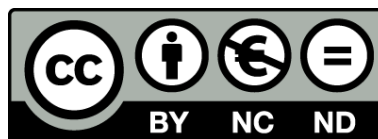




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nous actors moleculars en la fisiologia del teixit adipós i patologies associades

Rubén Cereijo Téllez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



B Universitat de Barcelona

Grup de Genètica i Biologia Molecular de Proteïnes
Mitocondrials i Patologies Associades
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia

Programa de Doctorat en Biomedicina

Nous actors moleculars en la fisiologia del teixit adipós i patologies associades

Rubén Cereijo Téllez
2015



B Universitat de Barcelona

Grup de Genètica i Biologia Molecular de Proteïnes
Mitocondrials i Patologies Associades
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia

Programa de Doctorat en Biomedicina

Nous actors moleculars en la fisiologia del teixit adipós i patologies associades

Memòria presentada per

Rubén Cereijo Téllez

per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Rubén Cereijo Téllez

Vist-i-plau dels directors:

Dr. Francesc Villarroya i Gombau

Dra. Marta Giralt i Oms

AGRAÏMENTS

INT. TAM-2 NIT

RUBÉN està assegut amb un ~~got de whisky de vi~~ de Nestea al centre d'un escenari il·luminat únicament per un focus, emulant la llum de la lluna. Vestuari: Americana esparracada, amb la camisa mal arreglada per sota. En silenci, derrotat, roman immòbil assegut a una cadira. Després d'uns segons, RUBÉN aixeca el cap, s'incorpora, mira a càmera. I comença a parlar mentre passeja d'un costat a l'altre.

First things first, vull agrair enormement al Cesc i la Marta el fet d'haver-me reclutat al TAM (que, dita així, és una expressió que ja fa molt per la temàtica d'aquesta tesi...). Si no ho haguessin fet mai, literalment, res del que vindrà a continuació d'aquesta línia concreta hagués passat. Quedant més que sobreentesa i agraïda l'experiència i els coneixements científics que m'han aportat sempre al llarg de tots aquests anys, així com tracte amable que en tot moment han tingut amb mi i amb la resta de companys, vull destacar que m'hagin ofert dues coses que no es pot dir de tots els supervisors i que personalment valoro: En primer lloc, llibertat, tant per a posar en pràctica les meves teories estrofolàries com per anar a la meua, tot demostrant-me que sense exigir res pots aconseguir molt. En segon lloc, confiança, ja que en moments de crisi sentir que algú creu i valora el que fas és una ajuda sense preu. Novament, moltes gràcies, això ja ho tenim! També cal agrair també a altres persones del departament la seva ajuda. En especial, a la Roser i la Teresa, per la seva ajuda variada amb els animals i altres qüestions, així com per les observacions en seminaris que sempre et fan veure les coses des d'una altra perspectiva. De la mateixa manera, a l'Octavi pels mateixos motius, i al Toni i a la Mercè per la seva ajuda.

(Pausa dramàtica. O s'ha oblidat del text. El cas és que es deté uns segons i continua.)

Què puc dir dels meus companys? Sou uns cracs!! De debò, amb totes les històries que se senten avui dia als grups de recerca, és un plaer poder compartir el dia a dia amb gent com vosaltres, que tant bon punt t'ajuden en el dia a dia com es presten a fer l'imbècil en una gravació que pràcticament no saben ni de què va. Com se sol dir, no vull pas destil·lar tots els anys que he passat amb cadascun de vosaltres en un parell de línies, de manera que...

...ho faré igualment. Josemi, haber sido tu *padawan* me ha marcado y no precisamente para mal. No, en serio, me has ayudado a ser más pragmático y a tomarme las cosas un poco menos en serio, que acaba siendo muy útil en la vida en general. ¡Hombre, y a grabar videacos! Aleix, només puc dir-te que "de gran vull ser com tu". No, de debò. En tots els anys que porto aquí sempre m'has ajudat quan t'ho he demanat i això és una cosa que no tothom pot fer com fas tu. Moltes gràcies per estar sempre allà. Anna, compartir grup amb una persona tan crack com tu és un honor, moltes gràcies per la teva disposició (fins i tot quan et fem fer tonteries...) i per la teva ajuda! Joan, *Joanillo*, què serien els dinars sense les teves converses surrealistes, profundes, *freaks* o tot alhora, però sempre estimulants. Dóna gust compartir estones dins i fora del lab amb algú com tu. Ibon, tu *flow* y optimismo son contagiosos, que es algo que en los días en que se nada sale como esperas cuesta de encontrar y te activa. Eres *lo más*. Montse, jo, que sóc un melón plus, sempre he flipat amb la teua velocitat mental, tant per coses de ciència com per a resoldre casos. Ara, el teu bon humor i saber que hi ha algú a hores intempestives per fer-nos companyia és realment lo que le da la calidad a la película. Ricardo, ¿qué te voy a decir que no te haya dicho ya? Eres un grande. Muchas gracias por ser mi compañero de fatigas, de charlas, de birras y de mamarracheces, pero, ante todo, por ser un amigo de puta madre. Tania, la amabilidad es una cualidad en peligro de extinción, pero a ti te sobra tanta que hasta se la regalas a los demás. Gente como tú hace no solo del TAM, sino también del mundo un sitio mejor. Perdón, un lugar rechido. Marion, my batokine partner in crime! Thank you for your experience, but especially for cheering us whenever things go wrong and always looking on the bright side of life (aand now I

won't be able to get the song out of my head...). Albert, cal que el món ho sàpiga: Aquest totxo que teniu entre les mans no seria el que és sense les mil immunos del infierno d'aquest fucking master! I no només per això, sinó també per ser... tu, què coi, no cal ser res més! Laura, quanta energia! Gent com tu és el que dona vida a un laboratori i el treu de la monotonia. Merci per muntar TAM-things. And last but not least, Merche, Celia, Samantha... fa poc que ens coneixem però ja puc dir que és un plaer haver-ho fet: Tinc ganes de veure com us aneu adaptant a la TAM freak life! I mencions especials als que ja no estan entre nosotros: Isis, jo no podria haver-nos aguantat cada dia durant tots els anys que vas estar, però tot i així ho vas aconseguir! I moltes gràcies en especial per preocupar-se de tot. David, tu motivación es contagiosa, tanto como la ilusión que pones en todo lo que haces, sea musical o científicamente. ¡Y yo que me alegro por poder compartirlo! Francesc, compartir ordinador i tesi és una cosa que, com saps, uneix molt les persones... Segueix a full per la France! Albert (l'altre...), "trobo a faltar els teus grups xungos a tot drap" és una cosa que no m'escollaràs dir mai, però la veritat és que ara ho recordo amb una inquietant nostàlgia. I, finalment, fer menció a tots els altres que potser han coincidit menys amb mi, però que m'han aportat, en major o menor mesura, el seu granet de sorra en aquesta etapa de la meua vida i només puc dir-vos: Gràcies.

RUBÉN para de caminar. Durant uns segons, mira a un punt indeterminat de l'objectiu. Però mira allò que dius "qué intenso mira", ¿eh?. Tot seguit, deixa de mirar, tanca els ulls uns segons i segueix amb la ~~xapa~~. Soliloqui.

No volia deixar d'agrair la comprensió i ajuda que durant tota aquesta aventura que ha estat la tesi m'han ofert els amics d'aquí i d'allà, que han comprès que en ocasions no em poguessin veure sense demanar explicacions. Tot i que al cap i a la fi, els cops en què sí pots és el que t'acaba salvant de la bogeria absoluta. Primer, moltíssimes gràcies a la meua panda frikis preferida, per tantes estones compartides: Sergio, Víctor, Carol, Helena, Toni i Xavi (vinga, que això ja ho tenim!). Com? Que falta algú? No, no, és que a l'Ivan a més d'això li he d'agrair que fos el fuckin' betatester de lectura d'això que teniu entre les mans sense saber ni de què anava! Ets el millor, perquè com a mínim ara podré dir que segur algú s'ha llegit la meua tesi! Segon, a la gent del fòrum, per les converses *in situ* o a distància de tota mena de temes durant tot aquest temps. PLOT TWIST: Us fico a VOSALTRES a la tesi. Moltes gràcies a tothom: timeywimeyers, tiets de la Míriam, cuatrerros, delinqüents i hojpibrunchers en general. La genètica no ho és tot. Finalment, no volia deixar-me sense agrair: Sergio, que ya son muchos años al pie del cañón, y ahí seguiremos por muchos más. Doctor Chamo: Figura, aguantar al puto *control freak* durante la carrera y después es un mérito, espero que todo te vaya genial a partir de ahora! I un agraïment molt especial a l'Àlicia, sense el suport i els ànims de la qual el melón que escriu això no hauria ni fet un batxillerat. Moltes gràcies per haver cregut en mi quan jo menys ho feia.

I, per descomptat, als meus pares, que fa molts anys que em coneixen i tal. No estariem aquí si no hagués estat per la vostra ajuda, possiblement la més desinteressada que es pot tenir. Gràcies per la paciència i per la comprensió. I als avis, que tot i que no podran fer-ho segur que els hagués fet il·lusió veure aquest totxet.

Sí, ha costat, però aquí estem. La ciència és així, exigent, però tot l'esforç val la pena per aquell petit instant en què veus que les peces del trencaclosques encaixen, tot pren sentit i crees coneixement. És un viatge cap al desconegut i sense xarxa, però, si n'hi hagués... *Where's the adventure?* Per sort, no he estat mai sol en el viatge. A tothom, moltíssimes gràcies, de debò.

Somriu. Amb parsimònia, deixa la copa. Fa una darrera mirada a càmera i es tomba cap al fons de l'escenari. Lentament, entre esgotat i feliç, s'allunya, xiulant. *Always look on the bright side of life, tun, turun, turururun...*

Fos a negre.

CRÈDITS INICIALS.

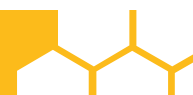


PRESENTACIÓ

La present tesi doctoral s'organitza segons la normativa vigent pel què fa al format de tesi com a compendi de publicacions establerta per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. Per aquest motiu, presenta la següent estructura:

1. Índex
2. Abreviatures
3. Introducció general
 - a. Revisió: Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans.
 - b. Revisió: Non-sympathetic control of brown adipose tissue.
 - c. Revisió: An endocrine role for brown adipose tissue?
4. Objectius
5. Informe dels codirectors de tesi sobre els articles publicats
6. Resum de resultats i discussió global
7. Conclusions
8. Bibliografia
9. Publicacions:
 - d. The molecular signature of HIV-1-associated lipomatosis reveals differential involvement of brown and beige/brite adipocyte cell lineages.
 - e. Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations.
 - f. Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue.
 - g. CXCL14 is a brown adipocyte-derived chemokine mediating the recruitment of alternatively-activated macrophages to adipose tissues upon thermogenic activation.
10. Apèndix:
 - h. A study of fatty acid binding protein 4 in HIV-1 infection and in combination antiretroviral therapy-related metabolic disturbances and lipodystrophy.
 - i. Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion.
 - j. Adipokines and the endocrine role of adipose tissues.

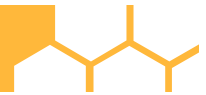
ÍNDEX



PRESENTACIÓ	11
ÍNDEX	13
ABREVIATURES	15
INTRODUCCIÓ GENERAL	19
1. El teixit adipós.....	19
1.1. L'epidèmia d'obesitat	19
1.2. Organització de l'òrgan adipós.....	19
1.2.1. Estructura de l'òrgan adipós en ratolins.....	20
1.2.2. Estructura de l'òrgan adipós en humans.....	21
1.3. Classificació dels adipòcits.....	24
1.4. Funcions de l'òrgan adipós.....	27
1.4.1. Adipòcits blancs: Emmagatzematge i mobilització de reserves	27
1.4.1.1. Lipogènesi	28
1.4.1.2. Lipòlisi	30
1.4.2. Adipòcits marrons: Funció termogènica	32
1.4.2.1. Termogènesi.....	32
1.4.2.2. Percepció i transmissió de l'estímul de fred.....	34
1.4.2.3. Activació de la termogènesi: Control noradrenèrgic.....	35
1.4.2.4. Producció de calor per part dels adipòcits marrons	37
1.4.2.5. Termogènesi adaptativa metaboloreguladora.....	38
1.4.3. Adipòcits beix/brite: Funció dual?	39
a) Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans	41
2. Diferenciació dels adipòcits	53
2.1. Diferenciació dels adipòcits blancs	53
2.1.1. Determinació.....	53
2.1.2. Diferenciació terminal	56
2.1.3. Adipòcit madur.....	59
2.2. Diferenciació dels adipòcits marrons	59
2.2.1. Determinació.....	60
2.2.2. Diferenciació terminal	61
2.2.3. Adipòcit madur.....	62
2.3. Diferenciació i transdiferenciació dels adipòcits beix/brite: <i>Browning</i>	63
2.3.1. Diferenciació a partir de cèl·lules precursoras bipotencials	64
2.3.2. Transdiferenciació d'adipòcits preexistents.....	65
2.3.3. Regulació del <i>browning</i>	66
2.3.4. Control no noradrenèrgic de l'activació dels adipòcits marrons.....	67
b) Non-sympathetic control of brown adipose tissue	71
3. El teixit adipós com a òrgan endocrí	79
3.1. Generalitats de la via biosintètica-secretora.....	79
3.2. El concepte d'adipocina.....	81
3.3. Funció secretora del TAB.....	82
3.3.1. Leptina	82
3.3.2. Adiponectina.....	83
3.3.3. Resistina	84
3.3.4. Altres adipocines	84
3.3.5. Àcids grassos lliures.....	85
3.3.6. Citocines i quimiocines	85
3.4. Funció secretora del TAMO	86
3.5. Funció secretora del TAM.....	86
c) An endocrine role for brown adipose tissue?.....	87

4.	Interaccions teixit adipós – sistema immunitari.....	95
4.1.	La resposta immunitària	95
4.1.1.	Comunicació intercel·lular, quimiotaxi i sistema immunitari.....	95
4.1.1.1.	CXCL14, una quimiocina d'especial rellevància al teixit adipós?	98
4.1.2.	Immunitat innata.....	101
4.1.3.	Immunitat adquirida	102
4.2.	Obesitat, inflamació i resistència a la insulina.....	103
4.3.	Infiltració immunitària al teixit adipós	108
4.3.1.	Cèl·lules de la immunitat innata al teixit adipós.....	108
4.3.1.1.	Macròfags M1 i M2	108
4.3.1.2.	Altres tipus cel·lulars de la immunitat innata.....	110
4.3.2.	Cèl·lules de la immunitat adquirida al teixit adipós	111
4.4.	Infiltració immunitària al TAM: Rellevància en la termogènesi	112
4.5.	Funció biològica de la infiltració immunitària al teixit adipós.....	115
5.	Lipodistròfies	116
5.1.	Malalties del teixit adipós.....	116
5.2.	Generalitats de les lipodistròfies	117
5.3.	Lipodistròfies d'origen genètic.....	119
5.3.1.	Lipodistròfia congènita generalitzada: Síndrome de Berardinelli-Seip	119
5.3.2.	Lipodistròfia parcial familiar.....	120
5.3.3.	Altres formes hereditàries de lipodistròfia	121
5.4.	Lipodistròfies adquirides.....	122
5.5.	Lipodistròfia associada a la infecció per VIH-1 i al tractament antiretroviral d'alta activitat.....	123
5.5.1.	Infecció per VIH-1 i teràpia HAART.....	123
5.5.2.	Simptomatologia de la HALS.....	125
5.5.3.	Bases moleculars de la HALS.....	126
5.5.4.	Nous fàrmacs antiretrovirals: La fi de la HALS?	129
	OBJECTIUS	131
	INFORME DELS CODIRECTORS DE TESI.....	135
	RESUM GLOBAL I DISCUSSIÓ GENERAL.....	141
	CONCLUSIONS	159
	BIBLIOGRAFIA	163
	PUBLICACIONS	189
	d) The molecular signature of HIV-1-associated lipomatosis reveals differential involvement of brown and beige/brite adipocyte cell lineages.....	191
	e) Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations	209
	f) Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue.....	221
	g) CXCL14 is a brown adipocyte-derived chemokine mediating the recruitment of alternatively-activated macrophages to adipose tissues upon thermogenic activation.	229
	APÈNDIX	283
	h) A study of fatty acid binding protein 4 in HIV-1 infection and in combination antiretroviral therapy-related metabolic disturbances and lipodystrophy	285
	i) Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion	297
	j) Adipokines and the endocrine role of adipose tissues.....	307

ABREVIATURES I SIGLES



A la següent taula es mostra una relació, per ordre alfabètic, de les principals abreviatures i sigles emprades en la memòria de la present tesi doctoral. Entre parèntesis s'indiquen variants de proteïnes amb les mateixes sigles. Entre claudàtors, abreviatures alternatives per al mateix concepte, si s'escau. El desenvolupament d'altres de menys freqüents es detallarà al text en el moment puntual de la seva aparició.

AdipoQ	Adiponectina	CXCR(x)	Receptor de CXCL (x = diversos números)
ADP	Difosfat d'adenosina	CytB	Citocrom b
AG	Àcid gras	DIO2	Tiroxina 5'-desiodasa de tipus 2
AGL	Lipodistròfia adquirida generalitzada	DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
AGPAT	Acilglicerolfosfat aciltransferasa	DNA	Àcid desoxiribonucleic
AMP	Monofosfat d'adenosina	EBF(x)	Factor primerenc de cèl·lules B (x=diversos números)
AMPc	AMP cíclic	ELOV	Elongasa d'àcids grassos de cadena llarga
AMPK	Proteïna cinasa activada per AMP	ELR	Motiu àcid glutàmic-leucina-arginina
APOH	Àrea preòptica de l'hipotàlem	eTAB	Teixit adipós blanc epididimal
APL	Lipodistròfia parcial adquirida	[eWAT]	
ARG1 [Arg1]	Arginasa 1	F4/80	Homòleg murí de l' <i>epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
ATGL	Lipasa de triglicèrids adipocitària	FABP4 [aP2]	Proteïna d'unió a àcids grassos 4
ATP	Trifosfat d'adenosina	FAS	Àcid gras sintasa [proteïna adipocitària 2]
β2M	β ₂ -microglobulina	FGF(x)	Factor de creixement fibroblàstic (x = diversos números)
BH	Lipomes de tipus "gep de búfal"	FOX(x)	<i>Forkhead box protein</i> (x = diverses formes)
BMI	Índex de massa corporal	FPLD	Lipodistròfia parcial familiar
BMP(x)	Proteïna morfogenètica òssia (x=diverses isoformes)	GLUT	Transportador de glucosa
CCL(x)	Lligand de tipus quimiocina amb motiu CC (x = diversos números)	GR	Receptor de glucocorticoides
CCR(x)	Receptor de CCL (x = diversos números)	HAART	Teràpia antiretroviral d'alta activitat
CD(x)	Cúmul de diferenciació (x = diversos números)	HALS	Lipodistròfia associada a la infecció per VIH-1 i a la teràpia HAART
cDNA	DNA còpia	HIF-1α	Factor induïble per hipòxia 1 alfa
C/EBP(x)	Proteïna d'unió a seqüència CCAAT i a potenciadors (x=diverses isoformes: α, β, δ)	HIV-1	Virus de la immunodeficiència humana de tipus 1
CGL [BSCL]	Lipodistròfia congènita generalitzada/Lipodistròfia congènita de Berardinelli i Seip	HSL	Lipasa sensible a hormones
CIDE(x)	Efector inductor de mort cel·lular similar al factor de fragmentació de DNA (x = diverses isoformes)	IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
Clec10a [CD301]	<i>C-type lectin domain family 10 member A</i>	IFNγ	Interferó gamma
CoA	Coenzim A	IgG	Immunoglobulina G
CREB	Element d'unió en resposta a AMP cíclic	IL-(x)	Interleucina (x = diversos números)
CTE	Cadena de transport d'electrons	ILC2	Cèl·lula limfoide innata de tipus 2
CXCL(x)	Lligand de tipus quimiocina amb motiu CXC (x = diversos números)	iNOS [Nos2]	Òxid nítric sintasa induïble
		iTAB [iWAT]	Teixit adipós blanc inguinal
		iTAM [iBAT]	Teixit adipós marró interescapular
		KO	<i>Knock-out</i>

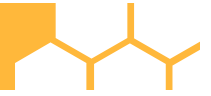
Abreviatures i sigles

KNG1	Cininogen 1	RT-qPCR	PCR a temps real (quantitativa) d'RNA retrotranscrit
LMNA	(Pre)lamina A/C (gen)	RXR	Receptor de retinoides X
LPL	Lipoproteïna lipasa	SA-β-Gal	Galactosidasa associada a senescència
LPS	Lipopolisacàrid	[GLB1]	
M1	Macròfag M1 (activació clàssica)	SIRT(x)	Sirtuïna (x = diferents isoformes)
M2	Macròfag M2 (activació alternativa)	SREBP-1c	Proteïna d'unió a elements reguladors d'esterols 1c
MAD	Displàsia mandibuloacral	[SREBF1]	
MAF	Fracció d'adipòcits madurs	STAT	Transductor de senyals i activador de la transcripció
MCAD	Deshidrogenasa de grups acil de cadena mitjana	SVF	Fracció de l'estroma vascular
MCP-1 [Ccl2]	Proteïna quimiotàctica per a monòcits 1	T2DM	Diabetis mellitus de tipus 2
MHCI / MHC II	Complexos principals d'histocompatibilitat I o II	TAB [WAT]	Teixit adipós blanc
Mrc1	Receptor de la mannososa	TAM [BAT]	Teixit adipós marró
[CD206]		TAMO	Teixit adipós del moll de l'os
mRNA	RNA missatger	TG	Triglicèrid
MSC	Cèl·lula mare mesenquimal	TGFβ	Factor de transformació tumoral beta
mtDNA	DNA mitocondrial	T₃	Triiodotironina
NA/NE	Noradrenalina	TH	Tirosina hidroxilasa
NADP(H)	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina, forma oxidada (forma reduïda)	T_H(x)	Limfòcit T col·laborador de tipus x (x = 1, 2, 17...)
NBL	Lipomes de tipus no "gep de búfal"	TNFα	Factor de necrosi tumoral alfa
NEFA	Àcid gras no esterificat	TR	Receptor d'hormones tiroïdals
NF-κB	Factor nuclear estimulador de la cadena lleugera kappa de cèl·lules B	T_{reg}	Limfòcit T regulador
NK(T)	Cèl·lula <i>natural killer</i> (T)	TRP	Canal catiònic de potencial de transició
p38 MAPK	Proteïna cinasa activada per mitògens p38	TZD	Tiazolidinediona
p53	Proteïna 53	UCP(x)	Proteïna desacobladora (x = diversos números)
PBS	Tampó fosfat salí	VIH-1	Virus de la immunodeficiència humana 1
PCNA	Antigen nuclear de cèl·lules proliferants	[HIV-1]	
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa	WNT(x)	<i>Wingless and int1 family</i> (x = diversos números)
PGC-1(x)	Coactivador de PPAR γ 1 (x = diferents isoformes: α , β)	ZFP	Proteïna amb dit de zinc
PI	Inhibidor de la proteasa del VIH-1	ZIC1	<i>Zinc finger of the cerebellum family member 1</i>
PKA	Proteïna cinasa A	ZMPSTE24	Zinc metal·loproteïnasa homòloga a STE-24 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PLIN(x)	Perilipina (x = diversos números)		
PPAR(x)	Receptor activat per proliferació peroxisomal (x = diferents isoformes: α , γ , δ)		
pRb	Proteïna del retinoblastoma		
PRDM16	<i>PR domain-containing 16</i>		
RAW 264.7	Macròfags immortalitzats <i>Raschke, Ralph and Watson 264.7</i>		
RBP4	Proteïna d'unió a retinol 4		
RE	Reticle endoplasmàtic		
RNA	Àcid ribonucleic		
RNA-seq	Seqüenciació de RNA		
ROS	Espècies reactives de l'oxigen		
RPKM	Lectures per kilobase per milió de lectures mapades		
RPMI	Medi <i>Roswell Park Memorial Institute</i>		



**INTRODUCCIÓ
GENERAL**

INTRODUCCIÓ GENERAL



1. El teixit adipós

1.1. L'epidèmia d'obesitat

En l'actualitat, el teixit adipós ha passat d'ésser considerat únicament un lloc d'emmagatzematge d'energia a esdevenir un òrgan complex, encarregat ja no tan sols de regular d'una forma activa l'homeòstasi energètica, sinó, a més, de dur a terme funcions endocrines de rellevància¹. Tot i que un òrgan adipós saludable duu a terme una sèrie de funcions vitals dins de l'organisme, el seu estudi, especialment en humans, ha estat sovint propiciat per disfuncions del mateix, ja en sigui per la seva manca (**lipodistròfies**) o, especialment, pel seu excés (**obesitat**).

L'obesitat s'ha convertit en les darreres dècades en un greu problema de salut pública que ha arribat a cotes d'epidèmia no només en països d'alt nivell socioeconòmic, sinó també en la major part de societats amb un nivell intermedi. La humanitat ha arribat a un punt d'inflexió en què els individus que es troben en una situació patològica per problemes de malnutrició excessiva superen els que ho estan per desnutrició, on més d'1,7 milers de milions de persones estan classificades com a obeses i el 65% de la població mundial resideix en països on el sobrepès i l'obesitat són responsables de més morts que la desnutrició^{2,3}. L'obesitat és actualment una causa principal de morbiditat, incapacitació i mortalitat prematura, ja que es correlaciona amb situacions d'hipertensió, resistència a la insulina, dislipidèmia, síndrome metabòlica i diabetis mellitus de tipus 2 (T2DM)⁴.

Fins el moment, els nombrosos esforços per a desenvolupar tractaments contra aquestes afeccions han presentat o bé una limitada eficàcia o una elevada invasivitat³. La cerca de nous mètodes que fixen el propi teixit adipós com a diana sobre la qual actuar per a tractar-les es perfila com una alternativa prometedora per als mateixos. És per aquests motius que, més que mai, l'estudi del teixit adipós està rebent en l'actualitat un creixent interès.

1.2. Organització de l'òrgan adipós

En humans i altres mamífers, l'òrgan adipós es pot dividir en dos tipus principals de teixit d'acord al seu aspecte visual aparent, els quals, al seu torn, disposen de funcions diametralment oposades: El **teixit adipós blanc** (TAB) i el **teixit adipós marró** (TAM). A més d'aquests, s'ha descrit l'existència del **teixit adipós del moll de l'os** (TAMO), el qual, no obstant, no està tan ben caracteritzat com la resta¹.

Al **TAB**, els adipòcits blancs emmagatzemen l'energia excessiva en forma de triglicèrids (TG), els quals es poden alliberar a la circulació en situacions de manca de nutrients com a mecanisme evolutiu per a sobreviure períodes perllongats entre àpats. Al **TAM**, els adipòcits marrons també emmagatzemen TG, però, en aquest cas, n'empraran les seves reserves i els derivats del TAB com a combustible per a generar calor mitjançant la dissipació d'energia en un procés conegut com a termogènesi no associada a tremolor¹.

La naturalesa del **TAMO** roman encara elusiva, donada la seva peculiar ubicació i un comportament erràtic respecte als altres teixits adiposos (per exemple, la seva massa s'incrementa en situacions de restricció calòrica). Actualment, es creu que realitza funcions sistèmiques i locals: A nivell sistèmic, en situacions de baixa disponibilitat de nutrients, s'afavoriria la diferenciació dels seus adipòcits en lloc de l'hematopoesi i l'osteogènesi, processos que requereixen elevades quantitats d'energia que es podran emprar per a funcions més crítiques per a l'organisme. D'altra banda, a nivell local, seria una font d'energia ràpidament accessible per a dur a terme aquests processos. En qualsevol cas, el TAMO resulta un component essencial del moll de l'os i la seva ablació és capaç de provocar desordres tant esquelètics com sistèmics^{5,6}.

1.2.1. Estructura de l'òrgan adipós en ratolins

En ratolins i altres múrids, l'òrgan adipós s'estructura en múltiples dipòsits que presenten una ubicació i una forma consistentes al llarg de la vida de l'animal. Aquests es poden classificar pel seu fenotip visual i funcional en dipòsits de TAB o de TAM, mentre que, per la seva ubicació, es poden separar en dipòsits **subcutanis** (ubicats sota la pell) o **viscerals** (ubicats entre les vísceres), els quals presenten entre si patrons d'expressió gènica similars però alhora diferents que retenen un cop escindits del seu dipòsit original, quelcom que ocorre tant en rosegadors com en humans^{7,8}. Els diferents dipòsits adipocitaris actuen de manera independent els uns dels altres, per la qual cosa es pot dir que el teixit adipós està, de fet, format per diferents "mini-òrgans"⁹. A més d'aquests dipòsits principals, també es pot constatar la presència d'**altres de més petits i dispersos**, sovint estretament vinculats a diferents òrgans i en contínua comunicació amb els mateixos, com ara els presents en forma de vetes entre les fibres musculars¹.

Tot i que alguns autors no consideren una divisió clara de TAM i TAB i, per tant, opten per designar els dipòsits d'una forma global¹⁰, freqüentment s'empren classificacions com la que es mostra a continuació (**Fig. 1**) com a criteri de conveniència a l'hora d'identificar els dipòsits principals¹¹:

Dipòsits de TAM:

- **Interescapular:** Dipòsit bilobulat simètric situat sobre les escàpules de l'animal. És el dipòsit de TAM de major mida. S'acostuma a emprar en experimentació com a dipòsit estàndard per a representar el TAM.
- **Cervical:** Dipòsit de forma allargada, inserit i envoltat per múscul a la zona profunda del coll.
- **Subescapular:** Dipòsit intramuscular ubicat sota les escàpules, també conegut com a **dipòsit axil·lar**.
- **Mediastinal:** Dipòsit intratoràctic, ubicat a la zona del mediastí. La massa principal d'aquest dipòsit envolta l'artèria aorta, per la qual cosa també se'l coneix com a **dipòsit periaòrtic**.
- **Perirenal:** Dipòsit visceral que envolta gran part de l'hil renal, a la zona aferent per a l'artèria renal i eferent per a l'urèter i per a la vena renal.

Dipòsits de TAB:

- **SUBCUTANIS:**
 - **Posterior subcutani:** Dipòsit unit a la capa dèrmica des de la zona de la pelvis i que s'estén en direcció ventral cap a les extremitats posteriors. Sovint aquest dipòsit es subdivideix en les porcions **dorsolumbar**, **inguinal** i **glútia**. El dipòsit inguinal s'acostuma a emprar en experimentació com a dipòsit estàndard per a representar el TAB subcutani.
 - **Dorsal subcutani:** Dipòsit de TAB ubicat sobre el TAM interescapular, amb el que conforma un continu. També se l'anomena cervical superficial.
 - **Anterior subcutani:** Dipòsit bilateral ubicat entre la pell i les fàscies posteriors dels músculs de la part proximal de les extremitats davanteres.
- **VISCERALS:**
 - **Perigonadal:** Dipòsit que envolta les gònades. En mascles rep el nom de dipòsit **epididimal** i, en femelles, **periovàric**. S'acostuma a emprar en experimentació com a dipòsit estàndard per a representar el TAB visceral.
 - **Retroperitoneal:** Dipòsit unit a la paret dorsal de l'esquena. Està encapsulat per una fina membrana que el separa del ronyó i del TAM perirenal.
 - **Cardíac:** Dipòsit de poc gruix, que envolta el cor estenent-se des del ventricle dret fins a l'apex.
 - **Mesentèric:** Dipòsit ubicat al mesenteri, delimitant la superfície intestinal.
 - **Omental:** Dipòsit intraabdominal de poc gruix disposat sobre la superfície de l'estómac.

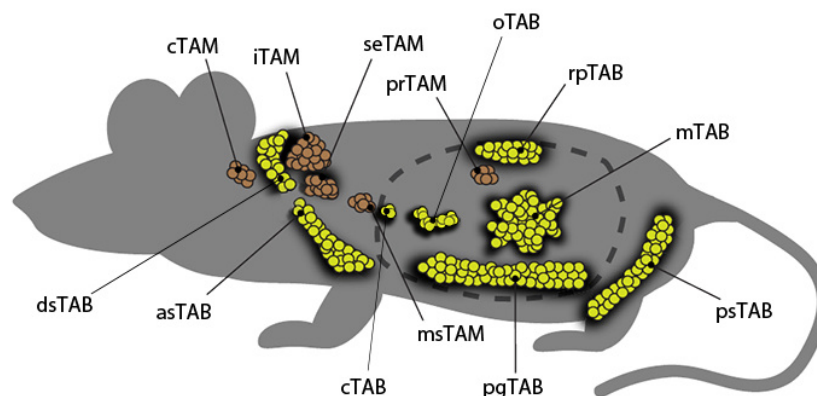


Figura 1: Principals dipòsits de teixit adipós en ratolins. Els dipòsits viscerals estan envoltats per una línia de punts. Dipòsits de TAM: cTAM: cervical, iTAM: interescapular, seTAM: subescapular, msTAM: mediastinal, prTAM: perirenal. Dipòsits de TAB: dsTAB: dorsal subcutani, asTAB: anterior subcutani, psTAB: posterior subcutani, cTAB: cardíac, oTAB: omental, rpTAB: retroperitoneal, mTAB: mesentèric, pgTAB: perigonadal. Adaptat de Ref. 103.

1.2.2. Estructura de l'òrgan adipós en humans

En humans, tot i que sí que es pot observar una divisió del TAB en els compartiments subcutani o visceral, l'establiment d'un fraccionament en dipòsits definits és menys clar, especialment en el cas del subcutani, el qual s'estén uniformement sota la dermis¹⁰. Sí existeixen, però, determinades regions on s'hi dona una acumulació preferencial. Es poden trobar, a més, marcades diferències entre sexes quant a l'acumulació de greix en aquestes regions, especialment paleses en situacions d'obesitat. Mentre que els homes tendeixen a fer-ho a la regió subcutània abdominal i al compartiment visceral (model d'obesitat **androide**),

en el cas de les dones serà a la regió subcutània gluteofemoral i, en menor mesura, al compartiment visceral (model **ginoide**). No obstant, aquestes diferències no són absolutes i podem trobar casos en què no es segueixi aquest patró¹².

Pel que fa al TAM, la seva existència ha estat reconeguda des de fa dècades en **nounats** humans: Es coneix que els nadons en disposen de prominents dipòsits, essent especialment destacable l'interescapular, els quals, com en el cas d'altres animals, actuarien per a generar calor durant el principi de la vida de l'individu. Aquest, però, s'aniria atrofiant amb l'edat i acabaria essent reemplaçat per TAB en l'edat adulta. Fins recentment, s'havia considerat, doncs, que els individus humans adults havien perdut tot el seu TAM. No obstant, existien evidències de què aquest podria no ser el cas. Aquest podia reaparèixer en situacions d'**aclimatació contínua al fred**, com ara en treballadors escandinaus que duïen a terme la seva feina a l'exterior¹³. Les catecolamines, importants activadores del TAM com veurem posteriorment, són sintetitzades en excés en un tipus de tumor de les càpsules suprarenals, el **feocromocitoma**. En pacients amb aquesta afecció es va poder observar que el TAB visceral proper a la zona estimulada per les mateixes adquiria un fenotip similar al del TAM¹⁴. Finalment, existia el coneixement de casos en humans d'un tipus de tumor benigne de molt baixa incidència, l'**hibernoma**, el qual resideix en dipòsits de TAB (tant subcutanis com viscerals) però està format, majoritàriament, per TAM¹⁵. Tanmateix, aquestes observacions de la presència de TAM en humans adults van ser considerades anecdòtiques i irrellevants durant molts anys.

A finals del segle XX, els oncòlegs començaren a emprar la tomografia d'emissió de positrons per captació de [¹⁸F]-desoxiglucosa (**FDG-PET**), la qual permet la detecció de la progressió tumoral mesurant la captació de glucosa marcada radioactivament per part de regions metabòlicament molt actives com és el cas dels tumors³. Fent servir aquesta tècnica acoblada a la tomografia computacional (**FDG-PET-CT-scan**), es podia apreciar la presència de patrons de captació de FDG en determinades regions, els quals es van considerar inicialment artefactuals però que es van acabar explicant d'una forma sorprenent: Aquestes zones enfosquides eren dipòsits de TAM, activats per l'estrès tèrmic de la sala radiològica, que normalment es confonien a tots els efectes amb el TAB^{16,17}. Aquestes observacions van ser àmpliament confirmades el 2009 a partir d'una sèrie d'estudis retrospectius a nivell clínic, histològic i molecular que van posar de manifest que aquelles regions que captaven grans quantitats de glucosa eren, efectivament, TAM. Aquest, coherentment, era estimulat pel fred, es correlacionava negativament amb l'índex de massa corporal (BMI) dels individus i, com es va comprovar més endavant, també negativament amb la seva edat¹⁸⁻²³.

Donat que, en la major part de casos, el TAM d'humans adults es troba inactiu en condicions de termoneutralitat, es va postular que, a diferència del TAM dels rosegadors aquest posseiria un caràcter **induïble** i s'activaria en situacions de demanda tèrmica. La resta del temps, però, romandria a tots els efectes actuant com un dipòsit de TAB, explicant així l'aparent involució del TAM neonatal, del qual un cert dipòsit sí que seria més semblant al TAM murí o **clàssic**²⁴. La identificació i caracterització, pràcticament en paral·lel a aquest ressorgiment del TAM en humans, de l'existència de dos tipus diferents d'adipòcits marrons amb capacitat per a produir calor va permetre identificar aquestes cèl·lules termogèniques del TAM humà adult i d'alguns dipòsits neonatals amb les d'aquest segon tipus²⁵.

En conclusió, l'òrgan adipós humà es pot classificar també en dipòsits de TAB i de TAM segons es mostra a continuació (**Fig. 2**)¹²:

Dipòsits de TAB:

- **Subcutani:** Comprèn el 80% del greix corporal. Repartit sota la pell. Es pot subdividir en dipòsits com ara l'**abdominal**, el **craniofacial** o el **gluteofemoral**.
- **Visceral:** Drenat per la vena porta. Es pot subdividir en els dipòsits **mesentèric**, **omental**, **pararenal** i **retroperitoneal**, i també s'hi pot englobar el TAB **pericàrdic**. En humans, el dipòsit omental és més extens que en rosegadors, mentre que, a diferència d'aquests, en individus de sexe masculí no existeix un dipòsit epididimal.

Dipòsits de TAM:

- **CLÀSSIC:**
 - **En nounats:** **Interescapular**, anàleg al present en rosegadors.
 - **En adults:** **Zona cervical profunda**, proper al múscul *longus colli*, única presència fisiològica confirmada de TAM clàssic en humans adults.
- **INDUÏBLE:** Present sota estímuls termogènics als dipòsits **supraclavicular**, **paravertebral**, **peritiroïdal**, **mediastinal/periaòrtic** i **perirenal/suprarenal**, així com a la **zona cervical intermèdia**. Aquests dipòsits estan presents tant en adults com en nadons, estant en aquest últim cas els supraclaviculars i els suprarenals més desenvolupats.

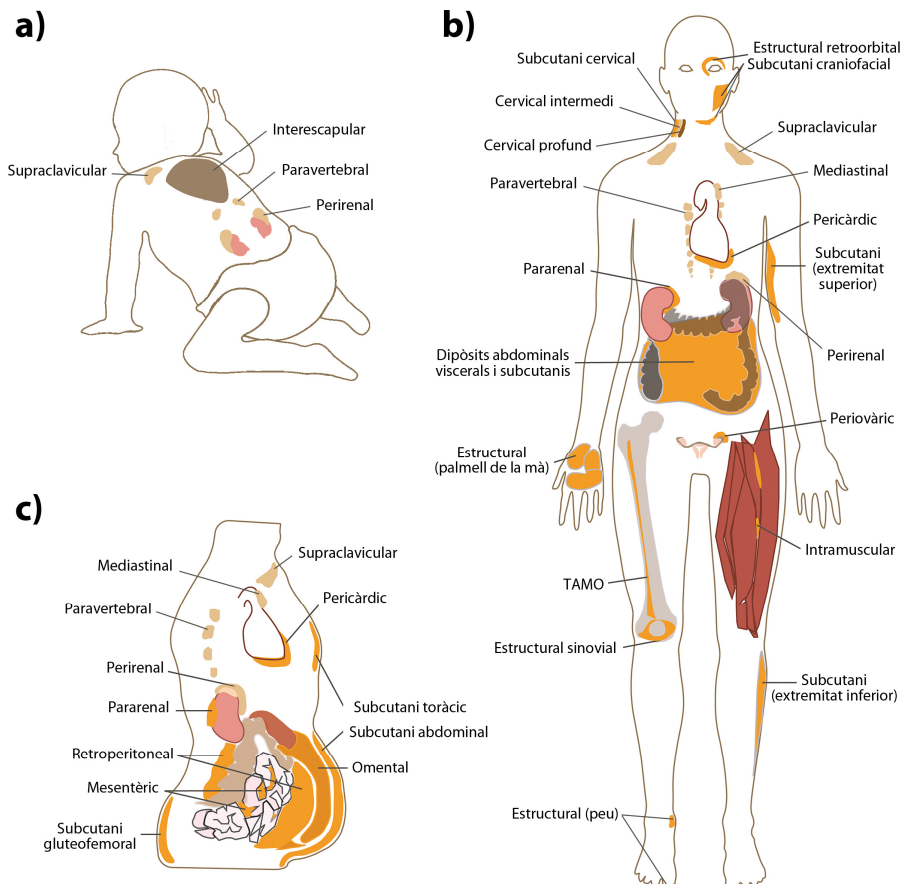


Figura 2: Principals dipòsits de (a) TAM en nounats humans i (b i c) de TAM i TAB en humans adults. La figura 2b mostra un pla frontal general i la 2c una secció toràcica-abdominal lateral. S'indiquen en taronja els dipòsits de TAB i de TAMO, en beix els de TAM induïble i en marró els de TAM clàssic. Editada a partir de *Ref. 21*.

1.3. Classificació dels adipòcits

Tots els organismes eucariotes, des dels llevats fins als éssers humans, són capaços d'emmagatzemar calories en forma de vesícules lipídiques. No obstant, únicament els vertebrats disposen d'unes cèl·lules especialitzades en fer aquesta funció, els **adipòcits**, que conformen la fracció cel·lular principal dels dipòsits de teixit adipós. Estructures com el cos greixós de les larves de *Drosophila* o les cèl·lules intestinals del nematode *Caenorhabditis elegans* podrien representar construccions homòlogues als adipòcits, o simplement podrien reflectir un fenomen d'evolució convergent. En cas de ser així, aquest estaria orientat vers la necessitat de disposar d'una reserva energètica en forma de molècules lipídiques les quals, en resultar potencialment tòxiques (**lipotoxicitat**), han d'ésser retingudes amb seguretat en recipients cel·lulars dedicats^{26,27}.

En tots els dipòsits adiposos, per tant, el tipus cel·lular majoritari en seran els adipòcits. Aquests, però, presentaran una morfologia i unes característiques fenotípiques concretes en funció del tipus i dipòsit al qual pertanyin i de la funció que hi desenvolupin, com es tractarà posteriorment. A més d'adipòcits, als teixits adiposos s'hi poden trobar altres tipus cel·lulars. Cèl·lules precursoras multipotencials, preadipòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials, neurones i cèl·lules del sistema immunitari (especialment innates, com ara els macròfags) acabaran de conformar el que es coneix com a fracció de l'**estroma vascular del teixit adipós (SVF)**, la qual es pot separar dels adipòcits emprant una digestió amb col·lagenasa seguida d'un protocol de flotació dels mateixos emprant baixes velocitats de centrifugació (un procés emprat, per exemple, per a obtenir preadipòcits i procedir amb cultius primaris dels mateixos)²⁸. Aquesta composició cel·lular, a més, podrà variar en funció del tipus de teixit adipós, del seu estat d'activació funcional i per alteracions patològiques del mateix^{1,29}.

Clàssicament, els adipòcits han estat classificats en dos subtipus diferents, en funció d'aquell tipus de teixit adipós al qual pertanyien i, en conseqüència, han rebut noms en concordança amb color del mateix (**Fig. 3**). Els **adipòcits blancs**, especialitzats en acumular TG com a reserva nutricional, es caracteritzen per disposar una única vesícula lipídica de gran mida (morfologia unilocular), la qual està envoltada pel citoplasma i provoca que el nucli i la resta d'òrgànuls quedin desplaçats a la perifèria cel·lular. D'altra banda, els **adipòcits marrons** són cèl·lules adipocitàries de menor mida que els adipòcits blancs altament especialitzades en dissipar en forma de calor l'energia química emmagatzemada en una gran quantitat de vesícules lipídiques (morfologia multilocular) gràcies a l'expressió de la proteïna desacobladora 1 (**UCP1**) a la membrana mitocondrial interna dels seus mitocondris, dels quals en presenten un nombre elevat³⁰.

En rosegadors sotmesos a exposicions perllongades al fred o a estímuls adrenèrgics, però, es pot detectar l'aparició dintre dels dipòsits de TAB d'agrupacions de cèl·lules UCP1⁺ amb una morfologia similar a la dels adipòcits marrons³¹. Es va poder comprovar que l'abundància d'aquestes cèl·lules variava dràsticament entre dipòsits, i que eren especialment nombroses al TAB inguinal i al retroperitoneal (ambdós dipòsits subcutanis) en comparació amb el perigonadal (un dels dipòsits viscerals)³². A aquests adipòcits amb un fenotip termogènic induïble que apareixien als dipòsits de TAB se'ls va assignar el nom d'**adipòcits beix**³³, en al·lusió al color cromàticament intermedi entre els dos tipus d'adipòcits descrits clàssicament, o **brite** (acrònim de "*brown-in-white*")³⁴, per la seva característica ubicació.

Adicionalment, se n'han proposat nomenclatures alternatives com ara les d'adipòcits multiloculars, adipòcits marrons induïbles o adipòcits marrons reclutables^{35,36} per tal de diferenciar-los dels adipòcits marrons *clàssics*, concepte que es va forjar per a designar aquells adipòcits marrons presents als dipòsits de TAM descrites clàssicament, en especial l'interescapular^{11,37}.

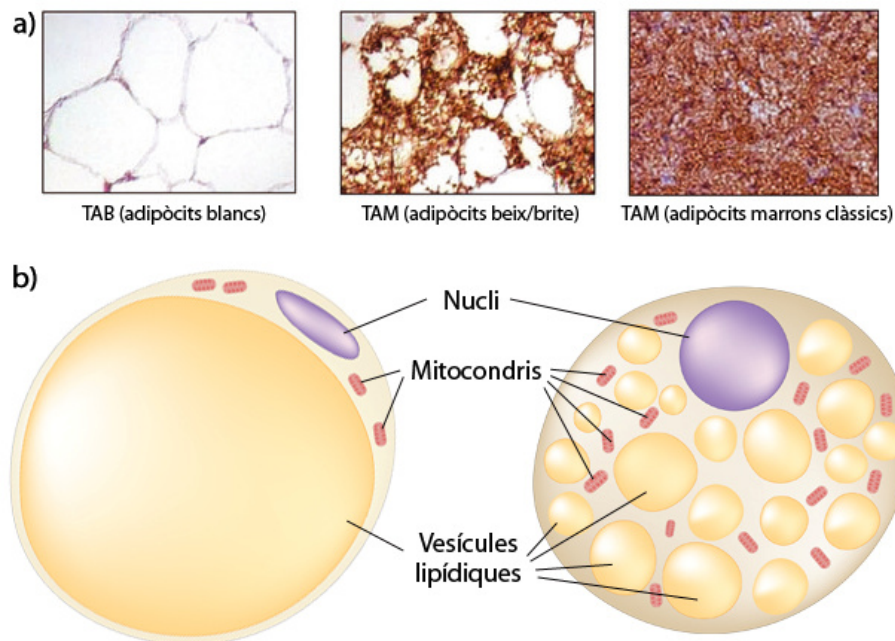


Figura 3 : **a)** Imatges immunohistològiques de dipòsits de TAB humà, TAM induïble humà i TAM clàssic murí tenyint-hi UCP1. Adaptades de Ref. 352. **b)** Representació esquemàtica d'un adipòcit blanc (esquerra) i d'un de marró (dreta) amb les seves característiques morfològiques principals. Adaptada de Ref. 193.

Els adipòcits beix/brite presenten característiques úniques, però alhora en comparteixen d'altres amb els adipòcits marrons clàssics. A més de l'expressió d'UCP1 a nivell transcripcional i proteic, tots dos tipus cel·lulars expressen el programa essencial de gens termogènics i de mitocondriogènesi característics dels adipòcits marrons^{11,37}. Adicionalment, s'ha pogut determinar l'existència de determinats marcadors característics d'adipòcits marrons clàssics, beix/brite o blancs^{11,37}. A la **taula I** es resumeixen les principals característiques descrites fins el moment en ratolins dels dos tipus d'adipòcit termogènic.

Característiques	Adipòcits marrons clàssics	Adipòcits beix/brite
Localització anatòmica	Dipòsits de TAM clàssic (iTAM, cTAM, seTAM, prTAM, mTAM)	Dipòsit inguinal de TAB, altres dipòsits subcutanis > viscerals
Morfologia	Multilocular	Unilocular/multilocular
UCP1 basal	Elevada	Baixa
UCP1 en l'estat activat	Elevada	Elevada
Termogènesi	Sí	Induïble
Mitocondris	Abundants	Abundants un cop estimulats
Vascularització dels seus dipòsits	Abundant	Abundant un cop estimulats
Marcadors específics	<i>Ucp1, Zic1, Lhx8, Eva1, Ebf3, Fbxo31</i>	<i>Ucp1, Tbx1, Tmem26, Tnfrsf9, Shox2, Cited1</i>
Potencial antiobesitat	Sí	Sí

Taula I: Comparativa de les principals característiques dels adipòcits marrons clàssics i beix/brite en ratolins. Adaptada a partir de Refs. 1 i 158.

Les anàlisis bioenergètiques realitzades sobre dipòsits de TAM i sobre dipòsits de TAB sotmesos a estímuls termogènics suggereixen que ambdós tipus cel·lulars són, efectivament, capaços de generar calor i que tenen desacoblada una considerable fracció de la seva respiració. Comparant adipòcits marrons i beix/brite clonalment purs es va poder comprovar, però, que els adipòcits marrons clàssics mostraven uns nivells basals d'expressió d'UCP1 i de desacoblament superiors als dels beix/brite abans dels estímuls, en els quals eren comparables als dels adipòcits blancs. Després de ser estimulats, però, els adipòcits beix/brite induïen UCP1 fins a nivells equiparables als dels adipòcits marrons clàssics³⁷. Aquest fet suggereix que els adipòcits beix/brite i els dipòsits que els contenen estan programats per a ser **bifuncionals**, és a dir, per a emmagatzemar energia en absència d'estímuls termogènics però essent completament capaços de passar a un estat generador de calor quan reben uns senyals adients. Així doncs, es va forjar el concepte de **browning** per a designar aquest procés d'aparició d'adipòcits beix/brite amb fenotip termogènic en dipòsits prèviament a tots els efectes de TAB^{1,30,38,39}.

Quant als adipòcits del moll de l'os, coneguts també com **adipòcits medul·lars** o **adipòcits grocs**, aquests són idèntics als adipòcits blancs a nivell morfològic (uniloculars, de gran mida), si bé presenten un nombre més elevat de mitocondris que aquests. Es creu que els adipòcits medul·lars derivarien de cèl·lules progenitores exclusives que es podrien diferenciar en adipòcits o osteoblasts en funció dels estímuls rebuts⁴⁰. Sorprenentment, un estudi recent va revelar que, a més, els adipòcits medul·lars murins mostraven l'expressió de gens característics dels adipòcits marrons. Aquesta disminuïa amb l'edat, juntament amb la d'altres de característics dels adipòcits blancs. A més, aquests adipòcits eren susceptibles de patir processos de *browning* en ésser tractats amb **tiazolidinediones (TZDs)**, compostos que es coneix que poden activar aquest procés com veurem posteriorment. Aquestes troballes, doncs, indiquen la possibilitat de l'existència d'adipòcits medul·lars beix/brite⁴¹. D'altra banda, en un model animal amb una situació de *browning* constitutiu dels dipòsits subcutanis, l'augment en la secreció de factors produïts pels adipòcits beix/brite -com ara la proteïna d'unió al factor de creixement similar a insulina-2 (**IGFBP2**)- afavoria l'osteogènesi⁴², quelcom que explicaria la necessitat d'un cert fenotip marró al TAMO però que, globalment, ha suscitat que es generin noves preguntes al voltant de la funció dels adipòcits medul·lars.

En humans, diverses anàlisis transcripcionals acurades de biòpsies de TAM van revelar que es podien detectar diferents tipus d'adipòcit marró a les mateixes, coexistint doncs a l'organisme adipòcits marrons i beix/brite. La presència d'un o altre tipus dependria de l'etapa ontogènica de l'individu i del dipòsit tractat. Aquesta presència d'adipòcits marrons clàssics i beix/brite en humans va originar una certa confusió en el seu estudi i nomenclatura, i el mateix va ocórrer en l'intent de trobar marcadors específics per a cada subtipus d'adipòcit marró com s'havia fet en ratolins. Una primera aportació a la present tesi doctoral fou l'elaboració d'una revisió sistemàtica de les publicacions recents que havien sorgit al respecte amb l'objectiu d'ordenar el creixent volum de dades sobre adipòcits marrons, beix/brite i blancs en humans, la qual es mostra al final d'aquesta primera secció de la introducció de la present memòria.

1.4. Funcions de l'òrgan adipós

A nivell global, l'òrgan adipós desenvolupa una sèrie de funcions diverses i d'importància. En primer lloc, ofereix una **protecció mecànica** a certs òrgans delicats, com ara l'ull, que està embolcallat per un coixí de greix, o a zones del cos exposades a elevades quantitats d'estrès mecànic, com és el cas del taló en humans. El teixit adipós realitza també una funció clau en la **regulació de la temperatura corporal** en organismes homeotermes: El TAB subcutani és capaç d'aïllar tèrmicament l'individu del medi exterior i el TAM de generar calor. En el cas d'alguns animals, com ara els mamífers marins, el teixit adipós n'ofereix **propietats hidrodinàmiques**. A més, aquest actua com a nexa entre dues funcions clau per a qualsevol ésser viu com són l'homeòstasi energètica i la **reproducció**, proporcionant-n'hi nutrients en èpoques de reproducció i secretant hormones que regulen l'eix hipotalàmic-hipofisiari-gonadal. Indubtablement, però, la funció primordial del teixit adipós en general és la d'actuar com a **regulador mestre de l'equilibri nutricional de l'organisme** i en la **coordinació** del mateix¹.

Tot seguit analitzarem en detall les funcions principals de cada tipus de teixit adipós, prenent com a base la cèl·lula adiposa que les dugui a terme: Els adipòcits blancs al TAB, els adipòcits marrons al TAM i els adipòcits beix/brite al TAB que ha passat per un procés de *browning*.

1.4.1. Adipòcits blancs: Emmagatzematge i mobilització de reserves

Que en un determinat individu es produeixi un emmagatzematge o un consum de les seves reserves energètiques vindrà determinat pel seu **balanç energètic**. Aquest es compon de l'energia incorporada (dieta) i de l'energia consumida, la qual es pot desglossar en la **taxa metabòlica basal** (consum energètic obligatori per a què l'organisme realitzi les seves funcions bàsiques) i la **despesa energètica**, que inclou la que es produeix per l'activitat física o per processos com ara la termogènesi adaptativa⁴³. De forma simplificada, aquest balanç energètic es pot expressar de la següent manera:

Balanç energètic = Energia incorporada – Energia consumida
--

Un resultat *positiu* d'aquest balanç, a causa, per exemple, d'una ingesta excessiva de carbohidrats en una situació en què les reserves de glicogen hepàtiques estiguin saturades o d'una baixa activitat física, provocarà l'emmagatzematge de TG. Mentre que el fetge i el múscul en poden emmagatzemar una reserva molt limitada i de ràpid consum, serà el teixit adipós l'encarregat de l'acumulació majoritària a llarg termini. Així, una necessitat d'emmagatzematge de reserves conduirà a una **hipertròfia** (deguda a un augment de la mida dels adipòcits) i a una **hiperplàsia** (deguda a un increment del nombre d'adipòcits diferenciats) del teixit adipós, la qual, al seu torn, es traduirà en un augment del pes de l'individu¹. D'altra banda, si aquest balanç és *negatiu*, el teixit adipós mobilitzarà les reserves de TG per tal que l'organisme pugui emprar-ne els àcids grassos lliures resultants com a substrat de la β -oxidació i actuïn com a combustible per a dur a terme les seves funcions vitals¹.

En humans a la societat actual, la tendència a què aquest equilibri es trobi desplaçat cap a un resultat positiu ha vingut afavorida per un increment en la disponibilitat quotidiana d'aliments d'alt contingut calòric, així com per a una disminució en la despesa energètica causada per un augment en la industrialització (disminuint la necessitat de llocs de treball que exigeixin un elevat nivell d'activitat física), a la urbanització i al desenvolupament del transport motoritzat³. Un altre factor que ha contribuït a disminuir la despesa energètica ha estat una reducció en l'exposició a variacions en la temperatura ambiental, especialment al fred estacional, degut a l'existència de sistemes de control de la mateixa. Per tant, l'establiment d'una temperatura de confort tèrmic en una zona del rang de termoneutralitat en què l'organisme no empra energia per a mantenir la temperatura corporal estable també n'afecta negativament la despesa⁴⁴.

1.4.1.1. Lipogènesi

La **lipogènesi** engloba els processos de síntesi d'àcids grassos i la consegüent generació de TG de reserva. Tot i que diversos tipus cel·lulars són capaços de dur a terme aquest procés, els hepatòcits i, en especial, els adipòcits, seran els més rellevants a aquests efectes⁴⁵. A la **Fig. 4** es resumeixen les reaccions i processos que es discutiran en aquesta secció.

Els lípids dietaris, essencialment TG i colesterol, seran incorporats al torrent sanguini per l'intestí en forma de quilomicrons. Al fetge, els excedents de carbohidrats es podran emprar per a sintetitzar TG a través d'aquest mecanisme de lipogènesi *de novo*, els quals podran ser exportats a la sang en forma de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). En qualsevol cas, els TG empaquetats podran acabar essent transportats al teixit adipós per a la seva reesterificació i emmagatzematge amb els generats pels adipòcits, o bé arribar a altres teixits perifèrics per a la seva oxidació immediata⁴⁶. En aquesta secció ens centrarem, no obstant, en el procés de lipogènesi *de novo* i de reesterificació de TG a l'adipòcit.

El requeriment inicial per a aquest procés és la condensació d'una molècula d'acetil-coenzim A (CoA), provinent del metabolisme catabòlic general, amb una de malonil-CoA, generada al seu torn a partir d'acetil CoA per acció de l'acetil-CoA carboxilasa. La cadena alifàtica de l'àcid gras serà elongada per acció del complex **àcid gras sintasa (FAS)** en una sèrie de reaccions de reducció a les quals, a cada cicle, s'hi afegiran dos carbonis provinents de molècules de malonil-CoA fins a l'obtenció de d'**àcid palmític**. Aquest servirà com a precursor d'altres àcids grassos de cadena llarga, els quals es generaran a partir de processos d'elongació i dessaturació seqüencial de diferents àcids grassos per acció, entre d'altres, d'enzims de la família d'elongases d'àcids grassos de cadena llarga (**ELOV**). Els àcids grassos generats d'aquesta forma, així com els obtinguts de la dieta, seran incorporats als fosfolípids de les membranes cel·lulars o esterificats per al seu emmagatzematge en forma de **TG**, també anomenats triacilglicerols, en funció de les necessitats de l'organisme. Aquestes molècules seran, de totes les opcions d'emmagatzematge, les que més energia podran aportar a l'organisme en ésser metabolitzades (aproximadament 38 kJ·g⁻¹)⁴⁶.

El primer pas en la biosíntesi de TG és l'acilació dels dos grups hidroxil lliures d'una molècula de glicerol 3-fosfat -generada per gliceroneogènesi per acció de la fosfoenolpiruvat carboxicinas- amb dues molècules d'acil gras-CoA, tot produint àcid fosfatídic, en una reacció catalitzada per glicerolfosfat aciltransferases (GPTAs) i acilglicerolfosfat

aciltransferases (**AGPATs**). Els diacilglicerols resultants es convertiran en triacilglicerols per esterificació amb una tercera molècula d'acil gras-CoA. Els àcids grassos incorporats a aquests TG podran variar en funció de diversos factors, com també ho farà el seu nombre de saturacions. Determinats enzims, com l'estearoil-CoA desaturasa-1 (**SCD1**) seran clau per a generar formes monoinsaturades dels àcids grassos i formaran part del programa fenotípic final de l'adipòcit madur⁴⁶. A nivell extracel·lular, la lipoproteïna lipasa (**LPL**) s'encarregarà d'hidrolitzar els TG presents als quilomicrons i a les VLDL, els quals, un cop incorporats a l'adipòcit, es podran reesterificar en forma de TG i ser gestionats com aquells produïts *de novo*⁴⁵.

La síntesi de TG té lloc al lumen del reticle endoplasmàtic. En tractar-se de molècules hidrofòbiques neutres, els TG tenen una tendència a unir-se i a formar agregats. Quan aquests agregats comencin a augmentar de mida es separaran del reticle endoplasmàtic i seran alliberats al citoplasma envoltats per una monocapa de fosfolípids –els quals associaran les seves cues hidrofòbiques a l'interior, també hidrofòbic–, colesterol, i diverses proteïnes ancorades. Aquestes estructures micel·lars reben el nom de **vesícules lipídiques**⁴⁷.

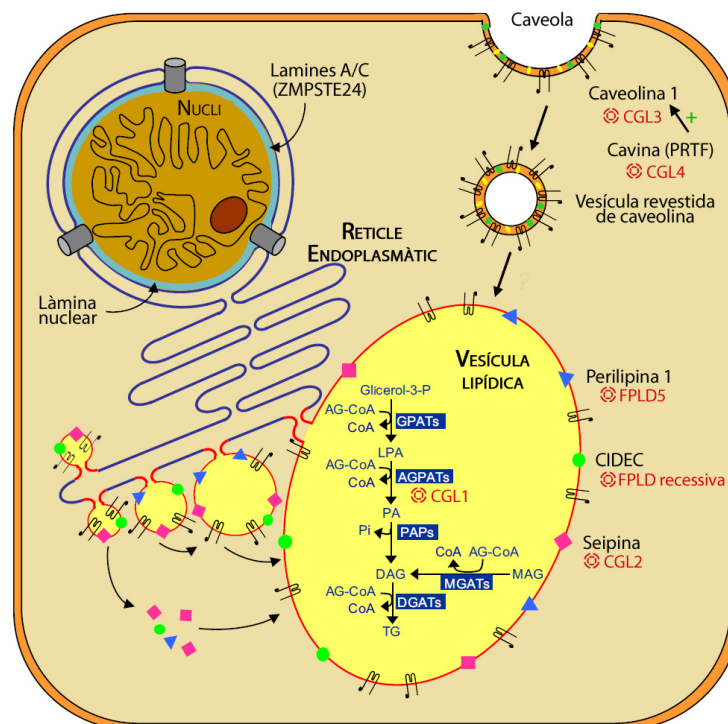


Figura 4: Representació esquemàtica dels principals esdeveniments que tenen lloc durant la lipogènesi i la formació de vesícules lipídiques. Les proteïnes indicades amb una diana vermella són proteïnes relacionades amb la lipogènesi i la vesícula lipídica que es troben mutades en determinades lipodistròfies d'origen genètic (veure secció 5 de la present Introducció). Adaptat de Ref. 356.

De manera anàloga al cas dels adipòcits, les vesícules lipídiques han passat d'ésser considerades cúmuls passius de lípids a òrgans ben estructurats i amb una regulació complexa. Entre les proteïnes que envolten la vesícula lipídica es destaquen l'adipofil·lina o les de la família de les **perilipines (PLIN)**, que seran rellevants a l'hora de gestionar l'accés a les mateixes en situació de necessitat energètica i durant el seu procés de formació⁴⁷. Mentre que els adipòcits marrons disposen de múltiples vesícules lipídiques, en el cas dels adipòcits blancs madurs aquestes acabaran fusionant-se en una de sola al final del seu procés de

diferenciació. D'altres, com la caveolina 1 (**CAV1**), estan implicades en el transport de TG a les vesícules lipídiques per a la seva incorporació a les reserves l'adipòcit. Per la seva part, la família dels efectors inductors de mort cel·lular similars al factor de fragmentació de DNA (CIDE), com ara **CIDEA** o **CIDEC**, també tindran un paper en el manteniment de la integritat de la vesícula. CIDEA en concret és un potent regulador de la fusió de les mateixes i un inhibidor de la lipòlisi el qual, en situacions d'alta demanda de la mateixa –com ara durant l'activació termogènica dels adipòcits marrons- serà reprimida a nivell transcripcional^{48,49}. La manca de qualsevol d'aquestes proteïnes de les vesícules lipídiques es traduirà en un fenotip poc funcional de l'adipòcit blanc madur, quelcom que, com tractarem posteriorment, conformarà la base molecular d'algunes lipodistròfies congènites⁵⁰.

La lipogènesi és un procés àmpliament regulat. A nivell nutricional, serà necessari un excés de glucosa circulant per tal que aquesta s'activi, en ésser aquest glúcid precisament un substrat de la lipogènesi *de novo*⁴⁵. La **insulina**, que presenta nivells plasmàtics elevats en aquestes situacions, en serà per tant un potent inductor hormonal. Una de les accions de la insulina és afavorir la translocació del **transportador de glucosa 4 (GLUT4/SLC2A4)** a la membrana dels adipòcits i permetre la seva incorporació com a reserva, quelcom que s'unirà a la resta d'accions anabòliques transduïdes per acció del seu receptor de tipus tirosina cinasa. Coherentment, el dejuni i concentracions elevades de glucagó inhibiran aquest procés afavorint, en canvi, la lipòlisi. Altres proteïnes, com ara l'hormona de creixement, en seran també reguladores positives⁴⁵. A nivell transcripcional, les **proteïnes d'unió a elements reguladors d'esterols**, especialment la seva forma **1c (SREBP-1c/SREBF1)**, seran clau en el control de l'expressió de gens com el de la FAS o el de la leptina. Aquest factor de transcripció és sintetitzat inicialment com a un precursor, el qual resideix al reticle endoplasmàtic i és processat per a esdevenir actiu en presència de l'estímul de la insulina^{51,52}. Com veurem posteriorment, SREBP-1c també tindrà un paper rellevant en l'adipogènesi, tot enllaçant la diferenciació de l'adipòcit amb la seva competència funcional.

1.4.1.2. Lipòlisi

En situacions de manca energètica, com ara el dejuni o l'exercici perllongat, l'organisme enviarà determinats senyals als adipòcits blancs i aquests procediran a activar el procés de **lipòlisi**. Aquesta via catabòlica implicarà essencialment la conversió dels TG emmagatzemats en àcids grassos lliures no esterificats (**NEFA**) i glicerol per acció de lipases, els quals seran alliberats a la circulació i, a través de la sang, arribaran als teixits diana. Un cop allà, seran internalitzats i esdevindran així substrats per a la β -oxidació i, per tant, fonts d'energia⁵³.

Diversos senyals hormonals i farmacològics són capaços de regular a l'alça o a la baixa la lipòlisi actuant a través de diverses vies de senyalització específiques en a cada cas. No obstant, l'estímul inductor clàssic ve mediat per l'acció de l'**adrenalina** o de la **noradrenalina** sobre els receptors adrenèrgics α_1 i β ⁵⁴. En la secció corresponent a l'activació dels adipòcits marrons s'explicarà en detall la cascada de transducció de senyals que té lloc partint de la interacció de l'agonista adrenèrgic amb el seu receptor, en ésser aquest també el punt clau en l'inici de l'activació del programa termogènic. Per tant, a la present secció ens centrarem en els esdeveniments que condueixen de manera directa a la lipòlisi de les reserves lipídiques.

Independentment de la via emprada, el senyal lipolític acabarà activant una proteïna cinasa determinada, la qual fosforilarà i activarà la **lipasa sensible a hormones (HSL)** i la

perilipina A, fet que n'alterarà l'estructura conformacional. D'aquesta manera es permetrà l'accés a la vesícula lipídica a l'HSL i a altres lipases, ja que, en condicions basals, la perilipina A que les recobreix evita precisament aquest accés⁵⁵. Addicionalment, una proteïna específica dels adipòcits, la **proteïna d'unió a àcids grassos 4** o **proteïna adipocitària 2 (FABP4/aP2)**, s'unirà a l'HSL i serà instrumental en aquest accés a les reserves lipídiques. D'altra banda, la FABP4 també durà a terme en aquesta situació la seva funció més coneguda: Unir-se a NEFAs i contribuir al seu transport a la membrana plasmàtica per a la seva posterior alliberació⁵⁴.

Un cop activada, l'HSL activa podrà hidrolitzar tant TG com diglicèrids i monoglicèrids fins a l'estat de glicerol i NEFAs⁵³. A més de l'HSL, altres lipases participaran en la lipòlisi un cop accessibles els TG. La triglicèrid lipasa adipocitària (**ATGL**) hidrolitzarà els TG a diglicèrids i un NEFA. La monoglicèrid lipasa (**MGL**), d'altra banda, s'encarregarà d'hidrolitzar monoglicèrids en glicerol i àcid gras lliure. L'HSL, per tant, realitza una funció combinada i sinèrgica amb aquestes altres lipases per tal d'alliberar grans quantitats de NEFAs al torrent sanguini⁵³ (**Fig. 5**). A nivell extracel·lular, la LPL s'encarregarà d'hidrolitzar els TG presents en les lipoproteïnes transportadores i, per tant, afavorir la incorporació de NEFAs a la cèl·lula per tal d'ésser oxidats. Tot i que aquesta acció té lloc a les cèl·lules perifèriques, els adipòcits també expressen nivells elevats de LPL i, per tant, seran també capaços d'incorporar als seus TG àcids grassos provinents de l'exterior cel·lular⁵⁶. Això resultarà especialment interessant en el cas dels adipòcits marrons i, encara més, en el dels beix/brite, en atorgar-los la capacitat d'emprar els NEFAs provinents dels adipòcits blancs com a substrat per a la termogènesi.

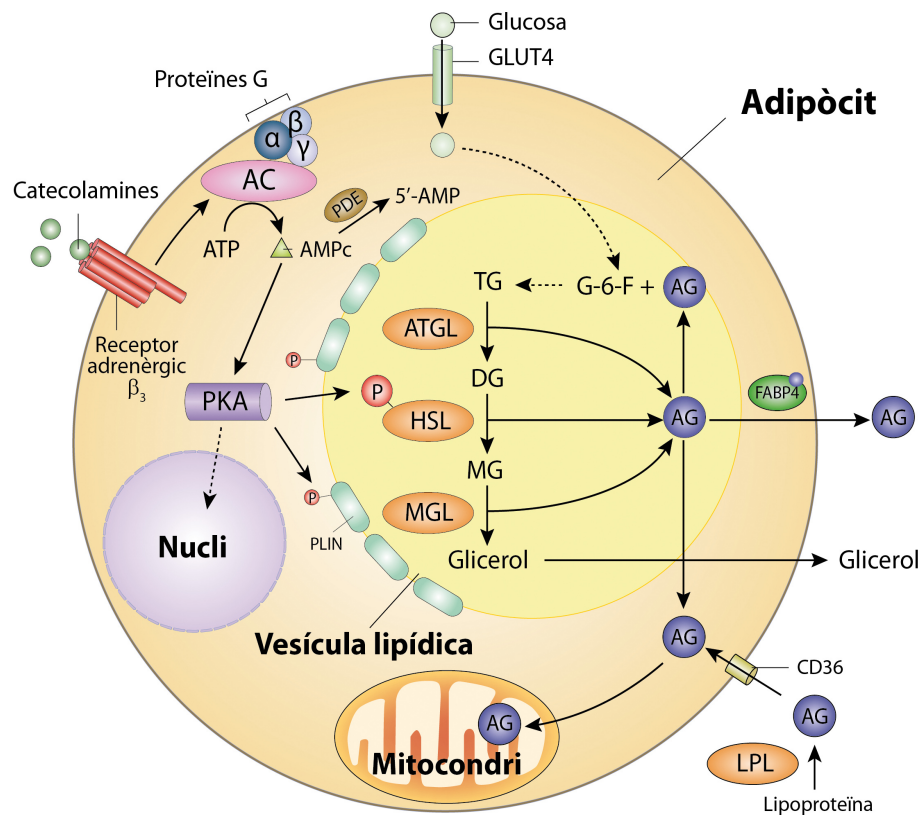


Figura 5: Cascada de senyalització i accés a les vesícules lipídiques per part de lipases durant l'activació de la lipòlisi. AC: Adenilat ciclasa. PDE: Fosfodiesterasa. AG: Àcid gras. Adaptada a partir de Refs. 24 i 54.

A les cèl·lules diana, els NEFAs seran incorporats al citosol per acció de proteïnes de membrana, com ara el transportador anomenat cúmulo de diferenciació 36 (**CD36**). Allà, a través de la llançadora de carnitina i per acció de la carnitina-palmitoil transferasa 1 (**CPT1**), els àcids grassos seran incorporats al mitocondri, on hi tindrà lloc la β -oxidació dels mateixos i la fosforilació oxidativa⁵⁴. D'aquesta manera, la cèl·lula podrà produir trifosfat d'adenosina (**ATP**) per a les seves necessitats energètiques o, en el cas de l'adipòcit marró o beix/brite, calor, com procedirem a analitzar a continuació.

1.4.2. Adipòcits marrons: Funció termogènica

L'existència del TAM va ser descrita per primer cop en petits mamífers i en nadons humans com a **sistema d'adaptació per a combatre el fred tot produint calor**. A causa de la seva funció en el manteniment de la temperatura corporal d'animals que hibernen, el TAM fou anomenat inicialment "glàndula d'hibernació"⁵⁷⁻⁵⁹. El TAM, de fet, existeix únicament en mamífers i, evolutivament, es creu que pot haver suposat un avantatge per a sobreviure a períodes de fred hivernal, per a poder romandre actius durant la nit i per a adaptar-se a la supervivència en dietes deficientes en macronutrients essencials⁵⁹.

El TAM es compon principalment d'adipòcits marrons, si bé al si dels seus dipòsits existeix també una elevada presència de preadipòcits, neurones i cèl·lules endotelials per tal que aquest pugui dur a terme la seva funció en situacions de demanda calorífica⁶⁰. Els dipòsits de TAM clàssic es troben densament innervats i irrigats, a diferència dels dipòsits de TAB, que acostumen a estar-ho en menor mesura⁵⁹. L'activació de la termogènesi dels adipòcits marrons està controlada per fibres nervioses de tipus noradrenèrgic que estenen sinapsis sobre els mateixos, i, conjuntament, serà el sistema nerviós qui percebi principalment la necessitat de producció de calor, com es discutirà en detall posteriorment. Al seu torn, el TAM necessita un rec sanguini continu per part dels capil·lars que envolten els adipòcits marrons per tal que, per una banda, aquests puguin emprar l'oxigen i el combustible (glucosa i lípids) que la sang els aporta, i, per una altra, transmetre el seu producte energètic principal, la calor, al llarg de l'organisme en forma de sang eferent a una temperatura més elevada que l'aferent. És en aquest punt on entra en joc el sistema vascular d'aquest teixit adipós⁵⁹.

Tot i que ens centrarem en la descripció d'aquests processos principalment als dipòsits de TAM clàssic, especialment a l'interescapular, on han estat més àmpliament estudiats, en el cas del procés de *browning* que pateixen els dipòsits de TAB per acció dels adipòcits beix/brite en una situació de demanda termogènica aquests processos en seran anàlegs. Per tant, tret que se n'especifiqui alguna diferència puntual, el terme "adipòcits marrons" farà referència a tots els efectes funcionals tant als *clàssics* com als *induibles* (és a dir, als adipòcits beix/brite).

1.4.2.1. Termogènesi

Quan un animal homeoterm, inclosos els humans, s'exposa a baixes temperatures ambientals, esdevé necessària una aportació addicional de calor per tal de compensar l'increment de transferència tèrmica de calor amb l'entorn i mantenir així estable la seva temperatura corporal. El rang de temperatures ambientals entre les quals no s'indueixen mecanismes de regulació de la temperatura corporal a l'alça (**termogènesi**) o a la baixa

(**dissipació evaporativa de calor**) s'anomena **zona de termoneutralitat** (TNZ), i serà on la taxa metabòlica de l'individu es trobi a nivells basals⁴⁴. En el cas del fred, la temperatura a partir de la qual és necessària aquesta aportació de calor es situa per sota del límit inferior de la TNZ, que, en la major part d'espècies, estarà per sota dels 30 °C⁵⁹. La necessitat d'aportació calorífica d'un animal dependrà, a més, de diversos factors, com ara la magnitud de la disminució tèrmica de l'entorn o de la seva mida^{59,61}.

En una exposició al fred de curt termini l'organisme activarà processos de **conservació de la temperatura corporal**, tals com la vasoconstricció perifèrica, o d'elevació activa de la seva temperatura corporal, essencialment per **tremolor**⁶². En resposta als estímuls termosensorials processats per l'hipotàlem, aquest elaborarà una resposta simpàtica que actuarà sobre el múscul esquelètic, de manera similar a com es detallarà posteriorment per al cas del TAM⁶³. Aquesta resposta es traduirà en una sèrie de contraccions rítmiques i involuntàries del mateix que serviran per a generar calor^{63,64}. Durant la tremolor es poden observar dos patrons electromiogràfics diferents, corresponents a la contracció de dos tipus de fibres musculars que originaran al seu torn dues cadències de tremolor: Per una banda, es produirà una tremolor contínua de baixa intensitat, relacionada amb el reclutament de fibres de tipus I -més anaeròbiques, especialitzades en l'ús de glucosa com a combustible-. Per una altra, es manifestaran brots de contraccions d'alta intensitat associats amb fibres de tipus II -més aeròbiques, especialitzades en l'ús de lípids-. Ambdós tipus es coordinaran per tal de garantir la producció de la màxima escalfor possible tot comproment al mínim la funció de l'aparell locomotor^{62,65}. Aquest mecanisme requerirà, doncs, una generació continuada i estable d'ATP als miòcits per tal que la miosina hi pugui realitzar la seva funció contràctil, quelcom que aconseguirà a partir del consum preferencial d'hidrats de carboni, lípids i, addicionalment, proteïnes quan les reserves de glicogen i de TG es vegin reduïdes⁶².

Tot i ser important per a temps curts, la termogènesi per tremolor resulta a llarg termini incòmoda i insuficient: Si un animal no disposa d'unes capacitats muscular, pulmonar i cardiovascular suficients per tal de resistir aquesta contracció muscular contínua i garantir una aportació suficient de combustibles, nutrients i oxigen al múscul esquelètic, aquest s'esgotarà i l'animal acabarà per defallir per hipotèrmia⁵⁹. És en aquest punt quan, en mamífers, passa a ser clau l'activació de la **termogènesi no associada a tremolor** o **termogènesi adaptativa termoreguladora**.

Els estímuls de fred perllongats condueixen a una activació i a un reclutament del TAM, entenent com a *activació* els fenòmens que porten a un increment en la capacitat de producció de calor del mateix (en contraposició a la *inactivació*) i com a *reclutament* les alteracions coordinades que tenen lloc al teixit i que augmenten la capacitat màxima del teixit per a produir la termogènesi (en contraposició a l'*atròfia* del mateix)⁵⁹. El teixit, per tant, esdevindrà més actiu funcionalment (produirà més calor) i hi haurà un reclutament cel·lular més elevat: un increment del nombre d'adipòcits marrons (a causa de la hiperplàsia i diferenciació de cèl·lules precursoras), així com un grau superior d'expressió dels gens termogènics als mateixos i la coordinació d'altres tipus cel·lulars implicats en el TAM, com ara les del sistema immunitari o les de l'endoteli vascular⁵⁹. Als dipòsits de TAB, activació i reclutament, que inclouran en aquest cas la diferenciació dels adipòcits beix/brite i la seva activació del fenotip termogènic en lloc del de reserva, conduiran a l'aparició dels fenòmens de *browning*^{36,66}.

En les següents seccions es descriuran en detall els mecanismes fisiològics i moleculars que condueixen a aquesta activació de la termogènesi no associada a tremolor.

1.4.2.2. Percepció i transmissió de l'estímul de fred

En mamífers, la temperatura corporal està coordinada a nivell central per l'**hipotàlem**, i, més concretament, per l'àrea preòptica (APOH)⁶⁷. Les cèl·lules responsables d'efectuar respostes a canvis en la temperatura són essencialment les neurones GABAèrgiques i glutamatèrgiques presents a l'APOH, les quals són capaces d'activar-se espontàniament en situacions d'increment o reducció de la temperatura central⁶⁸. Al seu torn, l'APOH rep estímuls de les neurones termosensibles perifèriques, especialment de les presents a la pell (**Fig. 6a**). Aquestes poden detectar canvis en la temperatura exterior i enviar la informació a l'APOH a través de l'àrea preòptica mitjana de l'hipotàlem⁶⁸, quelcom que poden dur a terme per la presència a la seva membrana plasmàtica de canals catiónics de potencial de transició (TRPs) que els permeten sentir el fred (TRPA1 i TRPM8) o la calor (TRPV3 i TRPV4)⁶⁹.

Un cop percebut l'estímul tèrmic, el senyal nerviós aferent serà transmès pels axons neuronals perifèrics i arribarà finalment a l'APOH, des d'on se'n coordinarà una resposta eferent (**Fig. 6b**). Altres regions, com ara el nucli ventromedial de l'hipotàlem, un centre regulador del metabolisme, són capaços de potenciar l'estímul en desinhibir-se per acció dels estímuls de fred, i enllacen el TAM amb una funció metabòlica controlada a nivell central⁵⁹. A l'APOH, aquests senyals captats per les neurones termosensibles al fred seran transmesos a través d'interneurones capaces d'inhibir un circuit inhibitori que, en condicions de manca de necessitat termogènica, mantenen la senyalització cap al TAM inactiva. El resultat d'aquesta desinhibició serà la transmissió d'una resposta. Per la seva banda, els estímuls de calor seran capaços de potenciar encara més aquesta inhibició, garantint així que en situacions d'excés tèrmic no s'activin aquests mecanismes⁶⁸.

El senyal desinhibit arribarà al nucli pàl·lid rostral del rafe i a l'àrea parapiramidal del bulb raquidi, les quals projectaran el senyal a través dels seus axons per la medul·la espinal fins a les neurones simpàtiques preganglionars del teixit adipós (**Fig. 6c**). Si bé diversos neurotransmissors seran capaços de modular positivament o negativament tot aquest procés de transmissió del senyal central eferent, l'estímul seguirà amb l'activació de neurones colinèrgiques i culminarà amb l'activació del conjunt de neurones simpàtiques noradrenèrgiques que innerven el teixit adipós^{59,68}. Entre aquestes, se n'ha descrit la presència de dos tipus diferents: Un tipus conté neuropèptid Y (NPY) i els enzims de síntesi de noradrenalina –com ara la **tirosina hidroxilasa (TH)**–. L'altre, però, només disposa dels enzims de síntesi de noradrenalina. Mentre que les primeres innervaran la vasculatura del teixit adipós i estaran implicades en la correcta expansió i, per tant, en la funcionalitat del mateix indirectament, seran les del segon tipus les que innervaran directament els adipòcits marrons i que, per tant, contribuiran directament a l'activació del procés termogènic⁵⁹.

Tot i que la percepció dels estímuls tèrmics té lloc, com hem vist, gairebé totalment a nivell nerviós, recentment s'ha descrit tant en cèl·lules aïllades de ratolins com d'humans que els adipòcits beix/brite, però no els marrons clàssics, són capaços de percebre ells mateixos canvis en la temperatura del seu entorn i induir el programa termogènic. Aquest fet peculiar es podria deure a l'expressió d'alguns TRP a la membrana dels mateixos, i s'explicaria com un

mecanisme característic dels adipòcits de dipòsits subcutanis complementari a la percepció nerviosa per tal de captar estímuls de fred⁷⁰.

1.4.2.3. Activació de la termogènesi: Control noradrenèrgic

La **noradrenalina** o **norepinefrina**, un neurotransmissor del grup de les catecolamines, és l'inductor per excel·lència de l'activitat del TAM. Majoritàriament, la noradrenalina que actuarà sobre els adipòcits provindrà d'aquests terminals nerviosos. Recentment, però, s'ha descrit que la contribució d'un subtipus determinat de macròfags a aquesta producció de noradrenalina seria també rellevant per a una correcta funció del TAM⁷¹, com es discutirà en detall posteriorment. A la **Fig. 6d** es detalla, de forma global, el procés d'activació noradrenèrgica de la termogènesi.

Els adipòcits marrons expressen a la seva membrana plasmàtica receptors adrenèrgics de tots tres subtipus: α_1 , α_2 i β ⁵⁹. D'entre aquests, el **receptor adrenèrgic β_3** és el que s'expressa majoritàriament als adipòcits marrons madurs i el que estarà més fortament implicat en la funció termogènica⁵⁹. Els receptors adrenèrgics β_1 i β_2 , si bé s'expressen al TAM, ho fan en menor mesura. El receptor β_1 no està acoblat als processos de senyalització en els adipòcits marrons clàssics madurs, però sí que contribuirà a incrementar la concentració intracel·lular del segon missatger AMPc (monofosfat d'adenosina cíclic) dels seus preadipòcits i, per tant, serà rellevant en l'expansió del teixit en situacions de necessitat d'hiperplàsia⁷². Pel que fa al receptor β_2 , aquest no s'expressa en els adipòcits marrons madurs, però sí en d'altres tipus cel·lulars dins del teixit, com ara les cèl·lules endotelials⁷³. La presència de receptor adrenèrgic β_3 , no obstant, no és exclusiva del TAM: Al TAB, els adipòcits blancs i beix/brite també expressen aquest receptor, que en serà clau per a poder iniciar la lipòlisi de les seves reserves i l'activació de la termogènesi en situacions que així ho requereixin³².

Els receptors adrenèrgics β són receptors acoblats a proteïnes G amb 7 dominis transmembranals. Concretament, els receptors β estan normalment acoblats a proteïnes G del subtipus G_s , i, en adipòcits marrons madurs, la forma $G_s\alpha_S$ n'és la majoritària⁷⁴. A més de al subtipus G_s , els receptors β_3 en concret es poden acoblar a proteïnes G del subtipus inhibitori G_i ⁷⁵. Aquest fet els permetria conduir el senyal de l'estímul noradrenèrgic també cap a la via de les cinases activades per mitògens (MAPK), a més d'actuar com a mecanisme per a autolimitar l'acció de l'AMPc un cop produït l'estímul inicial⁵⁹, ja que els receptors β_3 , a diferència dels β_1 i dels β_2 , presenten una capacitat de dessensibilització reduïda, probablement per tal de poder perllongar l'estímul termogènic durant períodes perllongats d'exposició al fred^{76,77}.

En produir-se la unió de la noradrenalina al receptor β -adrenèrgic, les proteïnes G transmeten aquesta informació i s'activa l'**adenilat ciclase**. Aquest enzim catalitza la ciclació del monofosfat d'adenosina (AMP) a AMPc a partir d'ATP (trifosfat d'adenosina). En adipòcits marrons madurs, aquesta activació de l'adenilat ciclase està totalment canalitzada per acció del receptor β_3 ⁷⁸. Un cop generat, l'AMPc activarà la capacitat catalítica de la **proteïna cinasa A** (PKA), que fosforilarà les seves proteïnes diana per tal de prosseguir amb la inducció dels gens clau de la termogènesi. Si bé la concentració d'AMPc és capaç de modular altres vies de senyalització, en adipòcits marrons la via principal que s'activarà serà la de la PKA, ja que s'ha descrit que els inhibidors d'aquest enzim són capaços de bloquejar-hi la termogènesi^{59,79}.

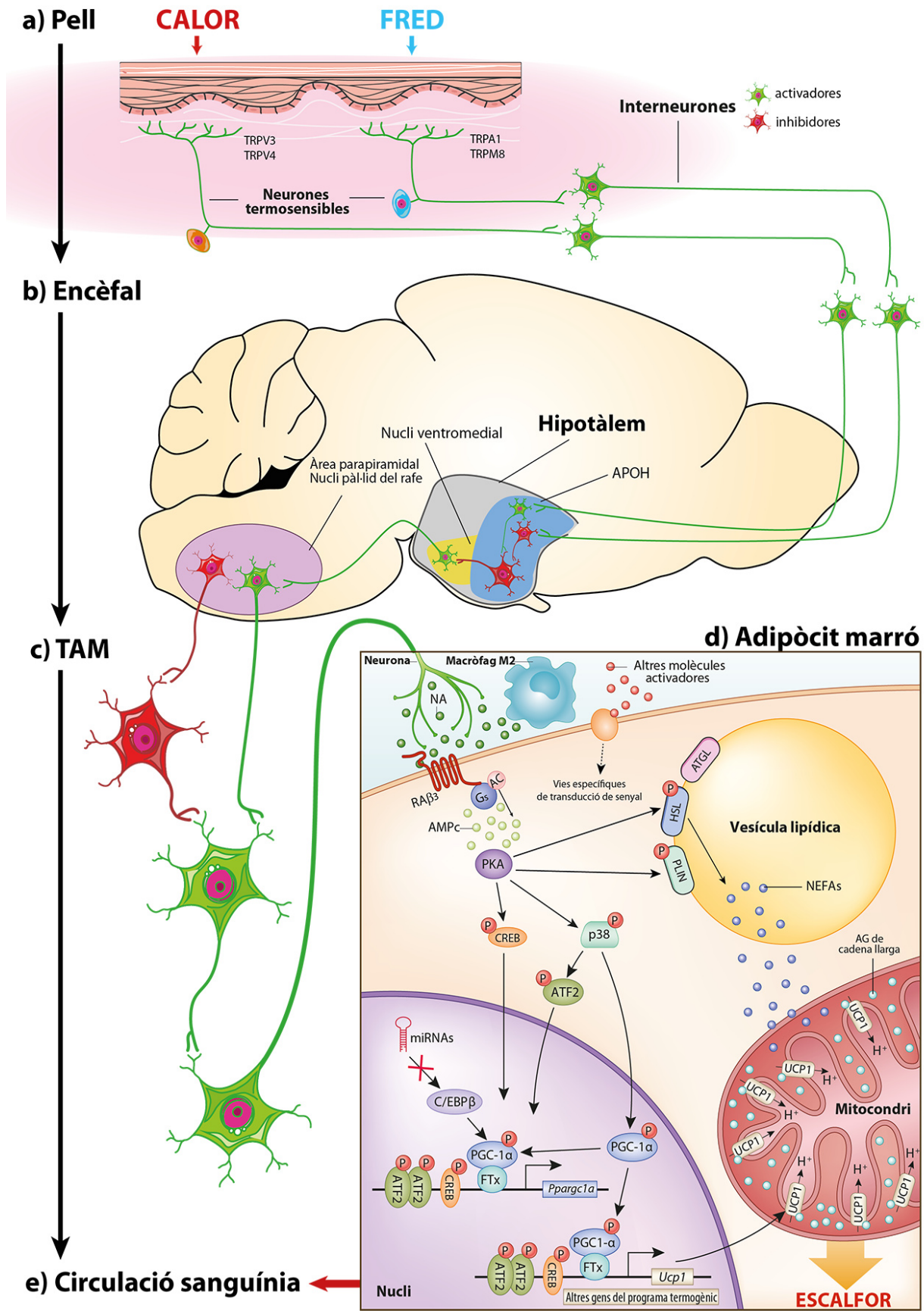


Figura 6: Procés global de percepció sensorial i resposta eferent durant la termogènesi adaptativa. (a) Percepció cutània de l'estímul tèrmic. **(b)** Integració al sistema nerviós central. **(c)** i **(d)** Cascada d'activació termogènica. **(e)** Resposta de repartiment d'escalfor. FTx: Factors de transcripció diversos. Consultar el text o la secció corresponent per a la resta d'abreviatures. Adaptada a partir de Refs. 68, 69 i 193.

Entre les dianes per a la PKA trobem tant proteïnes nuclears com citosòliques. El factor de transcripció de resposta a la unió d'AMPc (**CREB**) i el factor de transcripció activador 2 (**ATF2**) seran dues de les dianes més rellevants per a aquesta cinasa als adipòcits marrons⁸⁰. Aquests factors de transcripció són capaços d'activar l'expressió de gens que disposin de l'element de resposta CRE, entre els quals es troba UCP1⁵⁹. Al seu torn, l'activació de la via de la PKA indueix de forma indirecta l'activació de Src i la subsegüent activació de les MAPK **ERK1/2**, fet que afavorirà una inhibició de l'apoptosi en un teixit que necessitarà mantenir la seva cel·lularitat per tal de seguir produint calor⁸¹. La PKA també induirà l'activació d'una segona via de MAPK, la de **p38**, la qual també estarà implicada directament en la inducció de gens termogènics com el d'UCP1⁸², com veurem més en profunditat posteriorment. No obstant, l'activació de la tercera via de MAPK, la de les cinases aminoterminals de c-jun (**JNK**), no es produeix en adipòcits marrons però sí en altres tipus cel·lulars del TAM durant l'exposició al fred⁵⁹. A nivell citoplasmàtic, la PKA activarà determinats inhibidors de fosfatases, tot perllongant la seva pròpia acció⁸³, a més de proteïnes implicades en la lipòlisi, com ara l'HSL o la perilipina, que permetran a l'adipòcit marró alliberar NEFAs de les seves pròpies vesícules lipídiques per tal d'activar l'acció d'UCP1 i de fer-los servir com a substrat per a la β -oxidació.

1.4.2.4. Producció de calor per part dels adipòcits marrons

El mecanisme de generació de calor a l'adipòcit marró és un procés que ha estat subjecte de controvèrsia des dels primers estudis en què es va descriure la funció del TAM. Inicialment, es creia que el procés es duia a terme a base de cicles fútils de lipòlisi i lipogènesi, per activació de l'ATPasa de sodi/potassi o, globalment, per acció de mecanismes dependents d'ATP⁵⁹. No obstant, el fet que la inhibició de l'ATP sintasa per oligomicina tan sols causa una disminució marginal de la termogènesi en els adipòcits marrons⁸⁴ va portar a pensar que havia d'existir algun altre mecanisme, independent d'ATP, que expliqués aquesta capacitat termogènica. Aquesta teoria alternativa, que suggeria que no tenia lloc una formació d'ATP, va culminar amb el descobriment als mitocondris dels adipòcits marrons d'una proteïna desacobladora pròpiament dita, **UCP1**, també coneguda com a termogenina⁸⁵. Tot i que posteriorment es descobriren altres proteïnes desacobladores -essencialment UCP2 i UCP3, ja que es considera que UCP4 i UCP5, que s'expressen al sistema nerviós, tindrien altres papers en el desacoblament mitocondrial⁸⁶-, UCP1 és la realment necessària per a la inducció termogènica dels adipòcits marrons en presència de noradrenalina: La seva carència no es compensa per acció de la resta de proteïnes desacobladores als corresponents animals KO pel gen *Ucp1*⁸⁷.

L'acció d'UCP1 té lloc a la membrana mitocondrial interna dels adipòcits marrons clàssics i beix/brite, on hi catalitza un flux de protons (**desacoblament respiratori**) que dissipa el gradient electroquímic generat a través de la cadena de transport d'electrons (CTE)⁸⁸. L'ATP sintasa, el complex V de la CTE, és capaç d'incorporar a la matriu mitocondrial els protons de l'espai intermembranós que hi han estat translocats per acció dels complexos I al IV, per tal de dur a terme la seva activitat catalítica de fosforilació del difosfat d'adenosina (ADP) i la consegüent producció d'ATP. Quan l'ATP és prou abundant, els electrons deixen d'entrar a la CTE i s'atura l'oxidació de molècules derivades del catabolisme dels combustibles cel·lulars. A la major part de cèl·lules que no disposen d'UCP1, aquest gradient electroquímic solament es pot dissipar per la formació d'ATP. No obstant, la presència d'UCP1 és capaç de produir un curtcircuit a la CTE en provocar la translocació dels protons de l'espai

intermembranós cap a la matriu mitocondrial. Això origina que tots els passos de l'oxidació mitocondrial de combustibles cel·lulars (cicle de Krebs i CTE) s'accelerïn, i, que, a més, no s'aturin per concentracions normalment limitants d'ATP. D'aquesta manera, les ineficiències inherents de totes les reaccions químiques implicades acaben resultant en una generació de calor⁸⁹.

El mecanisme a través del qual UCP1 és capaç de permetre la translocació de protons també ha estat subjecte d'àmplia especulació. S'havia pogut comprovar que l'activació termogènica dels adipòcits marrons es podia aconseguir afegint al medi àcids grassos, quelcom que depenia totalment d'UCP1^{84,87,90}. És més, qualsevol manipulació que induïx la lipòlisi en adipòcits marrons n'activa també la termogènesi, i la inducció termogènica no es produeix si no s'hi activa la lipòlisi⁵⁹. Aquests fets suggerien que la forma d'acció d'UCP1 hi podria estar relacionada. Actualment, un dels mecanismes proposats més acceptat és que UCP1 és un **simportador de protons i àcids grassos, essencialment de cadena llarga**, que transloca simultàniament cap a l'interior de la matriu mitocondrial la forma aniònica de l'àcid gras i un protó⁹¹. No obstant, els àcids grassos semblen ser el substrat principal d'UCP1, ja que s'ha comprovat experimentalment que pot unir-se amb baixa afinitat i transportar anàlegs d'àcids grassos de cadena curta sense el transport protònic associat, i que el mateix depèn de la pKa de l'àcid gras en qüestió⁹¹. D'aquesta manera, s'explica per què la lipòlisi, a més de resultar un procés necessari per a la generació de substrats oxidables per a produir calor, afecta directament a la funció termogènica de l'adipòcit marró o beix/brite.

El resultat final del procés d'activació de l'adipòcit marró és, doncs, una generació local de **calor** als mitocondris de l'adipòcit marró. Aquest increment tèrmic local s'escalarà per a escalfar els dipòsits sencers de TAM. En última instància, s'incrementarà la temperatura corporal gràcies a la transferència de calor a la sang venosa eferent dels dipòsits de TAM i a la distribució d'aquesta sang escalfada per tot l'organisme (**Fig. 6e**)⁵⁹.

1.4.2.5. Termogènesi adaptativa metaboloreguladora

En un determinat individu, la seva taxa metabòlica basal, entesa com el consum energètic i despesa calorífica associada per mantenir en funcionament l'organisme, és incrementada pels àpats fins a un 20%. Aquesta resposta fisiològica d'augment en el metabolisme es coneix com a **termogènesi postprandial**, i, almenys en el cas dels rosegadors, en la mateixa hi estaria implicat el TAM^{59,92}. Durant aquest procés s'hi pot detectar un increment en el consum d'oxigen, un major recanvi de noradrenalina i un increment en el flux sanguini als seus dipòsits⁵⁹. Es creu que aquest fenomen tindria lloc per l'acció activadora del TAM dels elevats nivells de glucosa i d'insulina al sèrum en situació postprandial. Algunes hormones secretades durant la digestió, com ara la colescistocinina i l'enterostatina, també serien capaces d'activar el sistema nerviós simpàtic que innerva el TAM i induir-hi l'alliberament de noradrenalina. En concordança, el dejuni és capaç de desactivar el TAM tot inhibint-hi l'expressió d'UCP1 i la lipòlisi⁹³.

A diferència de la termogènesi no associada a tremolor que es manifesta sota estímuls de fred, no existeix una explicació tan clara a per què el TAM és capaç de dur a terme aquesta funció que provoca una ineficiència metabòlica òbvia, si bé podria estar relacionat amb unes altres observacions. En rosegadors, es va poder comprovar que determinades dietes obesogèniques eren capaces de provocar un increment en el reclutament del TAM⁹⁴. Els

animals sotmesos a aquestes dietes presentaven, coherentment, un increment en l'expressió d'UCP1 i una temperatura corporal més elevada⁹⁵. Aquest fenomen es va anomenar **termogènesi induïda per la dieta**, i es creu que el seu paper fisiològic seria el d'intentar drenar l'excés calòric aportat per la ingesta i evitar incrementar més el volum dels dipòsits adiposos i, per tant, els efectes adversos de l'obesitat⁵⁹. El procés estaria controlat pel sistema nerviós simpàtic com en el cas de la termogènesi termoreguladora i es creu que la leptina seria capaç d'induir-lo a nivell central⁹⁶.

En qualsevol cas, aquests fets subratllen el fet que, a més d'una funció termogènica per a combatre la hipotèrmia, el TAM pot actuar també com a un important regulador de l'homeòstasi energètica i de control de l'estat nutricional, una funció que li és comuna a tots els tipus de teixit adipós.

1.4.3. Adipòcits beix/brite: Funció dual?

Els adipòcits beix/brite, a tots els efectes, seran adipòcits termogènics per definició, per la qual cosa el que s'ha explicat per al cas dels adipòcits marrons clàssics també hi seria aplicable. No obstant, si s'accepta que aquests es poden transdiferenciar d'un fenotip d'adipòcit blanc a un fenotip d'adipòcit marró en situacions de necessitat termogènica, com discutirem en detall posteriorment, es podria afirmar que aquests desenvolupen a l'organisme una **funció dual**: Emmagatzemar i mobilitzar les reserves de TG i produir escalfor. En aquest cas, doncs, els adipòcits beix/brite representarien un important mecanisme de regulació energètica global, especialment al si dels seus dipòsits³⁶. L'existència de funcions addicionals exclusives per a aquest tipus cel·lular resta encara per determinar.

Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans.

Revista: *Annals of Medicine*

PMID: 25230914

Títol: L'adipogènesi termogènica de tipus marró i beix/brite en humans.

Resum: Els resultats obtinguts en rosegadors van assentar les bases d'un important paper del teixit adipós marró (TAM) en la despesa energètica. A més, per tal de mantenir la termogènesi, el TAM ha resultat ésser un important lloc de drenatge i d'oxidació de glucosa i triglicèrids circulants. El potencial de l'activitat del TAM en la protecció contra l'obesitat i la síndrome metabòlica ha quedat demostrat. Recentment, la presència inesperada d'activitat pròpia del TAM es va poder detectar en humans. El tipus cel·lular responsable de la termogènesi, l'adipòcit marró, s'origina a partir de complexos processos de desenvolupament. A més dels adipòcits marrons clàssics, present en dipòsits de TAM programats com a tals pel desenvolupament, existeixen adipòcits marrons anomenats brite (de *brown-in-white*) o beix que apareixen en resposta a estímuls termogènics dins del greix blanc a través del procés anomenat *browning*. Els adipòcits beix/brite han resultat ser una part important dels dipòsits de TAM en humans adults. A més del control ja establert de l'activitat del TAM per acció del sistema nerviós simpàtic, certs senyals metabòlics i hormonals originats pel múscul o el fetge (com ara la irisina o l'FGF21) han estat reconeguts com a activadors del TAM i dels adipòcits beix/brite. Al present article es revisa la recerca més recent en aquest camp i, especialment, l'impacte dels nous descobriments per als humans. Addicionalment, es provaran d'aclarir els processos biològics que tenen lloc més enllà del sorgiment d'una nova nomenclatura en aquest camp.

SPECIAL SELECTION: BROWN FAT

Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans

Rubén Cereijo, Marta Giralte & Francesc Villarroya

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Catalonia, Spain

Evidence from rodents established an important role of brown adipose tissue (BAT) in energy expenditure. Moreover, to sustain thermogenesis, BAT has been shown to be a powerful sink for draining and oxidation of glucose and triglycerides from blood. The potential of BAT activity in protection against obesity and metabolic syndrome is recognized. Recently, an unexpected presence and activity of BAT has been found in adult humans. Here we review the most recent research in this field and, specifically, how new findings apply to humans. Moreover, we seek to clarify the underlying biological processes occurring beyond the burst of new nomenclature in the field. The cell type responsible for thermogenesis, the brown adipocyte, arises from complex developmental processes. In addition to 'classical' brown adipocytes, present in developmentally programmed BAT depots, there are brown adipocytes, named 'brite' (from 'brown-in-white') or 'beige', which appear in response to thermogenic stimuli in white fat due to the so-called 'browning' process. Beige/brite cells appear to be important components of BAT depots in adult humans. In addition to the known control of BAT activity by the sympathetic nervous system, metabolic and hormonal signals originating in muscle or liver (e.g. irisin, FGF21) are recognized as activators of BAT and beige/brite adipocytes.

Key words: Antiobesity agents, brown adipose tissue, metabolic syndrome X, obesity, white adipose tissue

Introduction: the shifting history of human brown adipose tissue

There is a long history of evidence for the existence of brown adipose tissue (BAT) in humans. Classical anatomists and histologists reported the presence of masses of brown adipose tissue containing the typical multilocular adipocyte morphology in several anatomical sites in humans. The prevalence of BAT depots in human neonates and the progressive decrease in the amount of BAT in adults were commonly recognized, and it was assumed that BAT progressively involutes with age. Given the recognized role of BAT as a thermogenic tissue, it was also assumed that BAT function in humans was probably restricted to the neonatal period, during which it would provide the heat needed to cope with the thermal stress associated with birth (1).

Key messages

- Thermogenic, energy-dissipating, beige/brite adipocytes are a subtype of brown adipocytes with a cell lineage origin distinct from 'classical' brown adipocytes.
- Human adult adipose tissue possesses a remarkable plasticity and may contain thermogenic, energy-dissipating, beige/brite adipocytes.
- The energy-dissipating and metabolite oxidation properties of beige/brite adipocytes (like 'classical' brown adipocytes) make them attractive candidates to be stimulated in order to prevent obesity and ameliorate hyperglycemia and hyperlipidemia.

However, studies in rodents reported by Rothwell and Stock in the late 1970s proposed that BAT was not only a site of cold-induced thermogenesis but was also a main site of diet-induced thermogenesis (2), reigniting interest in the role of human BAT owing to its obvious potential to promote energy expenditure and protect against obesity. The subsequent discovery of UCP1 (uncoupling protein-1) in rodents as the key protein that conferred specific thermogenic properties to BAT mitochondria was soon followed by the identification and characterization of human UCP1, confirming that the molecular mechanisms necessary for BAT-associated thermogenesis were present not only in rodents but also in humans (3). However, skepticism about the physiological relevance of BAT in humans prevailed (4). Nevertheless, some lines of evidence continued to provide support for the physiological role of BAT, including genetic association studies that related polymorphisms of the *UCP1* gene with altered energy balance and metabolism in adult human patients. A single-base polymorphism (A-3826G) in the 5' regulatory region of the *UCP1* gene is relatively frequent in the human population. Multiple studies in the late 1990s reported significant associations of this polymorphic variant with metabolic abnormalities in distinct adult human populations. After reviewing 12 independent reports, Gonzalez-Barroso et al. (5) concluded that the A-3826G polymorphism is not a major contributor to obesity development, but it is related to an increased propensity toward

weight gain over time, especially in persons with a higher risk of obesity. Since that time, more than 20 additional studies of distinct adult human populations have confirmed the association of this *UCP1* gene polymorphism with metabolic and energy balance alterations in human adults. Of course, these genetic data could be interpreted as evidence for a biological role of *UCP1* activity in neonatal BAT that has consequences in adulthood, but the possibility remained that *UCP1*-related BAT activity was physiologically relevant in adults.

The concepts governing thinking on the subject of BAT in human adults have recently undergone a radical shift, propelled initially by the serendipitous finding of metabolically active 'adipose tissue' in patients suspected of cancer—a finding made possible by the introduction of [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose-based positron emission tomography (PET) assays for diagnostic purposes. Active metabolic sites revealed by PET, unrelated to tumors, were found mainly in neck and shoulder areas of adults (6). Three independent studies in 2009 demonstrated that these sites corresponded to metabolically active BAT, leading to the current concept that the majority of human adults possess metabolically active BAT (7–9). Notably, recent studies that have assessed the association of *UCP1* -3826A/G and PET-determined BAT activity established an association between this *UCP1* gene polymorphism and the extent of age-related decreases in BAT activity (10). In recent years, multiple studies have addressed studies on BAT activity in distinct human populations, confirming several conclusions: BAT activity is higher in women than men; BAT activity progressively decreases with age; BAT activity is induced by cold exposure; and BAT activity is reduced in obese patients. Recent reviews provide updated information on the PET scan-based assessment of BAT activity in humans (11,12).

Beige/brite: nomenclature, tissues, and cellular identities

The story of the recent rediscovery of BAT in adult humans has coincided with important advances in our understanding of the cell biology of the brown adipocyte and a growing awareness of its unexpectedly high degree of complexity.

In rodents, classical anatomical brown fat depots (i.e. interscapular) are present throughout life. BAT develops during fetal life, whereas white adipose tissue (WAT) grows mainly after birth. However, this apparent transformation of adipose depots that occurs in mice after birth, from predominantly brown to predominantly white, does not rely on the conversion of mature brown adipocytes to white adipocytes, but is instead based primarily on the differentiation of white adipocytes from precursor cells (13).

During embryonic development, adipocytes develop from mesenchyme of mesodermal origin, with the exception of the mesenchyme in the cephalic region, which has an ectodermal origin (14). Numerous studies have sought to establish the identity of adipocyte precursor cells (15). It is now well established that brown and white adipocytes have distinct developmental origins. At least two distinct adipocyte lineages have been defined based on expression of the myogenic lineage marker *Myf5* (myogenic factor 5). Brown adipocytes present in BAT depots originate from *Myf5*-expressing precursors, which are also the source of skeletal myogenic cells and a subpopulation of white adipocytes (16–18). In contrast, most white adipocytes are derived from *Myf5*-negative precursors; this also appears to be the case for brown adipocytes that develop in WAT as a consequence of the 'browning' process (16,19,20).

The so-called browning of WAT is defined as the appearance of functional brown adipocytes—also named 'brite' ('brown-in-white')

or 'beige' (see below)—in WAT depots after thermogenic stimuli. In rodents, it is now well established that this process, together with the 'recruitment' of existing BAT depots, is required for optimal adaptive energy expenditure (21). As discussed below, cold exposure and adrenergic signaling are the main inducers of these processes, although other factors, shared to varying degrees, might also contribute. Increased browning of WAT is also often found in genetically engineered rodent models resulting in suppressed 'classical' BAT activity (22), possibly as a compensatory process.

Adipocyte cells were formerly classified into two types: unilocular, fat-storing, white adipocytes; and multilocular, thermogenic brown adipocytes. The current classification scheme now includes a third category of adipocytes, the so-called beige or brite adipocytes, also sometimes referred to as 'inducible' brown adipocyte-like cells (23–25). These cells have phenotypic and functional characteristics of brown adipocytes, but are found in anatomical white adipose depots. In contrast, brown adipocytes located in defined anatomical BAT depots are often referred to as 'classical', 'constitutive', or 'developmentally programmed' brown adipocytes. This terminology is clearly applicable in rodents, but, as described below, its application to adipocyte cell biology in humans is not consolidated yet.

There is genetic evidence that the capacity to induce the appearance of beige/brite adipocytes in WAT depots is highly relevant for protection against obesity in rodents. Accordingly, differences in beige/brite adipocyte abundance in WAT reported between mice strains correlate positively with their resistance to induce obesity by diet (26). There are also significant differences in the number of these beige/brite cells between WAT depots; they are most abundant in subcutaneous inguinal WAT and least abundant in visceral perigonadal WAT (27).

Recent lineage-tracing studies using transgenic mice indicate that beige/brite adipocytes arise from a cell lineage (*Myf5*-negative) different from that leading to brown adipocytes (*Myf5*-positive) in anatomically defined BAT depots (16). However, research to clarify the precise origin of distinct cells found in WAT—genuine white adipocytes and beige/brite adipocytes—remains ongoing. In fact, whether beige/brite adipocytes derive from pre-existing white adipocytes through a process of transdifferentiation or through *de novo* adipogenesis from a specific subgroup of precursor cells remains a matter of debate (28,29). These processes are not mutually exclusive, and it is possible that their relative importance in different WAT depots may vary. Indeed, it has been proposed that β 3-adrenergic activation induces browning in epididymal WAT through proliferation and further differentiation of precursors, whereas in inguinal WAT it acts through white-to-brown transdifferentiation (19).

Support for the white-to-brown adipocyte transdifferentiation process was first proposed based on the observed lack of induced cellular proliferation and the presence of morphological intermediate forms of adipocytes ('paucilocular') in the transition from large unilocular white adipocytes to *UCP1*-positive multilocular beige/brite adipocytes in response to cold exposure or β 3-adrenergic receptor stimulation (30–32). Recent lineage-tracing experiments in adult mice directly demonstrated that mature white adipocytes in inguinal WAT have the potential to convert to beige/brite adipocytes and, furthermore, that this is a reversible process that depends on environmental temperature (33). However, another recent study in mice using a pulse-chase fate-mapping technique to mark mature white adipocytes reached the conclusion that most beige/brite adipocytes arise from precursor cells during browning in inguinal WAT (34).

Another question is whether there are specific precursor cell types for beige/brite adipocytes distinct from those for white adipocytes in WAT. As discussed below, gene-profiling analyses of primary WAT preadipocytes differentiated *in vitro* have suggested two types of preadipocytes (25). In contrast, *in vivo* mouse studies have been less conclusive, due in part to the difficulty of defining a true white adipocyte specific marker, or even unique gene markers for tracing WAT adipocyte developmental origins. So, the actual identity of beige/brite precursor cells (if they exist) is poorly known, in addition to the fact that they are expected to be *Myf5*-negative. Interestingly, Spiegelman and colleagues have recently identified a smooth muscle-like origin for at least a subset of beige/brite cells (35).

In any case, it should be kept in mind that a difference in the developmental origin of adipocytes does not necessarily imply a functional difference. How important is the activity of the new beige/brite cells that appear as a consequence of browning of WAT relative to the activity of the classical BAT depots in rodents? First data indicated that cultured cells representative of the 'classical' brown and beige/brite lineages have similar rates of basal and uncoupled respiration (25). Moreover, a recent study that directly determined the uncoupling activity and metabolite-oxidizing capacity in mitochondria from beige/brite adipocytes compared with 'classical' brown adipocytes concluded that the two types of adipocytes showed very similar behavior (36). Only lower capacity of utilization of glycerol-3-phosphate in beige/brite mitochondria relative to 'classical' brown mitochondria was reported. Theoretical calculations have suggested that the total amount of beige/brite cells cannot account for a large portion of energy expenditure relative to the capacity elicited by classical BAT depots (36). However, studies using different strains of mice characterized by distinct WAT browning capacities but a similar capacity to activate classical BAT have shown that browning capacity is highly correlated with protection against high-fat-diet-induced obesity (37). In fact, a tendency toward lower thermogenic capacity was reported in mitochondria obtained from an obesity-prone mouse strain (C57Bl/6) compared with those from an obesity-resistant mouse strain (129Sv) (36). Further studies will be needed to reconcile the minor bioenergetic impact on the organism expected from browned WAT, determined on the basis of biochemical considerations, with the importance of the process evidenced by the genetic studies described above. Moreover, a potential endocrine role of BAT beyond its intrinsic thermogenic activity has been recently proposed (38); to date, there are no data indicating important differences in the bioactive factors (e.g. FGF21) released by beige/brite cells relative to 'classical' brown adipocytes (see below).

Molecular controllers of differentiation of distinct adipocyte cell types

Despite originating from different lineages, adipocytes undergo adipogenic differentiation processes that share common transcriptional cascades (39). Indeed, the nuclear receptor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) is indispensable for the development of all types of adipose cells (40,41). The other master gene that determines adipogenic differentiation is C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein- α). C/EBP α acts to maintain PPAR γ expression, and both factors promote and maintain the differentiated state of adipocytes by co-operatively regulating the transcription of genes involved in processes such as lipid and glucose metabolism and insulin sensitivity (42). The absence of C/EBP α in mice prevents the development of all white, but not brown, adipose depots, indicating that a lack of C/EBP α

can be compensated for in brown fat development, probably by C/EBP β (43,44). In fact, C/EBP β has been shown to play a key role in brown adipogenesis through direct interaction with the co-regulator PRDM16 (PR-domain containing protein-16) (45).

PRDM16, together with PGC-1 α (PPAR γ -coactivator-1 α), have been identified as the main regulators of the phenotype of both 'classical' brown adipocytes and beige/brite adipocytes. In particular, PGC-1 α , which coactivates PPAR γ and PPAR α (46,47), is involved in the regulation of mitochondrial biogenesis, oxidative metabolism, and thermogenesis. In contrast, PRDM16, but not PGC-1 α , has been shown specifically to confer brown fat cell identity (48,49). In fact, PRDM16 acts primarily through co-regulating C/EBP β , PPAR γ , PPAR α , and PGC-1 α to induce expression of brown fat-specific genes (16,45,49,50). MiR-133a/b and miR-155 are microRNA species that target PRDM16 and C/EBP β , respectively, thus having an inhibitory role on brown and beige/brite adipogenesis and function. In contrast, miR-196a appears to induce specifically beige/brite adipogenesis via inhibition of the homeobox protein HOXC8 (51). On the other hand, the co-regulator TLE3 competes with PRDM16 for binding to PPAR γ , thus impairing brown adipocyte thermogenic gene expression and promoting a more white adipocyte gene expression signature (52). Recent studies of adipocyte-specific PRDM16-knockout mice showed that 'classical' BAT remains functionally intact whereas there is a loss of the browning capacity (i.e. beige/brite adipocyte function) in response to cold and β 3-adrenergic stimulation. When exposed to a high-fat diet, those mice show an increase of subcutaneous WAT mass, but this WAT depot acquires physiological characteristics more related to visceral WAT (53). In contrast, selective ablation of PRDM16 in the brown (*Myf5*-positive)—but not beige/brite (*Myf5*-negative)—adipose lineage results in altered 'classical' brown adipocyte identity and function in adult mice (54).

Genetic markers of the beige/brite phenotype

Several studies using differential gene expression profiling in cell cultures have identified specific genes whose expression may be used to distinguish beige/brite from brown adipocytes despite common expression of the thermogenic genes, such as UCP1 (29,55). For instance, differential high expression of the zinc finger transcription factor *Zic-1* and LIM homeobox 8 protein (*Lhx8*) is commonly found in 'classical' brown adipocytes relative to beige/brite adipocytes in most studies (23,56). Expression of TNF receptor superfamily member 9 (CD137), T-box associated transcription factor (TBX1), transmembrane 26 (TMEM26), and short stature homeobox-2 (SHOX2) are considered indicative of beige/brite cell identity (25,56). The assessment of the expression of these genes in adipose tissue depots from mice confirmed partially that the differential gene expression signature occurs *in vivo*, (e.g. a high and distinctive expression of *Zic-1* in 'classical' BAT depots but absence in beige/brite-prone WAT depots, or preferential expression of SHOX2 in inguinal WAT, a site highly sensitive to 'browning'). Thus, it appears that marker gene expression profiles allows to distinguish a predominant 'classical' brown adipocyte phenotype in the BAT depots versus a predominant beige/brite phenotype in WAT depots in which browning had been induced (27). However, considering that several members of the gene panels that distinguish 'classical' BAT versus beige/brite adipose tissue are homeobox genes or other genes involved in positional determination during mammalian development, it is unclear to what extent the expression of these marker genes in tissues is reflecting cell identity or just positional location of adipose cells across whole-body anatomy. In this sense, a recent

approach aimed to identify a comprehensive molecular description of brown versus beige/brite gene expression using ribosomal profiling concluded that several candidate genes may in fact reflect much more the anatomical location in which adipocytes reside rather than intrinsic adipocyte type-specific identity (35). On the other hand, recent reports also claim that gene expression signature in adipose depots is highly dependent on the developmental stage even in the same anatomical depot (57).

Finally, some authors have questioned the definition of beige/brite as an independent cell type with respect to classical brown adipocytes, and instead consider these cells should be named just brown adipocytes (58). In fact, white adipocytes from subcutaneous versus visceral depots are considered the same cell type, notwithstanding reported differences in developmental lineage, gene expression signature, and/or hormonal responsiveness (59–61). In the same sense, myocytes from different skeletal muscle fiber-types also constitute unique cell types (62). At this point, it may happen that, in fact, issues related to cell biology and those related to the preferred use of a given terminology to classify cells overlap.

Signals that control beige/brite cell appearance and function

Because prolonged thermogenic stimulation appears to be the main context in which the browning of WAT occurs in rodent models, the classically recognized regulatory axis of sympathetic activation and subsequent noradrenergic signaling is considered the main mechanism that elicits the appearance of beige/brite cells in WAT depots (63). However, a number of novel factors capable of inducing the browning process have been identified in recent years. Most of these factors also induce the activation of existing brown adipocytes and promote the recruitment of classical BAT anatomical depots. These new factors, which are capable of controlling the browning of WAT through mechanisms totally or partially independent of sympathetic activation, originate from distinct tissues. The discovery of one of these factors, irisin, is especially remarkable. Exercise has been reported to induce browning of WAT (64). Bostrom et al. (65) observed that over-expression in muscle of PGC-1 α , a transcriptional co-regulator involved in muscular bioenergetics and metabolism, also caused browning of WAT. A search for the mechanisms responsible for this effect led to the identification of irisin, a bioactive protein released by skeletal muscle after cleavage of the membrane protein FNDC5 (fibronectin type III domain containing 5), and showed that this bioactive protein is capable of inducing the browning of WAT in response to muscle contraction. Another factor that promotes browning and activation of BAT is FGF21 (fibroblast growth factor-21) (66,67), a hormone released mainly by the liver in response to lipid availability (68). FGF21 is also released by white and brown adipocytes in rodents and may have both an endocrine and a paracrine action in promoting the browning and thermogenic activity of BAT (67,69). A number of other factors have been reported to promote browning and BAT activation in rodents, as recently reviewed (70). They include cardiac peptides (71), vitamin A derivatives (72) or even metabolites such as β -aminoisobutyric acid (73) and lactate (74).

Human brown adipose tissue: 'classical' versus beige/brite

How do the above concepts and findings, which have been developed mainly using cell culture models and rodents, apply to humans? Cell culture analysis to explore adipocyte lineage, as

mentioned above for rodents, provided limited data for human brown-versus-beige/brite identity distinction on the basis of marker gene expression analysis. Table I summarizes the current findings relative to marker genes for the different subsets of adipocytes specifically in humans. Remarkable similarities in marker genes useful to distinguish adipocyte identity in adipose depots have been found relative to rodent studies and, also as in rodents, there is a wide range of biological roles for the corresponding gene products, most of them unrelated to the current knowledge of specific brown and beige/brite biological function.

The discovery of active BAT in adult humans at the anatomical sites mentioned above has spurred interest in directly characterizing the features of this tissue through analysis of biopsies. In fact, in one of the original studies published in the *New England Journal of Medicine* (8), the authors reported high expression of UCP1 and other marker genes of BAT + beige/brite versus WAT molecular identity. The typical brown adipocyte morphology and expression of UCP1 were confirmed by an independent study in neck adipose tissue from adult humans (75). Recent studies have also attempted to determine whether adult BAT at upper trunk anatomical locations is 'classical' BAT or beige/brite BAT by direct analysis of fat at these anatomical sites.

The first reports of these analyses yielded the surprising finding that BAT in the supraclavicular region of adult humans expressed the same marker genes representative of the beige/brite type previously identified in rodents and human cell culture studies (25). An additional study, performed using a set of samples of supraclavicular as well as visceral fat depots in neonates and children, also found indications of gene expression typical of beige/brite adipocytes, but no evidence for expression of markers of classical, developmentally programmed BAT (56). These findings raised the surprising possibility that all BAT in humans might be the beige/brite type.

However, subsequent reports have challenged this concept. Lidell et al. (76) found that samples of BAT from the adult supraclavicular and periaxillary area expressed beige/brite markers genes, but an analysis of neonatal interscapular BAT, an anatomical site equivalent to the interscapular area in rodents, revealed differential expression of the classical BAT marker, ZIC1. In fact, on the basis of the expression of marker genes for classical BAT (i.e. ZIC1) and beige/brite BAT (i.e. CD137), we found that human fetuses at term simultaneously contain both types of brown adipocytes depending on the anatomical region: 'classical' BAT in the interscapular area and beige/brite in the omentum (77). At this point, the question becomes: does 'classical' BAT exist only in human fetuses and neonates, with all BAT in human adults being beige/brite? Even this formulation is challenged by recent findings. Cypess et al. (78) found that the deep fat layers in the necks of adults contain brown adipocytes (based on morphology and UCP1 expression) that show a pattern of gene expression (high ZIC1 expression) characteristic of classical BAT. In a separate study of neck adipose tissue from adults, the authors reached a similar conclusion, suggesting that human supraclavicular BAT might consist of both 'classical' brown and beige/brite adipocytes, also on the basis of marker gene expression (79).

In summary, clarifying the identity of human brown adipocytes through direct studies of human biopsies and samples has proven to be a difficult task, first because of the limited availability and difficulty of obtaining such samples, and second because of inherent doubts about the suitability of directly applying profiles of 'classical' and beige/brite marker genes, derived mainly from rodent studies (and not totally agreed upon in the literature) to human BAT. Expression of the FGF21 gene highlights these difficulties. In rodents, FGF21 is substantially expressed in

Table I. Confirmed marker genes for different subsets of adipocytes in humans.

Phenotype	Gene symbol	Gene name	Biological function	(Ref.)
'Classical' brown	<i>ZIC1</i>	Zic family member 1	Multifunctional C2H2-type zinc finger transcription factor	(55, 76, 78, 79)
	<i>LHX8</i>	LIM homeobox 8	Cysteine-rich double-zinc finger transcription factor	(55, 76, 78, 79)
	<i>miR206</i>	MicroRNA 206	Inhibition of muscular transcription factors myogenin and MyoD in brown adipocytes	(27, 79)
	<i>miR133b</i> <i>HOXC4</i>	MicroRNA 133b Homeobox C4	See <i>miR206</i> ; regulation of PRDM16 expression Homeodomain-containing DNA-binding transcription factor	(79) (9)
'Classical' brown + beige/brite	<i>HOXA1</i>	Homeobox A1	See <i>HOXC4</i>	(9)
	<i>UCP1</i>	Uncoupling protein 1	Uncoupling of oxidative metabolism from ATP production, allowing heat production	(25, 55, 76, 78, 79)
	<i>DIO2</i>	Deiodinase, iodothyronine, type II	Conversion of thyroxine (T4) to 3,3',5'-triiodothyronine (T3)	(76)
	<i>PPARGC1A (PGC-1α)</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Transcriptional co-activator controlling the expression of key metabolism-related genes	(21, 76, 79, 108)
	<i>PRDM16</i>	PR domain containing 16	Transcriptional co-regulator, control of the brown phenotype transcriptional network	(76, 79, 111)
	<i>ADRB3</i> <i>FGF21</i>	β3-adrenergic receptor Fibroblast growth factor 21	Norepinephrine receptor Increase of glucose uptake and oxidation, induction of <i>UCP1</i>	(76) (66, 77, 108)
	<i>CIDEA</i>	Cell death-inducing DFFA-like effector A	Activator of apoptosis upon DNA fragmentation; lipolysis and thermogenesis regulator	(79)
Beige/brite	<i>CITED1</i>	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	Transcriptional co-activator for estrogen receptors	(56, 79)
	<i>TBX1</i>	T-box 1	T-box-associated transcription factor	(25, 55, 76, 79)
	<i>TNFRSF9 (CD137)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Clonal expansion, survival, and development of T cells, induction of a Th1 program	(25)
	<i>TMEM26</i> <i>SHOX2</i>	Transmembrane protein 26 Short stature homeobox 2	Unknown Homeodomain-containing DNA-binding transcription factor	(25, 78, 79, 108) (76, 78, 112)
Beige/brite + white	<i>HOXC8</i>	Homeobox C8	Homeodomain-containing DNA-binding protein	(27, 79, 113)
White	<i>HOXC9</i>	Homeobox C9	See <i>HOXC8</i>	(27, 79, 108, 113)
	<i>LEP</i>	Leptin	Regulation of body weight by inhibiting food intake and energy expenditure in adipocytes	(78)

both WAT and BAT (although FGF21 has been proposed to be preferentially expressed in beige/brite adipocytes in rodent cell culture studies) (25,56). However, in humans, FGF21 expression is negligible in WAT (both subcutaneous and visceral) (80), but is substantial in both classical and beige/brite fat depots from human neonates (77).

BAT in pheochromocytoma patients: a human model of the browning of WAT

Pheochromocytoma is a neuroendocrine tumor that secretes large amounts of catecholamines. More than 50 years ago, Feyrter identified the presence of adipocytes with the multilocular lipid droplet morphology typical of brown adipocytes in the fat depots close to pheochromocytoma tumors (81). Further research confirmed that these cells possessed the morphological (cytoplasm filled with mitochondria with numerous tightly packed cristae) and biochemical (mitochondrial guanosine diphosphate-sensitive, loose respiratory coupling) features of bona fide brown adipocytes (Figure 1) (82). Expression of the *UCP1* gene and high amounts of *UCP1* in mitochondria, an unequivocal sign of brown adipocyte identity, was also confirmed (83,84). In addition to *UCP1*, other BAT + beige/brite marker genes (e.g. *PRDM16*, β3-adrenoreceptor) are also highly expressed in omental adipose tissue from pheochromocytoma patients (85). Moreover, recent PET scan studies have consistently reported hypermetabolism in the omental and

mesenteric adipose tissue from pheochromocytoma patients, indicating the functionality of brown adipocytes that develop at those regions (86–89).

According to current concepts, the brown adipocytes that appear in pheochromocytoma patients are, by definition, the consequence of a browning process because they appear at sites in which only WAT is present in control conditions and their appearance is dependent on a particular stimulus—in this case, continuous adrenergic stimulation caused by the tumor. Notably, under basal conditions, visceral adipose tissue, the anatomical site where BAT appears as a consequence of pheochromocytoma, is considered much less prone to browning than subcutaneous fat (a concept developed largely based on rodent studies), and remnant *UCP1* expression levels in WAT from healthy adult humans is more prevalent in visceral than in subcutaneous fat (90). In any case, under this scenario, brown adipocytes that appeared in the visceral fat of pheochromocytoma patients would be expected to be beige/brite, but, to date, no extensive analysis of the molecular expression signature—'classical' versus beige/brite—has been reported in BAT from pheochromocytoma patients.

How these adipocytes develop is the subject of a current controversy, fueled by results obtained in rodent models. Some authors suggest that precursor cells differentiate into a brown (beige/brite) phenotype, whereas others claim that the existence of morphologically intermediate forms between white and adipocytes—so-called paucilocular adipocytes, which express *UCP1*—supports the idea that a transdifferentiation process from

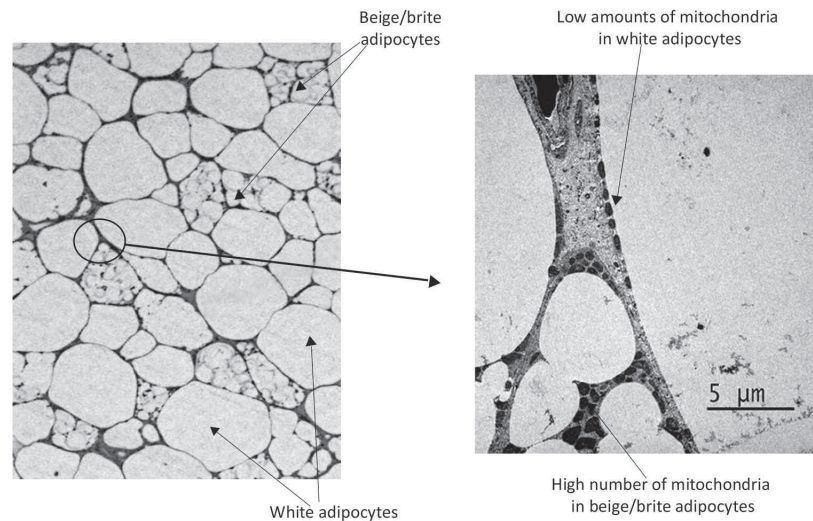


Figure 1. Presence of beige/brite adipocytes in visceral adipose tissue from a patient with pheochromocytoma. Left: light microscopy, indicating the presence of multilocular beige/brite adipocytes among other unilocular white adipocytes. Right: electron microscopy of the area indicated in the left, high mitochondrial content characteristic of beige/brite adipocyte phenotype is shown, as well as poor mitochondria presence in the cytoplasmic rim of white adipocytes.

white to beige/brite adipocytes takes place in adipose tissue from these patients (85).

In any case, the appearance of brown adipocytes in patients with pheochromocytoma confirms the existence of browning potential in adipose tissues of adult humans. The availability of samples as a byproduct of surgical treatment procedures provides unique research opportunities that could be exploited to further elucidate the biological processes underlying adipose browning in humans.

How is browning controlled in humans?

Recent advances in our understanding of the neuro-hormonal control of the browning process in rodents (70,91,92) are beginning to be extended to humans, with the obvious limitations associated with human studies. As in rodents, a cold environment appears as a major inducer of human BAT activity (9,93). The pheochromocytoma-associated appearance of brown adipocytes in BAT depots is possibly the clearest evidence that in humans, as in rodents, chronic adrenergic stimulation is a major inducer of browning. Notably, the adrenergic receptor antagonist propranolol suppresses BAT activity in the neck and cervical areas of humans, as assessed by PET scans (94). This indicates that if most neck brown adipocytes are of the beige/brite type, as noted above, their activity is controlled by sympathetic-driven, adrenergic-mediated action. Some researchers have reported that the sympathomimetic ephedrine activates BAT in humans (95), whereas others were unable to replicate these findings (96), perhaps owing to differences in the dose administered.

Do other, non-sympathetic-related, factors control BAT activity and the browning process in humans? Among the factors identified in previous rodent studies, irisin and FGF21 possibly deserve the most attention in humans. Investigations into the capacity of exercise to increase irisin levels in humans have led to conflicting results, with an initial report of higher irisin levels after endurance training (65) not being systematically confirmed by other independent studies (97–100). Whether exercise was even effective in promoting browning in human adipose tissue has been questioned (101). Some studies have indicated that irisin is unable to induce the expression of BAT-related marker genes

in human white adipocytes (98), whereas others have reported that FNDC5 activates the thermogenic activity of neck (mostly beige/brite) adipocytes (102). It should be noted, however, that the reliability of current methods for measuring human irisin in blood has been a recent subject of debate, making it difficult to compare data from different laboratories (103,104). In summary, it appears that clear-cut evidence that irisin is able to induce the browning of human WAT is still lacking, and further research will be required (105,106). However, the recent finding that irisin is expressed and released by human WAT itself (107) and thus has a potential autocrine role in promoting browning may open new research directions that help to establish the actual function of irisin in human adipose tissue and its potential role in browning.

With respect to FGF21, it should first be noted that, unlike the case in rodents, FGF21 in humans is very poorly expressed in WAT, but is highly expressed in BAT—both classical (interscapular BAT from neonates) and beige/brite (neck BAT from healthy humans, omental fat from pheochromocytoma patients) (77,108). There is evidence that human adipocytes are sensitive to FGF21 action, and treatment of human preadipocytes with FGF21 activates beige/brite genes involved in the browning program (102,108), suggesting that FGF21 may be an endocrine as well as an autocrine factor in controlling beige/brite appearance and activity. A recent report found a strong association between a rise in circulating FGF21 levels in response to cold and activation of BAT (mostly beige/brite) in the neck in humans, consistent with a role for FGF21 in promoting the activity of beige/brite cells (102).

Conclusions and perspective

Clarifying the cellular identity of distinct types of brown adipocytes may at a first glance appear to be somewhat of an academic exercise in the larger context of cell biology research. However, the current awareness of the potential value of promoting BAT activity in humans so as to enhance energy expenditure (thus protecting against obesity) and drain glucose and fat from the circulation (thus protecting against diabetes and hyperlipidemia) stresses the relevance of this line of research. Experiments in rodents suggest that the neurohormonal processes that control

the activation and perhaps recruitment of existing BAT may not be identical to those that promote the enrichment of brown adipocytes in former WAT depots. Whereas some classical activators (e.g. β -adrenergic activation) and more recent activators (FGF21) appear to induce both the activity of existing BAT and the promotion of browning (66,67), others (e.g. irisin) (65) appear more selective for the browning process. However, the role of these factors in the control of BAT activity and browning of WAT specifically in humans has not yet been definitively established. Identification of cell targets in humans and determining their relative sensitivity to neurohormonal modulators is of utmost relevance to the identification of drug targets and development of pharmacological tools for future treatment of obesity and metabolic diseases. Moreover, although currently available data support common thermogenic roles for 'classical' brown and beige/brite adipocytes, their different gene expression profiles suggest that, beyond their current role as experimental tools, these cell types may potentially serve distinct, and as yet unidentified, physiological functions. Finally, new roles of BAT and/or beige/brite activation that could be used for metabolic therapy purposes are increasingly being proposed, ranging from the control of hyperlipidemia and hyperglycemia (109,110) to the alleviation of redox pressure (74). The fascinating story of adipose plasticity in humans and the prospects for pharmacological intervention are only just beginning.

Acknowledgements

This work was supported by MINECO (grant SAF2011-23636), Instituto de Salud Carlos III (grant PI11/00376), EU (FP7 project BETABAT, grant HEALTH-F2-2011-277713), and Generalitat de Catalunya (2009SGR-284). Thanks are given to A. Goday and J. M. Gallego-Escuredo for help with microscopy images from pheochromocytoma patients.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

References

- Lean MEJ, James PT. Brown adipose tissue in man. In: Trayhurn P, Nicholls DG, editors. *Brown adipose tissue*. Edward Arnold Ltd. London, UK; 1986. p. 339–65.
- Rothwell NJ, Stock MJ. Regulation of energy balance. *Annu Rev Nutr*. 1981;1:235–56.
- Cassard AM, Bouillaud F, Mattei MG, Hentz E, Raimbault S, Thomas M, et al. Human uncoupling protein gene: structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4. *J Cell Biochem*. 1990;43:255–64.
- Cunningham S, Leslie P, Hopwood D, Illingworth P, Jung RT, Nicholls DG, et al. The characterization and energetic potential of brown adipose tissue in man. *Clin Sci (Lond)*. 1985;69:343–8.
- Del Mar Gonzalez-Barroso M, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM. The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *Obes Rev*. 2000;1:61–72.
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E444–52.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360:1509–17.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360:1518–25.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360:1500–8.
- Yoneshiro T, Ogawa T, Okamoto N, Matsushita M, Aita S, Kameya T, et al. Impact of UCP1 and β 3AR gene polymorphisms on age-related changes in brown adipose tissue and adiposity in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37:993–8.
- van Marken Lichtenbelt W. Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15:547–52.
- Bauwens M, Wierts R, van Royen B, Bucierius J, Backes W, Mottaghay F, et al. Molecular imaging of brown adipose tissue in health and disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41:776–91.
- Moulin K, Truel N, André M, Arnauld E, Nibbelink M, Cousin B, et al. Emergence during development of the white-adipocyte cell phenotype is independent of the brown-adipocyte cell phenotype. *Biochem J*. 2001;356:659–64.
- Billon N, Iannarelli P, Monteiro MC, Glavieux-Pardanaud C, Richardson WD, Kessar N, et al. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*. 2007;134:2283–92.
- Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:340–51.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454:961–7.
- Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:143–8.
- Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks C, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab*. 2012;16:348–62.
- Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*. 2012;15:480–91.
- Berry R, Rodeheffer MS. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol*. 2013;15:302–8.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013;27:234–25.
- Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, et al. Brown-fat paucity due to impaired -BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*. 2013;495:379–83.
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2010;285:7153–64.
- Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science*. 2010;328:1113–14.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150:366–76.
- Xue B, Rim JS, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res*. 2007;48:41–51.
- Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302:E19–31.
- Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev*. 2012;13(Suppl 2):83–96.
- Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19:1252–63.
- Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C670–81.
- Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, et al. The emergence of cold induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298:E1244–53.
- Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res*. 2012;53:619–29.
- Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. 2013;15:659–67.
- Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013;19:1338–44.

35. Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X, et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* 2014;19:810–20.
36. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013;5:1196–203.
37. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest.* 1998;102:412–20.
38. Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305:E567–72.
39. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006;4:263–73.
40. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999;4:585–95.
41. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999;4:611–17.
42. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 1999;3:151–8.
43. Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, et al. C/EBP α is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12532–7.
44. Carmona MC, Iglesias R, Obregón MJ, Darlington GJ, Villarroya F, Giral M. Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein α . *J Biol Chem.* 2002;277:21489–98.
45. Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, et al. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- β transcriptional complex. *Nature.* 2009;460:1154–8.
46. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92:829–39.
47. Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giral M. Peroxisome proliferator-activated receptor α activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem.* 2001;276:1486–93.
48. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 2006;3:333–41.
49. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 2007;6:38–54.
50. Hondares E, Rosell M, Díaz-Delfin J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR α) induces PPAR γ -coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem.* 2011;286:43112–22.
51. Trajkovski M, Lodish H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24:442–50.
52. Villanueva CJ, Vergnes L, Wang J, Drew BG, Hong C, Tu Y, et al. Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPAR γ specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab.* 2013;17:423–35.
53. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell.* 2014;156:304–16.
54. Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* 2014;19:593–604.
55. Scheele C, Larsen TJ, Nielsen S. Novel nuances of human brown fat. *Adipocyte.* 2014;3:54–7.
56. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One.* 2012;7:e49452.
57. Chu DT, Malinowska E, Gawronska-Kozak B, Kozak LP. Expression of adipocyte biomarkers in a primary cell culture model reflects pre-weaning adipobiology. *J Biol Chem.* 2014;289:18478–88.
58. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte.* 2014;3:4–9.
59. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 2007;131:242–56.
60. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 2013;17:644–56.
61. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014;156:20–44.
62. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011;91:1447–531.
63. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 1992;103:931–42.
64. Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300:R1115–25.
65. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481:463–8.
66. Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giral M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPAR α in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* 2010;11:206–12.
67. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 2012;26:271–81.
68. Adams AC, Kharitonov A. FGF21: the center of a transcriptional nexus in metabolic regulation. *Curr Diabetes Rev.* 2012;8:285–93.
69. Hondares E, Iglesias R, Giral M, Gonzalez FJ, Giral M, Mampel T, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem.* 2011;286:12983–90.
70. Villarroya F, Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab.* 2013;17:638–43.
71. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* 2012;122:1022–36.
72. Villarroya F, Iglesias R, Giral M. Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem.* 2004;11:795–805.
73. Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, Schinzel RT, Lewis GD, Dejam A, et al. β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab.* 2014;19:96–108.
74. Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, André M, Chenouard V, Arnaud E, et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes.* 2014 May 1. [Epub ahead of print].
75. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, et al. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J.* 2009;23:3113–20.
76. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglund M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 2013;19:631–4.
77. Hondares E, Gallego-Escuredo JM, Flachs P, Frontini A, Cereijo R, Goday A, et al. Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism.* 2014;63:312–17.
78. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med.* 2013;19:635–9.
79. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Daugaard S, Homøe P, Loft A, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 2013;17:798–805.
80. Gallego-Escuredo JM, Gómez-Ambrosi J, Catalan V, Domingo P, Giral M, Frühbeck G, et al. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int J Obes (Lond).* 2014 May 12. [Epub ahead of print].
81. Feyrter F. On the degeneration of brown fatty tissue in pheochromocytoma. *Wien Med Wochenschr.* 1961;111:648–9.
82. Ricquier D, Nechad M, Mory G. Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;54:803–7.
83. Lean ME, James WP, Jennings G, Trayhurn P. Brown adipose tissue in patients with pheochromocytoma. *Int J Obes (Lond).* 1986;10:219–27.

84. Bouillaud F, Villarroya F, Hentz E, Raimbault S, Cassard AM, Ricquier D. Detection of brown adipose tissue uncoupling protein mRNA in adult patients by a human genomic probe. *Clin Sci (Lond)*. 1988;75:21–7.
85. Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Ricquier D, et al. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:950–9.
86. Hadi M, Chen CC, Whatley M, Pacak K, Carrasquillo JA. Brown fat imaging with (18)F-6-fluorodopamine PET/CT, (18)F-FDG PET/CT, and (123)I-MIBG SPECT: a study of patients being evaluated for pheochromocytoma. *J Nucl Med*. 2007;48:1077–83.
87. Wang Q, Zhang M, Ning G, Gu W, Su T, Xu M, et al. Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One*. 2011;6:e21006.
88. Cheng W, Zhu Z, Jin X, Chen L, Zhuang H, Li F. Intense FDG activity in the brown adipose tissue in omental and mesenteric regions in a patient with malignant pheochromocytoma. *Clin Nucl Med*. 2012;37:514–15.
89. Dong A, Wang Y, Lu J, Zuo C. Hypermetabolic mesenteric brown adipose tissue on dual-time point FDG PET/CT in a patient with benign retroperitoneal pheochromocytoma. *Clin Nucl Med*. 2014;39:e229–32.
90. Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F, Patsch W. Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res*. 1997;38:2125–33.
91. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 2012;149:871–85.
92. López M, Alvarez CV, Nogueiras R, Diéguez C. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med*. 2013;19:418–27.
93. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009;58:1526–31.
94. Söderlund V, Larsson SA, Jacobsson H. Reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34:1018–22.
95. Carey AL, Formosa MF, Van Every B, Bertovic D, Eikelis N, Lambert GW, et al. Ephedrine activates brown adipose tissue in lean but not obese humans. *Diabetologia*. 2013;56:147–55.
96. Cypess AM, Chen YC, Sze C, Wang K, English J, Chan O, et al. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:10001–5.
97. Timmons JA, Baar K, Davidsen PK, Atherton PJ. Is irisin a human exercise gene? *Nature*. 2012;488:E9–10.
98. Raschke S, Elsen M, Gassenhuber H, Sommerfeld M, Schwahn U, Brockmann B, et al. Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PLoS One*. 2013;8:e73680.
99. Hecksteden A, Wegmann M, Steffen A, Kraushaar J, Morsch A, Ruppenthal S, et al. Irisin and exercise training in humans - results from a randomized controlled training trial. *BMC Med*. 2013;11:235.
100. Pekkala S, Wiklund PK, Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Horttanainen M, Pöllänen E, et al. Are skeletal muscle FNDC5 gene expression and irisin release regulated by exercise and related to health? *J Physiol*. 2013;591:5393–400.
101. Norheim F, Langley TM, Hjorth M, Holen T, Kielland A, Stadheim HK, et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 α , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS J*. 2014;281:739–49.
102. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab*. 2014;19:302–9.
103. Erickson HP. Irisin and FNDC5 in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor? *Adipocyte*. 2013;2:289–93.
104. Sanchis-Gomar F, Alis R, Pareja-Galeano H, Romagnoli M, Perez-Quilis C. Inconsistency in circulating irisin levels: what is really happening? *Horm Metab Res*. 2014;46:591–6.
105. Irving BA, Still CD, Argyropoulos G. Does IRISIN have a BRITE future as a therapeutic agent in humans? *Curr Obes Rep*. 2014;3:235–41.
106. Elsen M, Raschke S, Eckel J. Browning of white fat: does irisin play a role in humans? *J Endocrinol*. 2014;222:R25–38.
107. Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A, et al. FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS One*. 2013;8:e60563.
108. Lee P, Werner CD, Kebebew E, Celi FS. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38:170–6.
109. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011;17:200–5.
110. Peirce V, Vidal-Puig A. Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1:353–60.
111. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:96–105.
112. Lee KY, Yamamoto Y, Boucher J, Winnay JN, Gesta S, Cobb J, et al. Shox2 is a molecular determinant of depot-specific adipocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:11409–14.
113. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:4401–6.

2. Diferenciació dels adipòcits

Els adipòcits, juntament amb els osteoblasts, els miòcits i els condrocits, s'originen a nivell embrionari a partir de cèl·lules mare mesenquimals (MSCs) d'origen principalment mesodèrmic a partir d'un procés anomenat **adipogènesi**⁹⁷. En individus adults, tant murins com humans, s'ha descrit que l'adipogènesi segueix essent possible, tot i que en aquest cas les cèl·lules precursors implicades serien fenotípicament similars als perícits residents a l'endoteli dels vasos que irriguen els dipòsits adiposos⁹⁸.

In vivo, el procés d'adipogènesi del TAB s'inicia poc després del part en rosegadors i al final de la gestació en humans, en resposta a un increment de la disponibilitat de nutrients i portant a una gran expansió postnatal dels seus dipòsits^{99,100}. D'altra banda, en la major part de mamífers, el TAM es desenvolupa abans que el TAB, durant la fase fetal, per tal que el nou-nat pugui disposar d'una font de calor per a combatre l'estrès tèrmic que comporta eixir de l'úter matern¹⁰¹.

L'adipogènesi es pot dividir en dues grans fases: La **determinació** al llinatge adipocitari i la **diferenciació terminal**. Durant aquest procés, els precursors passaran de tenir una morfologia protuberant similar a la dels fibroblasts a una d'arrodonida amb acumulació de lípids pròpia dels adipòcits madurs, la qual al seu torn diferirà del tipus adipocitari final⁹⁹. Tot i les dissimilituds existents entre els adipòcits blancs, marrons i beix/brite, tots tres tipus cel·lulars tindran en comú, com podrem comprovar, diverses característiques del seu procés de diferenciació.

2.1. Diferenciació dels adipòcits blancs

2.1.1. Determinació

El resultat de la determinació serà la diferenciació de les cèl·lules precursors fins a l'estat de **preadipòcit**, cèl·lules restringides a esdevenir adipòcits. Els preadipòcits determinats, doncs, no es podran diferenciar en cap dels altres tipus cel·lulars que aquestes cèl·lules mare multipotencials podrien esdevenir un cop completin aquesta etapa de l'adipogènesi. Ara bé, encara que les cèl·lules progenitores completin la determinació fins a preadipòcits, aquests no prosseguiran amb la diferenciació terminal fins a l'estadi d'adipòcits madurs fins que no rebin els estímuls adients.

Històricament s'havia considerat que els adipòcits blancs i els marrons derivaven de les mateixes cèl·lules precursors. No obstant, posteriorment es va poder comprovar que els adipòcits marrons clàssics es derivaven principalment de precursors que expressaven el factor miogènic 5 (producte gènic de *Myf5*) i altres marcadors, com ara la proteïna *paired-box 7* (el de *Pax7*), origen que compartien amb les cèl·lules musculars. Els adipòcits blancs i beix/brite, d'altra banda, es derivarien principalment de precursors que no expressaven aquests marcadors¹⁰². Aquest paradigma, però, actualment està tornant a canviar: En ratolins s'ha pogut identificar recentment l'existència de precursors d'adipòcits marrons clàssics *Myf5*, així com de precursors blancs o beix/brite *Myf5*⁺^{103,104}. De fet, la presència d'aquest marcador dependria més aviat de la ubicació del dipòsit adipós que no pas del seu fenotip funcional:

Mentre que la major part d'adipòcits presents a la zona dorsoanterior provindrien de precursors *Myf5*⁺, aquells presents en la regió ventral-posterior ho farien preferentment de precursors *Myf5*⁻ ¹⁰³. Aquests descobriments suggereixen un nou model de diferenciació adipocitària (**Fig. 7**) on aquestes cèl·lules, independentment del seu fenotip final (blanc, beix/brite o marró clàssic), s'originen a partir dels precursors més abundants en cada regió concreta.

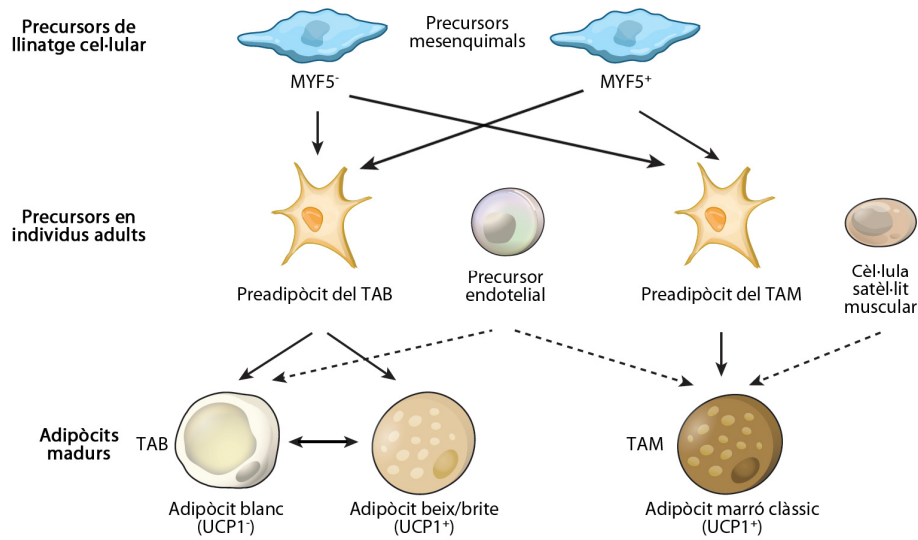


Figura 7: Possibles orígens cel·lulars dels diferents tipus d'adipòcits. Adaptat i actualitzat de Ref. 24.

En qualsevol cas, el pas dels precursors corresponents a preadipòcits blancs vindrà mediat per diversos estímuls, dels quals a la **Fig. 8** se'n recullen diversos. Entre aquests podem trobar els següents:

- **Senyalització per proteïnes de la família WNT.** Les pertanyents a la família WNT són glicoproteïnes secretades que tenen papers clau durant el desenvolupament embrionari. La senyalització per la via canònica de WNT és activada per la unió de lligands com WNT10B als receptors de membrana LRP5, LRP6 i Frizzled, per a després activar factors que reclutaran complexos transcripcionals dependents de β -catenina¹⁰⁵. La via canònica, no obstant, resulta inhibidora de l'adipogènesi dels preadipòcits blancs, afavorint però la diferenciació dels tipus cel·lulars alternatius derivats de MSCs (entre ells, la dels adipòcits marrons)^{105,106}. D'altra banda, lligands com ara WNT5B poden actuar a través d'una via independent de la β -catenina, interaccionant amb receptors de membrana alternatius i promovent l'adipogènesi¹⁰⁷.
- **Senyalització per proteïnes de la superfamília de TGF β .** Les proteïnes de la superfamília del factor de creixement transformant- β (TGF β) són morfògens secretables crucials per a la determinació del llinatge cel·lular en el cas de les MSCs¹⁰⁸. A partir de resultats contradictoris en models *in vivo* (es correlaciona amb adipogènesi)¹⁰⁸ i *in vitro* (inhibeix l'adipogènesi en línies de preadipòcits)¹⁰⁹, es va arribar a la conclusió que aquesta via promou l'adipogènesi en els progenitors multipotencials però la inhibeix en els preadipòcits determinats. D'altra banda, diferents proteïnes morfogenètiques òssies (**BMPs**), que pertanyen també a aquesta família, serien capaces d'afavorir l'adipogènesi activant diversos SMADs i senyalitzant a través de la via de p38¹¹⁰. BMP2 i BMP4

promouen l'adipogènesi dels adipòcits blancs^{111,112}, mentre que BMP7 i BMP9 en promouen la dels marrons^{113,114}. Pel que fa als adipòcits beix/brite, l'acció de les BMP ha estat menys estudiada, si bé en models *in vitro* humans s'ha descrit que tant BMP4 com BMP7 serien capaces de promoure la diferenciació a aquest tipus cel·lular, almenys a partir de progenitors *MYF5*⁻¹¹⁵.

- **Composició i rigidesa de la matriu extracel·lular.** La conversió de cèl·lules precursors de morfologia protuberant similar a la dels fibroblasts en adipòcits esfèrics implica una gran remodelació de la seva matriu extracel·lular. Com més elevada és la tensió que aquesta exerceix sobre la cèl·lula (com, per exemple, en situacions de fibrosi), més s'inhibeix la competència adipocitària¹¹⁶. De la mateixa manera, nivells elevats de certes molècules d'adhesió a la membrana plasmàtica (com ara la integrina $\alpha 5$), o de l'expressió i secreció d'inhibidors de metal·loproteases de la matriu (com ara TIMP3) són capaços d'aturar la progressió de l'adipogènesi^{117,118}.
- **Contacte intercel·lular i morfologia dels precursors.** *In vitro*, un requeriment habitual dels protocols de diferenciació de línies de precursors adipocitaris és que el cultiu arribi a confluència, ja que, en cas contrari, les MSC poden acabar determinant-se al llinatge osteoblàstic^{119,120}. No obstant, certes línies de preadipòcits són capaces de dur a terme un breu període d'expansió clonal mitòtica si s'hi afegeixen d'estímuls adipogènics¹²¹, per la qual cosa es pot afirmar que la confluència no afavoreix l'adipogènesi en garantir la inhibició per contacte de l'expansió cel·lular, sinó per altres mecanismes. Es creu que aquest fenomen es podria deure a la intervenció de les hidrolases de trifosfat de guanina (GTPases) de la família RHO, les quals, donada l'adquisició d'una forma esfèrica per part de les cèl·lules, serien capaces d'afavorir l'expressió de WNTs proadipogèniques⁹⁹.

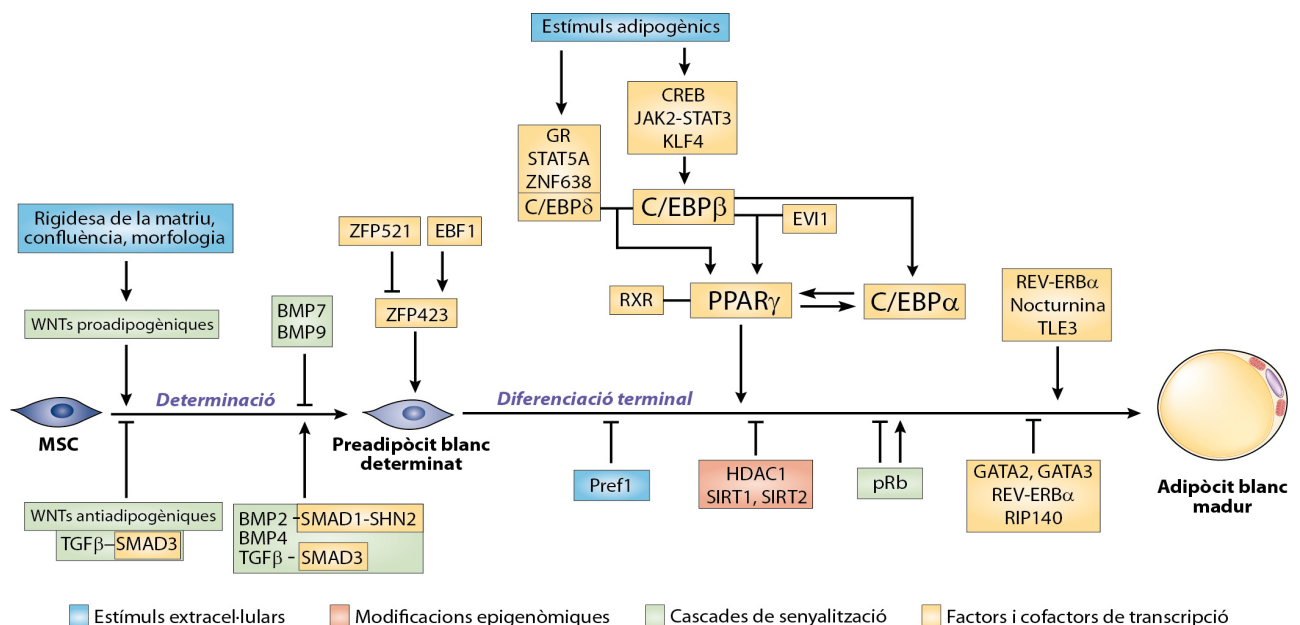


Figura 8: Adipogènesi dels adipòcits blancs. Relació de factors externs, de factors de transcripció i d'altres molècules capaços d'afectar les etapes de determinació i diferenciació terminal durant les diverses etapes de diferenciació. Consultar el text per a les diverses abreviatures. Adaptat a partir de Refs. 99 i 126.

Adicionalment, l'acció de factors de transcripció concrets als precursors adipocitaris també influiria a l'hora de completar la determinació. Un d'aquests és la proteïna amb dit de zinc (ZFP) 423 (**ZFP423**), el qual es creu que actua amplificant la senyalització de les BMP i l'eventual inducció de l'expressió del factor mestre de l'adipogènesi, PPAR γ , tant en precursors blancs com marrons¹²². L'expressió del gen *Zfp423*, no obstant, pot ésser modulada per altres dos factors de transcripció que es regulen recíprocament de forma negativa: El factor primerenc de cèl·lules B 1 (**EBF1**) indueix la ZFP423 i la **ZFP521** la reprimeix, equilibrant així la diferenciació cap a preadipòcits o osteoblasts¹²³⁻¹²⁵.

Finalment, en les fases més tardanes de la determinació es produirà una **aturada del cicle cel·lular** de forma definitiva. Mentre que les MSCs tenen una capacitat proliferativa indefinida, els preadipòcits determinats cultivats *in vitro* entren en quiescència en aparèixer el fenomen de la inhibició per contacte. No obstant, com s'ha comentat abans, aquest arrest del cicle cel·lular pot revertir-se per acció d'estímuls hormonals i provocar la reentrada coordinada dels preadipòcits a la fase G1, produint-se'n una **expansió clonal mitòtica**¹²¹. Les proteïnes del cicle cel·lular jugaran un important paper en aquest punt. Les **ciclins de tipus D** s'acomplexen amb les cinases dependents de ciclins 4 i 6 (**CDK4/6**) en presència d'aquests estímuls proadipogènics per tal d'orquestrar la transició de la fase G1 a la fase S. Aquesta s'aconseguirà gràcies a la fosforilació per part de CDK4/6 de certes proteïnes, com ara les de la família de la proteïna del retinoblastoma. **pRb**, en la seva forma no fosforilada, segresta els factors **E2F** i impedeix que aquest pas tingui lloc. Hiperfosforilat per CDK4/6, el complex es dissociarà i l'expansió clonal mitòtica podrà prosseguir¹²⁶. D'altra banda, el paper de **p53** en la diferenciació dels adipòcits està relacionat amb la seva capacitat d'aturar el cicle cel·lular: La seva activació impedeix que tingui lloc l'expansió clonal mitòtica i, per tant, desenvolupa un paper negatiu en el control de l'adipogènesi¹²⁷. En qualsevol cas, aquesta expansió clonal arribarà a la seva fi amb l'expressió dels factors de transcripció propis de la diferenciació terminal, com veurem a continuació, permetent així que el procés de diferenciació pugui prosseguir.

2.1.2. Diferenciació terminal

Un cop els preadipòcits s'han determinat al programa adipogènic, s'inicia una cascada transcripcional que culminarà amb l'expressió dels factors de transcripció mestres de l'adipogènesi, i, en conseqüència, dels gens del metabolisme de lípids i hidrats de carboni i d'adipocines associats amb el fenotip adipocitari final. Aquest serà el cas de FABP4, GLUT4, la leptina o l'adiponectina. Serà també en aquest moment en què es produirà l'aturada definitiva del cicle cel·lular dels preadipòcits. Aquesta etapa del procés de diferenciació es coneix com a **diferenciació terminal**^{99,126,128}. Tot i que són molts els factors de transcripció que tenen un paper en l'adipogènesi, serà l'expressió del receptor activat per proliferació peroxisomal γ (**PPAR γ**) i de la família de proteïnes d'unió a seqüències CCAAT/potenciadors (**C/EBP**), **C/EBP α** , **C/EBP β** i **C/EBP δ** , juntament amb la seva coordinació epigenòmica, el que provocarà majoritàriament la inducció dels gens adipocitaris durant aquesta fase de diferenciació terminal.

Les C/EBPs són factors de transcripció de tipus cremallera de leucina bàsica expressats àmpliament entre diferents tipus cel·lulars i que tenen papers clau en el desenvolupament dels mateixos¹²⁶. En els preadipòcits determinats, **C/EBP β** s'expressa en poca mesura i roman

ancorat a determinats punts del genoma. En presència d'estímuls adipogènics, però, s'indueix l'expressió del mateix, el qual reclutarà altres factors de transcripció adipogènics: **C/EBP δ** , el transductor de senyals i activador de la transcripció 5A (**STAT5A**), el receptor de glucocorticoides (**GR**) i el receptor de retinoides X (**RXR**). És més, excepte per al cas de C/EBP δ , es requereix la presència de C/EBP β en aquests punts del genoma per a què la resta de factors de transcripció s'hi puguin unir¹²⁹.

És precisament per aquest paper crític com a iniciador de la fase de diferenciació terminal de l'adipogènesi que l'expressió i activitat de C/EBP β estan fortament regulades. L'expressió d'aquest factor de transcripció s'indueix potentment per acció de l'AMPc a través de la fosforilació de l'activador transcripcional CREB per acció de la PKA, resultant en un increment en l'expressió del transcrit de C/EBP β durant les etapes primerenques de l'adipogènesi^{130,131}. Aquesta regulació de C/EBP β també es duu a terme a través d'un control posttraduccional: La fosforilació d'aquest factor de transcripció és un requeriment per al seu correcte funcionament. Addicionalment, els glucocorticoides, actuant a través del GR, afecten no tan sols a la seva expressió, sinó també la seva acetilació en inhibir el bloqueig per l'acció de corepressors transcripcionals com la histona desacetilasa 1 (**HDAC1**)^{132,133}. D'altra banda, la forma hipofosforilada de pRb pot activar l'expressió de C/EBP β però inhibir la de PPAR γ , indicant l'existència d'un rol dual d'aquesta proteïna en la promoció i la inhibició de l'adipogènesi¹³⁴.

Tot i que el paper i regulació de C/EBP β en el context de la diferenciació terminal de l'adipòcit són àmpliament coneguts, no existeix tanta informació sobre el de C/EBP δ . En presència de glucocorticoides, l'expressió d'aquest factor de transcripció també s'indueix ràpidament¹³⁰. D'altra banda, C/EBP δ resulta tan crític per a la diferenciació adipocitària com la resta de C/EBPs, donat que els ratolins doble *knock-out* (KO) per a tots dos factors de transcripció, C/EBP $\beta^{-/-}\delta^{-/-}$, presenten una adipogènesi incompleta i una disminució en la seva massa adiposa¹³⁵. Quant a C/EBP α , es coneix que és una diana directa de l'acció de C/EBP β ; la seva expressió s'indueix en fases tardanes de la diferenciació terminal per tal de preparar l'adipòcit per al seu fenotip madur i per a garantir l'aturada del cicle cel·lular degut a la seva acció antimitòtica per repressió d'E2F¹³⁶⁻¹³⁸.

L'activitat de C/EBP β i de C/EBP δ en aquestes etapes inicials de la diferenciació terminal pot ésser regulada per diversos factors. Per exemple, **ZNF638** s'uneix a tots dos factors de transcripció en estats primerencs de la diferenciació terminal per tal d'afavorir la posterior activació de PPAR γ per acció de les C/EBPs¹³⁹. Una altra proteïna, **Evi1**, és capaç de formar un complex amb C/EBP β per tal d'induir l'expressió de PPAR γ ¹⁴⁰. Aparentment, aquesta activitat tindria lloc tan sols durant l'adipogènesi dels adipòcits blancs, ja que, en el cas de les dels marrons, una proteïna diferent de la seva mateixa família, PRDM16, pren aquest paper i serà també clau en la diferenciació d'aquest tipus cel·lular, com veurem a la seva corresponent secció.

PPAR γ , per la seva banda, resulta tant necessari com suficient per a què la diferenciació terminal tingui lloc i, per tant, es completi el procés d'adipogènesi, fet pel qual se n'hi considera el **factor de transcripció mestre**¹⁴¹. La seva deficiència és letal a nivell embrionari, i una menor expressió constitutiva deguda a, per exemple, mutacions puntuals, és causa de lipodistròfia tant en humans com en ratolins¹⁴². Aquests fets són indicatius de l'enorme

rellevància d'aquest factor de transcripció per a la fisiologia general de l'organisme. En ambdues espècies, el gen *Pparg/PPARG* es pot transcriure a partir de dos promotors alternatius, que donaran lloc a dues isoformes: PPAR γ 1 i PPAR γ 2¹⁴³. Totes dues s'expressen més abundantment en adipòcits i, si bé PPAR γ 1 s'expressa també en altres tipus cel·lulars, inclosos els preadipòcits, PPAR γ 2 és pràcticament específica d'adipòcits. La progressió de l'adipogènesi, no obstant, pot tenir lloc per acció de qualsevol d'elles¹⁴⁴.

Els lligands endògens de PPAR γ romanen encara per descobrir, si bé certs metabòlits lipídics, com ara àcids grassos poliinsaturats i eicosanoides, s'han postulat com a candidats viables⁹⁹. Es creu que un dels mecanismes d'acció pels quals SREBP-1c promouria l'adipogènesi seria afavorint la generació d'aquests lligands endògens, a més d'induir directament l'expressió de PPAR γ unint-se a elements de resposta de tipus *E-box*, amb els quals SREBP-1c hi té afinitat i que són presents al promotor de PPAR γ ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

De forma similar a com ho fan altres receptors nuclears, PPAR γ s'uneix al DNA com un **heterodímer amb el RXR**¹⁴¹, el qual al seu torn haurà estat reclutat per C/EBP β a llocs rellevants d'acció de PPAR γ i, per tant, n'afavorirà l'acció. Les anàlisis realitzades sobre les regions reguladores dels gens diana de PPAR γ van permetre descobrir l'existència d'elements de resposta a aquest factor de transcripció, tot i que en realitat són pocs els gens que han estat validats com a dianes directes de PPAR γ en els adipòcits¹⁴⁸. PPAR γ és capaç d'unir-se als seus gens diana en absència de lligand, per la qual cosa és necessària l'acció de corepressors transcripcionals per a regular-ne l'activitat, els quals recluten histona desacetilases (com ara les sirtuïnes 1 i 2) i altres proteïnes de modificació de la cromatina per a evitar el seu accés al DNA⁹⁹. La unió del lligand a PPAR γ hi provoca un canvi conformacional que en deixa al descobert un lloc d'unió per a coactivadors, com és el cas dels coactivadors de receptors d'esteroides. En el cas d'alguns gens, com el de FABP4, PPAR γ està associat constitutivament a coactivadors, quelcom que resulta en una elevada expressió dels mateixos. En el cas d'altres gens és necessària l'acció d'un lligand exogen per tal que es produeixi aquesta substitució de corepressors per coactivadors i promoure'n la transcripció^{149,150}. D'altra banda, existeixen proteïnes atípiques com **RIP140** (*receptor-interacting protein 140*), un coregulador que interactua amb la forma de PPAR γ unida a lligand però que en reprimeix la transcripció¹⁵¹.

A més de pels sistemes de control de l'expressió gènica que ja s'han discutit, aquests nivells d'expressió i d'activitat de PPAR γ també estan regulats per altres proteïnes, com ara factors de transcripció relacionats amb els ritmes circadians (REV-ERB α , nocturnina), tot indicant una relació entre aquest procés i l'adipogènesi^{152,153}. Certes proteïnes d'unió a la seqüència GATA, com ara **GATA2** i **GATA3**, i factors secretables com el factor preadipocitari 1 (**Pref1** o DLK1) inhibeixen l'expressió de PPAR γ i han de ser reprimides als preadipòcits per tal que l'adipogènesi progressi^{154,155}. **TLE3** (*transducin-like enhancer of split 3*), d'altra banda, és un repressor de l'acció de les proteïnes de la família WNT que serà necessari per a garantir la presència de PPAR γ durant la diferenciació terminal, a més de dur a terme una acció anti-*browning* en inhibir la interacció de PPAR γ amb PRDM16, un factor d'importància en la diferenciació de l'adipòcit marró com tractarem posteriorment^{156,157}.

A nivell farmacològic, un ampli ventall de compostos és capaç d'induir l'expressió dels factors de transcripció clau en la diferenciació adipocitària. En cultius cel·lulars de línies de preadipòcits, tant blancs com marrons, sovint s'empren **combinats adipogènics** per tal

d'afavorir la seva diferenciació actuant especialment sobre la diferenciació terminal¹⁵⁸. La 3-isobutil 1-metilxantina (**IBMX**), un inhibidor de fosfodiesterases que permet mantenir concentracions elevades d'AMPc intracel·lular i, per tant, C/EBP β actiu, és un d'aquests compostos. L'IBMX comparteix aquesta acció amb la **indometacina**, la qual, a més, pot induir l'expressió de PPAR γ ¹⁵⁹. La **dexametasona**, per la seva banda, és un glucocorticoide capaç d'activar també l'expressió de les C/EBP. Juntament amb la insulina, que afavoreix l'expansió mitòtica clonal i la captació de glucosa per a generar àcids grassos i, per tant, vesícules lipídiques, aquestes molècules formen part comunament dels combinats adipogènics¹⁵⁸.

2.1.3. Adipòcit madur

La fase final de la diferenciació adipocitària suposa l'aparició del fenotip d'**adipòcit madur**, la qual implicarà una elevada expressió dels gens propis d'aquest tipus cel·lular, la presència de C/EBP β , C/EBP α i PPAR γ transcripcionalment actius i l'adquisició de la morfologia pròpia d'aquest tipus cel·lular. En el cas dels adipòcits blancs, aquesta serà la característica forma arrodonida amb una única vesícula lipídica, la qual es formarà per fusió de vesícules lipídiques de menor mida al llarg del procés de maduració^{126,160}.

En aquesta fase, tant C/EBP β com C/EBP α com el mateix PPAR γ són necessaris per a mantenir l'expressió del darrer i, per tant, la dels gens clau per al funcionament de l'adipòcit, com ara l'adiponectina, FABP4 o l'HSL¹⁶¹. De fet, PPAR γ i aquests C/EBPs es regulen l'un a l'altre a través d'un cicle de retroalimentació positiva per tal de garantir-se'n l'expressió en la fase terminal de la diferenciació i un cop completada aquesta¹⁶². C/EBP α , que s'expressa a nivells màxims en estadis tardans de la diferenciació terminal i en adipòcits madurs, resulta crucial per tal de conferir-n'hi la sensibilitat a l'acció de la insulina quant a captació de glucosa¹⁶³. Per la seva part, la rellevància de PPAR γ com a factor mestre de la transcripció també es fa palesa en aquest punt, ja que, com ocorria durant la fase terminal de l'adipogènesi, els adipòcits madurs no poden sobreviure en situacions de manca total de l'expressió d'aquest gen, però sí en situacions on l'expressió en sigui parcial^{164,165}.

2.2. Diferenciació dels adipòcits marrons

Tot i que, com hem comentat prèviament, el TAM es forma abans que el TAB en la major part de mamífers, en el moment del naixement, però, només els mamífers precoços disposen d'un TAM actiu i preparat per a produir calor. Les cries d'espècies altricials, d'altra banda, neixen amb un TAM format però un eix hipotalàmic-hipofisari immadur, quelcom que provocarà que aquest teixit adipós s'activi més tard; els primers dies de vida, les cries mantindran la calor corporal en jaure plegades al niu¹⁰¹. D'altra banda, mentre que en rosegadors els dipòsits de TAM clàssic mantindran una ubicació i presència consistents al llarg de la vida de l'animal, en humans i altres espècies els dipòsits de mida més gran, com ara l'interescapular, s'aniran atrofiat a mesura que avanci l'edat de l'individu i s'aniran reemplaçant per dipòsits majoritàriament formats per adipòcits blancs i beix/brite¹⁰¹.

Tot i les diferències ontogèniques i funcionals existents entre els adipòcits blancs i els marrons, ambdós tipus cel·lulars comparteixen una cascada transcripcional que en controla el procés de diferenciació. **PPAR γ** és totalment necessari per a una correcta diferenciació tant dels adipòcits blancs com dels marrons, com és també el cas de les **C/EBPs**, que hi actuaran

cooperativament per a promoure i mantenir l'estat de diferenciació dels mateixos^{136,166}. No obstant, l'adipogènesi dels adipòcits marrons també presenta tot un seguit de diferències clau. Per exemple, a diferència del que succeeix amb els adipòcits blancs, en el cas dels adipòcits marrons PPAR γ en solitari no és suficient per tal de promoure'n l'adipogènesi¹⁶⁷. D'altra banda, l'ablació de l'expressió de C/EBP α inhibeix el desenvolupament de tots els dipòsits de TAB, però no el dels de TAM clàssic¹⁶⁸. Per motius com aquests, resulta lògic pensar que existeixen altres reguladors del procés adipogènic propis i exclusius d'aquest altre tipus cel·lular. A la **Fig. 9** es resumeix el procés de diferenciació dels adipòcits marrons.

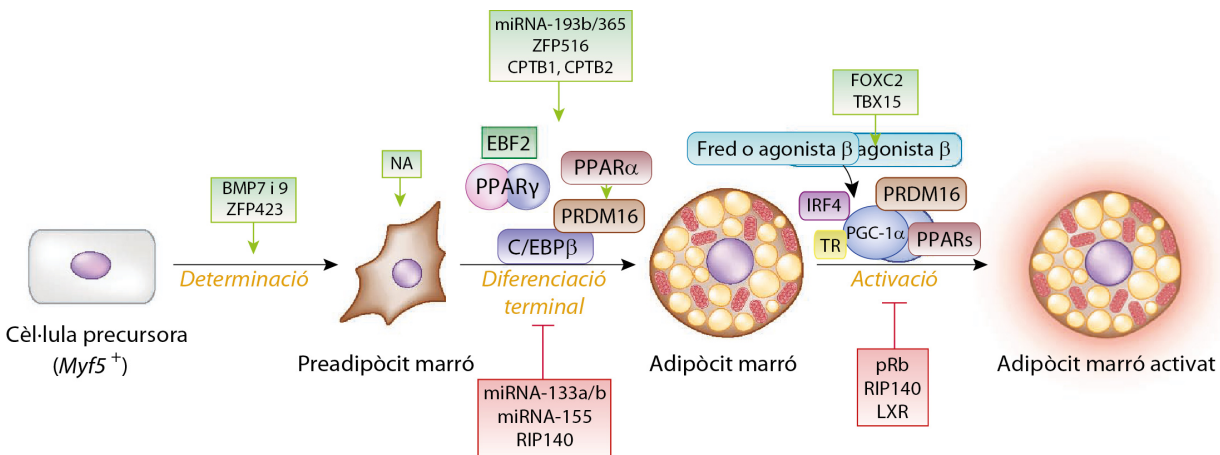


Figura 9: Adipogènesi dels adipòcits marrons clàssics. Resum de les etapes, factors de transcripció i altres molècules principals implicats en la diferenciació dels adipòcits marrons. En requadres verds s'indiquen factors proadipogènics, mentre que en vermells es mostren d'antiadipogènics. Adaptat a partir de Ref. 193.

2.2.1. Determinació

Als dipòsits de TAM clàssic, els preadipòcits marrons tenen un origen preferencial a partir de cèl·lules precursors *Myf5*⁺, les quals presenten un patró transcripcional i proteòmic més semblant al de les cèl·lules de múscul esquelètic¹⁶⁹. Els factors extrínsecs i intrínsecs que condicionen la determinació dels preadipòcits marrons ja han estat esmentats a la corresponent descripció dels blancs (com ara les proteïnes de la família WNT o les BMPs), si bé en aquest cas d'adipòcits marrons originats a partir de precursors *Myf5*⁺, el llinatge cel·lular alternatiu cap a on es diferenciaran no serà l'ossi sinó el mioblàstic¹⁶⁷.

Entre els factors de transcripció que afecten aquest procés de determinació es troba, com també ocorria en el cas dels preadipòcits blancs, **ZFP423**, ja que la seva ablació provoca una manca d'ambdós tipus cel·lulars¹²². D'altra banda, el factor primerenc de cèl·lules B 2 (**EBF2**) té un paper més selectiu que el d'EBF1 en la determinació i manteniment de la identitat cel·lular dels precursors dels adipòcits marrons, ja que l'absència del mateix es tradueix en una disminució en el nombre de preadipòcits als dipòsits clàssics de TAM i una morfologia més semblant a la del TAB¹⁷⁰.

Durant el procés de diferenciació dels adipòcits marrons, la **noradrenalina** jugarà un triple paper. En les cèl·lules precursors i els preadipòcits actuarà a través del receptor adrenèrgic β_1 i en promourà la proliferació alhora que n'inhibirà l'apoptosi, si bé no induirà l'expressió del gen d'UCP1 en trobar-se aquest encara inhibit per l'elevada expressió de proteïnes de control del cicle cel·lular com pRb o p53. En els preadipòcits determinats, la

noradrenalina contribuirà a elevar la concentració d'AMPC intracel·lular, un requisit clau per a l'activitat de C/EBP β . Finalment, durant l'etapa d'adipòcit madur, serà, com s'ha discutit anteriorment, l'activador principal de la termogènesi⁵⁹.

2.2.2. Diferenciació terminal

El punt clau per a fixar la diferenciació dels precursors adipocitaris *Myf5*⁺ (i, potencialment, *Myf5*⁻) en detriment de la línia miogènica (o osteogènica, en precursors *Myf5*⁻) serà l'inici de l'expressió de la ***PRD1-BF-RIZ1 homologous domain containing protein-16 (PRDM16)*** per acció de PPAR γ ¹⁷¹. L'EBF2 tindrà en aquest punt també un paper de rellevància en facilitar el seu reclutament cap al gen de PRDM16 per tal de prosseguir amb la diferenciació terminal de l'adipòcit marró¹⁷⁰. Com en el cas dels preadipòcits blancs, la diferenciació terminal dels preadipòcits marrons tindrà lloc en iniciar-se la transcripció dels gens propis d'aquest tipus cel·lular. Aquest pas serà iniciat per **C/EBP β** , si bé el factor de transcripció amb el qual interactuarà en aquesta ocasió serà PRDM16¹⁷².

PRDM16 és una proteïna amb motius de tipus dit de zinc, la qual es va descobrir cercant gens sobreexpressats al TAM respecte al TAB¹⁷¹. La seva expressió ectòpica en preadipòcits blancs o precursors mioblàstics hi provocà una inducció del programa termogènic pràcticament al complet, incloent l'expressió de gens com *Ucp1*, *Dio2*, *Ppargc1a*, i fins i tot la d'aquells insensibles a AMPC, com *Cidea* o *Elov3*. A més, també hi indueix un augment en la biogènesi mitocondrial i un increment de la respiració cel·lular, característiques pròpies dels adipòcits marrons^{102,171}. Coherentment, la pèrdua de l'expressió de PRDM16 als preadipòcits marrons no només hi provoca una pèrdua gairebé total d'aquestes característiques, sinó que, a més, hi promovia l'aparició d'una morfologia més similar al dels miotubs esquelètics¹⁶⁷. En concordança, a nivell tissular es van poder observar fenòmens anàlegs als vistos en cultiu¹⁰². Aquestes observacions, per tant, posaven de manifest que PRDM16 és un factor crucial per a l'adipogènesi dels adipòcits marrons, i que hi resulta clau per tal de determinar el seu llinatge cap a preadipòcits marrons en lloc de cap a progenitors mioblàstics durant l'organogènesi embrionària del TAM¹⁰².

Tot i que PRDM16 es pot unir directament al DNA, es coneix que la generació de mutacions que ho impedeixen no provoquen una alteració substancial del TAM a nivell fenotípic¹⁷¹. Per tant, havien d'existir mecanismes d'acció alternatius per tal d'explicar aquest, d'altra banda, crític paper en el procés de diferenciació dels preadipòcits marrons. PRDM16 és, de fet, capaç d'interactuar directament amb PPAR α , PPAR γ , p53 i diversos membres de la família C/EBP, tot resultant en una potent coactivació de la seva activitat transcripcional^{102,172}. Com hem comentat, resulta especialment rellevant la interacció amb C/EBP β , el qual es troba àmpliament expressat a l'adipòcit marró i en mioblasts. PRDM16 forma un complex transcripcional amb la forma activa d'aquest factor de transcripció, de manera anàloga a la interacció que C/EBP β duia a terme amb Evi1 durant el procés de diferenciació dels adipòcits blancs, quelcom coherent tenint en compte el fet que tant PRDM16 com Evi1 pertanyen a la mateixa família de factors de transcripció amb domini PR¹⁴⁰. En el cas que ens ocupa, el complex PRDM16-C/EBP β resulta suficient per a promoure el programa transcripcional complet dels preadipòcits marrons¹⁰².

Entre les dianes que el complex PRDM16-C/EBP β hi pot induir l'expressió hi figura PPAR γ . A més, en el cas de la diferenciació dels adipòcits marrons, PRDM16 també pot formar part del complex PPAR γ -RXR i afavorir l'expressió de diversos gens, entre els que hi figuren els del programa termogènic^{102,172}. El complex PRDM16-C/EBP β és també capaç d'induir l'expressió del **coactivador de PPAR γ 1-alfa (PGC-1 α)**, que, com descriurem a continuació, serà clau en l'activació de l'adipòcit marró¹⁷¹. Finalment, PRDM16 podrà formar també complexos repressors amb les proteïnes CPTB1 i CPTB2, els quals inhibiran l'expressió de gens propis dels adipòcits blancs per a garantir la diferenciació dels marrons¹⁷³.

En aquest context resulta també d'especial interès el paper dels **microRNAs** (miRNA), que seran capaços d'afavorir que la cèl·lula progenitora bipotencial s'encamini a aquest llinatge o a l'alternatiu, o de fer que l'expressió dels factors de transcripció mestre de l'adipogènesi siguin inhibits. Els miRNA són oligonucleòtids d'un promig de 22 bases que actuen com a inhibidors de la transcripció de determinats gens diana en ser complementaris a la seqüència del seus transcrits¹⁷⁴. Alguns miRNA, com els del cúmul **miRNA-193b/365**, són capaços de promoure l'adipogènesi dels adipòcits marrons (almenys en precursors *Myf5*⁺) tot inhibint l'expressió d'inhibidors de l'acció del complex PPAR α -PRDM16, si bé no resulten essencials per a què tingui lloc la mateixa^{175,176}. D'altra banda, els **miRNA-133a/b** i **-155** resulten inhibitoris. Els miRNA-133 interfereixen directament l'expressió de PRDM16, mentre que el miRNA-155 forma amb C/EBP β un cicle inhibitori mutu on, en funció dels senyals rebuts, s'aconseguirà aturar la repressió de l'expressió d'aquest factor de transcripció i prosseguir amb l'adipogènesi¹⁷⁷.

2.2.3. Adipòcit madur

PGC-1 α , codificat pel gen *Ppargc1a/PPARGC1A*, fou identificat inicialment com un coactivador de PPAR γ induïble per fred al TAM¹⁷⁸, i actualment està considerat un regulador mestre de la biogènesi mitocondrial i del metabolisme oxidatiu en molts tipus cel·lulars. Aquesta proteïna presenta diverses isoformes que ens transcriuen per processament alternatiu, essent la isoforma **PGC-1 α 1** la que s'ha descrit com a implicada en el metabolisme en diversos teixits a més de l'adipós, com ara al fetge, al múscul esquelètic i al múscul cardíac¹⁷⁹. A efectes pràctics, ens referirem a aquesta proteïna derivada de la isoforma α 1 del transcrit com a PGC-1 α .

L'expressió i activació de PGC-1 α està, com hem mencionat, lligada a estímuls β -adrenèrgics i de fred. En concret, la seva expressió està regulada per **ATF2**, el qual és, com s'ha mencionat prèviament, una diana de la MAPK p38 i serà activat per fosforilació com a part del programa termogènic^{82,180}. Als adipòcits marrons clàssics i beix/brite, PGC-1 α és capaç d'induir l'expressió d'UCP1 i d'altres gens del programa termogènic^{178,181}. Els dipòsits de TAM, però, es poden diferenciar normalment en absència de PGC-1 α , potencialment per una compensació a través de PGC-1 β ¹⁸². A través de l'acció de PGC-1 α , per tant, queden vinculats els processos d'activació i reclutament d'adipòcits marrons o beix/brite amb la termogènesi, i la seva funció més rellevant tindrà lloc a nivell d'adipòcit madur en la inducció dels gens del programa termogènic.

El mecanisme d'acció d'aquest coactivador rau en la seva **unió amb factors de transcripció**. Als adipòcits marrons, la forma activa de PGC-1 α (és a dir, fosforilada) és capaç

d'interactuar amb PPAR γ , PPAR α , el receptor d'hormones tiroïdals (TR) i d'altres, tot afavorint el seu reclutament als promotors de gens d'interès del programa termogènic i, per tant, induint-ne l'expressió dels mateixos^{178,183,184}. D'altra banda, el mateix PRDM16 és capaç d'unir-se directament a PGC-1 α i PGC-1 β per tal de potenciar la seva activitat, contribuint a induir l'expressió del primer als adipòcits marrons¹⁷¹ i beix/brite¹⁸⁵.

Al seu torn, diversos factors són capaços d'induir l'expressió o potenciar l'acció de PGC-1 α . **PPAR α** és un important activador de la termogènesi no només per ser capaç d'induir l'expressió d'UCP1¹⁸⁶, sinó també la de PGC-1 α . PPAR α duria a terme aquesta activitat en conjunció amb PRDM16, l'expressió del qual també indueix¹⁸⁷. Recentment s'ha descobert que algunes proteïnes serien capaces d'actuar, al seu torn, com a parelles transcripcionals de PGC-1 α , com és el cas del factor regulador d'interferons-4 (**IRF4**). Aquest factor, a més d'induir l'expressió tant de PGC-1 α com de PRDM16, la seva interacció directa amb el primer seria un requisit indispensable per a promoure la transcripció de gens del programa termogènic¹⁸⁸.

Existeixen altres factors que, no obstant, són capaços de reprimir la transcripció de gens del programa termogènic a partir de la seva interferència amb PGC-1 α . Les proteïnes de la família retinoblastoma, com pRb o p107, reprimeixen l'expressió de PGC-1 α ¹⁸⁹. RIP140, d'altra banda, pot inhibir l'activitat de PGC-1 α sobre determinats gens per unió i bloqueig directe del mateix¹⁹⁰, un paper que s'afegeix a la inhibició general de l'adipogènesi mencionada prèviament i que el situa com a important regulador negatiu de la diferenciació de tots els tipus d'adipòcit.

A més de PRDM16 i PGC-1 α , l'adipogènesi i el manteniment de la identitat termogènica dels adipòcits marrons poden venir afavorits per altres factors de transcripció, com ara *forkhead box C2* (**FOXC2**) o el *T-box transcription factor 15* (**TBX15**), els quals, a més de ser necessaris per a la inducció de gens tals com *Ucp1* o *Pparg1a*, respectivament, estarien relacionats amb el *browning* dels dipòsits de TAB^{191,192}.

2.3. Diferenciació i transdiferenciació dels adipòcits beix/brite: *Browning*

El reconeixement dels adipòcits beix/brite com un tipus cel·lular al marge dels adipòcits blancs i marrons clàssics és un esdeveniment recent i encara controvertit, per la qual cosa el seu procés de diferenciació és molt desconegut si és que aquest presenta canvis destacables amb el dels adipòcits prèviament descrits. Els adipòcits beix/brite del dipòsit inguinal de TAB es derivarien preferentment, a diferència dels adipòcits marrons clàssics de l'interescapular, de progenitors embrionaris *Myf5*⁻¹⁰². No obstant, convé recordar que els adipòcits termogènics residents a altres dipòsits de TAB també poden provenir de precursors *Myf5*⁺¹⁰³. Si aquestes cèl·lules precursors són les mateixes de les que es deriven els adipòcits blancs del seu dipòsit o si ho fan a partir de precursors propis independents roman per elucidar.

Una altra disjuntiva existent sobre la diferenciació dels adipòcits beix/brite i la seva activació en una situació d'estímul per fred o noradrenalina és, precisament, com apareixen aquestes cèl·lules termogèniques multiloculars que són visibles entre els adipòcits blancs. Actualment, les dues teories més acceptades són la d'una **diferenciació de novo** a partir de

precursors residents i la d'una **transdiferenciació** d'adipòcits "blancs" preexistents¹⁹³. Degut a la comunicació feaent i contradictòria de tots dos fenòmens per part de diferents grups a la literatura existent, és probable que l'explicació definitiva sigui de tipus integrador i que combini totes dues hipòtesis.

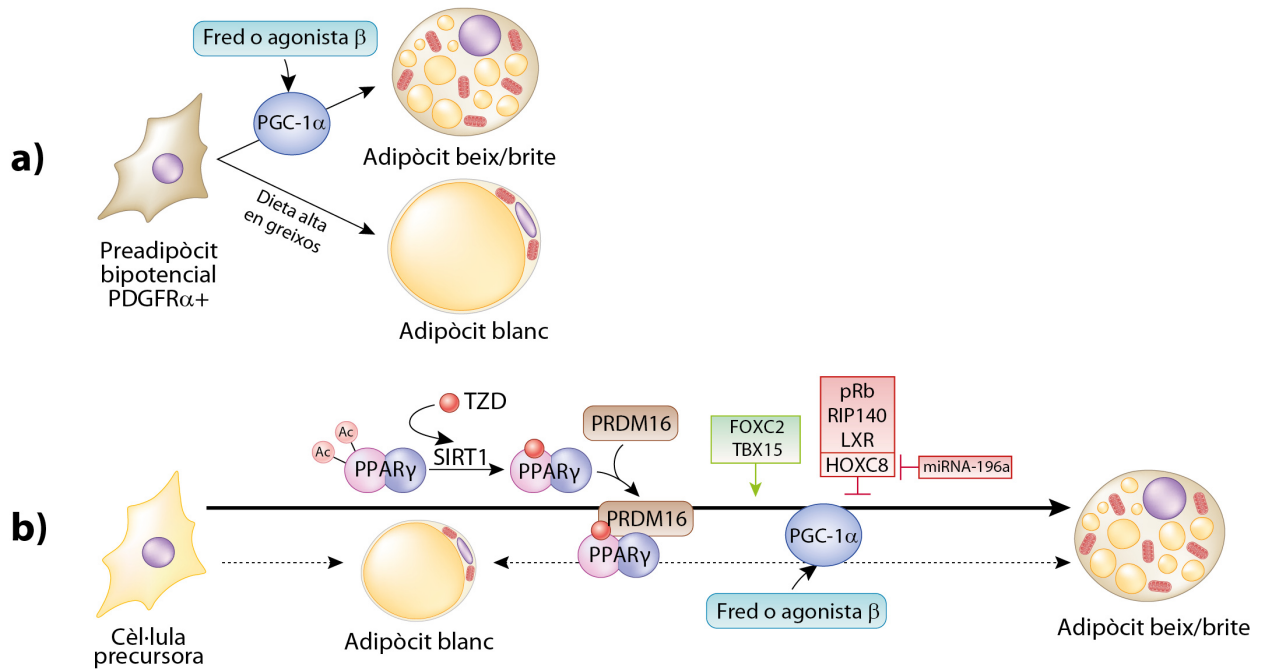


Figura 10: Adipogènesi i transdiferenciació dels adipòcits beix/brite. Representació esquemàtica de les dues possibles vies proposades per a la generació d'adipòcits beix/brite. **(a)** Diferenciació *de novo* a partir de precursors propis. **(b)** Transdiferenciació de cèl·lules existents. En requadres verds s'indiquen factors proadipogènics, mentre que en vermells es mostren d'antiadipogènics. Adaptat de la Ref. 193.

2.3.1. Diferenciació a partir de cèl·lules precursoras bipotencials

Diversos estudis han aportat resultats sobre l'existència de possibles **cèl·lules progenitores bipotencials** capaces d'originar adipòcits blancs i beix/brite (**Fig. 10a**). Als dipòsits epididimals de TAB murí s'ha descrit una subpoblació cel·lular que presenta els marcadors PDGFR α , CD45 i Sca1. Sota un estímul β -adrenèrgic, es produïa un augment en la proliferació d'aquestes cèl·lules, les quals esdevenien adipòcits amb morfologia multilocular. D'altra banda, en situacions de dieta alta en greixos, aquests precursors es diferenciaven preferentment a adipòcits blancs. A més, disposaven d'una capacitat d'autorenovació, per la qual cosa es va poder aïllar i mantenir en cultiu¹⁹⁴. Una altra subpoblació cel·lular, present al TAM interescapular, al múscul esquelètic i al TAB inguinal de ratolí i definida com Sca1⁺:CD45⁻:Mac1⁻ també era capaç de diferenciar-se a un fenotip multilocular en aquests dipòsits subcutanis de TAB en ésser estimulada amb BMP7³⁵. Posteriorment, en estudis de marcatge cel·lular, es va poder comprovar que la major part dels adipòcits beix/brite (UCP1⁺) que sorgien al dipòsit inguinal ho feien a partir d'una població precursora que es diferenciava *de novo* més que no pas a partir d'adipòcits preexistents¹⁹⁵.

En un estudi recent es va suggerir un potencial **origen semblant al del múscul llis** per als adipòcits beix/brite, però no per als marrons. Emprant estudis de marcatge d'UCP1, es va poder determinar que una fracció de les cèl·lules de dipòsits blancs la coexpressaven amb marcadors típics d'aquest altre tipus cel·lular. A més, es demostrà que els adipòcits beix/brite

estudiats provenien de precursors que expressaven *Myh11*, un marcador de múscul llis, i que l'expressió ectòpica de PRDM16 en cultius primaris de múscul llis era capaç de convertir els miòcits en adipòcits UCP1⁺¹⁹⁶. Aquest fet suggeriria l'existència d'un llinatge relacionat amb el miòcit llis en el cas dels adipòcits beix/brite, si bé encara resta aprofundir al respecte.

En qualsevol cas, el procés pel qual es produiria l'adipogènesi en aquestes cèl·lules progenitores no està caracteritzat en profunditat, però es creu que seria anàleg al de generació d'adipòcits blancs o marrons clàssics: El procés seria iniciat per C/EBP β , i la inducció i manteniment de PPAR γ i C/EBP α o de PRDM16 serien claus durant la diferenciació terminal, així com la de PGC-1 α en situacions d'estímul termogènic¹⁹³.

2.3.2. Transdiferenciació d'adipòcits preexistents

Altres grups, no obstant, han reportat l'existència de fenòmens d'interconversió entre adipòcits madurs en quiescència amb un fenotip blanc i adipòcits amb un fenotip marró. Aquesta situació, doncs, seria un fenomen poc comú de **transdiferenciació**, en què una cèl·lula somàtica ja diferenciada és capaç d'esdevenir-ne una altra sense passar per un estadi desdiferenciat³⁶ (**Fig. 10b**). Segons aquesta teoria, els adipòcits blancs uniloculars, en resposta al fred o a estímuls β -adrenèrgics, serien capaços de reprogramar-se a nivell genètic o epigenètic, esdevenint així adipòcits beix/brite multiloculars, amb un elevat contingut mitocondrial, expressió d'UCP1, de PGC-1 α i d'altres gens termogènics i generant, efectivament, calor per desacoblament de la CTE³⁶.

Aquest fenomen es va descriure quinze anys enrere amb l'observació que la major part d'adipòcits multiloculars sorgien a partir d'adipòcits blancs madurs i, per tant, en quiescència¹⁹⁷. Aquest fenomen va ser confirmat posteriorment a partir de la realització d'estudis de marcatge cel·lular, i s'ha pogut reforçar amb la constatació de la presència d'una cel·lularitat constant als dipòsits blancs durant el *browning*, la qual seria indicativa d'un estat estacionari on no es produïrien variacions en la quantitat sinó en el fenotip dels seus adipòcits³². D'altra banda, l'existència als dipòsits de TAB sota estímuls de fred d'unes cèl·lules conegudes com **adipòcits pauciloculars** (UCP1⁺ amb una distribució de vesícules lipídiques intermèdia entre els adipòcits blancs i els marrons) suggereix que aquest tipus cel·lular es correspondria amb morfologies de transició entre el fenotip d'adipòcit blanc i el del marró, tot donant suport a la hipòtesi de la transdiferenciació^{198,199}.

Recentment, un altre estudi *in vivo* va donar una forta empenta a aquesta teoria: Emprant tècniques de marcatge adipocitari, es va poder determinar que els adipòcits beix/brite que apareixien al dipòsit inguinal de TAB hi sorgien preferentment per interconversió directa d'adipòcits blancs, com ja s'havia suggerit, però que, a més, aquesta era **reversible**: Després de 5 setmanes d'exposició de nou a una temperatura elevada, els adipòcits beix/brite no eren eliminats per apoptosi, sinó que es tornaven a transdiferenciar al fenotip blanc. És més, una segona ronda d'estímul de fred era capaç de provocar que tornessin a esdevenir beix/brite⁶⁶. Aquesta interconversió bidireccional suggereix una gran plasticitat dels adipòcits, i una relació més directa entre cèl·lules capaces de consumir energia i d'emmagatzemar-la quan així ho requereixi l'organisme.

La teoria de la transdiferenciació rep, a més, un inesperat suport addicional amb el descobriment que la plasticitat dels adipòcits no acabaria amb la interconversió blanc-marró: En rosegadors s'ha descrit que, durant l'embaràs i la lactància, alguns dels adipòcits blancs que conformen la glàndula mamària patirien fenòmens de transdiferenciació i esdevindrien cèl·lules capaces de produir llet, un fenomen que només tindria lloc al dipòsit subcutani de les femelles. A aquestes cèl·lules que produeixen llet i emmagatzemen lípids de forma multilocular se'ls va assignar el nom d'**adipòcits roses**, pel color que presenten sota el microscopi en tenir una morfologia més semblant a la d'una cèl·lula epitelial²⁰⁰.

Cal recordar, però, que la definició de "*brite*" com a tal implica l'aparició d'adipòcits marrons en el si d'un dipòsit blanc i no la conversió total del mateix a una configuració termogènica. Això suggereix que la transdiferenciació no seria un fenomen que es pogués produir a qualsevol adipòcit blanc, sinó només en una subpoblació determinada, la qual podria provenir o no de precursors diferents als dels adipòcits blancs encarregats de l'emmagatzematge de lípids. D'altra banda, la designació "*beix*" fa al·lusió al color que prenen els dipòsits de TAB un cop es produeix el *browning*, més acusada als subcutanis que no pas als viscerals: El fet que una hipòtesi o una altra es compleixi preferentment a determinats dipòsits de TAB o de compartiment tampoc no s'ha de descartar a l'hora de garantir la validesa de totes dues teories. En qualsevol cas, la veritable naturalesa del *browning* resta encara per elucidar.

2.3.3. Regulació del *browning*

Independentment de la forma en què els processos de *browning* tinguin lloc, els fets clau són que unes determinades cèl·lules han d'ésser capaces d'activar els mecanismes transcripcionals propis dels adipòcits marrons per tal d'esdevenir adipòcits beix/*brite*. Aquesta activació, doncs, estarà afavorida per diversos factors i controlada per l'organisme per tal d'afinar correctament l'aparició d'aquestes cèl·lules i que realitzin la seva funció¹⁹³.

PRDM16 es troba sobreexpressat al TAM clàssic respecte al TAB visceral¹⁷¹, però resulta d'interès destacar que, als dipòsits de TAB més susceptibles de ser subjectes a processos de *browning*, com ara l'inguinal de ratolins, PRDM16 també s'expressa a nivells elevats. A més, l'ablació de la seva expressió n'impedeix l'adquisició d'un fenotip termogènic sota els estímuls adients¹⁸⁵. Per tant, aquest factor és essencial per a què el *browning* es pugui produir.

Com en el cas de la resta de processos de diferenciació adipocitària, els microRNAs tindran també un paper rellevant en la regulació de gens propis del fenotip termogènic en els adipòcits beix/*brite*. Com en el cas dels marrons clàssics, miR-133 bloquejarà l'expressió de PRDM16 i miR-155 la de C/EBP β , inhibint així la diferenciació dels adipòcits beix/*brite*¹⁷⁷. En el cas d'aquest tipus cel·lular, a més, l'actuació d'un altre miRNA n'afavorirà la diferenciació: **miR-196a**. Una de les proteïnes *homeobox*, HOXC8, s'expressa en nivells elevats en progenitors *Myf5*, on hi actua reprimint els gens propis dels adipòcits marrons, mentre que, durant l'adipogènesi d'aquest tipus cel·lular, la seva expressió és reprimida. L'acció repressora de HOXC8 té lloc per inhibició de l'expressió de C/EBP β . Durant l'estímul termogènic dels adipòcits beix/*brite*, miR-196a és induït i reprimeix l'expressió de *Hoxc8*, tot permetent un inici de la transcripció de gens propis de l'adipòcit marró en incrementar indirectament l'expressió del gen *Cebpb* i, per tant, permetent la seva unió amb PRDM16²⁰¹.

2.3.4. Control no noradrenèrgic de l'activació dels adipòcits marrons

En estudis realitzats amb ratolins KO pel gen del receptor adrenèrgic β_3 es va poder comprovar que els seus adipòcits marrons eren completament funcionals, si bé sí que tenien disminuït el nombre d'adipòcits beix/brite als dipòsits de TAB²⁰². Tot i que aquest fet s'havia atribuït inicialment a un increment del paper del receptor β_1 en els adipòcits marrons clàssics²⁰³, actualment, el descobriment de **factors alternatius** al marge de l'estímul simpàtic capaços de provocar l'activació dels dipòsits de TAM o el *browning* dels dipòsits de TAB pot explicar, almenys en part, aquesta contradicció (**Fig. 11**). A continuació s'esmentaran alguns dels més rellevants que han sorgit, especialment, durant els darrers anys.

- **Retinoides:** Des de fa més de 20 anys es coneix que els retinoides, uns derivats de la vitamina A (retinol), són uns potents activadors del reclutament de TAM i de la transcripció d'UCP1²⁰⁴. En situacions d'activació termogènica, els adipòcits marrons sobreexpressen la **proteïna d'unió a retinol-4 (RBP4)**, que, si bé es correlaciona amb obesitat en el cas de la seva expressió pel TAB, a nivell de TAM té una funció més estrictament limitada a la originalment descrita i s'encarregaria de lliurar retinol a altres adipòcits marrons per tal d'activar-los²⁰⁵. Administrant de forma crònica àcid retinoic *in vivo*, els dipòsits de TAB pateixen un acusat fenomen de *browning* amb presència augmentada de cèl·lules multiloculars²⁰⁶.
- **Hormones tiroïdals:** L'eix tiroïdal-hipofisiari és un important activador del TAM. La presència de la **tiroxina 5'-desiodasa de tipus 2 (DIO2)** al TAM, però no al TAB, indica que aquest teixit és capaç de generar triiodotironina (**T3**) a partir de la tiroxina (T4). A nivell intracel·lular, la T3 s'unirà al receptor d'hormones tiroïdals (**TR**), per acció del qual s'activaran determinats gens del programa termogènic, incloent el d'UCP1²⁰⁷. A més, a nivell central, la T3 també pot activar les neurones hipotalàmiques d'enviar senyals d'activació al TAM²⁰⁸.
- **Prostaglandines:** La ciclooxygenasa-2 (COX2), l'enzim limitant en el procés de síntesi de prostaglandines, i les prostaglandines derivades del TAB (PGE₂ i PGI₂) semblen tenir un paper rellevant en la inducció d'UCP1 en els adipòcits beix/brite del TAB inguinal, però no als marrons clàssics. De fet, la COX2 és induïda com a resultat del procés de *browning* al TAB inguinal. D'altra banda, la incubació de MSCs amb aquestes molècules provoca una diferenciació de les mateixes a adipòcits amb un fenotip marró. Es creu que les prostaglandines actuarien mitjançant l'activació de PPAR γ , si bé encara no s'ha descobert una explicació mecànica clara^{209,210}.
- **Agonistes de PPARs:** Donat que PPAR α i PPAR γ són, com s'ha comentat, inductors de l'adipogènesi i del fenotip marró, els seus agonistes seran capaços d'afavorir el reclutament als dipòsits de TAM i el *browning* als de TAB. Per exemple, el bezafibrat, un agonista de PPAR α , és capaç d'induir el *browning* dels dipòsits viscerals *in vivo* i *in vitro* sense alterar el TAM^{187,211,212}. D'altra banda, les TZD, com ara la rosiglitazona, activen PPAR γ i són capaces d'induir el *browning* al TAB i l'adipogènesi cap al fenotip marró a través de la inducció de l'expressió de PGC-1 α i de PGC-1 β ¹⁸³.

- **Àcids biliars:** El fetge és també capaç de modular l'activitat del TAM tot secretant àcids biliars, els quals, actuant a través del seu receptor TGR5 són capaços d'induir-hi la DIO2 i, per tant, activar-lo²¹³.
- **FGF21:** El factor de creixement fibroblàstic 21 (**FGF21**) pertany a la família d'FGF endocrins. Als adipòcits marrons i beix/brite, FGF21 interactua amb el seu receptor i la proteïna coreceptora β -klotho, i activarà vies de senyalització que promouran l'expressió de PGC-1 α i, en última instància, UCP1 i la termogènesi. En aquest cas, i com es revisarà posteriorment, l'adipòcit marró és tant una diana com un lloc d'alliberació d'aquest factor secretable, tot i que el principal òrgan productor n'és el fetge. Això confirma FGF21 com un factor secretable inductor de la termogènesi independent del sistema nerviós central^{38,214,215}.
- **Irisina:** El múscul esquelètic és capaç de produir múltiples molècules secretables, anomenades miocines. Una d'elles, la irisina, és la forma soluble i present en la circulació sanguínia del producte gènic de *Fndc5/FNDC5*. Tant en humans com en ratolins, la irisina seria induïble per exercici, situació en la qual seria secretada pel múscul i produiria fenòmens de *browning* als dipòsits de TAB, si bé no activaria ni reclutaria els dipòsits de TAM²¹⁶.
- **Pèptids natriurètics:** Els pèptids natriurètics auricular (ANP) i ventricular (BNP) són hormones produïdes principalment pel cor. Totes dues, especialment el BNP, són capaces d'induir el reclutament del TAM a un fenotip termogènic i el *browning* dels dipòsits de TAB. Donat que els adipòcits marrons expressen a la seva superfície el receptor de pèptids natriurètics, aquests hi poden interactuar i iniciar una via de senyalització similar a la de l'estímul noradrenèrgic sobre el seu receptor, si bé fent servir monofosfat de guanina cíclic (GMPc) i la proteïna cinasa dependent del mateix (PKG) en lloc de l'AMPc i la PKA. El resultat final de l'activació d'aquesta via és la inducció de l'activitat de la MAPK p38 i, en conseqüència, la inducció de gens propis del programa termogènic, com ara UCP1 o PGC-1 α ²¹⁷.
- **Cardiotrofina-1:** La cardiotrofina-1 (CT-1) és una citocina de la família gp130 produïda pel múscul cardíac i l'esquelètic. Aquesta molècula és capaç de promoure el reclutament al fenotip termogènic dels dipòsits de TAB²¹⁸, tot posant de manifest el possible paper de rellevància per part de determinades citocines en la funció termogènica, com tractarem posteriorment.
- **BMP8B:** La BMP8B és una proteïna de la família de les BMPs que, en el context adipocitari i a diferència d'altres BMPs, no té un paper rellevant en la diferenciació sinó en l'activació dels adipòcits marrons. BMP8B, de fet, és capaç d'actuar directament sobre els adipòcits marrons i sensibilitzar-los a l'estímul noradrenèrgic, però, addicionalment, senyalitza sobre les neurones hipotalàmiques tot afavorint la seva senyalització al TAM²¹⁹. El seu mecanisme és similar al que es dona en el cas d'unes altres hormones neuropeptídiques, les **orexines**, les quals interactuen amb el receptor de BMPs 1A (BMPR1A), present als adipòcits marrons²²⁰.
- **Factors dietaris:** A més d'aquestes molècules definides, s'ha pogut comprovar que múltiples principis actius dietaris són capaços de provocar tant l'activació del TAM

com el *browning* del TAB per mecanismes funcionals diversos, sovint per accions preferentment a nivell central. Alguns d'aquests factors són les restriccions d'aminoàcids (com ara la metionina), la capsàicina, la ficoxantina, l'hidrolitzat de proteïna de salmó o el resveratrol. Altres factors, però, provocarien tan sols l'activació del TAM (com ara la dieta alta en greixos, almenys en ratolins) o el *browning* dels dipòsits de TAB (l'àcid linoleic conjugat o certs principis actius d'origen botànic)²²¹.

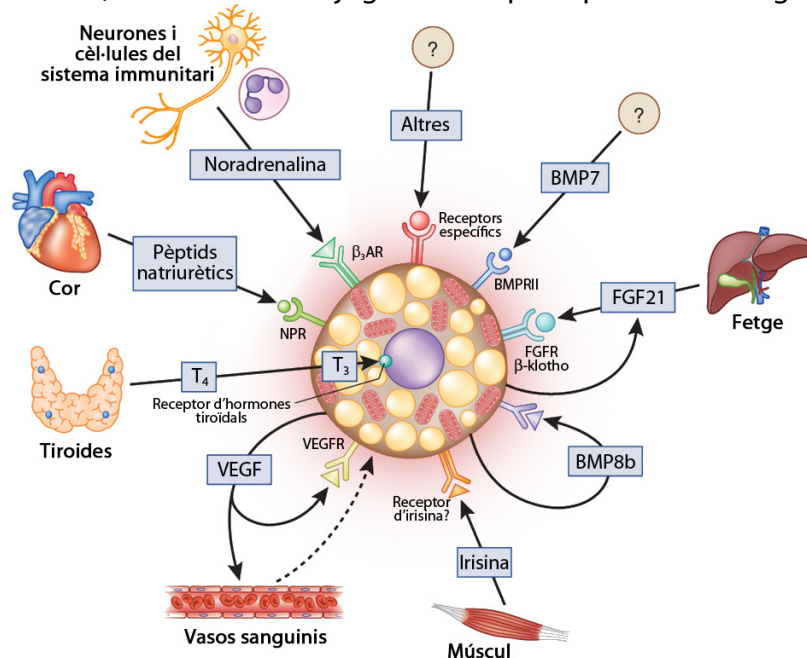


Figura 11: Relació d'alguns agents noradrenèrgics i no noradrenèrgics activadors dels adipòcits marrons. S'inclou la forma d'acció sobre aquest tipus cel·lular i l'òrgan del qual provenen. Adaptat de la Ref. 193.

L'existència d'una varietat tan àmplia de factors capaços d'activar el fenotip termogènic i de consum energètic dels adipòcits marrons clàssics i beix/brite resulta d'interès tant a nivell de comprensió del funcionament dels mateixos com per tal de modular-la. Com s'ha comentat àmpliament, l'adipòcit marró és un important dissipador d'energia, per la qual cosa l'excés de la mateixa podria ser consumit en situacions d'obesitat i sobrepès. La idea de tractar l'obesitat amb inductors termogènics, però, no és nova: Un agent desacoblorador, el **2,4-dinitrofenol**, va ser comercialitzat inicialment com a fàrmac termogènic, donat que, efectivament, presentava un marcat efecte en la reducció del pes corporal. No obstant, aquest compost va haver d'ésser retirat del mercat en presentar múltiples efectes secundaris que posaven en perill els usuaris i en provocaven la mort en un 10% de casos, en no actuar aquest tan sols a nivell dels adipòcits marrons, sinó també d'altres tipus cel·lulars²²². L'ús de **simpaticomimètics** tampoc resultà segur: L'estímul generalitzat origina importants efectes adversos en actuar a nivell cardiovascular²²³, per la qual cosa s'havia d'optar per quelcom més específic per a aquest tipus cel·lular. No obstant, l'ús d'**agonistes específics per al receptor adrenèrgic β_3** va mostrar-se efectiu per a reduir la massa adiposa en models animals, però, a l'hora d'escalar-ho a humans, els efectes antiobesogènics foren molt lleus²²⁴. Per aquests motius, l'estratègia a seguir passa per activar la termogènesi d'una forma selectiva als adipòcits marrons i, especialment en el cas dels humans, induir el *browning* dels seus dipòsits susceptibles. La recerca en molècules capaces de produir aquests efectes de manera independent a l'estímul simpàtic, per tant, resulta d'especial interès. Una segona contribució a la present tesi doctoral fou una revisió en què s'aprofundeix sobre aquests conceptes, la qual s'inclou a continuació.

Non-sympathetic control of brown adipose tissue.

Revista: *International Journal of Obesity Supplements*

PMID: [En premsa]

Títol: Control no simpàtic del teixit adipós marró.

Resum: L'activitat del teixit adipós marró (TAM) a l'organisme està fortament regulada a través de diferents processos, des de la inducció a curt termini d'un increment en la conductància de protons promoguda per la proteïna desacobladora 1 a processos complexos de reclutament de TAM i l'aparició dels adipòcits beix/brite al teixit adipós blanc (TAB) en el procés anomenat *browning*. El sistema nerviós simpàtic ha estat reconegut clàssicament com el mediador principal de l'activació del TAM. No obstant, recentment s'han identificat certs nous factors capaços d'activar-lo per mecanismes no simpàtics. Entre aquests es troben membres de la família de les proteïnes morfogenètiques òssies, amb accions probablement autocrines, i activadors dels receptors d'hormones nuclears, especialment derivats de la vitamina A. També s'han identificat múltiples factors endocrins alliberats pels teixits perifèrics que poden actuar al TAM. Alguns són pèptids natriurètics d'origen cardíac, mentre que entre altres es troben la irisina, que s'origina al múscul esquelètic, i el factor de creixement fibroblàstic 21, produït principalment pel fetge. S'ha descrit que aquests factors tenen efectes sobre els propis adipòcits marrons, si bé *in vivo* no es pot excloure l'existència d'altres factors que tinguin efectes indirectes sobre el TAM. A més, aquests factors poden actuar a diferents nivells, com ara activant el TAM existent, induint el *browning* del TAB o realitzar ambdós fenòmens. La identificació de controladors no simpàtics de l'activitat del TAM té un especial interès biomèdic en ésser un requisit previ per tal de desenvolupar eines farmacològiques que puguin influir en l'activitat del TAM sense els efectes adversos dels simpaticomimètics.

REVIEW

Non-sympathetic control of brown adipose tissue

R Cereijo^{1,2}, J Villarroya^{1,3} and F Villarroya^{1,2}

The thermogenic activity of brown adipose tissue (BAT) in the organism is tightly regulated through different processes, from short-term induction of uncoupling protein-1-mediated mitochondrial proton conductance to complex processes of BAT recruitment, and appearance of the beige/brite adipocytes in white adipose tissue (WAT), the so-called browning process. The sympathetic nervous system is classically recognized as the main mediator of BAT activation. However, novel factors capable of activating BAT through non-sympathetic mechanisms have been recently identified. Among them are members of the bone morphogenetic protein family, with likely autocrine actions, and activators of nuclear hormone receptors, especially vitamin A derivatives. Multiple endocrine factors released by peripheral tissues that act on BAT have also been identified. Some are natriuretic peptides of cardiac origin, whereas others include irisin, originating in skeletal muscle, and fibroblast growth factor-21, mainly produced in the liver. These factors have cell-autonomous effects in brown adipocytes, but indirect effects *in vivo* that modulate sympathetic activity toward BAT cannot be excluded. Moreover, these factors can affect to different extents such as the activation of existing BAT, the induction of browning in WAT or both. The identification of non-sympathetic controllers of BAT activity is of special biomedical interest as a prerequisite for developing pharmacological tools that influence BAT activity without the side effects of sympathomimetics.

International Journal of Obesity Supplements (2015) 5, S40–S44; doi:10.1038/ijosup.2015.10

INTRODUCTION

Brown adipose tissue (BAT) is the main site of non-shivering thermogenesis in mammals. The thermogenic function of BAT reflects the unique properties of the brown adipocytes, which contain large amounts of mitochondria that are naturally uncoupled owing to the presence of the uncoupling protein-1 (UCP1) in the inner mitochondrial membrane. Thus, BAT possesses a powerful machinery for oxidizing metabolic substrates to produce heat, and correspondingly robust enzymatic machinery for lipid and glucose uptake and catabolism.¹

As a site for adaptive thermogenesis, BAT is under the control of multiple regulatory processes that modulate the extent of BAT activation in response to thermogenic requirements. In the short term, thermogenic induction (for example, due to cold exposure) causes a rapid activation of the proton conductance pathway in mitochondria via the activation of the existing UCP1.² With persistent thermogenic activation, genes encoding UCP1 and components of the mitochondrial oxidative machinery, lipid catabolism and lipid uptake (via lipoprotein lipase), and other aspects of cell catabolism are upregulated. This allows for the maximization of metabolic substrate uptake and oxidation necessary to sustain thermogenesis. Long-term thermogenic induction ultimately leads to the enlargement of BAT mass through promotion of tissue hypertrophy and hyperplasia.³ Persistent thermogenic stimulation leads not only to the enlargement of BAT at its anatomical locations but also promotes the appearance of brown adipocytes in anatomical sites of white adipose tissue (WAT).⁴ This latter process is commonly called 'browning' of WAT, and the brown adipocytes that appear in WAT depots are termed 'brite' (from brown-in-white)⁵ or beige⁶ adipocytes. All of these processes, from the very short-term

activation to the long-term adaptations, are mainly mediated by the activation of the sympathetic nervous system. The release of norepinephrine by sympathetic nerve endings activates β -adrenergic receptors in BAT and induces the intracellular pathways that mediate the aforementioned processes.⁷

In recent years, positron emission tomography scanning techniques have revealed the presence of active BAT in adult humans.⁸ Moreover, consistent with numerous previous studies in rodent models, it has been found that BAT activity is systematically reduced in obese patients.⁹ These observations have spurred interest in exploring the activation of BAT as a potential strategy for promoting energy expenditure and protecting against obesity. Pharmacological activation of the sympathetic pathway has not proven useful for this purpose because successful achievements in the promotion of energy expenditure are counteracted by strong cardiovascular side effects, thus precluding the effective therapeutic use of sympathomimetics.¹⁰ Accordingly, there is a growing interest in the identification of non-sympathetic regulators of BAT activity. Here we review the current knowledge and recent developments relating to BAT activators beyond the 'classical' sympathetic mediators, and highlight their potential for future pharmacological use in promoting energy expenditure.

ENDOCRINE VERSUS AUTOCRINE/PARACRINE CONTROLLERS OF BAT ACTIVITY: THE EXAMPLE OF BMPS

In recent years, it has been recognized that, in addition to being a potential target of endocrine and neuro-endocrine (for example, noradrenergic activation) signaling, the processes associated with BAT activation, including the browning of WAT, involve multiple autocrine and paracrine signals.

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain and ³Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr F Villarroya, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: fvillarroya@ub.edu

Among the more prominent autocrine/paracrine factors are members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. Distinct members of the BMP family appear to be differentially involved in the process of brown adipocyte differentiation during ontogeny (and perhaps in the recruitment of BAT in adulthood) and in the browning of WAT. For instance, BMP7 promotes brown adipocyte differentiation,¹¹ whereas genetic ablation of the type-1A BMP receptor in brown adipogenic progenitor cells leads to a severe paucity of BAT at 'classical' anatomical sites, but a compensatory induction of the browning of WAT.¹² In contrast, BMP4 appears essential for WAT-to-BAT conversion in the browning process.¹³ Growth differentiation factor-5, a protein closely related to the BMP family that acts through BMP receptors, has been reported to promote the browning of WAT and to protect against obesity by enhancing energy expenditure.¹⁴ BMP8b has been recently recognized as a novel powerful BAT modulator that sensitizes BAT to sympathetic activation; notably, BMP8b is itself strongly induced by noradrenergic action in brown adipocytes, suggesting an autocrine role.¹⁵

Prostaglandins are also suspected as physiologically relevant controllers of BAT activity, specifically, in the browning process. For example, genetic ablation or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-2^(refs. 16,17) or microsomal prostaglandin E synthase-1,¹⁸ enzymes involved in the biosynthesis of prostaglandin E, impairs UCP1 expression and the appearance of brown adipocytes of the beige/brite type in WAT depots.

Multiple additional autocrine factors have also been identified, and their relative roles in the distinct BAT activation processes have been dissected to different degrees.^{1,19,20} However, most of the identified autocrine factors, perhaps with the exception of BMP8b, are not BAT specific, thus pharmacologically exploiting their mechanisms of BAT regulation is likely to be difficult.

HORMONES, VITAMINS AND METABOLITES THAT ACT THROUGH NUCLEAR RECEPTORS TO ACTIVATE BAT

There is long-standing evidence that natural and pharmacological activators of nuclear hormone receptors may function as non-adrenergic regulators of BAT activity. Although the activation of BAT is a complex process, the identification of factors that control the gene encoding UCP1, the BAT-specific protein essential for thermogenic function, has revealed multiple non-adrenergic, nuclear receptor-dependent regulators of BAT activity. *UCP1* gene transcription is strongly regulated through a distal enhancer that clusters multiple *cis*-elements that are responsive to thyroid receptors, retinoid receptors and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)- α and - γ ^(ref. 21) (Figure 1). Triiodothyronine (T3) is recognized as a positive controller of UCP1 and other components of thermogenic-related processes in brown adipocytes.²² However, this pathway of BAT regulation can hardly be considered totally adrenergic independent because T3 is produced inside brown adipocytes through deiodination of thyroxine by 5'-deiodinase—a noradrenergically regulated enzyme.²³

Additional evidence for non-adrenergic induction of UCP1 and overall activation of BAT implicates vitamin A derivatives. Retinoic acid strongly induces UCP1 in brown adipocytes,²⁴ and chronic treatment of rodents with retinoic acid promotes the browning of WAT.²⁵ Although retinoic acid is traditionally considered the main biologically active form of vitamin A in non-retinal cells, recent data based on genetic ablation of retinal dehydrogenase points to an important role of retinal in BAT activation.²⁶ However, although there is no evidence of adrenergic regulation of vitamin A metabolism in brown adipocytes, the intracellular conversion of retinol into active forms, such as retinal and retinoic acid, appears to be the ultimate factor that determines the activity of this pathway in controlling BAT thermogenic activity.²⁷

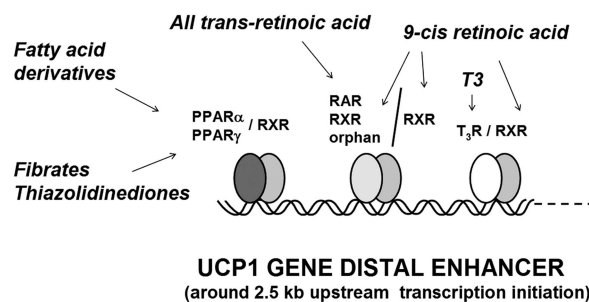


Figure 1. Schematic representation of nuclear hormone receptors binding the enhancer region of the *UCP1* gene and their ligands (in italics). TR, thyroid receptors; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor. The schema integrates the similar structure of *cis*-elements identified in the enhancer regions of the mouse, rat and human *UCP1* gene.²¹

Ligand-activated PPAR γ ^(ref. 28) and PPAR α ^(ref. 29) are also among the known activators of *UCP1* gene transcription and other concerted processes involved in overall BAT activation. PPAR γ activation via established pharmacological ligands (thiazolidinediones) not only promotes brown adipocyte differentiation but also differentiation of white adipocytes. However, analyses of cells already committed to brown adipocyte differentiation have shown that PPAR γ activation specifically enhances the expression of UCP1 and other specific markers of brown adipocyte phenotype.³⁰ Thiazolidinedione treatment *in vivo* recruits BAT depots and promotes the browning of WAT, but there are indications that parallel noradrenergic activation is required for thiazolidinediones to produce effective thermogenic induction.³¹

In contrast to PPAR γ , which is expressed in and regulates adipogenesis in both white and brown adipocytes, PPAR α is preferentially expressed in BAT,³² and genetic data point to PPAR α as an essential component of the BAT-specific phenotype.³³ Ligand-dependent activation of PPAR α induces UCP1 expression and some other aspects of thermogenic activation in brown adipocytes.²⁹ However, there is no evidence that fibrates, the pharmacological activators of PPAR α , are particularly specific or powerful inducers of overall BAT activity. It thus appears that PPAR α activation specifically involves the coordinate induction of fatty acid catabolism and mitochondrial uncoupling rather than orchestrating overall thermogenic induction in BAT.

Finally, it should be kept in mind that the nuclear hormone receptor signaling *in vivo* usually relies on a tight intracellular control over the generation of the active forms of ligands, such as T3, from deiodination of thyroxine, retinoic acid, formed from retinol via oxidative pathways, and intracellular ligands of PPARs, generated through fatty acid metabolism by still poorly understood pathways. Pharmacological tools that directly activate nuclear receptors (for example, retinoic acid, thiazolidinediones and so on) can be used to activate BAT to a certain extent. However, as all of these nuclear hormone receptor-mediated processes influence multiple additional organs and systems beyond BAT, secondary effects of such pharmacological agents may be substantial owing to their lack of specificity for BAT induction.

MODULATION OF ION CHANNELS ACTIVITY: AN EMERGING PATHWAY OF BAT ACTIVITY CONTROL

Among the most recently recognized (and possibly unexpected) potential modulators of BAT activity are ion channels. Transient receptor potential melastin-8 is a cation channel involved in sensing cold. In addition to being expressed in sensing neurons, transient receptor potential melastin-8 is expressed in BAT, where

its pharmacological activation by known agonists such as menthol induces BAT activity in rodents.³⁴ Human adipocytes also express transient receptor potential melastin-8, and transient receptor potential melastin-8 activation in these cells *in vitro* induces UCP1 expression.³⁵ Conversely, other ion channels appear to have a role in repressing BAT activity, evidenced by the fact that inhibition of these channels leads to BAT activation. Among these are the transient receptor potential vanilloid-4 channel³⁶ and the voltage-gated potassium channel Kv1.3,³⁷ whose pharmacological inhibition promotes the browning of WAT and the activation of existing BAT, respectively. There is evidence that modulation of these ion channels promotes brown (or beige/brite) adipocyte activity through cell-autonomous effects, but there is not yet conclusive data to establish whether the effect of the pharmacological manipulation of these ion channels *in vivo* is direct or it may involve indirect effects on the sympathetic activity.

TISSUE CROSS TALK IN THE ENDOCRINE CONTROL OF BAT ACTIVITY

In recent years, the identification of novel factors apart from sympathetic activation that control BAT activity has led to the recognition that multiple peripheral tissues are in fact capable of secreting regulatory factors that act on BAT activity and/or promote browning. Natriuretic peptides of cardiac origin have been shown to induce BAT activation as well as browning of WAT depots through the interaction with natriuretic receptors and activation of intracellular cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase.³⁸ Cardiotrophin, a member of the gp130 family of cytokines originating in heart and skeletal muscle, also enhances browning and protects against obesity in mice.³⁹ Moreover, the discovery of irisin, a myokine secreted by muscle in response to exercise that promotes the browning in WAT, highlights the potential role of direct signaling from skeletal muscle in BAT activation-related processes, and may explain the association between exercise and BAT activation.⁴⁰ Pro-glucagon-derived peptides of intestinal origin (for example, GLP-1) have also been reported to activate BAT, but current evidence points to an indirect effect mediated by the central action of these peptides.⁴¹ There are also reports indicating that fibroblast growth factor (FGF)-15/19, an endocrine factor released by the ileum and similar to FGF21 (see below), enhances BAT activity and overall energy expenditure.⁴² Finally, signals of hepatic origin, including bile acids, have also been recognized to control BAT activity.⁴² BAT expresses the bile acid receptor TGR5, which, after activation by bile acids, promotes thermogenic activity through activation of intracellular thyroid hormone signals.⁴³ Moreover, the recent recognition of FGF21 as a powerful inducer of BAT thermogenesis highlights the potential of endocrine signals of hepatic origin—the so-called hepatokines—to regulate BAT.

FGF21: THE ULTIMATE EXAMPLE OF NON-ADRENERGIC CONTROL OF BAT ACTIVITY

FGF21, which is mainly released by the liver, is an endocrine member of the FGF family that is known to promote glucose homeostasis, improve dyslipidemia and even protect against obesity by enhancing energy expenditure.⁴⁴ The study of the neonatal adaptations to cold stress after birth first identified FGF21 of hepatic origin as a powerful inducer of BAT thermogenic activity.⁴⁵ FGF21 acts directly on brown adipocytes, which express the components of the FGF21-responsive machinery, namely FGF receptors and the specific co-receptor β -Klotho.^{45,46} FGF21 action in brown adipocytes induces the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, a known intracellular mediator of thermogenic activation in BAT. Moreover, it has been found that FGF21 promotes also the browning of WAT.⁴⁷ Notably, FGF21 can induce *UCP1* gene expression and uncoupled respiration in brown

adipocyte-related cell culture systems, demonstrating cell-autonomous effects of FGF21. However, there is also evidence for central effects of FGF21 that may contribute to some of the energy expenditure-promoting effects and BAT activation observed *in vivo*.^{48,49} It is also notable that BAT itself releases FGF21 in response to thermogenic stimuli, suggesting a potential autocrine action of BAT-derived FGF21.⁵⁰ Interestingly, it has recently been found that, in humans, FGF21 is preferentially expressed in BAT versus WAT, thereby reinforcing the possibility of an autocrine role of BAT-derived FGF21 in addition to the endocrine role of hepatic FGF21.⁵¹

In human obese patients and in rodent models of obesity, it has been observed that FGF21 levels in blood are abnormally increased,^{52,53} leading to the suggestion that obesity may constitute an FGF21-resistant state.⁵² Recent data indicate that pro-inflammatory signals (that is, tumor necrosis factor- α) impair FGF21 action in brown adipocytes (as well as in other FGF21 target cells) through impairment in β -Klotho expression.⁴⁶ Thus, it appears that the pro-inflammatory environment associated with obesity may impair FGF21 action; however, considering the effectiveness of FGF21 treatments in obese rodents, this does not necessarily diminish the potential of FGF21 as a therapeutic tool.

CONCLUSIONS

In summary, recent years have witnessed a burst in the identification of novel factors capable of inducing BAT activity beyond the known sympathetic nervous system-derived mediators⁵⁴ (Figure 2). Although most of the new molecular actors identified to date have been described in single reports, these unique studies are generally quite comprehensive and have provided reliable information. Additional independent studies that confirm and definitively evaluate the actual physiological significance and mechanisms of action of these novel factors would further strengthen the conclusions of existing primary reports. The relationship between these novel regulators and the classical sympathetic mechanisms for controlling BAT activity also deserves further research. In several cases, a role for novel factors in controlling BAT has been demonstrated in brown adipocyte-based *in vitro* cell systems. However, whether the 'real' physiological effect of these factors *in vivo* is direct or includes a sympathetic-mediated component remains unclear. Moreover,

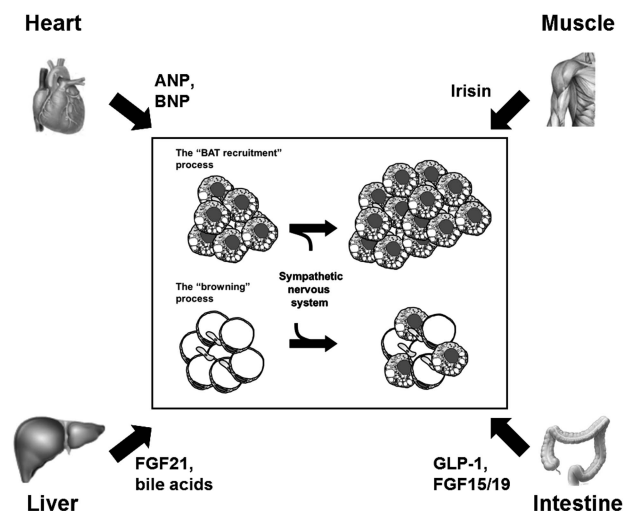


Figure 2. Schematic representation of the main endocrine signals released by peripheral organs that induce the recruitment of BAT and/or the browning of WAT. ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide.

insights obtained from cell biology studies on the intrinsically distinct cellular processes underlying BAT recruitment at 'classical' anatomical sites versus the browning process of WAT⁵⁵ highlight the need to assess the extent to which novel activators affect BAT activation/recruitment, the appearance of beige/brite cells in WAT depots or both.

In any case, the recent awareness that active BAT is present in adult humans underscores the relevance of research into potential novel pharmacological, and perhaps nutritional, tools for promoting BAT activity. Activation of BAT may favor an active draining of metabolic substrates, thereby mitigating diabetes and hyperlipidemia; it may also promote energy expenditure, aiding the fight against obesity. Importantly, agents capable of activating BAT independently of the sympathetic pathway would be free from the side effects of sympathomimetics, laying the groundwork for a significantly improved therapeutic strategy. Thus, in addition to the need to pursue research in cellular and animal models, translating emerging information to humans and validating it are essential for establishing the usefulness of novel BAT regulators in biomedical applications.

CONFLICT OF INTEREST

FV has received lecture fees from Lilly. The remaining authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by MINECO (grant SAF2011-23636), EU (FP7 project BETABAT, grant HEALTH-F2-2011-277713) and Generalitat de Catalunya (2009SGR-284).

DISCLAIMER

This article is published as part of a supplement sponsored by the Université Laval's Research Chair in Obesity, in an effort to inform the public on the causes, consequences, treatments and prevention of obesity.

REFERENCES

- 1 Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; **84**: 277–359.
- 2 Rial E, González-Barroso MM. Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1504**: 70–81.
- 3 Bukowiecki L, Collet AJ, Follera N, Guay G, Jahjah L. Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *Am J Physiol* 1982; **242**: E353–E359.
- 4 Young P, Arch JR, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 1984; **167**: 10–14.
- 5 Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH *et al*. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; **150**: 366–376.
- 6 Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 2010; **285**: 7153–7164.
- 7 Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L *et al*. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 1992; **103** (Pt 4): 931–942.
- 8 Enerbäck S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab* 2010; **11**: 248–252.
- 9 Lee P, Swarbrick MM, Ho KK. Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. *Endocr Rev* 2013; **34**: 413–438.
- 10 Yen M, Ewald MB. Toxicity of weight loss agents. *J Med Toxicol* 2012; **8**: 145–152.
- 11 Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM *et al*. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 2008; **454**: 1000–1004.
- 12 Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL *et al*. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 2013; **495**: 379–383.
- 13 Qian SW, Tang Y, Li X, Liu Y, Zhang YY, Huang HY *et al*. BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E798–E807.
- 14 Hinoi E, Nakamura Y, Takada S, Fujita H, Iezaki T, Hashizume S *et al*. Growth differentiation factor-5 promotes brown adipogenesis in systemic energy expenditure. *Diabetes* 2014; **63**: 162–175.
- 15 Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ *et al*. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; **149**: 871–885.
- 16 Vegiopoulos A, Müller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A *et al*. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 2010; **328**: 1158–1161.
- 17 Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, Fjaere E, Bronstad I, Hao Q *et al*. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* 2010; **5**: e11391.
- 18 García-Alonso V, López-Vicario C, Titos E, Morán-Salvador E, González-Pérez A, Rius B *et al*. Coordinate functional regulation between microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGEs-1) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in the conversion of white-to-brown adipocytes. *J Biol Chem* 2013; **288**: 28230–28242.
- 19 Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1831**: 969–985.
- 20 Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 2013; **27**: 234–250.
- 21 Del Mar Gonzalez-Barroso M, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM. The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *Obes Rev* 2000; **1**: 61–72.
- 22 de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW *et al*. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1379–1385.
- 23 Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 1983; **305**: 712–713.
- 24 Alvarez R, de Andrés J, Yubero P, Viñas O, Mampel T, Iglesias R *et al*. A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 5666–5673.
- 25 Mercader J, Ribot J, Murano I, Felipe F, Cinti S, Bonet ML *et al*. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 2004; **147**: 5325–5332.
- 26 Kiefer FW, Vernochet C, O'Brien P, Spoerl S, Brown JD, Nallamshetty S *et al*. Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat Med* 2012; **18**: 918–925.
- 27 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* 2006; **11**: 795–805.
- 28 Tai TA, Jennermann C, Brown KK, Oliver BB, MacGinnitie MA, Wilkison WO *et al*. Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29909–29914.
- 29 Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 2010; **276**: 1486–1493.
- 30 Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab* 2012; **15**: 395–404.
- 31 Sell H, Berger JP, Samson P, Castriota G, Lalonde J, Deshaies Y *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology* 2004; **145**: 3925–3934.
- 32 Valmaseda A, Carmona MC, Barberá MJ, Viñas O, Mampel T, Iglesias R *et al*. Opposite regulation of PPAR-alpha and -gamma gene expression by both their ligands and retinoic acid in brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1999; **154**: 101–109.
- 33 Xue B, Coulter A, Rim JS, Koza RA, Kozak LP. Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 8311–8322.
- 34 Ma S, Yu H, Zhao Z, Luo Z, Chen J, Ni Y *et al*. Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol* 2012; **4**: 88–96.
- 35 Rossato M, Granzotto M, Macchi V, Porzionato A, Petrelli L, Calcagno A *et al*. Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production. *Mol Cell Endocrinol* 2013; **383**: 137–146.
- 36 Ye L, Kleiner S, Wu J, Sah R, Gupta RK, Banks AS *et al*. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 2012; **151**: 96–110.

- 37 Upadhyay SK, Eckel-Mahan KL, Mirbolooki MR, Tjong I, Griffey SM, Schunk G *et al*. Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E2239–E2248.
- 38 Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C *et al*. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 2012; **122**: 1022–1036.
- 39 Moreno-Aliaga MJ, Pérez-Echarri N, Marcos-Gómez B, Larequi E, Gil-Bea FJ, Viollet B *et al*. Cardiotrophin-1 is a key regulator of glucose and lipid metabolism. *Cell Metab* 2011; **14**: 242–253.
- 40 Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC *et al*. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; **481**: 463–468.
- 41 Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C *et al*. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* 2012; **61**: 2753–2762.
- 42 Fu L, John LM, Adams SH, Yu XX, Tomlinson E, Renz M *et al*. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 2004; **145**: 2594–2603.
- 43 Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H *et al*. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006; **439**: 484–489.
- 44 Kharitonov A, Shyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ *et al*. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1627–1635.
- 45 Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giral M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPAR α in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010; **11**: 206–212.
- 46 Diaz-Delfin J, Hondares E, Iglesias R, Giral M, Caelles C, Villarroya F. TNF- α represses β -Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* 2012; **153**: 4238–4245.
- 47 Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F *et al*. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 2012; **26**: 271–281.
- 48 Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, German J, Fischer JD, Ogimoto K *et al*. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 2010; **59**: 1817–1824.
- 49 Bookout AL, de Groot MH, Owen BM, Lee S, Gautron L, Lawrence HL *et al*. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med* 2013; **19**: 1147–1152.
- 50 Hondares E, Iglesias R, Giral M, Gonzalez FJ, Giral M, Mampel T *et al*. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 2011; **286**: 12983–12990.
- 51 Hondares E, Gallego-Escuredo JM, Flachs P, Frontini A, Cereijo R, Goday A *et al*. Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism* 2013; **63**: 312–317.
- 52 Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS *et al*. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 2010; **59**: 2781–2789.
- 53 Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F *et al*. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008; **57**: 1246–1253.
- 54 Villarroya F, Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* 2013; **17**: 638–643.
- 55 Giral M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 2013; **154**: 2992–3000.

3. El teixit adipós com a òrgan endocrí

Tots els tipus cel·lulars necessiten comunicar-se amb les cèl·lules del seu voltant i amb el seu entorn per tal de dur a terme una funció coordinada dins de l'organisme, així com respondre ràpidament als canvis d'aquest entorn. Per tal d'aconseguir-ho, les cèl·lules ajusten contínuament la composició lipídica i proteica de la seva membrana plasmàtica i matriu extracel·lular, i, a més, alliberen a l'espai extracel·lular diversos factors mitjançant el procés d'**exocitosi** de la **via biosintètica-secretora**. Els adipòcits, com veurem, no suposen una excepció a aquesta regla. Es tracta, de fet, de cèl·lules secretores extremadament actives, i seran capaços de produir un ampli ventall de molècules.

3.1. Generalitats de la via biosintètica-secretora

La via biosintètica-secretora s'inicia al **reticle endoplasmàtic** (RE), des d'on es transportarà la càrrega de secreció cap a l'aparell de Golgi, tot culminant amb l'alliberació de les vesícules de secreció a l'espai extracel·lular. En tot moment, aquest trànsit vesicular es produirà per acció de proteïnes motores, com ara les cinesines, que transportaran les vesícules al llarg dels microtúbuls o altres elements del citoesquelet en direcció anterògrada, cap a la perifèria cel·lular²²⁵. Aquesta via comparteix el pas a través de determinats orgànuls i mecanismes amb la via endocítica de captació de molècules extracel·lulars, tot i que en sentit oposat, així com amb les rutes de recuperació de proteïnes residents al RE o a la membrana plasmàtica. A la **Fig. 12** es mostra un esquema global d'aquestes vies de trànsit entre l'interior i l'exterior cel·lular.

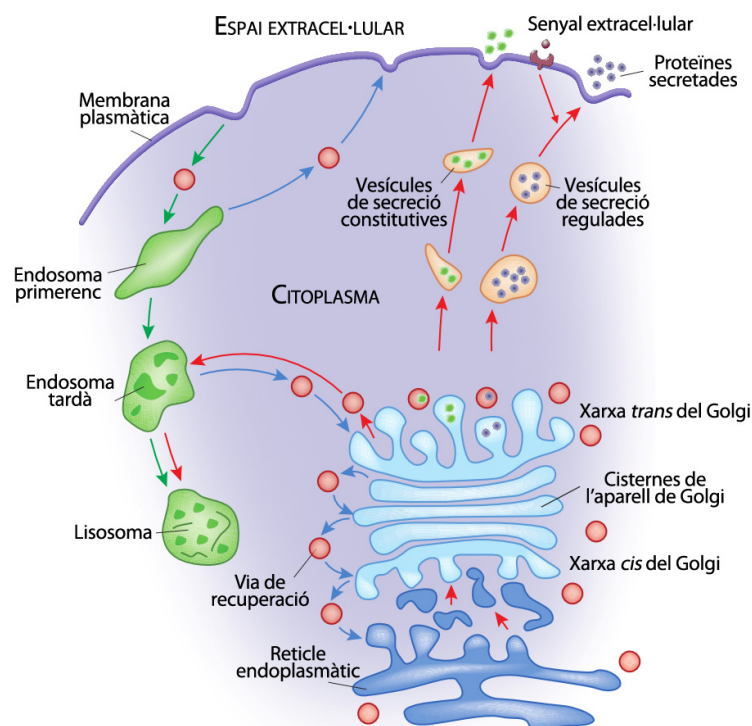


Figura 12: Esquema global de les rutes endocítiques i exocítiques cel·lulars. Amb fletxes verdes es mostra la via endocítica, amb fletxes vermelles la via biosintètica-secretora (incloent la mobilització per a proteïnes residents als endosomes i lisosomes) i amb fletxes blaves les vies de recuperació de proteïnes residents.

Les proteïnes sintetitzades pels ribosomes acoblats al RE i que tinguin com a destinació l'aparell de Golgi seran encapsulades en petites vesícules revestides per la proteïna COPII que s'originaran a partir de les membranes del mateix reticle endoplasmàtic. Aquesta entrada en vesícules que han de sortir del RE és un procés selectiu: És necessària la presència de senyals que així ho indiquin, o la proteïna hi romandrà a l'interior. Moltes de les proteïnes de la cara extracel·lular de la membrana plasmàtica interactuen amb les mateixes proteïnes del revestiment, quelcom que les permet viatjar fins a la mateixa. D'altra banda, les proteïnes secretables solubles sovint disposen de **pèptids senyal** al seu extrem aminoterminal que interaccionen amb receptors determinats de les vesícules de sortida, els quals, al seu torn, interaccionaran amb les proteïnes del revestiment i el senyal d'alliberació quedarà completat. Alternativament, altres proteïnes de secreció no disposen de pèptid senyal però, si són produïdes en elevades concentracions, també seran encapsulades en vesícules de secreció i enviades a fer la seva funció a l'exterior cel·lular. Usualment, es diu que les proteïnes que disposen de pèptid senyal es secreten per la **via clàssica**, mentre que les que no en disposen ho fan per una **via no clàssica**. Entre les proteïnes que pertanyen a aquesta via no clàssica sovint s'engloben també aquelles que són alliberades a l'espai extracel·lular per mecanismes miscel·lanis de manera independent de la via RE-Golgi que s'està descrivint en aquesta secció, com s'ha documentat per a determinades proteïnes mal plegades que no són degradades al proteasoma, així com per a formes funcionals de certes proteïnes, per exemple, el factor de creixement fibroblàstic-1 (FGF1) o la interleucina-1 α (IL-1 α)^{226,227}. En el cas concret dels adipòcits, aquests serien capaços de dur a terme la secreció de proteïnes emprant diferents vies: Mentre que dues de les principals proteïnes secretades pels adipòcits blancs, la leptina i l'adiponectina, són alliberades a l'exterior cel·lular emprant la ruta RE-Golgi (si bé mitjançant rutes vesiculars diferents)²²⁸, la visfatina és un exemple de proteïna secretada pels adipòcits a través d'un mecanisme no clàssic²²⁹.

En el cas de la major part de proteïnes i altres macromolècules secretables, les vesícules que van formant-se a partir del RE s'aniran fusionant les unes amb les altres i formant cúmuls tubulars de vesícules, que arribaran a l'**aparell de Golgi**. Aquest orgànul està format per una sèrie de compartiments aplanats anomenats **cisternes**, els quals s'organitzaran en dues cares que al seu torn generaran dues xarxes de transport vesicular: La **xarxa cis del Golgi** i la **xarxa trans del Golgi**. A més de ser clau en la via biosintètica-secretora, l'aparell de Golgi és també un important lloc de modificació posttraduccional de proteïnes, i cada cisterna disposa al seu interior d'enzims encarregats de l'addició o de l'eliminació de les mateixes a mesura que les proteïnes avancen, de manera seqüencial, des de la xarxa *cis* a la xarxa *trans*. Entre aquestes modificacions es troben l'eliminació del pèptid senyal o la proteòlisi de proproteïnes, si bé aquestes accions també poden tenir lloc a les vesícules de secreció o a l'exterior cel·lular²³⁰.

Les molècules destinades a l'exocitosi normalment aniran abandonant la xarxa *trans* del Golgi en vesícules tubulars de forma irregular. Totes les cèl·lules disposen d'una **ruta secretora constitutiva**, que opera de forma contínua. Les cèl·lules especialitzades en secreció, no obstant, també disposen d'una segona ruta, anomenada **ruta secretora regulada**, en la qual les proteïnes o altres molècules solubles s'emmagatzemen en vesícules de secreció per a ésser alliberades posteriorment en resposta a determinats estímuls, tot permetent a la cèl·lula actuar més ràpidament²³¹. Tot i que els exemples més característics d'aquest tipus de ruta són les vesícules secretores de neurotransmissors de les neurones o els grànuls d'histamina dels mastòcits, existeixen evidències de que els adipòcits també disposen

dels mecanismes necessaris per a activar aquesta segona ruta exocítica. Per exemple, el transportador GLUT4 és emmagatzemat en vesícules de secreció, les quals, en presència d'estímuls de captació de glucosa (com ara insulina), seran enviades ràpidament a la membrana cel·lular, permetent així una ràpida captació de glucosa per part de l'adipòcit²³².

La ruta constitutiva és un procés no selectiu que no requereix de cap senyal particular per a tenir lloc, per la qual cosa també se la coneix com a ruta per defecte. Tret de les proteïnes residents del RE o de l'aparell de Golgi que s'hagin dirigit erròniament a la via secretora i hagin d'ésser rescatades per la ruta de recuperació, en cèl·lules no polaritzades qualsevol proteïna destinada a l'espai extracel·lular seguirà aquesta ruta exocítica, quelcom que englobarà la major part de components de membrana i de proteïnes solubles extracel·lulars. Mentre que aquestes vesícules que transporten una càrrega destinada a la secreció constitutiva es fusionaran amb la membrana plasmàtica i l'alliberaran tan bon punt hi arribin, les vesícules secretores de la ruta regulada es mantindran a prop de la mateixa sense fusionar-se fins que un senyal, habitualment de tipus hormonal, generi un canvi intracel·lular –normalment relacionat amb un augment en els nivells de calci intracel·lular– que es tradueixi en la seva fusió i l'alliberació sota comanda del seu contingut. No obstant, cal destacar que, en la ruta constitutiva, l'alliberament d'una determinada proteïna dependrà en primera instància de la seva síntesi i, per tant, de l'expressió del seu gen. Per tant, en aquesta ruta, sí que existirà una certa regulació de la secreció, si bé aquesta serà a nivell transcripcional o traduccional en lloc de a nivell secretor com en el cas de la ruta regulada²³¹.

En l'actualitat, el coneixement dels patrons de seqüències dels pèptids senyal de les proteïnes secretables ha permès el desenvolupament d'eines bioinformàtiques capaces de predir, a partir de l'estructura primària de la proteïna, la seva potencial secreció. A més, recentment també s'han desenvolupat eines per a predir bioinformàticament la secreció de proteïnes de la via no clàssica a partir de la seva seqüència. Aquestes es basen en l'elaboració de xarxes neurals entrenades per a detectar i comparar determinats patrons presents proteïnes amb evidència experimental de secreció coneguda i vincular-la amb la seva seqüència, i amb les quals es compararan les seqüències incògnita. Exemples d'aquestes eines són les aplicacions en línia TargetP (via clàssica) i SecretomeP (via no clàssica), emprades en el decurs de la present tesi doctoral^{233,234}.

3.2. El concepte d'adipocina

Fa poc més de cinquanta anys, Kennedy va formular la hipòtesi de què havia d'existir alguna mena de factor circulant, lipostàtic i amb funcions inhibidores que fos capaç d'actuar a nivell central per tal d'alterar el consum energètic i la ingesta d'aliments²³⁵. Durant els següents anys, la realització d'estudis de parabiosi entre ratolins genèticament obesos com la soca *ob/ob* i ratolins control va permetre confirmar la presència de tal factor: Als animals units per parabiosi, es va poder observar una normalització del pes dels ratolins obesos en estar els ratolins control administrant-los-hi aquesta molècula incògnita, per a la qual, com es descobriria posteriorment, els ratolins *ob/ob* n'eren deficients i, per tant, no en disposaven prèviament a la cirurgia²³⁶. No obstant, no va ser fins el clonatge del gen de la leptina el 1994 que es va poder assignar una identitat a aquella entitat misteriosa²³⁷. Aquest descobriment, i el fet que la mateixa estigués produïda principalment pel teixit adipós, va suposar un gran canvi de paradigma en l'estudi del mateix: El reservori passiu de lípids havia esdevingut un òrgan endocrí, capaç de controlar activament l'homeòstasi energètica global.

El descobriment durant els anys posteriors (i que segueix tenint lloc en l'actualitat) de més molècules secretades preferentment pel teixit adipós amb accions **autocrines** (sobre la pròpia cèl·lula), **paracrines** (sobre cèl·lules del seu voltant) o **endocrines** (sobre cèl·lules distants, entrant en la circulació) va propiciar la forja d'un terme per a designar-les col·lectivament: **adipocines**, un acrònim de *teixit adipós* + *citocines*^{160,238}. Tot i que en la literatura aquest terme és emprat indistintament per a referir-se tant a aquelles molècules secretades produïdes pel teixit adipós en la seva globalitat (adipòcits i SVF) com per a aquelles alliberades principalment només pels adipòcits –o, fins i tot, per alguns subtipus específics d'adipòcit o per la ubicació subcutània o visceral dels mateixos–, cal tenir present l'existència d'aquesta distinció per a comprendre per complet el paper secretor del teixit adipós¹⁶⁰. A continuació, analitzarem en detall algunes de les principals adipocines de les quals es té constància fins el moment, així com la seva funció.

3.3. Funció secretora del TAB

3.3.1. Leptina

La **leptina** fou identificada, com hem esmentat abans, com el producte del gen associat a obesitat *ob* o *Lep*, no funcional en ratolins *ob/ob*²³⁷, els quals presenten una desregulació en aquest sistema que es tradueix en hiperfàgia, obesitat i resistència a la insulina que es pot revertir administrant-los-hi l'hormona²³⁹. La leptina és produïda majoritàriament pels adipòcits, especialment pels dels dipòsits subcutanis, i, en menor mesura, per altres teixits com ara l'epiteli gàstric i el cervell¹⁶⁰.

La funció d'aquesta adipocina és la inhibició de la ingesta tot actuant a nivell del sistema nerviós central, informant l'hipotàlem de l'estat nutricional dels adipòcits²³⁹. Actuant sobre l'hipotàlem i sobre altres nuclis que expressen la forma llarga del receptor de leptina (**LRb**), a més, aquesta hormona pot activar-hi l'enviament d'ordres als teixits perifèrics per tal d'incrementar l'oxidació d'àcids grassos, reduir la glucosa plasmàtica, induir la termogènesi i, en definitiva, reduir la massa adipocitària (**Fig. 13a**). D'altra banda, en una situació de dejuni, els nivells de leptina disminuiran en coordinació amb els d'insulina, tot estimulant l'apetit, inhibint l'activitat simpàtica que induiria lipòlisi i termogènesi i suprimint l'acció d'hormones anabòliques^{240,241}. Les accions de la leptina, però, no es limiten al sistema nerviós central: La major part de teixits perifèrics presenten altres formes del seu receptor i, per tant, respondran de forma catabòlica a l'estímul de la leptina. La leptina presenta una estructura helicoïdal similar a citocines com la interleucina-2 (IL-2), per la qual cosa, com veurem posteriorment, regularà també l'adipositat a nivell local tot promovent la diferenciació i proliferació dels limfòcits T²⁴².

En individus obesos, els nivells de leptina circulant es correlacionen positivament amb l'adipositat i es troben, per tant, elevats. Aquest fet és indicador d'una situació de resistència a la leptina, ja que aquests individus presenten nivells elevats de la citocina sense l'esperada resposta anorèxica i adipostàtica que sí tindria lloc en individus sans²⁴³. Aquesta situació de resistència es donaria tant a nivell central com a nivell perifèric, especialment al múscul esquelètic^{244,245}.

3.3.2. Adiponectina

L'**adiponectina** (també coneguda com a AdipoQ o ACRP30) és una altra hormona peptídica. De totes les adipocines conegudes actualment, és la més exclusiva dels adipòcits, i és present al plasma en elevades concentracions (de 3 a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)²⁴⁶⁻²⁴⁸. Aquesta molècula presenta una destacable estructura, formada per un domini similar a col·lagen seguit d'un de globular semblant al factor del complement C1q. De fet, amb aquest factor comparteix també la seva estructura quaternària: L'adiponectina forma trímers emprant els dominis similars a col·lagen, si bé també pot formar oligòmers multimèrics (hexàmers i formes d'alt pes molecular). Totes les formes són detectables a la sang, però es creu que tan sols les d'alt pes molecular tindrien activitat biològica²⁴⁹. Aquesta citocina resulta també interessant quant a què la seva secreció ve regulada a nivell del RE, on la xaperona ERp44 i l'oxidoreductasa Ero-L α en retenen les formes d'alt pes molecular i només són alliberades en presència d'estímuls adients, com ara agonistes de PPAR γ , del qual aquestes proteïnes en són dianes transcripcionals²⁵⁰.

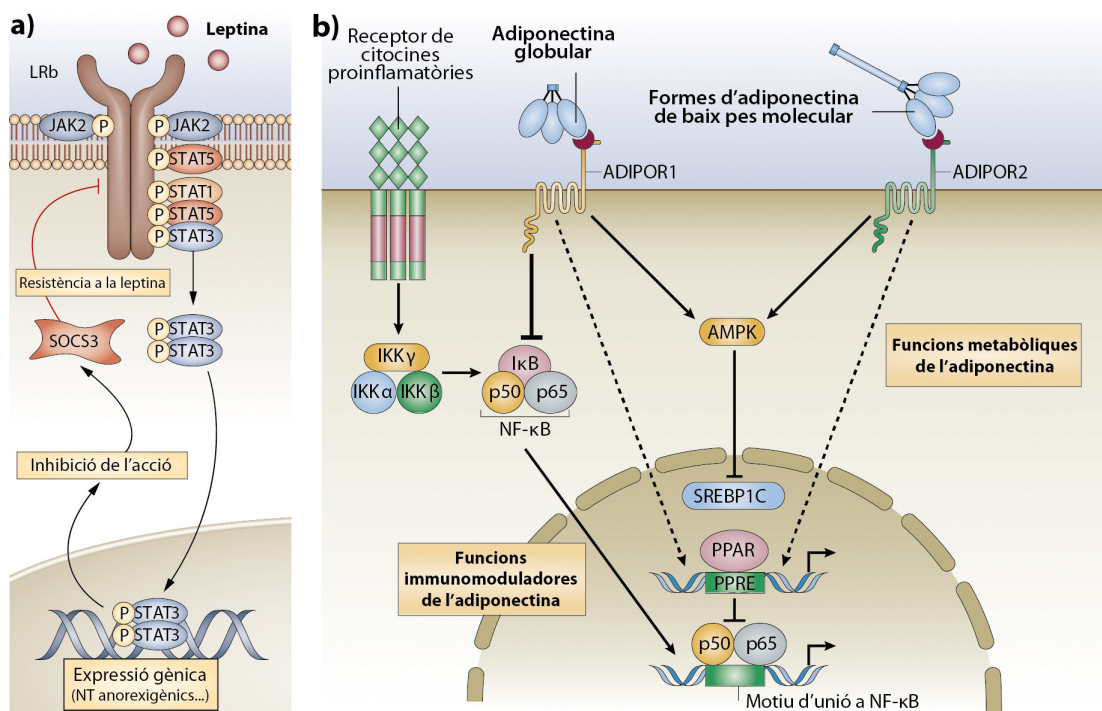


Figura 13: Mecanismes moleculars implicats en les vies de senyalització d'(a) la leptina i de (b) l'adiponectina. NT: Neurotransmissors. JAK: Cinasas de Janus. IKK: Cinasas d'I κ B. I κ B: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor. p50: Proteïna 50. p65: Proteïna 65. PPRE: Element de resposta a PPARs. Consultar el text i el llistat corresponent per a la resta d'abreviatures. Adaptat de Ref. 238.

L'adiponectina actua incrementant la sensibilitat a la insulina als teixits perifèrics. Aquesta acció vindria donada en part per la seva capacitat per a promoure l'acció de la cinasa activada per AMP (**AMPK**) actuant a través dels seus receptors de membrana, **AdipoR1** i **AdipoR2**^{251,252} (**Fig. 13b**). Aquesta cinasa actua com a sensor de l'estat nutricional i serà capaç d'activar l'oxidació d'àcids grassos al múscul esquelètic, així com d'inhibir la gliconeogènesi al fetge i la lipòlisi als adipòcits per tal d'afavorir la captació de glucosa²⁵¹. Al múscul esquelètic, addicionalment, l'adiponectina pot actuar a través del receptor AdipoR1 i activar PGC-1 α tot induint la seva desacetilació per part de SIRT1, promovent-hi així també el metabolisme oxidatiu i la biogènesi mitocondrial²⁵³. D'altra banda, les accions de l'adiponectina sobre els

adipòcits marrons i beix/brite són contradictòries: Mentre que la interacció de l'adiponectina amb els seus receptors als adipòcits i cèl·lules immunitàries promouria la termogènesi, existirien mecanismes d'acció alternatius capaços de limitar el seu reclutament i activació mitjançant una limitació de l'expressió del receptor adrenèrgic β_3 ²⁵⁴.

A diferència del què ocorria amb la leptina, en individus obesos i amb diabetis de tipus 2, per tant, els nivells d'adiponectina es troben disminuïts i es correlacionen negativament amb l'adipositat^{255,256}. En concordança, la seva síntesi per part dels adipòcits és inhibida per molècules proinflamàtores, probablement per inhibició de l'expressió i activitat de PPAR γ , del qual l'adiponectina n'és una diana transcripcional²³⁸.

3.3.3. Resistina

La **resistina** (també coneguda com a **FIZZ3**) és una proteïna secretada pel TAB relacionada amb l'activació de processos inflamatoris. Mentre que en ratolins és produïda de forma pràcticament exclusiva pels adipòcits blancs, en humans, en canvi, les cèl·lules productores en són els macròfags i els monòcits^{257,258}. Estructuralment, la resistina és similar a l'adiponectina; la seva forma circulant n'és principalment l'hexamèrica, mentre que la forma més bioactiva en són els trímers²⁵⁹.

La deficiència de resistina provoca obesitat en ratolins *ob/ob*, però aquests animals són sensibles a l'acció de la insulina i tenen una tolerància a la glucosa millorada. La resistina, per tant, actuaria induint resistència a la insulina, quelcom que en condicions fisiològiques contribuiria a regular el metabolisme de la glucosa²⁶⁰. El seu mecanisme d'acció està relacionat amb l'activació del supressor de senyalització per citocines 3 (**SOCS3**), un inhibidor de la senyalització de la insulina, i amb la supressió de l'activació de l'AMPK als teixits perifèrics²⁶¹. En humans els efectes de la resistina no estan tan clars, si bé també es creu que participaria en la generació de resistència a la insulina. Mentre que en situacions de lipoatròfia s'han detectat incrementats, no s'ha pogut establir una correlació clara entre els nivells circulants de resistina i situacions d'obesitat^{238,262}.

3.3.4. Altres adipocines

A més d'aquestes adipocines principals, el teixit adipós n'és capaç de produir d'altres amb efectes variats:

- **Adipsina:** Produïda principalment pels macròfags residents així com pels adipòcits, és una proteïna del complement que n'activa la via alternativa i que estimula l'acumulació de TG als adipòcits^{160,263}.
- **Apelina:** Produïda pels adipòcits i altres cèl·lules de l'estroma vascular, afavoreix les accions de la insulina i l'expressió de proteïnes desacobladores UCP1 (al TAM) i UCP3 (al TAB), incrementant la despesa energètica²⁶⁴. Els nivells circulants d'apelina es troben elevats en individus obesos i resistents a la insulina²⁶⁵.
- **Omentina:** Produïda per cèl·lules de l'SVF, afavoreix les accions de la insulina tot sensibilitzant les cèl·lules a la captació de glucosa. Addicionalment, duu a terme funcions antiinflamàtores i antiaterogèniques. En situacions d'obesitat i resistència a la insulina els seus nivells circulants es troben, coherentment, disminuïts^{160,266}.

- **RBP4:** Com s'ha mencionat prèviament, en situacions d'obesitat aquesta proteïna es troba augmentada a nivell circulant. Els seus elevats nivells incrementen la resistència a la insulina en el TAB²³⁸.
- **Vasplina:** Inhibidor de serina proteases secretat preferentment pel TAB visceral. Redueix els nivells de leptina, resistina i citocines proinflamatòries, tot millorant la sensibilitat a la insulina. Es troba augmentada en individus obesos, potencialment com a mecanisme de compensació²⁶⁷.
- **Visfatina:** Produïda per adipòcits i limfòcits principalment als dipòsits visceral, és una forma extracel·lular de la nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT), un enzim clau en la biosíntesi de nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD). En aquesta forma, pot actuar com insulinomimètic i ésser capaç d'incrementar la captació de glucosa i millorar la resistència a la insulina en situacions d'obesitat^{160,238}.

Adicionalment, el teixit adipós és també capaç de secretar diverses proteïnes que també són produïdes per altres tipus cel·lulars i òrgans. Entre aquestes molècules trobem proteïnes de la fase aguda com la proteïna sèrica amiloide (**SAA**), l'**haptoglobina** i l'inhibidor de l'activador del plasminogen 1 (**PAI-1**), els factors de creixement d'hepatòcits (**HGF**) i de nervis (**NGF**), així com **FGF21**²⁶⁸.

3.3.5. Àcids grassos lliures

Cal recordar que els adipòcits blancs són els principals contribuïdors a l'alliberament circulatori de NEFAs com a resultat de l'activació de la lipòlisi, un fenomen ja reconegut amb anterioritat al de la seva funció endocrina. Aquests, com hem vist, tenen una important funció com a combustible però també poden actuar com a molècules de senyalització en múltiples tipus cel·lulars. Els mecanismes implicats en la senyalització per àcids grassos són complexos i estan relacionats amb l'activació de receptors acoblats a proteïnes G sensibles a aquest tipus de molècules. A través d'aquests mecanismes, els NEFAs contribueixen a la resistència a la insulina als teixits perifèrics, a la disminució de la producció d'insulina per part de les cèl·lules β pancreàtiques i a l'activació de processos inflamatoris actuant, com veurem posteriorment, sobre cèl·lules del sistema immunitari¹⁶⁰.

Precisament, es creu que l'elevada taxa de lipòlisi –i, per tant, d'alliberament d'àcids grassos– que es dona en situacions d'obesitat són fets clau en l'etiologia de les seves complicacions metabòliques. Es coneix també que aquests efectes depenen del tipus d'àcid gras alliberat. Els efectes deleteris sobre el metabolisme estan relacionats amb l'alliberament d'àcids grassos saturats (com ara el palmític) i no amb els insaturats (com ara l'oleic). Estudis recents amb models animals, d'altra banda, han documentat que l'**àcid palmitoleic** derivat del teixit adipós pot actuar com a **lipocina**, una molècula lipídica capaç d'activar vies de senyalització a distància. La seva funció estaria relacionada amb una protecció vers l'aparició de fenotips obesos induïts per la dieta i les seves complicacions associades, si bé resta per determinar si en humans també seria aquest el cas^{269,270}.

3.3.6. Citocines i quimiocines

Finalment, cal destacar que el TAB produeix un ampli ventall de **citocines** i de **quimiocines**. Mentre que algunes d'aquestes molècules són alliberades principalment, com

veurem més endavant, per cèl·lules de l'SFV -com ara les cèl·lules immunitàries infiltrades-, els adipòcits són també capaços de secretar-ne també un elevat nombre. Si bé l'expressió de les proteïnes de tipus antiinflamatori corresponent a aquestes categories estarà més relacionada amb una situació d'homeòstasi del teixit en condicions de salut, en situacions de malaltia del teixit adipós com ara l'obesitat o les lipodistròfies s'incrementarà la producció de citocines proinflamatòries, tot augmentant-ne els nivells circulants, l'atracció de cèl·lules del sistema immunitari i l'estat inflamatori global de l'organisme²³⁸. Posteriorment es tractarà en detall el paper d'aquesta producció de citocines i de la inflamació crònica en l'obesitat, mentre que a la **taula III** (secció 4.2) es podrà apreciar una relació de les principals citocines i quimiocines produïdes pel TAB.

3.4. Funció secretora del TAMO

La funció secretora dels adipòcits medul·lars roman tan desconeguda com altres aspectes de la seva biologia. Fins recentment es creia que, en tot cas, les molècules secretades pels mateixos actuarien tan sols a nivell local⁶. No obstant, una publicació recent sembla indicar que també podrien actuar a nivell sistèmic: En situacions de restricció calòrica, com ara l'anorèxia nerviosa, el TAMO contribuiria directament a augmentar els nivells circulants d'adiponectina, suggerint així un paper també endocrí per a aquest dipòsit²⁷¹.

3.5. Funció secretora del TAM

En el cas del TAM, la seva funció secretora també havia estat sovint omesa fins els darrers anys, probablement pel seu menor volum en comparació amb el TAB i la seva aparent inexistència en humans adults. No obstant, en l'actualitat el paper secretor i endocrí d'aquest teixit i dels adipòcits marrons o beix/brite ha estat finalment reconegut. Donada la manca de referències exclusives sobre el paper secretor del TAM, una tercera contribució a la present tesi doctoral fou l'elaboració del treball de revisió que es mostra a continuació per tal d'ordenar l'evidència de l'existència de factors secretables produïts pel mateix i les seves possibles implicacions en el metabolisme global. Addicionalment, cal destacar que un dels objectius principals de la present tesi doctoral fou, precisament, el d'identificar proteïnes solubles alliberades pel TAM (*adipocines marrons*), com es detalla a la secció de resultats i discussió.

An endocrine role for brown adipose tissue?

Revista: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*

PMID: 23839524

Títol: Un paper endocrí per al teixit adipós marró?

Resum: El teixit adipós blanc està reconegut tant com un lloc d'emmagatzematge d'energia com un òrgan endocrí que produeix una miríada de factors endocrins anomenats adipocines. El teixit adipós marró (TAM) és el lloc principal de generació de termogènesi no associada a tremolar en mamífers. El nombre i activitat d'adipòcits marrons estan associats amb una protecció contra la obesitat i alteracions metabòliques associades. Aquests efectes del TAM han estat atribuïts tradicionalment a la seva capacitat d'oxidació d'àcids grassos i de glucosa per a mantenir la termogènesi. No obstant, dades recents suggereixen que els efectes beneficiosos del TAM podrien implicar un paper endocrí prèviament omès mitjançant l'alliberament de factors endocrins per part del mateix. S'ha trobat que diverses molècules de senyalització amb propietats endocrines són alliberades pel greix marró, especialment sota unes condicions d'activació termogènica. A més, s'ha pogut comprovar que un transplantament experimental del TAM serveix per a millorar la tolerància a la glucosa i la sensibilitat a la insulina, principalment per afectació sobre la funció hepàtica i cardíaca. S'ha proposat que aquests efectes estarien produïts per l'alliberament de factors endocrins des del greix marró, com ara el factor de creixement semblant a insulina 1, la interleucina-6 o el factor de creixement fibroblàstic-21. Es requereix d'una recerca més exhaustiva per tal de determinar si el greix marró juga un paper endocrí i, en cas afirmatiu, per a identificar àmpliament quins factors endocrins són alliberats pel TAM. Aquesta recerca podria servir per a treure a la llum noves pistes sobre l'associació que s'observa entre l'activitat dels adipòcits marrons i un perfil metabòlic saludable, i podria servir a més per a expandir el panorama actual d'eines terapèutiques en potència per a combatre l'obesitat i les malalties metabòliques associades.

An endocrine role for brown adipose tissue?

Joan Villarroya,^{1,2} Rubén Cereijo,² and Francesc Villarroya²

¹Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; and ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institute of Biomedicine, University of Barcelona, and Centro de Investigacion Biomedica en Red Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Catalonia, Spain

Submitted 3 May 2013; accepted in final form 8 July 2013

Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue?. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E567–E572, 2013. First published July 9, 2013; doi:10.1152/ajpendo.00250.2013.—White adipose tissue is recognized as both a site of energy storage and an endocrine organ that produces a myriad of endocrine factors called adipokines. Brown adipose tissue (BAT) is the main site of nonshivering thermogenesis in mammals. The amount and activity of brown adipocytes are associated with protection against obesity and associated metabolic alterations. These effects of BAT are traditionally attributed to its capacity for the oxidation of fatty acids and glucose to sustain thermogenesis. However, recent data suggest that the beneficial effects of BAT could involve a previously unrecognized endocrine role through the release of endocrine factors. Several signaling molecules with endocrine properties have been found to be released by brown fat, especially under conditions of thermogenic activation. Moreover, experimental BAT transplantation has been shown to improve glucose tolerance and insulin sensitivity mainly by influencing hepatic and cardiac function. It has been proposed that these effects are due to the release of endocrine factors by brown fat, such as insulin-like growth factor I, interleukin-6, or fibroblast growth factor-21. Further research is needed to determine whether brown fat plays an endocrine role and, if so, to comprehensively identify which endocrine factors are released by BAT. Such research may reveal novel clues for the observed association between brown adipocyte activity and a healthy metabolic profile, and it could also enlarge a current view of potential therapeutic tools for obesity and associated metabolic diseases.

brown adipose tissue; adipokine; batokine; fibroblast growth factor-21; endocrine

TWO TYPES OF ADIPOSE TISSUE exist in mammals: white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). They play opposing roles, with WAT acting as the main site of metabolic energy storage in the form of lipids, whereas BAT is a main site of energy expenditure. Rodent studies have shown that BAT plays a major role in protecting against obesity and obesity-associated metabolic alterations through the capacity of brown adipocytes to dissipate energy via uncoupling protein 1 (UCP1)-mediated uncoupling of mitochondrial oxidative processes and subsequent heat production. BAT activity has been associated with a healthy systemic metabolic profile, which is at least partly due to the ability of BAT to act as a sink of circulating glucose and lipids, thereby preventing excessive metabolic fuel deposition, diabetes, and dyslipidemia. Although researchers have long doubted the relevance of BAT in adult humans, the recent use of positron emission scanning

techniques has revealed BAT activity in adult humans and decreased BAT activity in obese patients (8, 57).

Cells exhibiting a brown adipocyte thermogenic phenotype (including UCP1 expression) and appearing in WAT depots after thermogenic activation have been identified and characterized. Some authors claim that these cells, usually termed “beige” or “brite” cells, arise from a cell lineage different from that leading to brown adipocytes in anatomically defined BAT depots (37, 45), but there is still ongoing research to clarify the precise origin of distinct cells showing a brown adipocyte phenotype. There is genetic evidence that the capacity to induce these cells in WAT depots is highly relevant for protection against obesity in rodents (18).

In this Perspectives article, we will refer to BAT as the anatomically defined, developmentally programmed BAT depots; cells present in these depots are referred as brown adipocytes. “Beige/brite” will be used to refer to the cells noted above that share thermogenic properties with brown adipocytes and appear in WAT depots under conditions of long-term adaptation to thermogenic challenges.

We Know That WAT is an Endocrine Organ, But What About BAT?

The traditional concept of WAT as a mere site of storage of fat to be used under conditions of shortage of energy supply has been modified dramatically in recent decades, especially after the discovery of leptin as a hormone produced by white adipocytes in 1994, following earlier predictions in the studies of Coleman (7). Multiple bioactive molecules released by white adipocytes have been identified to date as the so-called adipokines. With some parallelism with white adipocytes years ago, practically until present times, the brown adipocyte has been considered just a site of metabolic energy consumption to produce heat. Recent direct and indirect evidence suggests the need to change this concept to incorporate the recognition of a potential specific endocrine role of brown adipocytes (see below). Although still a matter of speculation, the physiological role of BAT and its association with healthy metabolism may extend beyond its capacity for metabolite oxidation to include the release of endocrine signals that act on other organs. When BAT is activated to respond to thermogenic requirements (e.g., in a cold environment), the body undergoes a set of systemic metabolic adaptations, including decreased glycemia and systemic insulin sensitization (3). Enhanced sensitivity to insulin and subsequent glucose uptake by BAT contributes to this systemic effect (17). Other tissues such as WAT and skeletal muscle do not show such insulin sensitization, and catabolic processes are increased (e.g., WAT lipolysis) (17, 52) in association with enhanced BAT activity, channeling fuel substrates to BAT for thermogenesis. Are BAT-

Address for reprint requests and other correspondence: F. Villarroya, Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Univ. de Barcelona, Av Diagonal 643, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain (e-mail: fvillarroya@ub.edu).

released signals acting on these tissues and contributing to their adaptations?

A role for BAT beyond its capacity of metabolite oxidation for thermogenesis was first proposed based on observations that genetically mediated ablation of BAT (21, 30) had a much more profound impact on metabolism than specific blockage of BAT thermogenic activity via UCP1 gene invalidation (13). Whether the association of active BAT detected in positron emission tomography scan assays with a lean and metabolically healthy phenotype in adult humans solely reflected intrinsic energy expenditure or indicates another facet of the physiological role of BAT is currently unknown.

The main adipokines released by WAT (e.g., leptin and adiponectin) are poorly expressed in BAT, especially when it is thermogenically active (5). Indeed, the expression levels of leptin and/or adiponectin are even used as WAT vs. BAT markers in situations of adipose tissue plasticity. If endocrine factors are released by BAT in response to thermogenic induction, we might assume that these factors, termed “batokines” by some authors (49, 51), 1) may have different (and perhaps opposite) actions from those of the WAT adipokines, 2) will act on other tissues (and possibly the central nervous system) to favor systemic adaptations for high energy expenditure, such as overall catabolic processes and the channeling of metabolic supplies to BAT for oxidation, and 3) will be actively released under conditions in which BAT is thermogenically activated. These endocrine factors released by BAT would also be expected to interact with the sympathetic nervous system activity, which is classically believed to coordinate the systemic response to thermogenic activation.

BAT as a Secretory Organ of Autocrine and Paracrine Factors

Although the endocrine role of BAT remains a largely unsolved mystery at this point, accumulating evidence indicates that BAT releases factors that act either on the secreting brown adipocytes (autocrine action) or on other cells types nearby (paracrine action). A summary of the paracrine/autocrine factors released by BAT is shown in Table 1; this information, based on currently available literature in this field, is derived almost exclusively from rat and mouse studies. Some are released by brown adipocytes under conditions of

BAT recruitment in development or in response to thermogenic activation. These include vascular endothelial growth factor-A, which possibly favors angiogenesis in response to sympathetic activation/vascularization, and insulin-like growth factor I (IGF-I) and fibroblast growth factor-2 (FGF2), which may increase the density of brown adipocyte precursor cells. Moreover, indirect evidence based on targeted disruption of the cyclooxygenase gene has stressed the importance of local prostaglandin generation in development of the “beige/brite” adipocytes in WAT depots (the so-called “browning” process) (53).

In general, expression of proinflammatory cytokine genes is lower in BAT than in WAT, possibly owing to the less proinflammatory phenotype of locally infiltrating immune cells (33, 35). However, interleukin (IL)-1 α and especially IL-6 are expressed and released by brown adipocytes in response to thermogenic stimuli (4). Although IL-6 is commonly considered a proinflammatory cytokine that has local paracrine and autocrine effects, it can also act as a myokine (a skeletal muscle-released hormonal factor) that has metabolic effects at a distance from its site of release (36). Furthermore, a major BAT-released factor, bone morphogenetic protein-8b (BMP8b), was recently identified and shown to have a unique capacity to sensitize brown adipocytes to noradrenergic action (56). Lipocalin prostaglandin D synthase, in addition to its role in the synthesis of D-series prostaglandins, is secreted to the extracellular milieu and can act as a carrier of lipophilic molecules such as thyroid hormones and retinoic acid (2, 50), all of which are hormonal factors relevant to brown adipocyte activity (5). Loss-of-function approaches have revealed a relevant role of lipocalin prostaglandin D synthase in BAT activity (54), thus suggesting a putative autocrine role. In summary, although an endocrine role cannot be excluded for some of these factors (e.g., IGF-I, IL-6, BMP8b), these bona fide BAT-released factors collectively appear to function primarily at the autocrine and/or paracrine levels.

Triiodothyronine, the Only Known Classical Endocrine Product of BAT

To date, the only known recognized endocrine role of BAT is its capacity to release the active thyroid hormone triiodothyronine (T₃). The enzyme type II thyroxine 5'-deiodinase,

Table 1. Summary of bioactive factors secreted by BAT preferentially expressed in brown vs. white adipocytes and/or activated in BAT under thermogenic stimuli (cold, norephinephrine)

Factor	Main Role	Ref. No.
Triiodothyronine (due to 5'-deiodinase local activity)	A/E	14, 48 ^{r,m}
Prostaglandins (due to local prostaglandin synthesis enzyme activity)	A	31, 39, 53 ^{r,m}
Angiotensinogen	A/P	6 ^r
Interleukin-1 α	P/A	4 ^m
Insulin-like growth factor I	A	20, 62 ^r
Interleukin-6	A/P/E	4, 49 ^{r,m}
Vascular endothelial growth factor-A	P	1, 60 ^{r,m}
Fibroblast growth factor-2	A	28, 62 ^{r,m}
Nitric oxide (due to local eNOS expression)	A/P	25, 34 ^r
Fibroblast growth factor-21	A/E	9, 22 ^{r,m}
Retinol-binding protein-4	A/P/E (?)	41 ^m
Bone morphogenetic protein-8b	A/P/E (?)	56 ^m
Lipocalin prostaglandin D synthase	A/E	54 ^m

BAT, brown adipose tissue; A, autocrine; P, paracrine; E, endocrine; eNOS, endothelial nitric oxide synthase. ^rStudies performed in BAT or brown adipocytes from rats; ^mstudies performed in BAT or brown adipocytes from mice; (?)role of these factors not fully established.

present specifically in BAT, converts thyroxine into T_3 and is strongly activated upon the induction of BAT thermogenic activity (47). Locally generated T_3 contributes to the intracellular pathways of thermogenic activation of brown adipocytes (10). In 1985, tracer-based kinetic studies demonstrated that, under conditions of high BAT activity, BAT is an important site for the generation of systemic T_3 (48). This was further confirmed using independent experimental approaches (14). Conversely, the observation that mice with targeted ablation of type II 5'-deiodinase gene maintain normal T_3 levels (10) weakened the argument that BAT is an important source of T_3 . However, we might expect compensatory processes in a highly homeostatic system, such as the maintenance of thyroid status. Considering the role of thyroid hormones in the promotion of catabolic energy-expending processes, it would seem logical that BAT could send peripheral signals that contribute to energy expenditure and thermogenesis.

Is Retinol-Binding Protein-4 a BAT-Released Endocrine Factor?

Retinol-binding protein-4 (RBP4) is a blood protein that transports retinol. In 1995, RBP4 was reported to behave as a WAT adipokine, transmitting signals to the liver and other tissues (63). Since then, there has been some controversy on the actual role of RBP4 as an inducer of insulin resistance. A recent study showed that thermogenic activation of BAT is associated with a strong induction of RBP4 expression in BAT, and brown adipocytes release high amounts of RBP4 when activated by norepinephrine (41). The action of putative BAT-released RBP4 on systemic metabolism is not yet known, but it is unlikely to reduce systemic insulin sensitivity, as proposed for WAT-released RBP4 (63), since BAT activation is associated with enhanced systemic insulin sensitivity (3). Perhaps the function may be related to the retinol-transporting role of RBP4 and the cold-induced hydrolysis of retinyl esters under conditions of enhanced BAT lipolysis associated with thermogenic activation.

FGF21: Recent Evidence for the Existence of BAT-Derived Endocrine Factors

Possibly the most substantive evidence that BAT may release endocrine factors is the recent recognition of BAT as a site of FGF21 production (22). FGF21, which is an endocrine member of the FGF family, powerfully promotes glucose oxidation in multiple tissues (liver, WAT, pancreas, and possibly the central nervous system) and can protect against obesity and type 2 diabetes in rodent models (40, 43). Under basal conditions, the liver appears to be the main site of FGF21 production. However, thermogenic activation induces FGF21 gene expression in BAT and triggers the release of FGF21 by brown adipocytes (9, 16, 22). An autocrine role of FGF21 in BAT cannot be excluded (16, 23); however, it has been demonstrated directly in vivo that BAT actively releases FGF21 to circulation upon activation of thermogenesis (22). Recent studies showing that transplantation of BAT can benefit metabolism and enhance FGF21 levels (see below) are consistent with the notion that BAT-released FGF21 transmits signals from BAT to other organs and tissues. Like RBP4, FGF21 is also expressed in WAT, but there is no induction associated with thermogenic activation; in fact, it has been proposed that

FGF21 plays mainly an autocrine role in WAT (11). Moreover, FGF21 appears to be able to cross the blood-brain barrier (24), and there are data showing that FGF21 may act on the brain to increase hepatic insulin sensitivity and metabolic rate in obese rats with diet-induced obesity (43). This would confirm the possibility that BAT-derived endocrine factors may be able to act on the central nervous system, like conventional adipokines, and by these means influence overall energy metabolism. Finally, it is worth noting that studies evaluating the expression of genes capable of distinguishing between "classical" brown adipocytes (present in anatomically defined BAT depots) and "beige/brite" cells have identified FGF21 as more intensely expressed in "beige/brite" cells (46, 58). This suggests that FGF21 may be especially relevant in the autocrine and/or endocrine role of this particular type of inducible brown adipocyte. Recently, FGF21 has been reported to be expressed and released by "beige/brite" adipocytes in adult humans (26).

BAT Transplantation, the Ultimate Approach Showing Evidence of the Existence of BAT-Derived Endocrine Factors

Very recent reports examining the consequences of experimental BAT transplantation offer the most compelling evidence that BAT releases endocrine signals. For example, Gunawardana and Piston (20) showed that subcutaneous BAT transplants normalized glucose levels and reversed diabetes symptoms in rodent models of type 1 diabetes. The authors proposed that BAT-released IGF-I acts as an endocrine factor mimicking the actions of insulin in ameliorating diabetes. A similar approach yielded a second breakthrough when Stanford et al. (49) reported that BAT transplantation to mice improved glucose tolerance, enhanced insulin sensitivity, decreased fat mass, and reversed high-fat diet-induced insulin resistance. Furthermore, they found that WAT and the heart were the major tissue targets of improved glucose uptake. BAT transplantation was associated with a strong enhancement in blood FGF21 levels, consistent with the idea that FGF21 could be the endocrine factor responsible for mediating the systemic effects of BAT transplantation. BAT-derived IL-6 was also found to be required for the effects of BAT transplantation, as transplantation of BAT from IL-6-null mice neither improves metabolic status of mice nor induces FGF21 increase. We do not yet know whether IL-6 acts directly or whether it induces FGF21 to mediate systemic effects.

Further Directions for the Establishment of the Endocrine Role of BAT and the Identification of Endocrine Factors Released by BAT

Although all of the evidence mentioned above points to the existence of a specific system of release of endocrine signals by BAT, definitive proof should await further research. The above findings should be considered the tip of the iceberg when it comes to proving the existence of BAT-derived endocrine factors and examining their ability to explain the endocrine role of BAT (Fig. 1). In the future, systematic research approaches will be needed to comprehensively test the endocrine actions of BAT and the molecules involved. This could include detailed studies of the systemic alterations in BAT ablation models. Unfortunately, classical approaches in endocrine research based on surgical ablation of the suspected endocrine organ are

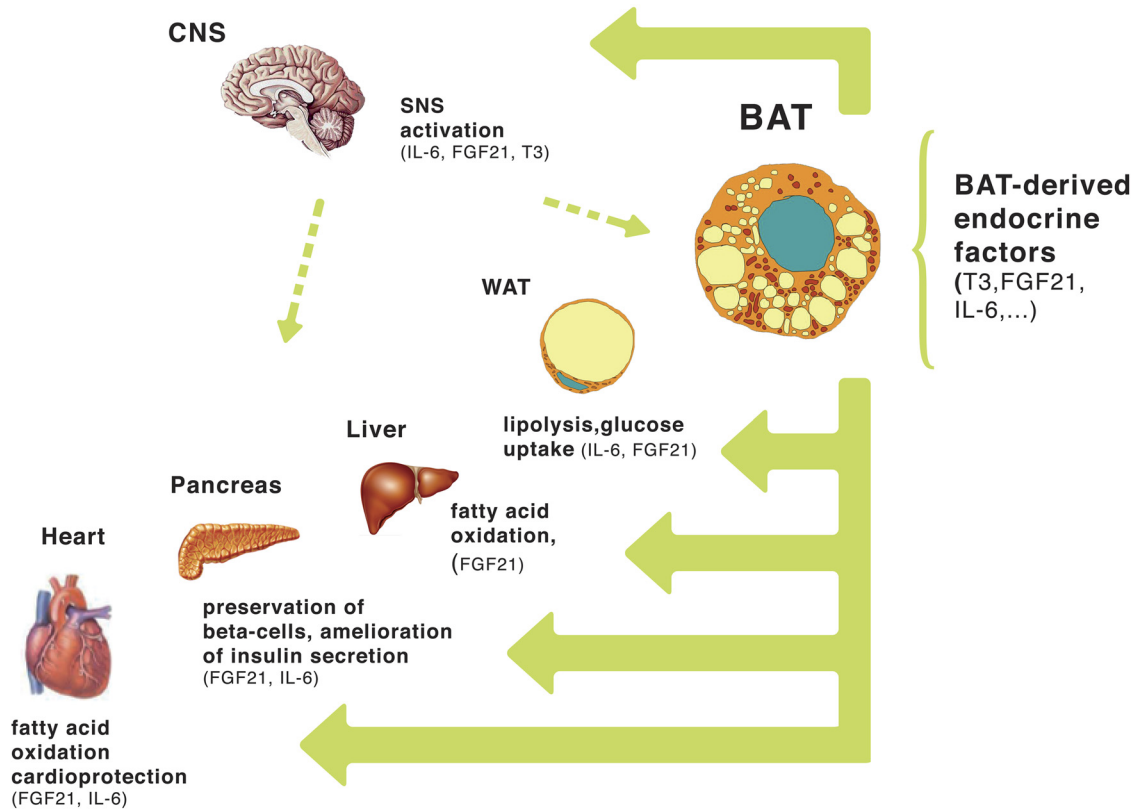


Fig. 1. Schematic representation of the hypothetical role of endocrine factors released by brown adipose tissue (BAT) in interorgan cross-talk. Endocrine factors released by BAT may signal both the periphery and the central nervous system (CNS). Some of these factors [e.g., IL-6, fibroblast growth factor-21 (FGF21)] may induce processes associated with metabolic energy consumption and provision of substrates to fuel thermogenesis. For example, it has been reported that IL-6 promotes lipolysis in white adipose tissue (WAT) (52), FGF21 induces fatty acid oxidation in liver (15), and FGF21 promotes cardioprotection and fatty acid oxidation in heart (38). In pancreas, FGF21 is known to improve β -cell function (55), and IL-6 ameliorates insulin secretion (12). The endocrine factors released by BAT may affect overall metabolism by acting directly on peripheral organs and indirectly through the CNS to produce subsequent systemic effects. For instance, central action of FGF21 increases metabolic rate (43), and IL-6 action on CNS leads to an increase in BAT activity through sympathetic nervous system (SNS)-dependent processes (27). Thyroid hormone is also known to stimulate SNS-mediated activity of BAT (29). Moreover, sympathetic activity elicited by CNS in response to external (food intake, cold temperature) and internal stimuli is likely to control the release of endocrine factors by BAT (4, 22, 48), thus closing a feedback regulatory loop. T₃, triiodothyronine.

hardly feasible in BAT. Surgical ablation of major BAT anatomic sites in rats results only in the removal of 40% of total BAT, and moreover, this manipulation leads to rapid compensatory proliferation at other BAT depots (42). Furthermore, genetic manipulation leading to atrophy of BAT at major anatomic sites also leads to compensation through “browning” of WAT, i.e., the induction of “beige/brite” cells in WAT depots (44). Perhaps other models of BAT ablation, such as the UCP1-DTA mice, in which brown adipocytes are genetically ablated through UCP1 promoter-driven diphtheria toxin, would be useful (30).

Research on the endocrine role of BAT could employ high-throughput screening approaches. The use of updated proteomic technologies to identify the proteins released to the medium by brown adipocytes in cell culture (i.e., the establishment of the brown adipocyte secretome) could be an important step. Bioinformatic scanning of BAT gene expression databases for predicted secretable proteins could also help to identify candidate endocrine factors for further experimental exploration. The strict cell specificity of UCP1 gene transcription in brown adipocytes suggests that BAT-specific gene-inactivated (“knockout”) models using previously reported systems in which UCP1 promoter-driven recombinase is used to invalidate

genes in brown adipocytes (19, 32) may also be exploited in future studies of endocrine factors released by BAT.

Finally, as seen for the endocrine role of WAT, it is possible that BAT-infiltrating cells other than brown adipocytes may contribute to the release of bioactive molecules. The recent recognition that the immune cell subpopulations infiltrating BAT differ from those in WAT (33, 35, 59) may suggest that BAT vs. WAT differences in secretory activity could also involve the activities of nonadipocyte cells.

Anatomists of old named BAT as the hibernating “gland” due to its relevant presence in hibernating mammals. Their intuition may be proven correct in the near future thanks to the ongoing research efforts to resolve questions surrounding the physiological implications of putative endocrine functions of BAT. The identification of endocrine factors released by BAT would be of utmost relevance as tools in future clinical applications focused toward improving metabolic health in highly relevant diseases such as obesity, diabetes, and dyslipidemia.

GRANTS

This work was supported by MINECO (SAF2011-23636), Instituto de Salud Carlos III (Grant PI11/00376), Generalitat de Catalunya, Spain, and the European Commission (BetaBat project). J. Villarroya is the recipient of a

“Sara Borrell” grant from Instituto de Salud Carlos III, Spain. R. Cereijo is the recipient of a Programa de Formación del Profesorado Universitario grant from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain.

DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.V. and R.C. analyzed the data; J.V. and R.C. drafted the manuscript; J.V., R.C., and F.V. approved the final version of the manuscript; F.V. contributed to the conception and design of the research; F.V. edited and revised the manuscript.

REFERENCES

- Asano A, Kimura K, Saito M. Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *J Vet Med Sci* 61: 403–409, 1999.
- Beuckmann CT, Aoyagi M, Okazaki I, Hiroike T, Toh H, Hayaishi O, Urade Y. Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochemistry* 38: 8006–8013, 1999.
- Bukowiecki LJ. Energy balance and diabetes. The effects of cold exposure, exercise training, and diet composition on glucose tolerance and glucose metabolism in rat peripheral tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 382–393, 1989.
- Burysek L, Houstek J. beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett* 411: 83–86, 1997.
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277–359, 2004.
- Cassia LA. Role of angiotensin II in brown adipose thermogenesis during cold acclimation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265: E860–E865, 1993.
- Coleman DL. A historical perspective on leptin. *Nat Med* 16: 1097–1099, 2010.
- Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17: 143–149, 2010.
- Chartoumpakis DV, Habeos IG, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, Papavassiliou AG. Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med* 17: 736–740, 2011.
- de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 108: 1379–1385, 2001.
- Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, Choi JH, Yu RT, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 148: 556–567, 2012.
- Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, Eppler E, Bouzakri K, Wueest S, Muller YD, Hansen AM, Reinecke M, Konrad D, Gassmann M, Reimann F, Halban PA, Gromada J, Drucker DJ, Gribble FM, Ehses JA, Donath MY. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med* 17: 1481–1489, 2011.
- Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387: 90–94, 1997.
- Fernandez JA, 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: 281–284, 1987.
- Fisher FM, Estall JL, Adams AC, Antonellis PJ, Bina HA, Flier JS, Kharitonov A, Spiegelman BM, Maratos-Flier E. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology* 152: 2996–3004, 2011.
- Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, Wu J, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E, Spiegelman BM. FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 26: 271–281, 2012.
- Gasparrini AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, Velloso LA. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signaling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 552: 149–162, 2003.
- Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest* 102: 412–420, 1998.
- Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Bruning J, Kozak LP, Kahn CR, Benito M. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108: 1205–1213, 2001.
- Gunawardana SC, Piston DW. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* 61: 674–682, 2012.
- Hamann A, Flier JS, Lowell BB. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* 137: 21–29, 1996.
- Hondares E, Iglesias R, Giral A, Gonzalez FJ, Giral M, Mampel T, Villarroya F. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 286: 12983–12990, 2011.
- Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giral M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 11: 206–212, 2010.
- Hsueh H, Pan W, Kastin AJ. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* 28: 2382–2386, 2007.
- Kikuchi-Utsumi K, Gao B, Ohinata H, Hashimoto M, Yamamoto N, Kuroshima A. Enhanced gene expression of endothelial nitric oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R623–R626, 2002.
- Lee P, Werner CD, Kebebew E, Celi FS. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int J Obes (Lond)*. In press.
- Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM, Scarpace PJ. Induction of uncoupling protein 1 by central interleukin-6 gene delivery is dependent on sympathetic innervation of brown adipose tissue and underlies one mechanism of body weight reduction in rats. *Neuroscience* 115: 879–889, 2002.
- Lindquist JM, Rehnmark S. Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival. *J Biol Chem* 273: 30147–30156, 1998.
- López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, Martínez de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha AK, Rahmouni K, Diéguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 16: 1001–1008, 2010.
- Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366: 740–742, 1993.
- Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, Fjaere E, Bronstad I, Hao Q, Petersen RK, Hallenborg P, Ma T, De Matteis A, Araujo P, Mercader J, Bonet ML, Hansen JB, Cannon B, Nedergaard J, Wang J, Cinti S, Voshol P, Dorskeld SO, Kristiansen K. UCPI induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* 5: e11391, 2010.
- Moulin K, Truel N, Andre M, Arnaud E, Nibelink M, Cousin B, Dani C, Penicaud L, Casteilla L. Emergence during development of the white-adipocyte cell phenotype is independent of the brown-adipocyte cell phenotype. *Biochem J* 356: 659–664, 2001.
- Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480: 104–108, 2011.
- Nisoli E, Tonello C, Briscini L, Carruba MO. Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology* 138: 676–682, 1997.
- Ortega MT, Xie L, Mora S, Chapes SK. Evaluation of macrophage plasticity in brown and white adipose tissue. *Cell Immunol* 271: 124–133, 2011.
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379–1406, 2008.
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCPI-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285: 7153–7164, 2010.

38. Planavila A, Redondo I, Hondares E, Vinciguerra M, Munts C, Iglesias R, Gabrielli LA, Sítges M, Giralt M, van Bilsen M, Villarroya F. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun* 4: 2019, 2013.
39. Portet R, de Marco F, Zizine L, Bertin R, Senault C. Perinatal variations of prostaglandins E2 and F alpha levels in brown adipose tissue of the rat; effects of ambient temperature. *Biochimie* 62: 715–718, 1980.
40. Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev* 26: 312–324, 2012.
41. Rosell M, Hondares E, Iwamoto S, Gonzalez FJ, Wabitsch M, Staels B, Olmos Y, Monsalve M, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. Peroxisome proliferator-activated receptors- α and - γ , and cAMP-mediated pathways, control retinol-binding protein-4 gene expression in brown adipose tissue. *Endocrinology* 153: 1162–1173, 2012.
42. Rothwell NJ, Stock MJ. Surgical removal of brown fat results in rapid and complete compensation by other depots. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 257: R253–R258, 1989.
43. Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, German J, Fischer JD, Ogimoto K, Schwartz MW. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 59: 1817–1824, 2010.
44. Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, Cypess AM, Mishina Y, Gussoni E, Tseng YH. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 495: 379–383, 2013.
45. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454: 961–967, 2008.
46. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7: e49452, 2012.
47. Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305: 712–713, 1983.
48. Silva JE, Larsen PR. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest* 76: 2296–2305, 1985.
49. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123: 215–223, 2013.
50. Tanaka T, Urade Y, Kimura H, Eguchi N, Nishikawa A, Hayaishi O. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem* 272: 15789–15795, 1997.
51. Townsend KL, Tseng YH. Brown adipose tissue. Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte* 1: 13–24, 2012.
52. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 184: 285–293, 2005.
53. Vegiopoulos A, Müller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, Berriel Diaz M, Rozman J, Hrabe de Angelis M, Nüsing RM, Meyer CW, Wahli W, Klingenspor M, Herzig S. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328: 1158–1161, 2010.
54. Virtue S, Feldmann H, Christian M, Tan CY, Masoodi M, Dale M, Lelliott C, Burling K, Campbell M, Eguchi N, Voshol P, Sethi JK, Parker M, Urade Y, Griffin JL, Cannon B, Vidal-Puig A. A new role for lipocalin prostaglandin d synthase in the regulation of brown adipose tissue substrate utilization. *Diabetes* 61: 3139–3147, 2012.
55. Wentz W, Efanov AM, Brenner M, Kharitonov A, Köster A, Sandusky GE, Sewing S, Treinies I, Zitzer H, Gromada J. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* 55: 2470–2478, 2006.
56. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroya F, Cannon B, Rahmouni K, Lopez M, Vidal-Puig A. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149: 871–885, 2012.
57. Whittle AJ, López M, Vidal-Puig A. Using brown adipose tissue to treat obesity—the central issue. *Trends Mol Med* 17: 405–411, 2011.
58. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150: 366–376, 2012.
59. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332: 243–247, 2011.
60. Xue Y, Petrovic N, Cao R, Larsson O, Lim S, Chen S, Feldmann HM, Liang Z, Zhu Z, Nedergaard J, Cannon B, Cao Y. Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab* 9: 99–109, 2009.
61. Yamashita H, Kizaki T, Ookawara T, Sato Y, Yamamoto M, Ohira Y, Ohno H. Is insulin-like growth factor I involved in brown adipose tissue enlargement? *Life Sci* 55: 141–148, 1994.
62. Yamashita H, Sato Y, Kizaki T, Oh S, Nagasawa J, Ohno H. Basic fibroblast growth factor (bFGF) contributes to the enlargement of brown adipose tissue during cold acclimation. *Pflugers Arch* 428: 352–356, 1994.
63. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356–362, 2005.

4. Interaccions teixit adipós – sistema immunitari

4.1. La resposta immunitària

Els vertebrats disposen d'un sistema de defensa immunològica estructurat en diferents nivells que els protegeix d'intrusions no desitjades per part de patògens externs. Aquestes defenses, conegudes col·lectivament com el **sistema immunitari**, comencen amb les barreres epitelials i mucoses, amb la competència comensal amb la microbiota aliada i amb vies d'entrada químicament inhòspites com ara l'estómac, que són suficients per a evitar l'entrada de la gran majoria de patògens. En el cas que aconseguixin accedir a l'organisme, s'iniciarà una resposta immunitària activa, tant innata com adquirida, on la coordinació entre els diversos tipus cel·lulars a través de la producció de determinades molècules de senyalització serà clau per a l'èxit de la mateixa²⁷².

4.1.1. Comunicació intercel·lular, quimiotaxi i sistema immunitari

Si bé les cèl·lules i determinades molècules solubles del sistema immunitari (com ara el sistema del complement o els anticossos) seran efectors directes de la resposta immunitària, tant les cèl·lules del teixit afectat com les del sistema immunitari poden produir i alliberar a l'entorn extracel·lular **citocines** en presència de senyals de perill. Aquestes són proteïnes de mida petita implicades en senyalització intercel·lular, amb les quals en el context de la resposta immunitària les cèl·lules del teixit afectat es comunicaran amb les cèl·lules del sistema immunitari i aquestes entre si per tal de dur a terme la seva funció de combatre l'agent immunogènic²⁷³. Actualment, el nombre de molècules classificades com a citocines ascendeix a més d'un centenar. Les proteïnes pertanyents a aquesta categoria són diverses, i s'hi engloben, entre d'altres, les proteïnes de les superfamílies del factor de necrosi tumoral (TNFSF), les interleucines (IL), els interferons (IFN) i les quimiocines. Les funcions de la major part de citocines estan relacionades amb l'activació vies de senyalització implicades en la posada en marxa de mecanismes efectors a les cèl·lules del sistema immunitari i polaritzar la resposta a una població cel·lular amb un fenotip adient per tal de combatre cada tipus d'infecció, com veurem posteriorment.

D'altra banda, el nombre de **quimiocines** és més discret. Aquestes molècules tenen la funció particular d'estimular la **quimiotaxi**, és a dir, la migració cel·lular cap al lloc de secreció de les mateixes²⁷⁴. Clàssicament, el tipus cel·lular que es va descriure com a atret a través de quimiocines foren precisament els leucòcits, especialment neutròfils, monòcits i altres cèl·lules efectores des dels vasos sanguinis al lloc de producció. Actualment, però, el descobriment de nous membres d'aquesta família de proteïnes ha permès elucidar l'existència d'un paper clau ja no sols en l'orquestració de la resposta immunitària, sinó també en processos d'organogènesi, d'angiogènesi, de disseminació de metàstasis tumorals i d'interaccions entre virus i cèl·lules de l'hoste²⁷⁵. Aquests descobriments han portat a ampliar el seu ventall d'atracció, per tant, a altres tipus cel·lulars no relacionats amb el sistema immunitari.

Les diferents quimiocines presenten entre si característiques estructurals comunes. Aquestes acostumen a disposar de quatre cisteïnes en total, dues de les quals es troben a

prop del seu extrem amino-terminal, la tercera en una posició central i la quarta propera a l'extrem carboxil-terminal. Les dues cisteïnes presents a l'extrem amino-terminal es troben àmpliament conservades entre espècies, i juguen un paper clau en l'estructura i funcionalitat de la proteïna²⁷⁵.

Inicialment es classificaren les quimiocines en dues subfamílies funcionals: **Inflamatòries** i **homeostàtiques**: Les quimiocines inflammatòries controlen l'atracció de cèl·lules del sistema immunitari als llocs de la infecció, mentre que les homeostàtiques estan implicades en un trànsit normal de cèl·lules immunitàries i amb el manteniment de precursors de les mateixes i d'altres tipus en condicions basals. Addicionalment, es designà aquelles que podien actuar com a tots dos tipus depenent de la situació com a quimiocines amb **funció dual**, i aquelles que duïen a terme la seva funció principalment en plasma en lloc de als teixits com a quimiocines **plasmàtiques**²⁷⁶. Durant la darrera dècada, però, el nombre creixent de noves quimiocines va portar a la necessitat d'establir un nou sistema de classificació per a les mateixes. El criteri que es trià fou en aquesta ocasió de tipus estructural, tot considerant la posició relativa dels dos residus de cisteïna a extrem amino-terminal²⁷⁴. Aquesta classificació va permetre diferenciar a nivell estructural quatre famílies de quimiocines:

- **CC**, si no existeix separació entre ambdues cisteïnes.
- **CXC**, si un aminoàcid no conservat separa les dues cisteïnes.
- **CX₃C**, si tres aminoàcids no conservats separen les dues cisteïnes.
- **XC**, si tan sols disposen d'una cisteïna a l'extrem amino-terminal.

Amb aquest sistema de classificació, cada quimiocina es designa amb la lletra L (de *l·ligand*) precedida del seu subtipus estructural. En el cas dels seus receptors, la nomenclatura és anàloga però substituint la lletra L per una R (de *receptor*) precedida del tipus estructural de quimiocina amb el qual interacciona. Mentre que les famílies CC i CXC disposen de nombrosos membres (fins el moment, CCL1-28 i CXCL1-17), tan sols s'ha descrit un membre de la família CX₃C (CX3CL1) i dos de la família C (XCL1 i XCL2)²⁷⁴. A la **taula II** es detalla una relació de les quimiocines descrites fins el moment en ratolí i humà. En el cas de les quimiocines de tipus CXC, a partir d'estudis iniciats sobre CXCL8 (IL-8), es va poder identificar l'existència d'un tripèptid immediatament anterior al patró CXC present en alguns però absent en d'altres membres d'aquesta família. Aquest tripèptid, format per un residu d'àcid glutàmic, un de leucina i un d'arginina (**seqüència ELR**), ha permès subdividir la família CXC en funció de si la quimiocina en disposa o no en aquelles de tipus ELR⁺ o bé ELR⁻. A més de constituir-ne una particularitat estructural, la presència d'aquest motiu permet a les quimiocines que en disposen unir-se als receptors CXCR1 i CXCR2, implicats en l'atracció de neutròfils²⁷⁶. D'altra banda, les quimiocines ELR⁻ s'uniran a altres receptors de tipus CXCR i estaran implicades en la quimiotaxi d'altres tipus cel·lulars.

Pel que fa als **receptors de quimiocines**, aquests estan acoblats a proteïnes G heterodimèriques (α , β i γ) i presenten set dominis transmembranals. La interacció amb els mateixos iniciarà una cascada de transcripció a la cèl·lula diana que culminarà amb una resposta de reestructuració del citoesquelet i de canvis en l'expressió gènica que n'afavoriran el moviment a favor del gradient de quimiocines (de concentracions baixes a concentracions altes de les mateixes)²⁷⁵. Mentre que algunes quimiocines només s'uneixen de forma específica a un sol receptor, d'altres poden interactuar amb més d'un i viceversa, sempre dins d'aquells de la seva família (**taula II**), tot creant una redundància de senyalització que dona

versatilitat al sistema. Tot i que en la major part de casos les quimiocines duen a terme efectes de tipus agonista sobre el receptor (afavorint la quimiotaxi), algunes quimiocines són capaces de realitzar efectes inhibidors de la quimiotaxi en interactuar sobre uns receptors, i fins i tot, dur a terme funcions agonistes o antagonistes en funció del receptor sobre el qual actuen^{274,275}. Per exemple, CCL7, una quimiocina agonista de CCR1, CCR2 i CCR3, actua com a antagonista de CCR5²⁷⁷.

Donat l'elevat potencial d'atracció de cèl·lules del sistema immunitari que tenen les quimiocines, el seu mecanisme d'acció està, doncs, fortament regulat. El primer punt de control de l'acció de les mateixes té lloc a nivell transcripcional (incloent processament alternatiu dels mRNAs), traduccional, posttraduccional i d'exocitosi tant de quimiocines com dels seus receptors. Un segon mecanisme de regulació de l'acció de les mateixes és la variació de la composició de la matriu extracel·lular, tot afavorint o empitjorant la unió de les quimiocines i, per tant, la formació d'un gradient definit cap al teixit diana²⁷². Finalment, el control de l'acció de les mateixes pot tenir lloc a nivell de receptor, sigui a través de l'acció de lligands antagonistes com hem mencionat prèviament o a través de la interacció de les quimiocines amb **receptors atípics**. En l'actualitat es coneixen cinc receptors atípics: El receptor de quimiocines positiu per a l'antigen Duffy (DARC), el receptor atípic D6, el receptor de quimiocines *chemocentryx* (CCX-CKR), CCRL2 i CXCR7 (conegut també com a receptor de quimiocines orfe 1, CMKOR1 o receptor atípic de quimiocines 1, ACKR1). Tot i ser també receptors amb set dominis transmembranals, els receptors atípics no estan acoblats a proteïnes G, si bé actualment es coneix que sí que ho estan a altres mecanismes de senyalització (com ara la via de la β -arrestina). D'aquesta manera, en contraposició a les observacions inicials en què tan sols eren considerats sistemes de segrest de les quimiocines per tal que no interaccionessin amb el seu receptor bioactiu, els receptors atípics exercirien funcions supressores d'una forma activa i contribuirien a una regulació precisa de les accions de determinades quimiocines^{272,278}.

Un bon exemple d'aquest tipus de regulació és el següent: **CXCL12** duu a terme una potent funció quimiotàctica per a monòcits en interactuar amb el seu receptor específic, **CXCR4**. Per tal de controlar aquesta acció, CXCL12 pot interactuar amb el receptor atípic **CXCR7**, el qual segrestarà la quimiocina i impedirà la seva interacció amb CXCR4 i, al seu torn, activarà la via de la β -arrestina per a internalitzar les molècules de CXCL12 segrestades^{279,280}. A aquest mecanisme de regulació cal afegir que recentment s'ha descobert que la quimiocina **CXCL14**, per a la qual encara no es coneix un receptor sobre el qual dugui a terme funcions agonistes, pot interactuar de forma antagonista amb CXCR4, tot impedingint les accions de CXCL12 sobre el mateix²⁸¹. En conjunt, aquestes molècules acaben formant una sofisticada tètrada de regulació de la funció de CXCL12 i, per tant, de control de la infiltració de cèl·lules del sistema immunitari al teixit diana en funció de les necessitats del mateix, tot coordinant i ajustant la resposta més adient per a cada fase de la infecció.

4.1.1.1. CXCL14, una quimiocina d'especial rellevància al teixit adipós?

CXCL14 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 14*), també coneguda com a **BRAK** (*breast and kidney associated chemokine*), **BMAC** (*B cell- and monocyte-activating chemokine*) o **MIP-2 γ** (*macrophage inflammatory protein 2-gamma*) és una quimiocina homeostàtica de tipus CXCL i ELR. A banda de la seva interacció antagonista amb l'eix CXCL12-CXCR4 que hem descrit, l'existència d'un receptor agonístic per a aquesta molècula és encara desconeguda. CXCL14 es sintetitza com un polipèptid de 99 aminoàcids, del qual se n'eliminarà el pèptid senyal i s'alliberarà a l'espai extracel·lular la forma funcional de 77 aminoàcids. El seu elevat estat de conservació entre espècies, des del peix zebra fins als humans, indica que CXCL14 és una quimiocina primordial les funcions de la qual són d'alta rellevància per a l'organisme²⁸².

Part d'aquesta importància es pot explicar pel fet que CXCL14 duu a terme **funcions pleiotròpiques**. Com a quimiocina, CXCL14 és capaç d'afavorir la migració de cèl·lules del sistema immunitari. Monòcits, macròfags activats, cèl·lules NK, limfòcits B i cèl·lules dendrítiques immadures es troben entre els tipus cel·lulars que s'ha descrit fins el moment que és capaç d'atreure. Addicionalment, aquesta quimiocina té una funció antimicrobiana als epitelis i les mucoses, la qual es creu que ve mediada per la proteòlisi de la mateixa per part de la microbiota comensal en situacions d'infecció per tal de combatre bacteris invasors virulents^{282,283}. Una de les funcions de CXCL14 més estudiada des del seu descobriment és el seu paper en la progressió tumoral, si bé els resultats al respecte són contradictoris: Mentre que en alguns tipus de tumors desenvolupa un paper negatiu per a la seva evolució a través d'accions antiproliferatives, antiangiogèniques i d'immunovigilància, en d'altres n'afavoriria la invasivitat a causa de les seves capacitats quimiotàctiques. A més d'aquestes funcions més estudiades, CXCL14 també duu a terme una missió rellevant a nivell reproductiu, ja que el transcrit d'aquesta quimiocina s'expressa a l'endometri durant les fases secretores intermèdia i tardana del cicle menstrual i s'ha descrit que aquesta expressió ve afavorida per la progesterona. A nivell de sistema nerviós, s'ha comprovat que CXCL14 s'expressa en elevats nivells a l'escorça cerebral, a l'hipocamp, a l'hipotàlem i al cerebel, on CXCL14 i CXCL12 estan relacionades amb neurogènesi. En concret, s'observà que les femelles de ratolins deficientes per a CXCL14 presenten una menor mida, una ingesta reduïda i una inhibició de la captació d'aliments en un entorn nou. Es postulà que aquests efectes es derivarien d'accions d'aquesta proteïna relacionades amb la neurogènesi dels circuits hipotalàmics orexigènics i anorexigènics responsables de modular l'apetit en coordinació amb la leptina (com ara els del NPY o la proteïna r-agouti), així com sobre l'expressió dels neurotransmissors específics d'aquestes neurones²⁸⁴.

Aquesta darrera observació, juntament amb un nombre molt discret d'estudis previs, establiren l'existència d'un **paper de CXCL14 en l'homeòstasi energètica**. Si bé fou un fet obviat inicialment, en què els estudis es centraren en les seves funcions immunitàries i oncològiques, aquesta quimiocina s'expressa al múscul esquelètic, al fetge, al TAB i al TAM^{285,286}. El fet que els nivells transcripcionals de CXCL14 es trobessin induïts al TAB en models animals d'obesitat i per una dieta alta en greixos, i que els animals KO per al seu gen mostressin una menor infiltració de macròfags al mateix i més sensibilitat a la insulina, portà a pensar que CXCL14 duia a terme accions proinflamàtories tot atraient aquestes cèl·lules immunitàries al TAB²⁸⁵, de forma similar a com fan altres quimiocines proinflamàtories com MCP-1, sobre la qual es parlarà més endavant. No obstant, estudis posteriors apuntarien que

el paper de CXCL14 en la regulació metabòlica és més complex i, fins i tot, contradictori amb aquestes observacions inicials. En primer lloc, es comprovà que l'administració de glucosa o insulina intraperitoneal a ratolins era capaç d'incrementar l'alliberació de CXCL14. D'altra banda, el tractament d'adipòcits blancs 3T3-L1 amb formes recombinants d'aquesta proteïna n'augmentava la seva sensibilitat a la insulina, mentre que realitzar la mateixa aproximació amb MCP-1 en generava resistència, tot demostrant que es tractava un efecte específic²⁸⁶. Aquestes observacions indiquen que la inducció de CXCL14 al TAB en situacions d'obesitat podria tenir, de fet, un efecte positiu en afavorir la captació de glucosa circulant i la lipogènesi *de novo*. En segon lloc trobem el paper abans esmentat de CXCL14 en el control central de l'apetit, que lliga unes accions metabòliques perifèriques amb d'altres de centrals.

En conjunt, aquestes observacions ressalten el paper de la CXCL14 derivada del teixit adipós en la regulació energètica. No obstant, les seves funcions a nivell de TAM no han estat explorades a la literatura fins el moment. En la present tesi doctoral, es caracteritzà el paper de la CXCL14 produïda pel mateix com a fase final del procés d'identificació de noves adipocines secretades pel TAM prèviament esmentat.

Quimiocina	Ortòleg en ratolí	Noms alternatius	Categoria funcional	Receptor	
				Agonista	Antagonista
Subfamília CC					
CCL1	<i>Ccl1</i>	I-309, TCA-3 (r)	I	CCR8	-
CCL2	<i>Ccl2</i>	MCP-1, JE (r)	I	CCR2	-
CCL3	<i>Ccl3</i>	MIP-1 α , LD78 α	I	CCR1, CCR5	-
CCL3L1	-	LD78 β	I	CCR1, CCR3, CCR5	-
CCL3L3	-	LD78 β	I	CCR1, CCR3, CCR5	-
CCL4	<i>Ccl4</i>	MIP-1 β	I	CCR5	-
CCL4L1	-	AT44.2	I	CCR5	-
CCL4L2	-		I	CCR5	-
CCL5	<i>Ccl5</i>	RANTES	I, P	CCR5, CCR1, CCR3	-
CCL7	<i>Ccl7</i>	MCP-3, MARC (r)	I	CCR1, CCR2, CCR3	CCR5
CCL8	-	MCP-2	I	CCR1, CCR2, CCR5	-
-	<i>Ccl8</i>		I	CCR8	-
CCL11	<i>Ccl11</i>	Eotaxina	D	CCR3, CCR5	CCR2, CXCR3
-	<i>Ccl12</i>	MCP-5	I	?	-
CCL13	-	MCP-4	I	CCR2, CCR3	-
CCL14	-	HCC-1	P	CCR1, CCR3, CCR5	-
CCL15	<i>Ccl9</i>	HCC-2, leucotactina-1, CCF18 (r), MIP-1 γ (r)	P	CCR1, CCR3	-
CCL16	-	LEC, HCC-4	?	CC1, CCR2, CCR5, CCR8	-
CCL17	<i>Ccl17</i>	TARC, ABCD-2 (r)	D	CCR4	-
CCL18	-	PARC, DC-CK1	H	PITPNM3	CCR3
CCL19	<i>Ccl19</i>	MIP-3 β , ELC	H	CCR7	-
CCL20	<i>Ccl20</i>	MIP-3 α , LARC	D	CCR6	-
CCL21	<i>Ccl21a</i>	SLC, 6Ccina	H	CCR7	CXCR3 (r)
-	<i>Ccl21b</i>		H	CCR7	-
-	<i>Ccl21c</i>		H	CCT7	-
CCL22	<i>Ccl22</i>	MDC, ABCD-1	D	CCR4	-
CCL23	<i>Ccl6</i>	MPIF-1, C10 (r)	P	CCR1, FPRL1	-
CCL24	<i>Ccl24</i>	Eotaxina-2, MPIF-2	H	CCR3	-
CCL25	<i>Ccl25</i>	TECK	H	CCR9	-
CCL26	<i>Ccl26</i> (hipotètica)	Eotaxina-3	I	CC3, CX3CR1	-
CCL27	<i>Ccl27a</i>	CTACK, ILC	H	CCR10	-
-	<i>Ccl27b</i>		H	CCR10	-
CCL28	<i>Ccl28</i>	MEC	H	CCR10, CCR3	-
Subfamília CXC					
CXCL1	<i>Cxcl3</i>	GRO α , MGSA, Gm1960 (r)	I, ELR+	CXCR2	-
CXCL2	<i>Cxcl2</i>	GRO β , MIP-2 (r)	I, ELR+	CXCR2	-
CXCL3	<i>Cxcl1</i>	GRO γ , KC (r)	I, ELR+	CXCR2	-
CXCL4	-	PF4	P, ELR-	CXCR3-B	-
CXCL4L1	<i>Pf4</i>	PF4V1	P, ELR-	CXCR3-B	-
CXCL5	-	ENA78	I, ELR+	CXCR2	-
CXCL6	<i>Cxcl5</i>	GCP2, LIX (r)	I, ELR+	CXCR1, CXCR2	-
CXCL7	<i>Ppbb</i>	PPBP, NAP-2	P/I, ELR+	CXCR1, CXCR2	-
CXCL8	-	Interleucina 8 (IL-8)	I, ELR+	CXCR1, CXCR2	-
CXCL9	<i>Cxcl9</i>	MIG	I, ELR-	CXCR3	CCR3
CXCL10	<i>Cxcl10</i>	IP-10	I, ELR-	CXCR3	CCR3
CXCL11	<i>Cxcl11</i>	I-TAC	I, ELR-	CXCR3, CXCR7	CCR3, CCR5
CXCL12	<i>Cxcl12</i>	SDF-1	H, ELR-	CXCR3, CXCR7	-
CXCL13	<i>Cxcl13</i>	BLC, BCA-1	H, ELR-	CXCR5, CXCR3	-
CXCL14	<i>Cxcl14</i>	BRAK, BMAC, MIP-2 γ	H, ELR-	?	CXCR4
-	<i>Cxcl15</i>	Lungkine, weche	?, ELR-	?	-
CXCL16	<i>Cxcl16</i>	SR-PSOX	I, ?	CXCR6	-
CXCL17	<i>Cxcl17</i>	DMC	?, ?	?	-
Subfamília C					
XCL1	<i>Xcl1</i>	Limfotactina, ATAC	D	XCR1	-
XCL2	-	SCM-1 β	D	XCR1	-
Subfamília CX3C					
CX3CL1	<i>Cx3cl1</i>	Fractalcina	D	CX3CR1	-

Taula II: Quimiocines descrites en humà i ratolí (r). I: Inflamatòria, H: Homeostàtica, D: Funció dual, P: Plasmàtica, ?: Paràmetre desconegut. ELR: Seqüència Glu-Leu-Arg. Adaptada i actualitzada a partir de Ref. 274.

4.1.2. Immunitat innata

La **resposta immunitària innata** es compon d'una sèrie de cèl·lules especialitzades i de molècules solubles, i representa la primera línia de defensa activa en presència d'intrusions. Les cèl·lules de la immunitat innata disposen de mecanismes de reconeixement de les mateixes en forma de receptors de reconeixement de patrons moleculars associats a patògens (PAMPs), com ara els receptors de tipus Toll (**TLR**, *toll-like receptors*), els quals detecten amplis rangs d'agents externs per a l'elaboració d'una resposta adient²⁸⁷.

Els granulòcits **neutròfils** tenen un important paper en estats inicials de la resposta inflamatòria (coneguts com a **fase aguda**). Es troben implicats en l'eliminació agressiva i directa de patògens de mida petita, com ara bacteris, a través d'una activitat fagocítica i de la generació de mediadors inflamatoris d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i de nitrogen, una activitat coneguda com a **esclat respiratori** que compartiran amb altres cèl·lules del sistema immunitari, com ara els **macròfags**. Per la seva banda, les **cèl·lules assassines naturals (NK)** participaran en la destrucció de cèl·lules de l'hoste infectades, especialment en el cas de virus. Per a paràsits més grans, com per exemple helmints, aquestes estratègies serien inefectives i cal l'acció d'una resposta basada en la producció de molècules tòxiques per al patògen coordinada pels **eosinòfils**. En funció de la naturalesa del patògen, i en algunes situacions d'al·lèrgia, l'acció dels **basòfils** i l'alliberament de grànuls d'histamina per part dels **mastòcits** també contribuiran a l'eliminació dels mateixos. Un dels tipus principals de cèl·lules de la immunitat innata, però, els macròfags, podran actuar com a iniciadors de tots dos tipus de resposta i realitzar una sèrie de funcions homeostàtiques de rellevància dins de l'organisme. Les **cèl·lules limfoides innates (ILCs)**, al seu torn, seran capaces de secretar citocines per tal d'afavorir unes o altres respostes en funció dels patrons a combatre, d'una forma anàloga a com veurem que faran els limfòcits T durant la resposta adquirida²⁸⁸.

Els **macròfags**, per la seva part, són cèl·lules mieloides diferenciades a partir dels **monòcits** circulants que es poden trobar de forma normal en pràcticament tots els teixits de l'organisme com a cèl·lules residents. Es creu que aquesta infiltració actuaria com a mecanisme de vigilància de l'entrada d'elements aliens, tant per captació directa de senyals dels mateixos a través dels PAMPs o de les citocines produïdes per les cèl·lules tissulars. Els macròfags residents, doncs, estan encarregats de captar, integrar i respondre a aquests indicadors d'estat del seu microambient. En funció dels mateixos, es podran activar en dos programes radicalment diferents (**Fig. 14**): L'activació clàssica i l'activació alternativa. Els **macròfags activats clàssicament** o macròfags **M1** adquireixen aquest fenotip en rebre senyals normalment associades amb infeccions bacterianes, com ara la presència de lipopolisacàrid (**LPS**), un component de la membrana externa dels bacteris gramnegatius, o d'interferó gamma (**IFN γ**). Aquest fenotip és altament inflamatori, disposa d'un metabolisme principalment glicolític i mostra un elevat potencial fagocític i bactericida, per la qual cosa col·laborarà amb neutròfils i cèl·lules NK per a eliminar la infecció. D'altra banda, els **macròfags activats per la via alternativa** o **M2** adquireixen aquest fenotip en interactuar amb la interleucina-4 (**IL-4**) o la interleucina-13 (**IL-13**), produïdes principalment pels eosinòfils. Aquest subtipus, menys inflamatori i amb un fenotip més oxidatiu, està implicat en resoldre infeccions de paràsits de gran mida i en processos de remodelació tissular, una altra important funció dels macròfags a nivell homeostàtic. Ambdós programes, al seu torn, potencien la diferenciació dels macròfags propers al seu mateix fenotip: Els macròfags M1

secretaran citocines proinflamatòries com el $TNF\alpha$, la $IL-1\beta$, la $IL-6$ i la $IL-12$, així com quimiocines implicades en una resposta inflamatòria, com MCP-1, $IL-8$ o CXCL12. En contraposició, els macròfags M2 produiran $IL-4$, $IL-13$ i $IL-10$. Els macròfags, a més, poden presentar un tercer estat, el de **desactivació**, en què només produiran citocines antiinflamatòries tals com $IL-10$ o $TGF\beta$ ²⁸⁹.

La principal diferència entre els dos tipus de macròfag, a més de l'estrictament funcional, rau en un metabolisme diferencial de l'arginina. Els macròfags M1 expressen nivells elevats d'**òxid nítric sintasa induïble (iNOS)**, per la qual cosa seran capaços de produir el bactericida òxid nítric a partir d'aquest aminoàcid. D'altra banda, els macròfags M2 expressen l'**arginasa 1**, quelcom que li permetrà generar urea i ornitina, ambdues molècules sense activitat proinflamatòria però implicades en la síntesi de col·lagen i en proliferació cel·lular, respectivament. L'expressió d'aquests marcadors, per tant, permet distingir els macròfags activats clàssicament dels activats alternativament. No obstant, tot i que a nivell conceptual resulta molt convenient classificar els macròfags en aquests dos subtipus emprant aquests marcadors, els macròfags són cèl·lules amb un alt nivell de plasticitat i, en un moment determinat, podran coexistir en un mateix teixit macròfags en múltiples estadis possibles del seu espectre d'activació²⁸⁹.

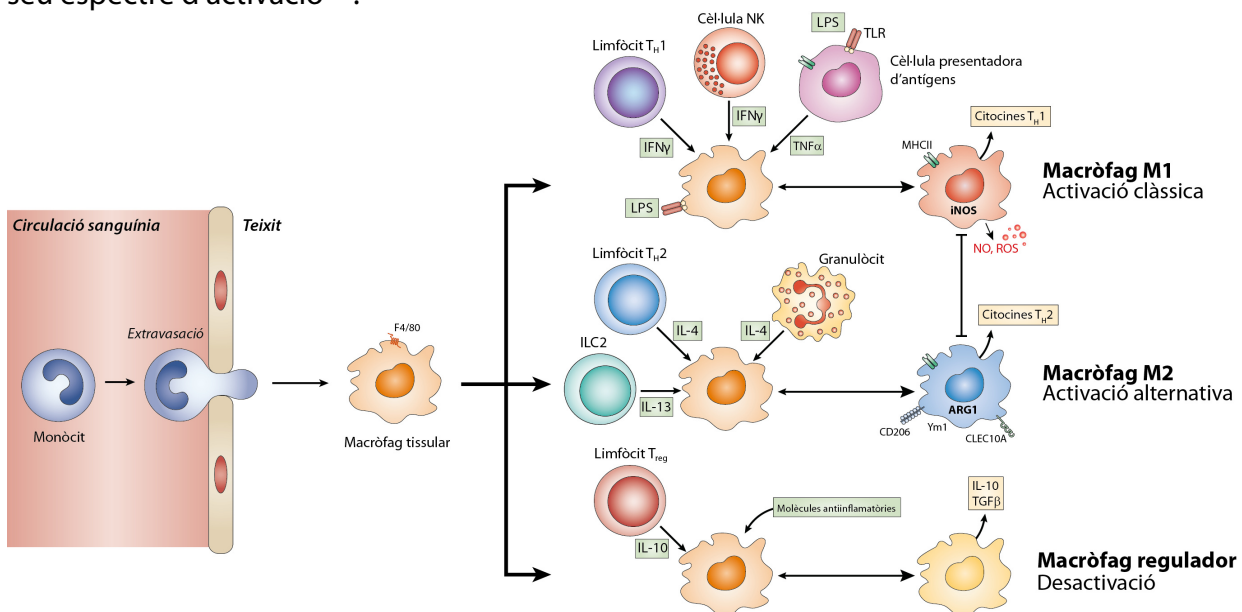


Figura 14: Possibles fenotips d'activació dels macròfags i marcadors característics per als mateixos en ratolí. M1 (superior), M2 (central) i desactivació (inferior). Ym1: Similar a quitinasa 3. Consultar al text o a la taula d'abreviatures el significat de la resta d'abreviatures. Adaptat de la Ref. 289.

4.1.3. Immunitat adquirida

La presència continuada d'un estímul antigènic condueix a l'activació i desplegament de la **resposta immunitària adaptativa o adquirida**. A diferència de la resposta immediata i semiespecífica que suposa la resposta innata, l'adaptativa triga dies a aparèixer degut als processos d'hipermutació somàtica que la generen i resulta en una resposta altament específica de **limfòcits T** efectors i d'anticossos generats pels **limfòcits B** que perdurarà durant anys un cop eradicat els intrusos²⁷³.

Els limfòcits T es poden classificar en dues grans subpoblacions en funció de la presència o no de dos certs marcadors de superfície: CD8⁺ o CD4⁺. Els **limfòcits T CD8⁺ o citotòxics** estaran implicats en respostes antivirals, ja que estaran implicats en l'eliminació de les cèl·lules tissulars afectades per tal d'evitar la replicació dels virus. D'altra banda, els limfòcits T CD4⁺ estaran relacionats amb la producció de citocines per tal d'assistir altres cèl·lules efectores en l'eliminació de les amenaces. En presència d'estímuls inflamatoris produïts per les cèl·lules de la immunitat innata, els limfòcits CD4⁺ esdevindran limfòcits col·laboradors de tipus 1 (**T_H1**) o, en el cas concret de la presència d'interleucina-17, **T_H17**, i produiran més mediadors inflamatoris. Alternativament, es podran diferenciar en els de tipus 2 (**T_H2**), implicats en respostes humorals per activació de limfòcits B i en homeòstasi tissular. Una tercera població de rellevància entre els limfòcits són els T reguladors (**T_{reg}**), FOXP3⁺, que estan implicats en control de l'expansió excessiva de respostes immunitàries tant innates com adquirides a través de la producció de citocines antiinflamatòries com ara la IL-10.

Les cèl·lules de la immunitat adquirida reben l'ordre de desplegament a partir de la **presentació d'antígens** a la superfície cel·lular, quelcom que té lloc a través dels complexos principals d'histocompatibilitat de tipus I i II (**MHCI** o **MHCII**). El MHCI es compon de tres cadenes α i d'una de β no ancorada a la membrana (**β_2 -microglobulina**), s'expressa a totes les cèl·lules nucleades i presenta antígens intracel·lulars. En cèl·lules sanes, el MHCI presenta pèptids provinents de proteïnes pròpies i, excepte en situacions d'autoimmunitat, aquests no suscitaran cap resposta efectora en ésser reconeguts. En presència de patògens intracel·lulars, però, el MHCI en presentarà pèptids propis de les seves proteïnes, tot permetent-ne el reconeixement per part dels limfòcits T citotòxics, els quals procediran a eliminar la cèl·lula infectada. D'altra banda, el MHCII està compost només per cadenes α ancorades a la membrana i és expressat per les **cèl·lules presentadores d'antígens professionals**, com ara cèl·lules dendrítiques, macròfags i limfòcits B. Aquestes presenten antígens extracel·lulars captats per elles mateixes, tot indicant als limfòcits T CD4⁺ la presència d'un element aliè específic i permetent l'elaboració d'una resposta adient. En tots dos casos, els limfòcits reconeixen la combinació MHC+antigen a partir del seu receptor de cèl·lula T (**TCR**) i transduiran el senyal a nivell citoplasmàtic per acció del seu coreceptor, **CD3**, un marcador exclusiu d'aquest tipus cel·lular.

D'altra banda, les cèl·lules assassines naturals T (**NKT**) són un tipus especial de limfòcits, a cavall entre la immunitat innata i l'adaptativa, que presenten marcadors propis de les cèl·lules NK i un TCR semi-invariant com el dels limfòcits T. Una característica exclusiva d'aquestes cèl·lules és la capacitat d'interacció amb **CD1d**, una proteïna de superfície expressada a diversos tipus cel·lulars i capaç de presentar-n'hi antígens lipídics a través del seu TCR, de manera anàloga a la presentació d'antígens peptídics que duen a terme els MHC. Les cèl·lules NKT es classifiquen en les NKT invariants o de tipus I (**iNKTI** o **NKTI**) i les de tipus II (**NKTII**), segons si la seva funció primordial és aquesta presentació i la secreció de citocines T_H1 o T_H2, en funció de la necessitat, o si, pel contrari, estan encarregades de controlar l'activació de les iNKTI²⁹⁰.

4.2. Obesitat, inflamació i resistència a la insulina

Com s'ha detallat anteriorment, la resistència a la insulina als teixits perifèrics és una important disfunció metabòlica associada a l'obesitat que es caracteritza per una incapacitat

de captació de glucosa i un augment en la lipòlisi al teixit adipós, quelcom que es tradueix en hiperglicèmia, hiperinsulinèmia i hipertrigliceridèmia. Com a resposta, les cèl·lules β del pàncrees augmenten la seva producció d'insulina fins al seu esgotament, enllaçant així l'obesitat amb el desenvolupament de T2DM²⁹¹. En qualsevol cas, l'obesitat i la T2DM estan associades a aquesta existència continuada d'un **estat inflamatori crònic de baixa intensitat**, el qual contribueix tant al seu inici com al seu manteniment i escalat²⁹² (**Fig. 15**).

Citocines i quimiocines	Funcions	Principals cèl·lules productores al TAB
<i>Proinflamatòries</i>		
TNF α	Inducció i manteniment de respostes inflamatòries innates i T _H 1, inhibició de PPAR γ	Adipòcits, macròfags, SVF
IL-1 β	Activació de macròfags i limfòcits T	Adipòcits, macròfags
IL-6	Pleiotròpica: Promoció de la diferenciació dels limfòcits B i T, síntesi de proteïnes de la fase aguda, inducció de la lipòlisi, sensibilització a l'acció de la IL-4	Adipòcits, SVF
IL-7	Preservació homeostàtica de precursors limfoides, modulació de la massa adiposa i de la senyalització per insulina	SVF
IL-18	Inducció de diverses de respostes inflamatòries	SVF
MCP-1/CCL2	Quimiotaxi de monòcits CCR2 ⁺	Adipòcits, SVF
RANTES/CCL5	Quimiotaxi de limfòcits	Adipòcits, SVF
ENA-78/CXCL5	Quimiotaxi de neutròfils, antagonisme de les vies de senyalització per insulina a través de la via JAK-STAT	SVF
IL-8/CXCL8	Quimiotaxi de neutròfils	Adipòcits, macròfags
IP-10/CXCL10	Quimiotaxi de leucòcits CXCR3 ⁺	Adipòcits, SVF
SDF-1/CXCL12	Quimiotaxi de macròfags CXCR4 ⁺	Adipòcits, SVF
Oncostatina M	Regulació de les respostes immunitàries, inhibició de la diferenciació adipocitària	Macròfags, SVF
M-CSF	Afavoriment de la proliferació i diferenciació de macròfags i monòcits	SVF
MIF	Activació de respostes immunitàries cel·lulars de tipus T _H 1	Adipòcits, SVF
<i>Antiinflamatòries</i>		
IL-4 IL-13	Activació de respostes T _H 2 i de l'activació alternativa de macròfags	Eosinòfils
IL-5	Activació d'eosinòfils	ILC2
IL-10	Atenuació de les respostes inflamatòries	Macròfags, SVF
IL-33	Activació d'ILC2 i limfòcits T _{reg}	Adipòcits, SVF
TGF β	Inhibició de la proliferació de cèl·lules immunitàries, inhibició de l'adipogènesi	SVF

Taula III: Principals citocines secretades pel TAB. RANTES: *Regulated on activation, normal T cell-expressed and secreted*. ENA-78: *Neutrophil activating protein 78*. IP-10: *IFN γ -inducible protein 10*. SDF-1: *Stromal cell-derived factor 1*. M-CSF: *Macrophage colony stimulating factor*. MIF: *Macrophage migration inhibitory factor*. Consultar el text o la secció d'abreviatures per a la resta. Adaptada i actualitzada de les Refs. 160, 238, 250 i 268.

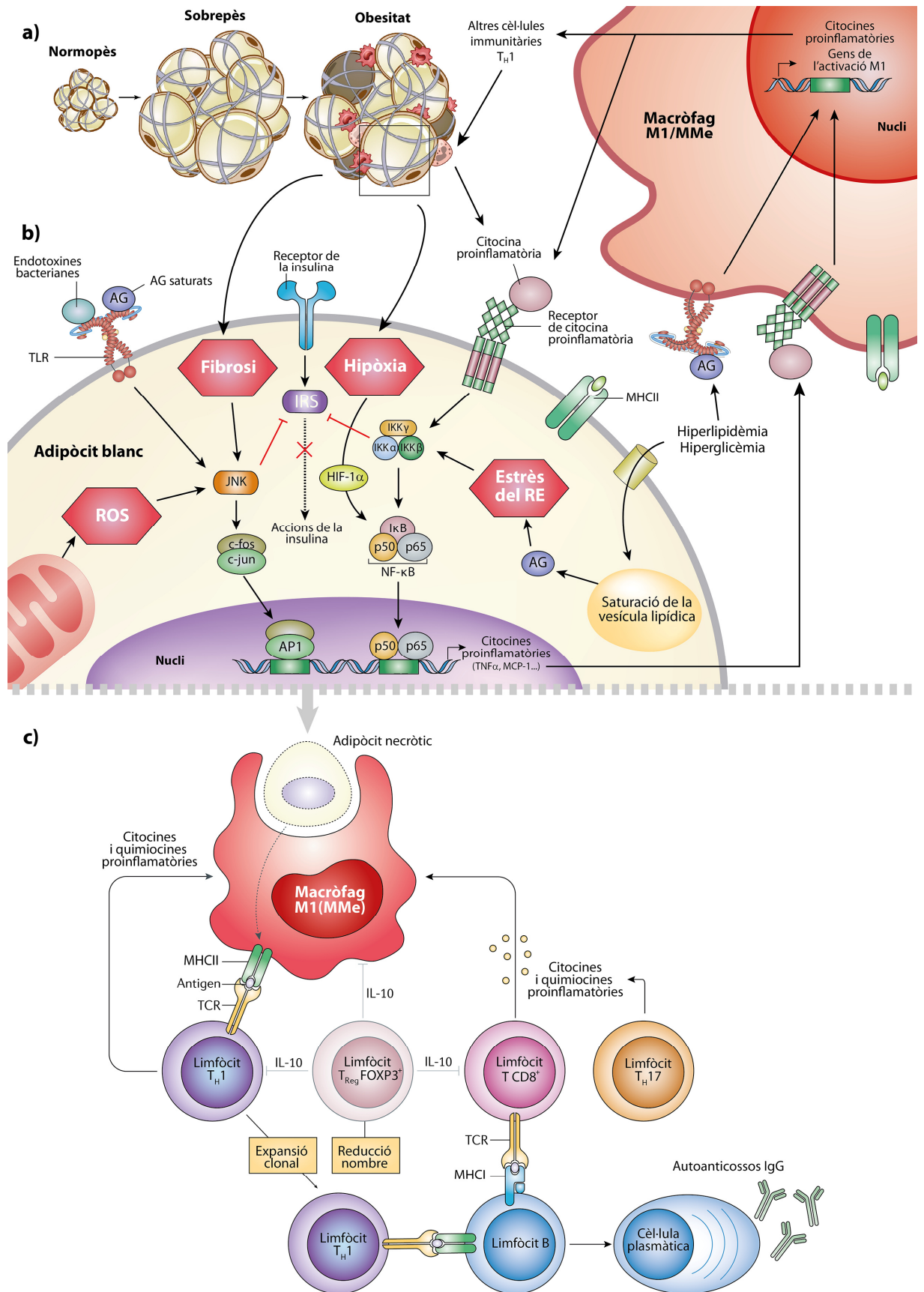


Figura 15: Mecanismes de generació d'un estat inflamatori i de resistència a la insulina al TAB obès. (a) Expansió del TAB. **(b)** Events intracel·lulars i mecanismes d'estrès (hexàgons vermells) que condueixen a la inducció d'un estat inflamatori a adipòcits i cèl·lules immunitàries infiltrades. **(c)** Resposta adaptativa que perpetua un estat d'inflamació crònica al TAB obès. Adaptat a partir de les Refs. 1, 289 i 292.

Les primeres evidències d'una implicació dels processos inflamatoris en l'etiologia de la diabetis daten de finals del segle XIX, quan es va descriure que el tractament amb altes dosis de salicilat de sodi, un antiinflamatori no esteroïdal, era capaç d'atenuar la hiperglicèmia dels pacients amb diabetis²⁹². A mitjans del segle XX es van poder detectar nivells incrementats de citocines proinflamatòries i proteïnes de la fase aguda en pacients amb obesitat i diabetis, si bé no fou fins a finals del mateix que es correlacionà aquest fet amb l'increment en l'adipositat²⁹². En un moment en què tot just s'estava començant a reconèixer el paper del teixit adipós com a òrgan secretor, el descobriment que el TNF α produït pel mateix –i alliberat en excés en situacions d'obesitat– era capaç de suscitar resistència a la insulina en models experimentals va suposar una idea revolucionària^{293,294}. Aquest reconeixement del teixit adipós com a òrgan secretor va afavorir l'estudi d'altres molècules, com ara, i tal i com s'ha esmentat prèviament, la producció de citocines i quimiocines per part del mateix. A la **taula III** es detalla una relació de les principals citocines i quimiocines reconegudes com a secretades pel TAB fins al moment. En l'actualitat, està plenament establerta l'existència d'una correlació positiva entre obesitat i els nivells circulants de citocines proinflamatòries i d'una de negativa amb d'antiinflamatòries, i, com veurem, el resultat d'aquest desequilibri serà un dels factors clau en l'aparició de les alteracions metabòliques relacionades.

En situacions d'obesitat, el teixit adipós pateix, com s'ha esmentat prèviament, fenòmens, inicialment, d'hipertrofia i, posteriorment, d'hiperplàsia, ja que els adipòcits hipertrofiats són capaços d'enviar senyals pro-adipogènics en situacions d'assoliment de la seva capacitat d'emmagatzematge màxima per tal d'afavorir la diferenciació de nous adipòcits¹ (**Fig. 15a**). Aquesta capacitat de ràpida remodelació del teixit adipós en resposta a les demandes nutricionals fa palès el requeriment d'una també ràpida habilitat de neovascularització per tal que la sang pugui arribar correctament al dipòsit. L'expansió excessiva, però, provoca l'acumulació d'adipòcits en regions a les quals no els arriba la circulació, els quals esdevenen hipòxics i, posteriorment, necròtics²⁹⁵. El factor induït per hipòxia 1 α (**HIF-1 α**) respon a aquesta disminució en la pressió parcial d'oxigen, per la qual cosa es trobarà sobreexpressat en el TAB d'individus obesos en models animals i en pacients. Aquest factor és capaç de suprimir la β -oxidació, disminuir la secreció d'adiponectina i promoure la fibrosi i la producció de citocines proinflamatòries i de quimiocines al si dels dipòsits adipocitaris²⁹⁶⁻²⁹⁸. La **fibrosi** és, de fet, un altre element clau en la determinació de l'estat del dipòsit adipós. Si la matriu extracel·lular del mateix és massa compacta, la capacitat d'expansió del dipòsit (tant per hipertrofia dels adipòcits existents com per hiperplàsia de nous) queda molt limitada, activant-s'hi així mecanismes d'estrès i inflamació. Per aquest motiu, els adipòcits disposen de mecanismes de remodelació de la mateixa: Canviant la composició de la matriu (per exemple, per inducció o repressió de l'expressió de certes formes de col·lagen), els adipòcits són capaços d'expandir-se sense suscitar l'aparició d'aquesta hipòxia i mecanismes d'estrès, fins a l'assoliment de la màxima capacitat del dipòsit, quelcom que no poden aconseguir en condicions d'expansió excessiva i ràpida^{299,300}.

L'estrès al que està sotmès el TAB obès conduirà, com hem vist, a un increment en la secreció de citocines proinflamatòries per part del mateix. En condicions normals, la insulina és capaç d'interactuar amb els seus receptors de tipus tirosina cinasa, els quals fosforilaran el substrat del receptor d'insulina 1 (**IRS-1**), el qual prosseguirà la transducció de senyals que conduiran a la resposta a aquesta hormona. Actuant a través dels seus receptors, però, les citocines proinflamatòries són capaces d'inhibir aquesta via de senyalització de la insulina. Alguns d'aquests receptors, com el de TNF α o el de IL-1, són capaços d'activar **JNK**, la qual

podrà dur a terme dues accions que contribuiran a la generació de resistència a la insulina: fosforilar l'IRS-1 en posicions desactivadores i activar c-jun i c-fos, generant en conseqüència l'aparició del factor de transcripció **AP-1** (proteïna activadora 1), el qual està implicat en l'expressió de gens proinflamatoris. Aquestes citocines proinflamatòries, a més, poden activar també la via de l'IKK β , la qual conduirà a l'activació del factor nuclear kappa-B (**NF- κ B**), el qual és també capaç d'induir l'expressió de gens inflamatoris^{292,301} (**Fig. 15b**).

Tot i que aquestes vies convergeixen, efectivament, en un increment en la secreció de citocines proinflamatòries per part de l'adipòcit i a una situació de resistència a la insulina, la identitat del mecanisme primordial que inicia aquesta cascada de retroalimentació positiva proinflamatòria ha estat àmpliament debatuda i probablement sigui de tipus multifactorial, però relacionada amb fenòmens de lipotoxicitat. Els àcids grassos saturats són alliberats pels adipòcits en situacions d'excés de reserves a causa d'un increment en la lipòlisi. Aquests, estructuralment similars al LPS bacterià, serien capaços d'**activar els TLR2 i 4**, presents als adipòcits i induir al seu torn aquestes vies proinflamatòries^{302,303} (**Fig. 15b**). S'ha descrit que, a més, el TLR4 es pot activar a causa de desequilibris en la microbiota intestinal en situacions d'obesitat, que provocarien la translocació d'antígens bacterians fins al teixit adipós, els quals exercirien una senyalització directa sobre aquest receptor³⁰⁴. L'acumulació de lípids que excedeixen la capacitat d'emmagatzematge i es filtren al citoplasma dels adipòcits, d'altra banda, seria també capaç de d'activar en excés la NADPH oxidasa i incrementar la producció de ROS, tot conduint a una situació d'**estrès oxidatiu** capaç d'activar les vies proinflamatòries^{305,306}. Aquesta acumulació també seria responsable de l'aparició de fenòmens d'**estrès del RE**, un altre mecanisme capaç d'activar aquestes vies^{307,308}. Finalment, es postula, com s'ha mencionat abans, la inducció de HIF-1 α en una situació d'**hipòxia** com un altre agent activador d'aquesta inflamació²⁹⁶ (**Fig. 15b**). Aquests mecanismes, a més de generar respostes *per se*, acabarien provocant la mort dels adipòcits per necrosi, alliberant els lípids que contenen a l'espai extracel·lular i perpetuant el microambient proinflamatori³⁰⁹.

Si bé aquestes alteracions estan essencialment vinculades a la hipertròfia del teixit, s'ha pogut comprovar que els fenòmens d'hiperplàsia que tenen lloc durant l'aparició de l'obesitat també poden resultar perjudicials a nivell tissular. En les etapes inicials de l'adipogènesi es dona, com s'ha tractat anteriorment, una proliferació de cèl·lules precursors. Resulta interessant, doncs, que en biòpsies de TAB subcutani d'individus obesos s'hagi pogut detectar un **escurçament dels telòmers**, especialment en aquells que van desenvolupar l'obesitat durant la infantesa i l'adolescència –èpoques de màxim recanvi de precursors–, en comparació amb individus primos. L'escurçament tenia lloc fins i tot en aquells casos en què els individus havien estat prèviament obesos i en el moment de l'estudi mostraven normopès. Aquesta disminució en el nombre de repeticions telomèriques, a conseqüència d'una excessiva proliferació dels precursors durant els processos d'hiperplàsia adiposa, és un marcador de senescència cel·lular i reflecteix un esgotament de mecanismes de replicació tissular que, al seu torn, contribuirà a generar situacions d'estrès oxidatiu³¹⁰.

Convé destacar que l'activació d'aquestes vies de senyalització proinflamatòries i del seu manteniment crònic en situacions d'obesitat amb resistència a la insulina, de fet, no tindrà lloc només als adipòcits i altres tipus cel·lulars perifèrics: les cèl·lules immunitàries infiltrades també podran activar-les al seu torn i exacerbar la resposta en augmentar el seu nombre al teixit en aquestes situacions, com veurem tot seguit.

4.3. Infiltració immunitària al teixit adipós

Diversos tipus cel·lulars del sistema immunitari es troben infiltrats de forma normal al teixit adipós, com a la major part d'altres òrgans. No obstant, en situacions d'obesitat, es produeixen destacables canvis numèrics, funcionals i relatius en les diferents poblacions que contribuiran a l'aparició de la resistència a la insulina (**Fig. 16**). A continuació detallarem la presència d'aquests tipus cel·lulars al teixit adipós sa i en condicions d'obesitat.

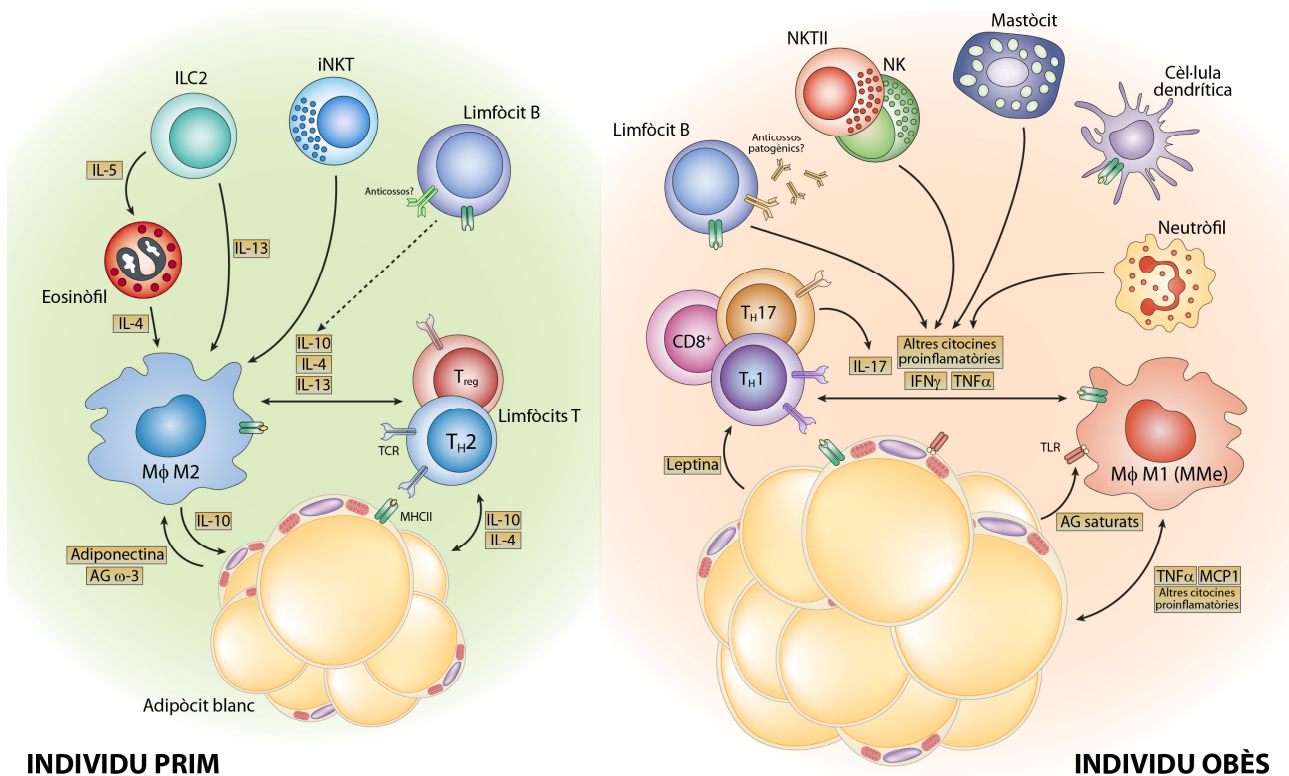


Figura 16: Canvis en la població de cèl·lules immunitàries residents al TAB en individus primers (esquerra) i obesos (dreta). Consultar el text per les abreviatures. Adaptada de Ref. 338.

4.3.1. Cèl·lules de la immunitat innata al teixit adipós

4.3.1.1. Macròfags M1 i M2

D'entre les cèl·lules immunitàries infiltrades al teixit adipós, els macròfags en són les numèricament i funcionalment dominants. Mentre que en ratolins primers el 5-15% de les cèl·lules del TAB expressen el marcador de macròfags F4/80, en animals obesos aquest percentatge augmenta fins el 45-60% del total de cèl·lules del teixit³¹¹. No obstant, el nombre de macròfags no és l'únic que canvia durant l'obesitat, sinó també el seu estat d'activació i la seva localització. Mentre que en individus primers els pocs macròfags infiltrats estan activats alternativament i es distribueixen uniformement entre els adipòcits, en situacions d'obesitat passen a activar-se per la via clàssica i s'acumulen al voltant d'adipòcits necròtics i restes dels mateixos en forma de les anomenades **estructures en corona**^{295,312}. En les estructures en corona es poden trobar macròfags que expressen el marcador de cèl·lules dendrítiques CD11c, els quals fagociten les restes adipocitàries i els lípids alliberats i esdevenen cèl·lules multinucleades de gran mida i farcides de lípids³⁰⁹.

El reclutament de monòcits i la seva activació a macròfags M1 és un esdeveniment que té lloc durant les etapes inicials de la resistència a la insulina i coincideix amb l'aparició d'adipòcits necròtics³¹³. Una de les citocines que els adipòcits són capaces de produir és, com hem vist, la quimiocina **MCP-1**, la qual es troba sobreexpressada en situacions d'obesitat i dieta alta en greixos³¹⁴. Els animals KO per a aquesta quimiocina o per al seu receptor, CCR2, estan parcialment protegits contra aquesta inflamació associada a l'obesitat i contra la resistència a la insulina³¹⁵. Aquests fets suggereixen que MCP-1 seria responsable de l'atracció de monòcits i macròfags proinflamatoris al dipòsit adipocitari, que en un microambient inflamatori s'activarien al fenotip M1²⁸⁹. No obstant, la disrupció d'aquest sistema no protegeix completament de la infiltració de macròfags M1^{316,317}, de manera que existirien altres quimiocines produïdes pel teixit adipós en situacions d'estrès metabòlic que serien capaces d'atreure'n, sigui a través de CCR2 o d'altres receptors de quimiocines.

Els senyals capaços d'activar clàssicament els macròfags atrets són equivalents als que provoquen l'activació de mecanismes inflamatoris als adipòcits. Els macròfags també disposen de receptors per a un ampli nombre de citocines proinflamatòries, així com els TLR2 i 4, essent així capaços d'activar les vies de JNK i NF- κ B i, en conseqüència, els programes transcripcionals propis del fenotip M1. D'altra banda, l'atracció preferencial de monòcits amb un potencial inflamatori superior, com ara els CCR2⁺ atrets per MCP-1, o osteopontina⁺, una proteïna de la seva matriu extracel·lular que sensibilitza l'acció d'aquesta quimiocina²⁸⁹, també contribuiria a la presència augmentada de macròfags M1 al teixit adipós obès. Els macròfags, a més, seran capaços d'activar el seu **inflamàsoma**, un mecanisme de resposta a patògens, i accelerar la seva producció de mediadors proinflamatoris³¹⁸.

Molt recentment s'ha postulat que aquests macròfags presents al TAB obès, tot i ésser efectivament inflamatoris, no pertanyen a un fenotip purament M1 com el definit prèviament. Per aquest motiu, s'ha designat aquestes cèl·lules com a **macròfags activats metabòlicament** o de tipus **MMe (Fig. 15b)**. Els estímuls que induirien aquesta activació, com ara el palmitat, serien capaços d'interactuar alhora amb els TLR2 i 4 i d'activar PPAR γ i p62. Aquestes proteïnes atenuarien la inducció de NF- κ B (i, per tant, l'expressió de gens característics del fenotip M1) i promourien un fenotip adaptat a l'oxidació de lípids més propi dels macròfags M2, si bé resta per determinar l'existència de marcadors i funcions propis³¹⁹. Aquestes observacions, de fet, ja s'havien identificat amb anterioritat: En un model de ratolí lipodistròfic per sobreexpressió de SREBP-1c, tot i presentar un increment en la infiltració de macròfags a tots els teixits adiposos, aquests presentaven un perfil de marcadors amb expressió de gens inflamatoris però intermedi entre M1 i M2 i diferent, al seu torn, al de ratolins obesos³²⁰. En conjunt, doncs, aquests estudis demostren que la via d'activació dels macròfags del teixit adipós *in vivo* presenta diferències respecte als models de polaritat definits *in vitro* en disposar aquests d'una elevada plasticitat adaptable a cada context particular, com s'ha comentat prèviament.

Els macròfags residents, tot i que han estat més estudiats en situacions de malalties del teixit adipós, estan també presents en individus sans. En aquest context, la producció d'IL-10 per part dels macròfags activats a un fenotip més similar a l'alternatiu o en estat de desactivació és capaç de potenciar la sensibilitat a la insulina als adipòcits i d'evitar l'aparició d'un fenotip inflamatori^{312,321}. Resulta d'interès destacar que, tant en macròfags murins com humans, els gens clau de la via alternativa estan controlats per PPAR γ , del qual l'arginasa 1 n'és diana directa, i per PPAR δ , entre altres factors de transcripció³²². És més, l'activitat de

PPAR γ és induïda als monòcits o als macròfags residents per acció de la IL-4 o la IL-13, i els confereix el fenotip oxidatiu induint els programes de la β -oxidació i de biogènesi mitocondrial. Diferents mecanismes, d'altra banda, poden actuar directament sobre els macròfags M2 per a reprimir l'activació de gens proinflamatoris, com és el cas dels àcids grassos insaturats omega-3 (interactuant amb el receptor GPR120) o el de l'adiponectina²⁸⁹.

4.3.1.2. Altres tipus cel·lulars de la immunitat innata

Tot i que el paper dels macròfags ha estat el més estudiat i el primer en ésser reconegut, actualment es té constància que l'estat metabòlic del teixit adipós és capaç de modificar la presència de pràcticament tots els altres tipus de cèl·lules immunitàries.

La presència de **neutròfils** als dipòsits adipocitaris és molt minsa en individus primis (<1%), però el seu nombre es duplica en situacions de dieta alta en greixos. Atrets per la IL-8 secretada pel teixit adipós obès, els neutròfils s'hi extravasarien i procedirien a produir mediadors inflamatoris, tot contribuint a l'estat inflamatori global³⁰⁹. Mentre que alguns autors afirmen que aquesta presència seria transitòria i després cedirien el seu lloc a cèl·lules de la immunitat adaptativa, altres afirmen que el paper dels mateixos es perllongaria en el temps, com en el cas dels macròfags M1^{323,324}. De manera similar, la presència de **cèl·lules NK** al TAB es triplica en condicions d'obesitat, i aquestes esdevenen més actives. La producció de lligands activadors de les cèl·lules NK per part dels adipòcits sotmesos als estímuls d'estrès propis de l'obesitat afavoreix la producció d'IFN γ i altres citocines proinflamatòries per part d'aquestes cèl·lules immunitàries, les quals contribuiran a la transició dels macròfags residents del fenotip M2 a l'M1/MMe³²⁵. El nombre de **mastòcits**, d'altra banda, també s'ha detectat incrementat en situacions d'obesitat tant en models animals com en humans, apareixent estretament vinculats a la vasculatura del teixit adipós i alliberant citocines com l'IFN γ ³²⁶. D'altra banda, s'ha demostrat l'aparició al TAB obès d'una subpoblació de cèl·lules CD11c⁺ i amb una baixa expressió de F4/80, tot suggerint la infiltració de **cèl·lules dendrítiques** veritables, essencialment absents en individus primis, la qual es produiria al marge dels macròfags amb característiques de cèl·lula dendrítica de les estructures en corona. Es creu que el seu paper tindria a veure amb la presentació antigènica i l'activació de la immunitat adquirida, com veurem posteriorment³²⁷.

El paper dels **eosinòfils** al teixit adipós és més complex i està rebent recentment una especial atenció. Aquestes cèl·lules són la font principal d'IL-4 als teixits adiposos –essent-ne els **basòfils** una font secundària– i la seva presència, a diferència de les cèl·lules inflamatòries, es correlaciona negativament amb l'adipositat. No resulta sorprenent, doncs, que en situacions d'eosinofília experimental, com ara infeccions helmíntiques, els animals d'experimentació mostressin una disminució en la massa adiposa i més sensibilitat a la insulina. Els eosinòfils, són per tant, els principals responsables d'orquestrar un microambient T_H2 al teixit adipós sa, i seran clau en l'activació dels macròfags per la via alternativa³²⁸. Al seu torn, la presència d'eosinòfils al teixit dependrà de la producció per part del mateix d'IL-5. Aquesta citocina s'ha pogut comprovar que, almenys al TAB visceral, és secretada per **ILC de tipus 2 (ILC2)**, juntament amb una dosi addicional d'IL-13³²⁹. Coherentment, l'abundància d'aquest tipus cel·lular es troba reduïda en situacions d'obesitat, tot contribuint a disminuir l'entorn T_H2 i afavorir la inflamació del TAB en aquesta condició patològica³³⁰. Les ILC2 s'activen i són reclutades en presència de IL-25 i IL-33²⁸⁸, però el principal tipus cel·lular productor i el nivell d'expressió d'aquestes citocines al teixit adipós sa i obès resta actualment

per elucidar, si bé indicis cada cop més establerts apunten als propis adipòcits i a les cèl·lules endotelials en el cas de la IL-33^{331,332}.

4.3.2. Cèl·lules de la immunitat adquirida al teixit adipós

Una resposta immunitària innata perllongada acaba per activar la resposta adquirida, i l'estat inflamatori crònic que té lloc al teixit adipós obès no n'és una excepció. L'activació de cèl·lules de la immunitat adquirida al teixit adipós s'iniciarà a partir de la presentació d'antígens a les mateixes (**Fig. 15c**). Les cèl·lules dendrítiques, els macròfags CD11c⁺ i altres cèl·lules amb activitat fagocítica que hagin incorporat aquests antígens resultants de la mort dels adipòcits serien capaços de presentar-los a través del MHCII i al MHCI als limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺, respectivament, tot iniciant les cascades de diferenciació i de producció de citocines específiques de cada cas³⁰⁹. Cal destacar que el TCR dels limfòcits T residents al teixit adipós, especialment obès, presenta una variabilitat molt limitada, fet que explicaria la seva eficient resposta a antígens molt concrets produïts pel mateix^{333,334}.

Al teixit adipós obès, els nombres absoluts de **limfòcits T CD4⁺** augmenta, i aquests es caracteritzen per una activa producció d'IFN γ . Com era d'esperar, aquests esdevenen limfòcits T_{H1} i contribuiran a mantenir l'estat proinflamatori del teixit adipós –i, en conseqüència, també a l'organisme– tot produint encara més citocines inflamatòries de la resposta T_{H1} i activant els nous monòcits reclutats a macròfags M1. Els limfòcits T_{H17} també apareixen associats a obesitat i resistència a la insulina. Determinar les funcions de la IL-17 en aquest procés és complex donada la naturalesa pleiotròpica de la mateixa, però el paper d'aquest tipus cel·lular s'ha relacionat amb l'activitat inflamatòria i proangiogènica descrita en altres contextos, que en el cas del TAB contribuiria a l'expansió del mateix³³⁵. Tot i que els nombres absoluts de limfòcits T CD4⁺ al teixit adipós augmenten en situacions d'obesitat, la quantitat de limfòcits T_{H2} i T_{reg} disminueix. Els limfòcits T_{reg} es poden trobar en gran nombre al TAB visceral d'individus sans, i aquesta subpoblació en concret mostra una producció especialment elevada de la citocina antiinflamatòria IL-10. Els estímuls obesogènics, però, desmunten totalment aquesta resposta T_{reg}, eliminant la seva presència i contribuint així a exacerbar l'expansió de la resposta inflamatòria i de resistència a la insulina en condicions patològiques³³³.

S'ha demostrat recentment, de fet, que **els mateixos adipòcits podrien actuar com a cèl·lules presentadores d'antígens professionals** en situacions d'obesitat, quelcom que explicaria la presència de limfòcits T CD4⁺ als dipòsits adiposos en aquests casos abans que la de macròfags M1. L'expressió de gens del MHCII i de processament d'antígens es trobà incrementada en humans obesos i en ratolins sota una dieta alta en greixos, i als animals deficients per al MHCII la infiltració immunitària en aquestes condicions es trobà disminuïda. Emprant limfòcits T amb un TCR específic per a l'ovoalbúmina es va poder comprovar la seva activació al fenotip T_{H1} en tractar adipòcits amb aquesta proteïna, tot suggerint que els adipòcits són efectivament capaços de dur a terme aquesta presentació³³⁶. La naturalesa dels antígens que poden presentar els adipòcits, però, resta per elucidar. La generació de nous antígens al TAB obès per modificació posttraduccional d'algunes proteïnes és una de les possibles explicacions. Altres teories apunten als desequilibris en la microbiota intestinal, que provocaria que alguns dels seus antígens fossin sistemàticament presentats pels adipòcits. Tot i que s'han descrit activitats fagocítiques en adipòcits, la seva capacitat d'internalitzar i processar aquests antígens bacterians no ha estat encara caracteritzada^{337,338}.

Per la seva part, el nombre de **limfòcits T CD8⁺** també es troba incrementat en situacions d'obesitat. Aquests es troben ubicats a les estructures en corona juntament amb els macròfags CD11c⁺, quelcom que suggereix que són els principals encarregats d'activar-los tot presentant-hi antígens al MHC I. En models experimentals, coherentment, l'eliminació dels limfòcits T CD8⁺ millora la sensibilitat a la insulina, mentre que la seva addició l'empitjora³³⁹. Resulta d'interès que els limfòcits T CD8⁺ apareguin al teixit adipós obès abans que altres tipus cel·lulars, inclosos els macròfags M1, quelcom coherent amb una atracció d'aquests a partir de la contribució a la producció de citocines proinflamatòries i quimiocines per part dels limfòcits T CD4⁺ i dels adipòcits. Aquest fet suggereix que les cèl·lules de les estructures en corona podrien ser els macròfags ja presents al dipòsit sa que s'han activat a un fenotip proinflamatori, o que altres tipus cel·lulars podrien estar implicats en aquesta presentació (inclosos els mateixos adipòcits)^{309,339}.

Tant en humans com en ratolins, les **cèl·lules iNKT** presenten una residència de forma normal als dipòsits de TAB, especialment viscerals, esbiaixades cap al fenotip secretor de citocines T_H2. El seu nombre disminueix durant situacions d'obesitat, fet que té lloc abans de l'aparició tant dels macròfags M1 com dels limfòcits T CD8⁺³⁴⁰. Aquest fet, juntament amb l'expressió de CD1d i de tota la seva maquinària de càrrega per part dels adipòcits i els macròfags residents, suggereix que la seva desaparició tindria a veure amb la presentació de lípids no convencionals durant les situacions d'obesitat³⁴¹. En qualsevol cas, la reducció del nombre de cèl·lules NKT al dipòsit adipocitari es traduiria en una disminució de la producció de citocines T_H2 i de IL-2, una citocina implicada en la proliferació de limfòcits però requerida per al desenvolupament dels limfòcits T_{reg}. Les **cèl·lules NKTII** tindrien un paper oposat al de les iNKT, ja que pel que s'ha pogut comprovar en models animals contribuirien a l'augment de l'adipositat i la resistència a la insulina dels dipòsits viscerals. No obstant, la seva activitat en situacions obesogèniques és encara molt desconeguda³⁴². Globalment, doncs, això es traduirà un cop més en un increment de l'estat inflamatori tissular.

El paper dels **limfòcits B** en l'obesitat és, probablement, el menys estudiat de tots, ja que la seva presència als dipòsits adiposos és molt reduïda. En ratolins obesos, s'ha pogut detectar, però, una acumulació de limfòcits B³⁰⁹. Resulta destacable que la transferència d'immunoglobulines G (IgG) de ratolins diabètics a ratolins sans és capaç d'induir l'aparició de resistència a la insulina als darrers, quelcom que porta a pensar en l'existència de certes poblacions de limfòcits B capaces de, a més de presentar antígens a limfòcits T CD4⁺, produir anticossos patològics en la T2DM³⁴³, si bé és un camp controvertit que resta encara per explorar.

4.4. Infiltració immunitària al TAM: Rellevància en la termogènesi

La infiltració immunitària als dipòsits adiposos és un fet àmpliament reconegut en l'actualitat però sovint estudiat tan sols en el context del TAB, donada la seva rellevància en obesitat, T2DM i síndrome metabòlica. En el cas del TAM, però aquesta ha estat menys aprofundida, en part per la manca d'un interès biomèdic real fins al ressorgiment de la recerca sobre la biologia d'aquest teixit a causa de la seva presència en humans adults i potencial terapèutic, i en part pel fet d'ésser quantitativament menor que als dipòsits de TAB³²⁰.

Un inesperat descobriment en relació amb aquestes qüestions va tenir lloc el 2011: Als dipòsits de TAM clàssic es va veure que **els macròfags activats alternativament són capaços d'afavorir la termogènesi tot produint catecolamines**⁷¹. Després del reclutament i activació del TAM pel fred, es va poder detectar als seus macròfags residents un increment en l'expressió de marcadors del fenotip M2, com ara l'arginasa 1, CD206 (*Mrc1*) o CD301 (*Clec10a*), així com una coherent disminució en d'altres de proinflamatoris (iNOS, TNF α o MCP-1). Aquests macròfags M2 reclutats pel TAM disposen de tota la maquinària enzimàtica de síntesi de noradrenalina, inclosa la TH, l'expressió dels quals depenia de la presència d'IL-4 i d'IL-13 i de la temperatura, i efectivament eren capaços de sintetitzar-ne. Emprant diversos models de pèrdua de funció, van demostrar que la presència d'aquests macròfags era realment necessària per a un correcte desenvolupament de la resposta termogènica, incloent l'expressió d'UCP1 o de PGC-1 α . Addicionalment, al TAB estimulat per fred i, per tant, en situació de *browning*, s'hi va poder comprovar un reclutament anàleg d'aquest fenotip de macròfags i una afectació equivalent de la seva manca, tot oferint indicis de que les catecolamines produïdes pels macròfags M2 també són capaces d'induir la diferenciació dels precursors beix/brite o la seva transdiferenciació a partir d'adipòcits fenotípicament blancs per tal d'activar-hi una resposta termogènica i de consum energètic pròpia d'un adipòcit marró⁷¹. Tot i que és probable que el reclutament inicial de macròfags M2 cap als teixits adiposos en cas d'una necessitat de generar escalfor tingui lloc per acció de quimiocines capaces d'atreure monòcits circulants, estudis molt recents han demostrat que els adipòcits beix/brite poden incrementar la seva producció d'adiponectina en presència d'estímuls termogènics, la qual seria capaç d'estimular la proliferació *de novo* dels macròfags M2. D'aquesta manera, es garantiria la presència d'aquestes cèl·lules immunitàries al si del dipòsit adipós en procés de *browning* durant temps perllongats per tal realitzar una resposta termogènica duradora³⁴⁴.

Recentment, dos grups van explorar més a fons aquestes qüestions i van descobrir de forma independent que en models animals els **eosinòfils**, els quals, com hem esmentat, són al teixit adipós la principal font generadora d'una activació alternativa dels macròfags, són un component clau en la **resposta termogènica dels adipòcits beix/brite**^{345,346}. Dos estudis independents van oferir les pistes per a explicar aquests fets. El primer estudi va descobrir la importància dels eosinòfils durant el *browning* tot cercant noves miocines (citocines musculars), quelcom que els va dur fins a l'**hormona similar a la meteorina (METRNL, meteorin-like)**. Als adipòcits, aquesta proteïna és secretada per acció del fred, i la seva sobreexpressió era capaç d'induir la de gens termogènics i, paradoxalment, la de citocines de tipus T_H2. Aquests efectes no es duïen a terme per una interacció directa amb els adipòcits marrons o amb els macròfags M2, sinó amb els eosinòfils residents: La població d'aquest tipus cel·lular es va trobar incrementada en sobreexpressar METRNL, quelcom que suggereix l'activació de la síntesi de quimiocines pròpies de l'atracció d'eosinòfils per part dels adipòcits³⁴⁶. Com indica el segon estudi, l'eosinofília als dipòsits de TAB condueix a un increment en la IL-4 i IL-13, en els macròfags M2 i en la producció local de noradrenalina i, per tant, en el seu *browning*. Cada element requerit (les citocines, els eosinòfils o els mecanismes de transducció de senyals) són necessaris per al procés de *browning*, però la seva manca afectà en poca mesura el TAM clàssic³⁴⁵.

La interessant dansa entre les cèl·lules immunitàries i els adipòcits marrons està, no obstant, lluny d'acabar: Molt recentment, dues publicacions han explorat en profunditat aquest fenomen tot escalant un nivell en la cascada de comunicació cel·lular. A les mateixes

es conclou que són, de fet, les **ILC2** qui realment juga un rol crític en tot el procés. El seu paper no seria únicament el d'activar i reclutar eosinòfils i, per tant, afavorir l'activació alternativa dels macròfags M2, sinó que també serien capaces promoure la determinació al llinatge beix/brite de cèl·lules precursors PDGFR α ⁺ per accions directes de la IL-4 i de la IL-13 sobre les mateixes. Addicionalment, es constata que les accions de la IL-33 (i, per tant, del reclutament i activació d'ILC2) produïda pels mateixos adipòcits beix/brite serien crítiques en aquest procés, donat que els animals deficients per al gen d'aquesta citocina mostren una tendència a l'obesitat i una menor capacitat de *browning* dels seus depòsits de TAB juntament amb una menor infiltració d'ILC2. D'altra banda, uns pèptids secretats per aquestes cèl·lules limfoides, les **metionina-encefalines**, serien al seu torn capaços de promoure la transdiferenciació dels adipòcits beix/brite al fenotip termogènic^{330,347}.

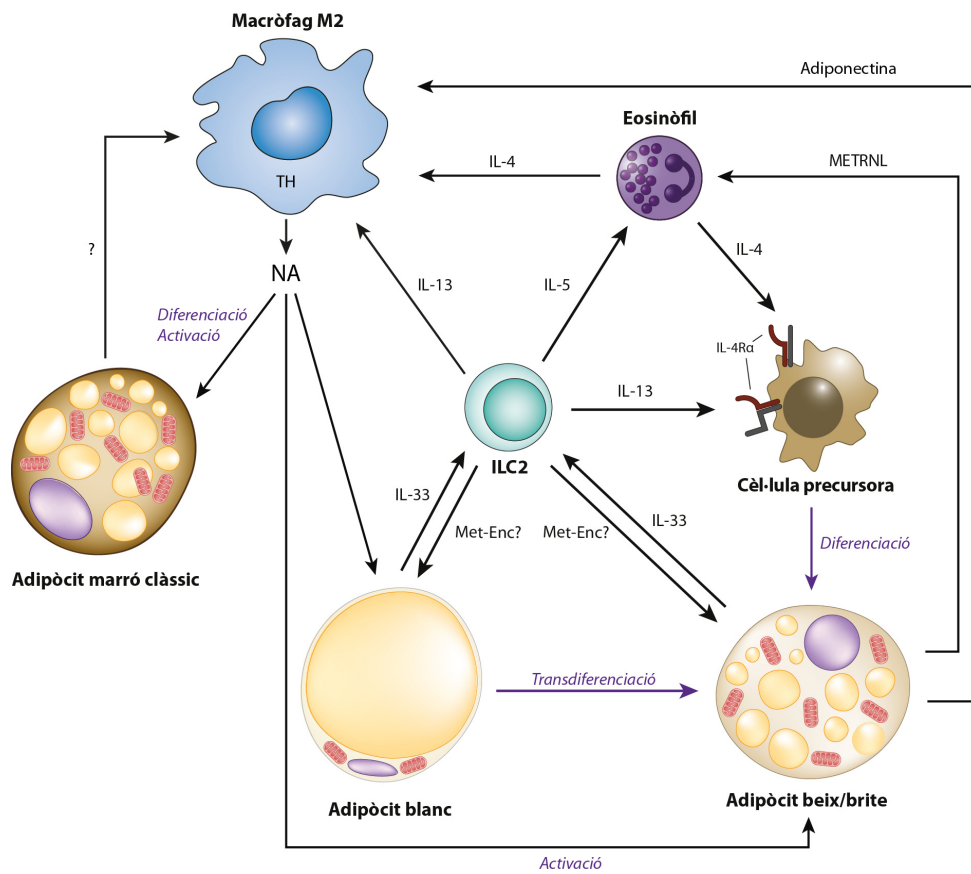


Figura 17: Resum de les principals interaccions entre cèl·lules immunitàries i adipòcits al TAM i TAB sotmès a un procés de *browning*. Met-Enc: Metionina-encefalines. IL-4R α : Cadena alfa del receptor d'IL-4. Adaptat de Ref. 347.

Els agents efectors de la resposta T_H2 i la interacció immunitària-adiposa són, en resum, un important mecanisme de control de la termogènesi paral·lel al del sistema nerviós no únicament al TAM clàssic, sinó també a l'induïble (**Fig. 17**). Aquest paper, tot i que clau en ambdós casos, seria especialment crític en la inducció del *browning* dels dipòsits de TAB en estar aquests menys innervats que els de TAM clàssic, al si dels quals l'aportació de noradrenalina dels terminals nerviosos simpàtics podria suplir una manca en la producció immunitària^{345,348}. El descobriment d'aquesta afectació dels adipòcits beix/brite obre les portes a l'elaboració d'estratègies d'immunomodulació per tal d'activar el *browning* per vies independents a la central i, així, les del seu potencial terapèutic en humans.

4.5. Funció biològica de la infiltració immunitària al teixit adipós

Si bé la interconnexió entre la resposta immunitària el metabolisme ha estat estudiada àmpliament a causa de la seva relació amb l'obesitat i les complicacions metabòliques associades, el fet que la relació causal entre inflamació i resistència a la insulina estigui conservada evolutivament fins als humans porta a pensar que existeix alguna mena de funció biològica per a aquesta connexió. Diversos autors han proposat que la resposta metabòlica a la inflamació no és sinó un mecanisme adaptatiu per a combatre de forma més efectiva les intrusions patogèniques.

En una infecció bacteriana o viral, les cèl·lules immunitàries empren elevats nivells de glucosa un cop activades a un fenotip inflamatori. La glicòlisi aeròbica és un requeriment indispensable per a l'expansió clonal i els esclats respiratoris. La NADPH oxidasa d'aquestes cèl·lules permetrà la producció de ROS, on el NADPH necessari provindrà de glucosa que ha passat a la via de les pentoses fosfat. Al seu torn, aquesta via servirà per a generar pentoses com ara la ribosa, la qual serà essencial per a la síntesi de DNA i RNA durant l'expansió clonal^{349,350}. Així doncs, la principal font bioenergètica d'una resposta immunitària T_H1 serà la glucosa. En aquestes circumstàncies, resulta favorable la generació transitòria d'una resistència perifèrica a la insulina, ja que aquest fet afavoreix la disponibilitat de glucosa per a les cèl·lules del sistema immunitari i provoca la mobilització de les reserves de l'organisme, que podran ésser emprada per les mateixes pel mateix motiu, prioritzant l'eradicació de la infecció per a garantir la supervivència de l'organisme²⁸⁹. Per la seva part, una intrusió de paràsits extracel·lulars requereix una resposta immunitària diferent, perllongada i de desgast: La resposta T_H2 que suscita aquest tipus d'insult afavoreix la sensibilitat a la insulina i la captació de glucosa per part dels teixits perifèrics. Aquest fet tindria, doncs, una doble funció: En primer lloc, garantir la disponibilitat de nutrients per a l'hoste mentre dura la infecció i, en segon lloc, privar el paràsit de nutrients disponibles, tot contribuint a limitar el seu creixement^{289,328}.

Finalment, resulta d'interès destacar que la relació entre les cèl·lules immunitàries i els adipòcits podria tenir un paper encara més directe. Com hem pogut veure, en el cas del TAM el paper de les cèl·lules immunitàries és instrumental per a la seva funció termogènica. D'altra banda, estudis recents posen de manifest el requeriment de processos inflamatoris aguts per a una correcta expansió dels dipòsits de TAB. A través de l'ús de tres models animals diferents deficitaris per a la producció de respostes inflamatòries a nivell de teixit adipós, es va poder comprovar que, paradoxalment, els animals que no les podien generar mostraven un increment en l'obesitat induïda per la dieta i una disminució de la capacitat de *browning* respecte a aquells que sí. D'aquesta manera, es va concloure que una resposta inflamatòria aguda per part del dipòsit de TAB és, de fet, un mecanisme adaptatiu necessari per a una correcta expansió del mateix durant els estadis inicials d'acumulació de noves reserves³⁵¹. Aquestes observacions, de fet, no es contradiuen amb els coneixements previs, indicant que la inflamació crònica, però no l'aguda, seria la causant de les complicacions metabòliques de l'obesitat àmpliament discutits i posa de manifest, un cop més, que la relació entre teixit adipós i sistema immunitari és més important a nivell fisiològic del que es creia inicialment.

5. Lipodistròfies

5.1. Malalties del teixit adipós

Com s'ha anat discutint, l'**obesitat** i les seves comorbiditats són les afeccions més comunes del teixit adipós, representant un greu risc per a la salut humana. L'obesitat es defineix clàssicament com una situació d'acumulació patològica de greix en la qual el pacient presenta un BMI superior a 30 kg·m⁻². El principal agent causant de la mateixa és el ja esmentat desequilibri energètic positiu afavorit per dietes calòricament elevades i estils de vida sedentaris. No obstant, si bé poc freqüents, existeixen també formes d'obesitat que tenen com a origen causes genètiques. La deficiència del gen de la leptina o del seu receptor, per exemple, són les formes d'obesitat genètica més conegudes, però també s'han descrit altres variants causades per mutacions monogèniques i poligèniques diverses que condueixen a un fenotip obès³⁵².

Mentre que l'obesitat es manifesta com els fenòmens ja discutits d'hipertròfia i hiperplàsia generalitzada del teixit adipós, una sobreproliferació anòmala però localitzada d'adipòcits o de precursors adipocitaris pot originar **tumors del teixit adipós**. La forma més comuna en són els **lipomes**, que afecten un 1% de la població mundial i solen aparèixer de forma espontània principalment al TAB subcutani. Els lipomes són tumors benignes, mòbils, flonjos i normalment encapsulats per teixit connectiu. Tot i ésser en general asimptomàtics, la seva eliminació per escissió és senzilla i curativa, i es recomana especialment en aquelles situacions en què el lipoma està provocant dolor en pressionar algun nervi o a les quals resulta estèticament desfavorable³⁵³. Tot i que normalment són lesions solitàries, la **lipomatosi simètrica múltiple (malaltia de Madelung)** es caracteritza per la presència d'un nombre discret de lipomes no encapsulats, especialment al voltant de la cara, el coll i el clatell. L'etiologia d'aquesta malaltia ha estat poc estudiada, però s'ha reportat un excés d'estimulació noradrenèrgica a aquestes regions, quelcom que es tradueix en un excés d'AMPC intracel·lular i, coherentment, en l'aparició d'adipòcits marrons a aquests lipomes³⁵⁴. D'altra banda, una forma de tumor maligne de teixit adipós es el **liposarcoma**, que afecta zones més profundes del teixit tou i pot sorgir tant al TAB subcutani com al visceral. En funció de l'estat de diferenciació dels adipòcits que els componen, els liposarcomes es classifiquen en un espectre que va de l'estat completament diferenciat al totalment desdiferenciat, essent la taxa d'agressivitat i metastasi més elevada en aquests darrers³⁵⁵. Finalment, en humans poden donar-se casos d'**hibernomes**, que, com ja s'ha mencionat prèviament, són infreqüents tumors de TAM. Resulta interessant destacar que els llocs principals de detecció d'hibernomes són àrees actualment confirmades com a susceptibles de passar per processos de *browning*, com ara les regions interescapular, cervical, pectoral i retroperitoneal. Aquests tumors, com els lipomes, són benignes, encapsulats i asimptomàtics, si bé, a diferència d'aquests, estan formats per una barreja d'adipòcits majoritàriament marrons amb presència d'alguns de blancs^{15,352}.

La manca de teixit adipós resulta, paradoxalment, tan perniciosa com el seu excés: Una situació d'adipositat insuficient genera també greus alteracions metabòliques i complicacions cardiovasculars als individus que la pateixen. A més del dejuni perllongat, diverses malalties condueixen a una reducció patològica de la massa de teixit adipós. Aquest és el cas de l'anorèxia nerviosa o de la caquèxia associada a determinades malalties, especialment a

algunes formes de càncer³⁵². En aquests casos, però, la manca de greix és més aviat una conseqüència de les causes principals de la malaltia i no l'origen en si. Existeixen, no obstant, altres afeccions en què la desaparició del teixit adipós n'és el fenotip principal que acaba generant una simptomatologia determinada. Aquestes malalties es coneixen en conjunt com a **lipodistròfies**, i poden aparèixer per causes genètiques o adquirides³⁵⁶. L'estudi dels mecanismes fisiopatològics subjacents a aquests desordres ha permès, al seu torn, descobrir punts clau de la biologia del teixit adipós en humans, tot aportant coneixements aplicables a combatre l'obesitat i la T2DM, tot posant de manifest que l'excés i la manca de teixit adipós no són sinó dues cares de la mateixa moneda.

5.2. Generalitats de les lipodistròfies

Les lipodistròfies representen un grup de malalties heterogènies caracteritzades per una pèrdua total o parcial del teixit adipós. A la literatura mèdica es té constància de l'existència d'aquests desordres des de fa més de cent anys, si bé també se n'han anat descobrint nous tipus durant les darreres dècades³⁵⁶.

La ubicació de les regions a les quals es perd massa adiposa i la magnitud d'aquesta pèrdua varia enormement entre lipodistròfies, però en la major part de casos aquestes malalties estan associades a greus alteracions metabòliques, com ara resistència a la insulina, intolerància a la glucosa i dislipidèmia³⁵⁷. La severitat del fenotip, de fet, es correlaciona amb la quantitat de greix absent. D'aquesta manera, les **lipodistròfies generalitzades**, que impliquen una pèrdua de greix a pràcticament tot el cos, seran les formes més greus. Les **lipodistròfies parcials**, d'altra banda, impliquen la pèrdua de greix (lipoatròfia) a algunes parts tals com les extremitats, i sovint es correlacionen amb una acumulació a altres regions (lipohipertròfia). Finalment, les formes més lleus seran les **lipodistròfies localitzades**, que impliquen la pèrdua de teixit adipós únicament en zones discretes i definides³⁵⁶.

A més de segons la magnitud de la pèrdua, les lipodistròfies també es poden classificar tenint en compte el seu origen. Així doncs, les **lipodistròfies d'origen genètic** en seran formes hereditàries, causades per mutacions gèniques, mentre que les **lipodistròfies adquirides** apareixeran a causa de factors diversos, com ara autoimmunitaris o farmacològics³⁵⁷. De manera general, però, els problemes comuns entre les diverses formes de lipodistròfia són la incapacitat d'emmagatzemar TG dins de les vesícules lipídiques o la impossibilitat de disposar d'adipòcits correctament diferenciats, quelcom que es tradueix en l'aparició de fenòmens de lipotoxicitat i que condueix a un increment en l'estrès oxidatiu i a una disfunció mitocondrial i general dels mateixos³⁵⁷. La **taula IV** inclou una relació dels principals tipus de lipodistròfies i dels seus mecanismes etiopatològics, com es tractarà posteriorment.

Tot i que el teixit adipós és el principal afectat per les lipodistròfies, altres òrgans poden rebre'n també les conseqüències. En els casos de les lipodistròfies d'origen genètic, per exemple, la disrupció generalitzada del gen en qüestió pot afectar a altres possibles llocs d'expressió rellevant. En tots els casos, l'acumulació ectòpica de lípids al fetge, múscul o pàncrees suposa un problema metabòlic addicional que al seu torn resulta coherent amb una severitat més pronunciada de les lipodistròfies generalitzades respecte les parcials, en què altres dipòsits intenten compensar el dèficit d'emmagatzematge de lípids de les regions

lipoatròfiques³⁵⁷. Addicionalment, en disposar d'una menor massa de teixit adipós, els pacients amb certes formes de lipodistròfia mostren, com detallarem posteriorment, alteracions en els nivells d'adipocines circulants que afectaran a l'estat metabòlic global. A més d'aquestes complicacions metabòliques, les lipodistròfies sovint provoquen un fenotip estèticament desfavorable i poden arribar a dificultar activitats de la vida quotidiana dels individus que les pateixen.

Lipodistròfia	Distribució	Gen afectat/ agents causals	Bases moleculars alterades
Lipodistròfies d'origen genètic			
<i>Herència autosòmica recessiva</i>			
CGL1/BSCL1	Generalitzada	<i>AGPAT2</i>	Síntesi d'àcid fosfatídic i, conseqüentment, lipogènesi.
CGL2/BSCL2	Generalitzada	<i>BSCL2</i>	Fusió de vesícules lipídiques, diferenciació adipocitària.
CGL3/BSCL3	Generalitzada	<i>CAV1</i>	Translocació d'àcids grassos a les vesícules lipídiques via caveoles.
CGL4/BSCL4	Generalitzada	<i>PTRF</i>	Biogènesi de les caveoles, control de l'expressió de les caveolines.
FPLD	Parcial	<i>CIDEA</i>	Inhibició de la lipòlisi, fusió de vesícules lipídiques.
MAD-A	Parcial	<i>LMNA</i>	Veure FPLD2.
<i>Herència autosòmica dominant</i>			
FPLD1 (Köbberling)	Parcial	?	Desconegudes.
FPLD2 (Dunnigan)	Parcial	<i>LMNA</i>	Estabilitat de les làmines nuclears, accés al DNA per part de factors de transcripció, mort cel·lular prematura.
FPLD3	Parcial	<i>PPARG</i>	Adipogènesi.
FPLD4	Parcial	<i>AKT2</i>	Transducció de senyals des del receptor de la insulina, adipogènesi.
FPLD5	Parcial	<i>PLIN1</i>	Estructura de les vesícules lipídiques, control de l'accés de lipases i, per tant, de la lipòlisi.
MAD-B	Generalitzada	<i>ZMPSTE24</i>	Processament post-traduccionall de la prelamina A per a formar les lamines A i C.
Lipodistròfies adquirides			
HALS	Parcial	PI NRTIs/NNRTIs VIH-1	Factors de transcripció adipogènics, funció mitocondrial, inflamació, processament de lamines, infecció dels adipòcits.
APL: Síndrome de Barraquer-Simons	Parcial	Autoimmunitat Idiopàtics	Sistema del complement, presència d'autoanticossos.
AGL: Síndrome de Lawrence	Generalitzada	Autoimmunitat Idiopàtics	Regulació immunitària.
Lipodistròfies localitzades	Localitzada	Fàrmacs Pressió Força centrífuga Idiopàtics	Múltiples.

Taula IV: Classificació de les principals lipodistròfies segons els seus orígens, herències i causes. Consultar al text o a la taula corresponent les diverses abreviatures. Adaptada a partir de les Refs. 342 i 343.

No obstant, el tractament clínic d'aquestes malalties suposa un repte tan complex com el tractament de l'obesitat. Una de les principals característiques d'aquestes malalties que dificulten la seva curació és el fet que el teixit adipós perdut no es pot recuperar fàcilment. D'aquesta manera, sovint es recorre a la cirurgia estètica per tal de reomplir les regions lipoatròfiques amb transplantaments autòlegs de les regions lipohipertròfiques, si és

possible, o amb implants de polímers sintètics (per exemple, d'àcid polilàctic). En els casos de lipohipertròfia, l'eliminació de la mateixa és anàloga a l'extirpació de teixit adipós en situacions d'obesitat (usualment liposucció)³⁵⁶. Als pacients amb lipodistròfia se'ls aconsella el consum de dietes amb un alt contingut en carbohidrats i baix en greixos, així com suplementes dietètics d'oli de peix i la realització d'activitat física aeròbica per tal d'atenuar la resistència a la insulina i la hipertrigliceridèmia. Per tal de millorar aquest darrer paràmetre, el tractament amb fibrats i estatines és l'opció més emprada. En aquells casos en què els pacients acaben desenvolupant diabetis, els tractaments amb metformina i amb insulina són les opcions més viables, ja que les TZDs poden acabar provocant l'acumulació de greix en les zones lipohipertròfiques³⁵⁸ i, a més, en el cas dels pacients que no disposen de PPAR γ aquesta teràpia seria fútil. Els tractaments subcutanis amb formes derivades de la leptina estan demostrant ésser també útils, si bé encara resten per ser aprovats³⁵⁹⁻³⁶¹. Finalment, determinades lipodistròfies en què la causa és més definida –com ara un tractament farmacològic determinat-, l'eliminació de l'agent causal també suposa sovint una millora moderada de la seva simptomatologia³⁵⁶.

5.3. Lipodistròfies d'origen genètic

Les lipodistròfies d'origen genètic són malalties poc freqüents -amb una incidència estimada d'un cas per milió d'habitants- caracteritzades per una lipoatròfia generalitzada o parcial, produint-se en aquest darrer cas essencialment una pèrdua a les extremitats i a la zona glútia i un guany a la regió superior del cos, a la regió craniofacial o al TAB visceral³⁵⁶. Els avenços recents en genètica i biologia molecular han permès identificar en molts casos el gen defectiu, la major part dels quals estan relacionats amb processos clau de la biologia i funció dels adipòcits.

5.3.1. Lipodistròfia congènita generalitzada: Síndrome de Berardinelli-Seip

La **lipodistròfia congènita generalitzada (CGL o BSCL)** fou descrita inicialment per Berardinelli i Seip a mitjans del segle XX, i es caracteritza per una pèrdua pràcticament total del teixit adipós des del naixement, que es tradueix en una aparença muscular dels pacients (**Fig. 18A**). De les diverses lipodistròfies és, com hem mencionat abans, la més greu, i es correlaciona amb una alta prevalença de diabetis. Altres símptomes associats a la CGL són esteatosi hepàtica, hiperlipidèmia, cardiomiopatia hipertròfica i un cert grau de retard mental³⁵⁶.

Coherentment, els loci mutats en aquesta malaltia tenen a veure amb la maduració de les vesícules lipídiques, com s'indica a la **Fig. 4**. La forma més comuna, que afecta aproximadament el 50% de pacients, és la CGL1, provocada per mutacions a l'aciltransferasa AGPAT2³⁶², mentre que la resta de gens mutats representen formes més minoritàries (**Taula IV**). El fenotip més sever és no obstant el de la CGL2, ja que la proteïna defectiva en aquest cas, la **seipina**, té un paper clau en la formació i organització de les vesícules lipídiques durant les darreres fases de l'adipogènesi^{363,364} però també participaria en la mateixa, ja que la seva disminució redueix l'expressió de les C/EBP i de SREBP-1c i retarda la inducció de marcadors d'adipòcits madurs^{365,366}. D'aquesta manera, es redueix de manera directa la presència d'adipòcits diferenciats al teixit adipós i no tan sols la seva capacitat d'emmagatzemar lípids, per la qual cosa aquests pacients amb CGL2 són els únics que tampoc disposen de TAB de

suport mecànic³⁵⁶. A més, a nivell de sistema nerviós central, la seipina és un gen altament expressat que, en els casos de CGL2, hi genera processos d'estrès del RE en acumular-se'n intracel·lularment formes mal plegades, quelcom que explica els símptomes neurològics associats a la CGL2³⁶⁷.



Figura 18: Alteracions morfològiques en pacients amb diversos tipus de lipodistròfia. (A) CGL1, (B) FPLD2, (C) AGL, (D) APL i (E) HALS, amb detalls per a aquest darrer cas de la lipoatròfia facial (F), de la lipohipertròfia visceral (G) i dels lipomes de tipus "gep de búfal" (H). Consultar el text per a les abreviatures. Extreta de les Refs. 356 i 380.

5.3.2. Lipodistròfia parcial familiar

A la **lipodistròfia parcial familiar (FPLD)**, la pèrdua de greix es manifesta durant les etapes tardanes de infantesa i la pubertat, àdhuc més tard. A diferència de les CGL, les FPLD són malalties autosòmiques dominants, amb l'excepció d'una forma, que és recessiva. Aquests fets ja suggereixen que, en general, i pel fet de ser lipodistròfies parcials, les FPLD tindran una severitat menor que les CGL. Sovint, la cara, el coll i la zona intraabdominal conserven el seu teixit adipós, si bé s'hi acostuma a acumular en excés (**Fig. 18B**). Si aquesta redistribució de greix té lloc a la part superior del cos, els pacients solen presentar alteracions metabòliques, al contrari de si apareix a la part inferior. En general, les dones presentaran un fenotip més sever que els homes³⁵⁶.

Reflectint l'heterogeneïtat de les diverses formes de FPLD, en aquest cas els loci mutats tenen al seu torn funcions variades. Així, es tradueixen en alteracions en la biologia de les vesícules lipídiques (FPLD recessiva, per mutacions a CIDEA, i FPLD5, a la perilipina), en l'adipogènesi (FPLD3, a PPAR γ) o en la senyalització de la insulina (FPLD4, a la proteïna cinasa B)³⁵⁶. El locus mutat en la forma més comuna, la **FPLD2** o **de Dunnigan**, *LMNA*, no obstant, no presenta un enllaç evident amb el metabolisme ni amb la fisiologia del teixit adipós, per la qual cosa resulta d'interès analitzar-la en major profunditat.

El gen *LMNA* codifica la **prelamina A**, una proproteïna que originarà la **lamina A**, o bé, per fenòmens de processament alternatiu, un altre transcrit que podrà ser traduït a diverses isoformes de la **lamina C**³⁶⁸. La maduració de la prelamina A és un procés complex, que implica en primer lloc una farnesilació de la regió carboxil-terminal de la mateixa, seguida de diversos passos de proteòlisi per acció específica de la zinc metal·loproteïnasa STE-24 (**ZMPSTE24** o **FACE1**) que culminaran amb la generació d'una forma no farnesilada, madura i funcional de lamina A³⁶⁹. Les lamines A i C, juntament amb la lamina B (codificada de forma independent al gen *LMNB*), formaran en totes les cèl·lules nucleades un entramat de filaments intermedis coneguts com a **làmina nuclear**³⁶⁸. La funció d'aquesta estructura és conferir estabilitat mecànica al nucli, així com regular l'expressió gènica a través de la interacció, especialment per part de les lamines derivades de *LMNA*, amb proteïnes d'organització de la cromatina i diversos factors de transcripció³⁷⁰.

Les mutacions a *LMNA* originen diverses laminopaties, un ampli conjunt de malalties entre les que es troba la FPLD2. La mutació més comuna en aquest cas una substitució al 482è codó, que es troba a l'extrem carboxil-terminal de la lamina A i que està implicat en la unió de la mateixa al DNA i a factors de transcripció, entre els quals es troba SREBP-1c³⁷¹. En individus amb FPLD2, els nivells de mRNA d'aquest factor de transcripció es troben disminuïts al TAB, mentre que els de PPAR γ estan incrementats³⁵⁷. Donat que les lamines A/C interactuen amb SREBP-1c, s'ha postulat que un dels possibles mecanismes causals d'aquesta malaltia és una inhibició d'aquesta interacció a causa de les mutacions presents als individus amb FPLD2, quelcom que desregularia, doncs, l'adipogènesi i la lipogènesi i que conduiria en darrera instància al fenotip lipodistròfic³⁷².

5.3.3. Altres formes hereditàries de lipodistròfia

A més de les ja discutides, altres mutacions són també capaces d'originar síndromes lipodistròfics. La **displàsia mandibuloacral (MAD)** es caracteritza per una sèrie d'anormalitats esquelètiques, però també per manifestacions progeroides i lipodistròfia. Més concretament, els pacients amb MAD poden presentar una lipodistròfia parcial (**MAD-A**) o una de generalitzada (**MAD-B**)³⁵⁶. Els individus amb MAD-A presenten mutacions al gen *LMNA*, per la qual cosa es creu que els mecanismes moleculars subjacents a la lipodistròfia que pateixen serien anàlegs als de la FPLD2³⁷³. Els individus amb MAD-B, no obstant, mostren mutacions al gen *ZMPSTE24*, que codifica la proteasa encarregada de processar la prelamina A. La incapacitat de procedir amb la maduració de la lamina A condueix a una l'acumulació de prelamina A farnesilada, la qual resulta tòxica per a la cèl·lula. Això es tradueix en una senescència cel·lular accelerada, que, en el cas dels adipòcits, condueix a una situació de lipodistròfia en humans i en models animals^{374,375}.

Altres afeccions menys caracteritzades també es destaquen per presentar al seu quadre clínic formes clares de lipodistròfia. És el cas de certes malalties autoimmunitàries hereditàries, com ara les mutacions al gen *PSMB8*, que codifica per una subunitat de l'immunoproteasoma la qual, si és defectiva, provoca la presentació d'autoantígens adipocitaris al MHCI³⁷⁶. Diverses malalties de recent reconeixement el locus mutat de les quals encara roman per ser identificat (síndrome SHORT, síndrome MDP i altres síndromes progeroides)³⁵⁶ també es poden englobar en aquest conjunt de lipodistròfies congènites miscel·lànies.

5.4. Lipodistròfies adquirides

Amb una excepció, les lipodistròfies adquirides són també malalties poc freqüents, per la qual cosa l'estudi de les seves causes ha estat complicat. Com les lipodistròfies d'origen genètic, les lipodistròfies adquirides es poden classificar en generalitzades i parcials, si bé també es podria englobar com a tal la **lipodistròfia localitzada**. Aquesta forma, de major incidència que les seves contrapartides més severes, es manifesta com una pèrdua focalitzada de teixit adipós, normalment en forma d'un o més clots subcutanis. Entre les seves possibles causes figuren l'administració local de determinats fàrmacs, panniculitis (presència de nòduls inflamatoris al TAB subcutani), el manteniment d'una pressió a la zona concreta i altres causes sense definir (lipodistròfies idiopàtiques)³⁵⁶.

La **lipodistròfia adquirida generalitzada (AGL)** o **síndrome de Lawrence** sovint es manifesta durant la infantesa. Si bé en alguns pacients la pèrdua de greix és efectivament total, altres conserven el TAB visceral i el TAMO (**Fig. 18C**). En ésser una lipodistròfia generalitzada, els desordres metabòlics i la diabetis tenen una incidència més elevada en els seus afectats. Es creu que, almenys en certs casos, aquesta lipodistròfia podria tenir el seu origen en processos autoimmunitaris amb producció d'autoanticossos contra antígens específics del teixit adipós³⁷⁷ o una activació anòmla del sistema del complement³⁷⁸. Aquests processos es tradueixen, per tant, en un atac autoimmunitari als adipòcits, conduint, en qualsevol cas, a la seva destrucció i a una situació d'estrès inflamatori.

D'altra banda, la **lipodistròfia adquirida parcial (APL)** o **síndrome de Barraquer-Simons** presenta unes característiques reminiscents de les FPLD, si bé en la major part de pacients es produeix una pèrdua progressiva de teixit adipós de la part superior del cos, començant per la cara, i mantenint o hipertrofiant els dipòsits subcutanis inferiors (**Fig. 18D**). En aquests casos, els processos autoimmunitaris també podrien ser la causa principal, ja que molts pacients presenten en sèrum nivells baixos del factor 3 del complement (C3) i la presència d'un autoanticòs que bloqueja la degradació de la C3 convertasa, un enzim que limita aquest procés, quelcom que portaria al seu descontrol³⁷⁷.

D'entre totes les lipodistròfies, però, la forma més comuna es va identificar fa poc més de quinze anys³⁷⁹. A principis de la dècada dels anys 80 del segle XX es va reconèixer l'existència d'un tipus d'immunodeficiència de transmissió sexual, sanguínia i vertical. Aquesta malaltia rebé el nom de síndrome d'immunodeficiència adquirida (**sida**), i fou associada etiològicament a una infecció viral. L'agent causal fou anomenat virus de la immunodeficiència humana de tipus 1 (**VIH-1**). La infecció per aquest virus, fins i tot abans d'evolucionar a la sida, es correlacionà amb elevades taxes de mortalitat i morbiditat. Durant

els anys posteriors, però, la introducció de fàrmacs antiretrovirals va permetre controlar en gran mesura la infecció i millorar la qualitat de vida dels pacients, especialment un cop establert un règim de teràpia combinada conegut com a tractament antiretroviral d'alta activitat (**HAART**, *highly active antiretroviral therapy*)³⁸⁰. No obstant, durant la dècada dels 90 es va poder observar que en alguns pacients apareixia una síndrome amb pèrdua de greix en algunes regions i acumulació en d'altres. Aquest trastorn, que es va classificar efectivament com a una forma de lipodistròfia adquirida i parcial, rebé el nom de **lipodistròfia associada a la infecció per VIH-1 i al tractament HAART (HALS, HIV-1- and HAART-associated lipodystrophy syndrome)**³⁷⁹. A continuació discutirem en detall els mecanismes moleculars implicats en aquesta forma de lipodistròfia coneguts fins al moment.

5.5. Lipodistròfia associada a la infecció per VIH-1 i al tractament antiretroviral d'alta activitat

5.5.1. Infecció per VIH-1 i teràpia HAART

El VIH-1 pertany a la classe de virus de DNA/RNA anomenada retrovirus i, al seu torn, al subgrup conegut com a lentivirus. Els virions del VIH-1 estan formats per una envolta lipídica, una càpside proteica i el seu material genètic, que tan sols codifica per nou proteïnes que li permetran dur a terme tot el seu cicle replicatiu. Com tots els virus, el VIH-1 només es podrà replicar a l'interior cel·lular tot prenent el control de la maquinària de la cèl·lula hoste per a generar noves còpies. En aquest cas, les cèl·lules afectades principalment, la mort de les quals conduirà a les manifestacions patològiques més importants, són els limfòcits T CD4⁺³⁸⁰.

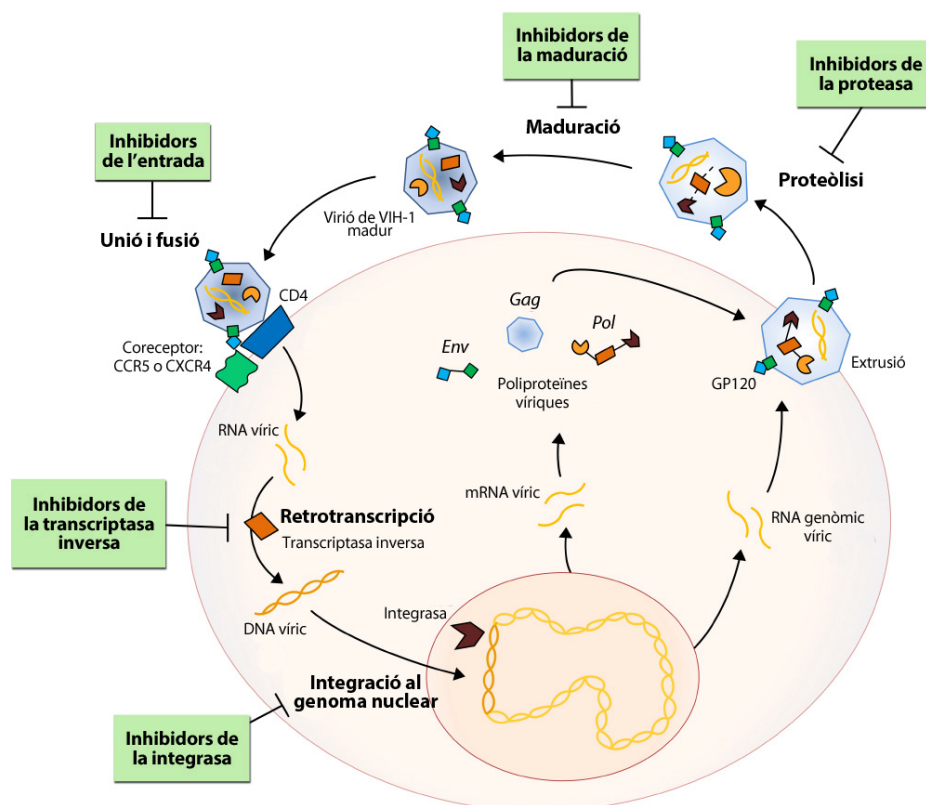


Figura 19: Cicle replicatiu del VIH-1 i punts d'acció dels fàrmacs antiretrovirals (requadres verds).
Adaptada a partir de la Ref. 382.

El coneixement del cicle replicatiu del VIH-1 ha estat clau en el desenvolupament d'estratègies terapèutiques per a combatre la infecció (**Fig. 19**). El primer pas del mateix és la **unió** del virus a la superfície cel·lular, la qual tindrà lloc a través del contacte d'una proteïna de l'envolta del VIH-1 amb el seu receptor, la molècula CD4 del limfòcit. Aquesta primera unió permetrà una segona interacció amb un receptor de quimiocines (usualment, CCR5 o CXCR4) que actuarà com a coreceptor per a assegurar l'ancoratge del virus. La fixació a la cèl·lula portarà a la **fusió** de la seva envolta amb la membrana plasmàtica, tot permetent l'entrada del virió a la cèl·lula. Un cop dins, es produeix l'alliberament de l'RNA i els enzims virals de les proteïnes de la càpside. Un d'aquests enzims és una transcriptasa inversa, que **retrotranscriurà** l'RNA viral a DNA, el qual serà translocat al nucli i **integrat** al genoma de la cèl·lula hoste per acció d'un altre enzim viral, la integrasa. Un cop integrat en forma de provirus es podrà donar la transcripció del genoma del VIH-1 i de les seves proteïnes, algunes de les quals es tradueixen com a proproteïnes. Al citoplasma, les proteïnes de la càpside s'ensamblaran tot englobant al seu interior el genoma viral (en forma de RNA de doble cadena) i els enzims accessoris, i abandonaran la cèl·lula per gemmació. Simultàniament, un dels enzims virals, la proteasa del VIH-1, **processarà** les proproteïnes encapsidades, conduint a la **maduració** dels virions i preparant-los per a infectar una nova cèl·lula. El resultat d'aquest procés és un desgast dels recursos metabòlics del limfòcit, que conduiran en darrera instància a la seva mort i a disminució en aquests leucòcits en individus infectats per VIH-1^{380,381}.

Família	Mecanisme d'acció	Exemples
Inhibidors de la transcriptasa inversa		
Anàlegs de nucleòsids o nucleòtids (NRTI)	Inhibidors competitius. Aturen la síntesi de DNA que duu a terme la transcriptasa inversa del VIH-1 en ésser incorporats al mateix.	Estavudina Didanosina Zidovudina Abacavir
No anàlegs de nucleòsids o nucleòtids (NNRTI)	Inhibidors al·lostèrics. No s'uneixen al centre actiu de la mateixa, però en disminueixen l'activitat.	Efavirenz Nevirapina Rilpivirina
Inhibidors de la proteasa (PI)	Bloqueig del centre catalític de la proteasa del VIH-1, impedit el processament de les proproteïnes virals i generant virions no infectius.	Indinavir Lopinavir Ritonavir Nelfinavir Darunavir
Inhibidors de la integrasa	Impedeixen la inserció del provirus interactuant amb cofactors de la cèl·lula hoste.	Raltegravir Elvitegravir
Inhibidors de l'entrada/ de la fusió	Diversos, però en general eviten la unió del virus als seu receptor i coreceptors i la consegüent fusió de membranes.	Maraviroc Enfuvirtide
Inhibidors de la maduració	Bloqueig del processament de les proproteïnes virals unint-se a les mateixes enlloc de a la proteasa viral, com és el cas dels PI.	Bevirimat

Taula V: Principals famílies de fàrmacs antiretrovirals d'ús contra el VIH-1. Adaptat a partir de les Refs. 380, 381 i 382.

L'alta capacitat de mutació i, per tant, d'adquisició de resistències virals per part del VIH-1 va conduir a l'establiment de règims terapèutics combinats. En l'actualitat existeixen sis classes diferents de fàrmacs antiretrovirals, que tenen com a diana precisament etapes particulars del cicle replicatiu del VIH-1. A la **Fig. 19** i a la **Taula V** es detallen els mecanismes d'acció dels mateixos i se n'ofereixen exemples dels més emprats. Des del 1996, l'ús de la teràpia HAART ha esdevingut el tractament estàndard per a combatre la infecció per VIH-1. En

aquest règim terapèutic s'acostumen a emprar tres fàrmacs de com a mínim dues classes diferents, quelcom que afavoreix un efecte sinèrgic sobre el control de la càrrega viral –i, per tant, sobre l'aparició de la sida- altament efectiu. Malauradament, a aquest tractament s'hi associen greus efectes adversos, com ara hepatotoxicitat i diversos símptomes gastrointestinals i cutanis³⁸⁰. Poc després de què s'implantés la teràpia HAART es va començar a descriure que, en alguns pacients, apareixia l'esmentat fenotip anòmal quant a la distribució del teixit adipós en diverses localitzacions anatòmiques i uns valors de metabòlits circulants alterats, documentant-se així els primers casos de HALS³⁷⁹. Aquesta síndrome lipodistròfica va arribar a afectar a un 40-50% d'individus infectats per VIH-1 sota tractament HAART, si bé la seva incidència ha disminuït en haver-se descobert recentment nous fàrmacs i noves combinacions menys propenses a causar-la^{382,383}. La recerca en la HALS prova, doncs, d'elucidar els mecanismes subjacents que vinculen la infecció per VIH-1 i l'ús d'aquests fàrmacs amb la biologia del teixit adipós.

5.5.2. Simptomatologia de la HALS

La HALS és una lipodistròfia parcial, per la qual cosa les alteracions morfològiques que s'hi presenten es poden dividir en dues de principals: Lipoatròfia i lipohipertròfia (**Fig. 18E**). La **lipoatròfia** es manifesta com una pèrdua de teixit adipós subcutani generalment irreversible, essencialment a la cara, a les extremitats i a la zona glútia (**Fig. 18F**). D'altra banda, el greix s'acumula als dipòsits viscerals i mamaris (**Fig. 18G**), de manera que aquestes regions pateixen una situació de **lipohipertròfia**³⁸⁴. Ocasionalment, alguns pacients presenten també acumulacions de greix al coll i a la zona dorsocervical, creant els efectes coneguts com a "coll de granota" (*bullfrog neck*) i "gep de búfal" (**BH**, *buffalo hump*)(**Fig. 18H**)^{385,386}. En els pacients amb HALS també poden aparèixer altres lipomes ubicats a regions disparells, els quals sovint apareixen en un nombre discret (**lipomatosi**)^{387,388}. Les diferents alteracions morfològiques, no obstant, no tenen per què aparèixer alhora al mateix individu. Així doncs, la lipoatròfia és un fenomen molt freqüent, mentre que la lipomatosi tan sols apareix en un baix percentatge de casos. La coexistència d'aquestes dues situacions suposa, però, un repte pels facultatius a l'hora d'establir un tractament adient, ja que la supressió d'un dels efectes adversos amb altres fàrmacs –per exemple, agonistes adipogènics com les TZDs- n'intensifica d'altres^{360,388}.

A més d'aquestes alteracions morfològiques, els pacients amb HALS també presenten determinades **complicacions metabòliques sistèmiques**, reminiscents de la síndrome metabòlica que pot aparèixer en individus obesos. Les més rellevants són la dislipidèmia, caracteritzada per una hipertrigliceridèmia i uns elevats nivells circulants de NEFAs, i la resistència a la insulina, evidenciada per hiperinsulinèmia i intolerància a la glucosa. Aquests paràmetres es correlacionen al seu torn amb un risc elevat de patir malalties cardiovasculars³⁸³.

Els **nivells circulants d'adipocines** també es troben alterats en aquests pacients, quelcom que aquesta malaltia, de fet, comparteix amb altres formes de lipodistròfia, i contribueixen a l'existència d'alguns dels símptomes metabòlics esmentats. La concentració plasmàtica de leptina es correlaciona, com hem vist, amb l'adipositat, per la qual cosa, i a diferència del cas dels individus obesos, en pacients amb lipodistròfies d'origen genètic i amb HALS aquesta es troba disminuïda³⁶⁰. L'adiponectina es troba disminuïda en l'obesitat, i aquest també sembla ser el cas per a algunes formes de lipodistròfia, entre elles la HALS, tot

afectant a la sensibilitat a la insulina d'aquests pacients³⁶⁰. No obstant, fins el moment no s'ha establert una correlació clara i directa entre els símptomes de la HALS i els nivells de resistina circulants³⁸⁹. Pel que fa a altres adipocines estudiades fins el moment, únicament els nivells circulants d'RBP4 es troben augmentats en els pacients amb HALS, mentre que els de visfatina, apelina, i adiposina apareixen disminuïts i no hi ha encara dades sobre els d'omentina i els de vaspina²⁶². D'altra banda, tot i que aquests pacients presenten un increment en els nivells circulants d'FGF21, el seu origen seria potencialment hepàtic per danys en aquest òrgan donada la baixa expressió d'aquesta adipocina marró en TAB humana en absència d'estímuls de *browning*³⁹⁰. Aquesta alteració global en els nivells d'adipocines resalta encara més la funció secretora del teixit adipós i la repercussió de la seva pèrdua.

5.5.3. Bases moleculars de la HALS

A causa de la detecció dels primers casos d'aquesta forma de lipodistrofia pràcticament de forma simultània a la implementació de la primera generació de PI als règims HAART, inicialment se'ls va considerar la causa etiològica de la mateixa. No obstant, en l'actualitat es coneix que aquestes alteracions apareixen, com veurem, a causa d'una complexa combinació de factors, entre els quals estan la pròpia infecció viral, respostes immunitàries de l'hoste i els fàrmacs antiretrovirals. Entre aquests últims, no només els PI estan associats amb l'aparició d'insults propis de la HAART, sinó també en gran part els NRTI i en menor mesura els NNRTI³⁸³.

Les zones lipoatròfiques subcutànies s'han pogut estudiar més en profunditat que les zones lipohipertròfiques visceral, en part per la facilitat d'accés a les mateixes tot i el limitat material biològic que s'hi pot extreure. En qualsevol cas, els mecanismes afectats per aquesta teràpia serien múltiples, i als mateixos s'haurà de sumar l'efecte de la infecció per VIH-1 en si³⁸³.

La major part d'estudis realitzats en biòpsies de regions lipoatròfiques apunten a una **alteració en l'expressió gènica dels adipòcits i en l'adipogènesi** com a primer mecanisme que contribueix a la HALS. Tant els PI com diversos NRTI³⁹¹⁻³⁹³ i fins i tot els NNRTI efavirenz i rilpivirina són capaços d'inhibir la diferenciació de diverses línies d'adipòcits i de cultius primaris humans i murins^{388,394,395}. Coherentment, a les biòpsies corresponents a zones lipoatròfiques de pacients amb HALS es pot detectar una disminució en l'expressió de PPAR γ ³⁹⁶, quelcom que porta a una reducció en els gens regulats per aquest factor de transcripció mestre i que seran clau, com hem vist prèviament, en l'adquisició del fenotip d'adipòcit madur. Entre aquests gens reprimits als adipòcits es troben LPL, GLUT4 i l'adiponectina, en concordança amb la reducció en els nivells circulants de la mateixa. La disminució en l'expressió d'aquests gens contribueix a explicar, doncs, la dislipidèmia i hiperglicèmia que forma part del quadre clínic dels pacients amb aquesta lipodistrofia³⁹⁶. C/EBP α també es troba disminuït en teixit amb aquesta alteració de la HALS³⁹⁷, mentre que els nivells d'SREBP-1c presenten unes anomalies peculiars: L'efavirenz en redueix l'expressió, tot impeding l'acumulació de TG als adipòcits³⁹⁴, mentre que els règims de HAART amb PI provoquen increments de SREBP-1c a nivell de proteïna. Diversos estudis apunten a una deficiència en la translocació d'aquest factor de transcripció al nucli que impliquen una acumulació no funcional al citoplasma, la qual no pot dur a terme les seves funcions en l'adipogènesi i la lipogènesi^{398,399}. En concordança, resulta interessant que un model animal de lipodistrofia presenta aquest fenotip per sobreexpressió de SREBP-1c⁴⁰⁰. Al TAB subcutani dels individus amb HALS també es pot detectar una inducció de gens antiadipogènics, com ara les

proteïnes de la família WNT o Pref-1, quelcom que suggereix que aquesta inhibició de l'adipogènesi, en darrera instància, es traduiria en una incapacitat de repoblar les zones lipoatròfiques amb nous adipòcits diferenciats a partir dels precursors existents^{392,396,401}. El fet que el tractament amb TZD tingui una eficàcia limitada *in vivo* suggereix, però, l'existència d'altres mecanismes implicats en l'etiologia de la HALS.

L'aparició de fenòmens de **toxicitat mitocondrial** associada essencialment als NRTI fou també una de les primeres explicacions que es van proposar per a la lipoatròfia associada a la HALS. El DNA mitocondrial (**mtDNA**) codifica components clau de la CTE, per la qual cosa els danys al mateix seran directament perjudicials per al metabolisme energètic. El grau de lipoatròfia dels individus sota tractament HAART es correlaciona amb una depleció del mtDNA, i la reducció de l'ús de NRTI en aquests règims normalment l'alenteix⁴⁰². La disminució del mtDNA condueix a una reducció en l'expressió de transcrits mitocondrials que porten a una alteració en la funció d'aquest orgànul, tot disminuint la producció d'ATP i incrementant la de ROS, conduint a una situació d'estrès oxidatiu. Aquesta situació portaria, doncs, a una inhibició de la diferenciació dels adipòcits, a la inducció de vies inflamatòries (incrementant l'expressió de, per exemple, TNF α) i a l'apoptosi dels mateixos⁴⁰³. Un possible mecanisme que explica aquesta depleció és la inhibició de la DNA polimerasa γ , específica dels mitocondris, per part d'aquests fàrmacs a causa d'una competència amb els nucleòtids trifosfat, tot provocant que l'activitat benèfica de terminació de la síntesi de DNA es tornés contra la cèl·lula. Això conduiria a una disminució en la síntesi i reparació del mtDNA i a aquestes alteracions mitocondrials⁴⁰³. Paradoxalment, els NRTIs i els PIs són capaços d'induir també un increment en la biogènesi mitocondrial, possiblement per l'activació de mecanismes de compensació³⁹³. El fet que en alguns individus no es produeixi una depleció del mtDNA però sí una disfunció mitocondrial suggereix, però, que aquest no seria l'únic mecanisme responsable de la toxicitat mitocondrial de la HAART, i que la generació de ROS per altres mecanismes podrien tenir més pes del que es creia inicialment³⁸¹. Resulta interessant destacar que, en models murins, els fàrmacs de la HAART disminueixen l'expressió d'UCP1 als adipòcits marrons clàssics, quelcom que posa de manifest que l'afectació mitocondrial no es limita als adipòcits blancs³⁹³.

El fet que certes alteracions morfològiques, metabòliques, mitocondrials i transcripcionals pròpies de la HALS ja apareguessin en individus infectats per VIH-1 però sense tractar va suggerir un paper directe de la **infecció pel VIH-1** en aquesta lipodistròfia^{388,396,404}. Entre aquests, es destaquen una inhibició de l'expressió de proteïnes proadipogèniques com C/EBP α i PPAR γ , així com la de gens de funció mitocondrial i d'adipocines, la qual és potenciada pel tractament³⁹⁶. Coherentment, certes proteïnes virals són capaces d'inhibir l'expressió de PPAR γ i, per tant, l'adipogènesi, en adipòcits i models animals⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁸. L'explicació d'aquests efectes directes del virus rau en la possibilitat intrínseca de què pugui infectar els adipòcits, ja que aquestes cèl·lules expressen el receptor i principals coreceptors del VIH-1 (CD4, CCR5 i CXCR4)^{409,410}, si bé és un tema controvertit. En qualsevol cas, les cèl·lules immunitàries del TAB serien una diana més plausible per a les accions al virus³⁸⁸.

El teixit adipós lipoatròfic d'aquests pacients desenvolupa, de fet, un **estat inflamatori** iniciat per la presència de la infecció viral crònica i exacerbat per la HAART (especialment pels PI i NRTI), tot provocant l'alliberació de citocines proinflamatòries³⁸⁸. Aquestes potenciarien l'apoptosi dels adipòcits, així com el reclutament (MCP-1) i activació clàssica de macròfags i

altres cèl·lules de la resposta T_H1 (TNF α), les quals al seu torn en secretarien més. Addicionalment, el fet que entre aquestes citocines n'hi hagi, com hem vist, d'inhibidores dels gens adipogènics (com ara TNF α amb PPAR γ) i d'activadores de la lipòlisi (IL-6) contribuiria addicionalment a la lipoatròfia. S'ha pogut comprovar, de fet, que aquesta **inducció de la lipòlisi** seria un altre possible mecanisme implicat en la HALS. Aquesta té lloc en individus infectats per VIH-1 independentment del tractament, si bé, en el cas dels tractats, els PI serien els que hi contribuirien en més mesura³⁸⁸.

Finalment, donat que l'edat avançada està relacionada amb una redistribució, un increment en l'estrès oxidatiu i un estat d'inflamació basal del teixit adipós, s'ha proposat que, globalment, en l'etiopatologia de la HALS també hi jugarien processos de **senescència cel·lular**⁴¹¹. Per exemple, la inhibició de la proteasa ZMPSTE24 per acció dels PI està relacionada amb l'aparició de lipoatròfia^{412,413}, quelcom que es traduirà en un processament defectuós de la prelamina A. Com hem vist en el cas de la FPLD2, l'acumulació de prelamina A farnesilada té uns potents efectes tòxics i prosenescents, els quals, també en aquest cas, portarien a la mort dels adipòcits⁴¹². Addicionalment, el processament defectiu de prelamina A impediria la correcta translocació de SREBP-1c al nucli, conduint a l'acumulació d'aquesta proteïna al teixit lipoatròfic i contribuint a limitar-hi la lipogènesi⁴¹⁴.

La **lipohipertròfia** dels dipòsits viscerals, similar a l'augment de mida que pateixen en situacions d'obesitat, està menys caracteritzada que la lipoatròfia de les regions subcutànies. Es creu que part de les alteracions metabòliques que es poden observar en els pacients estarien relacionades amb aquest increment en la massa de TAB visceral com ocorre en el cas de l'obesitat: Mentre que en aquella situació es produeix una disminució en la relació TAB subcutani/TAB visceral a causa d'un increment en la massa del greix al darrer compartiment, en el cas de la lipodistròfia s'hi ha d'afegir el fet que la massa subcutània disminueix, provocant també a tots els efectes un resultat de disminució d'aquesta relació³⁸³.

Entre les potencials explicacions al comportament diferencial d'aquestes dues alteracions de la HALS trobem, en primer lloc, la possibilitat que els adipòcits o altres cèl·lules del TAB dels diferents compartiments **responguin de manera diferent** a la infecció i al tractament HAART. *In vitro*, els adipòcits viscerals i els subcutanis es comporten de manera diferent en resposta als tractaments amb PI, quelcom que dona suport a aquesta teoria⁴¹⁵. Coherentment, les biòpsies de pacients corresponents a TAB visceral no presenten alteracions en l'expressió dels marcadors adipogènics, però sí en la funció mitocondrial i en el patró de producció de citocines proinflamatòries⁴¹⁶. Una altra possible explicació no excloent fa referència al fet que, en realitat, el TAB subcutani seria més susceptible a patir els efectes adversos de la infecció i els fàrmacs, i que aquesta hipertròfia visceral es produiria com a mecanisme de compensació per tal d'**emmagatzemar els lípids** que els dipòsits subcutanis no poden retenir. Com en el cas de l'obesitat, els dipòsits viscerals acabarien superant la seva capacitat de reserva màxima i s'originarien els fenòmens de **lipotoxicitat** ja discutits. Tenint en compte que, com hem comentat prèviament, als dipòsits lipoatròfics la lipòlisi està induïda, l'alliberació de NEFAs per part del teixit adipós seria encara més alta, tot conduint a la hipertrigliceridèmia i a les alteracions metabòliques derivades que apareixen en aquests pacients³⁸³.

Existeix, però, un cas particular de lipohipertròfia, els **BH**, en què la seva etiologia no estaria relacionada amb l'expansió del dipòsit sinó únicament amb la hiperplàsia del mateix.

En efecte, els BH són expansions de caràcter lipomatós que presenten una desregulació del cicle cel·lular que condueix a la seva sobreproliferació^{386,417}. Els BH no estan associats a cap règim de tractament en particular, i només se n'ha correlacionat l'aparició amb hiperinsulinèmia⁴¹⁸. L'expressió gènica als BH està menys alterada que al TAB subcutani no lipomatós, si bé s'ha descrit que presenten una característica distintiva peculiar: L'expressió d'UCP1^{417,419}. Aquesta dada, així com la ubicació dels BH, suggereix la implicació d'adipòcits marrons. Aquest aparent *browning* dels BH, i la possibilitat de que els lipomes presents a altres localitzacions anatòmiques també el presentin, és, per ara, un fenomen molt desconegut, la naturalesa del qual s'ha analitzat en profunditat a la present tesi doctoral.

5.5.4. Nous fàrmacs antiretrovirals: La fi de la HALS?

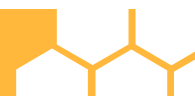
Com s'ha pogut comprovar, la major part d'alteracions descrites fins el moment s'han estudiat per a tractaments que incloïen solament NRTI, NNRTI i PI. Des de la seva aparició, però, els fàrmacs originals de cadascun d'aquests grups han anat deixant pas a les seves respectives noves generacions, les quals presenten una menor incidència d'efectes secundaris, entre els quals està l'aparició d'alteracions pròpies de la HALS. Per exemple, el darunavir no genera una acumulació de prelamina A farnesilada com sí provoquen altres PI com el lopinavir o l'atazanavir^{412,420}.

Si bé, des de la seva incorporació a mitjans de la dècada dels 2000, ja estan començant a aparèixer els primers informes sobre la detecció de símptomes de lipodistròfia en règims que incorporen nous fàrmacs, com ara l'aparició del BH en pacients tractats amb l'inhibidor de la integrasa raltegravir⁴²¹, resta encara per determinar si els inhibidors de l'entrada i de la maduració també estarien relacionats amb les causes de la HALS donada la seva recent implementació als règims HAART³⁸². Estudis recents, de fet, suggereixen que el maraviroc, un inhibidor de la fusió, atenua la inducció de la producció de citocines inflammatòries per part dels adipòcits humans en presència de LPS sense inhibir-ne la diferenciació, indicant així l'existència d'efectes secundaris fins i tot beneficiosos per als adipòcits⁴²².

Tot i aquesta atenuació de l'aparició de nous casos, la HALS és encara la forma més freqüent de lipodistròfia a causa de la seva gran prevalença. Si bé els efectes beneficiosos de la teràpia HAART superen amb escreix els adversos, l'estudi d'aquesta malaltia segueix essent necessari per tal d'intentar esmenar-ne la redistribució de teixit adipós i, especialment, les complicacions metabòliques associades i millorar definitivament la qualitat de vida d'aquests pacients. Addicionalment, les lliçons que la recerca en lipodistròfies com aquesta ens aporten resulten també clau per a elucidar mecanismes que posteriorment es poden aplicar per a combatre l'obesitat, tot oferint un doble benefici per a la salut humana.

 **OBJECTIUS**

OBJECTIUS



L'objectiu global que s'establí durant present tesi doctoral fou el de caracteritzar a nivell molecular nous factors implicats en les funcions fisiològiques i en les alteracions patològiques del teixit adipós per tal d'aprofundir en els coneixements de la biologia d'aquest òrgan.

Els objectius concrets i particulars que s'establiren es dividiren en dos blocs temàticament diferents. Aquests blocs conceptuals i llurs objectius foren els següents:

BLOC A: Bases moleculars de la lipomatosi associada a les lipodistròfies parcials

1. Caracteritzar les bases moleculars, el fenotip funcional dels adipòcits i altres diferències existents entre els dos fenòmens de lipomatosi presents en individus amb lipodistròfia associada a la infecció per VIH-1 i al tractament HAART, els lipomes de tipus "gep de búfal" i aquells pertanyents a altres localitzacions anatòmiques.
2. Descriure a nivell molecular les alteracions funcionals del teixit adipós en lipomes procedents d'individus sans i de pacients amb lipodistròfia parcial familiar de tipus 2.

BLOC B: Identificació de noves adipocines marrons

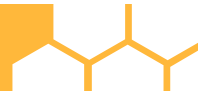
3. Identificar noves proteïnes secretables termoregulades produïdes pel teixit adipós marró de forma preferent al teixit adipós blanc mitjançant aproximacions *in silico* i la seva posterior validació *in vitro* i *in vivo*.
4. Determinar el paper funcional de la proteïna candidata CXCL14 en la fisiologia del teixit adipós marró i els seus efectes en models animals i cel·lulars.

Objectius



**INFORME DELS
CODIRECTORS DE TESI**

INFORME DELS CODIRECTORS DE TESI



Informe dels codirectors en relació a la Tesi Doctoral de Rubén Cereijo Téllez (publicacions i paper del doctorand)

En tant que codirectors de la Tesi doctoral de Rubén Cereijo Téllez, fem constar que els treballs corresponents a la memòria de la Tesi s'estructuren en els següents articles científics:

1. **Cereijo R**, Gallego-Escuredo JM, Moure R, Villarroya J, Domingo JC, Fontdevila J, Martínez E, Gutiérrez M del M, Mateo MG, Giralt M, Domingo P, Villarroya F.

The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages.

PLoS One. 2015 Aug 25;10(8):e0136571. doi: 10.1371/journal.pone.0136571.

IF: 3,27; 9 de 57 MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (1er Quartil).

El doctorand, primer autor d'aquesta publicació, ha tingut tot el protagonisme en l'obtenció experimental de les dades així com en l'evolució i progressió dels estudis, i ha participat amb gran protagonisme en la discussió dels resultats. El paper dels altres coautors ha estat el d'investigadors sènior que han participat fonamentalment en donar suport a alguns aspectes experimentals, proporcionar les dades clíniques dels pacients i realització de les biòpsies, així com en els aspectes intel·lectuals, d'elaboració i contextualització de les dades.

2. Araújo-Vilar D, Victoria B, González-Méndez B, Barreiro F, Fernández-Rodríguez B, **Cereijo R**, Gallego-Escuredo JM, Villarroya F, Pañeda-Menéndez A.

Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations.

Clin Endocrinol (Oxf). 2012 Jun;76(6):816-24.

IF: 3,45; 48 de 128 ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (2n Quartil).

En aquest article, el doctorand realitzà experiments de caracterització molecular de mostres de teixit adipós de pacients amb lipodistròfia parcial d'origen genètic, tant a nivell de quantificació de transcrits com de proteïnes específiques.

3. Hondares E, Gallego-Escuredo JM, Flachs P, Frontini A, **Cereijo R**, Goday A, Perugini J, Kopecky P, Giralt M, Cinti S, Kopecky J, Villarroya F.

Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue.

Metabolism. 2014 Mar;63(3):312-7.

IF: 3,89, 39 de 128 ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1er Tercil)

El doctorand realitzà mesures de immunoblot per a la quantificació de proteïnes específiques i transcrits que formen part d'aquest estudi. Aquest apartat fou essencial per a una correcta validació dels marcadors beix/brite que foren emprats posteriorment en els estudi de l'article 1. Així mateix, el doctorand participà en la discussió i interpretació de les dades.

4. **Rubén Cereijo**, Montserrat Cairó, Tania Quesada, Roser Iglesias, Teresa Mampel, Joan Villarroya, Jean-Valery Turatsinze, Decio Eizirik, Marta Giralt, Francesc Villarroya.

CXCL14 is a brown adipocyte-derived chemokine mediating the recruitment of alternatively-activated macrophages to adipose tissues upon thermogenic activation

Nature Medicine (Submitted).

El doctorand, primer autor d'aquesta publicació, ha tingut tot el protagonisme en l'obtenció experimental de les dades així com en l'evolució i progressió dels estudis. El paper dels altres coautors ha estat en tant que investigadors col·laboradors que han proporcionats alguns models experimentals i han donat suport a l'apartat bioinformàtic, així com investigadors sènior que han participats en la discussió i elaboració de dades.

Cal esmentar que en la segona part de la Tesi, referent a la identificació d'adipocines marrons, hi havia un important buit bibliogràfic, sense reviews sòlids al respecte. Part de la tasca de la Tesi ha estat contribuir en aquest camp mitjançant la publicació de quatre reviews específics al respecte. En ells, R. Cereijo ha contribuït de forma essencial, realitzant cerques exhaustives de la bibliografia, integrant la informació, generant taules i esquemes dels reviews i participant en la interpretació de la informació obtinguda. Ha estat una tasca important en la contextualització del seu tema de Tesi i com a tal consta com a co-autor dels reviews següents:

5. **Cereijo R**, Giralt M , Villarroya F

Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans

Ann Med 2015 Mar;47(2):169-177.

IF: 3,88; 21 de 154, MEDICINE, GENERAL & INTERNAL (1er Quartil)

6. **R Cereijo**, J Villarroya and F Villarroya

Non-sympathetic control of brown adipose tissue

Int J Obes Supp 5: S40-S44; doi:10.1038/ijosup.2015.10

És un suplement de la revista Int J Obes, que no té un IF definit en tant que suplement, tot i que Int J Obes té un IF de 5.00, 7 de 77, NUTRITION & DIETETIC (1er Quartil).

7. Villarroya J, **Cereijo R**, Villarroya F.

An endocrine role for brown adipose tissue?

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013 Sep 1;305(5):E567-72.

IF: 3,78.; 18 de 83 PHYSIOLOGY (1er Quartil)

8. Giralt M, **Cereijo R**, Villarroya F.

Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues.

Handb Exp Pharmacol. 2015 Apr 23. [Epub ahead of print]

És un capítol de llibre que no té IF, tot i que és reportat a PubMed. Inclòs a l'Apèndix.

Juntament amb els articles que formen part de la Tesi en sí, durant el període de desenvolupament del seu doctorat, Rubén Cereijo ha participat en estudis col·laboratius del nostre grup en temàtiques relacionades de forma general amb la seva Tesi. Aquests articles es presenten com a Apèndix, i són:

9. Escoté X, Megia A, López-Dupla M, Miranda M, Veloso S, Alba V, Domingo P, Pardo P, Viladés C, Peraire J, Giralt M, Richart C, Vendrell J, Vidal F; **HIV-1 Lipodystrophy Study Group (includes Cereijo R).**

A study of fatty acid binding protein 4 in HIV-1 infection and in combination antiretroviral therapy-related metabolic disturbances and lipodystrophy.

HIV Med. 2011 Aug;12(7):428-37.

IF: 3,99; 18 de 78 INFECTIOUS DISEASES (1er Quartil)

El doctorand participà en processos analítics de mostres dels pacients HIV.

10. Elias-Miró M, Mendes-Braz M, **Cereijo R**, Villarroya F, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Massip-Salcedo M, Domingo JC, Bermudo R, Rodés J, Peralta C.

Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion.

J Hepatol. 2014 Jan;60(1):87-95

IF: 11,33. 4 de 76, GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY (1er Quartil)

El doctorand realitzà les mesures de funció mitocondrial i expressió gènica relacionada inclosos en aquest estudi.

A Barcelona, el 19 d'octubre de 2015.

Signat:

Francesc Villarroya i Gombau

Director

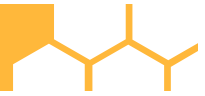
Marta Giralt i Oms

Directora



**RESUM GLOBAL
DISCUSSIÓ GENERAL**

RESUM GLOBAL I DISCUSSIÓ GENERAL



BLOC A: Bases moleculars de la lipomatosi associada a les lipodistròfies parcials

L'ús de teràpies combinades de fàrmacs antiretrovirals ha permès millorar la qualitat de vida dels pacients amb VIH-1, la qual ho ha fet encara més les darreres dècades en haver disminuït l'aparició de destacables efectes secundaris, com ara la HALS, a causa de la utilització de nous fàrmacs i règims terapèutics. Mentre que el TAB de les regions lipoatròfiques dels pacients infectats per VIH-1 i amb HALS ha estat àmpliament estudiat i les seves característiques moleculars han estat descrites a la literatura, els lipomes que també sorgeixen en aquests individus són freqüentment obviats, en presentar una menor incidència que la resta d'alteracions pròpies d'aquesta lipodistròfia i no constituir un símptoma que, en aparença, causi molèsties o greus problemes de salut als pacients. No obstant, resulta destacable que la presència de lipomes és un tret comú a diferents lipodistròfies parcials, com és el cas de la HALS i la FPLD2⁴²³, fet que suggereix que sí són rellevants en la simptomatologia d'aquestes malalties. Mentre que els lipomes de tipus BH presents a la zona dorsocervical d'aquests pacients ja havien estat analitzats prèviament tant al si del nostre grup com per part d'altres^{417,423}, aquells lipomes NBL presents a altres localitzacions anatòmiques i la seva relació amb els diversos llinatges adipocitaris de què es té constància actualment no havien estat mai caracteritzats. Per aquests motius, en els estudis d'àmbit clínic duts a terme al primer bloc de la present tesi doctoral, ens vam centrar en l'estudi d'aquests insults patofisiològics.

Per tal d'elucidar les bases moleculars subjacents als diferents tipus de lipomes de la HALS es van dur a terme anàlisis sistemàtiques en biòpsies de TAB subcutani no lipomatós d'individus sans, així com de TAB provinent de lipomes de tipus BH i NBL en pacients infectats per VIH-1 i afectats per la HALS. Demogràficament, no es detectaren diferències entre els paràmetres antropomètrics i bioquímics entre ambdós grups de pacients amb lipodistròfia, si bé ambdós grups mostraven hipertrigliceridèmia i hipercolesterolèmia. Aquest quadre de dislipidèmia ja s'havia descrit en individus amb lipodistròfies, en part perquè el seu escàs TAB i les anomalies associades als seus adipòcits fan que aquests siguin insuficients per tal d'emmagatzemar-hi TG^{356,388}. Quant als paràmetres propis de la infecció i la teràpia, tampoc es trobaren diferències entre els dos subgrups d'individus amb lipodistròfia quant a recompte de limfòcits T CD4⁺, virèmia i tractament, compostat en els dos casos per combinacions d'NRTI, NNRTi i PI.

● Els lipomes de tipus BH i NBL mostren patrons d'adipogènesi i funció adipocitària inalterada, d'immunoevasió i de disfunció mitocondrial

Una primera aproximació per tal de detectar anomalies en la funció del TAB lipomatós fou elaborar-ne un perfil transcripcional tenint en consideració diversos aspectes rellevants de la fisiologia d'aquest teixit, l'alteració dels quals podria comprometre la funció del mateix: Adipogènesi i funció adipocitària, inflamació, fibrosi i funció mitocondrial. A continuació, es caracteritzà l'estat proliferatiu i potencialment senescent de les cèl·lules presents a aquests lipomes. Finalment, per tal de determinar la implicació de diversos llinatges adipocitaris i

completar la caracterització molecular d'aquests insults de la HALS, se'n determinà l'expressió de gens associats a adipòcits blancs, beix/brite i marrons clàssics.

En anàlisis conduïdes prèviament s'havia descrit que el TAB subcutani lipoatròfic dels pacients amb HALS presentava una repressió de l'expressió dels marcadors d'adipogènesi afavorida tant per la infecció viral com per la teràpia antiretroviral el qual, en darrera instància, condueix a la manca de TAB observada a les extremitats, la cara i la regió glútia d'aquests individus^{396,417}. Per tal de contrastar aquesta informació amb la dels lipomes, en la present tesi doctoral s'analitzaren els nivells del transcrit i l'abundància proteica del factor de transcripció mestre de l'adipogènesi (PPAR γ), d'una proteïna representativa en el procés de captació i acumulació de lípids en els adipòcits (LPL) i d'una de les principals adipocines (adiponectina). A diferència del que s'havia descrit per a les regions lipoatròfiques, l'expressió d'aquests marcadors no es trobà inhibida en els lipomes i, de fet, es veié incrementada en els NBL. En contrast amb els resultats de mRNA, però, a nivell de proteïna no es detectaren diferències significatives entre el TAB subcutani d'individus control ni entre ambdós tipus de lipoma per a aquests marcadors ni per al transportador de glucosa GLUT4. Aquestes observacions suggereixen que l'estat actiu de diferenciació de preadipòcits en adipòcits al si d'aquests lipomes contribueix a mantenir-ne uns **nivells funcionals d'adipogènesi i captació de glucosa i TG**, tot indicant que els adipòcits presents en la lipomatosi associada a la HALS no tenen compromesa la seva funció essencial. Les discordances observades entre els resultats corresponents als transcrits i a la proteïna es podrien atribuir a la regulació post-transcripcional i post-traducciona vinculada a aquests gens^{424,425}, així com, en el cas de l'adiponectina, per una possible regulació post-traducciona després de la seva secreció⁴²⁶.

En contrast amb les regions lipoatròfiques dels pacients amb HALS, en què els seus adipòcits es troben sotmesos a un microambient inflamatori³⁸⁸, en cap dels dos subtipus de lipoma no es detectà un increment en l'expressió de la citocina proinflamatòria TNF α , del marcador d'infiltració de macròfags CD68 o de la subunitat del MHCII indicativa d'una presentació activa d'antígens, la β_2 -microglobulina. Aquest fet es correspon amb una **situació d'immunoevasió** en què s'evita la intervenció del sistema immunitari contra un conjunt cel·lular en proliferació excessiva i que permet a aquests tumors desenvolupar-se. D'altra banda, els nivells transcripcionals del marcador de fibrosi COL1A2 es trobaren disminuïts únicament en els lipomes BH en contrast amb els NBL, que presentaven uns nivells similars als dels individus control. Aquesta dada suggereix que la matriu extracel·lular en els lipomes BH disposa de menys col·lagen 1 α 2 i podria explicar la major capacitat d'expansió de les lipomatosi de la zona dorsocervical, a diferència de la menor mida i estat d'encapsulació més compacte dels lipomes d'altres localitzacions³⁵³. Donat que la fibrosi és un conegut factor de generació d'hipòxia i d'inici de l'estat inflamatori que condueix a les alteracions del TAB pròpies d'individus obesos, la manca d'inducció de la mateixa i el manteniment d'un baix perfil inflamatori podrien estar, al seu torn, lligades en el cas d'aquests lipomes. Al seu torn, aquesta estabilitat en el balanç inflamatori als lipomes concorda amb el manteniment de l'expressió de marcadors propis de la funció adipocitària i l'adipogènesi, les quals, en cas contrari, s'ha demostrat que poden resultar compromeses^{292,300}.

En concordança amb dades prèvies publicades a la literatura⁴¹⁷, els lipomes de tipus BH mostren una **depleció del mtDNA**, la qual, no obstant, **no s'observà en els NBL**. Els nivells d'expressió de MT-CO2, un transcrit codificat al mtDNA i que es correspon a la

subunitat II de la citocrom c oxidasa de la CTE, no es trobaren reprimits a nivell transcripcional però sí a nivell proteic en tots dos tipus de lipoma. Aquest fet suggereix l'existència una **alteració subjacent en la funció mitocondrial** dels adipòcits d'aquests insults patofisiològics de la HALS. Al seu torn, la depleció del mtDNA també apareix al TAB subcutani de les regions lipoatròfiques dels pacients amb HALS, quelcom que s'ha atribuït principalment a l'acció dels fàrmacs antiretrovirals corresponents a la família dels NRTIs: A més d'inhibir l'activitat de la transcriptasa inversa del VIH-1, es produeix una reacció adversa creuada que porta a la inhibició de la DNA polimerasa γ mitocondrial i, per tant, a un dèficit en la replicació d'aquest material genètic^{403,417}. L'explicació a per què aquesta depleció no es produeix en els NBL roman per elucidar, si bé podria tenir a veure amb la major importància relativa de la biogènesi mitocondrial en el fenotip i origen cel·lular dels adipòcits presents als BH, diferent al dels presents als NBL, com s'analitzarà posteriorment.

● **Les dues formes de lipomatosi presents a la HALS estan sotmeses a un estat de proliferació activa i d'envelliment cel·lular exacerbat**

En tractar-se els fenòmens de lipomatosi de potencials alteracions neoplàsiques, es considerarà d'especial interès aprofundir en l'existència de diferències en l'estat proliferatiu dels mateixos. Els nivells de l'antigen nuclear de cèl·lules en proliferació (PCNA), una proteïna implicada en promoure la continuïtat del cicle cel·lular⁴²⁷, es trobaren dràsticament elevats en els lipomes BH com ja s'havia descrit prèviament⁴¹⁷, però també en els NBL, quelcom que contrasta en tots dos casos amb una negligible expressió en les biòpsies de TAB d'individus control. Aquest fet evidencia que l'expansió d'aquests lipomes presents en la HALS no es deu únicament a una hipertròfia localitzada dels seus adipòcits, sinó que existeix una **proliferació activa de cèl·lules precursors** que origina en darrera instància una hiperplàsia dels mateixos. Aquesta troballa portà a intentar caracteritzar en profunditat les potencials alteracions associades a aquest excés de proliferació. Donat que, com s'ha esmentat anteriorment, es té constància que als dipòsits de TAB expandit d'individus obesos es dona un escurçament dels telòmers de les seves cèl·lules residents³¹⁰, es va procedir a mesurar en primer lloc aquesta longitud telomèrica a les biòpsies de lipomes i de TAB subcutani d'individus sans i d'afectats per la HALS. Ambdós subtipus de lipomes mostraren una dràstica reducció en el nombre de repeticions telomèriques, no només en contrast amb els individus control, sinó també amb el TAB subcutani de les regions lipoatròfiques dels pacients amb HALS, en què no es trobà alterat. Aquesta observació confirma una expansió descontrolada dels progenitors cel·lulars presents als lipomes, els quals no estarien activant la telomerasa per tal proliferar durant més cicles replicatius i es mantenen, doncs, com a alteració clínicament benigna. En segon lloc, es van determinar els nivells d'expressió de la β -galactosidasa associada a senescència (SA- β -Gal), un reconegut marcador d'envelliment tissular⁴²⁸, en ambdós tipus de lipomes en comparació amb el TAB subcutani d'individus sans. Els nivells del transcrit de l'SA- β -Gal es trobaren incrementats en ambdós tipus de lipomes respecte al TAB d'individus sans, si bé no se'n trobaren canvis entre tots dos. En darrer lloc, es va poder detectar la presència de la forma no processada i tòxica de les lamines nuclears A/C, la prelamina A, en ambdós subtipus de lipoma. Aquest tret dels lipomes presents a la HALS és compartit amb els lipomes que s'originen en individus amb FPLD2 i amb el TAB subcutani lipoatròfic dels pacients amb HALS^{414,429}. En el context de la HALS, s'ha atribuït aquesta acumulació a l'ús de PI, els quals interfereixen el processament de les lamines nuclears i condueixen un fenotip senescent als adipòcits⁴¹¹. En conjunt, aquestes tres observacions

porten a corroborar l'existència d'un **fenotip d'envelliment cel·lular** en els lipomes que, en contrast amb les regions lipoatròfiques, seria compensat per l'activa i accelerada proliferació cel·lular i que condueix en darrera instància a la seva expansió.

◆ **L'expressió de *ZIC1* és un marcador fiable de la presència d'adipòcits marrons clàssics en biòpsies humanes**

Com s'ha revisat prèviament, l'existència de TAM en humans adults havia estat considerada un fet anecdòtic fins recentment. El seu redescobriment i la possibilitat de suscitar-ne l'activació per tal de millorar les disfuncions metabòliques que es donen en les malalties del teixit adipós, no obstant, van avivar l'interès en la seva recerca. Fruit de la mateixa, diversos grups centraren els seus esforços en la identificació de marcadors transcripcionals propis d'adipòcits marrons clàssics, beix/brite i blancs^{11,37}. Entre ells, la proteïna amb dit de zinc *ZIC1* es perfilà com el marcador més específic d'adipòcits marrons clàssics⁴³⁰. Anàlisis transcripcionals dutes a terme durant la present tesi doctoral confirmaren l'expressió d'aquest marcador en biòpsies de teixit adipós de la zona interescapular de nadons, lloc canònic de presència d'adipòcits marrons clàssics. L'expressió del marcador proposat com a beix/brite *TNFRSF9* (CD137), que no es trobà alterada al TAM interescapular dels nadons, sí que es veié augmentada al TAM perirenal dels mateixos. D'altra banda, tot i que el teixit adipós perirenal de pacients amb feocromocitoma conté un gran nombre d'adipòcits marrons els quals, tot i que aparentment, haurien de ser de tipus beix/brite per definició –donat que s'han induït a una zona de TAB fruit de la acció catecolaminèrgica provocada per aquest tumor adrenal–, no mostraven una inducció de *TNFRSF9*. En canvi, sí que se n'hi detectà l'expressió de *ZIC1*, tot suggerint que en aquest cas també n'apareixen de tipus clàssic, observació que ha estat corroborada posteriorment a la bibliografia en altres cohorts de pacients⁴³¹. En conjunt, aquestes observacions demostren la **validesa de *ZIC1* en humans** com a marcador d'aquest tipus d'apòcit, si bé posen de manifest les limitacions pròpies de l'anàlisi de marcadors unívocs de cada fenotip adipocitari en humans, especialment en el cas dels adipòcits beix/brite, com tractarem en més detall a continuació.

◆ **Únicament els lipomes BH de la HALS presenten un patró transcripcional corresponent a la presència d'adipòcits marrons clàssics**

Estudis previs havien demostrat l'expressió i presència de la proteïna desacobladora UCP1 en biòpsies de BH d'individus amb HALS^{417,419,423}, però fins el moment no s'havia estudiat en profunditat ni la seva possible expressió als lipomes NBL presents a altres ubicacions anatòmiques ni l'origen cel·lular d'aquests adipòcits marrons. Tenint seguit amb els estudis de caracterització de les lipomatosis de la HALS, doncs, es dugué a terme un perfil transcripcional de les biòpsies dels dos subtipus de lipoma emprant alguns dels marcadors proposats actualment per a discernir adipòcits blancs, marrons clàssics i beix/brite.

Les anàlisis dutes a terme confirmen l'**adquisició d'una signatura transcripcional pròpia de la presència d'adipòcits marrons** als lipomes de tipus BH, però no en els NBL. Aquesta ve evidenciada per un augment en els nivells dels transcrits d'UCP1 i del coregulador PGC-1 α en aquest subtipus, així com per la repressió del receptor adrenèrgic β_3 , un fet comú associat a una regulació de l'activació dels adipòcits marrons⁴³². A la present tesi doctoral es va voler aprofundir també la caracterització de la identitat molecular dels adipòcits presents

en els dos subtipus de lipomes. Una elevada expressió de *ZIC1* (adipòcits marrons clàssics), en combinació amb una reducció en els marcadors *TBX1* (beix/brite) i *HOXC9* (blancs), tots ells marcadors dels més àmpliament validats per a cada tipus, suggereixen fortament que **els presents als lipomes BH són adipòcits marrons clàssics i no beix/brite**, quelcom que els diferencia no només del TAB subcutani dels controls sans, sinó també dels lipomes NBL. Els resultats amb altres marcadors per a cada tipus d'adipòcit foren menys consistents, de la mateixa manera que la seva validesa com a tals està subjecta a controvèrsia, especialment en situacions patològiques com la que ens ocupa. Una qüestió que cal tenir en compte per tal d'entendre aquestes discordances pot ser la funció cel·lular real de cada gen en contraposició al seu ús pràctic com a marcador d'un determinat fenotip. Per exemple, l'expressió d'*EBF3* i de *FBXO31*, dos altres marcadors proposats per als adipòcits marrons clàssics³⁷, es trobà sistemàticament augmentada en tots dos tipus de lipoma i no només als de tipus BH. La funció d'aquests dos gens, no obstant, està associada a la regulació del cicle cel·lular^{433,434}, de manera que en una alteració com són els lipomes, on aquests mecanismes estan com hem vist alterats, la seva validesa com a marcadors de fenotip passa a ésser qüestionable i cal ser cautelós a l'hora d'interpretar-la.

Els lipomes de tipus BH presents en els pacients amb lipodistròfia associada a infecció per VIH-1 i sota tractament HAART són, per tant, una alteració del teixit adipós en què es produeix una sobreproliferació de precursors adipocitaris entre els quals se'n troben d'adipòcits marrons clàssics, els quals retenen aquest fenotip un cop diferenciats, mentre que els lipomes presents a altres localitzacions anatòmiques ho són de precursors d'adipòcits blancs. Per tant, aquest insult de la HALS constitueix **una nova evidència de la presència de TAM clàssic en humans adults**. Aquesta, no obstant, no es tracta d'una presència fisiològica i funcional, sinó patològica, com ocorre en el cas dels hibernomes o amb el teixit adipós visceral que envolta els feocromocitomes. D'aquesta manera, es pot afirmar que la infecció per VIH-1 i el tractament HAART són capaces de tenir un impacte diferencial en distintes regions de TAB subcutani en funció del fenotip dels adipòcits i de les cèl·lules precursoras presents a les mateixes, un fet que cal tenir en compte a l'hora d'emprar possibles estratègies de *browning* per tal de millorar la síndrome metabòlica que es dona en aquests pacients. Aquest coneixement també posa de manifest la necessitat d'estudiar en profunditat l'existència de possibles respostes diferencials a regions discretes de TAB subcutani a l'hora d'emprar estratègies similars per a corregir els efectes perjudicials sistèmics propis de l'obesitat i la T2DM.

● Els lipomes presents a l'FPLD2 presenten alteracions parcialment similars a les dels que sorgeixen a la HALS

L'FPLD2 és una forma de lipodistròfia congènita de tipus parcial deguda a mutacions que dificulten el processament post-traduccional de la prelamina A a les seves formes funcionals (lamines A i C), proteïnes clau de l'embolcall nuclear. Aquest fet compromet la transcripció de gens clau i es tradueix en l'aparició d'alteracions com la progèria o l'FPLD2. Els individus que pateixen aquesta malaltia mostren alteracions reminiscents de les que es donen en la HALS, incloent, com s'ha esmentat prèviament, la presència de lipomes a diverses localitzacions anatòmiques⁴²⁹. Per aquests motius, l'anàlisi dels fenòmens de lipomatosi propis de totes dues malalties pot aportar dades útils per a determinar l'especificitat recíproca de les alteracions presents en cadascuna.

Durant la present tesi doctoral es realitzà un estudi transcripcional *ex vivo* de lipomes de TAB subcutani d'individus sans en què hi havien sorgit de manera espontània, així com del teixit adipós circumdant als mateixos (no lipomatós). Per a individus amb FPLD2, s'obtingueren mostres equivalents, tant de lipomes com de teixit no lipomatós adjacent. En el cas d'aquests darrers, 2 presentaven una mutació clàssica associada a l'aparició d'aquesta forma de lipodistròfia (R482W) i 2 més una forma atípica (I299V). S'analitzà l'expressió gènica en zones que en els pacients amb FPLD2 són lipoatròfiques o lipohipertròfiques de marcadors d'interès de control del cicle cel·lular (pRb, p53), de la prelamina A (*LMNA*), de proliferació (PCNA), d'adipogènesi i funció adipocitària (SREBF1, PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β , LPL, GLUT4, leptina i FABP4), antiadipogènics (PREF1), de funció termogènica (UCP1), d'inflamació i infiltració immunitària (CD3D, TNF α , IL-8, CD68) i de funció mitocondrial (*MT-CO2*, com a transcrit mitocondrial representatiu i *COX4I1* com a nuclear), així com l'abundància relativa del mtDNA en el teixit adipós d'aquesta sèrie de biòpsies. Les dades transcripcionals foren complementades amb dades histològiques per part del grup de recerca amb el qual es dugué a terme la col·laboració.

L'expressió de gens de funció mitocondrial (*MT-COII*) es trobà disminuïda en el teixit adipós lipoatròfic dels pacients amb FPLD2, tot i que el contingut de DNA mitocondrial no ho estava i el marcador mitocondrial de metabolisme lipídic SIRT3 només es detectà com a reduït en els lipomes dels individus amb FPLD2. D'altra banda, l'expressió dels gens proadipogènics PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β , LPL i GLUT4 fou menor en el greix circumdant lipoatròfic i en els lipomes d'aquestes zones dels pacients, però no en el greix lipohipertròfic ni en els lipomes pertanyents a aquestes regions, on, fins i tot, l'expressió d'alguns es detectà augmentada (C/EBP α , SREBF1, GLUT4). Els marcadors proinflamatoris tan sols es detectaren incrementats en el greix circumdant de regions lipoatròfiques dels pacients, si bé la infiltració de macròfags (CD68⁺) i limfòcits T (CD3D⁺) es detectà tant en teixit adipós lipoatròfic com en lipomes d'individus amb FPLD2. L'expressió de p53 i pRb es trobà disminuïda en els lipomes dels individus amb FPLD2. L'expressió del marcador contrari a la diferenciació adipocitària Pref1 i del marcador termogènic UCP1 fou negligible en tots els casos.

L'existència d'**alteracions mitocondrials** en cèl·lules amb mutacions al gen *LMNA* s'havien descrit amb anterioritat. Encara que els motius d'aquesta disfunció segueixen sense esclarir-se, la producció anòmala d'energia degut a una expressió inadequada de les proteïnes de la CTE o implicades en la regulació de l'oxidació de lípids podria derivar en una resposta de proliferació del dipòsit adipós⁴³⁵. La disminució de l'expressió d'adipogens en el greix lipoatròfic també es mostra concordant amb aquests estudis previs, i, tot i que els nivells d'expressió dels factors mestres de l'**adipogènesi** PPAR γ i C/EBP α es trobin disminuïts, aquests serien suficients per a què la resta del fenotip es mostri, en essència, poc alterat a les àrees esmentades en els pacients amb FPLD2. Els resultats en aquest model també suggereixen que, en el cas dels lipomes, els gens implicats en l'adipogènesi presentarien una regulació diferent, o podrien existir factors alternatius desconeguts que explicarien que, en el seu cas, l'alteració vagi inclinada a l'augment i no a la disminució, com ocorre en els lipomes NBL dels individus amb HALS.

En les laminopaties lipodistròfiques s'ha descrit que les alteracions en les lamines nuclears portarien a alteracions en la diferenciació cel·lular i a un procés de **senescència** accelerada de les mateixes³⁵⁶, fet pel qual resultà d'interès examinar l'expressió de p53 i pRb. El paper d'aquestes proteïnes en l'adipogènesi és, com hem esmentat prèviament, complex:

Els precursors adipocitaris sense Rb són incapaços de diferenciar-se en adipòcits, per la qual cosa una disminució en l'expressió del mateix es podria traduir en l'aparició d'adipòcits diferenciats d'una forma irregular i, al seu torn, explicar la reducció en l'expressió dels adipogens mestres en aquests pacients. L'activació de p53, d'altra banda, evita l'excés d'acumulació de lípids als adipòcits, per la qual cosa la seva inhibició es podria traduir en un mecanisme compensatori per a poder mantenir uns nivells de TG estables en l'escàs teixit adipós que existeix en aquestes zones lipoatròfiques¹²⁷.

L'existència d'un increment de l'expressió de **gens l'estat inflamatori** al teixit adipós lipoatròfic però no a la lipomatososa es correspon amb el descrit en pacients amb HALS. Aquesta situació d'infiltració immunitària al TAB subcutani lipoatròfic seria indicativa de les condicions de resistència a la insulina que presenten els individus amb lipodistròfies i que comparteixen amb els pacients obesos³⁸⁸. En els lipomes d'aquests pacients, tot i no detectar augments en l'expressió de marcadors proinflamatoris, sí que es detectà per immunohistoquímica una infiltració immunitària equivalent a les zones no lipomatoses, que es podria deure a l'efecte d'altres molècules quimiotàctiques conegudes o desconegudes diferents de les analitzades. D'altra banda, el fenotip d'aquestes cèl·lules immunitàries requeriria ser caracteritzat en profunditat per tal de determinar el seu caràcter proinflamatori o homeostàtic, ja que, donada aquesta manca d'inducció dels marcadors proinflamatoris, en el cas dels lipomes es pot tractar d'un possible enriquiment compensatori en macròfags M2 o en limfòcits T_{reg} o T_{H2} i elaborar-ne conclusions al respecte.

Finalment, la manca d'expressió de marcadors d'un **fenotip adipocitari termogènic** permet descartar que en els pacients amb FPLD2 la lipomatosi tingui a veure amb fenòmens de sobreproliferació d'adipòcits marrons clàssics o beix/brite. Resulta d'interès destacar que les biòpsies dels lipomes analitzats al present estudi no es trobaven originalment a la zona dorsocervical, de manera que aquestes observacions són compatibles amb la descripció de l'expressió d'UCP1 a aquesta regió en individus amb FPLD2⁴²³ i a la manca d'expressió de la mateixa als lipomes NBL de la HALS, com s'ha discutit en detall prèviament. Aquest fet permet diferenciar encara més les alteracions de tipus BH que apareixen en els individus amb HALS d'altres alteracions similars que es donen tant en la HALS com en altres lipodistròfies parcials i de forma espontània. Aquestes observacions suggereixen una implicació en l'aparició d'adipòcits marrons als lipomes BH per mecanismes que impliquen la infecció per VIH-1, el tractament HAART o una combinació de tots dos factors juntament amb la ubicació anatòmica, establint-los com una alteració única d'aquesta síndrome lipodistròfica.

A partir d'aquests resultats, es pot concloure de forma global que els lipomes presents espontàniament en individus sense altres malalties, en individus amb FPLD2 i en individus amb HALS constitueixen **alteracions clínicament similars però amb diferències pròpies en cada cas**. D'altra banda, els lipomes presents en lipodistròfies únicament mostren patrons d'expressió gènica característics de la presència d'adipòcits marrons en aquells provinents de la regió dorsocervical, tot indicant-ne un fenotip diferencial en funció de la seva localització anatòmica. **Els adipòcits que conformen els lipomes mostren, doncs, un fenotip aberrant indicatiu d'una condició patològica del teixit adipós.**

BLOC B: Identificació de noves adipocines marrons

En un moment de la història en què l'obesitat constitueix una epidèmia global, el teixit adipós ha passat a rebre un ampli interès en recerca biomèdica. Fruit d'aquest increment en el seu estudi, actualment el teixit adipós ha passat de ser considerat un reservori passiu de lípids a esdevenir una maquinària plàstica, dinàmica i àmpliament activa a l'hora de coordinar ja no tan sols l'homeòstasi energètica de l'organisme, sinó també la integració de respostes complexes a altres estímuls com, per exemple, l'exercici o el fred. Com qualsevol forma de comunicació, per tal d'integrar aquestes respostes, el teixit adipós emprà uns determinats senyals capaços de transmetre informació. En aquest cas, les adipocines seran les encarregades d'actuar de forma autocrina, paracrina i endocrina per a generar una resposta d'interès¹⁶⁰. Si bé el nombre d'adipocines del TAB conegudes ha crescut i ha estat àmpliament caracteritzat i reconegut en les darreres dècades, especialment per la seva relació amb obesitat, la producció de les mateixes per part del TAM ha quedat sovint omesa. En contrast amb el reconeixement del TAB com a òrgan endocrí, el TAM romaní relegat a ésser uns cúmuls de greix que, en petits mamífers i nadons, eren capaços de generar escalfor. No obstant, com s'ha esmentat prèviament, la redescoberta del TAM en humans adults i la seva competència funcional obrí les portes a la recerca d'estratègies d'activació del mateix per tal de prevenir o tractar les alteracions patofisiològiques pròpies de l'obesitat, en ésser els adipòcits marrons capaços d'incorporar elevades quantitats de glucosa i TG circulants per tal de satisfer les seves necessitats energètiques durant el procés de termogènesi⁴³⁶. D'aquesta manera, resulta d'especial interès elucidar les formes en què els adipòcits marrons es comuniquen entre si, amb les cèl·lules del propi dipòsit o amb altres òrgans i dipòsits per tal de coordinar aquesta activació termogènica. En aquest marc d'acció, el següent esforç de la present tesi doctoral es centrà en el descobriment d'adipocines pròpies del TAM ("adipocines marrons") tot començant per la utilització de tècniques massives i prosseguint posteriorment amb la seva caracterització funcional.

◆ Identificació de CXCL14 com a quimiocina produïda pel TAM en associació a l'activació tèrmica del mateix

Per tal d'identificar proteïnes candidates a ser considerades adipocines marrons, en la present tesi doctoral es va emprar una doble aproximació de mineria de dades transcriptòmiques (*transcriptomic data mining*). En primer lloc, s'empraren els resultats d'un bioxip de cDNA dipositat a la base de dades GEO per tal de localitzar gens sobreexpressats al TAM interescapular (iTAM) en comparació amb el TAB epididimal (eTAB) de ratolí, ambdós considerats els dipòsits més representatius del seu fenotip adipós^{11,430}. En segon lloc, es dugué a terme una seqüenciació massiva de RNA (RNA-seq) d'iTAM per tal de determinar les diferències entre el transcriptoma de ratolins establats en condicions de termoneutralitat i d'altres sotmesos a un estrès tèrmic de 24 hores a 4°C.

Les dades dels bioxips es van anar filtrant seqüencialment fins a disposar d'una base de dades de gens codificants per a proteïnes que es trobaven diferencialment expressats entre ambdós teixits. Emprant eines bioinformàtiques, es va predir quines d'aquestes proteïnes serien potencialment secretables i, de les obtingudes, se'n descartaren aquelles sobreexpressades a l'eTAB en favor de les que ho estaven a l'iTAM. Les 34 proteïnes resultants es contrastaren amb fonts bibliogràfiques i únicament 9 candidates es van mantenir com a

proteïnes sobreexpressades per l'iTAM i amb evidència experimental de la seva secreció. Per la seva banda, les dades d'expressió de l'RNA-seq es processaren fins a obtenir una base de dades de gens codificants per proteïnes l'expressió dels quals era induïda significativament pel fred. A partir de les dades anotades al sistema, es filtraren aquelles secretades a l'espai extracel·lular. Creuant els resultats de totes dues aproximacions, únicament dos candidats van passar el cribatge coincident. Els seus productes gènics eren, per tant, proteïnes secretades, més expressades al TAM respecte al TAB i, a més, induïdes per l'estímul fisiològic que activa funcionalment el TAM, el fred. Les dues proteïnes que es fixaren com a candidates a ésser adipocines marrons foren la quimiocina CXCL14 i la proproteïna codificada per *Kng1*, corresponent al cininogen d'alt pes molecular. Donada la complexa regulació post-traducciona que presenta el sistema cininogen-cinines-cal·licreïna⁴³⁷, la qual dificultava la interpretació dels resultats obtinguts per aproximacions transcriptòmiques, es procedí a començar la caracterització de candidats amb CXCL14.

En el moment de la realització d'aquest descobriment, no obstant, CXCL14 era una quimiocina recentment descoberta i poc caracteritzada. De fet, en el moment de la redacció de la present memòria segueixen havent-hi nombroses incògnites sobre la mateixa, essent-ne les principals el desconeixement de l'existència d'un possible receptor agonístic i detalls sobre les seves múltiples funcions en diversos contextos. Descrita inicialment en processos tumorals, posteriorment es va poder comprovar, com s'ha discutit prèviament, que CXCL14 també disposava de papers rellevants en la reproducció, al sistema nerviós central i, especialment d'interès, de tipus metabòlic²⁸². Com s'ha esmentat prèviament, però, existeix una controvèrsia en les funcions de CXCL14 en aquest context: Mentre que alguns apunten a accions de millora de la sensibilitat a la insulina dels adipòcits blancs²⁸⁶, altres posen CXCL14 al punt de mira del reclutament de macròfags durant l'obesitat^{284,285}. No obstant, el descobriment recent de les possibles interaccions antagonistes de CXCL14 amb l'eix CXCL12-CXCR4-CXCR7²⁸¹, juntament la implicació del mateix en la quimiotaxi de macròfags proinflamatoris al TAB⁴³⁸, suggeria que CXCL14 podria estar duent a terme funcions més homeostàtiques que inflamatòries al si dels dipòsits de TAB obès. No obstant, les aproximacions realitzades a nivell del control energètic de CXCL14 dutes a terme fins el moment únicament es centraren en el seu paper a nivell de TAB i central (com a agent modulador de la ingesta), tot ometent una possible acció al TAM. Partint d'aquesta base i dels resultats obtinguts que demostraven el seu enriquiment en la producció per part d'aquest teixit, doncs, ens centrarem en la caracterització de la implicació de CXCL14 en la biologia i en les seves possibles funcions al TAM.

Les aproximacions òmiques i bioinformàtiques resulten de gran interès per a processar grans volums de dades, si bé requereixen una posterior comprovació experimental per tal de validar les troballes emprant una tècnica estàndard. Per aquest motiu, es va procedir a analitzar els efectes del fred *in vivo* i l'expressió als diversos teixits adiposos de CXCL14 per RT-qPCR. A l'iTAM, els nivells de l'mRNA de *Cxcl14* es trobaren, efectivament, induïts respecte als de l'eTAB, i l'estímul de fred era capaç d'incrementar-ne la seva expressió en paral·lel a la de transcrits rellevants en termogènesi, com el d'UCP1 i el de PGC-1 α , mentre que altres mRNA associats a una funció immunitària i inflamació (TNF α , MCP-1) no variaven. La concentració plasmàtica de CXCL14 també augmentava per acció del fred, tot indicant una alliberació a la circulació sanguínia de la mateixa. Calculant les diferències arteriovenoses de concentració d'aquesta quimiocina entre l'aorta abdominal i la vena de Sulzer, eferent de l'iTAM, es va poder determinar que aquesta era superior en el compartiment venós, i que l'alliberació neta

de CXCL14 s'incrementava, en efecte, pel fred. Tot i que existia una tendència a l'augment, no es trobà una diferència significativa entre un estímul de fred curt (24 hores) respecte a un de perllongat (22 dies), en concordança amb l'expressió de l'mRNA a aquest teixit. Aquestes observacions *in vivo* indiquen que el TAM contribueix significativament a l'augment en els nivells circulants d'aquesta quimiocina en resposta a un estímul de fred, i que aquesta producció s'inicia a temps curts i es manté encara que l'estrès tèrmic perduri.

◆ Els adipòcits marrons expressen i secreten CXCL14 en resposta a estímuls noradrenèrgics, propis de l'activació simpàtica

A continuació, ens vam centrar en determinar els orígens cel·lulars de CXCL14 al si dels dipòsits de TAM. Separant la fracció d'adipòcits madurs de l'SVF de l'iTAM se'n va poder detectar una major expressió a la primera, en concordança amb la d'*Ucp1*. Per tant, els adipòcits marrons eren els principals responsables de l'expressió de CXCL14 al TAM. Coherentment, els nivells transcripcionals de *Cxcl14* s'indueïen durant la diferenciació en diferents models d'aquest tipus cel·lular cultivats *in vitro*, quelcom que ocorria també en paral·lel als d'*Ucp1*, indicant que forma part dels gens expressats en l'adipòcit marró madur.

Davant d'una situació de fred, la NA alliberada al si d'un dipòsit de TAM és capaç d'interactuar amb els receptors adrenèrgics β_3 presents als adipòcits marrons. Aquests prosseguiran amb la transmissió de la cascada de transducció de senyals incrementant la concentració intracel·lular d'AMPc, activant així la PKA, la qual fosforilarà les seves proteïnes diana, entre les quals es troba la p38 MAPK. D'aquesta manera, es procedirà a la inducció de l'expressió de gens rellevants per al fenotip adipocitari marró i, per tant, per a dur a terme la termogènesi adaptativa⁵⁹. Per tal de determinar la dependència de CXCL14 a aquests fenòmens, es van tractar adipòcits marrons amb NA i AMPc. En efecte, aquests tractaments foren suficients per a induir-hi no tan sols l'expressió del gen de *Cxcl14*, sinó també l'alliberació de la quimiocina al medi de cultiu. Aquests resultats confirmen que l'alliberació de CXCL14 per part dels adipòcits marrons es troba controlada per agonistes noradrenèrgics. El bloqueig de les accions de la PKA i de p38 emprant-ne inhibidors específics permeté limitar aquesta inducció transcripcional de *Cxcl14* per part de l'AMPc, tot confirmant la implicació de tot el conjunt de la via de transducció de senyals abans descrita en aquest procés. L'adipòcit marró, per tant, respon a estímuls simpàtics tot incrementant els nivells transcripcionals i alliberació de CXCL14 a l'espai extracel·lular, quelcom que suggereix una implicació real d'aquesta proteïna associada al procés termogènic.

◆ Els ratolins nounats deficientes per a CXCL14 mostren una manca de funció termogènica i alteracions en marcadors d'infiltració immunitària

Si bé, en aquest punt, les prediccions òmiques i la producció de CXCL14 per part dels adipòcits marrons quedaven confirmades, la seva funció en el procés d'activació termogènica seguia essent una incògnita. Per tal d'explorar aquesta qüestió, es va decidir prosseguir amb la caracterització en un model animal KO total pel gen *Cxcl14*. En disposar-nos a treballar amb aquest model animal, no obstant, va sorgir una dificultat inesperada: La mortalitat perinatal dels individus deficientes per a *Cxcl14* era molt elevada, especialment en mascles. Aquesta observació, de fet, ja havia estat realitzada per altres grups de recerca, els quals l'atribuïren a una menor ingesta de llet materna, fet pel qual van procedir a treballar amb una baixa mostra

de femelles adultes²⁸⁴. En aquests casos, però, els individus supervivents poden haver activat una gran quantitat de mecanismes compensatoris que emmascarin efectes reals de la deficiència, fent que el model sigui qüestionable. Com que la major part d'individus morien al tercer dia d'alletament, per tal de disposar de resultats *in vivo* vam decidir treballar amb nounats d'aquesta edat. De fet, vam poder determinar que l'expressió de *Cxcl14* a l'iTAM en cries de fenotip salvatge s'indueix àmpliament durant les primeres hores de vida i, a partir de les 24 hores, assoleix nivells similars als dels individus adults, per la qual cosa foren considerades un model substituït adient davant la mortalitat dels mateixos. Les cries KO per a *Cxcl14* no exhibiren alteracions significatives en els nivells circulants de diversos metabòlits i hormones, però mostraren una marcada tendència a nivells elevats d'insulina indicadors d'un possible estat primerenc de resistència a la mateixa. Aquests animals presentaven, com ja s'havia descrit prèviament en les femelles adultes, un menor pes i mida que els seus germans de ventrada. Tot i que el TAM dels individus KO disposava d'una mida similar al de les cries salvatges, morfològicament aquest posseïa un aspecte global més blanquinós i enriquit en el que semblava ser TAB. Aquestes observacions macroscòpiques es confirmaren a nivell microscòpic en detectar-s'hi adipòcits amb vesícules lipídiques fusionades, d'aspecte més similar al dels adipòcits blancs. Coherentment, aquestes cries mostraven una menor temperatura a la zona interescapular, tot indicant que la manca de CXCL14 provoca afectacions en el desenvolupament del TAM i en la seva funció termogènica. Per a aprofundir en aquestes troballes, es van quantificar els nivells de transcrits relacionats amb termogènesi, adipogènesi i homeòstasi lipídica. Tot i que el transcrit d'*Ucp1* es mantingué inalterat amb una tendència a la baixa, la clara reducció de la resta de marcadors de termogènesi i les observacions morfològiques del TAM dels animals KO suggereixen un compromís de la funció termogènica per problemes en l'adquisició del fenotip d'adipòcit marró madur. En concordança, els nivells de PPAR γ es trobaren disminuïts en els animals KO, els quals també mostraven una desregulació de la lipòlisi i la lipogènesi.

Durant els darrers anys, la importància de les interaccions entre el teixit adipós i el sistema immunitari han adquirit, com s'ha discutit prèviament, un interès renovat. A més de a nivell de TAB, per la seva rellevant presència en individus sans i, especialment, per la producció de mediadors inflamatoris en situacions d'obesitat i T2DM, també a nivell de TAM, donat que els macròfags activats alternativament residents al mateix són capaços de sintetitzar catecolamines (per exemple, NA) en resposta al fred i afavorir l'activació i reclutament dels adipòcits marrons^{71,289}. Aquest fet no exclou que, a més, aquestes cèl·lules immunitàries i altres cèl·lules efectores de la resposta T_H2 continuïn fent la seva funció de producció de citocines, tot contribuint a generar al si del dipòsit de TAM un entorn lliure d'inflamació favorable per a l'activació termogènica. Amb la caracterització dels adipòcits beix/brite, es va veure que als dipòsits de TAM induïble aquesta infiltració tenia una rellevància encara més gran, en estar aquests menys innervats³⁴⁸.

Per aquests motius, es procedí a analitzar també l'expressió de gens relacionats amb inflamació i residència immunitària a l'iTAM dels animals KO. La relació en l'expressió dels gens de l'arginasa 1 (*Arg1*) i l'iNOS (*Nos2*), un paràmetre indicatiu de la proporció de macròfags activats alternativament (M2) respecte als activats clàssicament (M1) al teixit en un moment determinat⁷¹, es trobà disminuïda als animals KO, tot indicant una reducció en el nombre de macròfags M2 infiltrats. Coherentment, el nombre de macròfags infiltrats en aquests animals es trobà disminuït. Si bé altres factors o funcions de CXCL14 desconegudes també hi podrien estar implicats, aquesta manca de macròfags M2 pot contribuir a explicar

l'aspecte menys diferenciat dels adipòcits marrons dels animals KO, ja que, com s'ha esmentat prèviament, la NA també actua durant l'adipogènesi dels adipòcits marrons i no únicament en la seva activació⁵⁹. Aquest fet concorda també amb estudis previs en què la disrupció gènica de les vies de senyalització que condueixen a l'activació alternativa dels macròfags es tradueix en una morfologia del TAM similar a l'observada en els animals deficientes per a *Cxcl14*⁷¹. D'altra banda, l'expressió de l'adiponectina en els nounats deficientes per *CXCL14* es trobà incrementada, un fet que podria estar relacionat novament amb situacions de compensació en ésser aquesta molècula un agent antiinflamatori i rellevant per a la proliferació dels macròfags M2 al si dels dipòsits de TAM, com s'ha demostrat recentment al TAB³⁴⁴. No obstant, els marcadors proinflamatoris es mostraren inalterats amb una tendència a l'augment, potencialment limitada per l'expressió d'altres molècules antiinflamatòries. De fet, l'increment de l'expressió de marcadors relacionats amb el reclutament i l'activació d'eosinòfils i ILC2 (*Siglec5*, IL-5, IL-33) concordaria amb una situació compensatòria en què aquests tipus cel·lulars incrementen la seva infiltració en aparèixer aquesta reducció de macròfags M2 per tal d'activar els romanents. En conjunt, aquestes observacions en les cries d'animals KO suggereixen un paper per *CXCL14* en l'activació termogènica, la funcionalitat dels adipòcits marrons i en el trànsit immunitari al TAM i destaquen la rellevància perinatal d'aquesta molècula per tal de mantenir la temperatura corporal dels animals.

● **CXCL14 no duu a terme funcions autocrines sobre els adipòcits marrons**

Tenint en compte els destacables efectes de la manca de *CXCL14* en relació a l'activació termogènica, era lògic suposar que aquesta molècula podria estar actuant sobre els adipòcits marrons per tal de suscitar-ne la seva activació. No obstant, el tractament dels mateixos amb *CXCL14* no hi generà una resposta rellevant ni n'afectà la seva diferenciació, si bé tampoc n'hi provocà un estrès inflamatori ni un increment en la mortalitat. Per tant, paradoxalment, *CXCL14* no estava desenvolupant accions de tipus autocrí, i l'adipòcit marró l'havia d'estar produint i alliberant per a realitzar alguna funció sobre altres cèl·lules o altres òrgans.

● **CXCL14 redueix la polarització dels macròfags al fenotip M1 i n'estimula l'adquisició del fenotip M2, així com la migració dels darrers**

Tenint en compte aquest marc de referència en què la infiltració immunitària al TAM havia cobrat importància, el fet que els adipòcits marrons secretessin una quimiocina de forma preferencial als blancs resultava especialment intrigant, i que aquesta producció es veiés potenciada per estímuls de fred cobrava un sentit completament nou. Podria tenir *CXCL14* alguna relació amb la component immunitària de la resposta termogènica i estar exercint accions paracrines sobre les seves cèl·lules efectores? Per tal de trobar la resposta a aquesta qüestió, es procedí a explorar els efectes de *CXCL14* sobre una línia cel·lular de macròfags murins, RAW 264.7. Aquesta línia cel·lular es troba en un estat d'activació basal, donat que expressa nivells baixos de diversos marcadors d'inflamació i homeostàtics, si bé aquests es troben lleugerament esbiaixats a un fenotip M1 donada la total absència del marcador d'activació M2, *Arg1*. Com que *CXCL14* podria estar realitzant algun efecte en macròfags activats, es va procedir a activar les cèl·lules RAW 264.7 vers les dues polaritzacions: El tractament d'aquests macròfags amb LPS o IL-4/IL-13 va permetre la seva activació als fenotips M1 o M2, respectivament. Aquesta activació quedà corroborada per la inducció de

l'expressió de marcadors transcripcionals propis de cada fenotip, com ara l'iNOS, TNF α i MCP-1 per als M1 i ARG1, CD301 (*Clec10a*) i CD206 (*Mrc1*) per als M2. El tractament d'aquests macròfags activats amb CXCL14 sí hi suscità una resposta: CXCL14 fou capaç d'inhibir l'expressió dels marcadors proinflamatoris propis de macròfags M1, amb un impacte negligible sobre els macròfags M2. Per tant, CXCL14 és capaç de reduir la polarització M1 dels macròfags, quelcom que, en el context del TAM, concorda amb el manteniment d'un microentorn antiinflamatori que afavoreix el reclutament i l'activació dels adipòcits marrons.

No obstant, eren aquestes les úniques accions que CXCL14 desenvolupava durant la termogènesi adaptativa? Dues observacions sobre la naturalesa d'aquesta molècula feien pensar que no: Primera, el tipus de proteïna de què es tracta, una quimiocina. La funció d'aquestes proteïnes és, com hem discutit prèviament, atreure cèl·lules a favor de gradient fins al seu lloc de producció²⁷⁶. La funció de desactivació dels macròfags, no obstant, la podria dur a terme una citocina o un altre tipus de factor secretable que no fos de tipus quimiocina, però els adipòcits marrons estaven secretant *concretament* una molècula d'aquest tipus en resposta a l'estrès tèrmic. Segona, el descobriment abans discutit de què CXCL14 és alliberada al torrent sanguini. L'enriquiment de CXCL14 a la circulació venosa eferent de l'iTAM suggeria l'existència d'un rol no únicament paracrí, sinó que indicava possibles accions endocrines de la mateixa. Els següents esforços es centraren, per tant, en col·locar aquestes altres peces del trencaclosques al seu lloc.

Emprant assajos de quimiotaxi *in vitro* amb els macròfags RAW 264.7 es va poder comprovar que, en efecte, CXCL14 era capaç d'atreure macròfags activats. No obstant, la seva capacitat d'atracció química era molt superior per als macròfags M2 en relació als macròfags M1, per la qual cosa es podia parlar d'accions preferencials en l'atracció dels macròfags activats alternativament cap al seu lloc de producció. Aquestes observacions concordaven amb un escenari en el qual l'adipòcit marró, especialment un cop estimulat pel fred, produeix CXCL14 per tal d'apropar macròfags M2 a la seva ubicació i beneficiar-se així de les accions de les catecolamines, citocines T_H2 i altres molècules secretables produïdes pels mateixos. No obstant, no demostraven que fos la CXCL14 secretada pels adipòcits marrons la responsable directa, en dur a terme els experiments amb una forma recombinant de la quimiocina.

◆ Els adipòcits marrons clàssics alliberen molècules capaces de reduir l'activació dels macròfags M1 i d'afavorir l'activació i reclutament dels macròfags M2, incloent CXCL14

Per tal d'aprofundir en aquests aspectes, es va emprar una estratègia de medis condicionats. En primer lloc, els macròfags RAW 264.7 polaritzats al fenotip M1 o M2 es van tractar amb medis de cultiu derivats d'adipòcits marrons clàssics i se n'analitzà el seu perfil transcripcional. Per a explorar el paper de la CXCL14 realment alliberada per aquests adipòcits marrons, en alguns medis condicionats s'hi afegí un anticòs monoclonal específic per a CXCL14 (anti-CXCL14) o bé una immunoglobulina anti-isotip inespecífica (anti-IgG). Els resultats revelaren que els medis condicionats *per se* no només permeteren induir o mantenir l'expressió dels marcadors M2 en els macròfags activats a aquest fenotip, sinó que eren capaços àdhuc de provocar la inducció d'*Arg1* i d'inhibir potentment els marcadors proinflamatoris en els macròfags M1. Prenent únicament aquestes dades ja s'infereix que els adipòcits marrons alliberen al medi extracel·lular proteïnes i/o altres molècules capaces d'influir en l'estat d'activació dels macròfags que els envolten en benefici de les necessitats

del seu microambient, és a dir, afavorint un entorn antiinflamatori que afavoreixi l'activació alternativa dels macròfags i la conseqüent producció de NA per part dels mateixos. D'altra banda, en presència de l'anticòs anti-CXCL14, es reprimia la inducció dels marcadors M2 en aquest fenotip i també l'expressió dels mateixos en macròfags M1. D'altra banda, els marcadors inflamatoris no es veien induïts ni reprimits sobre els macròfags indicant que CXCL14, en sinèrgia amb altres molècules secretables, té uns efectes més crítics sobre els macròfags del TAM al marge de les accions que realitzi per si mateixa. Un altre comportament diferencial entre els macròfags M1 i M2 tractats amb els medis condicionats fou que el medi dels adipòcits marrons era capaç d'estimular l'expressió de *Cxcl14* únicament en els macròfags M2, els quals, en condicions basals, mostren uns nivells de transcrit similars als dels macròfags M1. Per tant, tot i que els adipòcits marrons en siguin, com hem vist, els principals productors, els macròfags M2 també serien capaços de contribuir a la producció de CXCL14 de l'SVF al si del dipòsit de TAM.

Realitzant els assajos de quimiotaxi similars als abans descrits però ubicant al pou inferior de la cambra quimiotàctica el medi d'adipòcits marrons en presència o absència d'anticòs, es va comprovar que a les cambres amb medi condicionat es produïa un gran increment en la migració de macròfags M2 i una disminució en la de macròfags M1. Aquesta infiltració M2, però, es veié notablement reduïda pel bloqueig de CXCL14 amb l'anticòs específic. Aquestes observacions posaven de manifest que la CXCL14 que alliberen els propis adipòcits marrons és, en efecte, capaç d'atreure macròfags M2. El fet que el bloqueig de CXCL14 no inhibís per complet la migració de macròfags M2 i que el medi condicionat per si mateix reduís la dels M1 suggereix que altres quimiocines o molècules quimiotàctiques produïdes pels adipòcits marrons juguen també un rellevant paper en la quimiotaxi dels macròfags del TAM, si bé la naturalesa de les mateixes s'escapa a les fronteres de la present tesi doctoral.

◆ **L'alliberació sistèmica continuada de CXCL14 suscita l'activació del *browning* i un increment en la presència de macròfags M2 als dipòsits de TAB**

Mentre que els resultats descrits fins el moment acotaven el paper paracrí de la CXCL14 produïda pels adipòcits marrons en relació a l'atracció de macròfags M2 al dipòsit de TAM clàssic, no permetien detallar l'exploració dels possibles accions endocrines de la mateixa. Per tal d'aprofundir en aquest aspecte i en les funcions d'aquesta proteïna a nivell sistèmic, es va procedir a cloure els estudis establint un model animal adult de guany de funció. Per al mateix, s'implantaren quirúrgicament bombes osmòtiques (*minipumps*) a la zona interescapular de ratolins C57Bl/6j adults, les quals actuarien com a "iTAM suplementari" especialitzat únicament en l'alliberació de CXCL14 de forma continuada a la circulació general durant un període perllongat (7 dies) tot mantenint nivells circulants similars als observats en animals sotmesos a estímuls de fred crònic.

L'alliberament constant de CXCL14 durant 7 dies va suscitar una inducció del *browning* als dipòsits de TAB, tant inguinal com epididimal, evidenciada per l'aparició d'adipòcits beix/brite als mateixos, en contrast amb la seva absència en animals control. El TAM dels animals tractats, d'altra banda, no mostrà alteracions morfològiques. Tot i produir-se l'activació del *browning* als dipòsits de TAB, quelcom relacionat amb una millora de la sensibilitat a la insulina en captar els adipòcits beix/brite substrats per a la termogènesi⁴³⁶, no es van detectar canvis rellevants ni en la massa adiposa ni en els nivells sistèmics de diversos

metabòlits i hormones als animals tractats, incloent nivells inalterats de glucosa i insulina. Possibles explicacions a aquesta observació rauen en la durada relativament curta del tractament i/o al fet que els animals, de base, es trobessin en un estat de salut metabòlica en què els nivells de sensibilitat a la insulina són suficients per a les necessitats homeostàtiques de l'organisme.

De manera anàloga al que ocorria amb els adipòcits marrons clàssics, el tractament d'adipòcits blancs derivats d'eTAB o iTAB amb CXCL14 tampoc hi suscità cap resposta directa sobre gens clau del seu fenotip d'adipòcit madur, el que porta també a descartar aquestes cèl·lules com a dianes d'aquesta quimiocina per a suscitar el *browning* dels dipòsits de TAB. En realitzar una detecció per immunohistofluorescència del marcador general de macròfags F4/80 i d'un marcador de superfície de macròfags M2, CD206 (*Mrc1*), es va poder comprovar que el *browning* dels dipòsits de TAB estava, efectivament, acompanyat d'un increment en la infiltració de macròfags, enriquit en els de tipus M2. Al TAM, no obstant, l'alliberació sistèmica continuada de CXCL14 no hi provocà increments significatius en la infiltració de macròfags.

Per a indagar en aquestes observacions a nivell molecular, novament s'analitzaren els transcrits d'una àmplia bateria de gens relacionats amb la funció termogènica dels adipòcits marrons, amb adipogènesi i funció d'homeòstasi lipídica dels adipòcits en general i d'infiltració immunitària i inflamació. Al TAM, l'expressió de la major part d'aquests gens es mostrà inalterada, si bé existia una tendència a la baixa en aquells de tipus termogènica. En concordança amb les observacions morfològiques, els transcrits relacionats amb termogènesi, entre els quals hi havia UCP1, s'indueïren tant al compartiment subcutani com al visceral. Aquest comportament concorda amb el paradigma actual respecte a la termogènesi adaptativa, en què l'activació termogènica del TAM clàssic i de l'induïble es regulen recíprocament per tal d'evitar una despesa energètica i generació d'escalfor excessives⁴³⁶. D'altra banda, els marcadors de funció adipocitària mostraren un comportament diferencial entre l'iTAB i l'eTAB: Mentre que a l'iTAB es detectà un increment en l'expressió de gens relacionats amb adipogènesi (PPAR γ) i lipòlisi (ATGL i HSL), en el cas de l'eTAB tan sols es detectà una reducció en el transcrit de la leptina, observacions indicadores d'un estat d'activació metabòlica del TAB. Finalment, quant als marcadors d'infiltració immunitària, la inducció en els marcadors de macròfags activats al fenotip M2 fou especialment palesa a l'iTAB, si bé també es pogué detectar a l'eTAB. La presència de macròfags M1 també s'induí als dos dipòsits de TAB, si bé aquests mostrarien una activació parcial, consistent només per en un increment en els nivells transcripcionals d'iNOS. Resulta d'interès també destacar l'augment en l'expressió de transcrits propis d'eosinòfils (CCR3, *Siglec5*) o relacionats amb l'activació dels mateixos (METRNL, IL-5), quelcom que suggereix la infiltració ja no tan sols de macròfags, sinó també d'eosinòfils, als dipòsits de TAB dels animals tractats amb CXCL14. Finalment, l'mRNA de la IL-33, implicada com hem vist en l'activació de les ILC2, es trobà incrementat en tots tres tipus de teixit adipós.

Globalment, aquests resultats demostren l'existència d'un paper de CXCL14 també endocrí: Un cop alliberada a la circulació, CXCL14 és capaç d'arribar als dipòsits de TAB i exercir-hi les seves funcions d'atracció de macròfags, els quals s'hi polaritzaran al fenotip M2. Fins el moment de la redacció de la present tesi doctoral, únicament s'ha descrit que CXCL14 sigui capaç d'atreure cèl·lules del llinatge monocitari, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules NK²⁸². No obstant, la possibilitat de què sigui capaç d'atreure altres tipus cel·lulars roman per determinar. Es creu que la resposta immunitària T_H2 va evolucionar per a combatre Eosinòfils i

ILC2 són interessants candidats a respondre quimiotàcticament a la mateixa, donat el seu important paper en l'activació termogènica i durant el *browning* de dipòsits de TAB per tal de sustentar i afavorir l'activació alternativa dels macròfags infiltrats^{330,345-347}. Aquesta suposició no obstant resta per determinar, donat que desconeixem de l'existència d'un receptor agonístic o el fet que CXCL14 sigui una molècula pleiotròpica i que pugui dur a terme accions diverses en funció de diferents factors en dificulten el seu estudi.

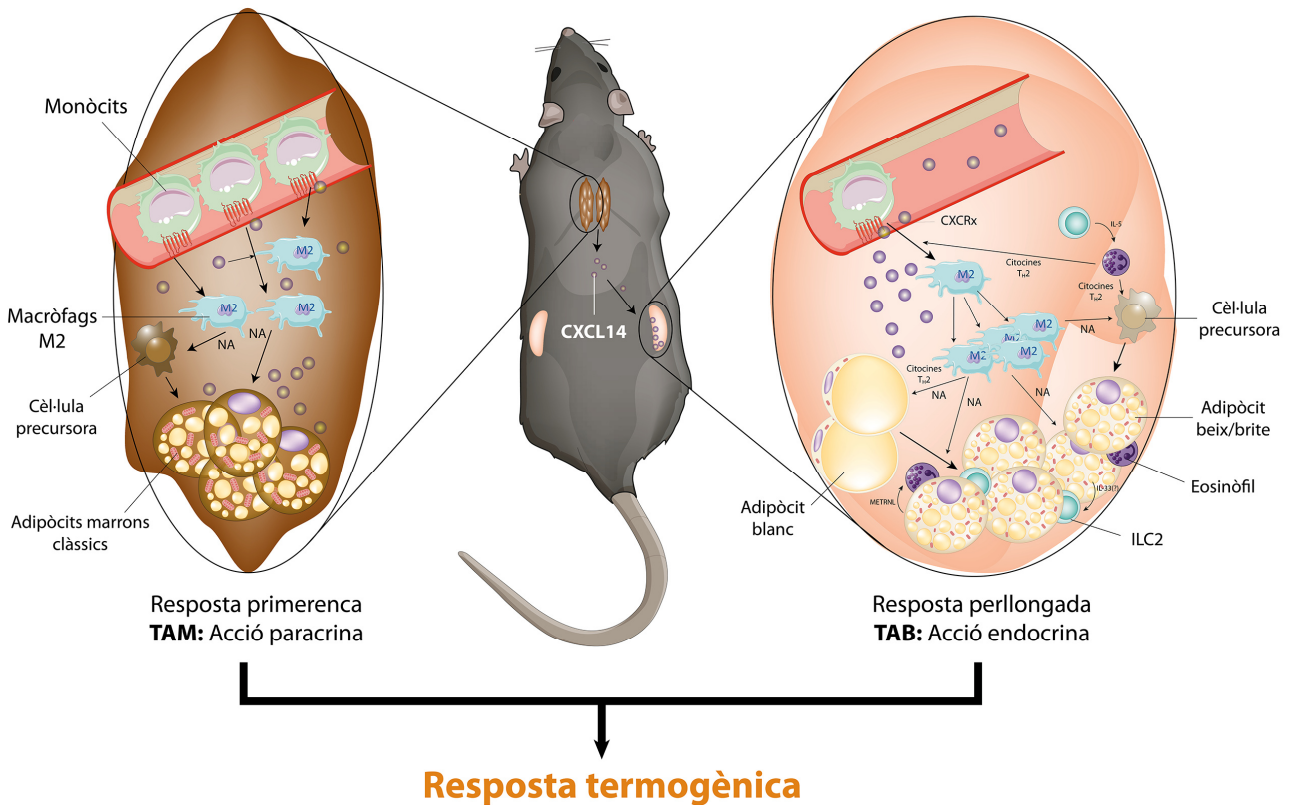
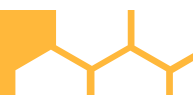


Figura 20: Model d'acció proposat per a CXCL14 en la coordinació de la resposta termogènica i infiltració de macròfags al TAM i al TAB.

En resum, tot i que el reclutament de macròfags M2 s'havia definit com un aconteixement rellevant durant l'activació termogènica del TAM i el *browning* del TAB, el mecanisme pel qual tenia lloc aquesta infiltració havia romàs desconegut fins el moment. A la present tesi doctoral s'ha pogut identificar l'**adipocina marró CXCL14**, que estableix una **nova via de comunicació entre els adipòcits marrons i els macròfags M2 i n'afavoreix la seva infiltració tant al TAM com al TAB (Fig. 20)**. Aquestes troballes remarquen que els adipòcits marrons no són únicament fonts d'escalfor cel·lulars, sinó que disposen de funcions secretores actives que els permeten **orquestrar la resposta termogènica global** en situacions de demanda calorífica i, en el cas que ens ocupa, emprant com a agents cel·lulars immunitàries. Si bé cal més una recerca més extensa al respecte, els estudis duts a terme durant la present tesi doctoral obren les portes a l'establiment de potencials estratègies d'immunoteràpia per tal de modular l'activació i reclutament dels dipòsits de TAM humà i actuar sobre els efectes deleteris de l'obesitat i la T2DM.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS



Les conclusions que es deriven del treball realitzat a la present tesi doctoral són les que s'indiquen a continuació:

BLOC A: Bases moleculars de la lipomatosi associada a les lipodistròfies parcials

1. Els lipomes de tipus “gep de búfal” i els presents a altres localitzacions anatòmiques a la síndrome lipodistròfica associada a la infecció pel VIH-1 i a la teràpia HAART mostren patrons d'adipogènesi i funció adipocitària inalterada, d'immunoevasió i de disfunció mitocondrial.
2. Les dues formes de lipomatosi presents a la síndrome lipodistròfica associada a la infecció pel VIH-1 i a la teràpia HAART presenten signes d'estar sotmeses a un estat de proliferació activa i d'envelliment cel·lular exacerbat.
3. L'estudi de mostres de teixit adipós marró humà de pacients adults amb feocromocitoma i neonatals indicà que *ZIC1* és un marcador fiable d'adipòcits marrons clàssics, mentre que els marcadors de beix/brite descrits fins al moment tenen una aplicabilitat menys definida.
4. Únicament els lipomes de tipus “gep de búfal” de la síndrome lipodistròfica associada a la infecció pel VIH-1 i a la teràpia HAART presenten un patró transcripcional corresponent a la presència d'adipòcits marrons clàssics.
5. Els lipomes presents a la lipodistròfia parcial familiar de tipus 2 mostren alteracions parcialment similars a les dels que sorgeixen a la síndrome lipodistròfica associada a la infecció pel VIH-1 i a la teràpia HAART.

BLOC B: Identificació de noves adipocines marrons

6. S'ha identificat CXCL14 com a quimiocina produïda pel teixit adipós marró en resposta a la seva activació termogènica.
7. Els adipòcits marrons expressen i secreten CXCL14 en resposta a estímuls noradrenèrgics, propis de l'activació simpàtica.
8. Els ratolins nounats deficientes per a CXCL14 mostren una manca de funció termogènica i alteracions en marcadors d'infiltració immunitària.
9. CXCL14 no duu a terme funcions autocrines sobre els adipòcits marrons.
10. CXCL14 redueix la polarització dels macròfags al fenotip M1 i n'estimula l'adquisició del fenotip M2, així com la migració dels darrers.

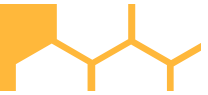
Conclusions

11. Els adipòcits marrons clàssics alliberen molècules, incloent CXCL14, capaces de reduir l'activació dels macròfags M1 i d'afavorir l'activació i reclutament dels macròfags M2.
12. L'alliberació sistèmica continuada de CXCL14 indueix l'activació del *browning* i del reclutament de macròfags M2 als dipòsits de teixit adipós blanc.
13. En resum, hem descrit una nova via per la qual, front a l'estímul termogènic, el teixit adipós marró, mitjançant l'alliberament de CXCL14, promouria el *browning* del teixit adipós blanc gràcies a la inducció del reclutament de macròfags M2.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA



- 1 Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**, 20-44 (2014).
- 2 Haslam, D. W. & James, W. P. Obesity. *Lancet* **366**, 1197-1209 (2005).
- 3 Zafrir, B. Brown adipose tissue: research milestones of a potential player in human energy balance and obesity. *Horm Metab Res* **45**, 774-785 (2013).
- 4 Bays, H. E. Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol* **57**, 2461-2473 (2011).
- 5 Tavassoli, M. & Crosby, W. H. Bone marrow histogenesis: a comparison of fatty and red marrow. *Science* **169**, 291-293 (1970).
- 6 Scheller, E. L. & Rosen, C. J. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann NY Acad Sci* **1311**, 14-30 (2014).
- 7 Gesta, S. *et al.* Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6676-6681 (2006).
- 8 Tchkonina, T. *et al.* Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* **55**, 2571-2578 (2006).
- 9 Kirkland, J. L., Hollenberg, C. H. & Gillon, W. S. Effects of fat depot site on differentiation-dependent gene expression in rat preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* **20 Suppl 3**, S102-107 (1996).
- 10 Cinti, S. Anatomy of the adipose organ. *Eat Weight Disord* **5**, 132-142 (2000).
- 11 Walden, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B. & Nedergaard, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E19-31 (2012).
- 12 Arner, P. Regional adiposity in man. *J Endocrinol* **155**, 191-192 (1997).
- 13 Huttunen, P., Hirvonen, J. & Kinnula, V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **46**, 339-345 (1981).
- 14 English, J. T., Patel, S. K. & Flanagan, M. J. Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology* **107**, 279-281 (1973).
- 15 Brines, O. A. & Johnson, M. H. Hibernoma, a special fatty tumor; report of a case. *Am J Pathol* **25**, 467-479 (1949).
- 16 Hany, T. F. *et al.* Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **29**, 1393-1398 (2002).
- 17 Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E444-452 (2007).
- 18 Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**, 1509-1517 (2009).
- 19 Saito, M. *et al.* High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526-1531 (2009).

Bibliografia

- 20 van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* **360**, 1500-1508 (2009).
- 21 Virtanen, K. A. *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**, 1518-1525 (2009).
- 22 Zingaretti, M. C. *et al.* The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* **23**, 3113-3120 (2009).
- 23 Symonds, M. E. *et al.* Thermal imaging to assess age-related changes of skin temperature within the supraclavicular region co-locating with brown adipose tissue in healthy children. *J Pediatr* **161**, 892-898 (2012).
- 24 Peirce, V., Carobbio, S. & Vidal-Puig, A. The different shades of fat. *Nature* **510**, 76-83 (2014).
- 25 Sharp, L. Z. *et al.* Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* **7**, e49452 (2012).
- 26 Ottaviani, E., Malagoli, D. & Franceschi, C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol* **174**, 1-4 (2011).
- 27 Young, S. G. & Zechner, R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* **27**, 459-484 (2013).
- 28 Rodbell, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* **239**, 375-380 (1964).
- 29 Trayhurn, P. Adipocyte biology. *Obes Rev* **8 Suppl 1**, 41-44 (2007).
- 30 Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G. & Cinti, S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol* **170**, R159-171 (2014).
- 31 Young, P., Arch, J. R. & Ashwell, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* **167**, 10-14 (1984).
- 32 Vitali, A. *et al.* The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* **53**, 619-629 (2012).
- 33 Ishibashi, J. & Seale, P. Medicine. Beige can be slimming. *Science* **328**, 1113-1114 (2010).
- 34 Petrovic, N. *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* **285**, 7153-7164 (2010).
- 35 Schulz, T. J. *et al.* Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 143-148 (2011).
- 36 Rosenwald, M. & Wolfrum, C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* **3**, 4-9 (2014).
- 37 Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366-376 (2012).
- 38 Fisher, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* **26**, 271-281 (2012).

- 39 Giralt, M. & Villarroya, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154**, 2992-3000 (2013).
- 40 Tavassoli, M. Ultrastructural development of bone marrow adipose cell. *Acta Anat (Basel)* **94**, 65-77 (1976).
- 41 Krings, A. *et al.* Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* **50**, 546-552 (2012).
- 42 Rahman, S. *et al.* Inducible brown adipose tissue, or beige fat, is anabolic for the skeleton. *Endocrinology* **154**, 2687-2701 (2013).
- 43 Hall, K. D. *et al.* Energy balance and its components: implications for body weight regulation. *Am J Clin Nutr* **95**, 989-994 (2012).
- 44 Lichtenbelt, W., Kingma, B., van der Lans, A. & Schellen, L. Cold exposure--an approach to increasing energy expenditure in humans. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 165-167 (2014).
- 45 Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* **2**, 282-286 (2001).
- 46 Strable, M. S. & Ntambi, J. M. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 199-214 (2010).
- 47 Brasaemle, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* **48**, 2547-2559 (2007).
- 48 Barneda, D., Frontini, A., Cinti, S. & Christian, M. Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 924-933 (2013).
- 49 Shimizu, T. & Yokotani, K. Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated beta3-adrenoreceptors. *Biochem Biophys Res Commun* **387**, 294-299 (2009).
- 50 Garg, A. & Agarwal, A. K. Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 507-513 (2009).
- 51 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**, 4753-4759 (1993).
- 52 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).
- 53 Townsend, K. L. & Tseng, Y. H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 168-177 (2014).
- 54 Fruhbeck, G., Mendez-Gimenez, L., Fernandez-Formoso, J. A., Fernandez, S. & Rodriguez, A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev* **27**, 63-93 (2014).
- 55 Sztalryd, C. *et al.* Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* **161**, 1093-1103 (2003).
- 56 Goldberg, I. J., Eckel, R. H. & Abumrad, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S86-90 (2009).
- 57 Hatai, S. On the presence in human embryos of an interscapular gland corresponding to the so-called hibernating gland of lower mammals. *Anat Anz*, 369-373 (1902).

Bibliografia

- 58 Rasmussen, A. T. The so-called hibernating gland. *J Morphol*, 147-205 (1923).
- 59 Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359 (2004).
- 60 Geloën, A., Collet, A. J., Guay, G. & Bukowiecki, L. J. In vivo differentiation of brown adipocytes in adult mice: an electron microscopic study. *Am J Anat* **188**, 366-372 (1990).
- 61 Golozoubova, V. *et al.* Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* **18**, 384-401 (2004).
- 62 Haman, F. Shivering in the cold: from mechanisms of fuel selection to survival. *J Appl Physiol (1985)* **100**, 1702-1708 (2006).
- 63 Nakamura, K. & Morrison, S. F. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* **11**, 62-71 (2008).
- 64 Haman, F., Blondin, D. P., Imbeault, M. A. & Maneshi, A. Metabolic requirements of shivering humans. *Front Biosci (Schol Ed)* **2**, 1155-1168 (2010).
- 65 Meigal, A. Gross and fine neuromuscular performance at cold shivering. *Int J Circumpolar Health* **61**, 163-172 (2002).
- 66 Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* **15**, 659-667 (2013).
- 67 Boulant, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* **31 Suppl 5**, S157-161 (2000).
- 68 Morrison, S. F., Madden, C. J. & Tupone, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab* **19**, 741-756 (2014).
- 69 Whittle, A. J., Lopez, M. & Vidal-Puig, A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* **17**, 405-411 (2011).
- 70 Ye, L. *et al.* Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12480-12485 (2013).
- 71 Nguyen, K. D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**, 104-108 (2011).
- 72 Bronnikov, G. *et al.* beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. *Endocrinology* **140**, 4185-4197 (1999).
- 73 Bengtsson, T., Cannon, B. & Nedergaard, J. Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *Biochem J* **347 Pt 3**, 643-651 (2000).
- 74 Bourova, L., Pesanova, Z., Novotny, J., Bengtsson, T. & Svoboda, P. Differentiation of cultured brown adipocytes is associated with a selective increase in the short variant of g(s)alpha protein. Evidence for higher functional activity of g(s)alphaS. *Mol Cell Endocrinol* **167**, 23-31 (2000).
- 75 Chaudhry, A., MacKenzie, R. G., Georgic, L. M. & Granneman, J. G. Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. *Cell Signal* **6**, 457-465 (1994).

- 76 Nahmias, C. *et al.* Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J* **10**, 3721-3727 (1991).
- 77 Emorine, L. J. *et al.* Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* **245**, 1118-1121 (1989).
- 78 Zhao, J., Cannon, B. & Nedergaard, J. alpha1-Adrenergic stimulation potentiates the thermogenic action of beta3-adrenoceptor-generated cAMP in brown fat cells. *J Biol Chem* **272**, 32847-32856 (1997).
- 79 Thonberg, H., Lindgren, E. M., Nedergaard, J. & Cannon, B. As the proliferation promoter noradrenaline induces expression of ICER (induced cAMP early repressor) in proliferative brown adipocytes, ICER may not be a universal tumour suppressor. *Biochem J* **354**, 169-177 (2001).
- 80 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 alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem J* **364**, 73-79 (2002).
- 81 Lindquist, J. M. & Rehnmark, S. Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival. *J Biol Chem* **273**, 30147-30156 (1998).
- 82 Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W. & Collins, S. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **276**, 27077-27082 (2001).
- 83 Meister, B., Fried, G., Hokfelt, T., Hemmings, H. C., Jr. & Greengard, P. Immunohistochemical evidence for the existence of a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) in brown adipose tissue of pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8713-8716 (1988).
- 84 Prusiner, S. B., Cannon, B., Ching, T. M. & Lindberg, O. Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. 2. Catecholamine regulated respiratory control. *Eur J Biochem* **7**, 51-57 (1968).
- 85 Nicholls, D. G., Bernson, V. S. & Heaton, G. M. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl* **32**, 89-93 (1978).
- 86 Ramsden, D. B. *et al.* Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain Behav* **2**, 468-478 (2012).
- 87 Matthias, A. *et al.* Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem* **275**, 25073-25081 (2000).
- 88 Krauss, S., Zhang, C. Y. & Lowell, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 248-261 (2005).
- 89 Nicholls, D. G. & Locke, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**, 1-64 (1984).
- 90 Reed, N. & Fain, J. N. Potassium-dependent stimulation of respiration in brown fat cells by fatty acids and lipolytic agents. *J Biol Chem* **243**, 6077-6083 (1968).
- 91 Fedorenko, A., Lishko, P. V. & Kirichok, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* **151**, 400-413 (2012).
- 92 Segal, K. R. *et al.* Independent effects of obesity and insulin resistance on postprandial thermogenesis in men. *J Clin Invest* **89**, 824-833 (1992).

Bibliografia

- 93 Young, J. B., Saville, E., Rothwell, N. J., Stock, M. J. & Landsberg, L. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. *J Clin Invest* **69**, 1061-1071 (1982).
- 94 Rothwell, N. J. & Stock, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31-35 (1979).
- 95 Rothwell, N. J. & Stock, M. J. A role for insulin in the diet-induced thermogenesis of cafeteria-fed rats. *Metabolism* **30**, 673-678 (1981).
- 96 Commins, S. P., Watson, P. M., Frampton, I. C. & Gettys, T. W. Leptin selectively reduces white adipose tissue in mice via a UCP1-dependent mechanism in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E372-377 (2001).
- 97 Gesta, S., Tseng, Y. H. & Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**, 242-256 (2007).
- 98 Tran, K. V. *et al.* The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* **15**, 222-229 (2012).
- 99 Cristancho, A. G. & Lazar, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 722-734 (2011).
- 100 Kirtland, J. & Harris, P. M. Changes in adipose tissue of the rat due early undernutrition followed by rehabilitation. 3. Changes in cell replication studied with tritiated thymidine. *Br J Nutr* **43**, 33-43 (1980).
- 101 Symonds, M. E. Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica (Cairo)* **2013**, 305763 (2013).
- 102 Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961-967 (2008).
- 103 Sanchez-Gurmaches, J. & Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun* **5**, 4099 (2014).
- 104 Sanchez-Gurmaches, J. *et al.* PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab* **16**, 348-362 (2012).
- 105 Takada, I., Kouzmenko, A. P. & Kato, S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 442-447 (2009).
- 106 Ross, S. E. *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* **289**, 950-953 (2000).
- 107 Kanazawa, A. *et al.* Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 505-510 (2005).
- 108 Zamani, N. & Brown, C. W. Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr Rev* **32**, 387-403 (2011).
- 109 Choy, L., Skillington, J. & Derynck, R. Roles of autocrine TGF- β receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* **149**, 667-682 (2000).
- 110 Hata, K. *et al.* Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell* **14**, 545-555 (2003).
- 111 Skillington, J., Choy, L. & Derynck, R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *J Cell Biol* **159**, 135-146 (2002).

- 112 Sottile, V. & Seuwen, K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). *FEBS Lett* **475**, 201-204 (2000).
- 113 Tseng, Y. H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000-1004 (2008).
- 114 Kuo, M. M. *et al.* BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials* **35**, 3172-3179 (2014).
- 115 Elsen, M. *et al.* BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C431-440 (2014).
- 116 Nakajima, I., Yamaguchi, T., Ozutsumi, K. & Aso, H. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation* **63**, 193-200 (1998).
- 117 Bernot, D. *et al.* Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) expression is necessary for adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **285**, 6508-6514 (2010).
- 118 Liu, J., DeYoung, S. M., Zhang, M., Cheng, A. & Saltiel, A. R. Changes in integrin expression during adipocyte differentiation. *Cell Metab* **2**, 165-177 (2005).
- 119 Green, H. & Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133 (1974).
- 120 Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. & Aubin, J. E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* **106**, 2139-2151 (1988).
- 121 Tang, Q. Q., Otto, T. C. & Lane, M. D. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 44-49 (2003).
- 122 Gupta, R. K. *et al.* Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* **464**, 619-623 (2010).
- 123 Kang, S. *et al.* Regulation of early adipose commitment by Zfp521. *PLoS Biol* **10**, e1001433 (2012).
- 124 Stephens, J. M. The fat controller: adipocyte development. *PLoS Biol* **10**, e1001436 (2012).
- 125 Akerblad, P., Lind, U., Liberg, D., Bamberg, K. & Sigvardsson, M. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **22**, 8015-8025 (2002).
- 126 Lefterova, M. I. & Lazar, M. A. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 107-114 (2009).
- 127 Hallenborg, P., Feddersen, S., Madsen, L. & Kristiansen, K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets* **13**, 235-246 (2009).
- 128 Hwang, C. S., Loftus, T. M., Mandrup, S. & Lane, M. D. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 231-259 (1997).
- 129 Siersbaek, R. *et al.* Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J* **30**, 1459-1472 (2011).
- 130 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**, 168-181 (1995).

Bibliografia

- 131 Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C. & Lane, M. D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* **279**, 4471-4478 (2004).
- 132 Wiper-Bergeron, N., Salem, H. A., Tomlinson, J. J., Wu, D. & Hache, R. J. Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2703-2708 (2007).
- 133 Wiper-Bergeron, N., Wu, D., Pope, L., Schild-Poulter, C. & Hache, R. J. Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J* **22**, 2135-2145 (2003).
- 134 Fajas, L. *et al.* The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell* **3**, 903-910 (2002).
- 135 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**, 7432-7443 (1997).
- 136 Tang, Q. Q., Zhang, J. W. & Daniel Lane, M. Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 235-239 (2004).
- 137 Johnson, P. F. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* **118**, 2545-2555 (2005).
- 138 Porse, B. T. *et al.* E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* **107**, 247-258 (2001).
- 139 Meruvu, S., Hugendubler, L. & Mueller, E. Regulation of adipocyte differentiation by the zinc finger protein ZNF638. *J Biol Chem* **286**, 26516-26523 (2011).
- 140 Ishibashi, J. *et al.* An Evi1-C/EBPbeta complex controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression to initiate white fat cell differentiation. *Mol Cell Biol* **32**, 2289-2299 (2012).
- 141 Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* **77**, 289-312 (2008).
- 142 Koutnikova, H. *et al.* Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14457-14462 (2003).
- 143 Zhu, Y. *et al.* Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7921-7925 (1995).
- 144 Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 885-896 (2006).
- 145 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**, 5495-5503 (1999).
- 146 Kim, J. B. & Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* **10**, 1096-1107 (1996).
- 147 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**, 4333-4337 (1998).
- 148 Chandra, V. *et al.* Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **456**, 350-356 (2008).

- 149 Guan, H. P., Ishizuka, T., Chui, P. C., Lehrke, M. & Lazar, M. A. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* **19**, 453-461 (2005).
- 150 Yu, C. *et al.* The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* **280**, 13600-13605 (2005).
- 151 White, R. *et al.* Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett* **582**, 39-45 (2008).
- 152 Kawai, M. *et al.* A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR-gamma nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10508-10513 (2010).
- 153 Wang, J. & Lazar, M. A. Bifunctional role of Rev-erbalpha in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **28**, 2213-2220 (2008).
- 154 Tong, Q. *et al.* Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* **290**, 134-138 (2000).
- 155 Smas, C. M. & Sul, H. S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**, 725-734 (1993).
- 156 Villanueva, C. J. *et al.* TLE3 is a dual-function transcriptional coregulator of adipogenesis. *Cell Metab* **13**, 413-427 (2011).
- 157 Villanueva, C. J. *et al.* Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPARgamma specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab* **17**, 423-435 (2013).
- 158 Park, A., Kim, W. K. & Bae, K. H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* **6**, 33-42 (2014).
- 159 Styner, M., Sen, B., Xie, Z., Case, N. & Rubin, J. Indomethacin promotes adipogenesis of mesenchymal stem cells through a cyclooxygenase independent mechanism. *J Cell Biochem* **111**, 1042-1050 (2010).
- 160 Harwood, H. J., Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* **63**, 57-75 (2012).
- 161 Nielsen, R. *et al.* Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* **22**, 2953-2967 (2008).
- 162 Steger, D. J. *et al.* Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev* **24**, 1035-1044 (2010).
- 163 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**, 151-158 (1999).
- 164 Schupp, M. *et al.* Re-expression of GATA2 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma depletion to revert the adipocyte phenotype. *J Biol Chem* **284**, 9458-9464 (2009).
- 165 Imai, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4543-4547 (2004).
- 166 Nedergaard, J., Petrovic, N., Lindgren, E. M., Jacobsson, A. & Cannon, B. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1740**, 293-304 (2005).
- 167 Kajimura, S., Seale, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab* **11**, 257-262 (2010).

Bibliografia

- 168 Carmona, M. C. *et al.* Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* **277**, 21489-21498 (2002).
- 169 Timmons, J. A. *et al.* Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4401-4406 (2007).
- 170 Rajakumari, S. *et al.* EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab* **17**, 562-574 (2013).
- 171 Seale, P. *et al.* Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* **6**, 38-54 (2007).
- 172 Kajimura, S. *et al.* Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* **460**, 1154-1158 (2009).
- 173 Kajimura, S. *et al.* Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev* **22**, 1397-1409 (2008).
- 174 Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835-840 (2010).
- 175 Feuermann, Y. *et al.* MiR-193b and miR-365-1 are not required for the development and function of brown fat in the mouse. *RNA Biol* **10**, 1807-1814 (2013).
- 176 Sun, L. *et al.* Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol* **13**, 958-965 (2011).
- 177 Trajkovski, M. & Lodish, H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* **24**, 442-450 (2013).
- 178 Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839 (1998).
- 179 Ruas, J. L. *et al.* A PGC-1alpha isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* **151**, 1319-1331 (2012).
- 180 Cao, W. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* **24**, 3057-3067 (2004).
- 181 Tiraby, C. *et al.* Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* **278**, 33370-33376 (2003).
- 182 Uldry, M. *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* **3**, 333-341 (2006).
- 183 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**, 2829-2838 (2006).
- 184 Wulf, A. *et al.* T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol Cell Endocrinol* **287**, 90-95 (2008).
- 185 Seale, P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* **121**, 96-105 (2011).
- 186 Barbera, M. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* **276**, 1486-1493 (2001).

- 187 Hondares, E. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem* **286**, 43112-43122 (2011).
- 188 Kong, X. *et al.* IRF4 is a key thermogenic transcriptional partner of PGC-1alpha. *Cell* **158**, 69-83 (2014).
- 189 Scime, A. *et al.* Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* **2**, 283-295 (2005).
- 190 Hallberg, M. *et al.* A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Mol Cell Biol* **28**, 6785-6795 (2008).
- 191 Cederberg, A. *et al.* FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106**, 563-573 (2001).
- 192 Gburcik, V., Cawthorn, W. P., Nedergaard, J., Timmons, J. A. & Cannon, B. An essential role for Tbx15 in the differentiation of brown and "brite" but not white adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E1053-1060 (2012).
- 193 Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* **19**, 1252-1263 (2013).
- 194 Lee, Y. H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P. & Granneman, J. G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* **15**, 480-491 (2012).
- 195 Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* **19**, 1338-1344 (2013).
- 196 Long, J. Z. *et al.* A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab* **19**, 810-820 (2014).
- 197 Himms-Hagen, J. *et al.* Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C670-681 (2000).
- 198 Barbatelli, G., Morroni, M., Vinesi, P., Cinti, S. & Michetti, F. S-100 protein in rat brown adipose tissue under different functional conditions: a morphological, immunocytochemical, and immunochemical study. *Exp Cell Res* **208**, 226-231 (1993).
- 199 Barbatelli, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E1244-1253 (2010).
- 200 Morroni, M. *et al.* Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16801-16806 (2004).
- 201 Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K. & Kaneda, Y. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biol* **10**, e1001314 (2012).
- 202 Jimenez, M. *et al.* Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *Eur J Biochem* **270**, 699-705 (2003).
- 203 Konkar, A. A., Zhai, Y. & Granneman, J. G. beta1-adrenergic receptors mediate beta3-adrenergic-independent effects of CGP 12177 in brown adipose tissue. *Mol Pharmacol* **57**, 252-258 (2000).
- 204 Alvarez, R. *et al.* A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* **270**, 5666-5673 (1995).

Bibliografia

- 205 Rosell, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and -gamma, and cAMP-mediated pathways, control retinol-binding protein-4 gene expression in brown adipose tissue. *Endocrinology* **153**, 1162-1173 (2012).
- 206 Mercader, J. *et al.* Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* **147**, 5325-5332 (2006).
- 207 Villarroya, F. & Vidal-Puig, A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* **17**, 638-643 (2013).
- 208 Lopez, M. *et al.* Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* **16**, 1001-1008 (2010).
- 209 Madsen, L. *et al.* UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* **5**, e11391 (2010).
- 210 Vegiopoulos, A. *et al.* Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* **328**, 1158-1161 (2010).
- 211 Li, P., Zhu, Z., Lu, Y. & Granneman, J. G. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E617-626 (2005).
- 212 Cabrero, A. *et al.* Uncoupling protein-3 mRNA levels are increased in white adipose tissue and skeletal muscle of bezafibrate-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 547-556 (1999).
- 213 Watanabe, M. *et al.* Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* **439**, 484-489 (2006).
- 214 Hondares, E. *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **286**, 12983-12990 (2011).
- 215 Hondares, E. *et al.* Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* **11**, 206-212 (2010).
- 216 Bostrom, P. *et al.* A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468 (2012).
- 217 Bordicchia, M. *et al.* Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* **122**, 1022-1036 (2012).
- 218 Moreno-Aliaga, M. J. *et al.* Cardiotrophin-1 is a key regulator of glucose and lipid metabolism. *Cell Metab* **14**, 242-253 (2011).
- 219 Whittle, A. J. *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871-885 (2012).
- 220 Zhang, W. *et al.* Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice. *J Physiol* **588**, 4117-4129 (2010).
- 221 Bonet, M. L., Oliver, P. & Palou, A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 969-985 (2013).
- 222 Grundlingh, J., Dargan, P. I., El-Zanfaly, M. & Wood, D. M. 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol* **7**, 205-212 (2011).
- 223 Yen, M. & Ewald, M. B. Toxicity of weight loss agents. *J Med Toxicol* **8**, 145-152 (2012).

- 224 Arch, J. R. The discovery of drugs for obesity, the metabolic effects of leptin and variable receptor pharmacology: perspectives from beta3-adrenoceptor agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **378**, 225-240 (2008).
- 225 Hunt, S. D. & Stephens, D. J. The role of motor proteins in endosomal sorting. *Biochem Soc Trans* **39**, 1179-1184 (2011).
- 226 Prudovsky, I. *et al.* The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. *J Cell Sci* **116**, 4871-4881 (2003).
- 227 Tanudji, M., Hevi, S. & Chuck, S. L. Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. *J Cell Sci* **115**, 3849-3857 (2002).
- 228 Xie, L., O'Reilly, C. P., Chapes, S. K. & Mora, S. Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 99-108 (2008).
- 229 Tanaka, M. *et al.* Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **359**, 194-201 (2007).
- 230 Kienzle, C. & von Blume, J. Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* **24**, 584-593 (2014).
- 231 Brandizzi, F. & Barlowe, C. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 382-392 (2013).
- 232 Martin, S. *et al.* Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3427-3438 (2000).
- 233 Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016 (2000).
- 234 Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G. & Brunak, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* **17**, 349-356 (2004).
- 235 Kennedy, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140**, 578-596 (1953).
- 236 Coleman, D. L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* **9**, 294-298 (1973).
- 237 Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
- 238 Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 85-97 (2011).
- 239 Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770 (1998).
- 240 Ahima, R. S. *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**, 250-252 (1996).
- 241 Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. & Mantzoros, C. S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* **111**, 1409-1421 (2003).
- 242 Lord, G. M. *et al.* Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* **394**, 897-901 (1998).

Bibliografia

- 243 Fried, S. K., Ricci, M. R., Russell, C. D. & Laferrere, B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* **130**, 3127S-3131S (2000).
- 244 Steinberg, G. R., Parolin, M. L., Heigenhauser, G. J. & Dyck, D. J. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E187-192 (2002).
- 245 Steinberg, G. R. *et al.* Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E57-63 (2004).
- 246 Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271**, 10697-10703 (1996).
- 247 Maeda, K. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 286-289 (1996).
- 248 Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **270**, 26746-26749 (1995).
- 249 Schraw, T., Wang, Z. V., Halberg, N., Hawkins, M. & Scherer, P. E. Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* **149**, 2270-2282 (2008).
- 250 Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I. & Scherer, P. E. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**, 753-768, x-xi (2008).
- 251 Yamauchi, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8**, 1288-1295 (2002).
- 252 Yamauchi, T. *et al.* Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* **13**, 332-339 (2007).
- 253 Iwabu, M. *et al.* Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature* **464**, 1313-1319 (2010).
- 254 Qiao, L. *et al.* Adiponectin reduces thermogenesis by inhibiting brown adipose tissue activation in mice. *Diabetologia* **57**, 1027-1036 (2014).
- 255 Ryo, M. *et al.* Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* **68**, 975-981 (2004).
- 256 Li, S., Shin, H. J., Ding, E. L. & van Dam, R. M. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **302**, 179-188 (2009).
- 257 Patel, L. *et al.* Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 472-476 (2003).
- 258 Steppan, C. M. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312 (2001).
- 259 Patel, S. D., Rajala, M. W., Rossetti, L., Scherer, P. E. & Shapiro, L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* **304**, 1154-1158 (2004).
- 260 Banerjee, R. R. *et al.* Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* **303**, 1195-1198 (2004).
- 261 Steppan, C. M., Wang, J., Whiteman, E. L., Birnbaum, M. J. & Lazar, M. A. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* **25**, 1569-1575 (2005).
- 262 Tsiodras, S., Perelas, A., Wanke, C. & Mantzoros, C. S. The HIV-1/HAART associated metabolic syndrome - novel adipokines, molecular associations and therapeutic implications. *J Infect* **61**, 101-113 (2010).

- 263 Cook, K. S. *et al.* Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* **237**, 402-405 (1987).
- 264 Higuchi, K. *et al.* Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* **148**, 2690-2697 (2007).
- 265 Castan-Laurell, I. *et al.* Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* **40**, 1-9 (2011).
- 266 Tan, B. K., Adya, R. & Randeve, H. S. Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* **20**, 143-148 (2010).
- 267 Hida, K. *et al.* Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10610-10615 (2005).
- 268 Bluher, M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab* **3**, 230-240 (2014).
- 269 Cao, H. *et al.* Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* **134**, 933-944 (2008).
- 270 Gong, J. *et al.* Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am J Clin Nutr* **93**, 186-191 (2011).
- 271 Cawthorn, W. P. *et al.* Bone Marrow Adipose Tissue Is an Endocrine Organ that Contributes to Increased Circulating Adiponectin during Caloric Restriction. *Cell Metab* **20**, 368-375 (2014).
- 272 Mortier, A., Van Damme, J. & Proost, P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett* **145**, 2-9 (2012).
- 273 Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9 (1997).
- 274 Zlotnik, A. & Yoshie, O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36**, 705-716 (2012).
- 275 Martins-Green, M., Petreaca, M. & Wang, L. Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**, 327-347 (2013).
- 276 Moser, B., Wolf, M., Walz, A. & Loetscher, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* **25**, 75-84 (2004).
- 277 Blanpain, C. *et al.* CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* **94**, 1899-1905 (1999).
- 278 Ulvmar, M. H., Hub, E. & Rot, A. Atypical chemokine receptors. *Exp Cell Res* **317**, 556-568 (2011).
- 279 Burns, J. M. *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* **203**, 2201-2213 (2006).
- 280 Rajagopal, S. *et al.* Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 628-632 (2010).
- 281 Tanegashima, K. *et al.* CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Lett* **587**, 1731-1735 (2013).
- 282 Hara, T. & Tanegashima, K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. *J Biochem* **151**, 469-476 (2012).

Bibliografia

- 283 Dai, C. *et al.* CXCL14 displays antimicrobial activity against respiratory tract bacteria and contributes to clearance of *Streptococcus pneumoniae* pulmonary infection. *J Immunol* **194**, 5980-5989 (2015).
- 284 Tanegashima, K. *et al.* CXCL14 deficiency in mice attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment. *PLoS One* **5**, e10321 (2010).
- 285 Nara, N. *et al.* Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *J Biol Chem* **282**, 30794-30803 (2007).
- 286 Takahashi, M. *et al.* CXCL14 enhances insulin-dependent glucose uptake in adipocytes and is related to high-fat diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **364**, 1037-1042 (2007).
- 287 Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* **10**, 351-353 (1998).
- 288 Walker, J. A., Barlow, J. L. & McKenzie, A. N. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol* **13**, 75-87 (2013).
- 289 Chawla, A., Nguyen, K. D. & Goh, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 738-749 (2011).
- 290 Godfrey, D. I., Stankovic, S. & Baxter, A. G. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* **11**, 197-206 (2010).
- 291 Kahn, B. B. & Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, 473-481 (2000).
- 292 Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 1793-1801 (2006).
- 293 Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M. Z., Lunenfeld, B. & Karasik, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* **268**, 26055-26058 (1993).
- 294 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).
- 295 Cinti, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* **46**, 2347-2355 (2005).
- 296 Halberg, N. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* **29**, 4467-4483 (2009).
- 297 Jiang, C. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates a SOCS3-STAT3-adiponectin signal transduction pathway in adipocytes. *J Biol Chem* **288**, 3844-3857 (2013).
- 298 Krishnan, J. *et al.* Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD+ system. *Genes Dev* **26**, 259-270 (2012).
- 299 Maquoi, E., Munaut, C., Colige, A., Collen, D. & Lijnen, H. R. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes* **51**, 1093-1101 (2002).
- 300 Sun, K., Tordjman, J., Clement, K. & Scherer, P. E. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* **18**, 470-477 (2013).
- 301 Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. & White, M. F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* **275**, 9047-9054 (2000).

- 302 Nguyen, M. T. *et al.* A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* **282**, 35279-35292 (2007).
- 303 Shi, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 3015-3025 (2006).
- 304 Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H. & Kim, D. H. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One* **7**, e47713 (2012).
- 305 Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* **114**, 1752-1761 (2004).
- 306 Lin, Y. *et al.* The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **280**, 4617-4626 (2005).
- 307 Nakatani, Y. *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* **280**, 847-851 (2005).
- 308 Ozcan, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461 (2004).
- 309 Ferrante, A. W., Jr. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* **15 Suppl 3**, 34-38 (2013).
- 310 Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F., Sabater, M., Ricart, W. & Fernandez-Real, J. M. Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects. *Int J Obes (Lond)* **34**, 1345-1348 (2010).
- 311 Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**, 1796-1808 (2003).
- 312 Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* **117**, 175-184 (2007).
- 313 Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**, 2910-2918 (2007).
- 314 Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* **116**, 1494-1505 (2006).
- 315 Weisberg, S. P. *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* **116**, 115-124 (2006).
- 316 Inouye, K. E. *et al.* Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* **56**, 2242-2250 (2007).
- 317 Kirk, E. A., Sagawa, Z. K., McDonald, T. O., O'Brien, K. D. & Heinecke, J. W. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]. *Diabetes* **57**, 1254-1261 (2008).
- 318 Vandanmagsar, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* **17**, 179-188 (2011).
- 319 Kratz, M. *et al.* Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab* **20**, 614-625 (2014).

Bibliografia

- 320 Herrero, L., Shapiro, H., Nayer, A., Lee, J. & Shoelson, S. E. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 240-245 (2010).
- 321 Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116-1120 (2007).
- 322 Chawla, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ Res* **106**, 1559-1569 (2010).
- 323 Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N. & Levy, R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* **49**, 1894-1903 (2008).
- 324 Talukdar, S. *et al.* Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* **18**, 1407-1412 (2012).
- 325 Wensveen, F. M. *et al.* NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* **16**, 376-385 (2015).
- 326 Liu, J. *et al.* Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* **15**, 940-945 (2009).
- 327 Bertola, A. *et al.* Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* **61**, 2238-2247 (2012).
- 328 Wu, D. *et al.* Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* **332**, 243-247 (2011).
- 329 Molofsky, A. B. *et al.* Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med* **210**, 535-549 (2013).
- 330 Brestoff, J. R. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* **519**, 242-246 (2015).
- 331 Wood, I. S., Wang, B. & Trayhurn, P. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 105-109 (2009).
- 332 Zeyda, M. *et al.* Severe obesity increases adipose tissue expression of interleukin-33 and its receptor ST2, both predominantly detectable in endothelial cells of human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* **37**, 658-665 (2013).
- 333 Feuerer, M. *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* **15**, 930-939 (2009).
- 334 Winer, S. *et al.* Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* **15**, 921-929 (2009).
- 335 Nikolajczyk, B. S., Jagannathan-Bogdan, M., Shin, H. & Gyrko, R. State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes Immun* **12**, 239-250 (2011).
- 336 Deng, T. *et al.* Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab* **17**, 411-422 (2013).
- 337 Charriere, G. *et al.* Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* **278**, 9850-9855 (2003).
- 338 Hruskova, Z. & Biswas, S. K. A new "immunological" role for adipocytes in obesity. *Cell Metab* **17**, 315-317 (2013).

- 339 Nishimura, S. *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* **15**, 914-920 (2009).
- 340 Rakhshandehroo, M., Kalkhoven, E. & Boes, M. Invariant natural killer T cells in adipose tissue: novel regulators of immune-mediated metabolic disease. *Cell Mol Life Sci* **70**, 4711-4727 (2013).
- 341 Huh, J. Y. *et al.* A novel function of adipocytes in lipid antigen presentation to iNKT cells. *Mol Cell Biol* **33**, 328-339 (2013).
- 342 Satoh, M. *et al.* Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* **7**, e30568 (2012).
- 343 Winer, D. A. *et al.* B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* **17**, 610-617 (2011).
- 344 Hui, X. *et al.* Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab* **22**, 279-290 (2015).
- 345 Qiu, Y. *et al.* Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**, 1292-1308 (2014).
- 346 Rao, R. R. *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279-1291 (2014).
- 347 Lee, M. W. *et al.* Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* **160**, 74-87 (2015).
- 348 Lee, S. D. & Tontonoz, P. Eosinophils in fat: pink is the new brown. *Cell* **157**, 1249-1250 (2014).
- 349 El-Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidallo, M. A. & Elbim, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**, 199-206 (2005).
- 350 Newsholme, P., Curi, R., Gordon, S. & Newsholme, E. A. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem J* **239**, 121-125 (1986).
- 351 Wernstedt Asterholm, I. *et al.* Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab* **20**, 103-118 (2014).
- 352 Feng, B., Zhang, T. & Xu, H. Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann N Y Acad Sci* **1281**, 160-177 (2013).
- 353 Dalal, K. M., Antonescu, C. R. & Singer, S. Diagnosis and management of lipomatous tumors. *J Surg Oncol* **97**, 298-313 (2008).
- 354 Gonzalez-Garcia, R., Rodriguez-Campo, F. J., Sastre-Perez, J. & Munoz-Guerra, M. F. Benign symmetric lipomatosis (Madelung's disease): case reports and current management. *Aesthetic Plast Surg* **28**, 108-112; discussion 113 (2004).
- 355 Dei Tos, A. P. Liposarcoma: new entities and evolving concepts. *Ann Diagn Pathol* **4**, 252-266 (2000).
- 356 Garg, A. Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 3313-3325 (2011).
- 357 Vigouroux, C., Caron-Debarle, M., Le Dour, C., Magre, J. & Capeau, J. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 862-876 (2011).

Bibliografia

- 358 Simha, V., Rao, S. & Garg, A. Prolonged thiazolidinedione therapy does not reverse fat loss in patients with familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *Diabetes Obes Metab* **10**, 1275-1276 (2008).
- 359 Park, J. Y., Javor, E. D., Cochran, E. K., DePaoli, A. M. & Gorden, P. Long-term efficacy of leptin replacement in patients with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Metabolism* **56**, 508-516 (2007).
- 360 Paruthi, J., Gill, N. & Mantzoros, C. S. Adipokines in the HIV/HAART-associated lipodystrophy syndrome. *Metabolism* **62**, 1199-1205 (2013).
- 361 Simha, V., Szczepaniak, L. S., Wagner, A. J., DePaoli, A. M. & Garg, A. Effect of leptin replacement on intrahepatic and intramyocellular lipid content in patients with generalized lipodystrophy. *Diabetes Care* **26**, 30-35 (2003).
- 362 Agarwal, A. K. *et al.* AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* **31**, 21-23 (2002).
- 363 Boutet, E. *et al.* Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Biochimie* **91**, 796-803 (2009).
- 364 Szymanski, K. M. *et al.* The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20890-20895 (2007).
- 365 Chen, W. *et al.* The human lipodystrophy gene product Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2/seipin plays a key role in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **150**, 4552-4561 (2009).
- 366 Payne, V. A. *et al.* The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation. *Diabetes* **57**, 2055-2060 (2008).
- 367 Ito, D. & Suzuki, N. Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain* **132**, 8-15 (2009).
- 368 Lin, F. & Worman, H. J. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* **268**, 16321-16326 (1993).
- 369 Rusinol, A. E. & Sinensky, M. S. Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J Cell Sci* **119**, 3265-3272 (2006).
- 370 Andres, V. & Gonzalez, J. M. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* **187**, 945-957 (2009).
- 371 Shackleton, S. *et al.* LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* **24**, 153-156 (2000).
- 372 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**, 769-777 (2002).
- 373 Novelli, G. *et al.* Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* **71**, 426-431 (2002).
- 374 Agarwal, A. K., Fryns, J. P., Auchus, R. J. & Garg, A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet* **12**, 1995-2001 (2003).
- 375 Pendas, A. M. *et al.* Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* **31**, 94-99 (2002).
- 376 Garg, A. *et al.* An autosomal recessive syndrome of joint contractures, muscular atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-associated lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, E58-63 (2010).

- 377 Misra, A., Peethambaram, A. & Garg, A. Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **83**, 18-34 (2004).
- 378 Savage, D. B. *et al.* Complement abnormalities in acquired lipodystrophy revisited. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 10-16 (2009).
- 379 Carr, A. *et al.* A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* **12**, F51-58 (1998).
- 380 Klimas, N., Koneru, A. O. & Fletcher, M. A. Overview of HIV. *Psychosom Med* **70**, 523-530 (2008).
- 381 Smith, R. L., de Boer, R., Brul, S., Budovskaya, Y. & van Spek, H. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Front Genet* **3**, 328 (2012).
- 382 Srinivasa, S. & Grinspoon, S. K. Metabolic and body composition effects of newer antiretrovirals in HIV-infected patients. *Eur J Endocrinol* **170**, R185-202 (2014).
- 383 Villarroya, F., Domingo, P. & Giralt, M. Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 392-399 (2010).
- 384 Lo, J. C., Mulligan, K., Tai, V. W., Algren, H. & Schambelan, M. Body shape changes in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **19**, 307-308 (1998).
- 385 Tierney, E. P. & Hanke, C. W. "Bullfrog neck," a unique morphologic trait in HIV lipodystrophy: case series and review of the literature. *Arch Dermatol* **146**, 1279-1282 (2010).
- 386 Lo, J. C., Mulligan, K., Tai, V. W., Algren, H. & Schambelan, M. "Buffalo hump" in men with HIV-1 infection. *Lancet* **351**, 867-870 (1998).
- 387 Guaraldi, G. *et al.* Prevalence of and risk factors for pubic lipoma development in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* **45**, 72-76 (2007).
- 388 Villarroya, F., Domingo, P. & Giralt, M. Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond)* **31**, 1763-1776 (2007).
- 389 Barb, D. *et al.* Circulating resistin levels are not associated with fat redistribution, insulin resistance, or metabolic profile in patients with the highly active antiretroviral therapy-induced metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 5324-5328 (2005).
- 390 Domingo, P. *et al.* Serum FGF21 levels are elevated in association with lipodystrophy, insulin resistance and biomarkers of liver injury in HIV-1-infected patients. *AIDS* **24**, 2629-2637 (2010).
- 391 Caron, M. *et al.* The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions in vitro. *AIDS* **18**, 2127-2136 (2004).
- 392 Pacenti, M. *et al.* Microarray analysis during adipogenesis identifies new genes altered by antiretroviral drugs. *AIDS* **20**, 1691-1705 (2006).
- 393 Viengchareun, S. *et al.* Mitochondrial toxicity of indinavir, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antivir Ther* **12**, 919-929 (2007).
- 394 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**, 15130-15141 (2004).
- 395 Diaz-Delfin, J. *et al.* Effects of rilpivirine on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 3369-3375 (2012).

Bibliografia

- 396 Giralt, M. *et al.* HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* **11**, 729-740 (2006).
- 397 Gougeon, M. L. *et al.* Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antivir Ther* **9**, 161-177 (2004).
- 398 Bastard, J. P. *et al.* Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* **359**, 1026-1031 (2002).
- 399 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**, 1378-1388 (2001).
- 400 Shimomura, I. *et al.* Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* **12**, 3182-3194 (1998).
- 401 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**, 1569-1584 (2001).
- 402 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**, 642-650 (2006).
- 403 Villarroya, F., Domingo, P. & Giralt, M. Mechanisms of antiretroviral-induced mitochondrial dysfunction in adipocytes and adipose tissue: in-vitro, animal and human adipose tissue studies. *Curr Opin HIV AIDS* **2**, 261-267 (2007).
- 404 Peck, M. D. *et al.* The esterified plasma fatty acid profile is altered in early HIV-1 infection. *Lipids* **28**, 593-597 (1993).
- 405 Otake, K. *et al.* HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS* **18**, 189-198 (2004).
- 406 Shrivastav, S. *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV)-1 viral protein R suppresses transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ and inhibits adipocyte differentiation: implications for HIV-associated lipodystrophy. *Mol Endocrinol* **22**, 234-247 (2008).
- 407 Villarroya, J. *et al.* HIV type-1 transgene expression in mice alters adipose tissue and adipokine levels: towards a rodent model of HIV type-1 lipodystrophy. *Antivir Ther* **15**, 1021-1028 (2010).
- 408 Diaz-Delfin, J., Domingo, P., Wabitsch, M., Giralt, M. & Villarroya, F. HIV-1 Tat protein impairs adipogenesis and induces the expression and secretion of proinflammatory cytokines in human SGBS adipocytes. *Antivir Ther* **17**, 529-540 (2012).
- 409 Hazan, U. *et al.* Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1? *FASEB J* **16**, 1254-1256 (2002).
- 410 Maurin, T. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 production in primary culture of human adipocytes. *Exp Cell Res* **304**, 544-551 (2005).
- 411 Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccara, F., Vigouroux, C. & Capeau, J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* **16**, 218-229 (2010).
- 412 Coffinier, C. *et al.* HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13432-13437 (2007).

- 413 Goulbourne, C. N. & Vaux, D. J. HIV protease inhibitors inhibit FACE1/ZMPSTE24: a mechanism for acquired lipodystrophy in patients on highly active antiretroviral therapy? *Biochem Soc Trans* **38**, 292-296 (2010).
- 414 Caron, M., Auclair, M., Sterlingot, H., Kornprobst, M. & Capeau, J. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS* **17**, 2437-2444 (2003).
- 415 Kovsan, J. *et al.* Depot-specific adipocyte cell lines reveal differential drug-induced responses of white adipocytes--relevance for partial lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E315-322 (2009).
- 416 Gallego-Escuredo, J. M. *et al.* Differentially altered molecular signature of visceral adipose tissue in HIV-1-associated lipodystrophy. *J Acquir Immune Defic Syndr* **64**, 142-148 (2013).
- 417 Guallar, J. P. *et al.* Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS* **22**, 575-584 (2008).
- 418 Mallon, P. W. *et al.* Buffalo hump seen in HIV-associated lipodystrophy is associated with hyperinsulinemia but not dyslipidemia. *J Acquir Immune Defic Syndr* **38**, 156-162 (2005).
- 419 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**, 959-960 (2004).
- 420 Coffinier, C. *et al.* A potent HIV protease inhibitor, darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of farnesyl-prelamin A in cells. *J Biol Chem* **283**, 9797-9804 (2008).
- 421 Ferrer, E. *et al.* Impact of switching from lopinavir/ritonavir to atazanavir/ritonavir on body fat redistribution in virologically suppressed HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses* **27**, 1061-1065 (2011).
- 422 Diaz-Delfin, J., Domingo, P., Giralt, M. & Villarroya, F. Maraviroc reduces cytokine expression and secretion in human adipose cells without altering adipogenic differentiation. *Cytokine* **61**, 808-815 (2013).
- 423 Bereziat, V. *et al.* LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. *Am J Pathol* **179**, 2443-2453 (2011).
- 424 Kersten, S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 919-933 (2014).
- 425 van Beekum, O., Fleskens, V. & Kalkhoven, E. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 213-219 (2009).
- 426 Hammond, E., McKinnon, E. & Nolan, D. Human immunodeficiency virus treatment-induced adipose tissue pathology and lipoatrophy: prevalence and metabolic consequences. *Clin Infect Dis* **51**, 591-599 (2010).
- 427 Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**, 665-679 (2007).
- 428 Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195 (2006).
- 429 Caron, M. *et al.* Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ* **14**, 1759-1767 (2007).

Bibliografia

- 430 de Jong, J. M., Larsson, O., Cannon, B. & Nedergaard, J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**, E1085-1105 (2015).
- 431 Nagano, G. *et al.* Activation of classical brown adipocytes in the adult human perirenal depot is highly correlated with PRDM16-EHMT1 complex expression. *PLoS One* **10**, e0122584 (2015).
- 432 Bengtsson, T., Redegren, K., Strosberg, A. D., Nedergaard, J. & Cannon, B. Down-regulation of beta3 adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon a short-lived protein factor. *J Biol Chem* **271**, 33366-33375 (1996).
- 433 Santra, M. K., Wajapeyee, N. & Green, M. R. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature* **459**, 722-725 (2009).
- 434 Zhao, L. Y. *et al.* An EBF3-mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* **66**, 9445-9452 (2006).
- 435 Araujo-Vilar, D. *et al.* Site-dependent differences in both prelamins A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *J Med Genet* **46**, 40-48 (2009).
- 436 Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes* **64**, 2346-2351 (2015).
- 437 Lalmanach, G., Naudin, C., Lecaille, F. & Fritz, H. Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie* **92**, 1568-1579 (2010).
- 438 Kim, D. *et al.* CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice. *Diabetologia* **57**, 1456-1465 (2014).

 **PUBLICACIONES**

The molecular signature of HIV-1-associated lipomatosis reveals differential involvement of brown and beige/brite adipocyte cell lineages.

Revista: *PLoS One*

PMID: 26305325

Títol: L'empremta molecular de la lipomatosi associada al VIH-1 demostra una implicació diferencial dels llinatges adipocitaris marró i beix/brite.

Resum: La teràpia antiretroviral d'alta activitat ha millorat considerablement la qualitat de vida dels pacients infectats per VIH-1. No obstant, aquest tractament ha estat vinculat a l'anomenada síndrome lipodistròfica, que comporta una sèrie d'efectes metabòlics adversos i d'alteracions morfològiques. Entre aquestes, una lipoatròfia del greix subcutani a certes àrees anatòmiques i una hipertròfia dels dipòsits viscerals en són les més comunes. Amb menor freqüència, també apareixen proliferacions lipomatoses de greix subcutani a diferents regions anatòmiques. El teixit adipós lipomatós de la regió dorsocervical ("gep de búfal") ha estat associat amb una transició parcial del fenotip blanc al marró i a un increment en la proliferació cel·lular, però fins el moment les neoplàsies presents en altres parts del cos no havien estat caracteritzades. Per tal de determinar els esdeveniments moleculars principals associats a l'aparició de la lipomatosi dels pacients amb VIH-1, vam analitzar biòpsies de teixit lipomatós de "geps de búfal" i d'altres localitzacions anatòmiques dels pacients, tot comparant-les amb teixit adipós subcutani d'individus sans, emprant una aproximació de gens marcadors. Tant els "geps de búfal" com els lipomes que no ho eren mostraren patrons similars d'adipogènesi funcional, inflamació inalterada, fenotip no fibròtic i activitat proliferativa. Una disminució en la longitud telomèrica, una acumulació de prelamina A i una inducció de l'SA- β -Gal, que recorden la senescència dels adipòcits, també foren comunes a tots dos tipus de teixits lipomatosos. Les biòpsies de "gep de búfal" mostraven una expressió de gens marcadors del teixit adipós marró (com ara UCP1) i, més específicament, d'adipòcits marrons clàssics (per exemple, ZIC1), però no dels d'adipòcits beix/brite. Aquests patrons d'expressió gènica relacionats amb el greix bru no apareixien en els teixits lipomatosos d'altres ubicacions anatòmiques. En conclusió, el "gep de búfal" i la resta de neoplàsies de teixit adipós subcutani dels pacients infectats per VIH-1 comparteixen un caràcter lipomatós similar. No obstant, una inducció aberrant del fenotip blanc i marró clàssic apareix com a exclusiva de la lipomatosi dorsocervical. Per tant, els insults causats per la infecció pel VIH-1 i/o per la teràpia antiretroviral que condueixen a l'aparició de lipomes actuen diferencialment en funció de la ubicació i del llinatge cel·lular.

RESEARCH ARTICLE

The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages

Rubén Cereijo¹, José Miguel Gallego-Escuredo¹, Ricardo Moure¹, Joan Villarroya^{1,2}, Joan Carles Domingo¹, Joan Fontdevila³, Esteban Martínez⁴, María del Mar Gutiérrez², María Gracia Mateo², Marta Giral¹, Pere Domingo², Francesc Villarroya^{1*}

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Catalonia, Spain, **2** Infectious Disease Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, and Red de Investigación en SIDA, Instituto de Salud Carlos III, Spain, **3** Department of Plastic Surgery, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain, **4** Infectious Diseases Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona (HCB), Barcelona, Spain

* fvillarroya@ub.edu



OPEN ACCESS

Citation: Cereijo R, Gallego-Escuredo JM, Moure R, Villarroya J, Domingo JC, Fontdevila J, et al. (2015) The Molecular Signature of HIV-1-Associated Lipomatosis Reveals Differential Involvement of Brown and Beige/Brite Adipocyte Cell Lineages. PLoS ONE 10(8): e0136571. doi:10.1371/journal.pone.0136571

Editor: Juergen Eckel, GDC, GERMANY

Received: March 9, 2015

Accepted: August 4, 2015

Published: August 25, 2015

Copyright: © 2015 Cereijo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by projects PI11/02512, PI11/00376, PI14/00700 and PI14/00063 from the Instituto de Salud Carlos III (<http://www.isciii.es/>) and by project SAF2011/23636 from the Ministerio de Economía y Competitividad (<http://www.mineco.gob.es/portal/site/mineco>) of the Spanish Government. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Highly active antiretroviral therapy has remarkably improved quality of life of HIV-1-infected patients. However, this treatment has been associated with the so-called lipodystrophic syndrome, which conveys a number of adverse metabolic effects and morphological alterations. Among them, lipotrophy of subcutaneous fat in certain anatomical areas and hypertrophy of visceral depots are the most common. Less frequently, lipomatous enlargements of subcutaneous fat at distinct anatomic areas occur. Lipomatous adipose tissue in the dorso-cervical area (“buffalo hump”) has been associated with a partial white-to-brown phenotype transition and with increased cell proliferation, but, to date, lipomatous enlargements arising in other parts of the body have not been characterized. In order to establish the main molecular events associated with the appearance of lipomatosis in HIV-1 patients, we analyzed biopsies of lipomatous tissue from “buffalo hump” and from other anatomical areas in patients, in comparison with healthy subcutaneous adipose tissue, using a marker gene expression approach. Both buffalo-hump and non-buffalo-hump lipomatous adipose tissues exhibited similar patterns of non-compromised adipogenesis, unaltered inflammation, non-fibrotic phenotype and proliferative activity. Shorter telomere length, prelamin A accumulation and SA-β-Gal induction, reminiscent of adipocyte senescence, were also common to both types of lipomatous tissues. Buffalo hump biopsies showed expression of marker genes of brown adipose tissue (e.g. UCP1) and, specifically, of “classical” brown adipocytes (e.g. ZIC1) but not of beige/brite adipocytes. No such brown fat-related gene expression occurred in lipomatous tissues at other anatomical sites. In conclusion, buffalo hump and other subcutaneous adipose tissue enlargements from HIV-1-infected patients share a similar lipomatous character. However, a distorted induction of white-to-“classical brown adipocyte” phenotype appears unique of dorso-cervical lipomatosis. Thus, the insults caused by

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

HIV-1 viral infection and/or antiretroviral therapy leading to lipomatosis are acting in a location- and adipocyte lineage-dependent manner.

Introduction

HIV-1 infection is currently treated using highly active anti-retroviral therapy (HAART), which has dramatically improved patients' life expectancy and quality. However, long-term HAART in HIV-1 patients is associated with a number of adverse effects, including a form of lipodystrophy designated HAART-associated lipodystrophy syndrome (HALS). Although removal of the most toxic components of HAART cocktails has decreased the incidence of HALS in recent years, the syndrome remains a frequent concern.

Altered adipose tissue distribution is a hallmark of HALS, with patients often showing lipodystrophy of subcutaneous adipose tissue in the face, arms, legs and buttocks; however, hypertrophy of visceral adipose tissue similar to abdominal obesity is also common [1,2]. Less frequently, lipomatous alterations take place in HAART-treated patients, the most common of which is a dorso-cervical accumulation, commonly referred to as "buffalo hump" (BH) [3]. Another site of prevalent lipomatous adipose enlargement is the pubic area [4], and a pattern of accumulation of fat leading to circumferential enlargement of the neck, also called "bullfrog neck", has also been reported [5]. In addition, multiple reports have indicated the presence of lipomas in HIV-1-treated patients scattered at different anatomical areas, such as the neck, trunk, and limbs [4,6].

To date, molecular characterization of lipomatous tissue in HIV-1-infected patients has been limited to the dorso-cervical BH fat. These studies have revealed a decrease in mitochondrial DNA (mtDNA) abundance in BH. However, this alteration is not likely to account for the hypertrophic response of the dorso-cervical fat because other subcutaneous areas, which exhibit the opposite lipotrophic behavior, show similar levels of mtDNA depletion. Adipogenesis and inflammation, however, are not altered in BH; this is in contrast to the decreased expression of adipogenesis marker genes and induction of pro-inflammatory genes in lipotrophic areas of the same patients [7]. Several studies have shown that adipose tissues in BH biopsies express uncoupling protein-1 (UCP1) [8,9] or 5'-deiodinase [10]—markers of brown adipose tissue (BAT)—especially in samples obtained from substantially enlarged lipomatous tissue requiring surgery.

With the recent use of positron emission tomography (PET) has come the recognition that BAT in adult humans is present mainly in the cervical-supraclavicular region [11–14]. However, lipomatous BH appears not to be composed of fully functional brown adipocytes, and a pathologically distorted adipocyte differentiation process that results in incomplete transition from the white to brown adipocyte phenotype has been suggested. Among the observed changes in BH cells, the acquisition of a highly proliferative status confirms the lipomatous features of fat accumulation in BH [7,15].

Recent years have seen important advancements in our understanding of brown adipocyte cell biology. Some brown adipocyte cells, now termed "classical" brown adipocytes, appear to derive from precursor cells common to skeletal muscle, whereas other brown adipocytes, referred to as beige or brite, appear to be more common to the white adipocyte cell lineage and, in fact, may be interspersed in white adipose tissue depots [16,17]. Whereas all types of brown adipocytes express *UCP1*, *PPARGC1A* (also known as *PGC-1 α*) and *PRDM16* (PR domain-containing 16) genes, common markers of differentiation and thermogenic function, the

expression levels of specific marker genes, such as *ZIC1* (zinc finger protein of the cerebellum 1) for classical brown adipocytes allow the distinction of both types of brown adipocytes [18]. Human brown fat in adults (i.e., that present mainly in the cervical and sub-scapular region) was initially considered to be composed mainly of beige/brite cells. However, recent data suggests that there are also classical brown adipocyte-enriched areas in adult human thermogenic adipose tissue [17,19–21].

Although lipoatrophic adipose tissue in HIV-1-associated lipodystrophy has been thoroughly studied [22–24], why some patients develop such opposing, hypertrophic events also in the subcutaneous area remains a mystery, and no clear-cut indicators of specific antiretroviral patterns or other mechanistic determinants have been identified. Moreover, it is unknown whether the brown fat-like phenotype appears only in BH (i.e., at anatomical areas close to those where brown fat is prevalent in adult humans) or is a general phenomenon of HIV-1-associated lipomatosis everywhere in the body.

In the present study, we sought to identify the main molecular events associated with the hypertrophic distortions that occur in adipose tissue in HIV-1 patients. To this end, we systematically characterized the molecular signature of lipomatosis in these patients by analyzing lipomatous samples at distinct anatomical regions.

Materials and Methods

Patients

HIV-1-infected patients were eligible if they had either lipomatous dorso-cervical enlargement (BH) or lipomas from different anatomical locations (non-BH) that required surgical removal. Subjects who were hospitalized or had a frank cognitive impairment on enrollment were not eligible. Patients with opportunistic infections, acute hepatitis, liver insufficiency, neoplasms or fever of undetermined origin were also excluded from the study. At the time of study enrollment no patients were using any other drugs known to influence glucose metabolism or fat distribution, such as anabolic hormones or systemic corticosteroids, recombinant human growth hormone, or appetite stimulants. Informed consent was obtained from the patients upon enrollment. Biopsies of BH adipose tissue from 10 patients were analyzed upon surgical extraction. These samples were compared to non-BH lipomas removed from different anatomical locations (two pubic, two sub-maxillary, one arm, three abdominal) in eight HIV-1-infected, HAART-treated patients, as well as samples from 10 age-matched, healthy controls obtained on occasion of minor dermatological surgical procedures from subcutaneous adipose tissue at anatomical sites comparable to those in lipomatous samples, i.e., abdominal and upper (dorsal and double chin) areas. To be eligible, controls did not have to meet any of the exclusion criteria used for patients.

Demographic values, anti-retroviral treatment data and circulating parameters are shown in [Table 1](#). Age and body mass index (BMI) in patients and healthy controls were similar. Both patient groups had higher levels of serum triglycerides and cholesterol than controls. There were not significant differences in the cumulative time of treatment with the distinct types of anti-retroviral drugs (nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors, NRTIs; non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs; protease inhibitors, PIs) between the two patient groups.

Tissue processing, RNA and DNA extraction

All extractions were performed with the written informed consent of patients, and were approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau ethics committee. Once extracted, adipose tissue biopsies were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For RNA

Table 1. Demographic values, treatment data and biochemical parameters in controls and HIV-1-infected patients bearing BH and NBL lipomas.

	Control (n = 10)	HIV-1-infected patients	
		Buffalo hump (n = 10)	Non-buffalo hump lipomas (n = 8)
Age (years)	57.4 ± 3.6	55.8 ± 1.4	54.2 ± 2.0
Sex (n)	6	7	5
BMI (kg·m ⁻²)	26.1 ± 1.2	25.6 ± 2.6	25.3 ± 1.6
Glucose (mmol·L ⁻¹)	3.2 ± 0.3	3.7 ± 0.1	4.5 ± 0.8
Triglycerides (mmol·L ⁻¹)	1.2 ± 0.3	3.9 ± 0.5*	3.1 ± 0.6*
Cholesterol (mmol·L ⁻¹)	3.1 ± 0.6	5.6 ± 0.1*	6.2 ± 0.4*
Clinical lipodystrophy	No	Yes	Yes
Time since HIV-1 infection (months)	-	167 ± 18	177 ± 24
Cumulative time (months) on:			
NRTIs	-	140 ± 22	152 ± 20
NNRTIs	-	25 ± 2	32 ± 9
PIs	-	30 ± 12	38 ± 16
CD4+ lymphocytes (cells·μL ⁻¹)	-	549 ± 74	445 ± 84

Values are expressed as means ± SEM. Statistical differences between controls and both groups of lipodystrophic patients are shown as * whenever significant (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0136571.t001

transcript analysis, frozen samples were fragmented by mechanical disruption and then homogenized in RA-1 buffer (Macherey-Nagel, Düren, Germany) supplemented with 10% β-mercaptoethanol. RNA was immediately isolated from the homogenate using a column affinity-based methodology (NucleoSpin[®] RNA II; Macherey-Nagel). DNA was separated from the tissue homogenate as a part of the protocol used for RNA extraction, dissolved in 70% ethanol, and purified by phenol/chloroform extraction.

Gene expression analysis

cDNA was synthesized from 0.5 μg of total RNA using MultiScribe reverse transcriptase and random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). mRNA expression levels were determined by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) using TaqMan reagents and an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed in a final volume of 20 μL using TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG reagent, and the following specific primer probes (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) as detailed in [S1 Table](#). Cytochrome c oxidase subunit II (*MT-CO2*) mRNA was quantified using custom-designed primers (forward, 5'-CAA ACC ACT TTC ACC GCT ACA C-3'; reverse, 5'-GAC GAT GGG CAT GAA ACT GT-3') and FAM-labeled probe (5'-AAA TCT GTG GAG CAA ACC-3') obtained from Applied Biosystems (Custom TaqMan Gene Expression Assays). mRNA levels of the genes of interest, normalized to that of the reference control (18S ribosomal RNA), were calculated using the comparative 2^{-ΔΔC_T} method.

Protein expression analysis

For Western blot analysis of protein expression, fragments of previously disrupted adipose tissue were homogenized in cold buffer consisting of 10 mmol·L⁻¹ HEPES (pH 7.5), 5 mmol·L⁻¹ ethylenediamine tetraacetic acid, 5 mmol·L⁻¹ dithiothreitol, and 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ supplemented with protease inhibitor (Complete-mini; Roche, Sant Cugat del Vallés, Spain). The

protein concentration in each sample was determined by the Bradford method, with detection of absorbance at 595 nm absorbance using a Shimadzu UV 160-A spectrophotometer. Homogenates containing equal amounts of protein (40 μ g) were brought to a total volume of 35 μ L with bidistilled water, mixed with 1/5 volume loading buffer (10% sodium dodecyl sulfate [SDS], 10% β -mercaptoethanol, 0.5 M Tris pH 6.8, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue) and incubated at 95°C for 5 min. Proteins in samples were then resolved on SDS-containing 10%–12% polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, MA, USA) using a Mini Trans-Blot kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Blots were incubated with primary antibodies against PPAR γ (sc-1984X), LPL (sc-73646), GLUT4 (sc-7938), PCNA (sc-25280), adiponectin (sc-26497) and lamin A/lamin C/prelamin A (sc-6215), obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); β 2-microglobulin (P0163), obtained from Dako Cytomation (Glostrup, Denmark); cytochrome *c* oxidase subunit II (12C4), obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA); p53 (2570S) from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) or β -actin (A5441), obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). After incubating with primary antibodies, blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (BioRad), donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) or rabbit anti-goat IgG (Sigma), as appropriate. Immunoreactive proteins were detected using a Millipore Immobilon Western chemiluminescent HRP system (Millipore) and a Fujifilm ImageRecorder LAS-3000 detection device (Fujifilm, Tokyo, Japan). The optical density of each band was quantified using the MultiGauge 3.0 software suite (Fujifilm).

mtDNA quantification

Total DNA isolated from tissue samples was purified by phenol/chloroform extraction, as indicated above, and the relative abundance of mtDNA was assessed by real-time PCR as previously described [7]. mtDNA levels were expressed as the amount of the mitochondrial gene *MT-CYB* (cytochrome B) relative to the nuclear, intronless, single-copy gene *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha). The TaqMan probes used to determine *MT-CYB* and *CEBPA* expression are shown in [S1 Table](#).

Telomere relative length quantification

Telomere length was assessed by real-time PCR essentially as described previously [25]. Briefly, PCR was performed using 35 ng of total DNA (PCR template) isolated from tissue homogenates in a reaction containing 10 μ L of 2x SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems) and 100 nM of specific primers (Sigma) for telomere repeats (Tel) or the single-copy housekeeping gene *36B4* (acidic ribosomal phosphoprotein P0) in a final volume of 20 μ L. The following primer pairs were used: Tel, 5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3' (forward) and 5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3' (reverse); and *36B4*, 5'-GCA AGT GGG AAG GTG TAA TCC-3' (forward) and 5'-ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3' (reverse). C_T values were obtained for both Tel and *36B4* in each sample. Relative telomere abundance was quantified as the Tel/*36B4* ratio using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons between groups were performed using a non-parametric analysis (Mann-Whitney U test). Statistical differences were considered significant for p-values < 0.05 .

Results

The levels of transcripts for marker genes related to adipogenesis and adipose function (PPAR- γ , LPL and AdipoQ), inflammation (TNF α), macrophage infiltration (CD68), mitochondrial toxicity (MT-CO2), and fibrosis (COL1A2) were determined in lipomatous and healthy control adipose tissues (Fig 1). Lipomatous adipose tissue data were analyzed separately for BH samples and non-BH lipomatous tissue (NBL), as described in Materials and Methods.

Transcript levels for adipogenesis marker genes, including peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , the master regulator of adipose differentiation, LPL (lipoprotein lipase), the enzyme responsible for fatty acid uptake and fat accretion in adipose tissue, and adiponectin, a main adipokine, were unaltered in BH compared with healthy subcutaneous adipose tissue. However, each of these three gene transcripts was systematically up-regulated in NBL from HIV-1-infected patients. Tumor necrosis factor (TNF)- α , a marker of inflammation, and CD68, a macrophage infiltration marker, were not altered in any of the adipose tissue sample groups analyzed. Expression of the mtDNA-encoded transcript *MT-CO2* was altered only in NBL samples, where it was significantly increased. Expression of the fibrosis marker *COL1A2* (collagen type I alpha 2) trended lower in BH and NBL samples relative to controls, but only the reduction in BH reached statistical significance.

Given that mitochondrial toxicity, specifically mtDNA depletion, is a relevant feature of co-morbidities present in HIV-1-infected patients undergoing treatment, we next quantified mtDNA levels. These analyses revealed that mtDNA levels were significantly reduced in BH samples relative to healthy controls, but were unaltered in NBL (Fig 1B).

We next extended our study to an analysis of marker expression at the protein level (Fig 2A and 2B). Unlike transcripts, protein levels of PPAR γ , LPL and adiponectin as well as those of the glucose transporter GLUT4, another protein associated with adipogenesis, were not significantly different between BH or NBL samples and controls. The abundance of β_2 -microglobulin, an indicator of inflammation, was also unaltered. Levels of the mtDNA-encoded protein MT-CO2 were significantly reduced relative to controls to a similar extent in both BH and NBL samples. An analysis of the expression of the proliferation marker, PCNA [26], showed a substantial increase in PCNA protein levels in BH and NBL relative to healthy subcutaneous adipose tissue, with the extent of the increase being similar for the two types of lipomatous tissue.

Considering the differences found, and taking into account the distinct anatomical location of NBL samples, we analyzed the gene expression and protein data by separately pooling data from samples taken from upper and lower body areas (using the waist as the dividing line). As shown in S2 Table, the only significant anatomical site-dependent changes observed were minor differences for *MT-CO2* and adiponectin expression in both NBL patients and healthy controls.

Accelerated ageing is often considered to be associated with co-morbidities that appear in HIV-1 patients, and telomere length in adipose tissue has been proposed as a marker of senescence and ageing-related phenomena that occur in fat under pathological conditions such as obesity [27]. We found that telomere length was profoundly decreased in both BH and NBL relative to healthy controls, with no differences between the two types of lipomatous tissue (Fig 3A). Notably, telomere length in lipoatrophic, non-lipomatous, adipose tissue from HIV-1-infected patients was not altered compared with that in healthy controls (data not shown). Determination of the expression of the *GLB1* gene, encoding SA- β -Gal [28], a marker of senescence, indicated a significant increase in both BH and NBL relative to controls (Fig 3B). We also measured p53 levels as a further marker of senescence but, in this case, no significant differences were found (data not shown).

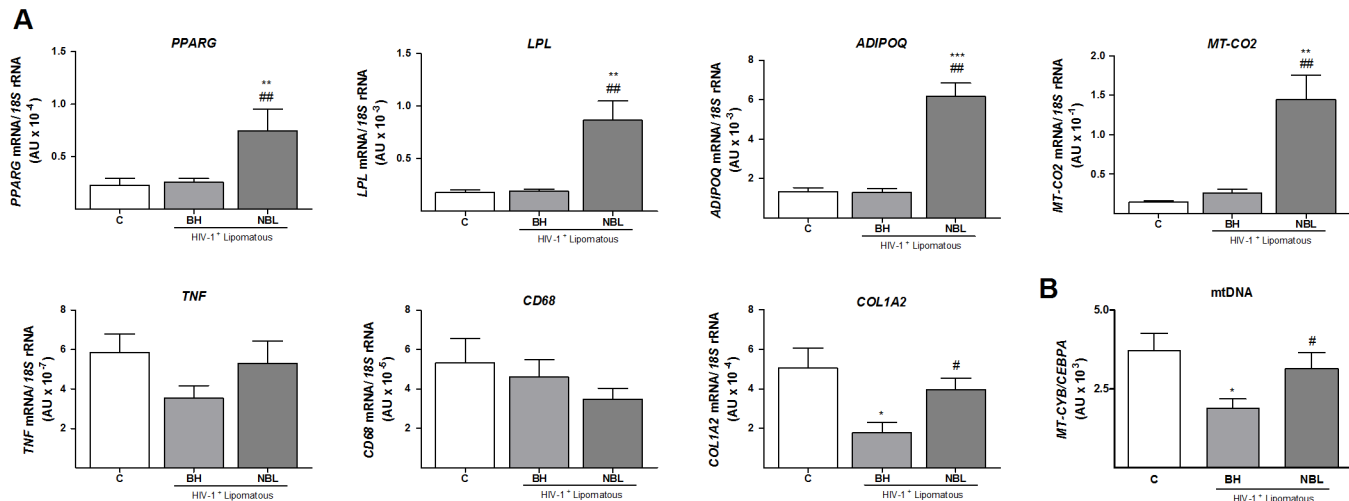


Fig 1. Expression of mRNA for various marker genes and mtDNA levels in BH and non-BH lipomas from HIV-1-infected, HAART-treated patients and healthy control subcutaneous adipose tissue. A) Relative mRNA levels of the indicated markers of adipogenesis and adipocyte function, mitochondrial function, inflammation, and fibrosis were determined by qRT-PCR. Means \pm SEM, expressed as ratios relative to 18S rRNA, are shown for each target mRNA. B) mtDNA data are presented as means \pm SEM, expressed as a ratio units between the mitochondrial gene *MT CYB* and the single-copy nuclear gene *CEBPA* levels (* $p < 0.05$, lipomas vs. healthy control; # $p < 0.05$, NBL vs. BH). (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, lipoma vs. healthy subcutaneous adipose tissue; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, NBL vs. BH). Means correspond to 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g001

Several partial lipodystrophy syndromes of genetic origin, sometimes associated with local lipomatous phenomena, are caused by alterations in the synthesis of lamin A protein that results in accumulation of the unprocessed prelamina A form in lipomatous tissue [29]. This phenomenon has been related to accelerated ageing [30]. We detected this high-molecular-weight, unprocessed form of prelamina A in BH and NBL samples, but found only weak expression in control adipose tissue, thus the prelamina A/lamin A ratio was increased in both BH and NBL relative to healthy control adipose tissue. (Fig 3C).

Finally, we analyzed the expression of brown-versus-white adipose tissue marker genes (Fig 4A). Expression of *UCP1* and *PPARGC1A* mRNA was significantly higher in BH, but not NBL, compared with healthy control adipose tissue, whereas *PRDM16* transcript levels were unchanged. Expression of the β_3 -adrenergic receptor, on the other hand, was dramatically repressed in BH, but not in NBL. We further analyzed the expression of marker genes recently proposed to distinguish between classical or developmentally programmed brown adipose tissue and inducible or beige/brite brown adipose tissue [31,32] (Fig 4B–4D). *ZIC1* mRNA, which was highly expressed in BH, showed negligible and very low expression in control adipose tissue and NBL, respectively. In contrast, *EBF3* (early B-cell factor 3) and *FBXO31* (F-box only protein 31), two other marker genes proposed to distinguish between the two types of brown fat, were upregulated in common in BH and NBL compared with controls. An analysis genes proposed in some studies to be markers of the beige/brite type of fat showed that expression of *TBX1* (T-box 1) was decreased in both enlarged BH and NBL sites compared with control fat, whereas *TMEM26* and *TNFRSF9/CD137* (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9) expression were not different among adipose tissues. It has been proposed that expression of *HOXC8* (homeobox C8) and *HOXC9* (homeobox C9) genes is preferentially associated with the white adipocyte phenotype relative to either the classical or beige/brite brown phenotype. We found that *HOXC9* expression was dramatically reduced in BH but unaltered in NBL relative to controls, whereas *HOXC8* was significantly increased in NBL.

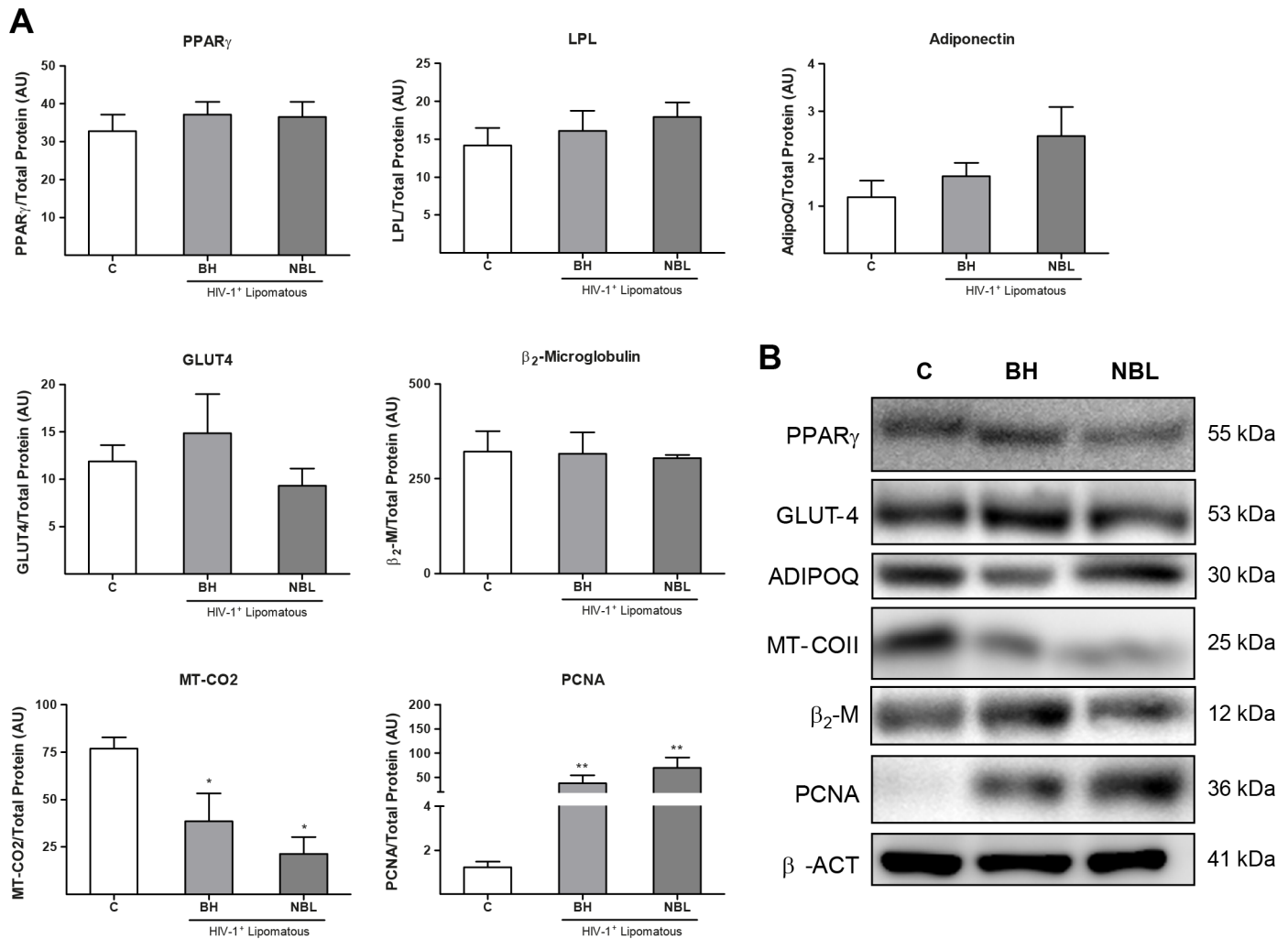


Fig 2. Expression of protein for various marker genes in BH and non-BH lipomas from HIV-1-infected, HAART-treated patients and healthy control subcutaneous adipose tissue. A) Relative protein levels of the indicated markers of adipogenesis and adipocyte function, mitochondrial function, inflammation, and cell proliferation were determined by densitometric analysis of Western blots. Means \pm SEM of 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples expressed as ratios of the optical density of each band corrected for total protein level, are shown for each protein (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and, lipomas vs. healthy subcutaneous adipose tissue; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$, NBL vs. BH). **B)** Representative Western blot bands for selected genes of each functional group in panel A for controls (C), BH, and NBL. Each sample corresponds to an individual from each group. β -actin was used a loading control. The molecular weight of each specific immunoreactive signal is shown at right. ADIPOQ, adiponectin; MT_COII, mitochondrial DNA-encoded subunit II of cytochrome c oxidase.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g002

Discussion

Dorso-cervical adipose accumulation, often referred as buffalo hump, is an alteration that occurs with a certain frequency in HIV-1 patients undergoing antiretroviral treatment, but attempts to associate it with specific patterns of treatment or other variables have been unsuccessful. There have been recent reports of the appearance of BH even in patients undergoing newer drug treatment regimens (e.g., raltegravir-based) with low toxicity towards adipose function and metabolism [33]. In addition to BH, adipose enlargements randomly occur in patients at other sites of subcutaneous adipose tissue, with the highest frequency observed in the neck [5] and pubic [4] regions. Previous studies have shown that expression of adipogenesis and inflammation marker genes is unaltered in BH in HIV-1-infected, HAART-treated patients;

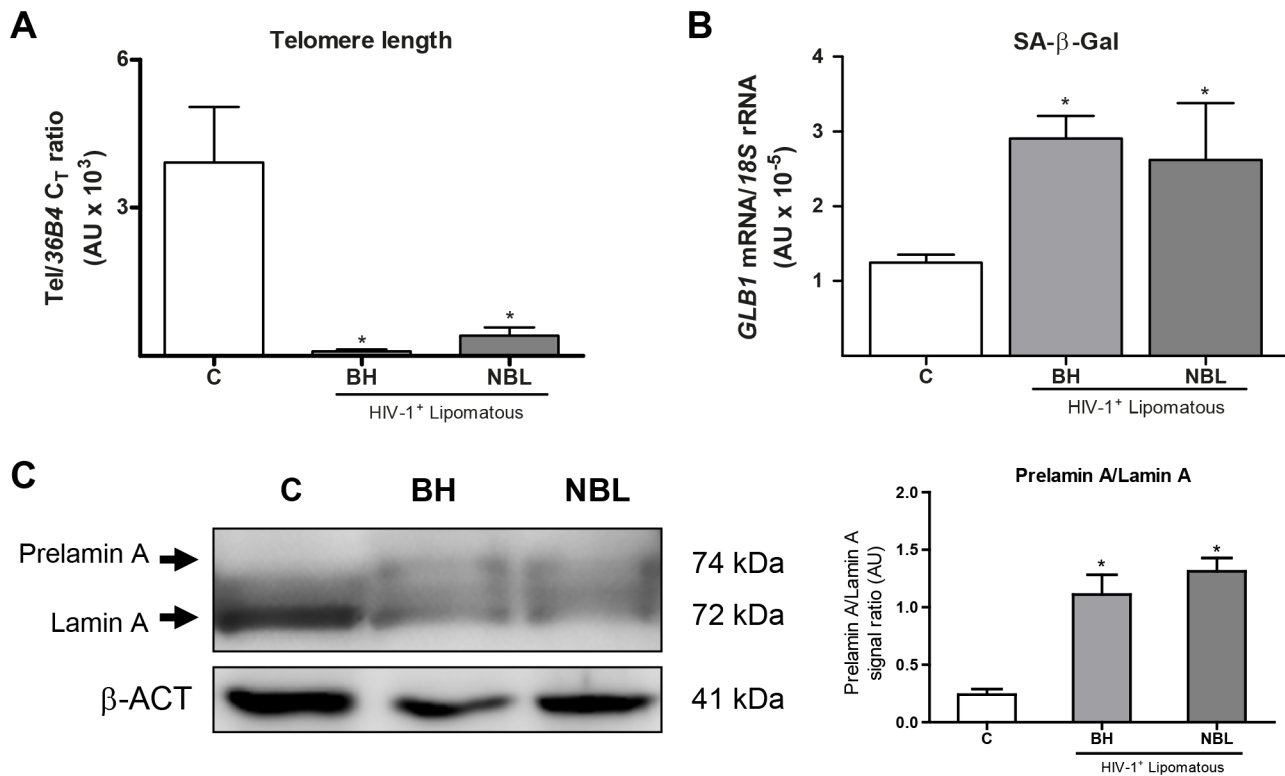


Fig 3. Relative telomere length, expression of *GLB1* (SA-β galactosidase) and prelamins A/lamin A ratio in adipose tissue from BH and NBL lipomas from HIV-1-infected, HAART-treated individuals and in subcutaneous adipose tissue from healthy controls. **A)** Relative telomere lengths are presented as means ± SEM, expressed as a ratio of arbitrary fluorescence units for telomere repeats (Tel) to the single-copy nuclear gene 36B4 (*p<0.05, lipomas vs. healthy controls). **B)** Relative mRNA levels of SA-β-Galactosidase. Means ± SEM, expressed as ratios relative to 18S rRNA, are shown. **C)** Prelamin A/lamin A ratio are presented as means ± SEM of the relative densitometric analysis of western blots (right), representative western blot bands for lamin A and prelamins A are shown (left). The bands for both processed lamin and unprocessed prelamins are indicated with arrows. Means correspond to 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g003

this contrasts with the repressed adipogenesis and enhanced local inflammation observed in lipotrophic subcutaneous fat [7]. We found that non-BH enlarged adipose depots apart from BH presented similar patterns of unaltered adipogenesis and inflammation, at least at the protein level. This finding confirms that hypertrophy of subcutaneous fat is associated with protection from the induction of pro-inflammatory responses that are known to take place at sites prone to lipotrophy in HIV-1 patients. A feature of NBL that distinguishes it from BH is that protein markers of adipogenesis (LPL, PPAR γ , adiponectin) are unchanged despite enhanced expression of the corresponding transcripts. The mechanisms underlying this discordance are unknown, but the fact that post-transcriptional and post-translational mechanisms are known to be relevant for determining LPL and PPAR- γ protein levels in adipose tissues should be taken into account [34,35]. Discordances between changes in adiponectin transcript and protein levels occur in subcutaneous adipose tissue from HIV-1-infected patients [36,37]. Moreover, as a secreted protein, adiponectin steady-state levels in cells may not change despite concerted alterations in synthesis and output, a fact that may also help explain this observation.

Indeed, our current findings support the lipomatous character of these other subcutaneous adipose tissue enlargements that appear locally in HIV-1 patients (i.e., pubic area, circumferential neck), as previously reported for BH [7]. The increased expression of PCNA, a bona fide marker of cell proliferation, confirms the activated cell-cycle status in the distinct, enlarged

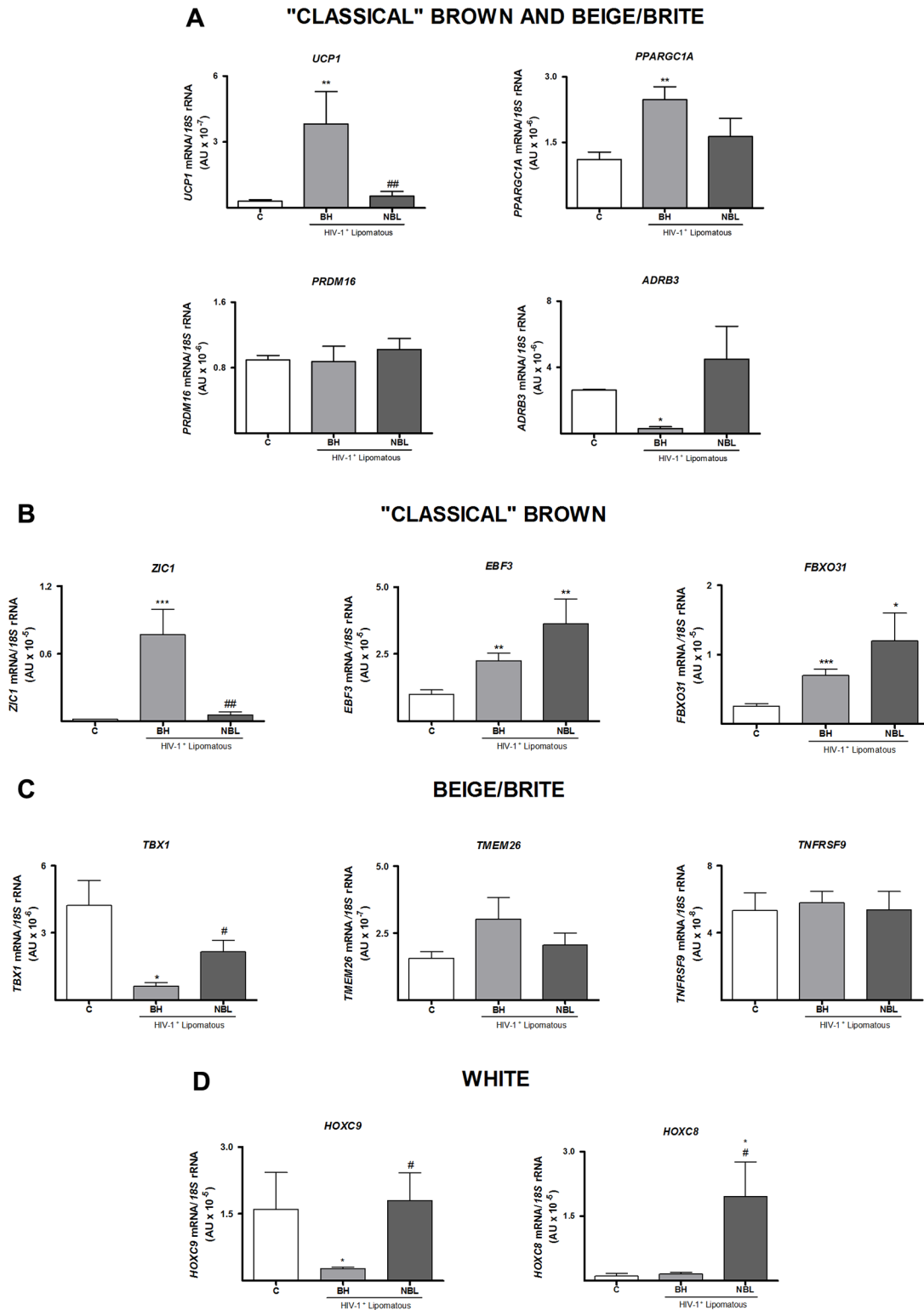


Fig 4. Expression of mRNA for brown adipocyte-associated genes and specific lineage markers of different classes of adipocytes in adipose tissue from BH and NBL lipomas from HIV-1-infected, HAART-treated individuals and in subcutaneous adipose tissue from healthy controls (C). Relative mRNA levels were determined by qRT-PCR. Means \pm SEM of 10 (C, BH) and 8 (NBL) samples, expressed as ratios relative to 18S rRNA, are shown for each target mRNA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, lipomas vs. healthy subcutaneous adipose tissue; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$, NBL vs. BH lipomas). **A)** Brown adipocyte-associated genes. **B-D)** Specific putative lineage markers of different types of adipocytes.

doi:10.1371/journal.pone.0136571.g004

adipose tissue depots analyzed here. This means that lipid accumulation and hypertrophy alone are not sufficient to explain the adipose enlargement, suggesting that hyperplasia of adipose tissue contributes to adipose depot overgrowth, both in BH and at distinct anatomical sites. Fibrosis, a feature usually found in rapidly proliferating adipose depots that leads to inflammation [38], was not increased, at least not at the transcriptional level. Notably, we found a dramatic reduction in DNA telomere length in both BH and non-BH enlarged adipose depots relative to control healthy adipose tissue, finding that strongly supports the lipomatous character of these adipose sites. Shortening of telomeres is a consequence of tissues having experienced high rates of cell replication, as has previously been reported for adipose depots in obese patients [27,39]. As a non-malignant tumorigenic process, lipomatosis maintains telomere shortening with cell division [40]; this contrasts with malignant tumorigenesis, which evades telomere shortening through activation of telomerase [39,41]. To our knowledge, our current findings represent the first data on telomere length as a marker of cellular behavior in fat depots from HIV-1-infected patients.

The common lipomatous character of BH and non-BH adipose enlargements is also evidenced by the accumulation of the toxic, non-processed form of lamin A, a phenomenon previously reported to take place not only in genetically-determined lipomatosis [29,42] but also in BH from HIV-1-infected, HAART-treated patients [9], as well as in the lipotrophic areas of these individuals. Our results, taken together with previous observations [43,44], suggest that lipomatosis in HIV-1 patients reflects an increased aging phenotype, as evidenced by prelamin A accumulation, telomere length reduction and enhanced expression of SA- β -Galactosidase. In contrast to lipotrophic areas, hyperproliferative lipomas would therefore compensate for cell death with accelerated precursor cell turnover, thus growing in size.

Our current findings confirm previous reports indicating partial acquisition of a brown adipose tissue molecular signature in BH. Our demonstration of increased expression of UCP1 is in accord with previous findings [7–9]. The partial acquisition of a brown adipose tissue phenotype is further underscored by the strong repression of β_3 -adrenoreceptor mRNA expression—a common finding in thermogenically activated brown adipose tissue in experimental models [45]. However, non-BH lipomatous sites did not show a remarkable expression of UCP1. Even when non-BH samples from circumferential neck enlarged adipose tissue close to sites where physiological brown adipose tissue is known to be present were analyzed separately, UCP1 expression was negligible. These findings indicate that the acquisition of a partial brown fat-type molecular signature is a specific feature of BH that is not shared by lipomas at other anatomical sites in HIV-1 patients.

This study represents the first use of marker genes proposed to allow the distinction between beige/brite and classical brown fat to characterize the brown fat-like features of BH. Our finding of very high expression of *ZIC1*, possibly the most specific, and best accepted, marker of classical, non-beige/brite, brown adipocytes [19–21,46], indicates that abnormal classical brown adipogenesis underlies the BH phenotype.

The suppressed expression of *HOXC9*, a proposed marker of the white-versus-brown phenotype [19,20], specifically in BH further supports the shift from white to brown adipogenesis in BH. The information obtained regarding a putative beige/brite phenotype was less conclusive, as only some increase in NBL versus BH expression was found. In fact, the determination of classical brown-versus-beige/brite phenotype made on the basis of marker gene expression analysis should be considered with caution, considering how recently these markers, the lack of unanimous agreement on their use and scarce validation in humans tissue of data obtained in rodents [46–48]. In this context, some studies have reported that *TMEM26* is preferentially found in human BAT [17,32] whereas others have reported no differences between BAT and WAT [19,20]. The value of *TNFRSF9* (*CD137*) as bona-fide beige marker has also been

questioned, and a recent comprehensive compilation of available data suggested that, whereas *ZIC1* is emerging as a bona-fide marker of “classical” BAT in humans, the validity of beige/briter markers in human adipose tissues is less compelling [46].

Overall, our findings strongly support the conclusion that a brown fat-like phenotype related to the classical brown adipocyte cell lineage is specifically induced in HIV-1-associated BH but not in lipomas at other anatomical sites. Recent reports have claimed that adipocytes of the classical brown type are present in human adults [19,20]; thus, it is likely that a specific distortion of this cell type elicited by HIV-1 infection and/or antiretroviral treatment underlies the etiopathology of BH lipomatosis.

The present study has obvious limitation: the relative scarcity of samples in this type of studies, the anatomical variability of NBL location, the impossibility to perform the study in distinct lipomas from the same individual, and the single molecular approach followed. We were nonetheless able to conclude that BH and adipose enlargements that occur at different anatomical sites in HIV-1-infected, HAART-treated patients share a similar lipomatous character and the absence of a local pro-inflammatory status. However, only BH exhibited a distortion in the brown-to-white molecular signature that appears to involve the classical brown adipocyte cell lineage. Overall, the present data provide evidence that HIV-1 infection and antiretroviral toxicity-mediated alterations in adipose tissue plasticity may differentially impact distinct anatomical sites according to a distinct molecular signature of affected tissue areas. Although our data allow few conclusions to be reached regarding prevention or treatment of this alteration, they suggest that proposals to promote brown adipose tissue activation as a tool for improving the metabolic syndrome, especially as it applies to HIV-1-infected patients, should therefore be considered with caution in the future.

Supporting Information

S1 Table. Reference numbers for the TaqMan probes used in the gene expression experiments conducted in this study.

(DOC)

S2 Table. mRNA and protein levels of adipogenesis and adipocyte function, mitochondrial function, inflammation, fibrosis, proliferation and brown-versus-white marker genes of subcutaneous adipose tissue from the upper body and lower body region of healthy controls (C) and non-buffalo lipomas (NBL).

(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FV MG PD. Performed the experiments: RC JMGE RM JV. Analyzed the data: RC JMGE RM JV MG FV EM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCD JF MdmG MGM PD EM. Wrote the paper: FV MG RC.

References

1. Vigouroux C, Gharakhanian S, Salhi Y, Nguyen TH, Adda N, Rozenbaum W et al. (1999) Adverse metabolic disorders during highly active antiretroviral treatments (HAART) of HIV disease. *Diabetes Metab* 25: 383–392. PMID: [10592860](#)
2. Villarroya F, Domingo P, Giralt M (2007) Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond)* 31: 1763–1776.
3. Lo JC, Mulligan K, Tai VW, Algren H, Schambelan M (1998) "Buffalo hump" in men with HIV-1 infection. *Lancet* 351: 867–870. PMID: [9525364](#)

4. Guaraldi G, Orlando G, Squillace N, Roverato A, De Fazio D, Vandelli M et al. (2007) Prevalence of and risk factors for pubic lipoma development in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 72–76. PMID: [17460472](#)
5. Tierney EP, Hanke CW (2010) "Bullfrog neck", a unique morphologic trait in HIV lipodystrophy: case series and review of the literature. *Arch Dermatol* 146: 1279–1282. doi: [10.1001/archdermatol.2010.341](#) PMID: [21079066](#)
6. Palella FJ Jr., Chmiel JS, Riddler SA, Calhoun B, Dobs A, Visscher B et al. (2006) A novel pattern of lipoaccumulation in HIV-infected men. *JAMA* 296: 766–768. PMID: [16905782](#)
7. Guallar JP, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Alegre M, Fontdevila J, Martínez E et al. (2008) Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS* 22: 575–584. doi: [10.1097/QAD.0b013e3282f56b40](#) PMID: [18316998](#)
8. Rodriguez de la Concepcion ML, Domingo JC, Domingo P, Giralt M, Villarroya F (2004) Uncoupling protein 1 gene expression implicates brown adipocytes in highly active antiretroviral therapy-associated lipomatosis. *AIDS* 18: 959–960. PMID: [15060448](#)
9. Bereziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont MC, Dumont S, Vantygem MC et al. (2011) LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. *Am J Pathol* 179: 2443–2453. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.07.049](#) PMID: [21945321](#)
10. Torriani M, Fitch K, Stavrou E, Bredella MA, Lim R, Sass CA et al. (2012) Deiodinase 2 expression is increased in dorsocervical fat of patients with HIV-associated liphypertrophy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E602–607. doi: [10.1210/jc.2011-2951](#) PMID: [22259052](#)
11. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB et al. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360: 1509–1517. doi: [10.1056/NEJMoa0810780](#) PMID: [19357406](#)
12. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J et al. (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58: 1526–1531. doi: [10.2337/db09-0530](#) PMID: [19401428](#)
13. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND et al. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360: 1500–1508. doi: [10.1056/NEJMoa0808718](#) PMID: [19357405](#)
14. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T et al. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360: 1518–1525. doi: [10.1056/NEJMoa0808949](#) PMID: [19357407](#)
15. Gallego-Escuredo JM, Domingo P, Fontdevila J, Villarroya J, Domingo JC, Martínez E et al. (2013) Hypertrophied facial fat in an HIV-1-infected patient after autologous transplantation from 'buffalo hump' retains a partial brown-fat-like molecular signature. *Antivir Ther* 18: 635–639. doi: [10.3851/IMP2528](#) PMID: [23344424](#)
16. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285: 7153–7164. doi: [10.1074/jbc.M109.053942](#) PMID: [20028987](#)
17. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L et al. (2012) Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7: e49452. doi: [10.1371/journal.pone.0049452](#) PMID: [23166672](#)
18. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A (2014) The different shades of fat. *Nature* 510: 76–83. doi: [10.1038/nature13477](#) PMID: [24899307](#)
19. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA et al. (2013) Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* 19: 635–639. doi: [10.1038/nm.3112](#) PMID: [23603815](#)
20. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Daugaard S, Homoe P, Loft A et al. (2013) A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 17: 798–805. doi: [10.1016/j.cmet.2013.04.011](#) PMID: [23663743](#)
21. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M et al. (2013) Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19: 631–634. doi: [10.1038/nm.3017](#) PMID: [23603813](#)
22. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, Rodriguez de la Concepcion ML, Alegre M, Domingo JC et al. (2006) HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 11: 729–740. PMID: [17310817](#)

23. Mallewa JE, Wilkins E, Vilar J, Mallewa M, Doran D, Back D et al. (2008) HIV-associated lipodystrophy: a review of underlying mechanisms and therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 62: 648–660. doi: [10.1093/jac/dkn251](https://doi.org/10.1093/jac/dkn251) PMID: [18565973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18565973/)
24. Villarroya F, Domingo P, Giralt M (2010) Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment. *Biochim Biophys Acta* 1801: 392–399. doi: [10.1016/j.bbaliip.2009.09.018](https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.09.018) PMID: [19800025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19800025/)
25. O'Callaghan NJ, Fenech M (2011) A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 13: 3. doi: [10.1186/1480-9222-13-3](https://doi.org/10.1186/1480-9222-13-3) PMID: [21369534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21369534/)
26. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665–679. PMID: [17512402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17512402/)
27. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Sabater M, Ricart W, Fernandez-Real JM (2010) Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 34: 1345–1348.
28. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC et al. (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5: 187–195. PMID: [16626397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16626397/)
29. Araujo-Vilar D, Victoria B, Gonzalez-Mendez B, Barreiro F, Fernandez-Rodriguez B, Cereijo R et al. (2012) Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76: 816–824.
30. Reddy S, Comai L. (2012) Lamin A, farnesylation and aging. *Exp Cell Res* 318: 1–7 doi: [10.1016/j.yexcr.2011.08.009](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.08.009) PMID: [21871450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21871450/)
31. Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2012) Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E19–31. doi: [10.1152/ajpendo.00249.2011](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2011) PMID: [21828341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21828341/)
32. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH et al. (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150: 366–376. doi: [10.1016/j.cell.2012.05.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016) PMID: [22796012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22796012/)
33. Ceccarelli G, d'Ettore G, Marchetti F, Rizza C, Mastroianni CM, Carlesimo B et al. (2011) Development of Buffalo Hump in the course of antiretroviral therapy including raltegravir and unboosted atazanavir: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 5: 70. doi: [10.1186/1752-1947-5-70](https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-70) PMID: [21329500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21329500/)
34. Kersten S (2014) Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1841: 919–933. doi: [10.1016/j.bbaliip.2014.03.013](https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.03.013) PMID: [24721265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24721265/)
35. van Beekum O, Fleskens V, Kalkhoven E (2009) Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* 17: 213–219.
36. Shikuma CM, Gangcuangco LM, Killebrew DA, Libutti DE, Chow DC, Nakamoto BK et al. (2014) The role of HIV and monocytes/macrophages in adipose tissue biology. *J Acquir Immune Defic Syndr* 65: 151–159 doi: [10.1097/01.qai.0000435599.27727.6c](https://doi.org/10.1097/01.qai.0000435599.27727.6c) PMID: [24091690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24091690/)
37. Hammond E, McKinnon E, Nolan D. (2010). Human immunodeficiency virus treatment-induced adipose tissue pathology and lipodystrophy: prevalence and metabolic consequences. *Clin Infect Dis* 51: 591–599. doi: [10.1086/655765](https://doi.org/10.1086/655765) PMID: [20645860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20645860/)
38. Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE (2013) Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* 18: 470–477. doi: [10.1016/j.cmet.2013.06.016](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.016) PMID: [23954640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23954640/)
39. Aubert G (2014) Telomere dynamics and aging. *Prog Mol Biol Transl Sci* 125: 89–111. doi: [10.1016/B978-0-12-397898-1.00004-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397898-1.00004-9) PMID: [24993699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24993699/)
40. Feng B, Zhang T, Xu H (2013) Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann N Y Acad Sci* 1281: 160–177. doi: [10.1111/nyas.12009](https://doi.org/10.1111/nyas.12009) PMID: [23317303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23317303/)
41. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S (1995) Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 2533–2536. PMID: [7780964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7780964/)
42. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM et al. (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 24: 153–156. PMID: [10655060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655060/)
43. Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccara F, Vigouroux C, Capeau J (2010) HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* 16: 218–229. doi: [10.1016/j.molmed.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.002) PMID: [20400373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20400373/)
44. Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, Chang SY, Hrycyna CA, Young SG et al. (2007) HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13432–13437. PMID: [17652517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17652517/)
45. Bengtsson T, Redegren K, Strosberg AD, Nedergaard J, Cannon B (1996) Down-regulation of beta3 adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon a short-lived protein factor. *J Biol Chem* 271: 33366–33375. PMID: [8969197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8969197/)

46. de Jong JM, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J. (2015) A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 308:E1085–105. doi: [10.1152/ajpendo.00023.2015](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00023.2015) PMID: [25898951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25898951/)
47. Giralt M, Villarroya F (2013) White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 154: 2992–3000. doi: [10.1210/en.2013-1403](https://doi.org/10.1210/en.2013-1403) PMID: [23782940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23782940/)
48. Scheele C, Larsen TJ, Nielsen S (2014) Novel nuances of human brown fat. *Adipocyte* 3: 54–57. doi: [10.4161/adip.26520](https://doi.org/10.4161/adip.26520) PMID: [24575370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24575370/)

Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by *LMNA* mutations.

Revista: *Clinical Endocrinology*

PMID: 21883346

Títol: Característiques histològiques i moleculars del teixit adipós lipomatós i no lipomatós en la lipodistròfia parcial familiar causada per mutacions al gen *LMNA*.

Resum: La lipodistròfia parcial familiar de tipus 2 (FPLD2) és una malaltia rara del teixit adipós (TA) causada per mutacions al gen *LMNA*, i en el context de la qual ocasionalment hi apareixen lipomes. En aquest estudi, es va fixar com a objectiu la caracterització de la lipomatosi associada a la FPLD2 i l'estudi de l'expressió gènica i proteica de marcadors implicats en el control del cicle cel·lular, funció mitocondrial, inflamació i adipogènesi. S'empraren biòpsies de lipomes i greix perilipomatós de quatre pacients amb FPLD2 i de deu individus control, les quals s'analitzaren per microscòpia òptica. La presència de cèl·lules inflamatòries s'avaluà per immunohistoquímica. S'empraren la reacció en cadena de la polimerasa a temps real i la transferència western per a avaluar els nivells d'expressió gènica i de les proteïnes d'interès. Els adipòcits dels pacients lipodistròfics mostraren una mida superior a la dels controls tant en els lipomes com en el greix circumdant. El TA lipodistròfic presentà una infiltració de macròfags CD68+ i de limfòcits CD3+. L'expressió de *TP53* es trobà disminuïda en tots els lipomes. A nivell de proteïna, C/EBP β , p53 i pRb es trobaren severament alterats tant en els lipomes dels pacients amb lipodistròfia com en el greix perilipomatós provinent de les àrees lipoatròfiques, mentre que l'expressió de C/EBP α es mostrà inalterada. Els gens de funció mitocondrial es trobaren subexpressats en el greix lipoatròfic. En ambdues classes de lipomes i en el greix perilipomatós de les regions lipoatròfiques, l'expressió dels gens d'adipogènesi fou menor que en els controls. En conclusió, es pot establir que àdhuc en els seus lipomes, la maquinària adipogènica es troba compromesa en el greix lipoatròfic de pacients amb FPLD2, tot i que el fenotip histològic fos proper a la normalitat amb l'excepció de la infiltració immunitària de baixa densitat. Aquests resultats suggereixen que la via de p53 i algunes proteïnes adipogèniques, com ara C/EBP α , podrien contribuir al manteniment d'aquest fenotip proper a la normalitat en el TA que roman en aquests pacients.

ORIGINAL ARTICLE

Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations

D. Araújo-Vilar*, B. Victoria*, B. González-Méndez*, F. Barreiro†, B. Fernández-Rodríguez‡, R. Cereijo§, J.M. Gallego-Escuredo§, F. Villarroya§ and A. Pañeda-Menéndez*

*Thyroid and Metabolic Diseases Unit (U.E.T.eM.), Department of Medicine, University of Santiago de Compostela, †Department of Surgery, University of Santiago de Compostela, ‡Department of Pathology, Clinical University Hospital of Santiago de Compostela and §Department of Biochemistry and Molecular Biology, and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), University of Barcelona, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Spain

Summary

Objectives Type 2 familial partial lipodystrophy (FPLD2) is a rare adipose tissue (AT) disease caused by mutations in LMNA, in which lipomas appear occasionally. In this study, we aimed to histologically characterize FPLD2-associated lipomatosis and study the expression of genes and proteins involved in cell cycle control, mitochondrial function, inflammation and adipogenesis.

Design and patients One lipoma and perilipoma fat from each of four subjects with FPLD2 and 10 control subjects were analysed by optical microscopy. The presence of inflammatory cells was evaluated by immunohistochemistry. Real-time RT-PCR and Western blot were used to evaluate gene and protein levels.

Results Adipocytes from lipodystrophic patients were significantly larger than those of controls, in both the lipomas and perilipoma fat. Lipodystrophic AT exhibited CD68⁺ macrophages and CD3⁺ lymphocytes infiltration. TP53 expression was reduced in all types of lipomas. At protein level, C/EBP β , p53 and pRb were severely disturbed in both lipodystrophic lipomas and perilipoma fat coming from lipoatrophic areas, whereas the expression of CEBP α was normal. Mitochondrial function genes were less expressed in lipoatrophic fat. In both lipomas and perilipoma fat from lipoatrophic areas, the expression of adipogenes was lower than controls.

Conclusions Even in lipomas, the adipogenic machinery is impaired in lipodystrophic fat coming from lipoatrophic regions in FPLD2, although the histological phenotype is near-normal, exhibiting low-grade inflammatory features. Our results suggest that the p53 pathway and some adipogenic proteins, such as CEBP α , could contribute to the maintenance of this near normal phenotype in the remnant AT present in these patients.

(Received 13 May 2011; returned for revision 30 May 2011; finally revised 16 August 2011; accepted 17 August 2011)

Introduction

Type 2 familial partial lipodystrophy (FPLD2; OMIM 151660) is characterized by a loss of subcutaneous adipose tissue (AT) in the limbs and buttocks, accumulation of fat in the neck and face and predisposition to insulin resistance, leading to complications such as glucose intolerance, dyslipidaemia, liver steatosis and increased risk of coronary heart disease.¹ FPLD2 results from mutations in the LMNA gene,² which codes for several spliced proteins, including lamin A, lamin C, lamin C2 and lamin A Δ 10. Lamin A, a key component of the nuclear lamina, is formed from post-translational modifications of a precursor protein, prelamin A.³

Although it has not been frequently reported in the literature,⁴ in our clinical experience, lipomas can arise in patients with FPLD2 (20% of prevalence in our cohort), even in lipoatrophic areas. Lipomas are common benign neoplasms composed of mature fat cells with minimal or no variation in shape and size and no nuclear atypia.⁵ The aetiology of lipomas remains obscure, though some germ-line mutations in the RB1 gene⁶ and mitochondrial DNA (tRNA^{Lys})^{7,8} among other genes⁹ have been associated with multiple lipomatosis, and chromosomal aberrations have been described in lipoma adipocytes.⁵ However, details of the cellular and molecular phenomena underlying the pathogenesis of this kind of tumours remain unclear.

Among the few studies published on the molecular basis of lipomas, altered expression of the master transcription factors of adipogenesis (PPAR γ and C/EBP α) has been reported.^{10,11} On the other hand, some features of brown fat have been reported in lipomas associated with tRNA^{Lys} mutations.¹⁰ This last aspect is intriguing because fat accumulates in the neck, axillas and back of patients with FPLD2 just the usual location of brown AT in the human beings.¹²

Correspondence: David Araújo-Vilar, Department of Medicine, Facultade de Medicina, University of Santiago de Compostela, Rua de San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34639393458; Fax: +34981559937; E-mail: david.araujo@usc.es

To the best of our knowledge, the histological and molecular features of FPLD2-associated lipomas have not yet been studied.

Subjects and methods

This study was approved by the Ethics Review Panel of the Consellería de Sanidade (Xunta de Galicia, Spain) and carried out according to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. All of the patients provided informed consent for participation in the study and publication of their clinical, biochemical and genetic information.

Subjects

Four patients with FPLD2 and lipomas were studied. Two of the patients had a known mutation in the LMNA gene (R482W), and the other two had a not yet described mutation in the same gene (I299V). Ten age- sex- and BMI-matched nonlipodystrophic subjects with lipomas were studied as controls. The anthropometric measures, clinical features, anatomic location and size of the lipomas in these subjects are shown in Table 1.

LMNA mutation analysis

DNA was prepared from peripheral white blood cells using standard procedures.¹³ LMNA exons 1–12 and the surrounding intronic sequences were amplified by PCR using primers and conditions that were described previously.¹⁴ The fragments were sequenced using the ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Table 1. Clinical characteristics of the subjects

Subject	Gender	Age	BMI	Lipoma		DM2	HBP	CVD	
				FPLD2	Location				Size (cm)
1	M	66	25.5	R482W	Back	7.0 × 6.4	No	No	Stroke
2	F	40	24.9	R482W	Abdomen	4.3 × 3.0	No	No	No
3	F	43	32.3	I299V	Thigh	3.0 × 2.1	Yes	Yes	No
4	F	70	33.4	I299V	Abdomen	4.8 × 4.4	Yes	Yes	No
5	F	59	30.2	NO	Back	7.0 × 5.5	No	No	No
6	F	53	27.4	NO	Back	5.0 × 5.0	No	Yes	No
7	F	59	28.9	NO	Thigh	4.0 × 2.5	Yes	No	No
8	M	28	21.5	NO	Abdomen	6.0 × 4.0	No	No	No
9	F	29	23.8	NO	Back	4.0 × 3.0	No	No	No
10	F	25	21.1	NO	Back	6.5 × 5.3	No	No	No
11	F	31	28.8	NO	Thigh	3.5 × 4.0	No	No	No
12	F	53	33.7	NO	Back	6.5 × 6.0	IFG	No	No
13	F	66	30.0	NO	Abdomen	4.0 × 3.5	Yes	Yes	No
14	M	28	29.6	NO	Thigh	4.5 × 4.0	No	No	No

M, male; F, female; BMI, body mass index (kg/m²); DM2, type 2 diabetes mellitus; IFG, impaired fasting glycaemia; HBP, high blood pressure; CVD, cardiovascular disease; FPLD2, type 2 familial partial lipodystrophy. All of lipomas were encapsulated.

Lipoma resection and perilipoma fat biopsy

One lipoma and a sample of nonlipomatous AT close to the tumour were extirpated from lipodystrophic and nonlipodystrophic subjects following standard surgical procedures. From one of the FPLD2 patients (R482W, women), two additional fat samples were obtained from the neck and thigh. Fat samples were cleaned of visible fibrous connective tissue and blood vessels and divided into roughly equal portions. One portion was snap-frozen immediately in liquid nitrogen and stored at –80 °C until further analysis, and the other was fixed in 10% buffered formalin to be processed for optical microscopy.

Optical microscopy

The fixed samples were embedded routinely in paraffin. Sections (4 µm thick) were stained with haematoxylin–eosin (HE) and analysed using light microscopy (Olympus BX51, Hamburg, Germany). For the morphometric study, 30 randomly selected adipocytes were analysed per sample. The major and minor diameters of each adipocyte were measured using an ocular micrometre.

Immunohistochemistry

The sections were mounted on FLEX IHC slides (Dako, Glostrup, Denmark) and heated at 60 °C for 1 h. The technique was automatically performed using an Autostainer Link 48 (Dako). After deparaffination and epitope retrieval in EnVision FLEX target retrieval solution with high pH for 20 min at 97 °C, the slides were allowed to cool in PT Link to 65 °C, and then in Dako wash buffer for 5 min at room temperature. The immunostaining protocol included successive incubation in EnVision FLEX peroxidase-blocking reagent (5 min); primary ready-to-use FLEX antibodies against CD68 (PG-M1), CD3, CD20, CD138 and Ki67; EnVision FLEX + mouse (linker) (15 min); EnVision FLEX/HRP (dextran polymer conjugated with horseradish peroxidase and affinity-isolated goat anti-mouse immunoglobulins, 20 min); substrate working solution (mix) (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen solution, 10 min); and EnVision FLEX haematoxylin (9 min). The proliferation index measured by Ki67 was estimated using ACIS III Image Analysis (Dako).

Western blot

Whole-cell lysates were obtained from human AT by sonication in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and 50 mM Tris, pH 8) containing 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and protease inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO, USA) at 4 °C. Two alternative protein extraction methods were used for the Lamin A/C detection assays: (i) final pellets (insoluble material) obtained with the lysis buffer mentioned above were solubilized using hot (100 °C) loading buffer for 1 min or (ii) AT samples were lysed in 'hot' lysis buffer (90 °C) containing 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 1% SDS, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5% beta-mercaptoethanol and protease inhibitors. Proteins were resolved in 8% or 10% SDS–

PAGE gels and transferred to PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). Blots were blocked for 1 h at room temperature in 2% or 5% nonfat milk in PT (PBS, 1% Tween-20). The blots were probed with anti-PPAR γ (sc-7196), anti-PPAR γ 2 (sc-22020), anti-C/EBP β (sc-150), anti-p21 (sc-397), anti-p53 (sc-65334) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-C/EBP α (#2843), anti-phospho-Rb (#3590) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-Lamin A/C (monoclonal MAN-LAC1 4A7, kindly provided by Prof. G.E. Morris)¹⁵ and monoclonal anti- β -actin (A5316) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (Thermo Scientific, 32460, Rockford, IL, USA) or anti-mouse IgG peroxidase conjugated (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA, NA931V) were the secondary antibodies. Immunoblot bands were revealed by chemiluminescence (Supersignal West Dura extended duration substrate; Thermo Scientific). Densitometry was performed using ImageJ software.¹⁶

Real-time RT-PCR

Expression of LMNA, UCP1 (a brown fat marker), DLK1 (Pref1, a preadipocyte marker), CEBPA, CEBPB, SREBF1, PPARG, LPL, SLC2A4 (GLUT4), LEP, FABP4 (all of them are genes involved in adipocyte differentiation), RB1, TP53 (p53) (genes involved in cell cycle control), CD3D, CD68, IL8, TNF (TNF α) (inflammation markers), MT-CO2, COX4I1 (COX4) and SIRT3 mRNAs (genes related with mitochondrial function) and the internal control RNA polymerase II (RPII) were quantified in a thermal cycler (Light Cycler 2.0; Roche Diagnostics, Sant Cugat del Valles, Spain) as described previously.¹⁷ Mitochondrial DNA (mtDNA) was quantified by quantitative real-time PCR as described previously¹⁸ and expressed as relative levels with respect to the nuclear, single-copy CEBPA.

Statistical analysis

Data are provided as means (SD). Owing to the low number of experiments, data were considered as not normally distributed, and the differences between groups were evaluated by a nonparametric test (Mann–Whitney *U*-test). Significance was set at $P < 0.05$. All statistical analyses were carried out using SPSS 14.0 software (Chicago, IL, USA).

Results

Of the four lipomas, two were from patients from the same pedigree¹⁹ with FPLD2 because of the R482W mutation in LMNA, whereas the other two came from a mother and daughter from another pedigree (Fig. 1a,b) with a previously not described missense mutation in LMNA (NM_170707.2): c. 895 A>G, p. Ile299Val (Fig. 1c). This mutation was not found in 100 control chromosomes.

Two of the lipomas were from nonlipoatrophic areas [back (R482W) and abdomen (I299V)], and two from lipoatrophic areas [abdomen (R482W) and thigh (I299V)].

Histological findings and immunohistochemistry

All of the studied lipomatous tissue stained with HE exhibited the typical aspects of white AT, with nonhistological features of brown fat. This tissue was similar to the perilipoma AT for both lipodystrophic and control samples (Fig. 2a).

The morphometric study revealed that adipocytes from lipomas were significantly larger than adipocytes from perilipoma fat in both controls and lipodystrophic patients. Unexpectedly, the lipodystrophic adipocytes were significantly larger than control adipocytes (Fig. 2b).

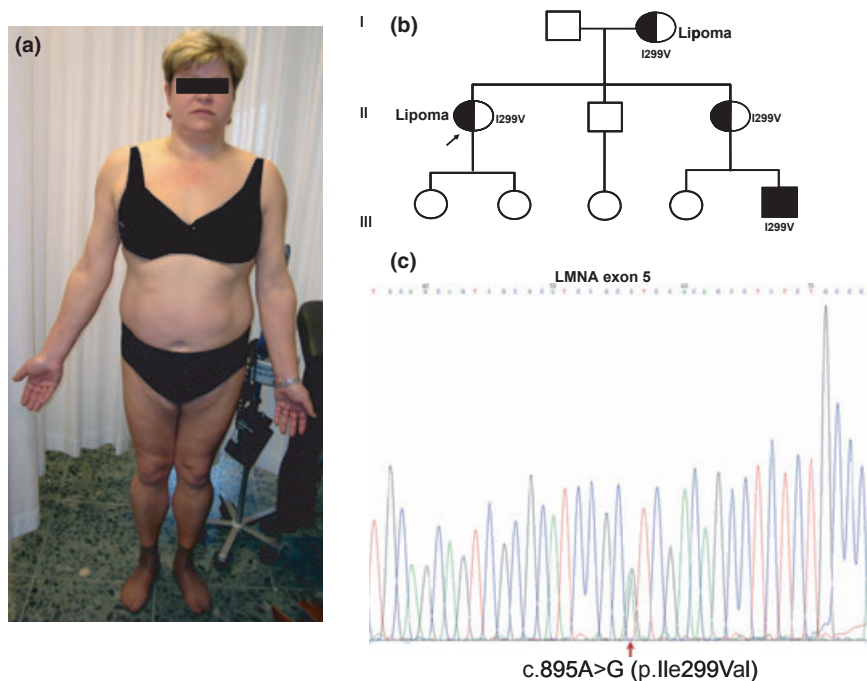


Fig. 1 (a): Photo of the index case with type 2 familial partial lipodystrophy (FPLD2) bearing the I299V mutation in LMNA. This patient showed an atypical form of FPLD with a loss of fat in the buttocks and limbs, abdominal fat accumulation, muscular hypertrophy, severe insulin resistance, diabetes mellitus, hypertriglyceridaemia and hypoleptinaemia. (b) Pedigree of the family with the I299V mutation in LMNA. The arrow indicates the index case. The mother and sister of the index case have a similar fat distribution to that of the propositus. The nephew of the index case is asymptomatic. The mother suffers diabetes mellitus with severe insulin resistance, hypertriglyceridaemia and hypoleptinaemia, whereas the sister has a normal glucose tolerance, hypertriglyceridaemia and normal leptinaemia. (c) Genetic analysis of LMNA in the proband, indicating a heterozygous A to G transition at position 895 (exon 5), predicting an I299V substitution.

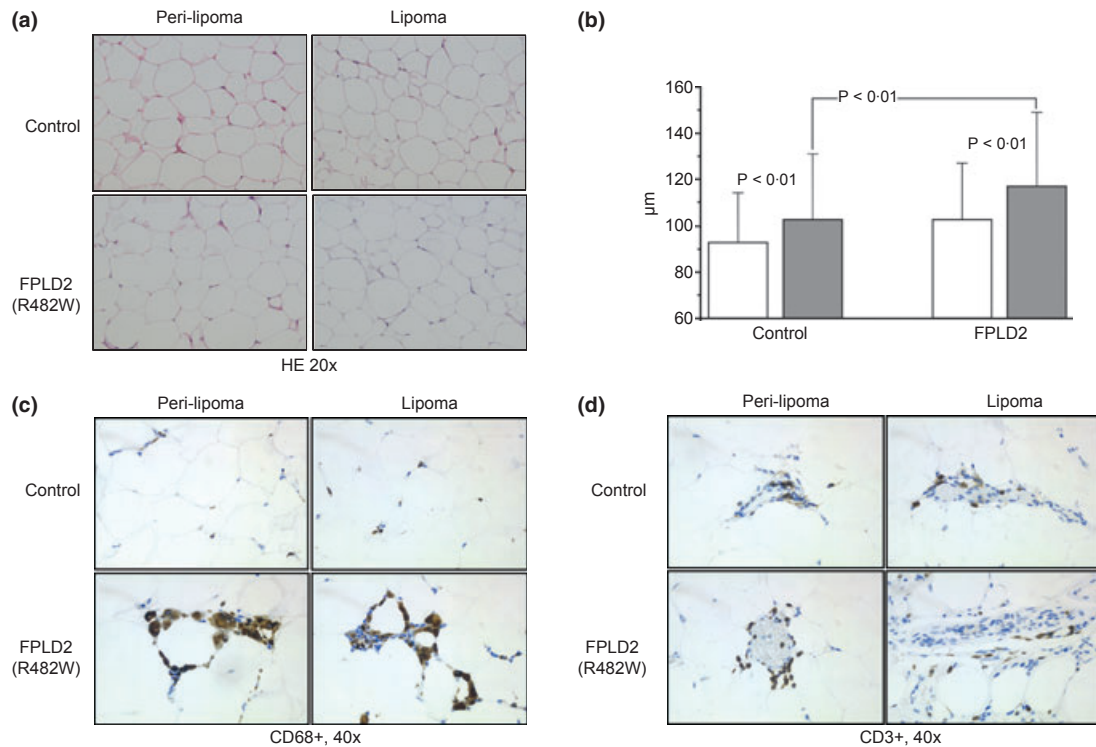


Fig. 2 Histological and immunohistochemical findings in representative perilipoma and lipoma samples. (a) Haematoxylin-eosin staining showing the typical white adipose tissue (AT) appearance in both tissues. (b) Morphometric study. Adipocytes from lipomas (grey bars) were larger than those from perilipomatous fat (white bars), and adipocytes from lipodystrophic samples were larger than those from control fat samples. (c) Immunohistochemistry for CD68. CD68⁺ cells surrounded several adipocytes in the crown-like structures frequently seen lipodystrophic AT. (d) Immunohistochemistry for CD3. More CD3⁺ lymphocytes appeared in lipodystrophic lipomas with a scattered and perivascular distribution. In the rest of the samples, the CD3⁺ T cells were scarce with perivascular distribution.

CD68⁺ macrophages were found in both lipomas and perilipoma AT from lipodystrophic subjects, but they were very rare in control subjects, and the distribution was preferentially scattered. In lipodystrophic samples, these cells appeared to be both scattered and to surround adipocytes. Crown-like structures, a feature of adipocyte phagocytosis by infiltrating macrophages, were also observed in these patients. This disposition around adipocytes seems to be more frequent in lipomas than perilipoma fat in lipodystrophic patients (Fig. 2c).

Apparently, more CD3⁺, with a scattered and perivascular distribution, were found in lipodystrophic lipomas compared with the other samples. In the rest of the samples, the CD3⁺ T cells were scarce with perivascular distribution (Fig. 2d).

The proportion of Ki67⁺ proliferating cells was significantly higher in lipomas from lipodystrophic patients than those from control subjects ($2.75 \pm 0.96\%$ vs $0.25 \pm 0.5\%$, $P < 0.007$).

B cells (CD20⁺) and plasma cells (CD138⁺) were essentially absent in all of the analysed samples.

Real-time RT-PCR

The gene expression results are shown in Table 2. Each individual lipodystrophic fat sample was compared with control samples coming from the same anatomical region.

Among genes that are involved in cell cycle control (RB1 and TP53), no differences were found between perilipoma AT from

lipodystrophic subjects and perilipoma AT from control subjects. In lipomas, the most remarkable data were the lower expression of TP53 from control and lipodystrophic subjects compared with perilipoma AT.

We also analysed markers of mitochondrial function, and the expression of MT-CO2 mRNA, a transcript encoded by mitochondrial DNA, was significantly reduced in perilipoma AT from the FPLD2 patients compared to controls, with a less marked tendency to a lower expression in lipodystrophic lipomas. This reduction could not be attributed to changes in the relative amounts of mitochondrial DNA, which were unaltered or even increased in the lipodystrophic samples. SIRT3, a mitochondrial protein involved in the regulation of mitochondrial lipid catabolism,²⁰ was clearly reduced only in lipomas from FPLD2 patients.

We also analysed the expression of inflammatory markers and infiltrating white blood cells genes. Regarding CD3D and CD68 transcript expression, no clear tendency was found in the analysed samples supporting our immunohistochemical findings. It may happen that the small representation of RNA from the CD3⁺ and CD68⁺ cells in the overall preparations of RNA from total AT samples give a low sensitivity to this assays respect to immunohistochemical observations. However, it is worth to mention that the expression of both IL8 and TNF was higher in lipomatous perilipoma samples compared with controls. Moreover, a tendency to a lower expression of these genes was found in lipodystrophic lipomas.

Table 2. Gene expression relative to RPII gene in adipose tissue from perilipoma and lipoma biopsies of subjects with FPLD2 and controls

Adipose tissue from lipoatrophic areas								
Gene	Perilipoma (Abdomen)		Perilipoma (Thigh)		Lipoma (Abdomen)		Lipoma (Thigh)	
	Control	R482W	Control	I299V	Control	R482W	Control	I299V
RB1	1.04 ± 0.21	1.34	1.01 ± 0.11	1.44	0.74 ± 0.05	1.33	0.87 ± 0.04	0.99
TP53	1.01 ± 0.24	1.20	1.00 ± 0.90	1.23	0.56 ± 0.22	1.03	0.64 ± 0.04	1.01
LMNA	1.02 ± 0.37	1.34	1.04 ± 0.33	1.27	0.66 ± 0.09	1.05	1.02 ± 0.50	1.03
SREBF1	1.05 ± 0.37	0.81	1.15 ± 0.66	0.35	3.52 ± 0.19	1.24	1.94 ± 0.21	0.93
PPARG	1.02 ± 0.21	0.45	1.02 ± 0.18	0.32	0.86 ± 0.33	0.38	1.03 ± 0.13	0.10
CEBPA	1.02 ± 0.22	0.31	1.04 ± 0.30	0.36	1.28 ± 0.52	0.58	1.95 ± 0.69	0.14
CEBPB	1.04 ± 0.31	0.18	1.08 ± 0.45	0.47	0.93 ± 0.04	0.71	1.22 ± 0.70	0.45
LPL	1.03 ± 0.25	0.38	1.07 ± 0.27	0.27	0.50 ± 0.33	0.38	0.98 ± 0.28	0.10
SLC2A4	1.03 ± 0.29	0.45	1.04 ± 0.31	0.23	2.44 ± 1.07	1.00	2.74 ± 0.81	0.26
LEP	1.46 ± 1.23	0.87	1.14 ± 0.47	1.17	0.95 ± 0.80	2.66	2.17 ± 1.31	0.20
FABP4	1.04 ± 0.33	0.53	1.01 ± 0.16	0.43	0.80 ± 0.01	0.78	1.28 ± 0.55	0.13
CD3D	1.08 ± 0.06	0.40	0.76 ± 0.19	1.14	0.97 ± 0.11	0.50	1.06 ± 0.52	1.38
CD68	1.04 ± 0.13	0.68	0.90 ± 0.06	0.74	1.14 ± 0.01	0.63	1.04 ± 0.2	3.93
IL8	1.07 ± 0.87	1.57	0.98 ± 0.06	2.30	1.21 ± 0.91	0.79	2.54 ± 2.04	0.11
TNF	1.36 ± 0.32	1.84	0.70 ± 0.24	3.94	0.91 ± 0.25	0.35	0.76 ± 0.53	0.92
MT-CO2	1.11 ± 0.31	0.61	1.51 ± 0.14	0.63	0.95 ± 0.35	0.88	1.03 ± 0.50	0.38
COX4I1	1.08 ± 0.05	0.77	0.62 ± 0.19	1.06	0.51 ± 0.22	1.02	0.94 ± 0.32	0.73
SIRT3	1.05 ± 0.09	0.81	1.16 ± 0.66	1.09	1.48 ± 0.12	0.71	0.92 ± 0.17	0.32
mtDNA	1.04 ± 0.04	0.31	0.65 ± 0.07	0.98	1.14 ± 0.05	1.43	1.2 ± 0.57	1.20

Adipose tissue from lipohypertrophic areas								
Gene	Perilipoma (Back)		Perilipoma (Abdomen)		Lipoma (Back)		Lipoma (Abdomen)	
	Control	R482W	Control	I299V	Control	R482W	Control	I299V
RB1	1.03 ± 0.20	1.03	1.03 ± 0.28	0.98	1.04 ± 0.41	1.02	0.74 ± 0.05	1.16
TP53	1.02 ± 0.19	0.82	1.02 ± 0.24	1.32	0.56 ± 0.60	0.59	0.58 ± 0.22	0.52
LMNA	1.10 ± 0.03	1.10	1.05 ± 0.37	1.81	0.72 ± 0.25	0.49	0.66 ± 0.09	0.57
SREBF1	1.02 ± 0.21	1.22	1.05 ± 0.37	3.09	1.14 ± 0.49	1.23	3.52 ± 0.19	2.29
PPARG	1.07 ± 0.38	0.71	1.02 ± 0.21	0.89	0.81 ± 0.43	0.73	0.86 ± 0.33	0.76
CEBPA	1.09 ± 0.42	0.82	1.02 ± 0.22	1.08	1.46 ± 0.76	1.48	1.28 ± 0.52	1.43
CEBPB	1.35 ± 1.13	0.67	1.04 ± 0.31	0.74	0.88 ± 0.38	0.81	0.93 ± 0.04	0.83
LPL	1.09 ± 0.40	0.66	1.03 ± 0.25	0.83	0.80 ± 0.40	0.84	0.50 ± 0.33	0.42
SLC2A4	1.20 ± 0.51	0.51	1.03 ± 0.29	0.66	2.27 ± 1.29	1.25	2.44 ± 1.07	0.89
LEP	1.09 ± 0.40	0.66	1.03 ± 0.25	0.83	0.80 ± 0.40	0.84	0.50 ± 0.33	0.42
FABP4	1.05 ± 0.37	1.42	1.04 ± 0.33	0.62	1.42 ± 0.39	1.60	0.80 ± 0.01	0.97
CD3D	1.55 ± 0.69	1.67	0.97 ± 0.11	0.67	0.9 ± 0.16	0.91	0.62 ± 0.07	0.45
CD68	1.19 ± 0.47	0.69	1.06 ± 0.11	0.51	0.88 ± 0.28	1.30	1.00 ± 0.40	0.71
IL8	1.01 ± 0.33	1.04	0.50 ± 0.03	0.41	1.46 ± 1.68	0.09	0.49 ± 0.10	0.17
TNF	0.88 ± 0.56	0.12	0.56 ± 0.47	0.69	1.22 ± 1.17	0.44	0.81 ± 0.17	0.62
MT-CO2	0.97 ± 0.26	0.24	0.92 ± 0.11	0.58	1.34 ± 0.91	1.47	0.75 ± 0.12	0.71
COX4I1	0.99 ± 0.93	0.52	0.98 ± 0.04	1.09	0.95 ± 0.29	1.57	0.42 ± 0.02	0.29
SIRT3	1.05 ± 0.24	0.95	0.91 ± 0.01	1.59	1.24 ± 0.56	0.59	1.17 ± 0.31	0.81
mtDNA	0.43 ± 0.05	1.55	0.91 ± 0.12	1.30	1.14 ± 0.6	1.32	1.36 ± 0.86	1.23

RPII, RNA polymerase II; FPLD2, type 2 familial partial lipodystrophy.

The expression of genes directly related to adipocyte differentiation was significantly reduced in perilipoma lipoatrophic AT from patients with FPLD2. Thus, the relative expression of the CEBPA, CEBPB, PPARG, LPL and SLC2A4 genes was 45–80% lower in these patients. However, these differences were not found in the lipodystrophic samples coming from lipohypertrophic areas.

The expression of several adipogenes was increased in lipomas. The expression of SREBF1, CEBPA and SLC2A4 was increased in lipomas from control subjects compared with perilipoma AT. Contrary to expectations, no changes were observed in the remaining adipogenes (PPARG, CEBPB, LPL, LEP, FABP4). In general terms, the expression of the analysed adipogenes in lipodystrophic lipo-

mas coming from lipoatrophic areas was reduced; however, this was not found in lipodystrophic lipomas coming from lipohypertrophic areas.

The expression of UCP1 and Pref1 was negligible in all of the studied samples.

Western blot

The levels of lamin A and lamin C were severely reduced in the lipodystrophic AT (perilipoma and lipoma) from lipoatrophic body areas, but not in the AT from lipohypertrophic areas (back) (Fig. 3a). To corroborate that the anatomical location was the cause of these findings, AT from different parts of the body (neck, abdomen and thigh) of the same FPLD2 patient (R482W) was analysed for lamin A/C. We found a low level of lamin A independent of anatomical location, though mainly in the lipoatrophic areas. We also detected an extra band corresponding to prelamin A accumulation in the same lipodystrophic patient (Fig. 3b). The only difference that we found among these lipodystrophic patients was gender. In the only man we studied, the levels of lamin A in both lipoma and perilipoma fat were very similar as those of control subjects.

Because these results were not concordant with our previous studies,¹⁷ we repeated the analysis using a different protein extraction protocol that included heating the AT samples in the lysis buffer at 90 °C and increasing the reducing conditions. The levels of lamin A/C after this protocol were similar to those found in control

subjects (Fig. 3c). To determine the possible causes of the low lamin A levels in lipodystrophic patients, we evaluated the amount of protein in the insoluble pellet, observing a clear lamin A band for the samples from the woman with FPLD2 (R482W), but not in the soluble fraction, indicating a lower solubility (Fig. 3d).

Analysis of the major transcription factors controlling adipogenesis showed a marked reduction of the CEBP β levels in the lipodystrophic AT, both lipomatous and perilipomatous, mainly in samples from lipoatrophic areas (Fig. 4a). The total amount of PPAR γ was also reduced in both lipodystrophic samples and non-lipodystrophic lipomas, and no significant differences were found in the levels of CEBP α (Fig. 4b). As PPAR γ 2 is preferentially expressed in AT, we also analysed this isoform. Only the sample coming from the thigh of a FPLD2 (I299V) patient showed a lower expression of this protein (Fig. 4b).

Regarding the transcription factors controlling cell cycle, we found that the expression of phosphorylated pRb was markedly reduced, particularly in lipodystrophic women, in both lipomas and perilipoma fat (Fig. 4c). The levels of p53 protein and its target p21 were also reduced in lipodystrophic women (Fig. 4d), but not in the samples from the lipodystrophic man (data not showed).

Discussion

We found no major differences in HE staining, but the adipocytes from lipodystrophic lipomas were bigger than those from other samples. Adipocytes in perilipomatous AT from FPLD2 patients

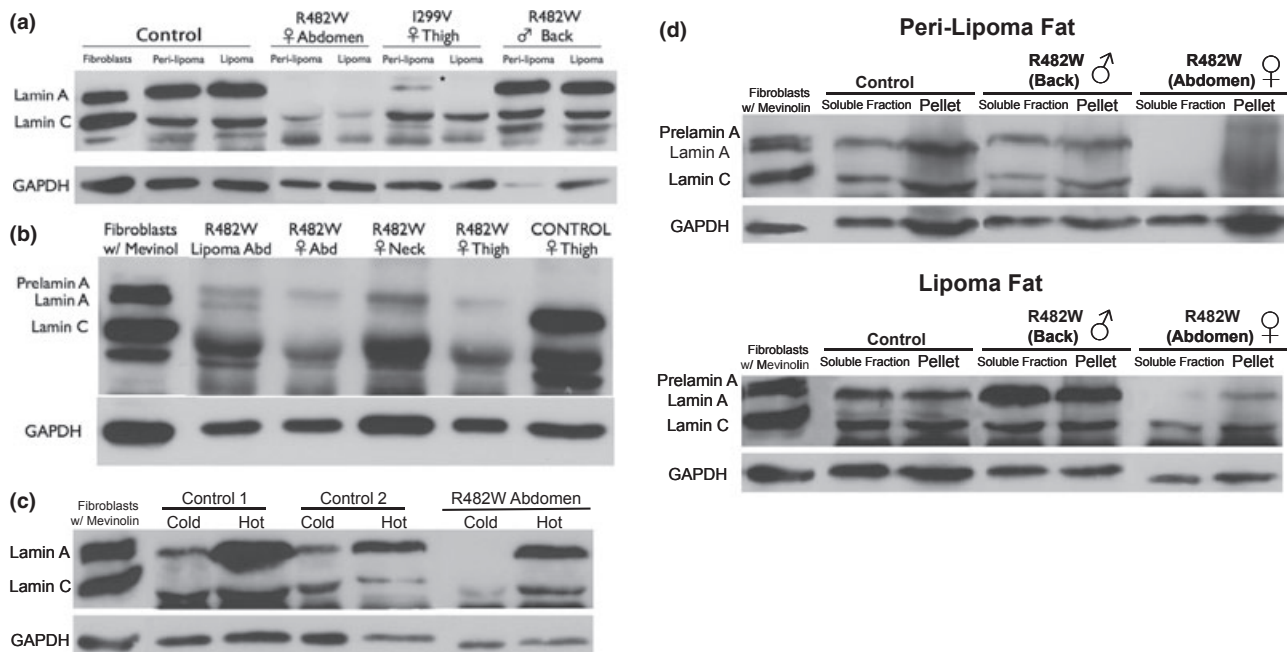


Fig. 3 Detection of prelamin A and lamin A/C by different Western blot protocols in adipose tissue. (a) Western blot analysis of lamin A and C in perilipoma and lipoma fat samples from a representative control and two lipodystrophic patients (bearing R482W and I299V LMNA mutations). *prelamin A band. (b) Western blot analysis of prelamin A, lamin A and lamin C in perilipoma (3rd to 5th lane) and lipoma fat from different anatomical locations of the same type 2 familial partial lipodystrophy (FPLD2) patient (R482W) (6th lane: perilipoma control). Fibroblasts from a control subject were previously treated with mevinolin for 18 h. (c) Western blot analysis of lamin A and lamin C in perilipoma fat from representative controls and a woman with FPLD2 (R482W) using protocols with different temperature and reducing conditions ('hot' and 'cold', see text for explanation). (d) Western blot analysis of lamin A and lamin C in perilipoma and lipoma fat from soluble and insoluble (pellet) protein fractions obtained from a representative control subject, a man with FPLD2 (R482W, lipohypertrophic area, back) and a woman with FPLD2 (R482W, lipoatrophic area, abdomen).

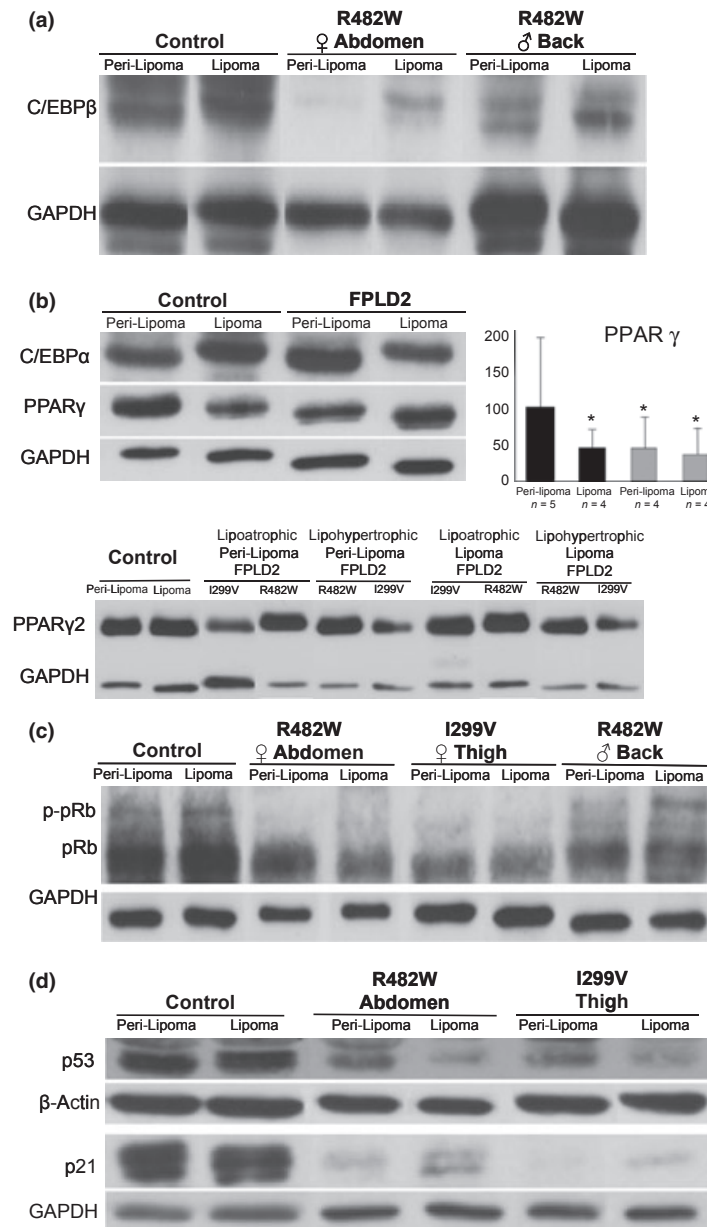


Fig. 4 (a) Western blot analysis of C/EBPβ in perilipoma and lipoma fat samples from a representative control subject and lipodystrophic patients. (b) Western blot analysis of C/EBPα, PPARγ and PPARγ2 and densitometric analysis of PPARγ bands in adipose tissue samples from control subjects (black bars) and type 2 familial partial lipodystrophy (FPLD2) subjects (grey bars). For Western blot analysis $n = 5$ control subjects and $n = 4$ FPLD2 patients. Data are mean \pm SD. * $P < 0.05$. (c) Western blot analysis of pRb and phosphorylated pRb (p-pRb) in perilipoma and lipoma fat samples from a representative control and lipodystrophic patients. (d) Western blot analysis of p53 and p21 proteins in perilipoma and lipoma fat samples from a representative control and lipodystrophic patients.

were also larger than those from control subjects. The larger adipocytes in the lipodystrophic AT may seem intriguing, but Wojtanik *et al.*²¹ described previously hypertrophic adipocytes in the white AT depots of a FPLD2 transgenic mouse model.

In the light of these histological findings and the lack of UCP1 expression, we can reasonably rule out the hypothesis that the lipomatous AT of FPLD2 patients are associated with a brown fat-like phenotype.

The lipodystrophic AT showed the macrophage and T cell infiltration characteristic of chronic low-grade inflammation, which is

associated with insulin resistant obesity,²² although these findings were not supported by all of the studied inflammatory markers. Even so, the lipodystrophic fat exhibits some features of other disorders that occur with insulin resistance. Increased pro-inflammatory cytokine expression and more macrophages²³ have been found in the subcutaneous AT of patients with HIV-associated lipodystrophy. In a P2-nSREBP-1c transgenic mice, an established model of lipodystrophy, elevated levels of circulating cytokines and infiltrating macrophages have been reported in white AT depots, suggesting systemic inflammation.²⁴ The behaviour of nonlipody-

strophic lipomas was different and no inflammatory data were found, as noted in a previous study.¹¹

Mitochondrial alterations have been reported in cells bearing LMNA mutations,²⁵ and lipomatosis has been associated with altered mitochondrial DNA because of genetic alterations¹⁰ or mitochondrial disturbances occurring as side effects of antiretroviral treatment.¹⁸ Although the reasons for this dysfunction are unknown, abnormal energy production because of inappropriate expression of components of the respiratory chain or lipid oxidation regulators (e.g. SIRT3) have been hypothesized to elicit a proliferative response in adipose cell depots.

Regarding the genes and proteins involved in adipogenesis, the nonlipomatous and lipomatous AT of lipodystrophic patients showed a decreased expression in practically all of the studied adipogenes, but only in those samples coming from lipoatrophic regions. These results are in accordance with our previous studies.¹⁷

The process of adipocyte differentiation involves the sequential expression of transcription factors C/EBP β , C/EBP δ , PPAR γ and C/EBP α . Our findings suggest that, despite the important suppression of C/EBP β and low levels of PPAR γ and CEBPA transcript expression in the lipodystrophic fat, these transcripts are translated at high enough levels to maintain near-normal levels of the proteins and near-normal phenotype in the scarce AT in these patients.

We found that the major genes involved in the adipogenic process in nonlipodystrophic lipomas were TP53, SREBF1, CEBPA and SLC2A4. The results of gene expression in lipodystrophic lipomas were different, mainly in those coming from lipoatrophic areas in which many adipogenes were severely underexpressed. These findings suggest that other unknown factors are involved in the cell proliferation process of lipodystrophic lipomas, at least in those coming from lipoatrophic areas.

Other authors have investigated the expression of master genes of adipogenesis in nonlipodystrophic lipomas with different results. Guallar *et al.*¹⁰ found lower PPAR γ expression in lipoma AT, but others^{9,11} found no differences. On the other hand, Guallar *et al.*¹⁰ found an increment in CEBPA expression in at least one of the three analysed lipomas.

The putative pathogenetic mechanisms of lipodystrophic laminopathies have been suggested to be related to both a failure of adult stem cell differentiation and prelamin A toxicity, leading to senescence.²⁶ In the present study, we analysed two major factors in cell cycle control, p53 and pRb. We found that the amount of p53 and its target p21 were dramatically reduced in both lipoma and perlipoma AT from lipodystrophic patients. p53 inhibits adipogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells through the down-regulation of PPAR γ and C/EBP α .²⁷ Therefore, we would expect to find p53 activation in these fat samples, but our results suggest that the p53 pathway could act as a compensatory mechanism promoting adipogenesis in the scarce AT present in these patients. Yahagi *et al.*²⁸ found that the p53 and p21 genes were highly induced in the adipocytes of ob/ob mice, leading to the negative regulation of SREBF1 and other lipogenic genes. The authors suggested that the activation of p53 might constitute a negative feedback loop against excess fat accumulation in adipocytes.

Phosphorylated pRb was reduced in lipodystrophic fat samples (lipoma and perlipoma). pRb regulates progression through the

cell cycle at the G1 \rightarrow S-phase transition by inhibiting the activity of E2F-type transcription factors in a phosphorylation-dependent manner.²⁹ The importance of pRb in adipocyte differentiation is illustrated by the inability of pRb-deficient fibroblasts to undergo adipose conversion³⁰; however, the role of pRb in adipogenesis is complex. Dorner *et al.*³¹ reported that the LAP2 α -lamin A/C complex is critical for pRb-mediated entry of adult stem cells into a postmitotic state, but it is not required for terminal adipocyte differentiation. Whether the decreased p-pRb was a consequence of mutated lamin A/C or that it contributed to less efficient adipocyte differentiation is a question that cannot be answered by our data.

The variability in BMI among FPLD patients is a limitation of the present study. Patients with the distinct LMNA mutations differed moderately in BMI and further analysis with a more refined comparison with controls fully matched for BMI would help to improve the strength of the conclusions.

We found accumulated prelamin A in lipodystrophic fat samples. Accumulation of immature lamin A was reported previously in FPLD2 studies, both *in vivo* and *in vitro*,^{16,32} and prelamin A has been involved in impaired adipogenesis in this laminopathy through the sequestration of SREBP1c, a transcription factor implicated in adipose differentiation.³² Our results suggest that prelamin A accumulation is a necessary, but not sufficient, condition for impaired adipogenesis because this immature protein appears in both lipodystrophic lipoma and lipohypertrophic areas (neck) of a patient with FPLD2. On the other hand, we found different lamin A solubility patterns in the studied fat samples. Other authors³³ have found increased lamin A solubility in R482W fibroblasts, but it was not evaluated in adipocytes. These differences may be cell type specific, which is consistent with the tissue sensitivity of human diseases linked to LMNA mutations. Lamins provide structural support to the interphase nuclear envelope and play a role in its disassembly and reassembly during mitosis. Whether this low solubility plays a role in the pathogenesis of FPLD2 should be addressed in future investigations.

In summary, FPLD2-associated lipomas exhibit similar histological features as nonlipodystrophic lipomas; though, as in nonlipomatous lipodystrophic fat, they show characteristics of chronic low-grade inflammation. In the control lipomas and lipodystrophic lipomas coming from lipohypertrophic areas, TP53, SREBF1, CEBPA and SLC2A4 were the most important factors associated with adipogenesis. The impaired adipogenesis in the lipodystrophic AT seems to be mediated by a malfunction of pRb, C/EBP β and, probably, PPAR γ . Lastly, our results suggest that the p53 pathway may act as a rescue mechanism that allows some adipocyte differentiation in FPLD2 subjects.

Acknowledgements

We are indebted to the patients for their collaboration in this study. This study was supported by the Fundación Mutua Madrileña, PI081449 (Instituto de Salud Carlos III and European Regional Development Fund, FEDER) and PS09/17 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia). B.V. is a Research Fellow granted by the Sociedad Española de Lipodistrofias and the Regional Government of Galicia (Xunta de Galicia).

Disclosure

The authors have nothing to disclose.

References

- Garg, A. (2000) Lipodystrophies. *American Journal of Medicine*, **108**, 143–152.
- Cao, H. & Hegele, R.A. (2000) Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Human Molecular Genetics*, **9**, 109–112.
- Rusiñol, A.E. & Sinensky, M.S. (2006) Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Cell Science*, **115**, 3265–3272.
- Decaudain, A., Vantyghem, M.C., Guerci, B. et al. (2007) New metabolic phenotypes in laminopathies: LMNA mutations in patients with severe metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**, 4835–4844.
- Willén, H., Åkerman, M., Dal Cin, P. et al. (1998) Comparison of chromosomal patterns with clinical features in 165 lipomas: a report of the CHAMP Study Group. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **102**, 46–49.
- Li, F.P., Abramson, D.H., Tarone, R.E. et al. (1997) Hereditary retinoblastoma, lipoma, and second primary cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, **89**, 83–84.
- Larsson, N.G., Tulinius, N.H., Holme, E. et al. (1995) Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle and Nerve*, **3**, S102–S106.
- Casali, C., Fabrizi, G.M., Santorelli, F.M. et al. (1999) Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology*, **52**, 1103–1104.
- Dreijerink, K.M.A., Varier, R.A., van Beekum, O. et al. (2009) The multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) tumour suppressor regulates peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent adipocyte differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 5060–5069.
- Guallar, J.P., Vilà, M.R., López-Gallardo, E. et al. (2006) Altered expression of master regulatory genes of adipogenesis in lipomas from patients bearing tRNA^{Lys} point mutations in mitochondrial DNA. *Molecular Genetics and Metabolism*, **89**, 283–285.
- Suga, H., Eto, H., Inoue, K. et al. (2009) Cellular and molecular features of lipoma tissue: comparison with normal adipose tissue. *British Journal of Dermatology*, **161**, 819–825.
- Enerbäck, S. (2010) Human brown adipose tissue. *Cell Metabolism*, **11**, 248–252.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hegele, R.A., Cao, H., Anderson, C.M. et al. (2000) Heterogeneity of nuclear Lamin A mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**, 3431–3435.
- Manilal, S., Randles, K.N., Aunac, C. et al. (2004) A lamin A/C beta-strand containing the site of lipodystrophy mutations is a major surface epitope for a new panel of monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1671**, 87–92.
- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36–42.
- Araújo-Vilar, D., Lattanzi, G., González-Méndez, B. et al. (2009) Site-dependent differences in both prelamin A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *Journal of Medical Genetics*, **46**, 40–48.
- Guallar, J.P., Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, J.C. et al. (2008) Differential gene expression indicates that ‘buffalo hump’ is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS*, **22**, 575–584.
- Araújo-Vilar, D., Loidi, L., Domínguez, F. et al. (2003) Phenotypic gender differences in subjects with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) due to a nuclear lamin A/C R482W mutation. *Hormone and Metabolic Research*, **35**, 29–35.
- Hirschey, M.D., Shimazu, T., Goetzman, E. et al. (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, **464**, 121–125.
- Wojtanik, K.M., Edgemon, K., Viswanadha, S. et al. (2009) The role of LMNA in adipose: a novel mouse model of lipodystrophy based on the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy mutation. *Journal of Lipid Research*, **50**, 1068–1079.
- Bourlier, V. & Bouloumie, A. (2009) Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes & Metabolism Journal*, **35**, 251–260.
- Lagathu, C., Eustace, B., Prot, M. et al. (2007) Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antiviral Therapy*, **12**, 489–500.
- Herrero, L., Shapiro, H., Nayer, A. et al. (2010) Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *PNAS*, **107**, 240–245.
- Caron, M., Auclair, M., Donadille, B. et al. (2007) Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death and Differentiation*, **14**, 1759–1767.
- Broers, J.L.V., Ramaekers, F.C.S., Bonne, G. et al. (2006) Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiological Reviews*, **86**, 967–1008.
- Molchadsky, A., Shats, I., Goldfinger, N. et al. (2008) p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS ONE*, **3**, e3707.
- Yahagi, N., Shimano, H., Matsuzaka, T. et al. (2003) p53 activation in adipocytes of obese mice. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 25395–25400.
- Frolov, M.V. & Dyson, N.J. (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *Journal of Cell Science*, **117**, 2173–2181.
- Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y. et al. (1996) Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes and Development*, **10**, 2794–2804.
- Dorner, D., Vlcek, S., Foeger, N. et al. (2006) Lamina-associated polypeptide 2 α regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma–E2F pathway. *The Journal of Cell Biology*, **173**, 83–93.
- Capanni, C., Mattioli, E., Columbaro, M. et al. (2005) Altered prelamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Human Molecular Genetics*, **14**, 1489–1502.
- Vigouroux, C., Auclair, M., Dubosclard, E. et al. (2001) Nuclear envelope disorganisation in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *Journal of Cell Science*, **114**, 4459–4468.

Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue.

Revista: *Metabolism*

PMID: 24369918

Títol: El factor de creixement fibroblàstic-21 s'expressa en teixit adipós marró humà neonatal i induït per feocromocitoma.

Resum: En rosegadors, el teixit adipós marró (TAM) i el blanc (TAB) són dianes i llocs d'expressió del factor de creixement fibroblàstic 21 (FGF21). En contraposició, el TAB humà n'expressa nivells negligibles. Es va examinar l'expressió de FGF21 en mostres de TAM humà, incloent el TAM present en pacients adults amb feocromocitoma, així com TAM interescapular i visceral de nounats. L'expressió d'*FGF21* i de la proteïna desacobladora 1 (*UCP1*, un marcador d'adipòcits marrons) fou determinada per PCR a temps real quantitativa i per immunotransferència. Els nivells de transcrit dels gens marcadors de TAM clàssic (proteïna cerebel·lar de tipus dit de zinc 1, *ZIC1*) i de TAM induïble (cúmulo de diferenciació 137, *CD137*) també foren avaluats. Tant FGF21 com UCP1 es trobaren expressats de forma significativa en el teixit adipós visceral dels pacients amb feocromocitoma, però no al d'individus sans. Als nounats, es detectà l'expressió d'FGF21 i d'UCP1 tant al greix visceral com a l'interescapular, i llurs nivells d'expressió estaven correlacionats de forma positiva. Els perfils d'expressió de gens marcadors suggereixen que al greix visceral el TAM present és de tipus induïble als pacients de feocromocitoma i als nounats, mentre que el TAM clàssic és present en el greix interescapular neonatal. Per tant, el TAM humà, però no el TAB, és capaç d'expressar el gen d'FGF21. Aquesta expressió de FGF21 és especialment elevada en el TAM induïble, també conegut com a beix/brite, dels nounats, però també s'hi detecta al TAM interescapular, de tipus clàssic.

Available online at www.sciencedirect.com

Metabolism

www.metabolismjournal.com

Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue

Elayne Hondares^{a,b,1}, José M. Gallego-Escuredo^{a,b,1}, Pavel Flachs^c, Andrea Frontini^d, Ruben Cereijo^{a,b}, Alberto Goday^{b,e}, Jessica Perugini^d, Pavel Kopecky^f, Marta Giralt^{a,b}, Saverio Cinti^d, Jan Kopecky^c, Francesc Villarroya^{a,b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Spain

^c Department of Adipose Tissue Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Prague, Czech Republic

^d Department of Experimental and Clinical Medicine, Center for the Study of Obesity-United Hospitals University of Ancona (Politecnica delle Marche), Ancona, Italy

^e Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

^f Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Neonatology, General Faculty Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2013

Accepted 19 November 2013

Keywords:

Obesity
Diabetes
Beige adipocyte
Brite adipocyte

ABSTRACT

Objective. In rodents, brown (BAT) and white (WAT) adipose tissues are targets and expression sites for fibroblast growth factor-21 (FGF21). In contrast, human WAT expresses negligible levels of FGF21. We examined FGF21 expression in human BAT samples, including the induced BAT found in adult patients with pheochromocytoma, and interscapular and visceral BAT from newborns.

Methods. The expression of FGF21 and uncoupling protein-1 (UCP1, a brown adipocyte marker), was determined by quantitative real-time-PCR and immunoblotting. The transcript levels of marker genes for developmentally-programmed BAT (zinc-finger-protein of the cerebellum-1, ZIC1) and inducible-BAT (cluster of differentiation-137, CD137) were also determined.

Results. FGF21 and UCP1 are significantly expressed in visceral adipose tissue from pheochromocytoma patients, but not in visceral fat from healthy individuals. In neonates, FGF21 and UCP1 are both expressed in visceral and interscapular fat, and their expression levels show a significant positive correlation. Marker gene expression profiles suggest that inducible BAT is present in visceral fat from pheochromocytoma patients and neonates, whereas developmentally-programmed BAT is present in neonatal interscapular fat.

Conclusions. Human BAT, but not WAT, expresses FGF21. The expression of FGF21 is especially high in inducible, also called beige/brite, neonatal BAT, but it is also found in the interscapular, developmentally-programmed, BAT of neonates.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: BAT, brown adipose tissue; CD137, cluster of differentiation 137; FGF21, fibroblast growth factor-21; UCP1, uncoupling protein-1; WAT, white adipose tissue; ZIC1, zinc finger protein of the cerebellum-1.

* Corresponding author at: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028-Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4021525; fax: +34 93 4021559.

E-mail address: fvillarroya@ub.edu (F. Villarroya).

¹ Both authors contributed equally to this study.

1. Introduction

Fibroblast growth factor-21 (FGF21) is a hormonal factor that has systemic effects in promoting glucose uptake and oxidation [1]. The liver is the main site of FGF21 expression and production in rodents, but FGF21 is also expressed in white adipose tissue (WAT), where it may play an autocrine role [2], and in brown adipose tissue (BAT). In rodents, FGF21 targets BAT, where it induces mitochondrial uncoupling protein-1 (UCP1) gene expression, and favors glucose oxidation and energy expenditure [3]. Moreover, FGF21 promotes the “browning” of WAT; i.e. the appearance of brown adipocytes (also called “beige” or “brite” cells) in WAT depots [4]. Under thermogenic activation, FGF21 is highly expressed in BAT, which has been proposed to be source of FGF21 in this situation [5].

The liver is considered the main site of FGF21 expression in humans, and blood FGF21 levels and liver FGF21 expression have been correlated in some hepatic pathologies [6]. Muscle is also a potential source of FGF21 in patients with mitochondrial pathologies [7]. Unlike rodents, there is little or no expression of FGF21 in human WAT [6,8].

The presence of BAT has been traditionally recognized in human neonates, wherein the UCP1 content increases at the final trimester of gestation [9]. However, active BAT has also recently been found in adult humans [10]. BAT activity is reduced in obese individuals, and this has suggested, like in rodents, that BAT-mediated thermogenic energy expenditure may protect against obesity [10]. Some authors have recently claimed that BAT in adult humans arises largely via the inducible “browning” of WAT [11,12]. In fact, the capacity of adult humans to develop brown adipocytes has long been recognized, as brown adipocytes arise in WAT from pheochromocytoma patients due to the tumor-mediated release of catecholamines, which are known BAT-inducing agents [13,14]. However, recent data also claim for the presence of “classical” BAT in children and adult humans [15,16].

Considering the role of FGF21 in the thermogenic activation of BAT, the potential of BAT as a source of FGF21 in rodents, and the absence of FGF21 expression in human WAT, we herein investigated the expression of FGF21 in human BAT. We employed a unique collection of neonatal human BAT samples, as well as BAT samples from adult pheochromocytoma patients.

2. Methods

Samples of visceral (perirenal, omental) adipose tissue were obtained during surgical removal of the pheochromocytoma tumors from Caucasian adult patients (Azienda Ospedaliero-Universitaria, Ancona, Italy, 6 patients; Hospital del Mar, Barcelona, Spain, 3 patients; clinical details provided in Supplemental Table 1). Visceral (omental) WAT samples from 10 Caucasian healthy control individuals were obtained during cholecystectomies. Mean age (51.3 ± 12.2 year in pheochromocytoma patients versus 57.5 ± 5.0 year in healthy controls, $P = 0.17$) and body mass index (24.2 ± 5.4 in pheo-

chromocytoma patients versus 24.9 ± 2.1 in healthy controls, $P = 0.75$) were not significantly different in patient's population relative to controls. Samples were frozen in liquid nitrogen until use for RNA and protein preparation. When possible, tissue sections were fixed and further processed for light and electron (JEOL-1010, Japan) microscopy.

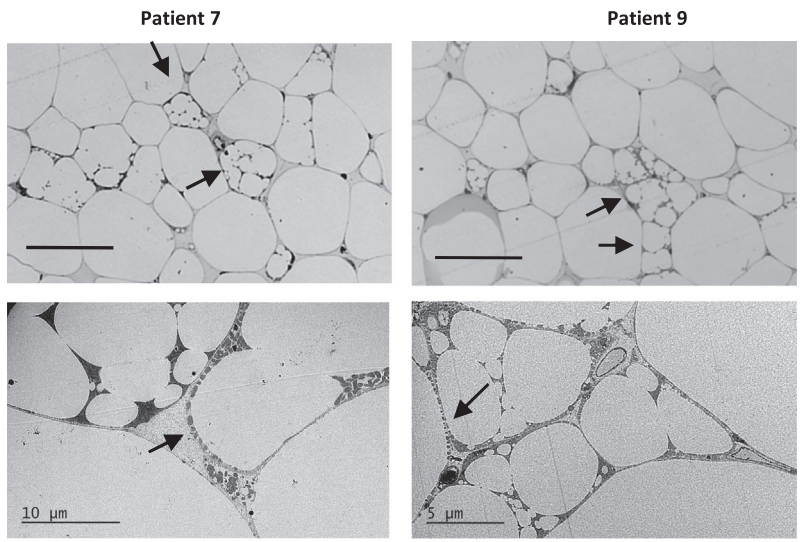
Samples of adipose tissue from the interscapular and visceral (perirenal/retrorenal) areas were obtained from human newborns (mostly premature neonates) who died during 1995–2006 in the Czech Republic. Autopsies were performed 2–3 h after the death. Some of these patients were previously reported in studies on developmentally-regulated gene expression in other tissues [17,18]. Clinical details are provided in Supplemental Table 2.

After RNA isolation, $1 \mu\text{g}$ RNA was retro-transcribed and gene transcript levels were quantified by quantitative RT-PCR, using TaqMan reagents as described by the supplier (Applied Biosystems) along with specific TaqMan probes (Supplemental Table 3). Expression levels of gene transcripts were considered negligible when, under the above standard RT-PCR conditions, cycle threshold was ≥ 40 . Data of specific mRNA abundance were expressed relative to 18S rRNA. The protein levels of UCP1 and FGF21 were assessed using $35 \mu\text{g}$ protein/lane, standard immunoblotting procedures, and antibodies against FGF21 (sc-16842, Santa Cruz, USA) and UCP1 (a specific anti-serum kindly provided by E.Rial, CSIC, Madrid). Where appropriate, statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test with pairwise post-hoc analysis (Tukey adjustment). Spearman's coefficients of correlation were determined. This study conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, and it was approved by the committees of medical ethics at all of the collaborating institutions. Informed consent was obtained from all neonate parents and adult patients.

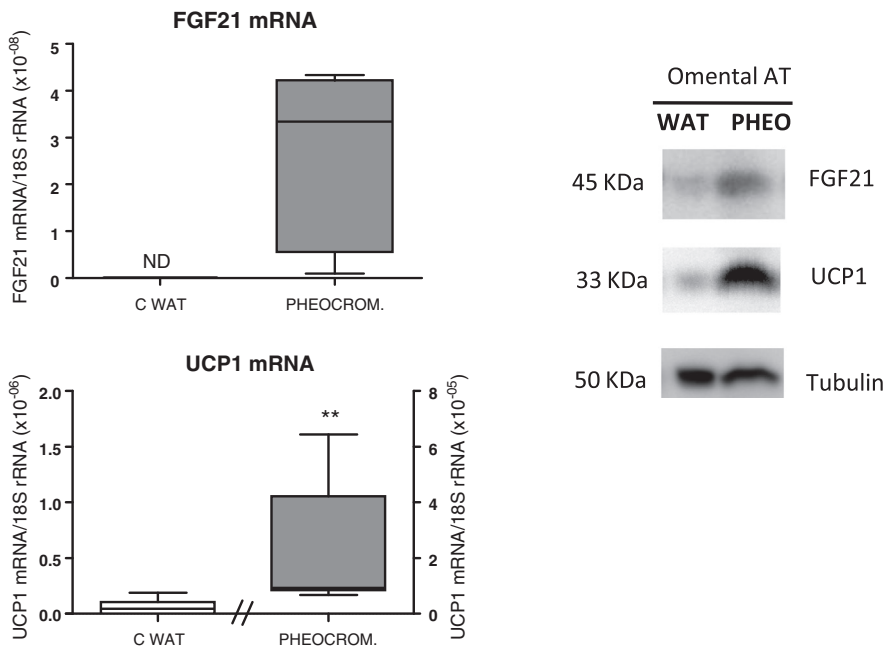
3. Results

3.1. FGF21 is expressed in BAT of adult human pheochromocytoma patients

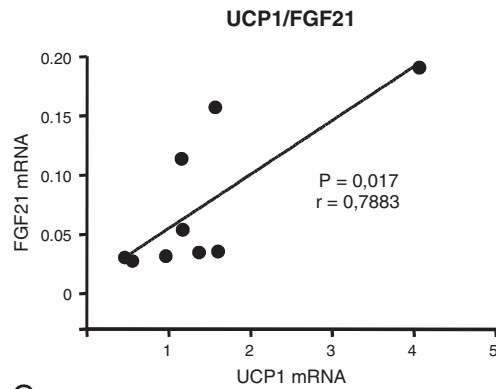
We analyzed visceral adipose tissues from the perirenal and omental regions of pheochromocytoma patients. These samples, particularly those from the perirenal region, contained adipocytes with multilocular lipid droplets and enhanced mitochondrial abundance, which are characteristic of the brown adipocyte morphology (Fig. 1A). All samples from patients expressed detectable levels of UCP1 mRNA (median 9.3×10^{-06} , interquartile range (IR): 3.3×10^{-05}) the marker of the brown adipocyte cell identity relative to white adipocytes. In contrast, visceral adipose tissues from healthy adult controls showed little UCP1 (median 6.4×10^{-08} , IR: 1.2×10^{-07} , $P = 0.0002$ relative to pheochromocytoma patients), indicative of a main WAT phenotype. FGF21 mRNA was expressed at substantial levels in adipose samples from the pheochromocytoma patients (median 3.3×10^{-08} , IR: 3.2×10^{-08}), whereas it was not detected in omental WAT from healthy controls (Fig. 1B, left). Subcutaneous abdominal or dorsal fat from healthy individuals did not show



A



B



C

substantial expression of the FGF21 and UCP1 mRNAs. UCP1 and FGF21 protein levels were consistent with the above described transcript levels (Fig. 1B, right). Spearman's coefficient of correlation analysis of FGF21 mRNA and UCP1 mRNA levels indicated a positive, significant, correlation ($P = 0.017$, $r = 0.7883$) (Fig. 1C). These findings indicated that FGF21 gene expression is directly associated with brown adipocyte abundance and activity in the adipose tissues of adult patients.

3.2. FGF21 is expressed in BAT of human neonates

All samples of interscapular and visceral (perirenal and retrorenal) adipose tissue from human neonates expressed detectable levels of the UCP1 and FGF21 mRNAs. UCP1 mRNA expression levels were: median 3.1×10^{-05} , IR: 8.8×10^{-05} in interscapular fat; and median 1.9×10^{-04} , IR: 3.1×10^{-04} in visceral fat, $P = 0.04$ and $P = 0.0009$ versus control WAT, respectively. UCP1 mRNA levels were not significantly different in interscapular versus visceral comparison. FGF21 mRNA levels were: median 6.9×10^{-08} , IR: 8.2×10^{-08} in interscapular fat, median 3.8×10^{-07} , IR: 7.1×10^{-07} in visceral fat, $P = 0.036$. The FGF21 mRNA levels showed positive, significant, correlation with gestational age at birth (Fig. 2A, left). The mRNA levels of UCP1 and FGF21 showed a positive and significant correlation (Fig. 2A, right), indicating that as much UCP1 gene is expressed (and, therefore, as much extent of brown adipose tissue maturation and differentiation occurs), as much the FGF21 gene is expressed in the neonatal samples. Separate analysis of FGF21 mRNA levels gene expression in samples from neonates with systemic inflammatory conditions (sepsis, necrotizing enterocolitis, $N = 12$, median 0.66×10^{-07} IR 1.25×10^{-07}) relative to neonates without those conditions ($N = 7$, median 0.37×10^{-07} IR 0.58×10^{-07}) revealed no significant changes in FGF21 gene expression ($P = 0.083$).

3.3. FGF21 gene expression and the molecular signature of fetal/neonatal BAT and pheochromocytoma-induced adult BAT

We compared gene expression levels of marker genes for distinct types of BAT in the interscapular and visceral (perirenal and retrorenal) fat samples from neonates of similar gestational age ($N = 7$, 28.0 ± 7.9 months, interscapular; $N = 7$, 32.1 ± 5.3 months, visceral). ZIC1, a marker gene expressed in developmentally-programmed brown adipocytes but not in beige/brite adipocytes [12,19], was highly expressed in interscapular neona-

tal BAT (median 9.8×10^{-06} , IR: 5.4×10^{-06}), but it was lower in visceral neonatal adipose tissue (median 6.1×10^{-07} , IR: 5.4×10^{-07} , $P = 0.032$ relative to interscapular adipose tissue), in visceral adipose tissue from adult pheochromocytoma patients (median 1.7×10^{-07} , IR: 3.8×10^{-07} , $P = 0.04$ relative to interscapular neonatal adipose tissue) and in adult control WAT (median 1.2×10^{-10} , IR: 8.0×10^{-11} , $P = 0.03$ relative to adult pheochromocytoma patients, $P = 0.0002$ relative to interscapular neonatal fat, and $P = 0.04$ relative to visceral neonatal adipose tissue) (Fig. 2). Conversely, the proposed beige/brite marker gene CD137 [11,12], was much more expressed in visceral (median 4.1×10^{-07} , IR: 6.6×10^{-07}) relative to interscapular adipose tissues from neonates of similar age (median 2.6×10^{-08} , IR: 2.5×10^{-08} , $P = 0.0004$ relative to neonatal visceral fat), and relative to WAT from healthy adults (median 1.2×10^{-07} , IR: 9.3×10^{-08} , $P = 0.04$ relative to neonatal visceral adipose tissue), but its expression was not significantly different relative to adipose tissue from pheochromocytoma patients (median 1.6×10^{-07} , IR: 1.2×10^{-07} , $P = 0.42$ relative to visceral fat from neonates).

4. Discussion

We found that human adipose tissues containing brown adipocytes systematically express FGF21, which shows a positive association with UCP1 expression, an indicator of the amount and activity of brown adipocytes in fat tissue. Neonatal interscapular BAT shows the molecular signature of developmentally-programmed BAT (e.g. high expression of ZIC1); and fetal/neonatal visceral BAT more closely resembles fat from the inducible, beige/brown, lineage. This is consistent with recent reports on a beige/brite molecular signature in intra-abdominal adipose depots from human children and neonates [12] but preferential expression of marker genes of developmentally-programmed BAT (e.g. ZIC1) in interscapular fat from children [15]. Our data suggest that the two cell lineages known to result in thermogenic, UCP1-expressing cells, co-exist at distinct anatomical sites in the human fetal/neonatal period. In any case, FGF21 expression (and, therefore the capacity of synthesizing and releasing FGF21) occurs in both types of BAT-related fat. However, at least in neonates, FGF21 appears to be more intensely expressed in beige/brite BAT. Cell culture experiments showed that FGF21 was expressed in cells differentiated into developmentally-programmed brown adipocytes and in beige/brite adipocytes, which much higher expression seen in beige/brite cells [11,12]. Recently, Lee et al. [20] reported that

Fig. 1 – FGF21 expression in BAT from patients with pheochromocytoma. A. Examples of microscopic morphology of visceral (perirenal) adipose tissue from two pheochromocytoma patients; representative images of light microscopy (top) and electronic microscopy (bottom) are shown. Arrows indicate the presence of cells with a brown adipocyte morphology (top) and evidence of mitochondrial abundance (bottom). B. FGF21 and UCP1 expression in adipose tissues from pheochromocytoma patients versus visceral WAT from healthy controls. Left, transcript levels of the FGF21 and UCP1 genes. Results are shown as box-and-whisker plot, the line within the box marks the median, and the upper boundary of the box indicates the interquartile range. Error bars above and below the box denoted the 100th and 0th percentiles, respectively. Mann-Whitney test was used to compare control and pheochromocytoma groups. Significant differences with respect to the control are denoted by * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$); $N = 9-10$ individuals/group; ND, not detectable. Right, examples of immunoblotting for the FGF21 and UCP1 proteins. C. Linear correlation of FGF21 mRNA and UCP1 mRNA in adipose tissue samples from pheochromocytoma patients. Spearman's coefficient of correlation is shown.

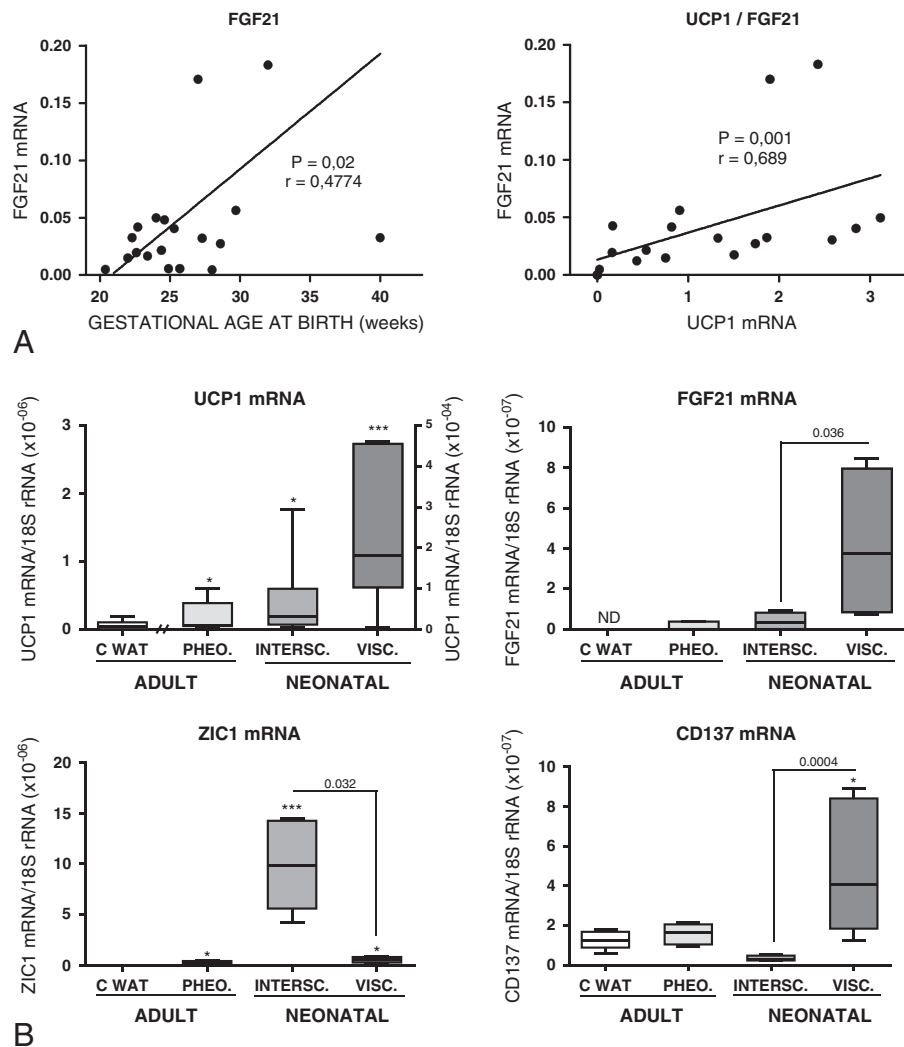


Fig. 2 – FGF21 expression in BAT from human neonates. **A**, Linear correlation of FGF21 mRNA expression in adipose tissue from neonatal samples in relation to gestational age at birth (left), and linear correlation of FGF21 mRNA and UCP1 mRNA in these samples (right). Spearman's coefficient of correlation is shown. **B**, Transcript levels of the UCP1, FGF21, ZIC1 and CD137 genes in neonatal adipose tissue from interscapular or visceral (perirenal/retrorenal) sites, compared with the levels in healthy adult visceral adipose tissue (control, C) and adipose tissue from adult pheochromocytoma patients. Results are shown as box-and-whisker plot, the line within the box marks the median, and the upper boundary of the box indicates the interquartile range. Error bars above and below the box denoted the 100th and 0th percentiles, respectively. Kruskal-Wallis test and pairwise post-hoc analysis (Tukey adjustment) was used for between-group comparisons. Significant differences with respect to controls are denoted by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) and *** ($P < 0.001$), shown only when controls values were detectable (see Methods). Significant differences between groups are marked denoting the P value.

differentiation of adult human precursor cells from neck fat into a beige/brite phenotype leads to expression and release of FGF21. Overall, present results in neonates and pheochromocytoma patients confirm these observations.

The present study has obvious limitations, mostly derived from the small sample size due to ethical considerations and to the relatively infrequency of pheochromocytoma among human populations. For neonates, the autopsy-derived samples, derived time span for sampling post-mortem individuals plus the diversity in morbidity and mortality causes are limitations whose influence on gene expression data and their interpretation cannot be currently evaluated. We couldn't exclude totally that pre-existing inflammatory conditions – a

reported stimuli of FGF21 levels [21,22] – in a sub-set of neonate population may have some influence in the extent of FGF21 gene expression in some samples. Moreover, the use of cholecystectomy surgical procedures in adult controls to obtain intra-abdominal adipose tissue is also a potential bias, difficult to address due to the obvious ethical constraints for obtaining intra-abdominal adipose samples from healthy individuals. In contrast with the above weaknesses, the current study took advantage of the analysis of a unique collection of human neonatal BAT samples, as well as BAT from several adult pheochromocytoma patients. Thus, even taking into account the caution in the interpretations arising from the limitations mentioned above, present data reinforce the concept that BAT

may be a relevant site of FGF21 release in humans. Given the strong capacity of FGF21 to promote BAT activity and the recruitment of inducible brown adipocytes, we speculate that FGF21 could play autocrine (and, perhaps endocrine) roles in these processes both during development and in the adult response to environmental stimuli. Considering that the identification of novel molecular actors capable of influencing BAT activity are of potential interest in promoting energy expenditure, the current evidence of preferential expression of FGF21 in BAT warrants further research on this regulatory factor in relation to foreseeable strategies to treat or prevent obesity by promoting energy expenditure.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.11.014>.

Author's contributions

Clinical data and biopsy samples from pheochromocytoma patients were obtained by A.F., J.P. and A.G; and those from neonates by P.F. and P.K. Isolation and subsequent assays with RNA were done by A.F., E.H. and J.M.G-E. Immunoblot assays were done by R.C, and microscopy analysis was done by M.G. Data were analyzed by S.C., J.K. and F.V. The paper was written by F.V.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the MINECO (Spain) SAF2011-23636 and EU FP7 BETABAT (HEALTH-F2-2011-277713, to FV) and DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373, to SC and JK).

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev* 2012;26(4):312–24.
- Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 2012;148(3):556–67.
- Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, et al. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPAR α in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010;11(3):206–12.
- Fisher FM, Kleiner S, Douris N, et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 2012;26(3):271–81.
- Hondares E, Iglesias R, Giralt A, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 2011;286(15):12983–90.
- Dushay J, Chui PC, Gopalakrishnan GS, et al. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010;139(2):456–63.
- Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol* 2011;10(9):806–18.
- Gallego-Escuredo JM, Domingo P, del Gutiérrez M, et al. Reduced levels of serum FGF19 and impaired expression of receptors for endocrine FGFs in adipose tissue from HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012;61(5):527–34.
- Houstěk J, Vízek K, Pavelka S, et al. Type II iodothyronine 5'-deiodinase and uncoupling protein in brown adipose tissue of human newborns. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77(2):382–7.
- Lidell ME, Enerbäck S. Brown adipose tissue—a new role in humans? *Nat Rev Endocrinol* 2010;6(6):319–25.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012;150(2):366–76.
- Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 2012;7(11):e49452.
- Ricquier D, Nechad M, Mory G. Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54(4):803–7.
- Frontini A, Vitali A, Perugini J, et al. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831(5):950–9.
- Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. 2013. *Nat Med* 2013;19(5):631–4.
- Cypess AM, White AP, Vernochet C, et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* 2013;19(5):635–9.
- Brauner P, Kopecky P, Flachs P, et al. Expression of uncoupling protein 3 and GLUT4 gene in skeletal muscle of preterm newborns: possible control by AMP-activated protein kinase. *Pediatr Res* 2006;60(5):569–75.
- Brauner P, Nibelink M, Flachs P, et al. Fast decline of hematopoiesis and uncoupling protein 2 content in human liver after birth: location of the protein in Kupffer cells. *Pediatr Res* 2001;49(3):440–7.
- Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, et al. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302(1):E19–31.
- Lee P, Werner CD, Kebebew E, et al. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int J Obes (Lond)* 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2013.82>.
- Gariani K, Drifte G, Dunn-Siegrist I, et al. Increased FGF21 plasma levels in humans with sepsis and SIRS. *Endocr Connect* 2013;2(3):146–53.
- Feingold KR, Grunfeld C, Heuer JG, et al. FGF21 is increased by inflammatory stimuli and protects leptin-deficient ob/ob mice from the toxicity of sepsis. *Endocrinology* 2012;153(6):2689–700.

CXCL14 is a brown adipocyte-derived chemokine mediating the recruitment of alternatively activated macrophages to adipose tissues upon thermogenic activation.

Revista: *Nature Medicine*

PMID: [Enviat]

Títol: CXCL14 és una quimiocina produïda pels adipòcits marrons que actua mitjançant el reclutament dels macròfags activats alternativament als teixits adiposes durant l'activació termogènica.

Resum: Els adipòcits del teixit adipós blanc (TAB) i del marró (TAM) duen a terme funcions oposades d'emmagatzematge i despesa d'energia. A més de l'activació nerviosa simpàtica, l'alliberament de catecolamines per part dels macròfags activats alternativament (M2) afavoreix l'activació termogènica dels adipòcits marrons clàssics i beix/brite. Tot i que el TAB es comunica amb òrgans distants tot alliberant adipocines, l'existència d'un possible paper endocrí anàleg en el TAM ha estat poc explorada. En el present article s'identifica CXCL14 com una nova adipocina més representada als adipòcits marrons, l'expressió i alliberament de la qual són induïts en cas de necessitat termogènica. Realitzant experiments de pèrdua de funció es descobrí una manca d'activació del TAM en absència de CXCL14, coincident amb una manca d'infiltració de macròfags M2. Els estudis funcionals duts a terme no van demostrar efectes autocrins sobre els adipòcits marrons, però sí que la CXCL14 alliberada pels adipòcits marrons mitjança la polarització dels macròfags al fenotip M2 i el seu reclutament als dipòsits adiposos durant l'activació termogènica, quelcom que resulta en una activació local del TAM i del *browning* del TAB, i que obre les portes a estratègies d'immunoteràpia per a combatre l'obesitat.

CXCL14 is a brown adipocyte-derived chemokine mediating the recruitment of alternatively activated macrophages to adipose tissues upon thermogenic activation

Rubén Cereijo¹, Montserrat Cairó¹, Tania Quesada-López¹, Joan Villarroya¹, Roser Iglesias¹,
Teresa Mampel¹, Jean-Valery Turatsinze², Décio L Eizirik², Marta Giralt¹, Francesc Villarroya^{1*}

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Catalonia, Spain

2 Laboratory of Experimental Medicine, ULB Center for Diabetes Research, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

* Corresponding author: fvillarroya@ub.edu

ABSTRACT

Adipocytes in white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) exert opposing energy-storing and energy-dissipating functions. Besides sympathetic nervous stimulation, release of catecholamines by alternatively activated (M2) macrophages favors thermogenic activation in brown and in beige/brite adipocytes. Although WAT communicates with distant organs by releasing adipokines, a potential analogous endocrine role for BAT has been scarcely explored. Here, we identify CXCL14 as a novel brown adipocyte-enriched adipokine, the expression and release of which is upregulated upon thermogenic requirements. Loss of function experiments revealed an impairment of BAT activation in the absence of CXCL14, concomitant with a lack of M2 macrophage infiltration. Functional studies revealed no autocrine effects on brown adipocytes, but demonstrated that brown adipocyte-derived CXCL14 mediates M2 macrophage polarization and recruitment to adipose tissues upon thermogenic activation, resulting in local BAT activation and browning of WAT depots and potentially giving way to immunotherapy for obesity.

In mammals, adipose tissue has evolved into two different and functionally opposed types: In white adipose tissue (WAT), white adipocytes store dietary energy in the form of lipids which can be oxidized in case of nutrient scarcity¹. Conversely, in brown adipose tissue (BAT), brown adipocytes generate heat to keep stable the core temperature of the organism in response to sympathetic stimuli or cold through expression of uncoupling protein 1 (UCP1), which dissipates the mitochondrial proton gradient of these cells and leads to substrate consumption with a subsequent futile cycle-associated production of heat^{1,2}. Even though BAT has long been known to be present in classical developmentally-programmed depots, inducible thermogenic adipocytes with a distinct origin and molecular signature, termed beige or brite adipocytes, arise in WAT depots during prolonged cold stimulation in the so-called process of “browning”^{3,4}. The recent discovery in adult humans of inducible and classical BAT⁵⁻⁸ has revamped biomedical interest of brown adipocytes as potential targets to ameliorate the metabolic disturbances in obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Although previously considered to be merely a passive energy storage site, WAT is currently recognized as a complex endocrine organ capable of regulating global metabolic homeostasis by communicating with distant cells using secretable molecules, collectively named adipokines⁹. Systemic metabolic adaptations such as a decrease in glycemia, insulinemia and triglyceridemia follow BAT activation and have been attributed to its actions as a sink for oxidation of metabolites^{1,2}. Hence, it may also be hypothesized that BAT may release specific adipokines, the so-called “brown adipokines” or “batokines”, which would allow brown adipocytes to intercommunicate with other organs to modulate metabolism in accordance with the thermogenic response¹⁰. Brown adipocytes are able to secrete proteins which exert autocrine or paracrine actions^{2,10}, but few endocrine products have been identified to date, among them classic factors such as thyroid hormone T3¹¹ or more recently identified fibroblast growth factor

21^{12,13} (FGF21), bone morphogenetic protein 8B (BMP8B)¹⁴, irisin¹⁵, meteorin-like (METRNL)¹⁶ and neuregulin 4 (NRG4)¹⁷.

Immune infiltration in WAT has been widely studied due to its relevant role in obesity. In lean individuals, the resident immune cell milieu consists mainly of M2 alternatively activated macrophages, eosinophils, regulatory T cells (T_{reg}), invariant natural killer T cells (iNKT) and type 2 innate lymphoid cells (ILC2), which secrete type 2 helper T cell (T_{H2}) cytokines such as interleukin 4 (IL-4), IL-13 or IL-5^{18,19}. This microenvironment prevents the triggering of inflammatory responses and increases insulin sensitivity of adipocytes^{18,19}. In the context of obesity, however, stress stimuli derived from pathological hypertrophy of adipocytes increase their release of proinflammatory cytokines, chemokines and other chemical mediators, which in turn leads to the extravasation and activation of M1-like classically activated macrophages, proinflammatory T-cells (CD4⁺ and CD8⁺), neutrophils and NK cells, reminiscent of a T_{H1} immune response. This exacerbates inflammation in WAT and contributes to systemic insulin resistance, which can eventually lead to T2DM¹⁸⁻²⁰. The adipose-immune cross-talk has recently began to be explored in BAT, as cold-induced catecholamine production by M2 macrophages and the presence of T_{H2} cells to sustain them have been revealed to be key events in the activation of classical brown and, especially, beige/brite adipocytes^{16,21-24}. However, how brown adipocytes recruit immune cells in response to cold is, to date, unknown.

In this paper, we identify chemokine (C-X-C) motif ligand 14 (CXCL14) as a BAT-derived chemokine the expression and release of which is induced by the thermogenic activation of brown adipocytes in order to recruit M2-polarized macrophages. These findings evidence a triple cross-talk among adaptive thermogenesis, immune residence in BAT and the endocrine function of brown adipocytes.

RESULTS

Identification of CXCL14 as a BAT-secreted protein regulated in concert with thermogenic activation

In order to identify new candidate brown adipokines, we followed a double transcriptomic data mining strategy in which microarray and RNA-sequencing (RNA-Seq) data were combined (**Fig. 1a**). Since interscapular brown adipose tissue (iBAT) and epididymal white adipose tissue (eWAT) are the most representative and well-established depots of classical brown adipose tissue and white adipose tissue respectively²⁵, we first retrieved raw data from a microarray experiment spanning 45,037 cDNA in which gene expression in iBAT and eWAT of C57/Bl6j male mice was compared (GSE8044, Gene Expression Omnibus). 1,829 cDNA in the microarray, corresponding to 1,796 genes, exhibited a significant up- or down-regulation between both tissues. Following redundancy elimination, 1,464 protein sequences were retrieved (UniProt) and further analysis was conducted on them to determine their extracellular release potential. Two different bioinformatic applications were used to perform this prediction: TargetP 1.1 and SecretomeP 2.0. TargetP predicts cellular location by identifying signal peptides in the protein sequence, therefore extracellular space prediction using this method was restricted to proteins bearing a secretion signal peptide. To include proteins secreted through non-canonical pathways, the prediction algorithms from SecretomeP were used as a complement to the TargetP prediction. Results from both tools were integrated and 329 potentially secretable proteins were identified. Among these, 34 were overexpressed in iBAT. After cross-checking our candidate database with bibliographical sources, evidence of actual extracellular presence in plasma and/or cell culture media was found for only 9 of the items in the prediction, therefore establishing them as putatively secreted, BAT-versus-WAT enriched proteins.

Next, we performed an RNA-seq experiment in order to establish a high-throughput database of genes the expression of which was induced in brown adipose tissue upon cold stimulation. Male C57Bl/6j mice were either exposed to a 24-hour cold challenge (4 °C) or housed at thermoneutrality (30 °C) and RNA-seq data was obtained from RNA preparations from the iBAT of these animals. Each preparation was sequenced on a single lane of an Illumina GAII sequencer, which provides enough sequencing depth to quantify gene expression and detect rare transcripts as previously demonstrated²⁶. Reads were mapped to the murine genome and gene expression was quantified from raw data in RPKM units (“reads per kilobase per million mapped reads”). Upon statistical analysis, of the 33,345 transcripts found to be expressed in murine iBAT, significant changes were detected in those corresponding to 3,470 genes, from which 2,389 were upregulated in cold-exposed animals. After sorting entries automatically annotated as “extracellular space”, 100 items adhered to the desired goal. Proteins known to be secreted by BAT and upregulated during adaptive thermogenesis, like FGF21^{12,13}, BMP8B¹⁴ or NRG4¹⁷, appeared at this step, along with novel potentially secretable, cold-induced proteins.

Finally, we combined the results from both iBAT versus eWAT and cold exposure datasets. Only the gene products of two genes, *Cxcl14* and *Kngr1*, matched the three target criteria of our study: To be BAT-enriched, to be upregulated upon cold stimuli and to be predicted and confirmed as secreted proteins. Therefore, chemokine CXCL14 and coagulation cascade pro-protein high molecular weight kininogen (HMWK) were established as the leads in our brown adipokine identification approach. Here, we report our findings concerning the regulation and role of CXCL14. First, we analyzed CXCL14 expression in BAT in order to validate the above findings. iBAT *Cxcl14* mRNA levels were 2.6-fold that of eWAT (data not shown), therefore confirming our first established criterion. Acute cold exposure (24h) caused a significant induction of the *Cxcl14* transcript, similarly to other thermogenic markers such as

UCP1 and PGC-1 α , whereas long term adaptation to cold caused a rise in CXCL14 as well, similarly to UCP1 expression. This effect of cold was not common to other inflammation-related cytokines whose expression was either unaltered (TNF α) or even decreased (MCP-1) (Fig. 1b). In WAT depots, CXCL14 expression trended higher in acute cold exposure, whereas in chronic cold it was upregulated in eWAT but downregulated in inguinal white adipose tissue (iWAT) (Fig. 1c). Effects of cold resulted in a significant rise in CXCL14 levels in blood (Fig 1d).

To directly assess the capacity of iBAT to release CXCL14 we followed an arterio-venous difference approach previously used to establish the actual release of FGF21 by iBAT in rats¹³ (Fig 1e). Cold-dependent induction of CXCL14 was confirmed to occur in rats (Supplementary Fig. 1) similarly to the above findings in mice. We found that CXCL14 was significantly released by iBAT (negative arterio-venous difference, significantly different from zero) and the extent of release showed a trend to be increased under cold exposure conditions. Assessment of the actual release of CXCL14 by iBAT, calculated using the perfusion rates across iBAT, revealed a significant induction of CXCL14 release by 24h cold and a much higher release of CXCL14 in long-term cold exposed rats (Fig. 1f).

CXCL14 is expressed and released by brown adipocytes in response to noradrenergic- and cAMP-mediated pathways

To elucidate the cellular origins of BAT-derived CXCL14, the mature brown adipocyte (MAF) and stromal vascular (SVF) fractions of iBAT were analyzed. Expression of *Cxcl14* mRNA was much higher in the MAF than in the SVF (Fig. 2a), concomitant with that of the brown adipocyte-specific *Ucp1* transcript, indicating that *Cxcl14* is mainly expressed in brown adipocytes. We further analyzed *Cxcl14* expression during differentiation of cultured brown adipocytes (Fig. 2b). *Cxcl14* mRNA expression was very low in brown pre-adipocytes and was

markedly induced throughout the brown adipocyte differentiation process, similarly to *Ucp1* expression, thus indicating that *Cxcl14* expression is associated with the acquisition of the mature brown adipocyte phenotype. Next, we explored the effects of the main agents known to control BAT thermogenic activity on *Cxcl14* regulation. Treatment of cultured brown adipocytes with norepinephrine (NE) or cAMP resulted in a significant induction of *Cxcl14* mRNA levels (Fig. 2c) and CXCL14 protein release to culture media (Fig. 2d). Moreover, blockage of PKA or p38 MAPK activities with respective specific antagonists dramatically reduced cAMP-mediated induction of *Cxcl14* mRNA (Fig. 2e). Taken together, these results indicate that brown adipocytes release CXCL14 in response to the noradrenergic, cAMP-mediated, signaling responsible for thermogenic activation processes in BAT.

CXCL14-null mouse neonates exhibit impaired BAT function and altered expression of immune infiltration markers, in association with insulin resistance

Next, we decided to examine the *in vivo* effects of CXCL14 deficiency. Homozygous *Cxcl14* knock-out (KO) mice exhibited a great rate of postnatal death, as previously reported²⁷, and the few surviving animals are expected to present a plethora of interfering compensatory mechanisms that may render artifactual results. We found a strong induction of *Cxcl14* expression in iBAT in mouse pups in the postnatal period, a well known situation of thermogenic activation of BAT (Fig. 3a). Since CXCL14-null mice are alive and maintain Mendelian rates of survival in the early postnatal period, we studied 3-day-old neonates as a model to explore the effects of CXCL14-deficiency *in vivo*. *Cxcl14* KO neonates exhibited similar circulating glucose levels to controls, while insulin plasmatic concentrations trended higher in KO mice (Supplementary Table S1), were somewhat smaller than wild-type littermates even though iBAT size was unaltered (Fig. 3b). However, iBAT from *Cxcl14* KO neonates exhibited less chromatic intensity and was surrounded by more WAT than that from controls (Fig. 3c, upper panels).

Microscopy examination revealed that brown adipocytes in *Cxcl14* KO mice showed a more white adipocyte-like morphology, with multiple interspersed cells showing a single instead of multiple lipid droplets (Fig. 3c, lower panels), thus suggesting defects in the acquisition of the mature brown adipocyte phenotype. Surface body temperature at the site of interscapular BAT was significantly reduced in *Cxcl14* KO pups compared to wild-type littermates, thus indicating that CXCL14 deficiency resulted in an impairment in iBAT thermogenic activity (Fig 3d). Expression of transcripts (Fig. 3e) related to adaptive thermogenesis was significantly reduced (*Ppargc1a*, *Fgf21*, *Dio2*) in *Cxcl14* KO pups or showed such trend (*Ucp1*). Expression levels of transcripts encoding components of the general adipogenic machinery and common white and brown metabolic function did not show a common trend, as they were either moderately decreased (*Pparg*, *Hsl*), increased (*AdipoQ*, *Lpl*, *Pnlpa2*) or unchanged (*Lep*, *Fasn*) in iBAT from *Cxcl14* KO pups. Finally, since infiltration of M2 macrophages and T_H2 cells in BAT has been recently reported to be involved in adaptive thermogenesis²¹, and, considering that CXCL14 is a chemokine, marker transcripts for immune infiltration were analyzed. The expression of the M2 marker gene arginase 1 (*Arg1*) was strongly reduced in iBAT from *Cxcl14*-KO pups, thus leading to a significant reduction in the *Arg1/Nos2* ratio, an index of M2/M1 macrophage polarization. However, transcript levels of marker genes for eosinophil (*Siglec5*) and ILC2 activity (*IL-5*, *IL-33*) were significantly up-regulated. Finally, BAT-activation associated cytokine *IL-6* mRNA expression was decreased in *Cxcl14*-KO neonates. Moreover, immunofluorescent detection revealed amounts of total macrophage (F4/80⁺) infiltration was lower in in iBAT from KO animals (Fig. 3f). Altogether, these observations indicate CXCL14 deficiency causes impairment in thermogenic activity and disturbances in immune infiltration of BAT.

CXCL14 does not act directly on brown adipocytes

Since CXCL14 deficiency resulted in a number of alterations of BAT function which compromised heat production, we first focused on elucidating the effects of CXCL14 on brown adipocytes. Treatment of cultured brown adipocytes with recombinant murine CXCL14 induced very minor changes in expression of marker genes of thermogenic function, adipogenesis and inflammation (Supplementary Fig. 2a). Chronic treatment of differentiating brown adipocytes did not cause significant changes neither in expression of relevant marker genes (Supplementary Fig. 2b) nor in the acquisition of the brown adipocyte differentiated cell morphology (Supplementary Fig. 2c). Moreover, glucose oxidation, used as indicator of the metabolic activity of brown adipocytes, was in turn unaffected by CXCL14 treatment (Supplementary Fig. 2d). These data strongly suggested that brown adipocyte-derived CXCL14 does not exert major autocrine functions.

CXCL14 reduces M1 macrophage polarization and promotes migration of M2-polarized macrophages

Given the relevance of M2 macrophages in the thermogenic activation of BAT and in the browning of WAT, and indications of altered immune infiltration profile in iBAT from CXCL14-KO pups, we investigated potential actions of CXCL14 on macrophages. RAW 264.7 macrophages were polarized to the M1 or M2 phenotypes as previously described²⁸ by using LPS or IL-4/IL-13 treatment, respectively, prior to treatment with recombinant CXCL14, at concentrations in the range of those found in brown adipocyte medium (7.15 nM), as schematized in Fig. 4a. Expression of marker genes related to the M1 (*Nos2*, *Tnf*, *Ccl2*) or M2 (*Arg1*, *Mrc1* or CD206, *Clec10a* or CD301) phenotypes was then analyzed. With the exception of a reduction of *Mrc1* in M2-polarized macrophages at a higher dose, CXCL14 did not alter expression of M2 marker transcripts neither in M1-activated nor in M2-activated macrophages.

On the other hand, CXCL14 steadily downregulated expression of proinflammatory markers in both in M1- and M2-polarized cells (Fig. 4b), thus suggesting anti-inflammatory actions for CXCL14. Because CXCL14 is a chemokine and it was previously shown to attract macrophages²⁹, we next placed M1- and M2-activated macrophages in transwell chambers for CXCL14 chemotaxis challenge as illustrated in Fig. 4a. The status of M1 or M2 polarization of seeded macrophages was first verified by quantifying expression of specific marker transcripts (Supplementary Fig. 4). Despite CXCL14 induced migration of both M1 and M2 macrophages, the extent of M2 macrophage infiltration in CXCL14-containing chambers was dramatically higher (Fig. 4c), indicating that CXCL14 exhibits a preferential chemotactic action on alternatively activated, M2, macrophages.

Brown adipocytes release factors that reduce M1 macrophage polarization and induce M2 polarization and chemotaxis, including CXCL14

To determine the relevance of brown adipocyte-derived CXCL14, M1- or M2-polarized macrophages were treated with brown adipocyte conditioned medium (CM) alone or in the presence of anti-isotype unspecific (anti-IgG) or anti-CXCL14 specific (anti-CXCL14) antibodies (Fig. 5a). Treatment with brown adipocyte CM alone either kept stable or induced the expression of M2-related marker transcripts in both polarization states of macrophages. This was especially marked for arginase 1, the expression of which became detectable even in the highly proinflammatory, M1-polarized macrophages, in response to CM. Conversely, CM treatment reduced the expression of M1 markers, especially when macrophages had been previously polarized to the M1 phenotype. Anti-IgG had very minor effects on macrophage polarization, with a moderate induction of *Mrc1* and MCP-1 expression in respect to antibody-free CM-treated cells. However, addition of an anti-CXCL14 antibody to brown adipocyte CM resulted in a consistent reduction of transcript levels of M2-related markers in both M1- and M2-activated

macrophage. Interestingly, *Cxcl14* expression was upregulated only in CM-treated M2-polarized macrophages, regardless of the addition of an antibody (Fig 5b).

We then evaluated the effects of brown adipocyte CM on M1- or M2-activated macrophage migration (Fig. 5c). Brown adipocyte CM alone dramatically promoted migration of M2-activated macrophages and migration of M1-activated macrophages. Addition of anti-IgG to CM did not alter macrophage whereas addition of CXCL14 led to a strong inhibition of migration of M2-polarized cells. These data demonstrate that brown adipocyte-derived CXCL14 contributes to M2 macrophage activation and recruitment, albeit it appears not to be the only molecule released by brown adipocytes involved in the brown adipocyte-macrophage cross-talk.

Sustained systemic release of CXCL14 promotes the browning of WAT and enriches adipose tissues in M2 macrophages

Having set a putative paracrine role for BAT-secreted CXCL14, we proceeded to evaluate potential endocrine actions. Mice were implanted a subcutaneous osmotic pump in the interscapular region delivered a constant dose CXCL14 or saline over 7 days. The treatment was adjusted to result in CXCL14 levels in circulation in the range of those induced in mice by cold exposure ($1.04 \pm 0.31 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). This one-week treatment did not cause significant effects in the biochemical and hormonal profile of mice (Supplemental Table S2) neither caused major changes in body weight, food intake or in the size of iBAT, iWAT and eWAT depots (not shown). Microscopy examination of iBAT did not reveal major changes, whereas CXCL14-treated mice exhibited noticeable browning not only of iWAT, but even of eWAT as evidenced by the presence of multilocular adipocytes with the characteristic brown-like, beige/brite, morphology (Fig. 6a). Gene expression analysis confirmed a strong induction of marker genes of thermogenesis in iWAT and eWAT, whereas in iBAT showed a trend of lowered thermogenic

gene expression. Such massive activation of thermogenic genes in iWAT and eWAT was not accompanied by overall changes in the expression of adipogenic genes common to WAT-and-BAT phenotype. As systemic CXCL14 delivery activated browning in distant WAT depots, we evaluated possible actions of CXCL14 in white adipocytes differentiating in culture (Supplementary Fig. 2e). Similarly to brown adipocytes, CXCL14 did not cause significant alterations in morphological differentiation (not shown) or in the expression of marker genes of thermogenesis (beige/brite phenotype), adipocyte function or inflammation neither in iWAT- nor eWAT-derived adipocytes in culture. Considering the M2 macrophage chemoattracting actions of CXCL14 released by BAT reported above, we examined the infiltration of macrophages in iBAT, iWAT and eWAT from mice treated with CXCL14 (Fig. 6b). Immunofluorescence labeling of F4/80 (total macrophages) and CD206 (M2-polarized macrophages) confirmed the enrichment of the latter in WAT, but not in iBAT, following the 7-day treatment with CXCL14 (Fig. 6c). The analysis of expression of immune infiltration marker genes in CXCL14-treated animals (Fig. 6d) revealed upregulation of M2 (and to a lesser extent of M1) macrophage-related marker transcripts (*Arg1*, *Mrc1*, *Clec10a*, *Nos2*, *Tnf*) in both WAT depots, whereas in iBAT these markers remained unchanged. Transcript levels of marker genes of eosinophil infiltration and activation (METRNL, eotaxin receptor CCR3 and *Siglec5*), and of ILC2 activation (IL-33), were upregulated in both WAT depots as well. Taken together, these results indicate systemic effects of CXCL14 that, in an endocrine manner acts on WAT by recruiting M2 macrophages, changing the immune cell population and promoting, in turn, browning.

DISCUSSION

Whereas the relevant endocrine role of white adipose tissue, occurring via the secretion of adipokines and cytokines, is nowadays recognized, much less is known about a putative endocrine role of BAT. Possibly, this is due to the fact that most adipokines released by WAT (e.g. leptin) are poorly expressed and released by BAT^{2,10}. In any case, considering the different (in fact, opposite) role of BAT versus WAT it is expectable that putative released regulatory factors were different as well. The association of high BAT activity and protection against obesity and amelioration of hyperglycemia and hyperlipidemia, among other improvements in metabolic syndrome is an established observation. This association has been usually attributed to the capacity of BAT to burn metabolites to produce heat, thus making BAT a sink of draining glucose and lipids for oxidation^{1,2}. However, this single explanation has not been fully proven and, in fact, the consideration on whether the amounts of BAT and activity may reasonably account for the systemic effects observed after BAT activation, has been a matter of debate, specially in humans³⁰. Indirect evidences of a secretory role of BAT have growingly been identified. Among them, several recent reports exploring the systemic consequences of BAT transplantation are especially relevant. Several independent laboratories using distinct experimental approaches agreed to conclude that BAT transplantation cause improvement in metabolic status and obesity though mechanisms that cannot be attributed to the intrinsic energy expenditure and metabolic oxidation processes achieved by the transplanted BAT³¹⁻³³. With the purpose of identifying previously unknown brown adipokines we followed an approach based on the combination of omics analysis of gene expression and bioinformatic prediction of "secretability", followed by specific validation. This approach allowed us to identify CXCL14 as novel regulatory factor secreted by BAT, with a relevant role in the attraction and activation of alternatively activated (M2) macrophages and the associated induction of the browning of WAT.

Our studies *in vitro* and *in vivo* demonstrated that: a) CXCL14 is preferentially expressed in brown adipocytes, in association with differentiation, b) CXCL14 is regulated *in vivo* (cold) and *in vivo* (norepinephrine, cAMP) in concordance with the overall processes of thermogenic activation and through the most standard intracellular pathways (PKA, p38 MAPK) of thermogenic induction, c) CXCL14 is effectively secreted by brown adipocytes and by BAT *in vivo*.

The exploration of the role of BAT-secreted CXCL14 ruled out an autocrine role on brown adipocytes themselves, whereas a powerful action of CXCL14 in the activation and attraction of M2 macrophages to adipose tissues was found. Studies in cell culture allowed us to demonstrate that CXCL14 directly attracted and activated M2 macrophages whereas it tended to repress M1 activation. Part of these effects were also observed using cell medium from cultured brown adipocytes and the use of specific antibodies allowed us to demonstrate the CXCL14 released by BAT accounted for some of these effects. Our data were strongly compatible with the recent awareness that M2 activation and attraction to adipose tissues is a relevant event for thermogenic recruitment and activation of BAT and induction of the browning of WAT. Overall, recent reports highlighted a complex cross-talk among immune cells and white-to-brown activation. Chawla and collaborators proposed that the importance of M2 macrophages recruitment to BAT and to WAT undertaking browning was due to secretion of norepinephrine which, in addition to that produced by sympathetic nervous endings, would contribute to the standard adrenergic pathway of brown adipocyte activation and white-to-brown phenotype transition²¹. In the case of the browning of WAT, beige/brite adipocytes can secrete IL-33, which mediates ILC2 activation^{23,24}, and METRN, which promotes eosinophil infiltration and activation^{16,22}. These other infiltrating immune cells release T_H2 cytokines (IL-4, IL-13), which sustain M2 macrophage polarization in the adipose depot. Moreover, direct interactions of these and other secretable factors on adipocyte precursor cells and adipocytes themselves can favor the

acquisition of the thermogenic, beige/brite phenotype²⁴. In turn, adipokines such as adiponectin have been proposed to induce de novo M2 macrophage proliferation during sustained time periods of thermogenic need³⁴. However, further yet unidentified mechanisms cannot be ruled out.

CXCL14 is a recently characterized chemokine first identified due to its roles in tumor progression and organogenesis³⁵⁻³⁷. Even though conflicting reports about an antagonistic role on CXCL12 receptor (CXCR4) have been recently published^{38,39}, the existence of an agonistic receptor for CXCL14 is still unknown. To date, few studies related CXCL14 with metabolism and findings were contradictory. Takahashi *et al.* found that CXCL14 improved glucose uptake in response to insulin in 3T3L1 adipocytes⁴⁰. In contrast, studies by Hara and collaborators claimed that CXCL14 would promote insulin resistance⁴¹. Since CXCL12 has been shown to mediate pro-inflammatory, M1-like CXCR4⁺ macrophage infiltration to WAT in obesity⁴², CXCL14 could be acting in an obesogenic, insulin resistance-generating context as a homeostatic mechanism to prevent said infiltration by blockage of CXCR4 signaling. Moreover, these last studies were mainly based on the analysis of CXCL14-KO adult female mice, which, as stated by these authors²⁷ and also found in our lab, are the scarce remnant of the population of CXCL14-KO mice still alive in adulthood after massive post-natal mortality. The only use of CXCL14 heterozygous mice as controls in these experiments further difficult evaluation of the strength of the information provided. In our experimental settings, CXCL14 neonates, representative of the whole CXCL14-KO population, showed no major metabolic alterations, but signs of insulin resistance. Despite promotion of WAT browning, an event associated with improvement of insulin sensitivity, our experimental setting of CXCL14 treatment did not elicit remarkable changes in systemic metabolism including glucose and insulin levels, perhaps due to the short treatment timing (one week) and/or the basal, metabolically healthy condition, of mice.

In summary, although M2 macrophage recruitment has been consistently identified as a major process associated with the browning of WAT and even with BAT activation itself, the mechanism by which thermogenic activation elicits such process has remained elusive. Here we have identified a novel, unique, mechanism by which activated BAT releases a signal, CXCL14, which promotes the recruitment of alternatively activated macrophages to adipose tissues and the browning of WAT. This findings point out to BAT as not only a site of heat production but also as a source of signaling and promotion of the concerted activation of thermogenic processes in the organism on response to adaptive thermogenic challenges. Even though further research in human subjects is needed, these results give way to the possibility of modulating adipocyte-immune cell interactions to activate browning of WAT as an immunotherapeutical approach to ameliorate deleterious effects of obesity and diabetes.

ONLINE METHODS

Transcriptomic data mining of microarray data

Gene expression data from microarray GSE8044 was downloaded from the public Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser>). Here, iBAT and eWAT were compared for differential transcriptomic markers in samples from 3 male C57/Bl6 mice⁴³. Raw transcriptomic data was log-transformed without background signal extraction and a bulk Loess normalization was applied to all datasets using the GEPAS/Babelomics online software⁴⁴ in order to provide a first filter of reduction of false positive results as previously described⁴⁵. Differential gene expression was assessed with the Significance Analysis of Microarrays (SAM) software (<http://www.stat-stanford.edu/~tibs/SAM>), an R-based application for mass statistical analysis of microarray data. The false discovery rate (FDR) value was set to 1.25% in order to provide enough restrictiveness to avoid false positive detection with little compromise of true positive results. A p-value of 0.05 was used as the significance threshold and only probes corresponding to known gene IDs were considered for further analysis.

Prediction of secreted proteins

Official gene symbols and Uniprot accession numbers were retrieved for each significant probe from SAM results using the Mouse Genome Informatics batch query service (<http://www.informatics.jax.org/batch/?page=batchQF>). Full sequences of each coding protein were retrieved as well from the Uniprot database. These sequences were analyzed with two different CBS secretion prediction programs, analogously as previously reported⁴⁶. TargetP 1.1, a software which predicts the subcellular or extracellular location of a eukaryotic protein by panning its N-terminal sequence to detect the presence of a signal peptide sequence or the lack thereof⁴⁷, was used to predict the secretability of the differentially expressed gene products.

SecretomeP 2.0 was used to further validate the TargetP prediction and to focus on possible non-classically secreted proteins in which no signal peptide is found⁴⁸. The resulting protein database was compared with bibliographical sources (NCBI, ISI Web of Knowledge, Google Scholar) to provide experimental evidence of secretion of every specific protein taken into consideration. The resulting information was compiled into a database and integrated into a differential expression and secretable potential query application on a Microsoft Excel runtime environment.

Animal experiments

Experiments using wild type animals were conducted on 8-week old male C57Bl/6j mice (Harlan Laboratory, Sant Feliu de Codines, Spain), which were either kept at thermoneutrality (30 °C) for 7 days, at room temperature or exposed to 4 °C for 24 hours or 22 days as stated in each the experiment. For loss of function experiments, wild type and heterozygous mice from a *Cxcl14* KO strain (B6;129S5-*Cxcl14*^{tm1Lex}/Mmucd) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Centre (MMRRC), a repository to which animals were donated by Lexicon Genetics, Inc., and the colony was further expanded. Wild type littermates of *Cxcl14* KO 3-day pups were used as controls. All experiments were performed adhering to the European Community Council directive 86/609/EEC and were conducted with the appropriate authorization of the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

Male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were used to assess arteriovenous differences in CXCL14 concentrations as previously described⁴⁹, as blood vessels are too narrow to conduct the required procedures in mice. Briefly, rats kept either at room temperature or exposed to 4 °C for 24 h or 30 days were anesthetized intraperitoneally with sodium barbital (50 mg·kg⁻¹ body weight). Blood was then obtained from the Sulzer's vein,

which drains blood flowing through iBAT, and from the abdominal aorta. Blood samples were centrifuged and BAT was excised and liquid nitrogen-frozen to proceed with RNA extraction as described above. iBAT blood flow was measured using ⁴⁶Sc-labeled microspheres (15 µm mean diameter, PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) as previously described⁵⁰. Flow rates were then used to calculate the net CXCL14 output from iBAT, understood as the product of each individual arterio-venous difference and blood flow values for each experimental group.

RNA-sequencing determination of cold-induced BAT transcripts

In order to generate a compilation of cold-induced transcripts in iBAT by RNA-sequencing (RNA-seq), 8-week old male C57/B16j mice kept at thermoneutrality or exposed to a cold challenge for 24 hours (n=5 for each group) were sacrificed, after which iBAT was extracted and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using a column-affinity based methodology (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel, Düren, Germany), which favors purification of all RNA molecules longer than 200 nucleotides, and further sample preparation done as described by the manufacturer (Illumina, Eindhoven, The Netherlands). Briefly, mRNA was purified from two µg total RNA using oligo (dT) beads, before it was fragmented and randomly primed for reverse transcription followed by second-strand synthesis to create ds cDNA fragments. The generated cDNA had undergone paired-end repair to convert overhangs into blunt ends. After 3'-monoadenylation and adaptor ligation, cDNAs were purified on a 2% agarose gel and 200 basepair (bp) products were excised from the gel. Following gel digestion, purified cDNA was amplified by PCR using primers specific for the ligated adaptors. The generated libraries were submitted to quality control with the Agilent bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Wokingham, UK) before sequencing. The RNA integrity number (RIN) values for all samples were 7.5 and above. 1 µL cDNA was loaded on an Agilent DNA chip (DNA-1000) to verify cDNA quality and quantity. Only libraries reaching satisfactory conditions were used

for sequencing, on an Illumina HiSeq 2000 sequencer (DNAnvision, Charleroi, Belgium). The raw data generated during the sequencing procedure will be deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) under submission number GSEXXXXX (awaiting confirmation). Sequencing reads were mapped to the mouse genome (*Mus musculus* version GRCm38) using Tophat version 2.0.2⁵¹ establishing default options for paired-end read mapping. Mapped reads were used to quantify transcripts from the Ensembl version 73 gene annotation dataset (<http://www.ensembl.org>), using the Flux Capacitor approach that deconvolves reads mapping to exonic regions shared by multiple transcripts by optimizing a system of linear equations and thus obtains a number of reads specifically assigned to each alternative spliceform (<http://flux.sammeth.net>)⁵². All genes and transcripts were assigned a relative coverage rate as measured in RPKM units (“reads per kilobase per million mapped reads”). Lists of differentially expressed genes and transcripts were generated from the Flux Capacitor output using scripts in Perl or R. To define genes up- or downregulated by cold, the fold-change, evaluated as the proportion between the sum of the RPKM for all gene transcripts under cold condition and the same sum in control condition was taken as measure of change in gene expression. The p-value was obtained by performing a Fisher exact test (number of reads mapped to the gene and number of reads mapped to all other genes in the cold condition versus the control condition) and corrected by the Benjamini-Hochberg method (taking for each gene the 4 samples as independent tests). A difference in gene expression was considered significant if the corrected p-value was <0.05. As additional criteria, a gene was considered to be “modified by cold” only if its expression changed significantly in the same direction - i.e. “up” or “down” - across at least 3 out of 5 samples per group and no significant change in the opposite direction was observed. The RPKM values for genes and transcripts and lists of differentially expressed genes and transcripts are available in Supplementary Dataset 1 and were further compiled into a differential expression query application on a Microsoft Excel environment.

Thermographic imaging

Surface temperatures were recorded using a T335 infrared digital thermographic camera (FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA), which features a thermal sensitivity of 0.1 °C and an image resolution of 640x480 pixels. As fur acts as a thermal insulator, pictures of 3-day pups could be taken directly on the hairless animal. Environmental parameters (relative humidity, room temperature and reflected apparent temperature) were measured *in situ* and set in the camera as parametrical inputs from the experiment. Triplicate infrared pictures of non-anaesthetized animals were taken from a distance of 30 cm. The resulting images were analyzed with the FLIR QuickReport software package (FLIR Systems) in order to normalize temperature ranges and to quantify temperature values arising from the isotherms. Maximal temperature values from the interscapular and the dorso-lumbar areas were retrieved and a ratio of both was calculated as a measure of interest.

Minipump incorporation

8-week old male mice were anesthetized with 1.5% isoflurane and subcutaneous Alzet osmotic minipumps (Cupertino, CA, USA) containing either PBS or CXCL14 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), the latter calibrated to release the chemokine at a rate of 45 ng·kg⁻¹ per day for 7 days, were surgically implanted subcutaneously in the interscapular region of the mice.

Quantification of plasma metabolites and soluble CXCL14

Blood glucose and triglyceride levels were measured with an Accutrend Technology device (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). β -hydroxybutirate was determined with spectrophotometric methods (Wako Diagnostics, Richmond, VA, USA). Circulating levels of insulin, resistin, leptin and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) were determined with a soluble protein quantification system, Milliplex kit (MADKMAG-71K-7, Millipore, Billerica,

MA, USA). CXCL14 plasma levels and culture media abundance were quantified with a rodent-specific enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (SEB67Mu, USCN Life Sciences, Wuhan, Hubei, PRC).

Histological analysis

After euthanizing the animals, samples from iBAT, iWAT and eWAT were fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. 5 μM cuts were separated from paraffin blocks and either hematoxylin and eosin (H&E) staining or immunohistofluorescence (IHF) was performed on them. For IHF, rehydrated tissue sections were incubated with antibodies rat anti-mouse F4/80 (ab6640, Abcam) or CD206 (sc-34577, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at a concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Anti-rat IgG antibodies conjugated to AlexaFluor 488 (Life Technologies) were used as secondary antibodies signal visualized under a fluorescence microscope (Leica). Total number of immunoreactive signals was quantified with the ImageJ imaging suite (Rasband, W. S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Real-time RT-PCR

At the set endpoints, animals were sacrificed and organ samples from iBAT, iWAT, eWAT and liver were frozen in liquid nitrogen until further processing. Differential expression of genes of interest was quantified by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA was extracted from samples as described above. Reverse transcription was performed with 0.5 μg of total RNA, random hexamer primers and Multiscribe reverse transcriptase (TaqMan reverse transcription reagents, Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX reagent (Invitrogen; Life technologies, Foster City, CA, USA) was

used as a master mix reagent in a final volume of 20 μ L with specific TaqMan probes for each candidate gene as detailed in Supplementary Table S3. An ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) was used to assess RT-qPCR amplification. All samples were normalized to the 18S housekeeping gene expression.

Primary adipocyte culture

Primary brown or white adipocytes were differentiated in culture as previously described⁵³. Briefly, preadipocytes were isolated from iBAT, iWAT or eWAT of 3-week old C57Bl/6j mice by following a tissue extraction and collagenase digestion procedure. The resulting mature adipocyte and stromal vascular fractions were stored for further gene expression analysis. Preadipocytes were cultured in DMEM:F12 medium for 8 days, when, if they exhibited consistent lipid droplet formation and a healthy, round morphology after, were considered to be fully differentiated and treatments were performed. Differentiated brown adipocytes were treated for 6, 12 and 24 hours with 0.5 μ M norepinephrine, for 24 hours with 1 mM dibutyryl-cAMP or for 24 hours with 0, 1 or 10 nM CXCL14. Differentiated inguinal or epididymal white adipocytes were treated with 10 nM CXCL14 for 24 hours.

C57 BAT cell culture

The immortalized brown adipocyte cell line C57 BAT, a kind gift from the Antonio Vidal-Puig laboratory originally developed by Johannes Klein, were differentiated as previously described¹⁴. At day 8 post-induction, cells were considered to be fully differentiated for further experimental usage whenever they matched the same morphological criteria as established for primary brown adipocytes. Differentiated C57 BAT cells underwent the following treatments as specified in each case: 2, 6 and 24 hours with 0.5 μ M norepinephrine, 24 hours with 1 mM dibutyryl-cAMP, or 6 and 24 hours with 1 mM dibutyryl-cAMP plus either 20 μ M PKA

signaling inhibitor H-89 (Sigma, St Louis, MO, USA) or 10 μM p38 MAPK signaling inhibitor SB 202190 (Sigma).

RAW 264.7 cell culture

Murine RAW 264.7 macrophages were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS (iFBS) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) in a humidified incubator at 37°C and 5% of CO₂. Cells between passages 15 and 20 were used for the experiments shown. For gene expression assays, macrophages were plated at a concentration of 2.5×10^5 cells·mL⁻¹. Once they reached 80% confluence, they were serum-starved and kept in RPMI medium supplemented with 0.05% BSA for 12 hours. Then, macrophages were either classically activated with 60 ng·mL⁻¹ LPS (Sigma) or alternatively activated with 40 ng·mL⁻¹ IL-4 or 60 ng·mL⁻¹ IL-13 (PeproTech) for 12 hours. Afterwards, cells were treated with 10 nM CXCL14 or conditioned media from day 8 C57 BAT cells for 12 hours. Cells were then harvested and RNA extraction was performed as described above.

Glucose oxidation

Glucose oxidation was assessed *in vitro* by quantifying ¹⁴CO₂ release to culture media after ¹⁴C-radiolabelled glucose usage. Primary brown adipocytes were differentiated as described above and either treated with 1 or 10 nM of CXCL14 for 24 hours or left untreated. Cells were then glucose-starved for one hour prior to incubation for 3 hours with DMEM supplemented with 3 mM D-[U¹⁴C]-glucose 1.5 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Hartman Analytic, Germany). Culture media was acidified with 3M perchloric acid (Panreac, Spain) and ¹⁴CO₂ released from media was collected in Whatman-3 paper soaked with phenylethylamine (Sigma) placed above the wells in a sealed culture plate for 1 hour. Pieces of said paper in contact with the radioactive isotope were cut off and placed in 10 mL of Ecolite liquid scintillation cocktail (MP Biomedical, France) afterwards.

$^{14}\text{CO}_2$ radioactive signal was measured on a Tri-Carb 2100TR counter (Packard Bioscience) as counts per minute (Cpm).

Chemotaxis assay

Macrophage chemotaxis was assessed with Costar Transwell chambers on 24-well plates (Corning Incorporated, NY, USA). LPS-, IL-4- or IL-3-activated macrophages were trypsinized and suspended in serum-free RPMI medium. The bottom wells of the chemotaxis plates were filled with serum-free RPMI with or without 10 nM CXCL14. For brown adipocyte conditioned media chemotaxis assay, media from 8-day C57 BAT cells or DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin was placed in the lower well. Unspecific antibodies against IgG (Sigma) or CXCL14 (Santa Cruz Biotechnology) were added to wells containing conditioned media to assess blocking of CXCL14 action. 200 μL of classically- or alternatively-activated macrophage suspensions ($5 \cdot 10^5$ cells) were placed in the upper wells, being separated by polycarbonate membranes with 8.0 μm pores from the lower wells. Plates were then incubated at 37°C for 20 hours. Afterwards, media from the upper wells were removed and chambers were rinsed with 1x PBS. Cells were fixed with a 4% formaldehyde solution for 15 minutes, washed with PBS and stained with hematoxylin for 30 minutes at room temperature and finally washed in water. Nonmigrating cells were gently scrapped from the upper side of the membranes and migrating macrophages on the lower side were visualized on an inverted microscope. Cell counts were determined with the ImageJ software.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.). Statistical significance was assessed by using a two-tailed Student's t test or one-way ANOVA followed by Dunnet or

Tukey post-hoc tests as appropriate with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A P-value of 0.05 was set as the significance threshold.

REFERENCES

1. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**, 20-44 (2014).
2. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359 (2004).
3. Petrovic, N., *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **285**, 7153-7164 (2010).
4. Wu, J., *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366-376 (2012).
5. Cypess, A.M., *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* **360**, 1509-1517 (2009).
6. Jespersen, N.Z., *et al.* A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell metabolism* **17**, 798-805 (2013).
7. van Marken Lichtenbelt, W.D., *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* **360**, 1500-1508 (2009).
8. Virtanen, K.A., *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* **360**, 1518-1525 (2009).

9. Giralt, M., Cereijo, R. & Villarroya, F. Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues. *Handbook of experimental pharmacology* (2015).
10. Villarroya, J., Cereijo, R. & Villarroya, F. An endocrine role for brown adipose tissue? *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **305**, E567-572 (2013).
11. Silva, J.E. & Larsen, P.R. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *The Journal of clinical investigation* **76**, 2296-2305 (1985).
12. Chartoumpakis, D.V., *et al.* Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med* **17**, 736-740 (2011).
13. Hondares, E., *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* **286**, 12983-12990 (2011).
14. Whittle, A.J., *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871-885 (2012).
15. Bostrom, P., *et al.* A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468 (2012).
16. Rao, R.R., *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279-1291 (2014).
17. Wang, G.X., *et al.* The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nature medicine* **20**, 1436-1443 (2014).
18. Odegaard, J.I. & Chawla, A. The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity* **38**, 644-654 (2013).
19. Chawla, A., Nguyen, K.D. & Goh, Y.P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature reviews. Immunology* **11**, 738-749 (2011).

20. Shoelson, S.E., Lee, J. & Goldfine, A.B. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1793-1801 (2006).
21. Nguyen, K.D., *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**, 104-108 (2011).
22. Qiu, Y., *et al.* Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**, 1292-1308 (2014).
23. Brestoff, J.R., *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* **519**, 242-246 (2015).
24. Lee, M.W., *et al.* Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* **160**, 74-87 (2015).
25. de Jong, J.M., Larsson, O., Cannon, B. & Nedergaard, J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **308**, E1085-1105 (2015).
26. Le, K., *et al.* Detecting tissue-specific regulation of alternative splicing as a qualitative change in microarray data. *Nucleic acids research* **32**, e180 (2004).
27. Tanegashima, K., *et al.* CXCL14 deficiency in mice attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment. *PloS one* **5**, e10321 (2010).
28. He, Z., *et al.* The interaction between different types of activated RAW 264.7 cells and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Radiat Oncol* **6**, 86 (2011).
29. Kurth, I., *et al.* Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *The Journal of experimental medicine* **194**, 855-861 (2001).
30. Nedergaard, J. & Cannon, B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell metabolism* **20**, 396-407 (2014).

31. Liu, X., *et al.* Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* **156**, 2461-2469 (2015).
32. Liu, X., *et al.* Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell research* **23**, 851-854 (2013).
33. Stanford, K.I., *et al.* Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of clinical investigation* **123**, 215-223 (2013).
34. Hui, X., *et al.* Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell metabolism* **22**, 279-290 (2015).
35. Hara, T. & Tanegashima, K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. *Journal of biochemistry* **151**, 469-476 (2012).
36. Benarafa, C. & Wolf, M. CXCL14: the Swiss army knife chemokine. *Oncotarget* (2015).
37. Hromas, R., *et al.* Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. *Biochemical and biophysical research communications* **255**, 703-706 (1999).
38. Otte, M., *et al.* CXCL14 is no direct modulator of CXCR4. *FEBS letters* **588**, 4769-4775 (2014).
39. Tanegashima, K., *et al.* CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS letters* **587**, 1731-1735 (2013).
40. Takahashi, M., *et al.* CXCL14 enhances insulin-dependent glucose uptake in adipocytes and is related to high-fat diet-induced obesity. *Biochemical and biophysical research communications* **364**, 1037-1042 (2007).
41. Nara, N., *et al.* Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* **282**, 30794-30803 (2007).

42. Kim, D., *et al.* CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice. *Diabetologia* **57**, 1456-1465 (2014).
43. Seale, P., *et al.* Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism* **6**, 38-54 (2007).
44. Tarraga, J., *et al.* GEPAS, a web-based tool for microarray data analysis and interpretation. *Nucleic acids research* **36**, W308-314 (2008).
45. Mutch, D.M., *et al.* Adipose gene expression prior to weight loss can differentiate and weakly predict dietary responders. *PloS one* **2**, e1344 (2007).
46. Mutch, D.M., Rouault, C., Keophiphath, M., Lacasa, D. & Clement, K. Using gene expression to predict the secretome of differentiating human preadipocytes. *Int J Obes (Lond)* **33**, 354-363 (2009).
47. Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature protocols* **2**, 953-971 (2007).
48. Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., Von Heijne, G. & Brunak, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **17**, 349-356 (2004).
49. 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. *The Biochemical journal* **243**, 281-284 (1987).
50. Foster, D.O. & Frydman, M.L. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **57**, 257-270 (1979).

51. Trapnell, C., *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology* **28**, 511-515 (2010).
52. Montgomery, S.B., *et al.* Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature* **464**, 773-777 (2010).
53. Carmona, M.C., *et al.* Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBPbeta. *The Biochemical journal* **389**, 47-56 (2005).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Identification of CXCL14 as a BAT-enriched secreted protein regulated in concert with thermogenic activation. (a) Schematic of the dual transcriptomic data mining strategies undertaken to discover novel BAT-derived, thermoregulated adipokines. (b) qRT-PCR determination of mRNA expression of *Cxcl14*, thermogenically-relevant transcripts *Ucp1* and *Ppargc1a* and inflammation-related mRNAs *Tnf* and *Ccl2* in iBAT from mice housed at thermoneutrality (Tn) or at 4°C for either 24h or 22 days (n = 6 for each condition). *P<0.05, Tn versus cold. (c) qRT-PCR determination of *Cxcl14* mRNA expression in iWAT and eWAT from mice kept at Tn or exposed to 4°C for 24h or 22 days (n = 6 for each condition). **P<0.01, Tn versus cold. (d) ELISA-determined plasmatic concentration of CXCL14 in mice housed at Tn or exposed to 4°C for 24h or 22 days (n = 6 for each). *P<0.05, Tn versus cold. (e) Diagram representing the blood extraction procedure from efferent venous and afferent arterial circulation in iBAT in order to calculate arterio-venous differences of CXCL14 concentration as a measurement of net iBAT CXCL14 production. (f) Arterio-venous differences of ELISA-determined plasmatic CXCL14 concentrations (arterial – venous concentrations) across iBAT in rats housed at room temperature (C) or exposed to 4°C for 24h or 22 days (left, n = 5 for each) and quantification of CXCL14 protein release from iBAT (right, n = 5 for each). *P<0.05, arterio-venous CXCL14 differences versus zero (left) or C versus cold (right). Data represent mean ± s.e.m. throughout. Two-tailed Student's *t*-test was used in **b**, **c**, **d** and **f**. One-sample *t*-test was used to assess discrepancy from zero in **f**.

Figure 2: CXCL14 is expressed and released by brown adipocytes in response to noradrenergic- and cAMP-mediated pathways. (a) qRT-PCR determination of *Cxcl14* and *Ucp1* mRNA levels in the mature adipocyte fraction (MAF) and the stromal vascular fraction (SVF) of murine enzymatically-digested iBAT (n = 3 for each fraction). Data is expressed as a

percentage of the transcript levels in the MAF. ND, not detectable. ** $P < 0.01$, SVF versus MAF.

(b) Time course of qRT-PCR-assessed *Cxcl14* and *Ucp1* mRNA expression during the differentiation of primary brown adipocytes (left, days 0, 4, 6 and 8 of differentiation, $n = 4$ for each time point) or immortalized brown adipocytes (right, days 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 8 of differentiation, $n = 3$ for each). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared to day 0. **(c)** qRT-PCR determination of *Cxcl14* mRNA expression in differentiated cells treated with norepinephrine (NE, $0.5 \mu\text{M}$) for 6, 12 and 24h in primary brown adipocytes (left, $n = 3$ for each time point) and for 2, 6 and 24h in immortalized brown adipocytes (right, $n = 3$ for each time point) or with cAMP (1 mM) for 24 hours. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, treated versus control adipocytes. **(d)** ELISA-determined CXCL14 protein concentration in cell culture media from differentiated primary brown adipocytes treated with NE ($0.5 \mu\text{M}$) for 12h or with cAMP (1 mM) for 24h. * $P < 0.05$, treated versus control. **(e)** qRT-PCR-determined *Cxcl14* mRNA expression in differentiated immortalized brown adipocytes either untreated (white bars) or treated with cAMP (1 mM, orange bars), cAMP plus PKA inhibitor H-89 ($20 \mu\text{M}$, gray bars) or cAMP plus p38 MAPK inhibitor SB 202190 ($10 \mu\text{M}$, black bars) for 6 or 24h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, treated versus control cells; †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$, PKA or p38 MAPK inhibitor-treated versus cAMP alone; ## $P < 0.01$, 24h versus 6h. Data represent mean \pm s.e.m. in all cases. Two-tailed Student's *t*-test was used to compare experimental conditions and controls in **a**, **b**, **c** and **d**. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was used to compare NE time points in **c** and followed by Dunnet's post-test to compare combined treatments in **e**.

Figure 3: Neonatal mice null for the *Cxcl14* gene exhibit impaired BAT thermogenic activity. **(a)** qRT-PCR determination of *Cxcl14* mRNA levels in wild type mice terminal fetus (TF), neonatal individuals (0h, 16h and 24h) and adults (A) ($n = 3$ for each). * $P < 0.05$,

***P<0.001, time period versus 0h neonates. **(b)** Whole body (left) and iBAT (right) weight of 3-day-old control (C) and *Cxcl14* knock-out (KO) mice neonates (n = 5 for each). ***P<0.001 C versus KO. **(c)** Representative photographs (upper panels) and hematoxylin and eosin staining images (lower panels) of iBAT from 3-day-old C and *Cxcl14* KO neonates (n = 4 for each). **(d)** Representative thermal images (left) and surface temperature quantification of the interscapular region (right) of 3-day-old C and *Cxcl14* KO neonates (n = 5 for each). *P<0.05 C versus KO. **(e)** qRT-PCR determination of mRNA expression of marker genes for thermogenic function, adipogenesis and lipid homeostasis and immune infiltration in iBAT from C (orange bars) and *Cxcl14* KO (black bars) 3-day-old neonates (n = 6 for each). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, C versus KO. **(f)** Representative images of immunohistofluorescence labeling of F4/80 or CD206 in iBAT from C (orange bars) and *Cxcl14* KO (black bars) 3-day-old neonates (left) and quantification of reactive signals (right, n = 4 each). *P<0.05, KO versus C. Data represent mean \pm s.e.m. in all cases. Two-tailed Student's *t*-test was used in **a**, **b**, **d**, **e** and **f**.

Figure 4: CXCL14 reduces M1 polarization of macrophages without major effects in M2 polarization. **(a)** Diagram of qRT-PCR determination of gene expression and of chemotaxis experiments conducted in M1- or M2-activated RAW 264.7 macrophages treated with recombinant CXCL14 or challenged for migration with CXCL14. **(b)** qRT-PCR-determined mRNA levels of M2 activation markers (*Arg1*, *Clec10a*, *Mrc1*), M1 activation markers (*Nos2*, *Tnf*, *Ccl2*), *Cxcl14* and the *Arg1/Nos2* transcriptional ratio in RAW 264.7 macrophages pretreated with LPS (60 ng·mL⁻¹) for M1 activation (n = 3) or IL-4 (40 ng·mL⁻¹)/IL-13 (40 ng·mL⁻¹) for M2 activation (n = 6) treated with CXCL14 (1 or 10 nM) for 12 hours. ND, not detectable. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, CXCL14-treated versus untreated cells; ##P<0.01, 10 nM CXCL14 versus 1 nM CXCL14; ‡P<0.05, ††P<0.01, †††P<0.001 untreated M2 macrophages versus untreated M1 macrophages. **(c)** Clear field microscope pictures of

hematoxylin and eosin-stained chemotactic chambers in which M1- or M2-preactivated macrophages were challenged for chemical attraction of CXCL14 (10 nM) (left) and quantification of migrating macrophages expressed as cells per visualization field (right, n = 4 for M1 and n = 8 for M2). *P<0.05, ***P<0.001, CXCL14 present versus absent in the chemotactic chamber; #: P<0.05, ###P<0.001, M2 versus M1. Data represent mean ± s.e.m. in all cases. Data in **c** is representative from 3 different visualization fields in 4 independent experiments. ANOVA was used to compare different CXCL14 concentrations in **b**. Two-tailed Student's *t*-test was used to compare M1 and M2 transcript levels for each concentration in **b** and in **c**.

Figure 5: CXCL14 secreted by brown adipocytes contributes to the attraction of M2 macrophages. (a) Diagram of qRT-PCR determination of gene expression and of chemotaxis assays conducted in M1- or M2-activated RAW 264.7 macrophages treated with brown adipocyte conditioned media (CM) in the absence or in the presence of a CXCL14-neutralizing antibody (anti-CXCL14) and of an unspecific anti-isotype antibody (anti-IgG), or challenged for migration over brown adipocyte CM with or without the antibodies. (b) qRT-PCR determination of mRNA levels of M2 activation markers (*Arg1*, *Clec10a*, *Mrc1*), M1 activation markers (*Nos2*, *Tnf*, *Ccl2*), *Cxcl14* and the *Arg1/Nos2* transcript level ratio in control RAW 264.7 macrophages pretreated with LPS (60 ng·mL⁻¹) for M1 activation (n = 3) or IL-4 (40 ng·mL⁻¹)/IL-13 (40 ng·mL⁻¹) for M2 activation (n = 6) (white bars) or exposed to differentiated primary brown adipocyte CM for 12 hours, either supplemented with anti-IgG (black bars), anti-CXCL14 (orange bars) or without antibody addition (gray bars). ND, not detectable. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, CM-treated versus untreated cells; #P<0.05, ##P<0.01, anti-CXCL14 versus anti-IgG; ‡P<0.05, ‡‡P<0.01, ‡‡‡P<0.001 untreated M2 macrophages versus untreated M1 macrophages; §P<0.05 CM versus CM plus antibody. (c) Clear field microscope pictures of

hematoxylin and eosin-stained chemotactic chambers for the migration of M1- or M2-preactivated RAW 264.7 macrophages using brown adipocyte CM supplemented with anti-IgG, with anti-CXCL14 or without antibodies (upper panel) and quantification of migrating macrophages expressed as cells per visualization field (lower panel, n = 4 for M1 and n = 8 for M2) in control conditions (white bars) and in transwell inserts with brown adipocyte CM alone (gray bars) or supplemented with anti-IgG (black bars) or anti-CXCL14 (orange bars). *P<0.05, ***P<0.001, CXCL14 present versus absent in the chemotactic chamber; #: P<0.05, ###P<0.001, M2 versus M1. Data represent mean \pm s.e.m. in all cases. Data in **c** is representative from 3 different visualization fields in 4 independent experiments. One-way ANOVA was used to compare between the different conditions in the same polarization phenotype of macrophages. Two-tailed Student's *t*-test was used in **c** to compare M1 and M2 transcript levels.

Figure 6: *In vivo* CXCL14 administration promotes the browning of WAT and enriches adipose tissues with M2 macrophages. (a) Representative hematoxylin and eosin stain pictures of iBAT, iWAT and eWAT from mice implanted with saline-delivering (control) or with CXCL14-releasing osmotic pumps (CXCL14) for 7 days at room temperature (n = 7 for each group). (b) Representative images of immunohistofluorescence labeling of F4/80 or CD206 in iBAT, iWAT and eWAT from control (white bars) or mice implanted with CXCL14-releasing osmotic pumps (orange bars) for 7 days at room temperature (left, n = 7 for each group) and quantification of reactive signals (right, n = 7 for each). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, control versus CXCL14. (c) qRT-PCR determination of mRNA levels of transcriptional markers for thermogenic function, adipogenesis and lipid homeostasis, immune infiltration and *Cxcl14* in iBAT (upper lane), iWAT (middle lane) and eWAT (bottom lane) from control (white bars) or mice implanted with CXCL14-releasing osmotic pumps (orange bars) (n = 7 for each). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, control versus CXCL14. Data represent mean \pm s.e.m. in all cases. Data

in **a** and **b** is representative of 3 different sections from 7 independent experiments. Two-tailed Student's *t*-test was used in **b** and **c** to compare control and CXCL14-treated animals.

SUPPORTING INFORMATION

Supplementary Figure 1, related to Figure 1: CXCL14 transcript expression and circulating levels are thermoregulated in rat BAT (a) qRT-PCR determination of mRNA transcript levels of *Cxcl14* (left) and *Ucp1* (right) in iBAT from rats housed at room temperature (C) or at 4°C for either 24h or 22 days (n = 6 for each condition). (b) ELISA-determined total plasmatic concentration of circulating CXCL14 in rats housed at room temperature (C) or exposed to 4°C for 24h or 22 days (n = 6 for each). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, C versus cold. Data represent mean ± s.e.m. in all cases. Two-tailed Student's *t*-test was used in **a** and **b** to compare between controls and cold-exposed rats.

Supplementary Figure 2, related to Figure 2: CXCL14 does not perform significant actions on brown or white adipocytes. (a) qRT-PCR determination of mRNA expression of marker genes of thermogenic function (*Ucp1*, *Ppargc1a*, *Dio2*, *Adrb3*, *Prdm16*, *Fgf21*, *Klb*), adipogenesis (*Pparg*) and inflammation (*Tnf*, *Ccl2*, *Il6*), and of *Cxcl14*, in primary (upper lane, n = 3 for each treatment) and immortalized (bottom lane, n = 3 for each) brown adipocytes untreated (white bars) or treated with 1 (orange bars) or 10 nM (black bars) CXCL14 for 24h. *P<0.05 treated versus control. (b) Time course of qRT-PCR-assessed mRNA expression of relevant marker genes of thermogenic function (*Ucp1*, *Ppargc1a*, *Fgf21*), inflammation (*Ccl2*) and adipogenesis (*Pparg*) at days 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 9 of differentiation of control and CXCL14 (10 nM) chronically-treated immortalized brown adipocytes (n = 3 for each time point and treatment). (c) Clear-field microscopy images of control and CXCL14-treated (10 nM) immortalized brown adipocytes at days 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 9 of differentiation. (d) Glucose oxidation quantification (expressed in scintillation counts per minute) in differentiated brown adipocytes untreated (white bar) or treated with 1 (orange bar) or 10 nM (black bar) CXCL14 for 24 hours (n = 6 for each treatment). (e) qRT-PCR determination of mRNA expression of marker

genes of thermogenic function (*Ucp1*, *Pparg1a*, *Dio2*, *Adrb3*, *Prdm16*, *Fgf21*, *Klb*), adipogenesis (*Pparg*) and inflammation (*Tnf*, *Ccl2*, *Il6*), and of *Cxcl14*, in control (white bars) CXCL14-treated (10 nM for 24h, black bars) differentiated primary white adipocytes from iWAT (left) and eWAT (right). ND, not detectable. Data represent mean \pm s.e.m. in all cases. Data in **c** is representative of 3 different experiments. One-way ANOVA was used in **a** and **d** to compare untreated and treated adipocytes. Two-tailed Student's *t*-test was used in **b** and **c** to compare treated and untreated adipocytes.

Supplementary Figure 3, related to Figures 4 and 5: RAW 264.7 cells used in chemotaxis assays are activated to the M1 or the M2 phenotypes. qRT-PCR determination of mRNA expression levels of M1-related genes (*Nos2*, *Tnf*, *Ccl2*), M2-related genes (*Arg1*, *Mrc1*, *Clec10a*) and of *Cxcl14* (left) and determination of the *Arg1/Nos2* transcript level ratio (right) in RAW 264.7 cells either untreated (white bars) or pretreated for 12 hours with LPS (40 ng·mL⁻¹, gray bars), IL-4 (60 ng·mL⁻¹, black bars) or IL-13 (60 ng·mL⁻¹, orange bars) (n = 3 for each). ND, not detectable. ***P<0.001 treated versus control macrophages. Data represent mean \pm s.e.m. in all cases. One-way ANOVA followed by Dunnet's post-test was used to compare treated and untreated cells.

	Control	KO
Glucose (mg·dL⁻¹)	87.2 ± 13.3	77.6 ± 8.2
Insulin (ng·mL⁻¹)	1.5 ± 0.4	2.8 ± 0.4
Resistin (ng·mL⁻¹)	12.1 ± 1.1	10.7 ± 2.3
PAI-1 (pg·mL⁻¹)	35.8 ± 6.4	21.6 ± 1.2
IL-6 (pg·mL⁻¹)	7.2 ± 0.7	6.1 ± 1.0

Supplementary Table S1: Circulating metabolites and relevant proteins in wild type controls and in *Cxcl14*-KO 3-day-old mice neonates.

	Control	CXCL14
Glucose (mg·dL⁻¹)	156.5 ± 4.1	165.5 ± 6.5
Triglycerides (mg·dL⁻¹)	155.0 ± 13.2	163.7 ± 6.1
β-hydroxybutirate (mmol·dL⁻¹)	0.71 ± 0.01	0.70 ± 0.06
Insulin (ng·mL⁻¹)	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.1
Resistin (ng·mL⁻¹)	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.3
PAI-1 (ng·mL⁻¹)	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.3
IL-6 (pg·mL⁻¹)	8.6 ± 2.4	10.7 ± 4.7

Supplementary Table S2: Circulating metabolites and relevant proteins in controls and in mice implanted a CXCL14-delivering osmotic pump for 7 days.

Gene	Taqman probe ID
<i>Adipoq</i>	Mm00456425_m1
<i>Adrb3</i>	Mm00442669_m1
<i>Arg1</i>	Mm00475988_m1
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
<i>Ccr3</i>	Mm00515543_s1
<i>Cebpa</i>	Mm00514283_s1
<i>Clec10a</i>	Mm00546124_m1
<i>Cxcl14</i>	Mm00444699_m1
<i>Dio2</i>	Mm00515664_m1
<i>Fasn</i>	Mm00662319_m1
<i>Fgf21</i>	Mm00840165_g1
<i>Il33</i>	Mm00505403_m1
<i>Il5</i>	Mm00439646_m1
<i>Il6</i>	Mm00446191_m1
<i>Klb</i>	Mm00473122_m1
<i>Lep</i>	Mm00434759_m1
<i>Lipe</i>	Mm00495359_m1
<i>Lpl</i>	Mm00434764_m1
<i>Metrn1</i>	Mm00522681_m1
<i>Mrc1</i>	Mm00485148_m1
<i>Nos2</i>	Mm00440502_m1
<i>Pnlpa2</i>	Mm00503040_m1
<i>Pparg</i>	Mm00440945_m1
<i>Ppargc1a</i>	Mm00447183_m1
<i>Prdm16</i>	Mm00712556_m1
<i>Siglec F</i>	Mm00523987_m1
<i>Th</i>	Mm00447557_m1
<i>Tnf</i>	Mm00443258_m1
<i>Ucp1</i>	Mm00494069_m1
<i>18S</i>	Hs99999901_s1
<i>Cxcl14</i>	Rn01441840_m1
<i>Ucp1</i>	Rn00562126_m1

Supplementary Table S3: Reference numbers for TaqMan probes used in assessment of gene expression experiments conducted in this paper.

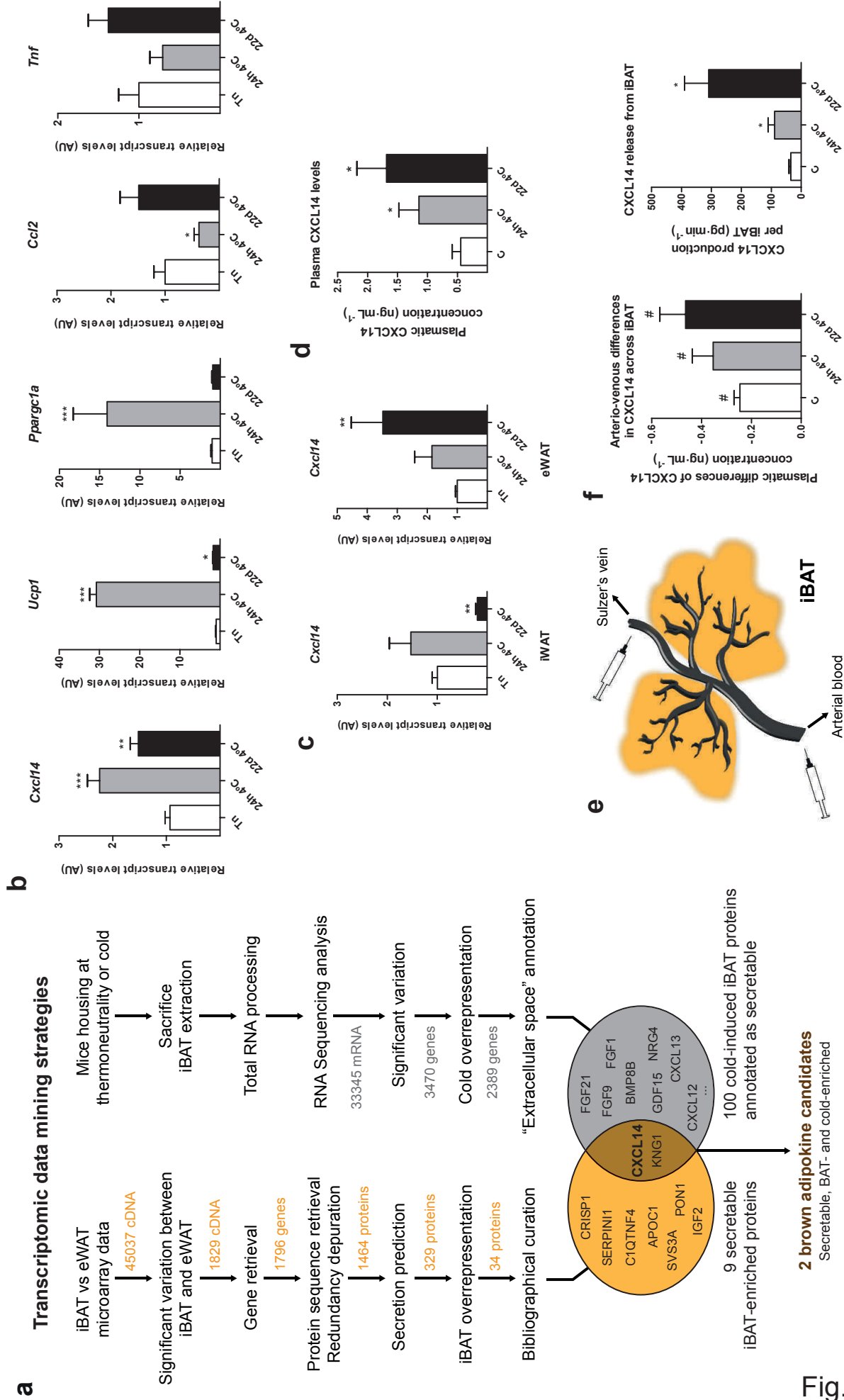


Fig. 1

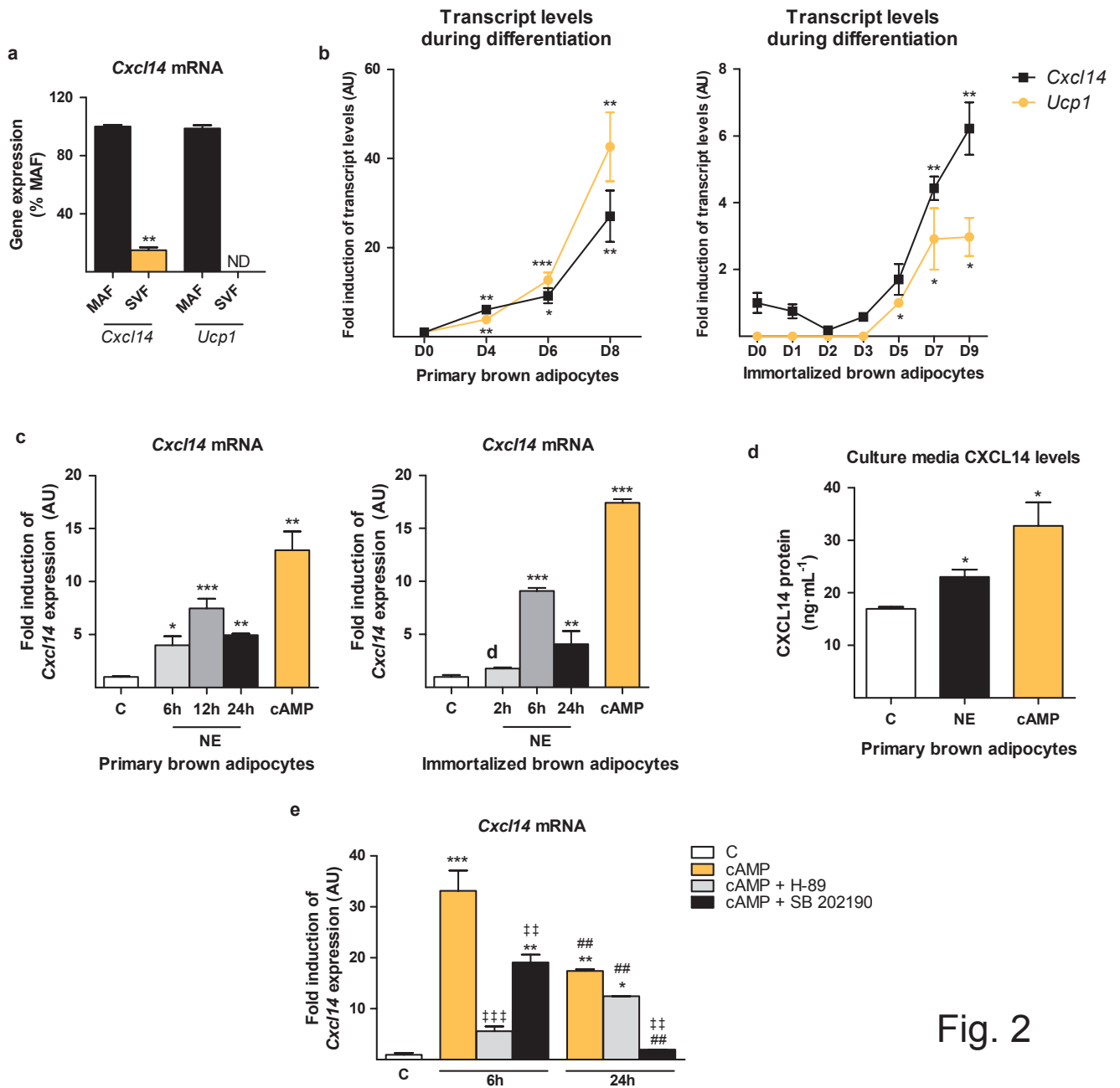


Fig. 2

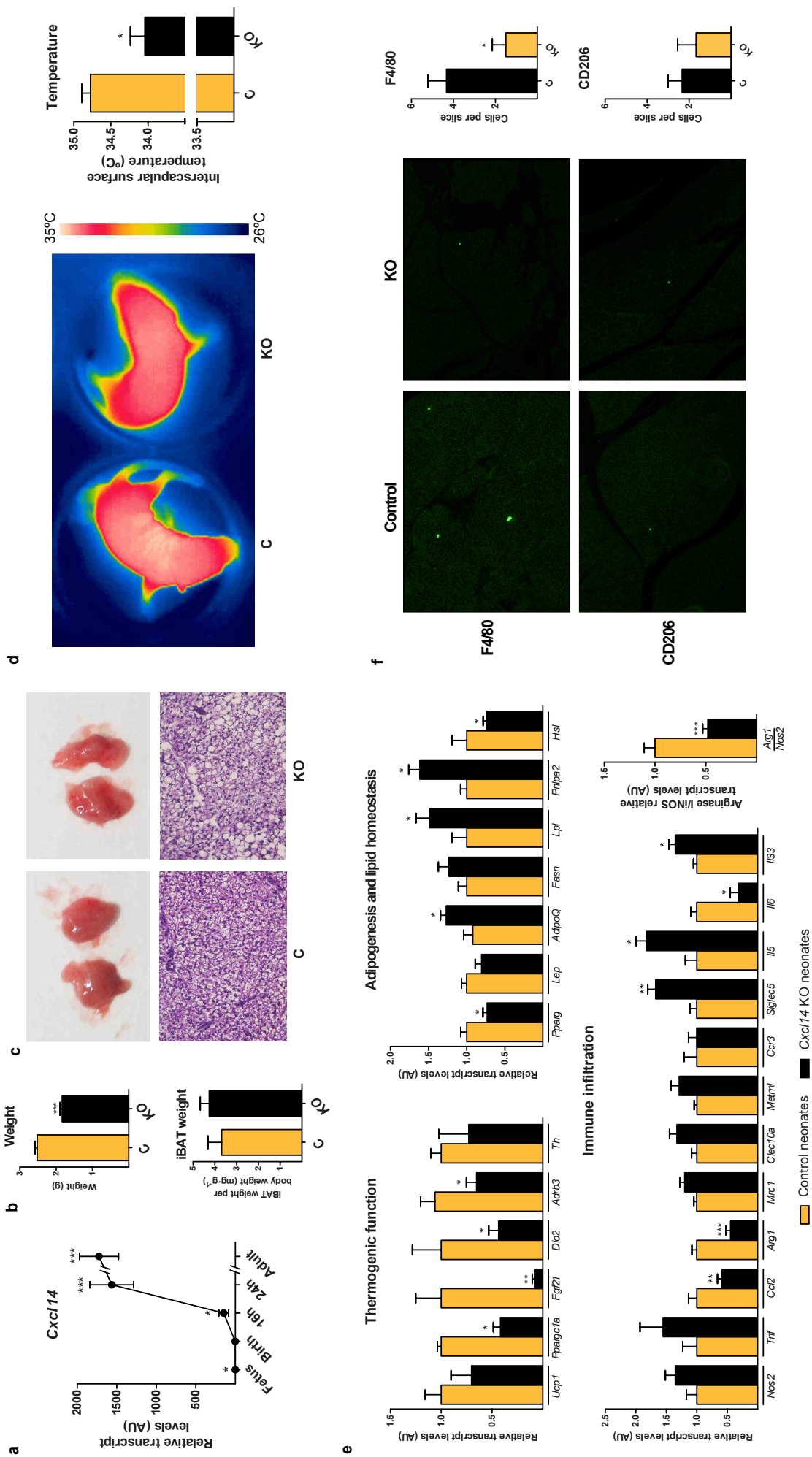


Fig. 3

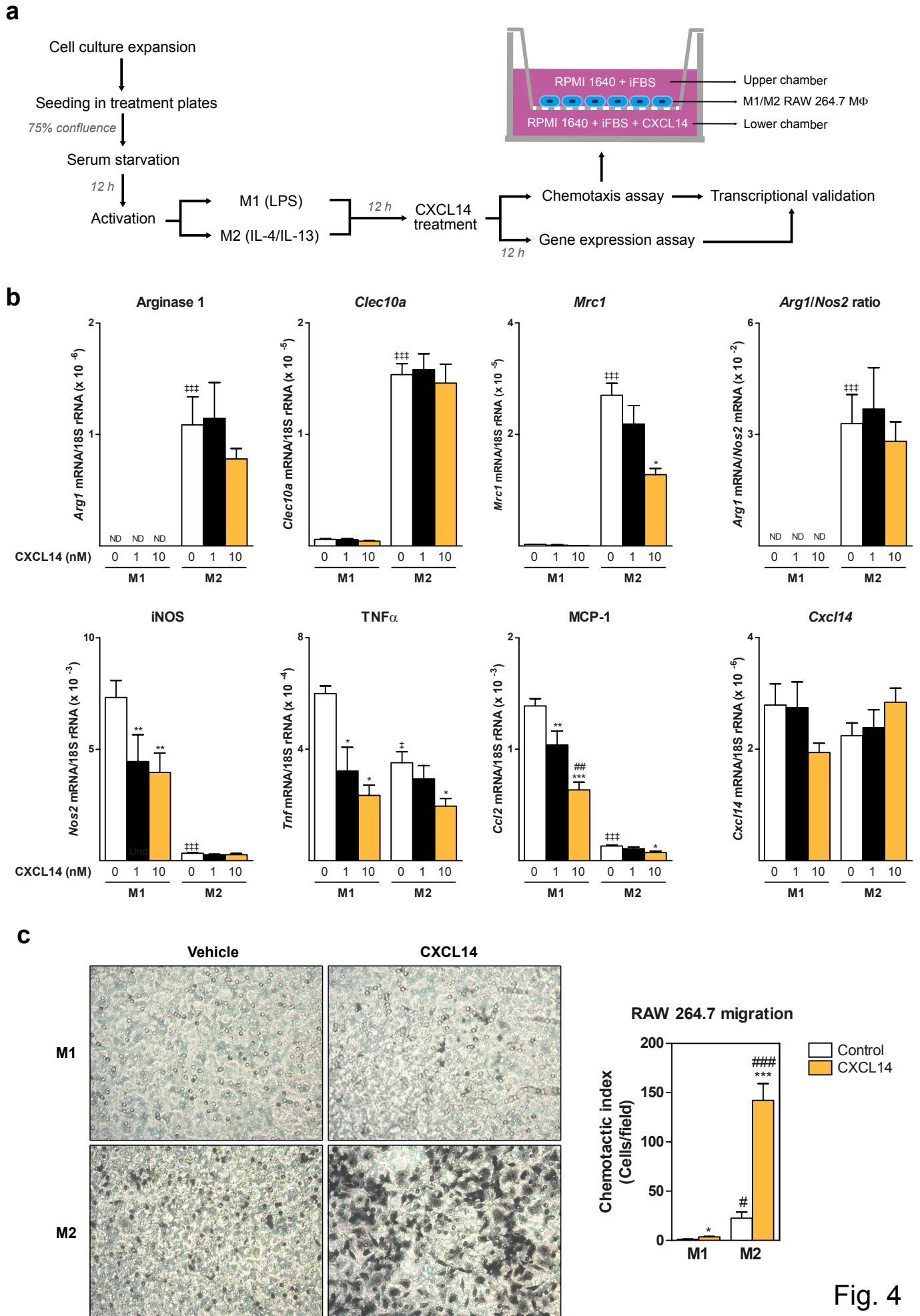


Fig. 4

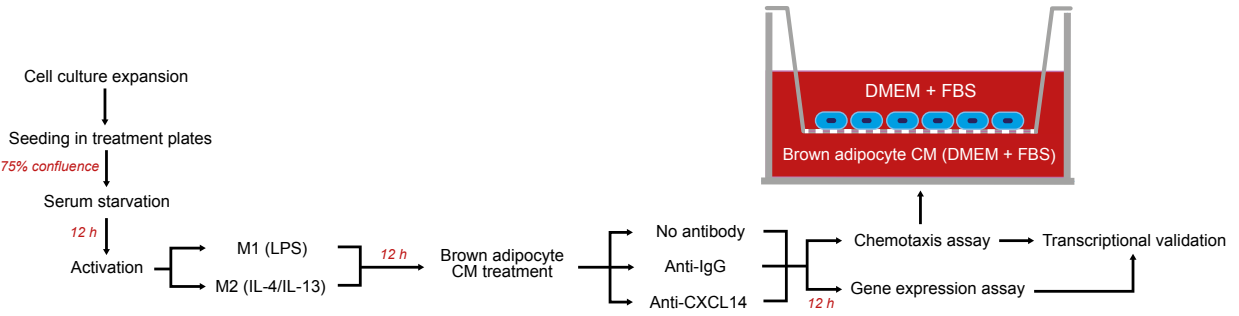
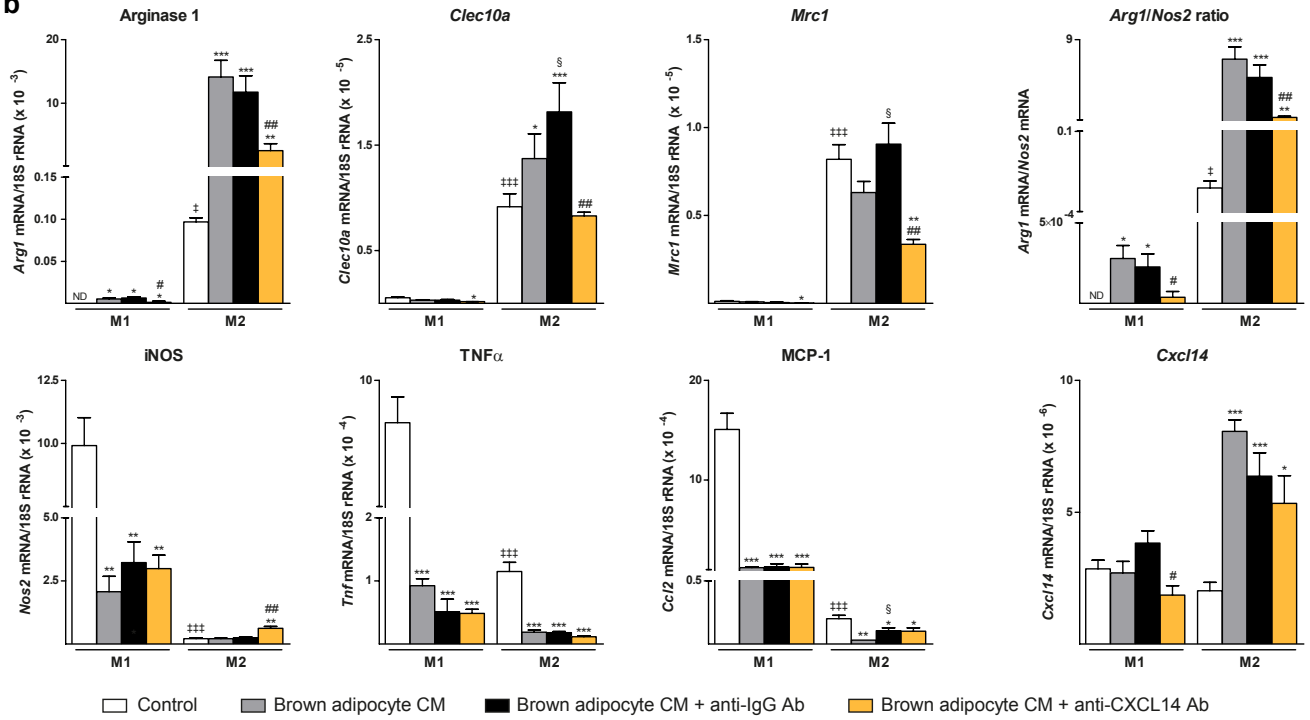
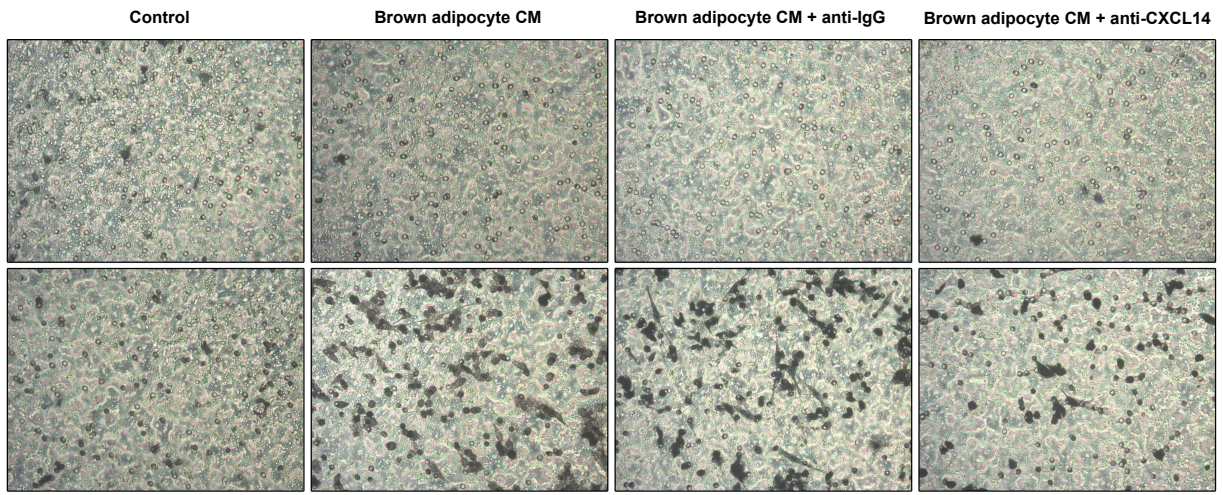
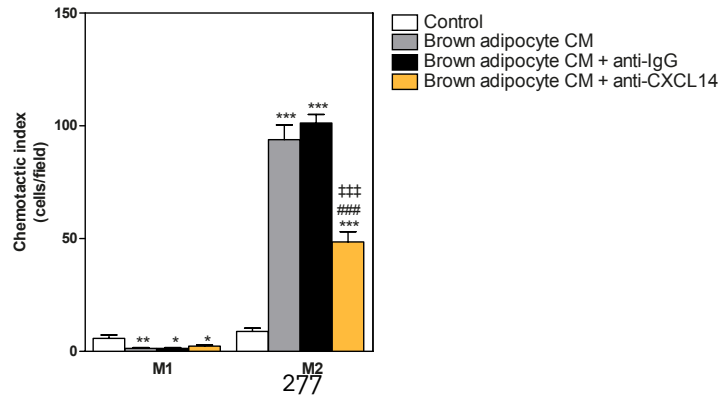
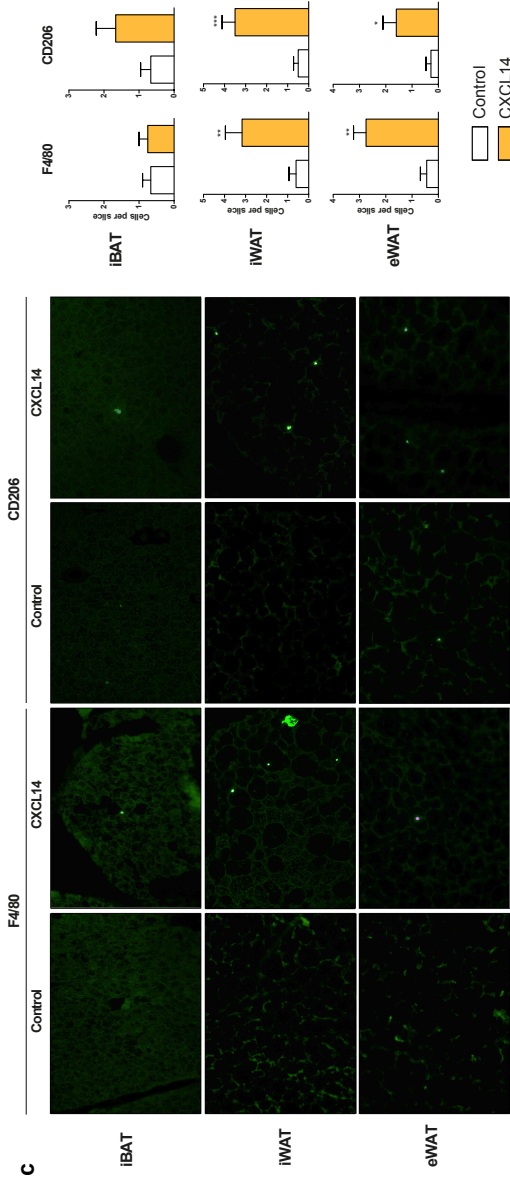
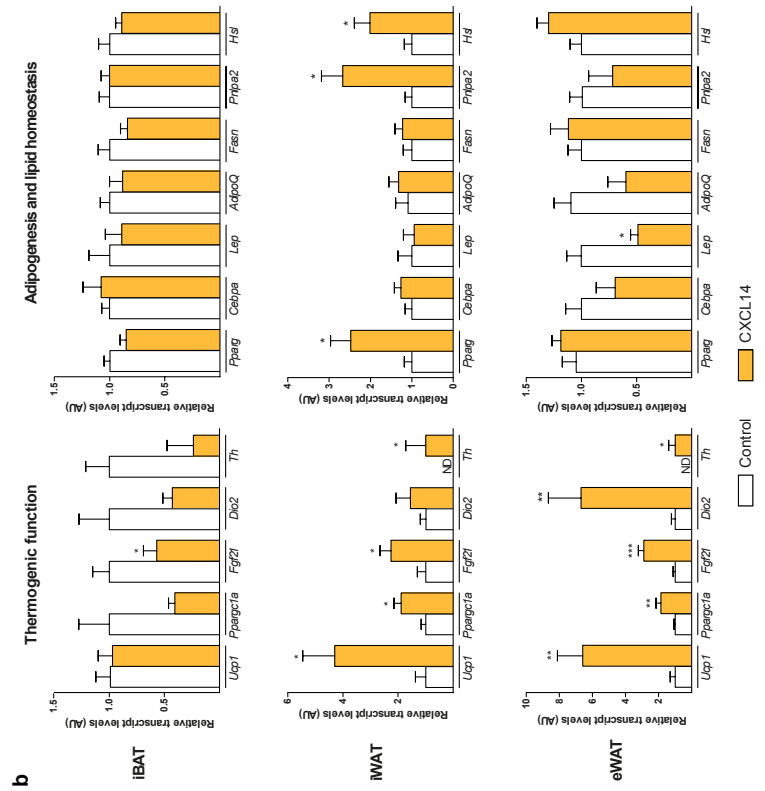
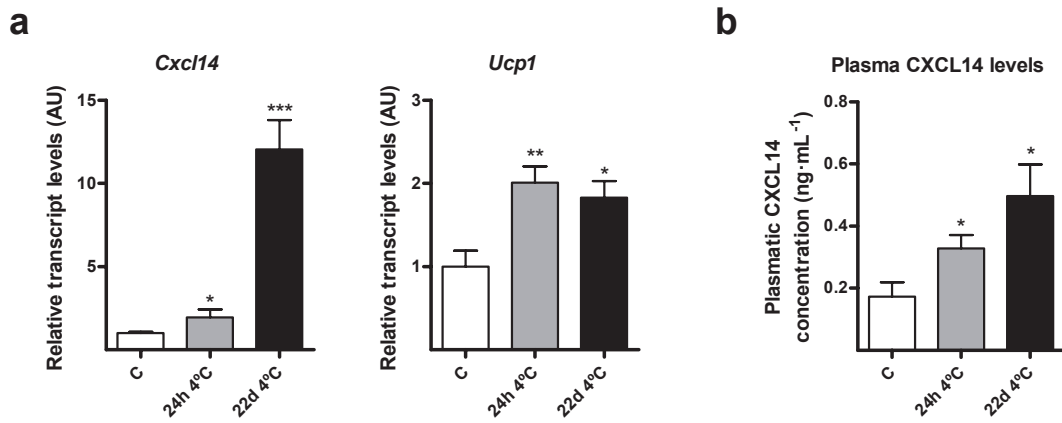
a**b****c****RAW 264.7 cells migration****Fig. 5**

Fig. 6

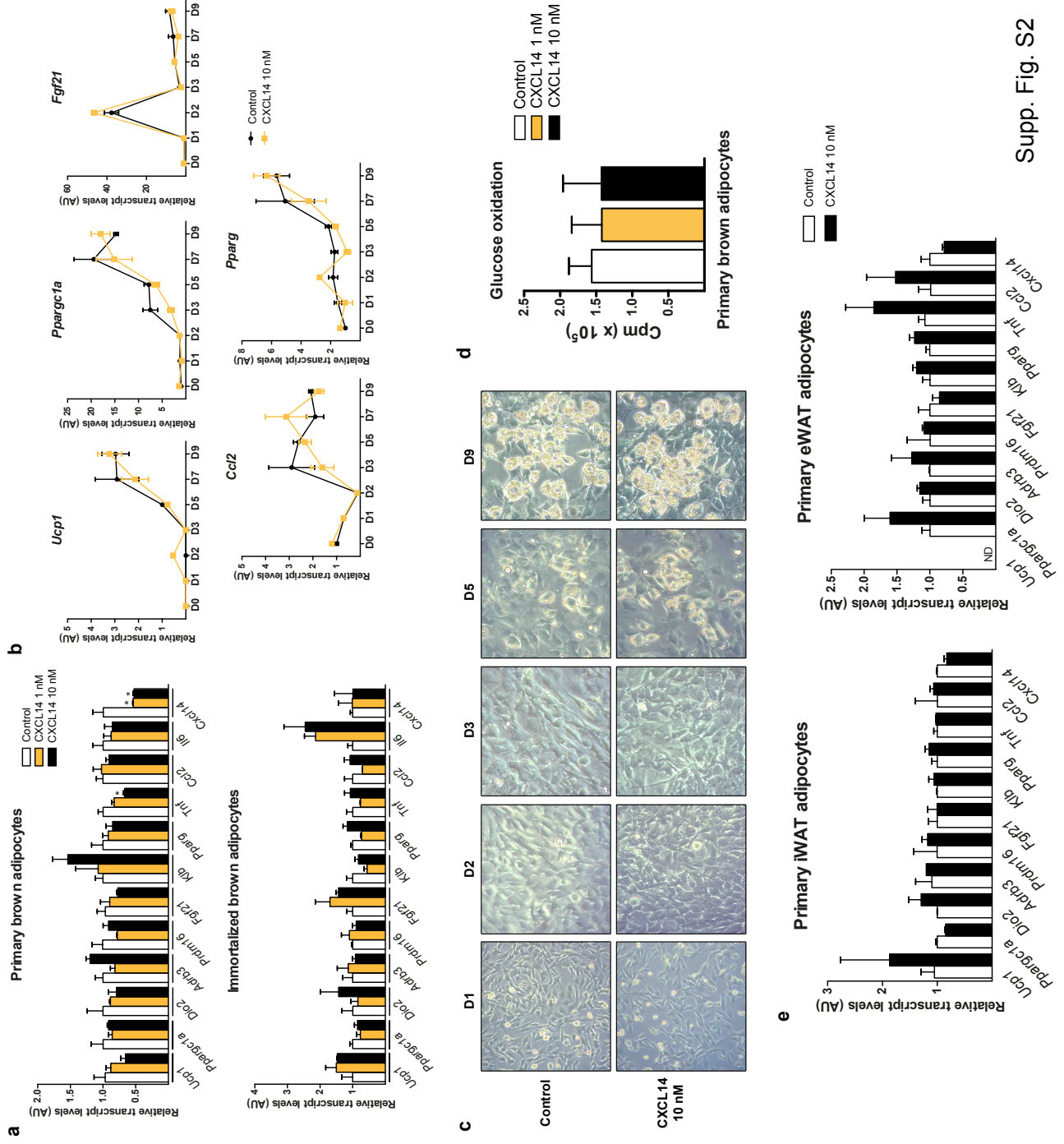


d

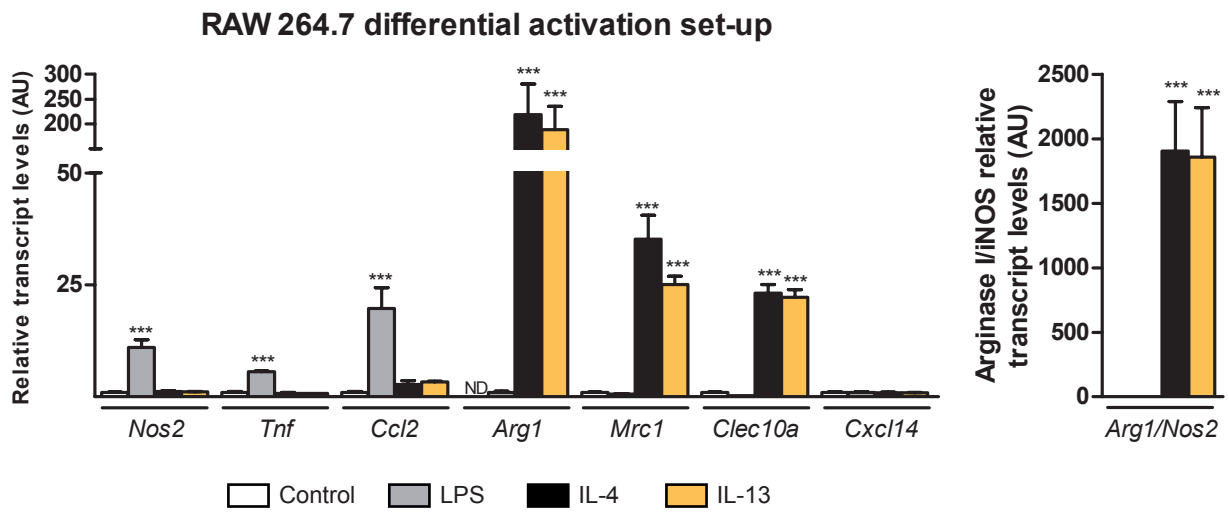




Suppl. Fig. S1



Supp. Fig. S2



Supp. Fig. S3



A PÈNDIX

A study of fatty acid binding protein 4 in HIV-1 infection and in combination antiretroviral therapy-related metabolic disturbances and lipodystrophy.

Revista: *HIV Medicine*

PMID: 21251185

Títol: Estudi de la proteïna d'unió a àcids grassos 4 en la infecció per VIH-1 i en alteracions metabòliques i lipodistròfia relacionades amb la teràpia antiretroviral combinada.

Resum: L'objectiu del present estudi fou el de determinar els nivells circulants de la proteïna d'unió a àcids grassos 4 (FABP4) en una cohort de pacients infectats per VIH-1 tractats amb una teràpia antiretroviral combinada (TARc) i el d'investigar les relacions entre els nivells de FABP4 i la resistència a la insulina, la dislipidèmia, la lipodistròfia i els nivells d'adipocines proinflamatòries en aquests pacients. Un total de 282 pacients infectats per VIH-1 i tractats amb una TARc estable durant un període mínim d'un any (132 amb lipodistròfia, i 150 sense), així com 185 controls no infectats foren incorporats a l'estudi. Se'n van determinar els paràmetres antropomètrics, els nivells plasmàtics de FABP4, de receptors solubles 1 i 2 del factor de necrosi tumoral (sTNF-R1 i sTNF-R2), d'interleucina-18 (IL-18), d'interleucina-6 (IL-6), d'adiponectina i de leptina, així com la resistència a insulina mesurada a través del model homeostàtic d'avaluació de la resistència a la insulina (HOMA-IR). L'expressió a nivell de mRNA de citocines proinflamatòries fou avaluada en el teixit adipós blanc subcutani de 38 pacients (25 amb lipodistròfia i 13 sense) per reacció en cadena de la polimerasa a temps real. La concentració plasmàtica de FABP4 fou més elevada en pacients amb lipodistròfia respecte als que no en presentaven. La concentració de FABP4 es correlacionà positivament amb l'índex de massa corporal, l'HOMA-IR i les concentracions d'insulina, colesterol tota, triglicèrids, sTNF-R1, leptina i IL-18, però negativament amb el colesterol de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) i l'adiponectina. El risc de lipodistròfia es trobà méselevat en aquells individus amb nivells de FABP4. Emprant un model de regressió per passos, FABP4 es trobà associat de manera independent amb l'HOMA-IR havent-lo controlat pels paràmetres clínics i inflamatoris. A més, es va detectar una correlació positiva en l'expressió adipocitària de CD68 i la concentració circulant de FABP4 en pacients amb lipodistròfia. Per tant, els individus infectats per HIV-1 sota un tractament TARc amb lipodistròfia presentaven una sobreproducció sistèmica de FABP4, estretament unida a una situació de resistència a la insulina i a l'expressió de marcadors inflamatoris al teixit adipós subcutani.

A study of fatty acid binding protein 4 in HIV-1 infection and in combination antiretroviral therapy-related metabolic disturbances and lipodystrophy

X Escoté,^{1,2*} A Megia,^{1,2*} M López-Dupla,¹ M Miranda,^{1,2} S Veloso,¹ V Alba,¹ P Domingo,³ P Pardo,⁴ C Viladés,¹ J Peraire,¹ M Giralt,⁵ C Richart,^{1,6} J Vendrell^{1,2} and F Vidal¹ for the HIV-1 Lipodystrophy Study Group[†]

¹Joan XXIII University Hospital of Tarragona, IISPV, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain, ²CIBER on Diabetes and related metabolic diseases (CIBERdem), Carlos III Institute of Health, Madrid, Spain, ³Santa Creu i Sant Pau Hospital, Autònoma University, Barcelona, Spain, ⁴Sant Joan University Hospital, Reus. IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain, ⁵Biochemistry and Molecular Biology Department, Biomedical Institute IBUB, Barcelona University, Barcelona, Spain and ⁶CIBER on Obesity physiopathology and Nutrition CICBERobn, Carlos III Institute of Health, Madrid, Spain

Objective

The aim of the study was to determine circulating levels of fatty acid binding protein 4 (FABP-4) in a cohort of HIV-1-infected patients treated with combination antiretroviral therapy (cART) and to investigate the relationships between FABP-4 levels and insulin resistance, dyslipidaemia, lipodystrophy and levels of proinflammatory adipocytokines in these patients.

Methods

A total of 282 HIV-1-infected patients treated with stable cART for at least 1 year (132 with lipodystrophy and 150 without) and 185 uninfected controls (UCs) were included in the study. Anthropometric parameters were determined. Plasma levels of FABP-4, soluble tumour necrosis factor receptors 1 and 2 (sTNF-R1 and sTNF-R2), interleukin-18 (IL-18), IL-6, adiponectin and leptin were also analysed. Insulin resistance was determined using the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). Subcutaneous adipose tissue mRNA expression of proinflammatory cytokines was assessed in 38 patients (25 with lipodystrophy and 13 without) by real-time polymerase chain reaction (PCR).

Results

The plasma FABP-4 concentration was significantly higher in patients with lipodystrophy than in those without ($P = 0.012$). FABP-4 concentration was positively correlated with body mass index (BMI), HOMA-IR, and the concentrations of insulin, total cholesterol, triglycerides, sTNF-R1, leptin and IL-18, but showed a negative correlation with high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and adiponectin concentrations. After adjusting for age, sex and BMI, the odds ratio (OR) for risk of lipodystrophy was found to be significantly increased for those with the highest levels of FABP-4 [OR 0.838, 95% confidence interval (CI) 0.435–1.616 for medium FABP-4 vs. OR 2.281, 95% CI 1.163–4.475 for high FABP-4]. In a stepwise regression model, FABP-4 was independently associated with HOMA-IR after controlling for clinical and inflammatory parameters ($P = 0.004$). Moreover, a positive relationship was observed in patients with lipodystrophy between subcutaneous adipose tissue *CD68* expression and FABP-4 plasma levels ($r = 0.525$; $P = 0.031$).

*Contributed equally to this work.

Correspondence: Dr Anna Megia, Joan XXIII University Hospital of Tarragona, IISPV, Rovira i Virgili University, Mallafre Guasch, 4, Tarragona 43007, Spain. Tel: + 34 977 295 833; fax: + 34 977 224 011; e-mail: amegia.hj23.ics@gencat.cat

[†]See Appendix for group members.

Conclusions

cART-treated HIV-1-infected patients with lipodystrophy have a systemic overproduction of FABP-4, which is closely linked to insulin resistance and inflammatory markers in subcutaneous adipose tissue.

Keywords: dyslipidaemia, FABP-4, HIV-1 infection, insulin resistance, lipodystrophy, subcutaneous adipose tissue

Accepted 22 October 2010

Introduction

The widespread use of combination antiretroviral therapy (cART) has resulted in considerable success being achieved in improving mortality and morbidity outcomes in HIV-1-infected patients. Unfortunately, cART is associated with severe side effects, such as lipodystrophy, insulin resistance and a proatherogenic lipid profile, which may in time lead to increased cardiovascular morbidity [1–3]. Several adipokines involved in the inflammatory process related to insulin resistance and cardiovascular risk factors have been investigated previously in HIV-1-infected patients. A relationship between elevated inflammatory activity and adipose tissue changes has been proposed [4]. Despite their lower body fat content, an inflammatory profile similar to that found in insulin-resistant obese patients has been observed in HIV-1-infected patients with lipodystrophy [5]. In patients with lipodystrophy, higher levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin-6 (IL-6) and IL-18 have been reported in both systemic and adipose tissue expression [6].

Recently, a newly discovered adipokine, fatty acid binding protein 4 (FABP-4; also called aP2), has emerged as an important mediator in the cross-talk between adipocytes and macrophages in adipose tissue. It belongs to the family of fatty acid binding proteins (FABPs) which are a group of molecules that co-ordinate lipid responses in cells and are also connected to metabolic and inflammatory pathways. FABPs are lipid chaperones that bind fatty acid ligands with high affinity and have functions in intracellular fatty acid trafficking, regulation of lipid metabolism, and modulation of gene expression [7,8]. FABP-4 is abundantly expressed in mature adipocytes and activated macrophages [9,10]. FABP-4-deficient mice exhibit higher insulin-stimulated glucose uptake and their adipocytes have a reduced efficiency of lipolysis, both *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, studies of FABP-4 gene variants suggest that FABP-4 may have effects on plasma lipid levels and insulin sensitivity, and play a role in coronary heart disease [9,10]. All these data suggest that FABP-4 could be a potential target for the treatment of metabolic diseases.

Although it was once thought to be a purely intracellular protein, recent studies have shown FABP-4 to be present at

high levels in human serum [11]. In cross-sectional analyses, circulating FABP-4 has been closely associated with obesity and metabolic syndrome, and in prospective studies FABP-4 levels predicted the development of metabolic syndrome and type 2 diabetes [11].

Data for HIV-1-infected patients are scarce. A recent study that included HIV-1-infected patients with metabolic syndrome and lipodystrophy showed that these patients had higher circulating levels of FABP-4 than those without metabolic syndrome or lipodystrophy, although the relationship with insulin resistance and other well-known inflammatory and adipocyte-related cytokines was not explored [12]. Considering that FABP-4 seems to be a key element in adipocyte differentiation, and that it has been postulated as a possible marker of fat distribution in mammals [13], we have hypothesized that FABP-4 may be involved in cART-related lipodystrophy syndrome and its associated metabolic disturbances in HIV-1-infected patients. We have therefore analysed the circulating levels of FABP-4 in an HIV-1-infected cohort including patients with and without lipodystrophy.

Materials and methods

Design, setting and participants

A multicentre cross-sectional case-control study was carried out. A total of 467 individuals were included in the study, all of whom were Caucasian adults, with 282 being HIV-1-infected and 185 uninfected. The HIV-1-infected patients were recruited from a prospectively collected cohort of 1700 HIV-1-infected individuals who had been receiving stable cART for at least 1 year. cART was defined as the combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) plus either a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) or one or more protease inhibitors (PIs).

Regarding the HIV-infected patients, we recruited all patients with moderate or severe lipodystrophy (LD +), which was assessed clinically [14,15] ($n = 132$), and a randomly selected group of patients without lipodystrophy (LD -; $n = 150$) whose age (± 5 years), gender, and duration of exposure to cART (± 3 months) were

comparable to those of the patients with lipodystrophy. The sample size was calculated to achieve a difference of FABP-4 levels greater than 6 ng/mL between groups that resulted in a confidence level of 95% and statistical power of 80%. The control group consisted of uninfected healthy subjects matched with patients for age and gender. The patients were followed up at the HIV-1 out-patient clinics of the three participating hospitals (Joan XXIII University Hospital of Tarragona, Santa Creu i Sant Pau Hospital, Barcelona and Sant Joan University Hospital, Reus). Inclusion criteria were age > 18 years, presence of HIV-1 infection, stable cART regimen for at least 1 year and presence or absence of lipodystrophy according to clinical assessment (see below for categorization criteria). The presence of cachexia, active opportunistic infections, current inflammatory diseases or conditions, consumption of drugs with known metabolic effects such as steroids (topical, inhaled or systemic), antidiabetic or hypolipidaemic drugs and hormones, and plasma C reactive protein > 1 mg/dL were considered as exclusion criteria for both patients and controls. All patients provided informed consent and the local ethics committees approved the study.

Clinical assessment of lipodystrophy

All HIV-1-infected patients were given a complete physical examination to assess the presence, type (lipoatrophy, lipohypertrophy or mixed) and degree (slight, moderate or severe) of lipodystrophy. Waist and hip circumference, height, weight and body mass index (BMI) were measured. The presence of lipodystrophy was defined as changes in body fat composition that were substantial enough to be recognized by both the patient and the attending physician. Criteria for lipoatrophy were one or more of the following: loss of fat from the face, arms and legs, prominent veins in the arms and legs, and loss of fat from the buttocks. Lipohypertrophy was defined as the presence of one or more of the following: an increase in abdominal perimeter, breast and/or neck fat deposition. We defined mixed lipodystrophy as occurring when at least one characteristic of lipoatrophy and one of lipohypertrophy were concomitantly present in a given patient. Lipodystrophy was categorized in accordance with the scale proposed by Carr *et al.* [1]: non-existent (0), slight (1), moderate (2) and severe (3). Doubtful cases were excluded. Lipodystrophy was evaluated according to this categorization in the face, arms, legs, buttocks, abdomen, neck and breasts. The sum of the values corresponding to each corporal zone indicated the degree of lipodystrophy: nonexistent (0), slight (1–6), moderate (7–12) and severe (13–18). In this study we included only moderate and severe cases in order to avoid an overlap between the LD+ and LD– subsets.

The LD+ group comprised 26 patients with pure lipoatrophy and 106 patients with the mixed type. No cases of pure lipohypertrophy were recorded. With respect to severity, 109 had moderate and 23 had severe lipodystrophy.

Laboratory measurements

Collection of blood samples

After an overnight fast, 20 mL of blood obtained from a peripheral vein was collected in Vacutainer™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. Five millilitres of whole blood was used to determine the CD4 T-cell count. Five hundred microlitres was used for DNA isolation with a MagNa Pure LC Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma and serum were obtained by centrifugation at 3500 g for 15 min at 4 °C and stored at – 80 °C until use.

HIV-1-related data

HIV-1 infection and plasma HIV-1 viral load were assessed as described elsewhere [14]. The CD4 T-cell count was determined using a flow cytometer FAC Scan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Data acquired were analysed using the MULTISSET program (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

Blood chemistry

Plasma glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were determined in an ADVIA 1200 (Siemens AG, Munich, Germany) auto-analyser using standard enzyme methods. Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated using the Friedewald formula [16]. Fasting plasma insulin was measured using a specific immunoradiometric assay (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium) in which proinsulin did not cross-react. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 6% and 7%, respectively. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as a marker for insulin resistance was calculated according to the formula [fasting glucose (in millimoles per litre) × fasting insulin (in microunits per millilitre)/22.5] [17].

Plasma levels of cytokines and adipokines

Soluble tumour necrosis factor receptor 1 (sTNF-R1) and sTNF-R2 were assessed as previously described [18]. Adiponectin levels were measured using a standardized radioimmunoassay kit from Linco Research (Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA). The kit has a sensitivity of 1 ng/mL. The intra- and inter-assay CVs were 8% and 12%, respectively. Plasma FABP-4 was measured using the

Human Adipocyte FABP ELISA (BioVendor Laboratory Medicine, Palackeho, Czech Republic). The sensitivity was 0.1 ng/mL. The intra- and inter-assay CVs were 5.2% and 3.8%, respectively. The leptin concentration in plasma was determined with a Human Leptin ELISA kit (Assaypro, St Charles, MO, USA); the lowest detectable level was 0.15 pg/mL with an intra-assay CV of 4.0% and an inter-assay CV of 7.7%. The IL-18 concentration in plasma was determined with a Human IL-18 ELISA kit (MBL International Corporation, Woburn, MA, USA); the lowest detectable level was 12.5 pg/mL. The intra-assay CV was 7.2% and the inter-assay CV was 7.5%. Plasma IL-6 levels were measured using the commercial kit Human IL-6 Quantikine HS High Sensitivity (R&D Systems, Lille, France).

Adipose tissue samples

Samples of subcutaneous adipose tissue (SAT) were obtained from subcutaneous abdominal depots by a small surgical biopsy, under local anaesthesia with mepivacaine. Twenty-five HIV-1-infected patients with lipodystrophy (LD+), and 13 HIV-1-infected patients without lipodystrophy (LD-) were biopsied. All patients had fasted overnight. One to four grams of SAT was removed from each biopsy and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA extraction. Total RNA was extracted from 400–500 mg of frozen SAT using the RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen Science, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was retrotranscribed to cDNA using the Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) in a final volume of 20 µL. The following primers were used in the real-time quantitative polymerase chain reaction: 5-gagcactgaaagcatgatcc-3 and 5-gctgttatctctcagctcca-3 for *TNF-α*, 5-tctgtgctgctgctcatag-3 and 5-cagatctccttgccacaat-3 for monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*); 5-ggaaactaagcctgcactc-3 and 5-ggatg aagctgtgtggaga-3 for *TNF-R1*; 5-tgccgctgtgtagaaagaa-3 and 5-gctcacaaggttctggcg-3 for *TNF-R2*; 5-atgagctggctgtgctt-3 and 5-gtggttttgtggctcttgg-3 for *CD68* and 5-ctatggagttcatgctgtg-3 and 5-gtactgacattattt-3 for peroxisome proliferator activated receptor gamma (*PPAR-γ*). The housekeeping genes used to normalize gene expression were: β-actin, 5-ggacttcgagcaagagatgg-3 and 5-agcactgtgtggcgtacag-3, and cyclophilin A (*CYPA*), 5-caaatgctggaccaaacac-3 and 5-gcctcacaatattcatgcttctt-3.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the spss 13.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). We performed the one-sample Kolmogorov-Smirnov test to verify the normal

distribution of the quantitative variables. Normally distributed data are expressed as the mean ± standard deviation (SD), whereas variables with a skewed distribution are represented as the median (interquartile range). Categorical variables are reported as number (percentage). Student's *t*-test was used to compare the mean values of continuous variables normally distributed between independent groups. For variables with skewed distributions, we used the Kruskal-Wallis test. To analyse the differences in nominal variables between groups, we used the χ^2 test. Spearman's correlation coefficient was used to analyse the bivariate correlation between FABP-4 and metabolic parameters. A stepwise multiple regression analysis including several metabolic and clinical variables known to be associated with insulin sensitivity was performed to determine whether FABP-4 was independently associated with HOMA-IR. A logistic regression analysis was performed to determine the OR of FABP-4 for the presence of lipodystrophy after adjustment for age, sex and BMI. FABP-4 levels were also grouped into tertiles and a logistic regression analysis was performed to determine the OR for the presence of lipodystrophy in subjects in the higher FABP-4 tertiles compared with those in the lowest tertile. For all comparisons, a *P* value <0.05 was considered significant.

Results

Baseline characteristics of the subjects

Whole group

The main clinical and metabolic characteristics of healthy controls and HIV-1-infected patients are shown in Table 1. Uninfected subjects had a higher mean BMI than HIV-1-infected patients (*P*<0.001). As expected, levels of inflammatory parameters (sTNF-R2, IL-6 and IL-18; *P*<0.001 for all) were higher in HIV-1-infected patients. Leptin levels were significantly lower in HIV-1-infected patients (*P*<0.001). In contrast, sTNF-R1 and adiponectin did not show significant differences between the groups.

HIV-1-infected subjects

Table 2 shows the main characteristics of the HIV-1-infected cohort, categorized according to the presence or absence of lipodystrophy. As expected, the group with lipodystrophy (LD+) had significantly higher mean BMI and waist/hip circumference ratio. They also had more advanced disease, as defined by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification, and a greater CD4 T-cell increase attributable to cART, compared with those without lipodystrophy (LD-). Moreover, LD+ patients had received a higher number of PIs and NRTIs and had had more prolonged exposure to NRTIs (Table 2),

Table 1 Clinical, metabolic and adipokine characteristics of healthy controls and HIV-1-infected patients

	Healthy controls (n = 185)	HIV-1-infected patients (n = 282)	P
Age (years)	40.00 (31.00–50.25)	42.00 (36.00–45.00)	0.805
Gender [n (%) male]	122 (65.9)	185 (65.6)	0.921
Waist circumference (cm)	90.00 (80–95)	88.00 (80–93)	0.378
BMI (kg/m ²)	25.75 ± 4.13	23.18 ± 2.99	<0.001
Plasma insulin (μU/mL)	5.95 (3.75–13.49)	6.96 (4.03–14.65)	0.435
Plasma adiponectin (μg/mL)	11.815 (7.635–19.223)	10.713 (4.906–19.032)	0.101
Plasma sTNF-R1 (ng/mL)	1.89 (1.50–2.40)	1.96 (1.57–2.45)	0.406
Plasma sTNF-R2 (ng/mL)	3.27 (2.80–3.80)	5.56 (4.34–7.62)	<0.001
Plasma leptin (ng/mL)	8.56 (4.94–14.58)	4.16 (2.33–7.39)	<0.001
Plasma IL-6 (pg/mL)	1.11 (0.65–1.77)	1.66 (1.18–2.73)	<0.001
Plasma IL-18 (pg/mL)	185.68 (147.24–233.61)	298.93 (224.50–409.15)	<0.001
Plasma FABP-4 (ng/mL)	21.21 (13.97–41.42)	24.63 (13.27–38.99)	0.221

Data are expressed as mean ± standard deviation or median (interquartile range).

BMI, body mass index; FABP-4, fatty acid binding protein 4; IL-18, interleukin-18; sTNF-R1, soluble tumour necrosis factor receptor 1; sTNF-R2, soluble tumour necrosis factor receptor 2.

particularly stavudine (d4T). No differences in FABP-4 levels were observed according to the antiretroviral drugs received.

With respect to the metabolic and inflammatory parameters, LD + patients had higher mean insulin ($P < 0.001$), triglyceride ($P < 0.001$), total cholesterol ($P = 0.005$) and LDL cholesterol ($P = 0.038$) plasma levels, but lower mean HDL cholesterol levels ($P < 0.001$). The HOMA-IR index was also significantly higher in the LD + group ($P < 0.001$). Circulating levels of sTNF-R1, sTNF-R2, IL-6 and IL-18 were similar in the two HIV-1-infected groups. Patients with lipodystrophy had significantly lower adiponectin ($P < 0.001$) and significantly higher leptin ($P = 0.008$) plasma levels compared with the nonlipodystrophy subset. Before considering patients with lipodystrophy as a whole, we investigated differences in inflammatory and metabolic parameters between patients with moderate and severe lipodystrophy, and also between patients with the mixed type of lipodystrophy and those with lipoatrophy. No differences were found (data not shown).

Plasma FABP-4 levels

HIV-1-infected patients had similar plasma FABP-4 levels to uninfected controls (Table 1). However, among infected patients, plasma FABP-4 levels were significantly higher in those with lipodystrophy than in those without lipodystrophy ($P = 0.012$) (Table 2). FABP-4 levels were similar between patients with different types and severities of lipodystrophy, and among those with different levels of exposure to antiretroviral drugs.

Odds ratios for lipodystrophy for FABP-4 subsets

In multiple regression analysis, after adjustment for age, BMI and sex, high FABP-4 levels were significantly associated with lipodystrophy [odds ratio (OR) 1.016; 95%

confidence interval (CI) 1.01–1.027; $P = 0.004$]. To determine the OR for the presence of lipodystrophy in patients with higher FABP-4 levels, we used tertiles to categorize the FABP-4 level, and carried out a multiple logistic regression analysis (Table 3). Patients in the highest FABP-4 tertile had a higher OR for the presence of lipodystrophy than those in the middle tertile. The OR for those in the highest tertile remained significant after adjustment for sex, BMI and age.

Relationship between plasma FABP-4 level and metabolic and inflammatory parameters

In the whole HIV-1-infected cohort, bivariate correlation analyses showed significant correlations between circulating FABP-4 level and some clinical and metabolic traits. Correlations were positive with BMI ($P < 0.001$), insulin ($P < 0.001$), HOMA-IR ($P < 0.001$), total cholesterol ($P = 0.013$), LDL cholesterol ($P = 0.040$) and triglycerides ($P < 0.001$), and negative with HDL cholesterol ($P = 0.002$) (Table 4). Regarding immunological and inflammatory parameters, significant positive correlations were observed between plasma FABP-4 level and sTNF-R1 ($P < 0.001$), leptin ($P < 0.001$) and IL-18 ($P = 0.034$) plasma levels (Table 4), while a negative correlation was observed with adiponectin ($P = 0.006$).

When we analysed data for HIV-1-infected patients separately in the LD + and LD – groups, both subsets showed a positive association between FABP-4 plasma level and BMI, fasting insulin and HOMA-IR index (Table 4). In contrast, triglycerides were only positively correlated with FABP-4 in LD + patients ($P = 0.035$). Regarding immunological and inflammatory parameters, only leptin was positively correlated with plasma FABP-4 level in both the LD + and LD – groups. Positive correlations between plasma FABP-4 level and sTNF-R1 ($P = 0.039$), sTNF-R2 ($P < 0.001$) and IL-18 ($P = 0.029$) were also found in the LD + subset (Table 4).

Table 2 Clinical and metabolic characteristics of HIV-1-infected subjects categorized according to the presence of lipodystrophy

Variable	LD – patients (n = 150)	LD + patients (n = 132)	P
Age (years)	40 (36–44)	40 (36–47)	0.206
Gender (% male)	67.9	60.0	0.168
Body mass index (kg/m ²)	22.33 (20.59–24.50)	23.45 (21.64–25.52)	0.01
Waist:hip circumference ratio	0.89 ± 0.09	0.94 ± 0.08	<0.001
Glucose (mmol/L)	5.10 (4.60–5.50)	5.20 (4.70–5.79)	0.129
Insulin (μU/mL)	5.18 (3.61–11.02)	8.61 (5.25–19.27)	<0.001
HOMA-IR	1.27 (0.83–2.41)	1.97 (1.18–4.36)	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.51 (0.90–2.12)	2.25 (1.46–3.80)	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	4.94 ± 1.18	5.47 ± 1.42	0.005
LDL cholesterol (mmol/L)	2.85 ± 1.00	3.29 ± 1.16	0.038
HDL cholesterol (mmol/L)	1.20 (0.99–1.47)	1.00 (0.82–1.30)	<0.001
cART duration (months)	60.82 ± 30	54.11 ± 24.39	0.145
Exposed to NRTIs before cART (%)	34	53	0.059
Ever exposed to NRTIs (%)	94	100	0.003
Cumulative time on NRTIs (months)	99.05 ± 61.25	122.09 ± 52.07	0.001
Cumulative time on d4T (months)	14.18 ± 20.37	34.59 ± 22.00	<0.001
Cumulative time on ZDV (months)	33.0 ± 29.9	26.2 ± 26.0	0.04
Cumulative time on PIs (months)	30.94 ± 29.62	33.28 ± 24.68	0.494
Ever exposed to PIs (%)	74.5	84.0	0.036
Cumulative time on NNRTIs (months)	14.40 ± 17.16	17.23 ± 16.82	0.181
Ever exposed to NNRTIs (%)	68.2	72.0	0.385
CD4 count (cells/μL)			
Nadir	329 ± 270	265 ± 207	0.040
Current	529 ± 316	577 ± 327	0.200
HIV RNA load			
Pre-cART (log ₁₀ copies/mL)	4.6 ± 1.1	4.5 ± 1.4	0.500
Post-cART (log ₁₀ copies/mL)	2.4 ± 1.4	2.2 ± 0.8	0.100
AIDS (categories A3, B3 and C) (%)	35.0	30.3	0.020
Plasma sTNF-R1 (ng/mL)	1.96 (1.56–2.37)	1.96 (1.57–2.58)	0.552
Plasma sTNF-R2 (ng/mL)	5.74 (4.29–7.76)	5.45 (4.29–7.57)	0.983
Plasma IL-6 (pg/mL)	1.65 (1.09–2.78)	1.81 (1.21–2.63)	0.898
Plasma IL-18 (pg/mL)	296.35 (211.00–412.08)	300.24 (235.13–407.74)	0.447
Plasma adiponectin (μg/mL)	14.439 (7.959–20.783)	5.719 (3.045–15.139)	<0.001
Plasma leptin (ng/mL)	4.58 (2.52–7.79)	4.80 (2.09–6.96)	0.008
Plasma FABP-4 (ng/mL)	18.48 (12.68–30.51)	26.00 (13.96–46.62)	0.012

Data are expressed as mean ± standard deviation or median (interquartile range).

Use of other antiretroviral drugs (didanosine, zalcitabine, lamivudine, abacavir, tenofovir, nevirapine, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir and atazanavir) did not differ significantly between groups.

BMI, body mass index; cART, combination antiretroviral therapy; d4T, stavudine; FABP-4, fatty acid binding protein 4; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IL-18, interleukin-18; LD –, HIV-1-infected patients without lipodystrophy; LD +, HIV-1-infected patients with lipodystrophy; LDL, low-density lipoprotein; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; sTNF-R1, soluble tumour necrosis factor receptor 1; sTNF-R2, soluble tumour necrosis factor receptor 2; ZDV, zidovudine.

To investigate whether the degree of insulin resistance was independently associated with FABP-4 level, we developed a stepwise multiple linear regression analysis including HOMA-IR as a dependent variable and serum FABP-4 and other clinical and metabolic variables known to be related to insulin resistance as covariates. FABP-4 was one of the five variables included in the model ($P=0.004$) (Table 5). The variables excluded ($P>0.05$) were sex, BMI, leptin, HDL cholesterol, LDL cholesterol, total cholesterol, triglycerides and adiponectin.

Relationship between FABP-4 plasma level and SAT gene expression

SAT biopsies from 38 HIV-1-infected patients (25 LD + and 13 LD –) were available (Tables 6 and 7). The use of

NRTIs or NNRTIs did not affect the genetic expression profile. The expression of *TNF-R1* and *MCP-1* was lower in patients on PI drugs, but no differences in the genetic expression profile according to the antiretroviral agent used were found when the LD + and LD – groups were considered separately (data not shown). LD + patients showed higher levels of *CD68* ($P<0.001$), *TNF-R1* ($P=0.029$) and *TNF-R2* ($P=0.044$) than LD – patients. Moreover, *CD68* and *MCP-1* gene expression showed a positive correlation with circulating FABP-4 level ($P=0.022$ and $P=0.046$, respectively) while *PPAR-γ* expression showed a negative correlation with circulating FABP-4 level in the HIV-1-infected group as a whole. When analyses of these relationships were carried out separately in the LD + and LD – groups, FABP-4 remained

Table 3 Odds ratios (ORs) for the presence of lipodystrophy according to fatty acid binding protein 4 (FABP-4) level categorized in tertiles

OR (95% CI)			
	Tertile 1 (3.50–15.53)	Tertile 2 (15.54–30.88)	Tertile 3 (30.89–203.77)
Model 1	1	1 (0.541–1.848)	2.917 (1.581–5.380)
Model 2	1	0.838 (0.435–1.616)	2.281 (1.163–4.475)

Model 1 is unadjusted; model 2 is model 1, plus correction for age, sex and body mass index. Values in brackets indicate FABP-4 concentration. CI, confidence interval.

Table 4 Correlations between fatty acid binding protein 4 (FABP-4) plasma level and clinical and metabolic parameters in HIV-1-infected patients

	All HIV-infected patients					
	patients (n = 282)		LD + patients (n = 132)		LD – patients (n = 150)	
	r	P	r	P	r	P
Age	0.115	0.070	0.146	0.119	0.068	0.436
BMI	0.284	<0.001	0.321	<0.001	0.189	0.044
Insulin	0.341	<0.001	0.232	0.014	0.388	<0.001
HOMA-IR	0.362	<0.001	0.282	0.002	0.371	<0.001
Cholesterol	0.156	0.013	–0.012	0.892	0.192	0.020
HDL cholesterol	–0.197	0.002	–0.121	0.162	–0.206	0.027
LDL cholesterol	0.134	0.040	0.111	0.269	0.111	0.206
Triglycerides	0.219	<0.001	0.198	0.035	0.155	0.073
cART duration (months)	–0.006	0.948	0.005	0.965	0.009	0.945
Time on PIs (months)	–0.036	0.566	–0.086	0.354	–0.011	0.900
Time on NRTIs (months)	0.083	0.178	0.032	0.731	0.065	0.441
Time on NNRTIs	0.173	0.005	0.078	0.401	0.246	0.003
Plasma sTNF-R1	0.232	<0.001	0.312	0.039	0.164	0.059
Plasma sTNF-R2	0.123	0.052	0.340	<0.001	–0.063	0.467
Plasma adiponectin	–0.170	0.006	–0.124	0.181	–0.092	0.271
Plasma leptin	0.306	<0.001	0.319	0.001	0.382	<0.001
Plasma IL-6	0.105	0.088	0.164	0.075	0.063	0.611
Plasma IL-18	0.135	0.034	0.204	0.029	0.062	0.480

BMI, body mass index; cART, combination antiretroviral therapy; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IL-18, interleukin-18, LDL, low-density lipoprotein; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; sTNF-R1, soluble tumour necrosis factor receptor 1; sTNF-R2, soluble tumour necrosis factor receptor 2.

positively correlated only with *CD68* expression in the LD + group ($P = 0.031$). No other significant correlations with FABP-4 plasma level were observed.

Discussion

This study provides some meaningful insights into the involvement of FABP-4 in cART-related lipodystrophy in HIV-1-infected patients. We observed systemic overproduction of FABP-4 in cART-treated HIV-1-infected patients with lipodystrophy and found that those with a plasma

Table 5 Stepwise multiple linear regression analysis of the relationship between the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index* and the fatty acid binding protein 4 (FABP-4) concentration and clinical, inflammatory and metabolic parameters

Independent variables	Beta	t	P
Waist:hip ratio	0.249	3.142	0.002
Plasma FABP-4*	0.236	2.903	0.004
Plasma sTNF-R1	–0.231	–2.936	0.004
Lipodystrophy	0.190	2.412	0.017
Plasma IL-18	0.150	1.981	0.050

R^2 : 0.257.

IL-18, interleukin-18; sTNF-R1, soluble tumour necrosis factor receptor 1.

*Log-transformed.

Table 6 Subcutaneous adipose tissue gene expression of some inflammatory markers

mRNA expression	LD + patients	LD – patients	P
<i>CD68</i>	0.154 ± 0.076	0.080 ± 0.24	<0.001
<i>TNF-α</i>	0.145 (0.099–0.221)	0.112 (0.058–0.201)	0.533
<i>TNF-R1*</i>	1.776 ± 1.166	2.731 ± 1.347	0.029
<i>TNF-R2*</i>	1.740 ± 1.204	2.701 ± 1.575	0.044
<i>MCP-1†</i>	2.189 (1.132–3.195)	1.377 (1.098–1.886)	0.311
<i>PPAR-γ</i>	0.462 (0.416–0.764)	0.668 (0.450–0.761)	0.270

Data are expressed as mean ± standard deviation for normally distributed variables or median (interquartile range) for variables with a skewed distribution.

LD, lipodystrophy; *MCP-1*, monocyte chemoattractant protein 1; *PPAR-γ*, peroxisome proliferator activated receptor gamma; *sTNF-R1*, soluble tumour necrosis factor receptor 1; *sTNF-R2*, soluble tumour necrosis factor receptor 2.

*Multiplied by 10^{-3} .

†Multiplied by 10^{-2} .

Table 7 Correlations between fatty acid binding protein 4 (FABP-4) plasma level and subcutaneous adipose tissue (SAT) mRNA expression

	All HIV-1-infected patients		LD + patients		LD – patients	
	r	P	r	P	r	P
<i>CD68</i>	0.423	0.022	0.525	0.031	0.098	0.762
<i>TNF-α</i>	0.163	0.397	0.279	0.248	0.098	0.762
<i>TNF-R1</i>	–0.042	0.827	–0.373	0.141	0.346	0.247
<i>TNF-R2</i>	–0.306	0.100	–0.309	0.228	0.286	0.334
<i>MCP-1</i>	0.367	0.046	0.390	0.122	0.027	0.929
<i>PPAR-γ</i>	–0.233	0.227	–0.522	0.032	–0.236	0.437

MCP-1, macrophage chemoattractant protein 1; *PPAR-γ*, peroxisome proliferator activated receptor gamma; *TNF-α*, tumour necrosis factor alpha; *TNF-R1*, tumour necrosis factor alpha receptor 1; *TNF-R2*, tumour necrosis factor alpha receptor 2.

FABP-4 level in the highest tertile had a higher prevalence of lipodystrophy. Furthermore, we found that FABP-4 was one of the major determinants of the degree of insulin resistance in HIV-1-infected patients, and this association

was independent of body fat distribution. We also observed a close relationship between FABP-4 and inflammatory markers both in plasma and in SAT.

The biological role of circulating FABP-4 is not well understood, but the association observed between serum FABP-4 level and the development of atherosclerosis, metabolic syndrome and type 2 diabetes suggests that plasma FABP-4 levels may parallel its tissue expression and activity. In our HIV-1-infected cohort, FABP-4 levels were similar to those observed in the control group, despite the difference between the groups in BMI, suggesting that other inflammatory factors could play a role in the regulation of this protein in this population. The observed increase in circulating FABP-4 levels in LD + HIV-1-infected subjects is consistent with some previous reports in which this protein was evaluated in the context of HIV-1 infection. Similar to our results, Coll and colleagues reported that the level of circulating FABP-4 was higher in HIV-1-infected patients with lipodystrophy compared with nonlipodystrophic subjects, and was closely correlated with BMI and insulin level [12]. However, in that study no measurements of inflammatory parameters or insulin resistance were made. In our cohort, findings for HIV-1-infected patients were similar to those for the uninfected group, and the plasma FABP-4 level was clearly associated with BMI, HOMA-IR index, inflammatory markers and dyslipidaemia. Regarding insulin sensitivity, in an analysis of the variables associated with the HOMA-IR index, we found that FABP-4 level was one of the variables most strongly associated with insulin sensitivity, irrespective of the presence or absence of lipodystrophy. Interestingly, significant associations between FABP-4 plasma level and inflammatory markers expressed in adipose tissue were found mainly in LD + patients. Both sTNF-R1 and sTNF-R2, surrogate markers for TNF- α activity, were higher in LD + patients. These findings are in agreement with previous reports in which increased levels of IL-6 were found in this subset of patients [19].

As FABP-4 has been suggested to be an adipocytokine involved in the cross-talk between adipocytes and macrophages, we investigated whether there was any relationship between FABP-4 serum level and the expression of markers of inflammation and macrophage infiltration in SAT biopsies obtained from patients with and without lipodystrophy. Up-regulation of *CD68* gene expression, a macrophage marker, was found in LD + patients, indicating an inflammatory local environment in SAT. Interestingly, *CD68* expression was found to be closely associated with the level of circulating FABP-4 only in LD + HIV-1-infected patients. Taken together, these results indicate a more aggressive inflammatory pattern both at the paracrine and at the systemic level in the context of

HIV-1-associated lipodystrophy. It is difficult to extrapolate the local data obtained in adipose tissue to the systemic inflammatory profile, but this relationship is particularly relevant in LD + patients. In agreement with previous reports [12], in our HIV-1-infected cohort, FABP-4 was found to be closely associated with lipodystrophy, independently of BMI, sex and age. Although we cannot discount the possibility that exposure to PIs and NRTIs could contribute to the high FABP-4 levels observed in the LD + group, results of previous experiments on the effects of PIs and NRTIs indicate that they block adipocyte differentiation. It was found that PIs interfere with adipocyte differentiation whereas NRTIs decrease *PPAR- γ* expression in adipose tissue. Both *PPAR- γ* and FABP-4 mRNA expression in adipose tissue increased in both NRTI-exposed and non-exposed after rosiglitazone treatment [20]. These observations argue against a direct effect of these treatments on FABP-4 expression via *PPAR- γ* in HIV-1-infected LD + patients, or at least against an effect with significant systemic repercussions for circulating plasma levels. Consistent with this conclusion, we observed that LD + patients were more frequently treated with PIs and NRTIs than LD – subjects, but FABP-4 levels were similar when the groups were compared according to NRTI and PI treatment (data not shown). In contrast, similar proportions of patients were treated with NNRTIs in the two groups, but in both cases FABP-4 levels were higher in patients treated with NNRTIs than in other patients in the same group. The absence of relationship of any of the antiretroviral drugs with FABP-4 levels in the Coll *et al.* study also argues against an important effect of cART on FABP-4 levels [12].

FABP-4 plasma levels were closely related to adipose tissue expression of *CD68* and *MCP-1* in HIV-1-infected patients, but when the LD + and LD – groups were considered separately the association with *CD68* expression was found only in the LD + subset of patients, suggesting that intense macrophage infiltration is associated with lipodystrophy.

This study has limitations. First, the cross-sectional nature of our study design (and hence the single measurement of FABP-4 in the study) means that our results provide information about associations but not causality. Secondly, we defined lipodystrophy clinically and cannot discount the possibility that some patients in the LD – group could have had minor subclinical changes that were not clinically detectable. However, we believe that this is unlikely because our cohort comprised patients with extreme phenotypes. Finally, we do not have the FABP-4 mRNA expression levels in SAT and this may have limited the interpretation of data on inflammatory markers in this tissue. Investigation of FABP-4 expression in adipose tissue from patients with lipodystrophy may prove

beneficial in the development of possible therapeutic options.

FABP-4 has been suggested as a potential therapeutic target for patients with type 2 diabetes, obesity and atherosclerosis [21]. It has been observed that patients with the genetic variant of the *FABP-4* gene (T-87C) associated with reduced transcriptional activity of the gene and diminished *FABP-4* expression in adipose tissue have lower triglyceride levels and a reduced risk of developing obesity and type 2 diabetes [21]. Recently, investigation of pharmacological agents that inhibit FABP-4 function in experimental models has yielded promising results [10], but further studies are needed to determine whether such agents may be of benefit in LD + patients.

In summary, our data suggest involvement of the FABP-4 system in cART-related lipodystrophy in HIV-1-infected patients who have increased systemic FABP-4 production, and that this increased FABP-4 production is probably related to macrophage adipose tissue gene expression. A close relationship between insulin resistance and FABP-4 level was found in the HIV-1-infected cohort, suggesting that FABP-4 may play a role in the carbohydrate metabolism disturbances observed in these patients. We propose that FABP-4 may influence both systemic and local inflammatory responses in HIV-1-infected patients with cART-associated lipodystrophy.

Acknowledgements

This work was partially financed by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (07/0976, 08/1032, 08/1195, 08/1715 and 10/2635); Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (FEDER); Fundación para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE 06/36572, 06/36610 and 36-0998-10); Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-02278); Programa de suport als Grups de Recerca AGAUR (2009 SGR 284, 959, 1061 and 1257); Red de Investigación en Sida (RIS, RD06/006/0022 and RD06/0006/1004); and the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. XE is supported by a fellowship from the JdIC programme and grant JDCI20071020. CIBERdem and CIBERobn are ISCIII projects. The comments and critiques of the anonymous reviewers helped us to improve the manuscript and are greatly appreciated.

Appendix

The members of the HIV Lipodystrophy Study Group and co-authors of this paper are: Verónica Alba, Alba Aguilar, Teresa Auguet, Matilde R. Chacón, Xavier Escoté, Miguel López-Dupla, Anna Megia, Merce Miranda, Carles Olona,

Montserrat Olona, Joaquim Peraire, Cristóbal Richart, Amadeu Saurí, Joan-Josep Sirvent, Montserrat Vargas, Ignacio Velasco, Sergi Veloso, Joan Vendrell, Vicente Vicente, Francesc Vidal, Consuelo Viladés (Hospital Universitari Joan XXIII, IISPV and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain), Carlos Alonso-Villaverde, Gerard Aragónés, Antoni Castro, Pedro Pardo, Sandra Parra (Hospital Universitari de Sant Joan, IISPV and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain), Pere Domingo, Àngels Fontanet, Mar Gutiérrez, Gràcia Mateo, Jessica Muñoz, M^a Antònia Sambeat (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain), Rubén Cereijo, Julieta Díaz-Delfín, José-Miguel Gallego-Escuredo, Marta Giralt, Joan Villarroya and Francesc Villarroya (Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

References

- 1 Carr A, Samaras K, Thorisdottir A *et al.* Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease inhibitor associated lipodystrophy, hyperlipidemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999; **353**: 2093–2099.
- 2 Mallon PW, Wand H, Law M *et al.* Buffalo hump seen in HIV-1-associated lipodystrophy is associated with hyperinsulinemia but not dyslipidemia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; **38**: 156–162.
- 3 Friis-Møller N, Sabin CA, Weber R *et al.* Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1993–2003.
- 4 Johnson JA, Albu JB, Engelson ES *et al.* Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-1-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **286**: E261–E271.
- 5 Samaras K, Gan SK, Peake PW *et al.* Proinflammatory markers, insulin sensitivity, and cardiometabolic risk factors in treated HIV-1 infection. *Obesity* 2009; **17**: 53–59.
- 6 Saumoy M, López-Dupla M, Veloso S *et al.* The IL-6 system in HIV-1 infection and in HAART related fat distribution syndromes. *AIDS* 2008; **22**: 893–895.
- 7 Coe NR, Bernlohr DA. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1391**: 287–306.
- 8 Hertzel AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**: 175–180.
- 9 Xu A, Wang Y, Xu JY *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006; **52**: 405–413.
- 10 Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**: 489–503.

- 11 Xu A, Tso AW, Cheung BM *et al.* Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007; **115**: 1537–1543.
- 12 Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C *et al.* The fatty acid binding protein-4 (FABP-4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-1-infected patients. *Atherosclerosis* 2008; **199**: 147–153.
- 13 Michal JJ, Zhang ZW, Gaskins CT *et al.* The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu × Limousin F2 crosses. *Anim Genet* 2006; **37**: 400–402.
- 14 Domingo P, Vidal F, Domingo JC *et al.* Tumor 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* 2005; **35**: 771–780.
- 15 Christeff N, Melchior JC, de Truchis P *et al.* Lipodystrophy defined by a clinical score in HIV-infected men on highly active antiretroviral therapy: correlation between dyslipidaemia and steroid hormone alterations. *AIDS* 1999; **13**: 2251–2260.
- 16 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**: 499–502.
- 17 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–419.
- 18 Auguet T, Vidal F, López-Dupla M *et al.* A study on the TNF-alpha system in Caucasian Spanish patients with alcoholic liver disease. *Drug Alcohol Depend* 2008; **92**: 91–99.
- 19 Kannisto K, Sutinen J, Korshennikova E *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* 2003; **17**: 1753–1762.
- 20 Mallon PWG, Sedwell R, Rogers G *et al.* Effect of Rosiglitazone on Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ gene expression in human adipose tissue is limited by antiretroviral drug-induced mitochondrial dysfunction. *J Infect Dis* 2008; **198**: 1794–1803.
- 21 Tuncman G, Erbay E, Horn X *et al.* A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for the hypertriglyceridemia, type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Proc Nat Acad Sci* 2006; **103**: 6970–6975.

Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion.

Revista: *Journal of Hepatology*

PMID: 23968888

Títol: La resistina i la visfatina en fetges amb i sense esteatosi en el context de la hepatectomia parcial sota reperfusió isquèmica.

Resum: Es va examinar si la regulació dels nivells de resistina i de visfatina podria reduir el dany i millorar la regeneració tant en fetges amb i sense esteatosi en processos d'hepatectomia parcial sota reperfusió isquèmica, un procediment aplicat sovint per a reduir l'hemorràgia. Els nivells de resistina i visfatina foren modulats farmacològicament en animals primis i obesos als quals s'hi havia aplicat aquest procediment. No es va poder observar cap paper evident per a aquestes adipocitocines en fetges sense esteatosi. No obstant, els animals obesos sotmesos a cirurgia hepàtica presentaren nivells de resistina plasmàtica més elevats sense canvis en el seu teixit adipós, a més d'una reducció en l'expressió de la visfatina al fetge i un increment al teixit adipós i als nivells plasmàtics. La resistina endògena contribueix a mantenir uns nivells baixos de visfatina al fetge tot bloquejant-ne la recaptació hepàtica des de la circulació, regulant així els efectes negatius de la visfatina sobre el dany hepàtic i la reducció en la seva regeneració. Coherentment, l'administració d'anticossos anti-resistina augmentà l'acumulació hepàtica de visfatina produïda pels adipòcits, tot exacerbant-ne el dany tissular i la reducció regenerativa. Resultà interessant que el tractament amb anticossos anti-visfatina va protegir els fetges amb esteatosi, i es van obtenir resultats similars amb la inhibició simultània de totes dues adipocines. Així doncs, en inhibir la visfatina, els efectes perniciosos dels anticossos anti-resistina van desaparèixer. Al present article es mostra que la regulació a l'alça de la visfatina augmentà els nivells de NAD en la resta dels fetges amb esteatosi, mentre que la inhibició de la mateixa els reduí. Aquestes últimes observacions suggereixen que la visfatina podria afavorir la síntesi de NAD en lloc de DNA i que induiria una alteració en el metabolisme d'aminoàcids pel cicle de la urea i en la producció d'òxid nítric, afectant en conjunt de forma negativa la viabilitat hepàtica. El potencial clínic de les teràpies basades en el bloqueig de l'acció de la visfatina sobre fetges amb esteatosi que són sotmesos a una hepatectomia parcial sota reperfusió isquèmica queda de manifest en aquest estudi.

Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion

Maria Elias-Miró^{1,†}, Mariana Mendes-Braz^{1,2,†}, Ruben Cereijo³, Francesc Villarroya³, Mónica B. Jiménez-Castro¹, Jordi Gracia-Sancho⁴, Sergi Guixé-Muntet⁴, Marta Massip-Salcedo¹, Joan Carles Domingo⁵, Raquel Bermudo⁶, Juan Rodés^{1,7}, Carmen Peralta^{1,*}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain; ²Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil; ³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, i Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, CIBER Fisopatologia de la Obesidad y Nutrición, Spain; ⁴Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Spain; ⁶Tumour Bank, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁷Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Background & Aims: This study examined whether the regulation of resistin and visfatin could reduce damage and improve regeneration in both steatotic and non-steatotic livers undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion, a procedure commonly applied in clinical practice to reduce bleeding.

Methods: Resistin and visfatin were pharmacologically modulated in lean and obese animals undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion.

Results: No evident role for these adipocytokines was observed in non-steatotic livers. However, obese animals undergoing liver surgery showed increased resistin in liver and plasma, without changes in adipose tissue, together with visfatin downregulation in liver and increment in plasma and adipose tissue. Endogenous resistin maintains low levels of visfatin in the liver by blocking its hepatic uptake from the circulation, thus regulating the visfatin detrimental effects on hepatic damage and regenerative failure. Indeed, the administration of anti-resistin antibodies increased hepatic accumulation of adipocyte-derived visfatin, exacerbating damage and regenerative failure. Interestingly, treatment with

anti-visfatin antibodies protected steatotic livers, and similar results were obtained with the concomitant inhibition of resistin and visfatin. Thus, when visfatin was inhibited, the injurious effects of anti-resistin antibodies disappeared. Herein we show that upregulation of visfatin increased NAD levels in the remnant steatotic liver, whereas visfatin inhibition decreased them. These later observations suggest that visfatin may favour synthesis of NAD instead of DNA and induces alterations in amino acid metabolism-urea cycle and NO production, overall negatively affecting liver viability.

Conclusions: Our results indicate the clinical potential of visfatin blocking-based therapies in steatotic livers undergoing partial hepatectomy with ischemia-reperfusion.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

In clinical situations, partial hepatectomy (PH) under ischemia-reperfusion (I/R) is usually performed to control bleeding during parenchymal dissection [1]. More than 20% of patients coming to liver resection have some degree of steatosis, usually related to obesity [2,3]. Hepatic steatosis is a major risk factor for liver surgery since it is associated with an increased complication index and postoperative mortality after major liver resection [4].

Under pathological conditions, adipose tissue has appeared as a highly active endocrine gland, secreting adipocytokines such as resistin and visfatin [5]. However, resistin and visfatin are also expressed in liver under obesity conditions and during fibrosis [6,7].

Increased levels of resistin have been reported in patients with cirrhosis, correlating with the severity of the disease [5,8]. Opposite effects of resistin on myocardial injury have been reported [9].

Visfatin, also known as nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt), is critical for the synthesis of nicotinamide adenine

Keywords: Liver surgery; Hepatic steatosis; Regeneration; Resection; Adipocytokines; Ischemia-reperfusion.

Received 27 March 2013; received in revised form 28 June 2013; accepted 18 July 2013

* Corresponding author. Address: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4177; fax: +34 933129406.

E-mail address: cperalta@clinic.ub.es (C. Peralta).

† These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: PH, partial hepatectomy; I/R, ischemia-reperfusion; Nampt, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; Ob, obese; Ln, lean; BrdU, bromodeoxyuridine; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HGF, hepatocyte growth factor; TGF, transforming growth factor; MPO, myeloperoxidase; MDA, malondialdehyde; LDL, Low-density lipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; GDH, glutamate dehydrogenase; CPT2, carnitine palmytoil transferase-2; MCAD, medium chain acyl-CoA dehydrogenase; FGF21, fibroblast growth factor-21; SOD2, superoxide dismutase-2; GPX1, glutathione peroxidase-1; SCD1, stearoyl-CoA desaturase-1; FAS, fatty acid synthase; COXI, cytochrome c oxidase subunit I; COXIV, cytochrome c oxidase subunit IV.



ELSEVIER

Journal of Hepatology 2013 vol. xxx | xxx-xxx

Research Article

dinucleotide (NAD) [10]. Interestingly, a potential role for visfatin in the pathogenesis and progression of non-alcoholic fatty liver disease has been reported [11]. Circulating visfatin levels are increased in inflammatory disorders [12] and its inhibition decreases several pro-inflammatory cytokines in cultured cells and during endotoxemia [13]. However, there are conflicting results regarding the role of visfatin since other reports indicate that elevated levels of visfatin in obesity have hepatoprotective effects [14], or even are not associated with inflammation [15]. Moreover, it is unclear if visfatin exerts its actions through the modulation of pro-inflammatory cytokine and/or its NAD biosynthetic activity [16,17].

Considering the current knowledge, we herein examined the generation of resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers undergoing PH under I/R. We also characterized adipose tissue as predominant source of both adipocytokines in PH under I/R. Finally, we investigated whether modulating resistin and/or visfatin could protect steatotic and non-steatotic livers against damage and regenerative failure following PH under I/R.

Materials and methods

Experimental animals

Male homozygous obese (*Ob*) (400–450 g) and heterozygous lean (*Ln*) Zucker rats (350–400 g) and male Wistar rats (200–220 g), fed with a choline-deficient or standard chow diet for 10 days [18], were used. *Ob* Zucker and *Ob* Wistar rats showed severe macrovesicular and microvesicular fatty infiltration in hepatocytes (60–70% steatosis). All procedures were performed under isoflurane anesthesia. This study complied with European Union regulations on animal experiments.

Surgical procedure

The experiments in this study employed experimental models of partial (70%) hepatectomy with or without 60 min of ischemia, as well as 60 min of ischemia without hepatectomy [4,19]. Samples were collected 24 h after completion of the surgical procedure. The experimental groups based on the pharmacological modulation of visfatin and/or resistin, and the different biochemical and molecular analyses are described in [Supplementary Materials and methods](#).

Results

Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

In *Ln* Zucker animals, resistin and visfatin levels in liver, plasma and adipose tissue of the PH + I/R group were similar to those found in the Sham group (Fig. 1A). This is consistent with the finding that pharmacological modulation of either resistin or visfatin (administering these adipocytokines separately or using antibodies against each cytokine) in *Ln* animals undergoing PH + I/R did not induce changes in either hepatic damage or liver regeneration parameters (data not shown).

In *Ob* Zucker animals, plasmatic and hepatic resistin mRNA and protein levels of the PH + I/R group were higher than in the Sham group (Fig. 1A), whereas resistin levels in adipose tissue were unmodified. In addition, a reduction in visfatin mRNA and protein levels was observed in steatotic livers of the PH + I/R group compared with sham, whereas visfatin levels in plasma and adipose tissue were increased.

Relevance of resistin and visfatin on hepatic damage and regenerative failure in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

Administration of anti-resistin antibodies (PH + I/R + anti-resistin group) resulted in hepatic damage exacerbation, an increase in transaminase levels, damage score values and the extension of necrosis areas compared with the PH + I/R group (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1A](#)). The number of Ki-67-positive hepatocytes (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1B](#)), BrdU-positive hepatocytes (Fig. 1B) and mitotic index (data not shown) in the PH + I/R + anti-resistin group were significantly lower than in the PH + I/R group. This decrease in proliferative cells was associated with low HGF and high levels of active TGF- β (Fig. 1B).

Administration of anti-visfatin antibodies (PH + I/R + anti-visfatin group) protected steatotic livers as indicated by the reduction in transaminases, number and extent of necrotic areas and damage score values compared with the PH + I/R group (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1A](#)). PH + I/R + anti-visfatin increased percentages of Ki-67-positive hepatocytes and BrdU-positive hepatocytes (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1B](#)) and mitotic index (data not shown) in steatotic livers compared with the PH + I/R group. This improvement was associated with high HGF and low TGF- β levels.

Relation between resistin and visfatin in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

Fig. 1C shows that endogenous resistin does not modify the hepatic generation of visfatin but prevents its accumulation in the liver from the circulation. Indeed, anti-resistin antibody administration (PH + I/R + anti-resistin group) did not induce changes in the hepatic mRNA levels of visfatin but increased protein levels of visfatin in steatotic livers. Visfatin accumulation was associated with a decrease in visfatin levels in both adipose tissue and plasma compared with the PH + I/R group (Fig. 1C). Removal of adipose tissue in *Ob* animals by surgical interventions (PH + I/R + LPT group) resulted in diminished visfatin levels in plasma compared with the PH + I/R group. In addition, visfatin accumulation in steatotic livers after resistin antibody administration (PH + I/R + anti-resistin group) was not observed when adipose tissue was removed (PH + I/R + LPT + anti-resistin group). Analysis of intrahepatic localization of visfatin demonstrated that it is mainly expressed in hepatocytes, whereas non-apparent immunoreactivity for visfatin was confined to sinusoids and hepatic vessels ([Supplementary Fig. 2](#)). Visfatin staining was less evident in steatotic livers of the PH + I/R group compared with the Sham group. However, a more robust visfatin expression in hepatocytes was observed in steatotic livers of PH + I/R + anti-resistin and PH + I/R + visfatin groups when compared with the Sham of PH + I/R groups. Moreover, visfatin was mainly accumulated in hepatocytes of sham-operated *Ob* livers after visfatin administration (data not shown).

Effects of visfatin accumulation on damage and regeneration in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

Exogenous visfatin was administered to achieve hepatic visfatin protein levels comparable to the PH + I/R + anti-resistin group. Visfatin administration (PH + I/R + visfatin group) significantly exacerbated hepatic injury compared with the PH + I/R group

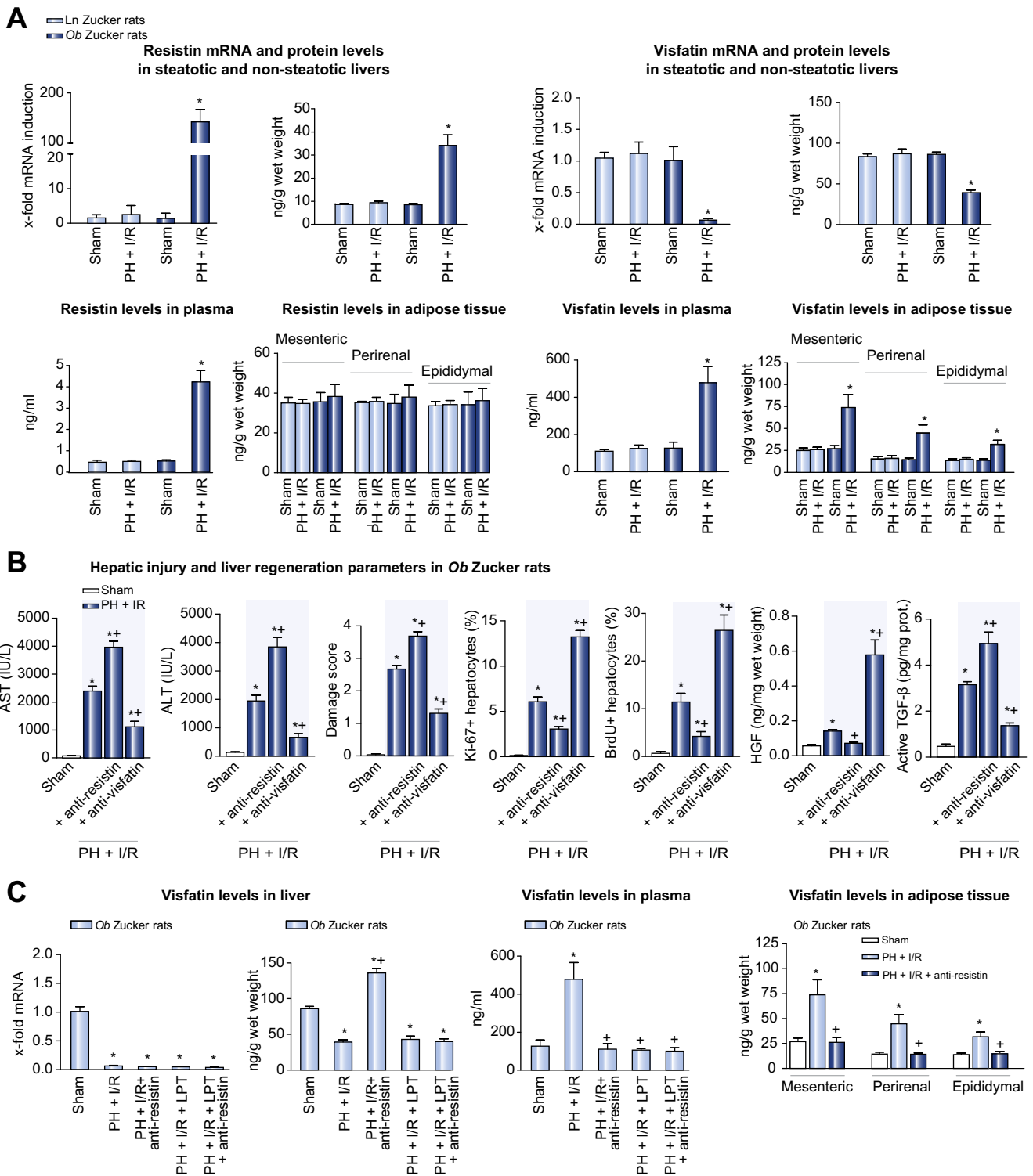


Fig. 1. Resistin and visfatin in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH + I/R. (A) Resistin and visfatin levels in liver, plasma and mesenteric, perirenal and epididymal adipose tissue, (B) hepatic injury and regeneration and (C) visfatin levels after lipectomy of adipose tissue. Six Ln and six Ob animals from each group in each measurement. * $p < 0.05$ vs. sham; ** $p < 0.05$ vs. PH + I/R.

(Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A). The number of Ki-67-positive hepatocytes, BrdU-positive hepatocytes (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1B) and the mitotic index (data not shown) were

lower in the PH + I/R + visfatin group than in the PH + I/R group. This decrease in proliferative cells was associated with low HGF and high TGF- β (Fig. 2A). The pernicious role of visfatin on liver

Research Article

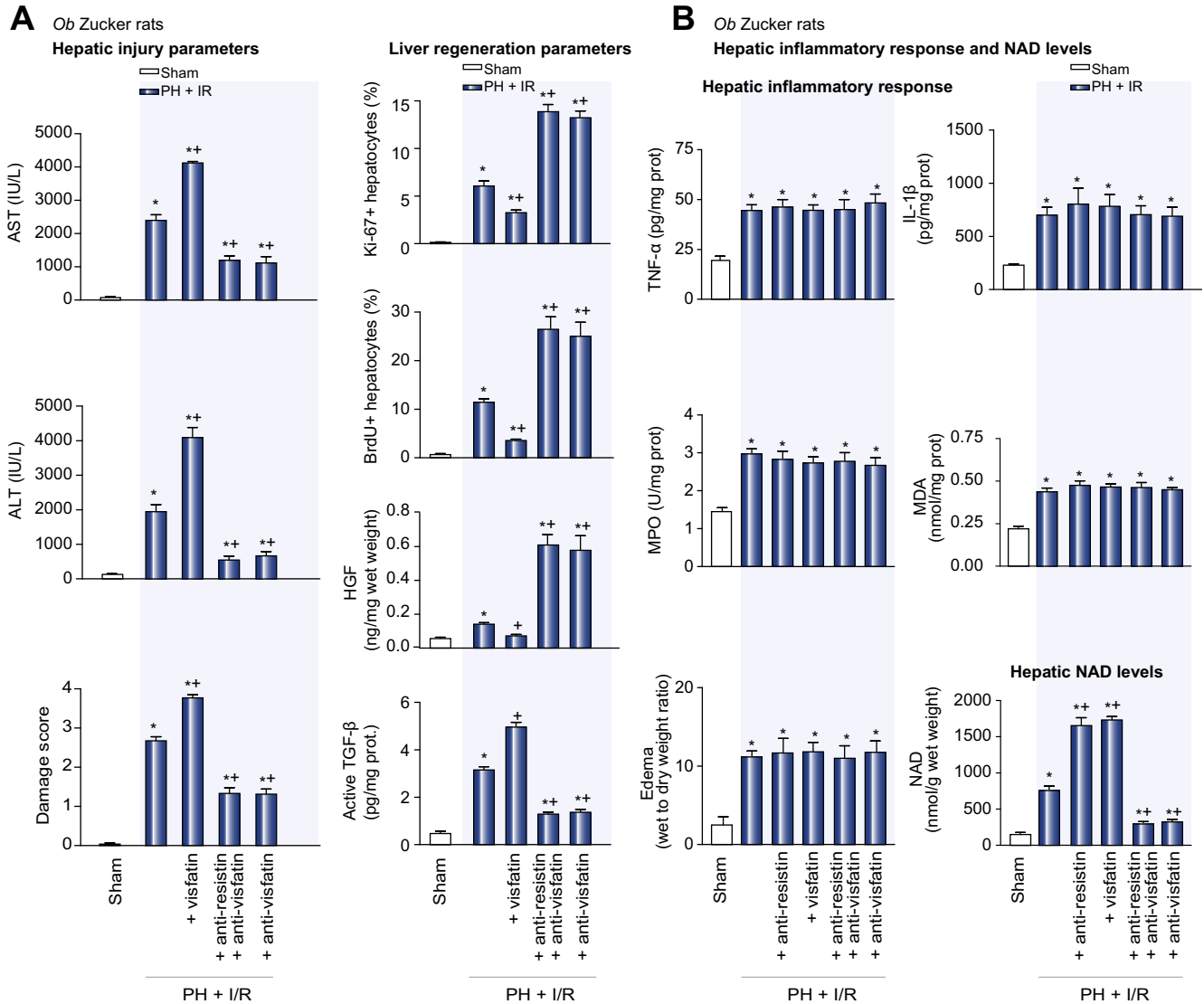


Fig. 2. Effects of visfatin inhibition induced by resistin on hepatic injury, regeneration, inflammatory response and NAD levels in *Ob* Zucker rats undergoing PH + I/R. (A) Hepatic injury and regeneration and (B) hepatic inflammatory response and NAD levels. Six *Ob* animals from each group were included for each measurement. * $p < 0.05$ vs. sham; ** $p < 0.05$ vs. PH + I/R.

viability after PH + I/R was further analysed studying liver injury and regeneration in a group of animals with elevated hepatic visfatin but inhibited visfatin-downstream pathway (PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin group). Interestingly, livers from these animals showed a significant amelioration of liver injury and regeneration in comparison to livers with normally functioning visfatin pathway (PH + I/R group). Indeed, no differences in transaminases, damage score values (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A), percentage of Ki-67-positive hepatocytes, percentage of BrdU-positive hepatocytes, or growth factor levels (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1B) were observed when comparing PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin and PH + I/R + anti-visfatin groups. Exogenous administration of resistin, aimed at reducing intrahepatic visfatin accumulation, did not effectively modify hepatic visfatin mRNA or protein levels compared to the PH + I/R group (data not shown). Thus, in terms of good surgical

outcomes, the conditions required to protect steatotic livers against visfatin-derived damage and regenerative failure are determined by inhibition of the hepatic visfatin pathway using antibody therapy against this cytokine.

Underlying mechanisms of visfatin in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

We next attempted to identify, which activity of visfatin – pro-inflammatory cytokine synthesis-like activity and/or NAD biosynthetic activity – is responsible for the injurious effects of visfatin on damage and regenerative failure of steatotic livers undergoing PH + I/R. The involvement of TNF- α and IL-1 β in the inflammatory response induced by visfatin [13] and that associated with liver I/R [20] is well known. As expected, PH + I/R resulted in elevation of hepatic TNF-A and IL-1B neutrophil

accumulation, oxidative stress and edema formation in comparison to the Sham group (Fig. 2B). Interestingly, those animals with increased visfatin concentration within the liver (PH + I/R + visfatin and PH + I/R + anti-resistin groups) did not show further increments in TNF- α , IL-1 β , MPO and MDA levels nor in edema formation in comparison to the PH + I/R group. Similarly, when hepatic visfatin action was inhibited (PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin groups) the inflammatory parameters were similar to those of the PH + I/R group (Fig. 2B). No modifications in inflammatory markers were found analyzing earlier times (6 and 12 h after completion of the surgical procedure) (Supplementary Fig. 3).

However, we herein show a correlation between visfatin and NAD levels in steatotic livers undergoing PH + I/R. In fact, the administration of either visfatin (PH + I/R + visfatin group) or antibodies against resistin (PH + I/R + anti-resistin group), which upregulated visfatin levels, increased hepatic NAD levels in comparison to the PH + I/R group (Fig. 2B). Moreover, when visfatin action was inhibited (PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin groups), NAD levels in steatotic livers were also reduced. No upregulation of NAD levels was observed in Ln animals undergoing PH + I/R after visfatin administration (data not shown).

Effects of pharmacological modulation of visfatin on lipid metabolism, protein metabolism and mitochondria dysfunction in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

As previously described [21], hepatic accumulation of fatty droplets and triglyceride levels were observed in the PH + I/R group vs. the Sham group (Fig. 3A and C), which was not observed in animals without adipose tissue (PH + I/R + LPT group) (data not shown). The pharmacological modulation of visfatin in *Ob* animals undergoing liver surgery did not induce changes in the parameters of lipid metabolism. Indeed, PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups resulted in hepatocellular fatty infiltration and hepatic triglyceride levels similar to those of the PH + I/R group. Plasma LDL, VLDL, HDL, fatty acids and total cholesterol levels followed a similar pattern to that described for triglycerides (data not shown). In addition, compared with the PH + I/R group, the expression of critical regulators for lipid catabolism, mitochondrial fatty acid oxidation (CPT2, MCAD and FGF21) and fatty acid synthesis (SCD1 and FAS) in steatotic livers of the PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups was unaltered (Fig. 3A). Moreover, the pharmacological modulation of either resistin or visfatin in sham-operated *Ob* Zucker rats did not induce changes in either hepatic damage, regeneration parameters or lipid metabolism (data not shown).

PH + I/R affected mitochondrial function in steatotic livers, as evidenced by the reduction in cytochrome c oxidase activity and ATP levels, and the increase in cytosolic cytochrome c and caspase 8 activity levels when compared with the Sham group (Fig. 3B). Liver surgery affected mainly *Cox4* mRNA expression whereas no changes in *Cox1* mRNA were detected (data not shown). All these changes in mitochondrial parameters were unmodified after pharmacological modulation of visfatin (PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups). Regarding mitochondrial redox status, PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin did not modify either *GPX1* mRNA expression or mitochondrial MDA levels in steatotic livers when compared with the PH + I/R group (Fig. 3B). Similar results were observed

analyzing *SOD2* mRNA levels (data not shown). On the other hand, alterations in amino acid metabolism in steatotic livers were observed after pharmacological modulation of visfatin. Indeed, high levels of both total free essential and non-essential amino acids were observed in plasma of PH + I/R, PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin when compared with the Sham group (Fig. 4A). Interestingly, lower and higher free arginine levels were observed in PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups respectively, when compared with the PH + I/R group. Arginine is involved in urea cycle (detoxification of ammonia to produce urea) and NO production [22]. Further analysis revealed that PH + I/R + anti-visfatin reduced GDH activity (a NAD-dependent enzyme), α -ketoglutarate, NH_4^+ , urea levels and NO production in steatotic livers when compared with the PH + I/R (Fig. 4B and C). Conversely, PH + I/R + visfatin increased GDH activity, α -ketoglutarate and NH_4^+ levels in steatotic livers when compared with the PH + I/R, which was associated with increased urea levels and NO production (Fig. 4C).

Effects of pharmacological modulation of resistin and visfatin in steatotic livers from Zucker rats undergoing either PH or I/R

In PH and I/R groups, resistin and visfatin levels in liver, plasma and adipose tissue of *Ob* animals were similar to those found in the Sham group (Supplementary Fig. 4A). Moreover, in *Ob* animals no effects on hepatic damage or liver regeneration were observed after resistin or visfatin pharmacological modulation (Supplementary Fig. 4B).

Resistin and visfatin formation in steatotic and non-steatotic livers from Wistar rats undergoing PH + I/R

Next, we investigated whether resistin and visfatin formation upon PH + I/R is a general phenomenon of animals with steatotic livers and not a phenomenon restricted to Zucker rats. As shown in Supplementary Fig. 5, resistin and visfatin levels in liver, plasma and adipose tissue of Ln and *Ob* Wistar animals, showed a similar pattern to those described for Ln and *Ob* Zucker animals, respectively.

Discussion

To the best of our knowledge, there are not previous studies reporting changes in resistin levels when livers are submitted to PH under I/R, a procedure commonly applied in clinical surgery. Using a well-characterized model of experimental PH + I/R, we have observed that in contrast to non-steatotic livers (which show no modification in this cytokine), resistin was increased in livers with steatosis in response to PH + I/R. Two hypotheses might explain why resistin is detected in the liver. First, resistin may be taken up from the circulation by liver cells. Second, the liver may generate resistin by itself. Our study describes upregulation in both mRNA and protein levels of resistin in the steatotic liver, no modifications in adipose tissue content, together with a concomitant increase of the cytokine in the systemic circulation, altogether suggesting that reperfusion of ischemic lobes of steatotic liver results in production and release of tissue-associated resistin to the circulation. Contrarily, significantly increased ability of adipose tissue to produce visfatin is observed in *Ob* animals submitted to PH + I/R, and may

Research Article

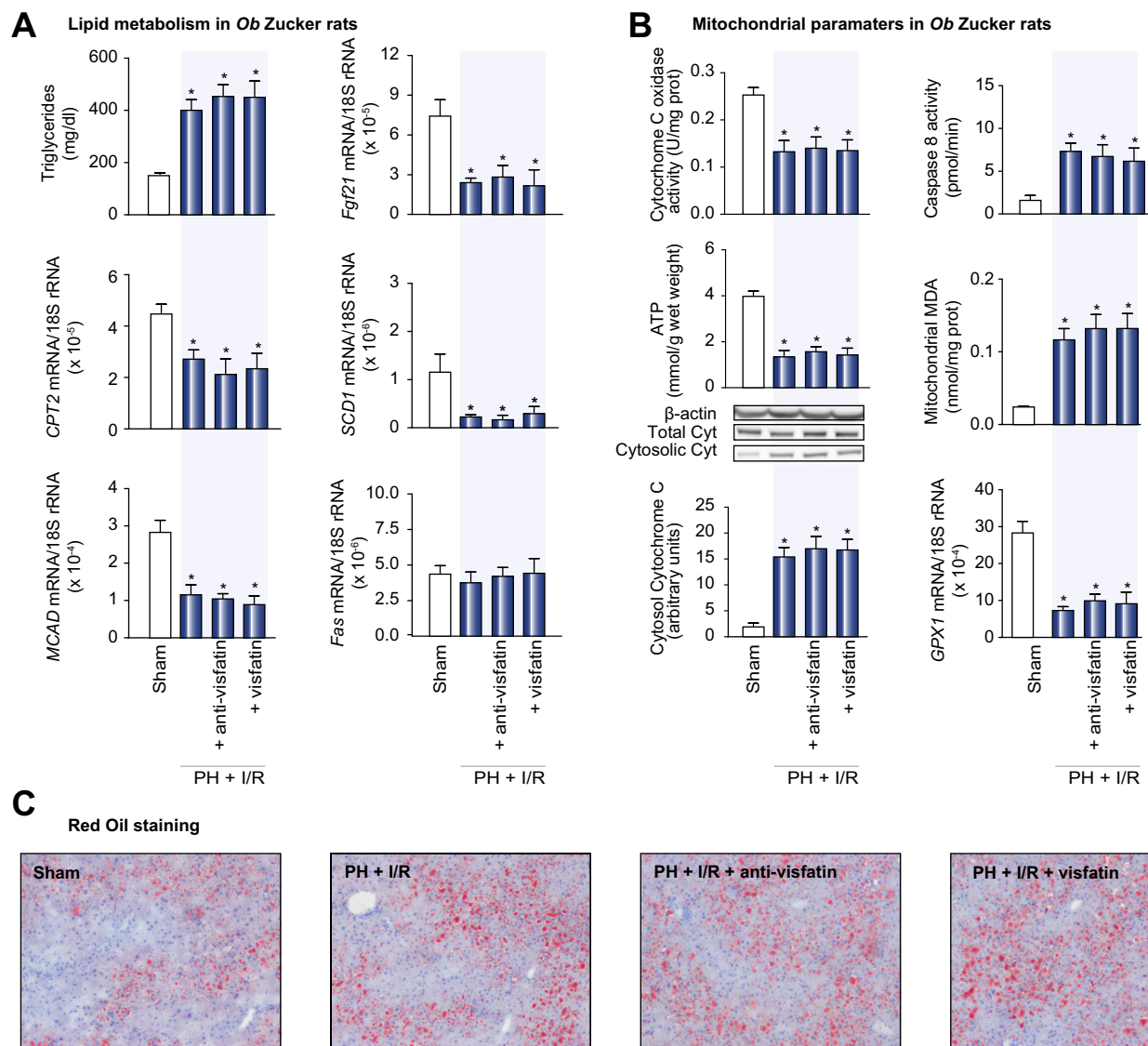


Fig. 3. Effects of visfatin on lipid metabolism and mitochondrial parameters in *Ob* Zucker rats undergoing PH + I/R. (A) Hepatic lipid metabolism parameters, (B) hepatic mitochondrial parameters and (C) representative photographs of red oil staining (10x). Six *Ob* animals from each group in each measurement. * $p < 0.05$ vs. sham.

explain the elevated visfatin circulating levels observed in these animals. The contribution of steatotic livers to circulating visfatin levels appears to be minor since it clearly had lower visfatin mRNA and protein levels after PH + I/R, presumably attributable to impaired hepatic production. This finding is in line with previous data showing that visfatin is downregulated under stress conditions in the heart, at both protein and mRNA levels [23]. In line with this, it has been also suggested that the expression of visfatin is regulated in a stimulus-dependent manner [23].

The effects of strategies based on modulating either resistin or visfatin on damage and regenerative failure in livers suffering PH under I/R have not been determined previously. Herein we have shown that neither resistin nor visfatin play a crucial role in non-steatotic livers. However, a very different scenario is observed in animals with hepatic steatosis, since we report evidence of the injurious effects of visfatin in steatotic livers, suggesting the clinical potential of visfatin-blocking-based drugs in

steatotic livers undergoing PH + I/R. Our results show for the first time that the spontaneous upregulation of resistin in steatotic livers in conditions of PH + I/R may be a compensatory mechanism to maintain low hepatic visfatin levels. In fact, here we show the importance of preventing increments in hepatic visfatin in steatotic livers to protect them against damage and regenerative failure.

A possible mechanism to explain why endogenous resistin maintains the low levels of visfatin in the steatotic livers follows. It appears unlikely that visfatin accumulation observed in steatotic livers after resistin inhibition can be attributed to an increase in visfatin generation by the liver. In fact, administration of antibodies against resistin did not modify the levels of *visfatin* mRNA in the steatotic liver. However, resistin blockade induced the release of visfatin from adipose tissue to the circulation, which ultimately could be taken up by hepatic cells. Indeed, a significant accumulation of visfatin within the liver, but not in

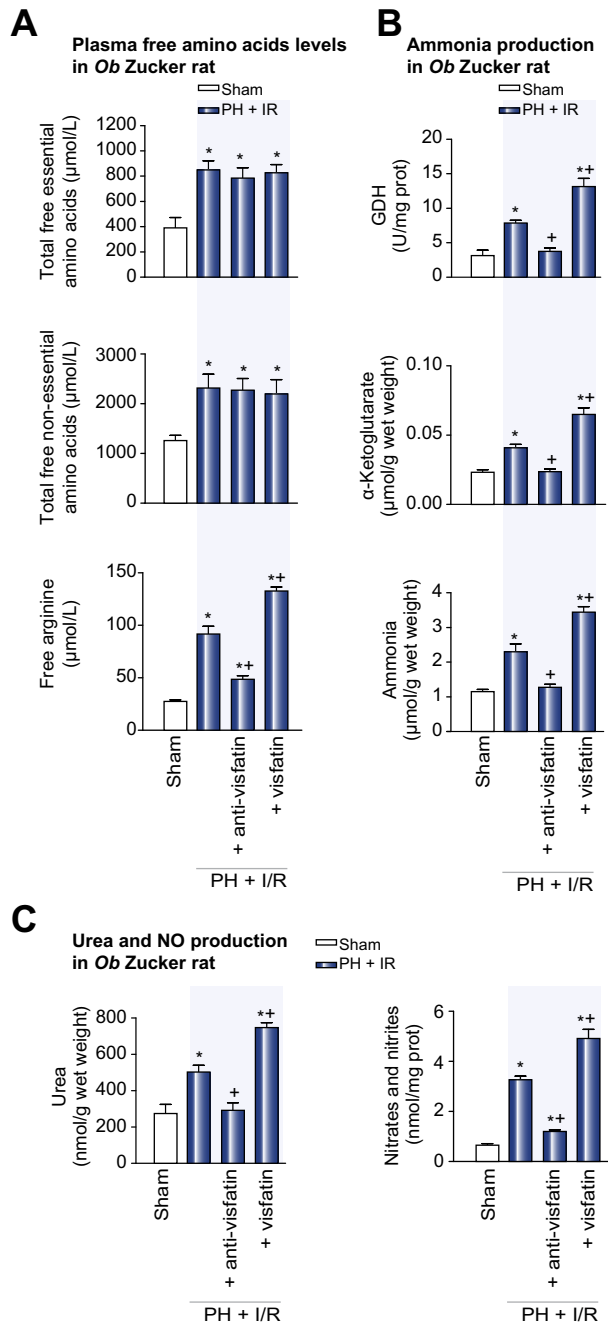


Fig. 4. Effects of visfatin on free amino acids levels, ammonia, urea and NO production in Ob Zucker rats undergoing PH + I/R. (A) Plasma free amino acids levels, (B) GDH, α -ketoglutarate and ammonia levels and (C) urea and NO production. Six Ob animals from each group in each measurement. * $p < 0.05$ vs. sham; ** $p < 0.05$ vs. PH + I/R.

plasma, was observed in the PH + I/R + anti-resistin group of animals. Moreover, adipose tissue visfatin origin was confirmed since hepatic visfatin accumulation was no longer observed when adipose tissue was removed. Very importantly, the injurious effects derived from visfatin accumulation can be abolished using visfatin-neutralizing antibodies.

Further studies (which are beyond the scope of the present study) will be required to elucidate how visfatin is taken up into hepatocytes. Although the specific receptors or transporters for visfatin in hepatic cells remain to be identified [24], the possibility that visfatin might be taken up (with intact enzymatic activity) into hepatocytes by a transport mechanism, not identified to date, should not be discarded. Indeed, recent data indicate that visfatin acts as an intracellular NAD biosynthetic enzyme and it is not enzymatically active in the bloodstream [25]. In addition, it has been suggested that circulating visfatin can likewise enter the brain compartment, probably via an unknown active transport mechanism [26].

Next, we investigated why the inhibition of the visfatin pathway is crucial to protect steatotic livers in conditions of PH under I/R. To our knowledge, our results are the first indicating that visfatin functions as an NAD biosynthetic enzyme in steatotic livers undergoing PH + I/R. This could partially explain the injurious effects of visfatin in liver surgery. Indeed, high visfatin levels in steatotic livers were associated with high hepatic NAD, increased hepatic damage and regenerative failure. Consequently, visfatin inhibition was associated with low NAD levels and protection against damage and regenerative failure of steatotic livers. To understand these results, the following observations should be considered. First, GDH is a mitochondrial matrix enzyme that plays an important role in the modulation of amino acid catabolism in the liver. GDH catalyzes the dehydrogenation of glutamate to α -ketoglutarate and ammonia with NAD^+ as a cofactor and their activation in the liver leads to hyperammonemia. In the liver, NH_4^+ enters the urea cycle and then, arginine induces urea formation and NO production [22]. In our hands, visfatin increased GDH activity and this was associated with high NH_4^+ levels, high arginine and increased NO production. Importantly, injurious effects of NO in PH + I/R-derived hepatic damage have been previously described [4]. In addition, urea itself is responsible for extracellular acidification [27], and NH_4^+ is highly damaging due to changes in cellular pH, lysosomal system of hepatocytes and swelling of susceptible cells by altering the osmotic balance [28]. Second, it should be considered that in the current study we evaluated hepatic regeneration 24 h after PH, and it should be noted that the period 16–28 h after PH is a very rapid DNA synthesis one [29]. It appears that during this regeneration phase, DNA synthesis occurs at the expense of NAD synthesis. Indeed, an inverse correlation between NAD content and DNA content was reported [29]. In our opinion, strategies aimed at blocking visfatin action in steatotic livers are required to protect this type of liver against damage and regenerative failure probably because visfatin in the remnant steatotic liver could favour the synthesis of NAD instead of DNA. This could be the result of competition for common precursors and cofactors namely ATP, ribose 1-phosphate 5-pyrophosphate and adenine between the two synthetic pathways.

On the other hand, it should be noted that PH + I/R did not induce changes in either resistin or visfatin in non-steatotic livers and this suggests that strategies aimed at regulating these adipocytokines would be irrelevant in non-steatotic livers under these surgical conditions. In line with this, the administration of visfatin to Ln animals undergoing PH + I/R did not affect NAD levels, damage or regeneration. The mechanisms involved in damage and regeneration in liver surgery are very different in steatotic and non-steatotic livers [4,21,30,31]. Thus, the same drug might

Research Article

have no effects, or even opposite effects on damage and regeneration depending on the type of liver.

In conclusion, steatotic livers are more vulnerable to overexpress resistin and downregulate visfatin following PH under I/R. Endogenous resistin does not modify the generation of visfatin by steatotic livers but rather blocks its hepatic re-uptake from adipose tissue, and a similar result is obtained supplementing steatotic livers with exogenous resistin. An inhibition of the visfatin-downstream pathway using antibody therapy against this cytokine is required to protect steatotic livers against damage and regenerative failure (Supplementary Fig. 6). NAD biosynthetic activity rather than inflammatory response-like activity is responsible for the injurious effects of visfatin on damage and regenerative failure in steatotic livers submitted to surgery. From the point of view of clinical application, drugs aimed at blocking visfatin action in steatotic livers may provide a novel therapeutic approach to clinical conditions in which I/R and liver regeneration occur including hepatic resections and small steatotic liver transplants. Nevertheless, intensive investigations will be necessary to evaluate if the benefits of these strategies observed in experimental models of PH under I/R could be extrapolated to the clinical practice.

Financial support

This research was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (project grant SAF2012-31238), Madrid, Spain. Mónica B. Jiménez-Castro is in receipt of a fellowship from Societat Catalana de Trasplantament, Barcelona, Spain. Jordi Gracia-Sancho has a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Economía y Competitividad.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.041>.

References

- [1] McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien PA. Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* 2007;245:923–930.
- [2] Mitchell C, Gilgenkrantz H. Had Prometheus known, would he have preferred to be obese? *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:2053–2054.
- [3] Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol* 2006;45:494–499.
- [4] Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Serafin A, Rimola A, et al. Are angiotensin II receptor antagonists useful strategies in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion? *J Pharmacol Exp Ther* 2009;329:130–140.
- [5] Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009;50:957–969.
- [6] Gaddipati R, Sasikala M, Padaki N, Mukherjee RM, Sekaran A, Jayaraj-Mansard M, et al. Visceral adipose tissue visfatin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2010;9:266–270.
- [7] Yang YP, Guan XQ, Qi MM, Zhu LR. Effects of resistin on hepatic fibrosis: possible mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease in in-vitro and in-vivo. *Dongwuxue Yanjiu* 2012;33:367–372.
- [8] Bahr MJ, Ockenga J, Böker KH, Manns MP, Tietge UJ. Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:e199–e206.
- [9] Smith CC, Yellon DM. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2011;129:206–219.
- [10] Jacques C, Holzenberger M, Mladenovic Z, Salvat C, Pecchi E, Berenbaum F, et al. Proinflammatory actions of visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) involve regulation of insulin signaling and Nampt enzymatic activity. *J Biol Chem* 2012;287:15100–15108.
- [11] Kukla M, Ciupińska-Kajor M, Kajor M, Wyleźń M, Żwirska-Korczała K, Hartleb M, et al. Liver visfatin expression in morbidity obese patients with nonalcoholic fatty liver disease undergoing bariatric surgery. *Pol J Pathol* 2010;61:147–153.
- [12] Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007;178:1748–1758.
- [13] Busso N, Karababa M, Nobile M, Rolaz A, Van Gool F, Galli M, et al. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One* 2008;3:e2267.
- [14] Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:412–421.
- [15] Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Miranda-Filloy JA, de Matias JM, et al. Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:56–62.
- [16] Bi J, Li H, Ye SQ, Ding S. Pre-B-cell colony-enhancing factor exerts a neuronal protection through its enzymatic activity and the reduction of mitochondrial dysfunction in vitro ischemic models. *J Neurochem* 2012;120:334–346.
- [17] Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, et al. Extracellular nampt promotes macrophage survival via a non-enzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem* 2008;283:34833–34843.
- [18] Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001;33:808–815.
- [19] Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999;30:469–475.
- [20] Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004;39:688–698.
- [21] Elias-Miró M, Massip-Salcedo M, Raila J, Schweigert F, Mendes-Braz M, Ramalho F, et al. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and non-steatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2012;18:1198–1208.
- [22] Cohen BD. Methyl group deficiency and guanidino production in uremia. *Moll Cell Biochem* 2003;244:31–36.
- [23] Hsu CP, Oka S, Shao D, Hariharan N, Sadoshima J. Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD+ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009;105:481–491.
- [24] Skokowa J, Lan D, Thakur BK, Wang F, Gupta K, Cario G, et al. NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via NAD+–sirtuin-1-dependent pathway. *Nat Med* 2009;15:151–158.
- [25] Hara N, Yamada K, Shibata T, Osago H, Tsuchiya M. Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. *PLoS One* 2011;6:e22781.

- [26] Hallschmid M, Randeve H, Tan B, Kern W, Lehnert H. Relationship between cerebrospinal fluid visfatin (PBEF/Nampt) levels and adiposity in humans. *Diabetes* 2009;58:637–640.
- [27] Bessems M, Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG, Ploeg RJ, et al. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 2006;40:236–246.
- [28] Shawcross DL, Wright GA, Stadlbauer V, Hodges S, Davies N, Wheeler-Jones C, et al. Amonia impairs Neutrophil phagocytic function in liver disease. *Hepatology* 2008;48:1202–1212.
- [29] Ferris GM, Clark JB. Nicotinamide nucleotide synthesis in regenerating rat liver. *Biochem J* 1971;121:655–662.
- [30] Selzner M, Rüdiger H, Sindram D, Madden J, Clavien P. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;32:1280–1288.
- [31] Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.017>.

Adipokines and the endocrine role of adipose tissues.

Revista: *Handbook of Experimental Medicine*

PMID: 25903415

Títol: Adipocines i el paper endocrí dels teixits adiposos.

Resum: Durant les darreres dues dècades ha tingut lloc un canvi en la manera com es té en consideració el teixit adipós blanc. Aquest ha passat de un mer reservori de greix per a disposar quan el menjar esdevé escàs a un teixit veritablement endocrí capaç d'alliberar senyals reguladors, les anomenades adipocines, a nivell sistèmic. El control de la ingesta alimentària, la sensibilitat perifèrica a la insulina i fins i tot el desenvolupament del sistema reproductor femení es troben entre els events fisiològics que controlen les adipocines. Recentment, s'ha reconegut el paper del teixit adipós marró en la fisiologia humana. El rol metabòlic del teixit adipós marró és l'oposat al del blanc: En lloc d'emmagatzemar greix, el teixit adipós marró és un lloc de despesa energètica mitjançant la termogènesi adaptativa. Cada cop existeixen més indicis de què el teixit adipós marró podria disposar del seu propi perfil de factors secretables hormonals, les anomenades adipocines marrons, les quals disposarien d'accions biològiques característiques que actuarien en les adaptacions fisiològiques enfocades a incrementar el consum energètic.

Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues

Marta Giralt, Rubén Cereijo, and Francesc Villarroya

Contents

- 1 Introduction: Adipose Tissues and the Concept of “Adipokine”
 - 2 Adipokines and the Secretory Function of White Adipose Tissue
 - 2.1 Leptin
 - 2.2 Adiponectin
 - 2.3 Resistin
 - 2.4 Other Adipokines
 - 3 Pro-inflammatory Cytokines as Adipokines
 - 4 Free Fatty Acids: Nonprotein Signaling Molecules Released by White Adipose Tissue
 - 5 Regional Differences in Adipokine Secretion Between Subcutaneous and Visceral White Adipose Depots
 - 6 Secretory Function of Bone Marrow Adipose Tissue
 - 7 Brown Adipokines: The Emerging Secretory Function of Brown Adipose Tissue
- References

Abstract

The last two decades have witnessed a shift in the consideration of white adipose tissue as a mere repository of fat to be used when food becomes scarce to a true endocrine tissue releasing regulatory signals, the so-called adipokines, to the whole body. The control of eating behavior, the peripheral insulin sensitivity, and even the development of the female reproductive system are among the physiological events controlled by adipokines. Recently, the role of brown adipose tissue in human physiology has been recognized. The metabolic role of brown adipose tissue is opposite to white fat; instead of storing fat, brown

M. Giralt • R. Cereijo • F. Villarroya (✉)

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Spain

e-mail: fvillarroya@ub.edu

© Springer International Publishing Switzerland 2015
Handbook of Experimental Pharmacology, DOI 10.1007/164_2015_6

adipose tissue is a site of energy expenditure via adaptive thermogenesis. There is growing evidence that brown adipose tissue may have its own pattern of secreted hormonal factors, the so-called brown adipokines, having distinctive biological actions on the overall physiological adaptations to enhance energy expenditure.

Keywords

Adipokine · Brown adipocyte · Endocrine · Inflammation · White adipocyte

1 Introduction: Adipose Tissues and the Concept of “Adipokine”

“Adipokine” is a term that first appeared in the biological literature a few decades ago with the recognition of a secretory role for adipose tissue. By default, the term “adipose tissue” is generally interpreted to mean “white” adipose tissue (WAT). The predominant cell type in this tissue is the white adipocyte, a specialized fat storage cell containing a single triglyceride vacuole that occupies more than 90% of the cell volume. WAT is the main type of adipose tissue in the organism and is responsible for storing fat for use when food availability is limited. A second distinct type of adipose tissue, termed “brown” adipose tissue (BAT), serves a totally different – in fact, opposite – role: consumption of metabolic energy to produce heat. The brown adipocyte contains adipose depots in the form of multiple triglyceride vacuoles, but they are not used to fuel other tissues but instead sustain uncoupled intracellular mitochondrial oxidation to produce heat. In contrast to white adipocytes, brown adipocytes contain large amounts of mitochondria. Almost everything we currently know about adipokines relates to the secretory role of WAT. One of the most recently emerging issues in relation to adipokines is the potential secretory function of BAT. The specific secretory properties of BAT are just beginning to be recognized and will be discussed separately at the end of this chapter. Finally, there is the bone marrow adipose tissue, a type of adipose tissue present in the interior of bones whose relative abundance is known to increase with aging (Justesen et al. 2001). Its biological role is poorly understood, and little information about its secretory properties is available, as cited below.

Just over 50 years ago, Kennedy postulated the existence of some kind of circulating “lipostatic” factor that exerts inhibitory functions capable of acting at central level to control energy expenditure and food intake (Kennedy 1953). In subsequent years, studies in which mice of the genetically obese *ob/ob* strain and control mice were surgically linked (parabiosis) allowed to confirm the presence of such a factor, as in animals linked by parabiosis, a normalization of weight was observed in obese mice due to the transfer of some molecule/s from control mice (Coleman 1973). However, it was not until the cloning of the gene for leptin in 1994 that an identity could be assigned to this mysterious entity (Zhang et al. 1994). The

finding that leptin, as a signaling molecule, was produced mainly by adipose tissue led to a major paradigm shift in thinking about the biological role of WAT, establishing this lipid reservoir as an endocrine organ capable of actively controlling overall energy homeostasis. This finding was followed by the discovery of additional molecules secreted mainly by adipose tissue. These studies, which are still ongoing today, showed that these factors act on the cell that excretes them (autocrine function), act on nearby cells (paracrine function), or enter the circulation to act on distant cells (endocrine function) – actions that led to the designation of these factors as adipokines (from adipose tissue + cytokines) (Ouchi et al. 2011).

An important issue relating to the use of the term “adipokine” concerns whether it refers to factors released specifically by adipocytes, the predominant cell type present in adipose depots, or applies more generally to factors released by any type of cell present in adipose tissue. The existing literature tends to use the term indistinctly, but to understand the endocrine role of adipose tissue, it is important to be aware that, whereas some of the currently known adipokines are expressed mainly by adipocytes – and in some cases, even by specific types of adipocyte – others are secreted by non-adipocytes, such as immune cells, vascular cells, and preadipocytes, present in adipose tissue depots.

2 Adipokines and the Secretory Function of White Adipose Tissue

The extensive body of research developed in recent years regarding major adipokines with signaling properties secreted by adipose tissue, together with the myriad novel molecules that are being continuously identified, makes it unrealistic to comprehensively describe every reported factor in a single book chapter. Hereby we provide an updated summary of the main adipokines, the basics of their biological roles, and their involvement in metabolic physiopathology.

2.1 Leptin

As noted above, leptin was identified as the product of the gene associated with obesity in mice homozygous for the recessive *ob* allele (Zhang et al. 1994). Loss of function for the *ob* gene, encoding leptin, results in hyperphagia, obesity, and insulin resistance, which can be reversed by administering leptin (Friedman and Halaas 1998). Leptin is a peptide hormone with a helical structure similar to that of cytokines such as interleukin (IL)-2 (Lord et al. 1998). Leptin is produced mainly by adipocytes, especially in subcutaneous fat depots, and, to a lesser extent, by other tissues such as the gastric epithelium and brain (Harwood 2012). Leptin acts mainly on the hypothalamus, which expresses the long, plasma membrane form of the leptin receptor, which mediates intracellular signals in response to leptin binding. The action of leptin on the hypothalamus signals ultimately the central nervous system, informing the nutritional status of the adipocytes and controlling

food intake, acting basically as a satiety signal (Ahima et al. 1996). In response to leptin-mediated signaling, the brain commands the peripheral tissues to increase the oxidation of fatty acids, reduce plasma glucose, induce thermogenesis, and, ultimately, reduce adipocyte mass. Moreover, in a fasting state, leptin levels decrease in coordination with insulin, stimulating appetite, inhibiting sympathetic activity-induced lipolysis and thermogenesis, and suppressing the action of anabolic hormones (Chan et al. 2003). The identification of a rare form of a morbid obesity disease in children carrying homozygosity-null mutations of the leptin gene and the decrease in hyperphagia and normalization of body weight produced by therapeutic administration of leptin provide confirmation in humans of the experimentally based concepts of leptin biological actions (Montague et al. 1997). The actions of leptin are not limited to the central nervous system; many peripheral tissues express some forms of leptin receptor and therefore respond to catabolic stimulation of leptin (Harwood 2012). Actions other than metabolic regulation are also recognized, e.g., the control of female reproductive system development (Friedman 2014).

In obese individuals, circulating leptin levels are high and correlate positively with adiposity. The fact that these high levels of leptin are unable to elicit an anorectic response is indicative of leptin resistance. It is known that leptin resistance in obesity involves the impairment of both central and peripheral responsiveness; however, it is not the variability of the leptin receptor molecule but alterations in intracellular signaling that determine impaired responsiveness (Steinberg et al. 2002). Extensive information has been generated on the subject of leptin – the molecule that inspired enormous research efforts in recent decades in adipokine identification and characterization – and a number of excellent reviews are currently available describing the multiple facets of leptin biology (Friedman 2014).

2.2 Adiponectin

Adiponectin (also known as AdipoQ or ACRP30) is another peptide hormone that originates in adipose tissues. Among the currently known adipokines, adiponectin, which is present at high concentrations in plasma (3–30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), is possibly the one that is most exclusively secreted by adipocytes (Scherer et al. 1995; Hu et al. 1996; Maeda et al. 1996). This molecule has a remarkable structure, consisting of an N-terminal collagen-like sequence and a C-terminal globular domain homologous to the globular complement factor C1q. The crystal structure of the adiponectin globular domain reveals a striking resemblance to the structure of tumor necrosis factor- α (TNF α) (Shapiro and Scherer 1998). Adiponectin forms a wide range of multimeric species from trimers and hexamers to high-molecular-weight (HMW) multimers. All forms are detectable in the blood, but it is believed that only the HMW form has biological activity (Schraw et al. 2008). The synthesis and secretion of this adipokine is complex. Transcription of the adipokine gene is controlled by the adipogenic transcription factor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated

receptor- γ). Moreover, secretion is regulated at the level of the endoplasmic reticulum (ER), where the chaperone ERp44 and oxidoreductase Ero-L α together retain HMW forms, which are released only in response to the appropriate stimuli (Halberg et al. 2008).

Adiponectin acts in peripheral tissues through interaction with its membrane receptors, AdipoR1 and AdipoR. Adiponectin increases insulin sensitivity, in part by promoting the action of AMP-activated kinase (AMPK) (Yamauchi et al. 2002). This kinase acts as a sensor of nutritional status and can activate fatty acid oxidation in skeletal muscle and inhibits hepatic gluconeogenesis and adipocyte lipolysis. In skeletal muscle, adiponectin also activates PGC-1 α (PPAR γ coactivator 1 α), promoting mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism (Iwabu et al. 2010). The actions of adiponectin on brown adipocytes are unclear, with some reports indicating that adiponectin promotes thermogenesis and others reporting that adiponectin blunts BAT recruitment by decreasing the expression and activation of the β -adrenergic receptor (Qiao et al. 2014).

In contrast to leptin levels, which are increased in obese individuals with type 2 diabetes, adiponectin levels are decreased in obese individuals and correlate negatively with adiposity. Adiponectin is one of the few adipokines that correlate negatively with insulin resistance; its release is increased under the conditions of leanness and is inhibited by pro-inflammatory molecules, the latter of which are known to worsen the metabolic status of obese patients (Li et al. 2009).

2.3 Resistin

Resistin (also known as FIZZ3) is a protein secreted by WAT that is closely associated with activation of inflammatory processes. In mice, resistin is produced exclusively by white adipocytes; however in humans, resistin is mostly produced by macrophages and monocytes (Steppan et al. 2001; Patel et al. 2003). Resistin and adiponectin show some structural similarities in that both form a circular homo-hexamer. In mice, resistin induces insulin resistance through a mechanism involving the activation of SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), an inhibitor of insulin signaling, and the suppression of AMPK activation in peripheral tissues (Steppan et al. 2005). Resistin effects in humans are not entirely clear, but the prediction is that resistin would participate in promoting insulin resistance as well (Harwood 2012).

2.4 Other Adipokines

In addition to the abovementioned adipokines, WAT is capable of producing a variety of other signal molecules:

- *Adipsin*: Produced mainly by resident macrophages as well as by adipocytes, it is a protein that activates the complement alternative pathway and stimulates the

accumulation of triglycerides in adipocytes (Cook et al. 1987). It has been recently shown to be involved in maintaining pancreatic β -cell function (Lo et al. 2014).

- *Apelin*: Produced by adipocytes and other stromal stem cells, it has been proposed to play a role in the regulation of glucose homeostasis. Circulating apelin levels have been found to be increased in obese and insulin-resistant patients (Castan-Laurell et al. 2011).
- *Omentin*: Produced by non-adipocyte cells in adipose depots, it is mainly found in visceral adipose tissue rather than in subcutaneous adipose tissue (Yang et al. 2006). Plasma omentin levels are reduced in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. Omentin has insulin-sensitizing effects and also has been reported to have anti-inflammatory, anti-atherogenic, and anti-cardiovascular disease properties (Tan et al. 2010).
- *RBP4 (retinol-binding protein 4)*: Secreted by adipocytes, its primary action is as a transporter of retinol; however, signaling properties that appear unrelated to vitamin A-related transport have been reported, mainly the induction of hepatic glucose production and insulin resistance (Yang et al. 2005). Its levels are increased in obesity (Ouchi et al. 2011).
- *Vaspin (visceral adipose tissue-derived serpin)*: Predominantly secreted by visceral fat, it is a serine protease inhibitor that reduces the levels of leptin, resistin, and pro-inflammatory cytokines, thereby improving insulin sensitivity (Hida et al. 2005). Its levels are increased in obese patients (Youn et al. 2008).
- *Visfatin*: Produced by adipocytes and lymphocytes, it is mainly produced in visceral adipose depots. Also known as the cytokine PBEF (pre-B-cell colony-enhancing factor), it is an extracellular form of the enzyme Nampt (nicotinamide phosphoribosyltransferase), an essential enzyme in the NAD biosynthetic pathway starting from nicotinamide. It has been proposed to act as an insulinomimetic capable of increasing glucose uptake and improving insulin resistance (Fukuhara et al. 2005).

In addition to these molecules, there are numerous other hormonal factors that are mainly released by tissues and cell types other than adipose tissue and adipocytes that have increasingly been found to be released by adipose tissue as well. Among these factors are plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor (NGF), and fibroblast growth factor-21 (FGF21), as described below.

3 Pro-inflammatory Cytokines as Adipokines

In addition to these “conventional” adipokines, adipose tissue and adipocytes themselves secrete a large number of pro-inflammatory molecules and chemokines that are often involved in insulin resistance associated with obesity or lipodystrophy through the induction of local inflammation in adipose tissue.

Table 1 Summary of cytokines and chemokines released by white adipose tissue

Cytokine or chemokine	Function	Primary source(s)
<i>Pro-inflammatory</i>		
TNF α	Promotion of inflammatory innate and T _H 1 immune responses, inhibition of PPAR γ	Adipocytes, macrophages
IL-1 β	Activation of macrophages and T cells	Adipocytes, macrophages
IL-6	Pleiotropic, promotion of T- and B-cell differentiation and synthesis of acute-phase proteins, enhancement of lipolysis, sensitization to IL-4 actions	Adipocytes, SVF cells
IL-7	Homeostatic preservation of lymphoid precursors, modulation of adipose tissue mass and insulin signaling	SVF cells
IL-18	Induction of a broad range of inflammatory responses	SVF cells
MCP1/CCL2	CCR2 ⁺ monocyte chemotaxis	Adipocytes, SVF cells
RANTES/CCL5	Lymphocyte chemotaxis	Adipocytes, SVF cells
ENA-78/CXCL5	Neutrophil chemotaxis, antagonism of insulin signaling through the JAK-STAT pathway	SVF cells
IL-8/CXCL8	Neutrophil chemotaxis	Adipocytes, macrophages
IP-10/CXCL10	CXCR3 ⁺ leukocyte chemotaxis	Adipocytes, SVF cells
SDF-1/CXCL12	CXCR4 ⁺ macrophage chemotaxis	Adipocytes, SVF cells
Oncostatin M	Regulation of immune responses, inhibition of adipocyte differentiation	Macrophages, SVF cells
CSF-1	Promotion of macrophage and monocyte proliferation and differentiation	SVF cells
MIF	Activation of T _H 1 cellular responses	Adipocytes, SVF cells
<i>Anti-inflammatory</i>		
IL-4 IL-13	Promotion of a T _H 2 response and alternative macrophage activation	Eosinophils
IL-5	Eosinophil activation	Type 2 innate lymphoid cells
IL-10	Attenuation of inflammatory responses	Macrophages, SVF cells
TGF β	Regulation of preadipocyte differentiation, inhibition of immune cell proliferation	SVF cells

CSF colony-stimulating factor, IL interleukin, SVF stromal vascular fraction, TGF tumor growth factor

It is evident that many pro-inflammatory cytokines are secreted in adipose tissue by infiltrating immune cells, such as macrophages and lymphocytes. The first evidence for a connection between inflammatory processes and obesity-related insulin resistance was provided by an observation in the nineteenth century that

treatment with high doses of the anti-inflammatory drug, sodium salicylate, attenuated hyperglycemia in diabetic patients. By the end of the twentieth century, a clear correlation between circulating levels and local production of pro-inflammatory cytokines and obesity had been fully established (Shoelson et al. 2006). In a time when WAT was just beginning to be recognized as a secretory organ, the revelation that TNF α was overproduced by WAT during obesity and evoked insulin resistance was an unexpected turn of events in research on this disease (Feinstein et al. 1993; Hotamisligil et al. 1993). These studies laid the foundation for WAT as a site of cytokine production, and since that time, a myriad of WAT-derived cytokines have been identified, as summarized in Table 1. Although mainly associated with infiltrating immune cells, the secretion of many of these factors by adipocytes (to a greater or lesser extent) has become increasingly evident, although it is difficult to precisely evaluate the relative contribution of adipocytes and non-adipocyte cells to total release.

In addition to cytokines, factors that fail to be classified as such, including acute-phase proteins and other inflammatory mediators, are also produced by adipose tissue. Serum amyloid A3, haptoglobin, lipocalin-2, and PAI-1 are among the acute-phase reactants produced by adipose tissue (Halberg et al. 2008). PAI-1 is a potent antagonist of fibrinolysis produced by adipocytes. In obesity, type 2 diabetes mellitus, and lipodystrophies, PAI-1 is greatly overexpressed by WAT, and it is well documented that its circulating levels rise dramatically, further contributing to insulin resistance (Alessi et al. 2007). The pro-inflammatory milieu of adipokines is completed by angiopoietin-like-2 (ANGPTL2), which acts in a paracrine way and promotes inflammatory immune cell extravasation by inducing the endothelial integrin expression, chemerin (also known as retinoic acid receptor responder-2), a secreted chemoattractant protein associated with systemic inflammation, recruitment of immune cells, and visceral fat accumulation, and progranulin, a small protein produced by stromal vascular fraction cells within WAT depots that is involved in cell proliferation and enhancement of IL-6 expression (Ouchi et al. 2011; Bluher 2014).

4 Free Fatty Acids: Nonprotein Signaling Molecules Released by White Adipose Tissue

Finally, we should be aware that, well before an endocrine role for adipose tissue was recognized, white adipocytes were known as sources of non-esterified fatty acids resulting from activation of lipolysis. In addition to their role as a metabolic fuel, free fatty acids have been recently recognized to function as signaling molecules, capable of influencing intracellular signaling in multiple cell types as well as modulate gene transcription of target cells and organs. The mechanisms are complex and involve membrane-associated G protein-coupled receptors sensitive to activation by fatty acids. Free fatty acids are thought to be responsible for insulin resistance in peripheral tissues, impaired insulin secretion by pancreatic β -cells, and enhancement of inflammatory processes. It is claimed that high rates of lipolysis

and the release of fatty acids by adipose tissue are important factors in the signaling associated with these metabolic disturbances. However, the signaling actions of fatty acids are complicated by their dependence on the type of fatty acid. It is well known that deleterious effects on metabolism are primarily attributable to saturated fatty acids (e.g., palmitate) rather than unsaturated fatty acids (e.g., oleic acid), both of which are present as adipose tissue triglycerides and therefore capable of being released into the circulation as a consequence of adipose tissue lipolysis. Recent rodent studies have shown that adipose-derived palmitoleic acid may serve as a “lipokine” that contributes to resistance to diet-induced obesity. Whether adipose tissue palmitoleic acid behaves as a lipokine to reduce the occurrence of obesity in humans remains to be established (Cao et al. 2008; Gong et al. 2011).

5 Regional Differences in Adipokine Secretion Between Subcutaneous and Visceral White Adipose Depots

WAT is distributed anatomically into different depots in the body, mainly under the epidermis, known as the subcutaneous adipose tissue, and in intra-abdominal depots, commonly referred to as the visceral adipose tissue. About 80% of the total fat in healthy humans is located in the subcutaneous fat depots, whereas visceral fat accounts for up to 10–20% in men and 5–8% in women (Wajchenberg 2000). In addition to sex-based differences, fat distribution also varies with age, genetic background, and disease state. Indeed, an elevated risk for systemic metabolic dysfunction is not simply associated with the amount of body fat but instead is closely linked to central (visceral) obesity as opposed to peripheral (subcutaneous) obesity.

It is well recognized that there are structural and functional differences between visceral and subcutaneous fat depots (recently reviewed in Lafontan 2013). Among these differences is their secretory activity. For example, subcutaneous fat depots are the major source of leptin, whereas adiponectin secretion is higher in visceral than in subcutaneous adipose tissue (Motoshima et al. 2002; Kovacova et al. 2012). Visceral adipose tissue also exhibits greater infiltration by macrophages and other immune cells than does subcutaneous depots, especially in obese individuals (Cancello et al. 2006). Accordingly, pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8, TNF α , or MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, also known as CCL2) are generally considered to be more highly expressed in visceral fat depots than in subcutaneous depots (Fontana et al. 2007; Pou et al. 2007).

In humans, subcutaneous fat depots account for up to 60% of systemic free fatty acids under basal conditions, reflecting their greater mass, but the contribution of visceral depots increases greatly during hyperinsulinemia. Visceral fat is also more prone to catecholamine activation but less susceptible to the antilipolytic action of insulin, in effect making its lipolytic activity higher than that of subcutaneous fat (Arner 1995, 2005). Owing to their anatomical positions, visceral depots partly drain into the liver via the portal vein. Therefore, free fatty acids and pro-inflammatory cytokines released by visceral fat may directly impact liver

function, thus providing a potential mechanistic link between visceral obesity and hepatic and systemic disturbances (Fontana et al. 2007).

6 Secretory Function of Bone Marrow Adipose Tissue

The secretory functions of adipocytes within the bone are largely unknown, as are other basic aspects of their biology and physiological role. Until recently, it was thought that, in any case, the molecules secreted might be the same as those by WAT and that they could act locally. However, a recent report suggests that bone marrow adipocytes may act at the systemic level by serving as a relevant source of adiponectin under conditions such as caloric restriction or anorexia nervosa (Cawthorn et al. 2014).

7 Brown Adipokines: The Emerging Secretory Function of Brown Adipose Tissue

Analogously to WAT and its energy storage function, BAT was hitherto considered just a site of metabolic consumption that happened to be able to dissipate energy in the form of heat. Systemic metabolic adaptations, namely, glycemia reduction and insulin sensitization, arise upon the activation of BAT in response to thermogenic stimuli (i.e., cold), and local glucose uptake and insulin action in BAT are thought to be major contributors to these effects. In other organs, however, catabolic processes are upregulated in association with BAT activation, like an enhancement of WAT lipolysis to provide oxidative fuels for non-shivering thermogenesis (Bukowiecki 1989). It is thus logical to hypothesize the existence of circulating molecules that allow BAT to communicate with other cells and peripheral organs in order to coordinate the adaptive thermogenic response.

The first hint of a secretory role for BAT emerged from the observation that genetic loss of BAT had a more profound impact on general metabolism than blocking BAT energy expenditure functions by specifically disrupting uncoupling protein-1 (UCP1) (Lowell et al. 1993; Hamann et al. 1996; Enerback et al. 1997). Moreover, the expression of WAT adipokines, such as leptin and adiponectin, is lower in BAT, especially after thermogenic activation (Cannon and Nedergaard 2004). Therefore, the existence of different factors preferentially secreted by BAT – brown adipokines or “batokines” – was postulated. Brown adipokines may thus serve their own functions and behave differently from white adipokines, be upregulated in thermogenically recruited BAT, and act locally or in distant tissues.

Several BAT-derived molecules that act either in a paracrine or autocrine fashion have already been identified, and most of them are produced by brown adipocytes and induced in situations of BAT recruitment. Vascular endothelial factor-A (VEGF-A), nitric oxide (NO), NGF, insulin-like growth factor I (IGF-1), and fibroblast growth factor-2 (FGF2) are all examples of this. VEGF-A promotes angiogenesis in response to the sympathetic recruitment of BAT, and NO is thought

to be involved in endothelium-dependent increases in blood flow to BAT and the induction of the master regulator of mitochondrial biogenesis, PGC-1 α . NGF released by brown adipocytes would serve to enhance sympathetic innervation of BAT, and both IGF-I and FGF2 have roles in increasing the number of brown adipocyte precursors (Cannon and Nedergaard 2004; Villarroya et al. 2013). Collectively, these molecules would act to enhance BAT expansion in situations of thermogenic need.

In contrast to other bone morphogenetic proteins (BMPs), BMP8b has recently been demonstrated to have no role in white or brown adipogenesis but instead is involved in BAT activation. This protein is secreted by, and in turn acts on, brown adipocytes, sensitizing these cells to adrenergic stimuli required for their activation. Moreover, BMP8b has an effect on hypothalamic neurons and enhances neural signaling to favor norepinephrine release in BAT (Whittle et al. 2012).

Lipocalin prostaglandin-D synthase (L-PGDS) is a prostaglandin-synthesizing enzyme that also acts as a carrier of lipophilic molecules, such as thyroid hormones and retinoic acid, which are well-known BAT activators. Thus, L-PGDS may exert its function in an autocrine or paracrine manner, as confirmed by loss-of-function studies in which the lack of L-PGDS was shown to result in an impaired activation of BAT (Virtue et al. 2012).

Until recently, immune infiltration in BAT had been overlooked. However, the tables were turned with the discovery that less inflammatory, alternatively activated macrophages are recruited upon BAT activation and actively produce norepinephrine to sustain adaptive thermogenesis. Accordingly, pro-inflammatory cytokines are in general less expressed in BAT than in WAT due to a reduced and more homeostatic immune infiltration (Nguyen et al. 2011). Some of these cytokines, such as IL-1 β and IL-6, are nonetheless overexpressed and released by brown adipocytes and immune cells in the presence of thermogenic stimuli. Whereas IL-1 β may act by modulating IL-1 receptor signaling and diminishing inflammation (Cannon and Nedergaard 2004), IL-6 confers insulin sensitization to BAT (discussed in detail below). It has recently been described that MTRNL (meteorin-like) is produced by brown-like adipocytes – termed “beige/brite” adipocytes – that occur in WAT depots upon thermogenic activation but not by “classical” brown adipocytes. MTRNL is responsible for eosinophil infiltration and activation. Since these cells are the main source of IL-4 and IL-13 in adipose tissue and both cytokines promote the alternative activation of macrophages, MTRNL would act as a browning agent for WAT and further exemplifies the contribution of the adipose-immune crosstalk to thermogenesis (Rao et al. 2014; Qiu et al. 2014).

Although the endocrine function of BAT is still in the process of being fully elucidated, there are a number of different factors that have already been recognized as having such a role, starting with triiodothyronine (T3). Type II iodothyronine 5'-deiodinase (DIO2) is highly expressed in BAT and catalyzes the conversion of thyroxine to T3. DIO2 is induced and T3 production is subsequently increased during thermogenic activation in brown adipocytes. T3 binds intracellularly to the

thyroid hormone receptor, which is involved in the activation of thermogenic genes, including UCP1. It is known, however, that cold-induced T3 release is not limited to a local function: BAT-derived T3 enters the bloodstream in substantial amounts to further mediate distal actions required for thermogenesis (e.g., in the hypothalamus). Given the role of thyroid hormones in the promotion of energy expenditure, it is reasonable to infer that their release by BAT might play a role in this context (Silva and Larsen 1985; Fernandez et al. 1987).

RBP4 offers further clues in the search for BAT adipokines. Though RBP4 was initially reported to be a WAT adipokine, its expression and release are strongly induced by cold in brown adipocytes (Rosell et al. 2012). Although the release of RBP4 by WAT is positively correlated with insulin resistance, as noted above, BAT-derived RBP4 may provide a mechanism for delivering retinol – a precursor of retinoic acid, which is a known activator of BAT – to adjacent brown adipocytes or even to distant WAT depots in order to promote beige/brite thermogenesis therein (Villarroya et al. 2013).

One of the most robust links of BAT with an endocrine function is arguably FGF21. In the absence of specific stimuli, the liver is the main site of FGF21 synthesis. However, FGF21 expression is greatly induced in brown adipocytes upon thermogenic activation and BAT is capable of releasing this hormone into the circulation (Hondares et al. 2011; Fisher et al. 2012). Locally, FGF21 promotes the expression of PGC-1 α and UCP1, thereby enhancing thermogenic activation (Hondares et al. 2010; Fisher et al. 2012). Systemically, FGF21 promotes glucose oxidation in many different tissues (e.g., liver, WAT, pancreas), and studies using animal models have demonstrated that FGF21 confers protection against obesity and type 2 diabetes (Coskun et al. 2008). BAT transplantation studies, discussed below, have revealed enhanced FGF21 production and an improved metabolic profile in animals on a high-fat diet, consistent with the idea that BAT-derived, circulating FGF21 acts systemically to exert beneficial effects. Though expressed in WAT as well, thermogenic stimulation yields no upregulation of FGF21 in this tissue, hence implying a more autocrine role (Dutchak et al. 2012). Since FGF21 is highly expressed in and released by beige/brite adipocytes in both mice and humans, it may be particularly relevant in the browning processes (Lee et al. 2014). On the other hand, FGF21 appears to be expressed more specifically in BAT versus WAT in humans; in contrast with rodents, FGF21 expression is practically negligible in human WAT (Hondares et al. 2014).

Recently, several groups almost simultaneously discovered a role for the gene product of Gm6484 (in mice) and C19orf80 (in humans) in lipid metabolism and trafficking. The protein encoded by these genes was revealed to be a member of the ANGPTL family and has since been variously named TD26, RIFL (refeeding-induced in fat and liver), lipasin, ANGPTL8, and betatrophin (Quagliarini et al. 2012; Zhang 2012; Ren et al. 2012; Yi et al. 2013). Although each study focused on different questions, all concurred that this protein is expressed at the highest levels in liver and BAT, followed by WAT. Expression of its transcript is

induced during adipogenesis in both white and brown adipocytes and is upregulated by insulin and cold, resulting in elevated circulating levels. However, it is downregulated by lipolytic effectors such as cAMP, norepinephrine, and fasting, which decrease its circulating levels. Disruption of this gene in animal models results in reduced triglyceridemia and a mild lipodystrophic phenotype. Collectively, these puzzle pieces form a picture of TD26/RIFL/ANGPTL8/betatrophin as a lipoprotein lipase inhibitor involved in replenishing WAT and BAT lipid stores. Moreover, this protein is thought to promote the proliferation of β -cells and subsequently increase pancreatic insulin production, which illustrates the existence of interactions between BAT and the pancreas (Yi et al. 2013).

Recent studies have used BAT transplantation as a powerful, albeit complex, tool to study the potential roles of BAT-derived endocrine molecules. Several of these studies identified the systemic effects of BAT transplantation that could not be accounted for by the increase in energy expenditure and metabolite oxidation attributable to the additional mass of transplanted BAT. One study demonstrated that subcutaneous BAT transplantation normalized glucose levels and ameliorated the symptoms of type 1 diabetes in rodent models. IGF-1 was proposed as a candidate for this behavior, since its actions would mimic those of insulin and reverse the diabetic phenotype (Gunawardana and Piston 2012). Other independent studies showed that BAT transplantation improved the whole-body energy metabolism and protected mice from high-fat-diet-induced obesity (Liu et al. 2013; Stanford et al. 2013). Stanford et al. reported a decrease in body weight and improved glucose metabolism and insulin sensitivity in high-fat-diet-fed mice upon BAT transplantation. Intriguingly, these effects were absent in IL-6-null mice and, in fact, the FGF21 increase associated with BAT transplantation is lost when IL-6-null BAT was transplanted (Stanford et al. 2013). IL-6 expression is induced in BAT upon thermogenic activation and it has a well-established function in the promotion of WAT lipolysis, indeed suggesting a role in adaptive thermogenesis. Mauer et al. shed some light on this issue by demonstrating that IL-6 receptor-mediated pathways were able to sensitize adipose-resident macrophages to IL-4 action, thus promoting alternative activation, concomitant catecholamine production, and BAT activity (Mauer et al. 2014).

Taken together, accumulating evidence suggests that BAT, like WAT, indeed has an endocrine role (see Fig. 1 for summary). The old designation of BAT as a hibernating “gland” might prove to be unintentionally less misleading than once thought, since all of the findings discussed above are probably just the beginning of an era of discovery for BAT-released factors. Given the renewed interest in BAT since its rediscovery in adult humans (Cereijo et al. 2014), BAT activation and brown adipokines have risen to the fore as promising tools for clinical treatment of obesity and diabetes.

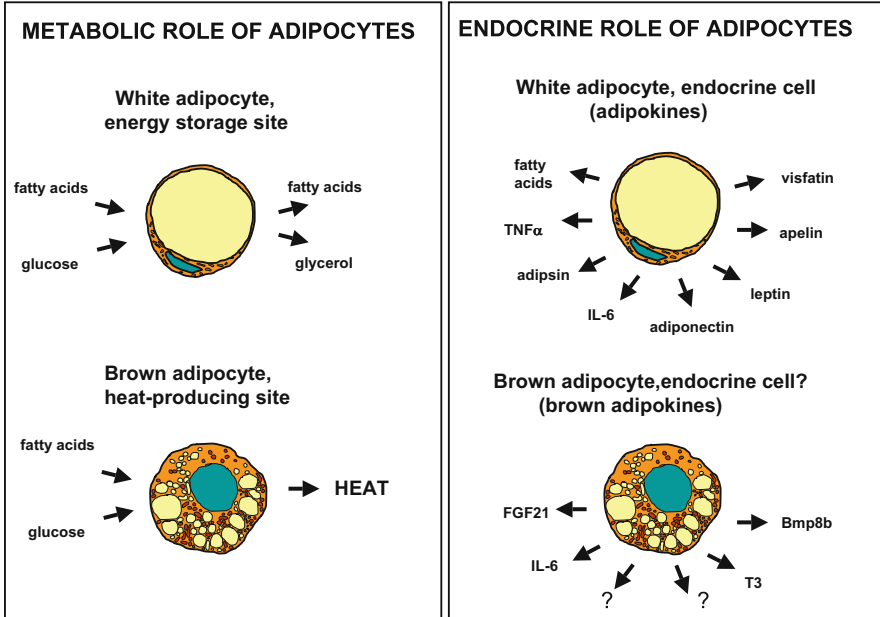


Fig. 1 Schematic representation of evolving concepts on the endocrine role of adipose cells. The classical metabolic role of white adipocytes and brown adipocytes is depicted (*left*). Examples of adipokines released by white adipocytes and of currently recognized “brown adipokines” are shown (*right*)

Acknowledgments This work was supported by MINECO (grant SAF2011-23636), Instituto de Salud Carlos III (grants PI11/00376 and PI14/00063), EU (FP7 project BETABAT, grant HEALTH-F2-2011-277713), and Generalitat de Catalunya (2014SGR-141).

References

- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250–252
- Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I (2007) Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 18:240–245
- Arner P (1995) Differences in lipolysis between subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med* 27:435–438
- Arner P (2005) Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:471–482
- Bluhm M (2014) Adipokines – removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab* 3:230–240
- Bukowiecki LJ (1989) Energy balance and diabetes. The effects of cold exposure, exercise training, and diet composition on glucose tolerance and glucose metabolism in rat peripheral tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 67:382–393
- Cancello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Bar Hen A, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K (2006) Increased infiltration of

- macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55:1554–1561
- Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277–359
- Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS (2008) Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134:933–944
- Castan-Laurell I, Dray C, Attane C, Duparc T, Knauf C, Valet P (2011) Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 40:1–9
- Cawthorn WP, Scheller EL, Learman BS, Parlee SD, Simon BR, Mori H, Ning X, Bree AJ, Schell B, Broome DT, Soliman SS, DelProposto JL, Lumeng CN, Mitra A, Pandit SV, Gallagher KA, Miller JD, Krishnan V, Hui SK, Bredella MA, Fazeli PK, Klibanski A, Horowitz MC, Rosen CJ, MacDougald OA (2014) Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab* 20:368–375
- Cereijo R, Giralto M, Villarroya F (2014) Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann Med* 18:1–9
- Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS (2003) The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* 111:1409–1421
- Coleman DL (1973) Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9:294–298
- Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM (1987) Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237:402–405
- Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitonov A (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149:6018–6027
- Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, Choi JH, Yu RT, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2012) Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 148:556–567
- Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387:90–94
- Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A (1993) Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 268:26055–26058
- Fernandez JA, Mampel T, Villarroya F, Iglesias R (1987) Direct assessment of brown adipose tissue as a site of systemic tri-iodothyronine production in the rat. *Biochem J* 243:281–284
- Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdegue F, Wu J, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E, Spiegelman BM (2012) FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 26:271–281
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S (2007) Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56:1010–1013
- Friedman J (2014) 20 Years of Leptin: Leptin at 20: an overview. *J Endocrinol* 223:T1–T8
- Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763–770
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307:426–430
- Gong J, Campos H, McGarvey S, Wu Z, Goldberg R, Baylin A (2011) Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am J Clin Nutr* 93:186–191

- Gunawardana SC, Piston DW (2012) Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* 61:674–682
- Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE (2008) The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:753–768
- Hamann A, Flier JS, Lowell BB (1996) Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* 137:21–29
- Harwood HJ Jr (2012) The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacol* 63:57–75
- Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, Shikata K, Hourai S, Futami J, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Akagi S, Makino H, Kanwar YS (2005) Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10610–10615
- Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F (2010) Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 11:206–212
- Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, Villarroya F (2011) Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 286:12983–12990
- Hondares E, Gallego-Escuredo JM, Flachs P, Frontini A, Cereijo R, Goday A, Perugini J, Kopecky P, Giralt M, Cinti S, Kopecky J, Villarroya F (2014) Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism* 63:312–317
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697–10703
- Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T (2010) Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 464:1313–1319
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2:165–171
- Kennedy GC (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140:578–596
- Kovacova Z, Tencerova M, Roussel B, Wedellova Z, Rossmeislova L, Langin D, Polak J, Stich V (2012) The impact of obesity on secretion of adiponectin multimeric isoforms differs in visceral and subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 36:1360–1365
- Lafontan M (2013) Differences between subcutaneous and visceral adipose tissues. In: Bastard JP, Fève B (eds) *Physiology and pathophysiology of adipose tissue*. Springer-Verlag, France, pp 329–350
- Lee P, Werner CD, Kebebew E, Celi FS (2014) Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int J Obes (Lond)* 38:170–176
- Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM (2009) Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 302:179–188
- Liu X, Zheng Z, Zhu X, Meng M, Li L, Shen Y, Chi Q, Wang D, Zhang Z, Li C, Li Y, Xue Y (2013) Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell Res* 23:851–854
- Lo JC, Ljubicic S, Leibiger B, Kern M, Leibiger IB, Moede T, Kelly ME, Chatterjee Bhowmick D, Murano I, Cohen P, Banks AS, Khandekar MJ, Dietrich A, Flier JS, Cinti S, Blüher M, Danil NN, Berggren PO, Spiegelman BM (2014) Adipsin is an adipokine that improves beta cell function in diabetes. *Cell* 158:41–53

- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897–901
- Lowell, B.B., V, S.S., Hamann, A., Lawitts, J.A., Himms-Hagen, J., Boyer, B.B., Kozak, L.P., and Flier, J.S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740–742.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286–289
- Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, Theurich S, Hausen AC, Schmitz J, Bronneke HS, Estevez E, Allen TL, Mesaros A, Partridge L, Febbraio MA, Chawla A, Wunderlich FT, Bruning JC (2014) Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol* 15:423–430
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O’Rahilly S (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903–908
- Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, Rosato FE, Goldstein BJ (2002) Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5662–5667
- Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A (2011) Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480:104–108
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11:85–97
- Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA (2003) Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300:472–476
- Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF Jr, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O’Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS (2007) Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 116:1234–1241
- Qiao L, Yoo H, Bosco C, Lee B, Feng GS, Schaack J, Chi NW, Shao J (2014) Adiponectin reduces thermogenesis by inhibiting brown adipose tissue activation in mice. *Diabetologia* 57:1027–1036
- Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, Palmiter RD, Chawla A (2014) Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* 157:1292–1308
- Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, Grishin NV, Hyde R, Boerwinkle E, Valenzuela DM, Murphy AJ, Cohen JC, Hobbs HH (2012) Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19751–19756
- Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, Jedrychowski MP, Ruas JL, Wrann CD, Lo JC, Camera DM, Lachey J, Gygi S, Seehra J, Hawley JA, Spiegelman BM (2014) Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 157:1279–1291
- Ren G, Kim JY, Smas CM (2012) Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E334–E351
- Rosell M, Hondares E, Iwamoto S, Gonzalez FJ, Wabitsch M, Staels B, Olmos Y, Monsalve M, Giral M, Iglesias R, Villarroya F (2012) Peroxisome proliferator-activated receptors- α and - γ , and cAMP-mediated pathways, control retinol-binding protein-4 gene expression in brown adipose tissue. *Endocrinology* 153:1162–1173

- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746–26749
- Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE (2008) Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* 149:2270–2282
- Shapiro L, Scherer PE (1998) The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8:335–338
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793–1801
- Silva JE, Larsen PR (1985) Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest* 76:2296–2305
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123:215–223
- Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ (2002) Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E187–E192
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307–312
- Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA (2005) Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 25:1569–1575
- Tan BK, Adya R, Randeve HS (2010) Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 20:143–148
- Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F (2013) An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305:E567–E572
- Virtue S, Feldmann H, Christian M, Tan CY, Masoodi M, Dale M, Lelliott C, Burling K, Campbell M, Eguchi N, Voshol P, Sethi JK, Parker M, Urade Y, Griffin JL, Cannon B, Vidal-Puig A (2012) A new role for lipocalin prostaglandin d synthase in the regulation of brown adipose tissue substrate utilization. *Diabetes* 61:3139–3147
- Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697–738
- Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroya F, Cannon B, Rahmouni K, Lopez M, Vidal-Puig A (2012) BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149:871–885
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288–1295
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356–362
- Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, Gong DW (2006) Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1253–E1261
- Yi P, Park JS, Melton DA (2013) Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. *Cell* 153:747–758
- Youn BS, Kloting N, Kratzsch J, Lee N, Park JW, Song ES, Ruschke K, Oberbach A, Fasshauer M, Stumvoll M, Bluher M (2008) Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 57:372–377
- Zhang R (2012) Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophysical Res Commun* 424:786–792
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432