**Estudio de los mecanismos autoinmunes en las lipodistrofias adquiridas**

**Investigadores:**

* Margarita López Trascasa (Investigador Principal)
* Fernando Corvillo Rodríguez (Investigador predoctoral)

**Enfermedades raras estudiadas:**

* Síndrome de Barraquer-Simons (ORPHA:79087)
* Síndrome de Lawrence (ORPHA: 79086)

**PROYECTO**

**Antecedentes y estado actual**

*Complemento y enfermedad*

El complemento es un componente fundamental de la inmunidad innata, donde juega un papel crucial en la defensa contra infecciones, la eliminación de células apoptóticas, el procesamiento de inmunocomplejos y la modulación de la inmunidad adaptativa (1). El complemento es un complejo sistema molecular capaz de disparar señales de alarma ante la presencia de agentes extraños al organismo, de discriminar componentes propios y extraños y, mediante un sistema de etiquetado molecular, de identificar estos últimos para su eliminación por opsonofagocitosis o su destrucción mediante lisis celular directa. El complemento es un arma de doble filo que requiere una regulación estricta para focalizar su acción sobre la superficie responsable de su activación (patógenos, células apoptóticas o complejos inmunes), y para evitar que se consuma completamente tras dicha activación. Esto se consigue por la acción concertada de un conjunto de proteínas reguladoras en el plasma y en las superficies celulares que actúan a distintos niveles, pero sobre todo controlando la actividad de las enzimas C3/C5 convertasas, que son responsables del bucle de amplificación de la vía alternativa y limitan el depósito del fragmento activo C3b (la etiqueta molecular) sobre los componentes propios. La pérdida de regulación del complemento lleva inevitablemente a su consumo, con la generación masiva de componentes activos, y/o al daño accidental de los propios tejidos (2,3). La importancia de una correcta regulación del sistema del complemento se ve reflejada en diversas patologías, como el Síndrome Hemolítico Urémico atípico o la Glomerulopatía C3 (C3G), en cuya fisiopatología está implicada la vía alternativa del complemento.

*La Lipodistrofia Parcial Adquirida, Glomerulopatía C3 y desregulación del complemento: un fenómeno autoinmune*

Un reducido grupo de pacientes con C3G presentan una patología que afecta parcialmente al tejido adiposo, denominada Lipodistrofia Parcial Adquirida o Síndrome de Barraquer-Simons (APLC3; OMIM%613913). La relación entre la enfermedad renal y la lipodistrofia parcial se describió en el año 1958, y desde entonces este hecho ha sido confirmado en algo más de 250 casos, considerándose una enfermedad ultra-rara que debuta en la infancia. Más del 90% de los pacientes, la mayoría niñas, tienen niveles detectables de un autoanticuerpo responsable de la desregulación de la vía alternativa, el factor nefrítico (C3NeF) (4). Este anticuerpo, cuya diana es la convertasa de C3 de la vía alternativa, se encuentra en un porcentaje muy elevado de pacientes con C3G (5). Como consecuencia de la presencia de C3NeF en los pacientes con la APLC3, desarrollan una intensa hipocomplementemia y a medio-largo plazo esta situación puede hacer que se instaure una glomerulopatía, acabando gran parte de ellos en fracaso renal. Sin embargo, aunque la presencia de este anticuerpo se relaciona perfectamente con la alteración del complemento y la enfermedad renal, no está claro cuál es el punto exacto que conecta estos sucesos con la pérdida del tejido adiposo.

Spiegelman y colaboradores demostraron que los adipocitos murinos sintetizaban y secretaban una proteína que llamaron adipsina, la cual tenía una funciones relevantes para el desarrollo de este tipo celular (6). Años después, en humanos se encontró una proteína con una homología con adipsina superior al 98%. Esta proteína, una serín-proteasa llamada factor D (FD), tenía unas funciones clave en la activación de la vía alternativa del complemento (7). Además, a diferencia de la mayoría de las proteínas del complemento, que se sintetizan en el hígado, un 95% de FD circulante se sintetiza en el tejido adiposo (8). También el adipocito sintetiza C3, factor B (9) y properdina (10). Con estos datos, quedaba constancia de la importancia que tenía la vía alternativa en el tejido adiposo. Los adipocitos logran generar una convertasa de C3 (C3bBb) en su exterior, enriqueciendo el espacio extracelular con C3a, una potente anafilotoxina pro-inflamatoria. En un estudio independiente Sniderman y colaboradores describieron la presencia de un factor en suero capaz de estimular la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo humano, el cual recibió el nombre de Proteína Estimuladora de la Acilación (ASP por sus siglas en inglés). Después de secuenciarla, descubrieron que correspondía a C3desArg (11), un producto de la degradación de C3a en suero por la carboxipeptidasa N. Posteriores estudios revelaron que los adipocitos presentaban el receptor C5L2 (*C5a receptor-like 2*) en la superficie de la membrana plasmática, el cual une ASP para estimular la síntesis de triglicéridos (12). Esta interacción promueve la maduración de los pre-adipocitos en modelos múridos *in vitro* (13). Por otra parte, los niveles de ASP en humanos están incrementados en obesidad y diabetes tipo II, mientras que se reducen con el ejercicio y la pérdida de peso (14). Por tanto, la desregulación local de la vía alternativa parece estar ligada a síndromes metabólicos (8).

Dada la importancia del sistema del complemento en la biología del adipocito, es probable pensar que una desregulación de la vía alternativa como consecuencia de la presencia de C3NeF pueda ocasionar algún trastorno de la grasa. Esta posible relación fue analizada por Mathieson y su equipo, los cuales comprobaron que un suero de un paciente con APLC3 y C3NeF era capaz de lisar los adipocitos, mientras que el de un control no lo hacía (15). A pesar de ello, el mecanismo fisiopatológico del C3NeF en la APLC3 es desconocido, ya que el C3NeF no es un autoanticuerpo exclusivo de este síndrome, sino que aparece también, y en mayor proporción, en otras situaciones patológicas en las que no se produce lipodistrofia. Por tanto, deben existir otros factores fisiopatológicos que intervienen en el cuadro clínico y que son desconocidos o bien el C3NeF en estos pacientes tiene unas características bioquímicas diferentes a las del resto.

*Susceptibilidad genética a desarrollar APLC3*

La Lipodistrofia Parcial Adquirida no tiene una base genética clara en la actualidad. Los casos descritos son esporádicos, sin un patrón de herencia claro. Salvo excepciones, lo más normal es encontrar familias con un hijo afecto y padres y hermanos sanos. Un caso muy interesante, descrito en España, es el de dos hermanas HLA idénticas con APLC3 (16); sin embargo, no se practicó estudio genético. Otro trabajo elaborado por un grupo británico describió por primera vez una familia con un con APLC3 y C3G en la que la primera segrega con la presencia de C3NeF y la segunda con una mutación en el regulador de la vía alternativa factor H (17). El análisis de exoma no desveló ninguna variante genética en común a todos los miembros afectados por la lipodistrofia.

Recientemente, se ha asociado la susceptibilidad a desarrollar Lipodistrofia Parcial Adquirida con mutaciones en heterocigosis en el gen que codifica para la proteína de la envuelta nuclear denominada lamina B2 (*LMNB2*; OMIM#608709). Este grupo de pacientes con mutación en el gen *LMNB2* se diferencian de aquellos con alteraciones de complemento (APLC3) por varios aspectos: i) dos de las cuatro variantes encontradas también estaban presentes en controles normales; ii) el patrón de destrucción afectaba, principalmente, a las extremidades inferiores; iii) presentaban dislipemias, algo infrecuente en los pacientes con la APLC3; iv) los pacientes con mutaciones en el gen *LMNB2* no presentaban alteraciones en los niveles de C3, ni se les detectó C3NeF y, por tanto, no desarrollaron glomerulonefritis en todo el seguimiento del estudio (18). Por tanto, en caso de ser válida la hipótesis de mutaciones en el gen *LMNB2*, es probable que se trate de dos subgrupos de una misma enfermedad.

*Anticuerpos anti-adipocito y su relación con la desaparición del tejido adiposo subcutáneo*

En el año 1998 Hübler y su equipo describieron un caso de un paciente con Lipodistrofia Generalizada Adquirida (AGL, Síndrome de Lawrence) asociada a la presencia de anticuerpos dirigidos contra la membrana del adipocito (19). Sin embargo, los autores no identificaron el antígeno que reconocían esos autoanticuerpos, ni tampoco analizaron el sistema del complemento, pues en este tipo de lipodistrofia, a diferencia de la APLC3, lo que suele estar consumido es el componente C4 (20,21).

Existen numerosos ensayos en ratón o cerdo en los que se ha demostrado que generando anticuerpos monoclonales anti-adipocito y administrándolos a los animales, se produce una pérdida de grasa subcutánea de manera notable y variable. Además, se sabe que el mecanismo de destrucción del tejido adiposo en presencia de estos anticuerpos es dependiente del sistema del complemento (22-27).

*Situación actual*

En el año 2014 se nos concedió una ayuda del Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) para el análisis de exoma en dos familias con APLC3 que estábamos estudiando. Del resultado inicial no hemos podido establecer un marcador genético de susceptibilidad. Además, el Dr. David Kavanagh nos cedió los datos del exoma de una familia que él estudio hace años (17). Se analizaron los tres exomas con el fin de buscar alguna variante común, resultando negativo. Para la elaboración de este trabajo se utilizó la plataforma BIER de CIBERER, con la ayuda inestimable del grupo U715, dirigido por el Dr. Joaquín Dopazo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y dada la asociación de esta enfermedad con otros procesos autoinmunes, hemos dirigido nuestros objetivos a la búsqueda de autoanticuerpos dirigidos frente al adipocito en pacientes con APLC3 y AGL, que pudieran estar implicados en la destrucción del tejido adiposo. Por el momento hemos demostrado que la mayoría de los pacientes con lipodistrofias adquiridas tienen anticuerpos que van dirigidos al tejido adiposo, sustentando este resultado en que el mecanismo patogénico es de tipo autoinmune.

Es por tanto una prioridad para nosotros la identificación de biomarcadores en estos subtipos de lipodistrofias.

**REFERENCIAS**

1. Ricklin et al. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol 11, 785.
2. Walport MJ. (2001) Complement. Second of two parts. N Engl J Med. 344:1140-4.
3. Walport MJ. (2001) Complement. First of two parts. N Engl J Med. 344:1058-66.
4. Misra A et al. (2004) Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore). 83(1):18-34.
5. Paixão-Cavalcante D et al. (2012) Sensitive and specific assays for C3 nephritic factors clarify mechanisms underlying complement dysregulation. Kidney Int. 82(10):1084-92.
6. Hunt et al. (1986) Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. ProcNatlAcadSci U S A. 83(11):3786-90.
7. White RT et al. (1992). Human adipsin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. J BiolChem. 267(13):9210-3.
8. Morgan BP et al. (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? ClinExpImmunol. 107:1-7.
9. Choy LN et al. (1992) Adipsin and an endogenous pathway of complement from adipose tissue. J Biol Chem. 267(18):12736-41.
10. Gauvreau D et al. (2012) A new effector of lipid metabolism: complement factor properdin. MolImmunol. 51(1):73-81.
11. Sniderman AD et al. (1994) The adipsin-ASP pathway and regulation of adipocyte function. Ann Med. 26(6):388-93. Review.
12. Kalant D et al. (2003) The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a desArg77/acetylation-stimulating protein. J Biol Chem. 278(13):11123-9.
13. Maslowska M et al. (2006) Targeting the signaling pathway of acylation stimulating protein. J Lipid Res. 47(3):643-52.
14. Koistinen HA et al. (2001) Plasma acylation stimulating protein concentration and subcutaneous adipose tissue C3 mRNA expression in nondiabetic and type 2 diabetic men. ArteriosclerThrombVasc Biol. 21(6):1034-9.
15. Mathieson PW et al. (1993) Complement-mediated adipocyte lysis by nephritic factor sera. J Exp Med. 177:1827–1831.
16. Peces R.(2002) Partial lipodystrophy in two HLA identical sisters with hypocomplementemia and nephropathy. Nefrología. 22(6):564-9.
17. Wong EK et al. (2014) Characterization of a factor H mutation that perturbs the alternative pathway of complement in a family with membranoproliferative GN. J Am SocNephrol. 25(11):2425-33.
18. Hegele RA et al. (2006) Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. Am J Hum Genet. 79:383–389
19. Hübler A et al. (1998) Dysregulation of insulin-like growth factors in a case of generalized acquired lipoatrophic diabetes mellitus (Lawrence Syndrome) connected with autoantibodies against adipocyte membranes. ExpClinEndocrinol Diabetes. 106(1):79-84.
20. Sisson JG et al. (1976) The complement abnormalities of lipodystrophy. N Engl J Med. 1976 Feb 26;294(9):461-5.
21. Savage DB et al. (2009) Complement abnormalities in acquired lipodystrophy revisited. J ClinEndocrinolMetab. 94(1):10-6.
22. Cheng ML et al. (2010) Anti-adipocyte scFv-Fc antibody suppresses subcutaneous adipose tissue development and affects lipid metabolism in minipigs. ApplBiochemBiotechnol. 162(3):687-97.
23. Dickinson K et al. (2002) Antibody-induced lysis of isolated rat epididymal adipocytes and complement activation in vivo. Obes Res. 10(2):122-7.
24. Wu YJ et al. (2000) Abdominal fat pad mass reduction by in ovo administration of anti-adipocyte monoclonal antibodies in chickens. Poult Sci. 79(11):1640-4.
25. De clercq L et al. (1997) An anti-adipocyte monoclonal antibody is cytotoxic to porcine preadipocytes in vitro and depresses the development of pig adipose tissue. J Anim Sci. 75(7):1791-7.
26. Killefer J et al. (1990) Production of a novel monoclonal antibody to porcine adipocyte plasma membrane. ProcSocExpBiol Med. 194(2):172-6.
27. Wright JT et al. (1990) Adipose tissue development in the fetal pig examined using monoclonal antibodies. J Anim Sci. 68(4):1170-5.