

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Instituto de Estudios de Postgrado

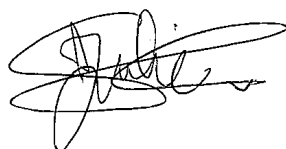
Máster de Investigación Biomédica Traslacional

Trabajo Fin de Máster

Caracterización de Rab18 en el metabolismo lipídico de adipocitos

Autor: Julia Sánchez Ceinos

Directores: María del Mar Malagón y Rafael Vázquez Martínez



Fdo.: Julia Sánchez Ceinos



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA



IMIBIC

INSTITUTO MAIMÓNIDES DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE CÓRDOBA

15/06/2015



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CELULAR, FISIOLÓGICA E
INMUNOLOGÍA



D^a María del Mar Malagón Poyato (Catedrática de Biología Celular), y **D. Rafael Vázquez Martínez** (Profesor Titular de Biología Celular), ambos pertenecientes al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que D^a **Julia Sánchez Ceinos**, Graduada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “*Caracterización de Rab18 en el metabolismo lipídico de adipocitos*”.

Y para que este conste, firmamos el presente documento en Córdoba, 15 de Junio de 2015.

Fdo.: **Prof. Dra María del Mar Malagón** Fdo.: **Prof. Dr. Rafael Vázquez Martínez**

Para la evaluación del trabajo, se proponen los siguientes revisores externos:

D^a Amaia Rodríguez Murueta-Goyena, Investigadora en el Laboratorio de Investigación Metabólica de la Clínica Universidad de Navarra y miembro del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición del Instituto de Salud Carlos III (atpacientecun@unav.es).

Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Valentí V, Moncada R, Silva C, Salvador J, Frühbeck G. Peripheral mononuclear blood cells contribute to the obesity-associated inflammatory state independently of glycemic status: involvement of the novel proinflammatory adipokines chemerin, chitinase-3-like protein 1, lipocalin-2 and osteopontin. 2015. *Genes Nutr.* 10: 460.

Méndez-Ginénez L, Becerril S, Moncada R, Valentí V, Ramírez B, Lancha A, Gurbindo J, Balaguer I, Cienfuegos JA, Catalán V, Fernández S, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Frühbeck G. Sleeve gastrectomy reduces hepatic steatosis by improving the coordinated regulation of aquaglyceroporins in adipose tissue and liver in obese rats. 2015. *Obes Surg.*

D. José Antonio Bárcena, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba (bb1barua@uco.es).

Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, Núñez E, Martínez-Acedo P, Pérez-Hernández D, Jorge I, Mesa R, Calvo E, Carrascal M, Hernández ML, García F, Bárcena JA, Ashman K, Abian J, Gil C, Redondo JM, Vázquez J. General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling. 2014. *J Proteome Res.* 13: 1234-47.

McDonagh B, Pedrajas JR, Padilla CA, Bárcena JA. Thiol redox sensitivity of two key enzymes of heme biosynthesis and pentose phosphate pathways: uroporphyrinogen decarboxylase and transketolase. 2013. *Oxid Med Cell Longev.* 932472.

ACRÓNIMOS

Acrónimos

A	Adrenalina
AA	Aminoácido
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
CCT	CTP:fosfocolina citidiltransferasa
CDP-colina	Citidinadifosfo-colina
cMyc-Rab18	pCMV-cMyc-Rab18
CPT	CDP-diacilglicerol fosfocolina transferasa
DAG	Diacilglicerol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DO	Densidad óptica
D-PBS	<i>Dulbecco-PBS</i>
FA	<i>Fatty acil</i>
FSV	Fracción del estroma vascular
GDP	Guanosín difosfato
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GFP-Rab18	phrGFP-N1-Rab18
GH	Hormona del crecimiento
GL	<i>Glycerolipid</i>
GLU	Glúcido
GP	<i>Glycerophospholipid</i>
GTP	Guanosín trifosfato
HSL	Lipasa sensible a hormonas
LD	<i>Lipid droplet</i>
LPL	Lisofosfolípido
MAG	Monoacilglicerol
MAM	<i>Mitochondria-associated membrane</i>
Mock	pCMV-cMyc

MSC	Célula madre mesenquimal
MTBE	<i>Methyl Tertiary Butyl Ether</i>
N₂	Nitrógeno
NA	Noradrenalina
NCS	<i>Newborn calf serum</i>
OMM	<i>Out membrane mitochondrial</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEMT	PE-metiltransferasa
PI	Fosfatidilinositol
PK	<i>Polyketides</i>
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PL	Fosfolípido
PLIN	Perilipina 1
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PR	<i>Prenol lipid</i>
PS	Fosfatidilserina
RE	Retículo endoplásmico
SAT	<i>Subcutaneous adipose tissue</i>
SL	<i>Saccharolipid</i>
SM	Esfingomiélinea
SP	<i>Sphingolipid</i>
ST	<i>Sterol lipid</i>
TA	Tejido adiposo
TAG	Triglicérido
TFM	Trabajo fin de máster
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i>
VIT	Vitamina
WAT	<i>White adipose tissue</i>

ÍNDICE

Índice General

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
2.1. El tejido adiposo	2
2.2. Composición celular del tejido adiposo	4
2.3. Regulación del metabolismo lipídico en adipocitos	4
2.4. Gotas lipídicas	5
2.4.1. <i>Composición proteica de las gotas lipídicas</i>	6
2.4.2. <i>Composición de fosfolípidos de las gotas lipídicas</i>	8
2.5. Interacción de las LDs con otros orgánulos celulares	10
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Material Biológico	14
4.1.1. <i>Cultivo de líneas celulares</i>	14
4.2. Electroporación de cultivos celulares	15
4.3. Aislamiento de MAMs	16
4.4. Aislamiento de LDs	16
4.4.1. <i>Precipitación de proteínas mediante acetona</i>	17
4.4.2. <i>Precipitación de proteínas mediante el método cloroformo/metanol</i>	17
4.4.3. <i>Obtención de extractos proteicos de los cultivos cel. electroporados</i>	18
4.5. Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia	18
4.5.1. <i>Inmunodetección</i>	19
4.6. Estudios de microscopía confocal	20
4.7. Estudio de lipidómica	21
4.7.1. <i>Ensayo 1</i>	21
4.7.2. <i>Ensayo 2</i>	22
RESULTADOS	
5.1. Distribución de Rab18 en membranas asociadas a mitocondrias (MAMs)	25
5.2. Lipidómica de LDs	27
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

Índice de Ilustraciones

Figura 1. Rutas biosintéticas de PC.	10
Figura 2. Rutas biosintéticas de PE y PC en las MAMs, entre RE, mitocondria y LD.	12
Figura 3. Fraccionamiento subcelular de adipocitos 3T3-L1.	26
Figura 4. Análisis de la colocalización de Rab18 (verde) con MitoTracker (rojo) en adipocitos 3T3-L1.	27
Figura 5. Electroporación de adipocitos 3T3-L1 con vector cMyc-Rab18 o con vector vacío (mock).	28
Figura 6. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa de extractos proteicos aislados a partir de adipocitos 3T3-L1.	29
Figura 7. Número de componentes lipídicos (fosfolípidos y ácidos grasos) identificados tras el análisis lipidómico de las fracciones enriquecidas en LDs del ensayo 2.	30

Índice de Tablas

Tabla 1. Vectores plasmídicos de expresión utilizados.	15
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los estudios de Western Blotting.	20
Tabla S1. Resultados obtenidos del primer análisis lipidómico de LDs de adipocitos 3T3-L1 en estado basal (electroporados con el vector de expresión cMyc vacío o mock) del ensayo 1.	43
Tabla S2. Resultados obtenidos del segundo análisis lipidómico de LDs de adipocitos 3T3-L1 en estado basal del ensayo 2.	45

RESUMEN

Resumen

Las gotas lipídicas (LDs) son orgánulos intracelulares que coordinan el almacenamiento y la movilización de los lípidos, siendo ambos procesos especialmente importantes en las células especializadas en la gestión de estos compuestos, los adipocitos. En estos procesos participan activamente otros orgánulos celulares, en interacción con las LDs, como el retículo endoplásmico (RE), las mitocondrias y los peroxisomas. Concretamente, existen zonas de contacto entre el RE y las mitocondrias, denominadas membranas asociadas a mitocondrias (MAMs), en las cuáles tiene lugar el transporte no vesicular de lípidos en ambos sentidos. Por este motivo, se propone que este sistema sirva, también, para suministrar lípidos a las LDs así como para enviar lípidos hacia las mitocondrias para su β -oxidación o para llevar a cabo etapas intermedias en la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos. De esta forma, se garantiza el *turnover* necesario a la hora de acumular lípidos en las LDs. Análisis proteómicos de LDs previos han identificado a la GTPasa de bajo peso molecular Rab18 como un componente de la superficie de la LD. Rab18 está involucrada en la regulación de los procesos de lipogénesis mediada por insulina y en la lipólisis inducida por estímulos β -adrenérgicos, probablemente facilitando la interacción de las LDs con membranas del RE y el intercambio de lípidos entre estos compartimentos. En este trabajo, se ha estudiado la localización intracelular de Rab18 en relación con mitocondrias y con las regiones especializadas de la membrana del RE que interaccionan con ellas, las MAMs. Mediante estudios bioquímicos y de imagen, se muestra que Rab18 está presente en toda la superficie de las LDs así como en áreas concretas de contacto con las mitocondrias que podrían corresponder con las MAMs. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que Rab18 podría facilitar el acercamiento y/o anclaje de LDs y mitocondrias a MAMs en adipocitos 3T3-L1. Además, el presente trabajo ha contribuido al desarrollo y validación de un método optimizado para establecer el lipidoma de LDs aisladas de adipocitos 3T3-L1, que permitirá conocer con detalle la composición lipídica de estos orgánulos y determinar los cambios que tienen lugar en células en respuesta a cambios en los niveles de expresión de Rab18. Los resultados obtenidos en el presente trabajo ayudarán a comprender mejor la función específica de esta GTPasa en relación al metabolismo lipídico y a los cambios adaptativos que experimenta en condiciones patológicas como obesidad y resistencia a insulina.

INTRODUCCIÓN

2.1. El tejido adiposo

Durante mucho tiempo, el tejido adiposo ha sido considerado como un mero depósito pasivo de grasa. Sin embargo, en la actualidad se acepta que constituye un depósito energético altamente dinámico, que almacena el exceso de energía en forma de triglicéridos (TAGs), mediante el proceso de *lipogénesis*, y lo libera, en periodos de deficiencia nutricional, de una forma estrictamente regulada (Ducharme y Bickel, 2008). Así, durante el ayuno, los TAGs son rápidamente hidrolizados a través de la activación de las vías lipolíticas y los ácidos grasos resultantes son transportados hasta otros tejidos, donde son utilizados como fuente de energía (Guilherme *et al.*, 2008). Además, el tejido adiposo constituye un sitio fundamental de captación de glucosa, que se utiliza con una doble finalidad: la producción de energía para el funcionamiento celular y la síntesis del glicerol requerido para la esterificación de los ácidos grasos y su almacenaje (revisado en Malagón *et al.*, 2013).

Los lípidos almacenados también se pueden utilizar como sustrato para la síntesis de otras moléculas fundamentales para la función celular, tales como los fosfolípidos de membrana. A su vez, los productos de la hidrólisis de TAGs, diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres, pueden actuar como moléculas señalizadoras, en adipocitos o en otros tipos celulares (Murphy, 2001; Kuerschner *et al.*, 2008). Concretamente, los ácidos grasos procedentes del tejido adiposo ejercen este papel mediante su unión a receptores nucleares, tales como los de la familia de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR; *Peroxisome proliferator-activated receptor*), que actúan como factores de transcripción regulando la expresión de numerosos genes (revisado en Christoloudides *et al.*, 2009). De esta forma, los ácidos grasos libres intracelulares en exceso pueden perturbar la integridad de la bicapa de fosfolípidos, alterar las vías de señalización de lípidos e inducir, entre otros procesos, la apoptosis (Mishra y Simonson, 2005). La esterificación de ácidos grasos libres con glicerol y el almacenaje de TAGs en los orgánulos celulares encargados de dicha función, las gotas lipídicas (LDs), proporcionan a las células una vía para regular la disponibilidad de sustratos para la utilización de energía y de las moléculas señalizadoras de naturaleza lipídica, así como de metabolitos potencialmente tóxicos.

Por otra parte, tras el descubrimiento de la leptina (Zhang *et al.*, 1994), se empezó a considerar al tejido adiposo como un verdadero órgano endocrino. Así, hoy en día se acepta que dicho tejido secreta, además de leptina, una gran variedad de hormonas y citoquinas con actividad biológica, genéricamente conocidas como adipoquinas (Kershaw y Flier, 2004). Las adipoquinas median la comunicación entre el tejido adiposo y otros órganos, como cerebro, músculo e hígado, para coordinar la homeostasis energética (Trayhurn y Wood, 2004), y, además, presentan funciones específicas en procesos como el control de la ingesta, la inmunidad, la inflamación y la reproducción (Guilherme *et al.*, 2008). Otras funciones en las que participa el tejido adiposo son el aislamiento térmico y como amortiguador para proteger los diferentes órganos de daños mecánicos (Marimam y Wang, 2010).

El tejido adiposo es un órgano complejo que se distribuye en múltiples localizaciones discretas, con grandes acumulaciones reconocidas como *depósitos*. Los principales depósitos grasos, constituidos por el tejido adiposo blanco (WAT), incluyen la grasa visceral (VAT) y la subcutánea (SAT) (Kelley *et al.*, 2000). El primero incluye el tejido adiposo omental, mesentérico y retroperitoneal así como el perigonadal (Wajchenberg, 2000), mientras que el tejido subcutáneo se localiza debajo de la piel a lo largo de todo el cuerpo (Shi *et al.*, 2009). A parte del WAT, los mamíferos contienen un segundo tipo de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón (BAT), con características metabólicas, celulares y bioquímicas diferentes de las del WAT. A diferencia del WAT, que está diseñado específicamente para el almacén de energía, el BAT se encarga de mantener la temperatura corporal vía termogénesis sin escalofrío mediante la disipación de la energía almacenada en forma de calor (Virtanen *et al.*, 2009). En relación con este descubrimiento, con posterioridad, se ha descrito la existencia de un tercer tipo de grasa: la grasa “beige” o “brite”, que, como el BAT, tiene capacidad termogénica, aunque presenta un patrón de expresión diferente a los adipocitos marrones clásicos (Wu *et al.*, 2012). De hecho, se ha propuesto que los adipocitos de grasa beige, que aparecen entremezclados entre los adipocitos del WAT, se corresponderían realmente con el BAT observado en individuos adultos (Wu *et al.*, 2012). Estos adipocitos beige están programados para ser bifuncionales, es decir, son empleados como almacén energético en ausencia de estímulos termogénicos, pero cuando reciben las señales apropiadas, son capaces de producir calor (Wu *et al.*, 2012).

2.2. Composición celular del tejido adiposo

El tejido adiposo está constituido por adipocitos maduros inmersos en una matriz de colágeno (Marimam y Wang, 2010), en la que también residen células madre mesenquimales, preadipocitos, terminaciones nerviosas, células sanguíneas y tejido vascular, que, en conjunto, constituyen la denominada fracción del estroma vascular (FSV) (Frayn *et al.*, 2003). Todos estos componentes son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo.

En concreto, los adipocitos constituyen el tipo celular más abundante del tejido. Son células esféricas y de tamaño muy variable, que puede oscilar entre 20 y 200 μm de diámetro. Los adipocitos blancos se caracterizan por contener una única gota lipídica central (LD, *lipid droplet*), y un núcleo plano localizado en la periferia celular (Bloor y Symonds, 2014). A pesar de estar prácticamente ocupados por la característica LD, los adipocitos también son ricos en orgánulos, que se localizan en la estrecha franja periférica que rodea a ésta. Por su parte, las células madre mesenquimales (MSCs) y los preadipocitos de la FSV permiten la renovación de las células maduras del tejido mediante el proceso de adipogénesis (Rodeheffer *et al.*, 2008).

2.3. Regulación del metabolismo lipídico en adipocitos

Tanto el almacenamiento como la movilización de la reserva energética contenida en las LDs están sometidos a un complejo sistema de regulación multifactorial. La insulina es el principal regulador endocrino de los procesos de captación y acumulación de lípidos (lipogénesis), mientras que la *lipólisis* está regulada por varias señales hormonales, principalmente catecolaminas y péptidos natriuréticos (Czech *et al.*, 2013; Moro *et al.*, 2004). Diversos factores autocrinos/paracrinos, como metabolitos y prostaglandinas o las propias adipoquinas secretadas por los componentes del tejido adiposo, también participan en su regulación (White, 2003).

Como ya se ha mencionado, la insulina es la hormona anabólica más potente que se conoce y es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Esta hormona se secreta por las células beta de los islotes pancreáticos en respuesta al aumento de los niveles circulantes de glucosa y aminoácidos después de una comida. La

insulina actúa sobre múltiples órganos y tejidos; en particular, respecto a los órganos relacionados con el metabolismo, la insulina reduce la producción de glucosa por el hígado y aumenta la tasa de absorción de glucosa en el músculo estriado (Shulman, 2000). En el tejido adiposo, la insulina ejerce múltiples acciones, desde la estimulación de la adipogénesis hasta la regulación de la entrada de glucosa y síntesis de TAGs, así como la inhibición de la lipólisis (Arner, 2003). Por su parte, las catecolaminas inducen la lipólisis en los adipocitos (Kolditz y Langrin, 2010). Específicamente, la adrenalina y la noradrenalina (A y NA, respectivamente) son los principales mediadores de la señalización adrenérgica en el tejido adiposo (Nielsen *et al.*, 2014).

Finalmente, existen rutas adicionales que regulan el metabolismo lipídico, ya sea directamente por la señalización mediada por receptor o indirectamente, por la remodelación de la cascada lipolítica. Algunos ejemplos son la hormona del crecimiento (GH) y los glucocorticoides, que estimulan potentemente la lipólisis en humanos (Hansen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003), así como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que actúa a través del receptor TNF-1 en adipocitos murinos (Sethi *et al.*, 2000) y humanos (Ryden *et al.*, 2002), promoviendo igualmente la hidrólisis de TAGs e inhibiendo el transporte de glucosa inducido por insulina.

2.4. Gotas lipídicas

Las gotas lipídicas o LDs son estructuras complejas y altamente dinámicas que, además de su papel central en la gestión de los recursos energéticos, participan en otros procesos tan relevantes como el almacenamiento y degradación de proteínas, la síntesis de membranas, la producción de moléculas derivadas de lípidos, la replicación viral o la protección frente a bacterias (Welte, 2015). El interés en la biología celular de este orgánulo se ha incrementado exponencialmente en la última década debido a la relación establecida entre las LDs y el desarrollo de enfermedades metabólicas (Konige *et al.*, 2013). A pesar de su importancia para la célula y la fisiología del organismo, se conoce relativamente poco acerca de muchos de los procesos básicos que ocurren en las LDs en diferentes tejidos.

Las LDs son estructuras de forma redondeada cuyo diámetro puede ser muy variable, oscilando entre 0,1 y 5 μm en células no adipocitarias y hasta 100 μm en

adipocitos blancos. Están constituidas por un núcleo de lípidos neutros, especialmente TAGs, ésteres de colesterol, ésteres de retinol y colesterol. Este núcleo hidrofóbico está rodeado por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian diversas proteínas (Walter y Farese, 2012; Reue *et al.*, 2011; Fujimoto y Parton 2011).

Las LDs están en remodelación constante, creciendo o disminuyendo. Actualmente se acepta que se forman a partir del retículo endoplásmico (RE) (Farese *et al.*, 2009). En condiciones de exceso de ácidos grasos, las LDs aumentan su volumen rápidamente (Farese *et al.*, 2009). Durante el crecimiento de las LDs, la síntesis de lípidos neutros y fosfolípidos se realiza de forma coordinada: a medida que aumenta el volumen de la LD y se expande su superficie, se necesitan los fosfolípidos para proteger el núcleo de lípidos neutros, reducir la tensión superficial y prevenir la coalescencia de las LDs presentes en la célula (Krahmer *et al.*, 2011). En este contexto, las proteínas que regulan la composición de fosfolípidos de las LDs son importantes para determinar su morfología y desempeñan un papel relevante en enfermedades relacionadas con el almacenamiento alterado de lípidos (Krahmer *et al.*, 2011).

2.4.1. Composición proteica de las gotas lipídicas

En los últimos años ha quedado claramente establecida la asociación de una gran variedad de proteínas a las LDs. Estas proteínas están implicadas en procesos muy diferentes que, entre otros, incluyen desde la regulación de la homeostasis lipídica a la biogénesis de las LDs, la síntesis de fosfolípidos de membrana y hormonas esteroideas, la señalización celular o el almacenamiento temporal y lipidación de ciertas proteínas (Walter y Farese, 2012; Konige *et al.*, 2013; Fujimoto y Parton, 2011). A continuación se detallan algunas de las proteínas asociadas a las LDs mejor caracterizadas hasta el momento.

En primer lugar, destaca, la familia PAT de proteínas de unión a LDs que, en mamíferos, comprende 5 miembros: perilipina (PLIN), ADRP, TIP47, S3-12, y OXPAT (Wolins *et al.*, 2006; Kimmel *et al.*, 2010). De todos ellos, sólo PLIN está asociada a la superficie de las LDs de forma constitutiva; el resto se translocan hasta la superficie de éstas bajo diferentes estímulos (Wolins *et al.*, 2006). Concretamente, PLIN actúa como una capa protectora previniendo la acción de las lipasas y juega un importante papel en

la movilización de grasa, ya que es fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) tras el estímulo de receptores β -adrenérgicos. La PLIN fosforilada sufre cambios conformacionales que derivan a la exposición de los TAGs acumulados en la LD a la acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Greenberg *et al.*, 1991). Por otra parte, la familia proteica CIDE se compone de 3 miembros. Concretamente, Cidec se expresa solamente en adipocitos blancos (revisado en Konige *et al.*, 2014) tanto en RE como en la superficie de las LDs (Qui *et al.*, 2008) y regula la lipólisis de los TAGs almacenados en las LDs (revisado en Gong *et al.*, 2011). Se ha propuesto que, además de inhibir la lipólisis, podría facilitar la fusión de las LDs (Puri *et al.*, 2007). Además, las LDs presentan proteínas de síntesis de TAGs, como GAPT4, que presenta una elevada expresión en tejido adiposo (Pol *et al.*, 2014) o DGAT2, que está implicada en el último paso de la generación de TAGs (Gidda *et al.*, 2011); ambas proteínas se han descrito, además, asociadas al RE (Gidda *et al.*, 2011).

Las LDs también presentan proteínas relacionadas con la regulación del tráfico intracelular, incluyendo proteínas SNARE y proteínas Rab (Zehmer *et al.*, 2009). Además, como veremos más adelante, estudios recientes han puesto de manifiesto la complejidad de las interacciones de las LDs, que pueden ser tanto homotípicas, con otras LDs, como heterotípicas, con otros orgánulos. Actualmente se propone que estas interacciones, en las que intervendrían las proteínas SNARE y Rab (Zehmer *et al.*, 2009), pueden constituir sitios de contacto inter-orgánulos o proporcionar un mecanismo de tipo hemifusión para facilitar la transferencia de lípidos (Murphy *et al.*, 2009). Respecto a la familia de GTPasas de pequeño tamaño Rab, se han descrito un total de 19 proteínas Rab distintas asociadas a la superficie de las LDs, en adipocitos y otros tipos celulares que pueden acumular LDs (p.e., hepatocitos) (Brasaemle *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Las proteínas Rab, pertenecientes a la superfamilia de GTPasas monoméricas Ras, actúan como interruptores moleculares, ya que alternan entre un estado activo, en el que la GTPasa está asociada a GTP, y un estado inactivo, en el que se encuentra unida a GDP y localizada en el citosol (Pfeffer, 2005). En cuanto a sus funciones, está ampliamente demostrado que las proteínas Rab intervienen en la regulación de todas y cada una de las fases del transporte intracelular de vesículas (Zerial y McBride, 2001).

En el caso particular de los adipocitos, sólo se han llevado a cabo estudios detallados sobre Rab5 y Rab18 (Liu *et al.*, 2007; Ohsaki *et al.*, 2006). La primera está

implicada en el tráfico intracelular del transportador de glucosa, GLUT4 (Kanzaki, 2006), mientras que diferentes estudios han mostrado la asociación de Rab18 a la superficie de las LDs en adipocitos, especialmente en condiciones de sobreexpresión de esta GTPasa (Ozeki *et al.*, 2005) o tras la estimulación de la lipólisis inducida por la activación mediada por el agonista β -adrenérgico isoproterenol (Martin *et al.*, 2005). Estos resultados condujeron a proponer que Rab18 podría participar en el tráfico de lípidos (Martin *et al.*, 2005). Además, se observó que la sobreexpresión de Rab18 provocaba un aumento significativo en la cantidad de membrana de RE que rodea a las LDs (Ozeki *et al.*, 2005), por lo que se propuso que esta GTPasa podría mediar la transferencia de lípidos entre estos dos compartimentos (Ozeki *et al.*, 2005). Recientemente, el grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFM, ha demostrado que, además de regular la lipólisis, Rab18 también participa en los procesos de síntesis de lípidos inducida por insulina (Pulido *et al.*, 2011). De hecho, la sobreexpresión de Rab18 en adipocitos murinos 3T3-L1 provoca un aumento del contenido en TAGs y del tamaño de las LDs, lo que indica que Rab18 podría facilitar la acumulación de lípidos mediada por insulina en estos orgánulos. Por último, estudios de expresión en tejido adiposo procedente de pacientes con distinto grado de obesidad y/o sensibilidad a insulina (Pulido *et al.*, 2011) y de diversos modelos murinos de obesidad (genética o inducida por dieta; Pulido *et al.*, 2013) han permitido mostrar que la expresión de Rab18 incrementa en relación al aumento de masa grasa, lo que también se observa igualmente en condiciones de ayuno, lo que apoyaría su papel en el *turnover* de los lípidos en los adipocitos. De hecho, cada vez existen más evidencias que apoyan la idea de que la lipólisis conlleva, además de la liberación de ácidos grasos, la re-esterificación de, al menos, una parte de los mismos, permitiendo así el reciclaje de los lípidos almacenados en las LDs.

2.4.2. Composición de fosfolípidos de las gotas lipídicas

La principal función de la monocapa de fosfolípidos es la separación del ambiente hidrofóbico del interior de las LDs del entorno acuoso proporcionado por el citosol. Para mantener la integridad de este orgánulo, su superficie debe protegerse de eventos de fusión espontánea con otras LDs y otros orgánulos de membrana. Durante la expansión rápida de las LDs, los diámetros de estos orgánulos pueden incrementarse

más de tres veces en cuestión de horas. Por tanto, las células necesitan sintetizar y transportar grandes cantidades de fosfolípidos para expandir la superficie de las LDs.

La monocapa de las LDs difiere en su composición de otras membranas celulares como las del RE, el aparato de Golgi o la membrana plasmática (Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Tanto en células de mamíferos como en levaduras, el fosfolípido mayoritario de la cubierta de las LDs es la fosfatidilcolina (PC), seguido de fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) (Leber *et al.*, 1994). De forma general, las LDs pueden contener otros fosfolípidos, normalmente en menores cantidades, aunque algunos estudios han demostrado la presencia de elevadas cantidades de esfingomielina (SM) en LDs aisladas de fibroblastos (McIntonch *et al.*, 2010) y adipocitos 3T3-L1 (Blouin *et al.*, 2010). El ácido fosfatídico, que es un intermediario en la biosíntesis de lípidos, no se ha encontrado en elevadas cantidades en las LDs. Sin embargo, el diacilglicerol (DAG), que es el producto generado a partir del ácido fosfatídico, sí que es capaz de acumularse en cantidades considerables en la superficie de las LDs (Chitraju *et al.*, 2012).

Una vez formadas, las LDs no intercambian membranas lipídicas con otros orgánulos mediante la vía canónica de transporte vesicular. Por el contrario, la expansión de su superficie y su remodelación dependen de otras rutas, que incluyen la síntesis local, el transporte monomérico mediado por proteínas y el transporte por sitios de contacto o continuidades de membrana (revisado en Penno *et al.*, 2013). La síntesis del fosfolípido mayoritario de la superficie de las LDs, la PC, se lleva a cabo a partir de dos rutas: la ruta Kennedy, que utiliza CDP-colina y DAG, y la ruta de la PE-metiltransferasa (PEMT), que conlleva la metilación de la PE (*Figura 1*).

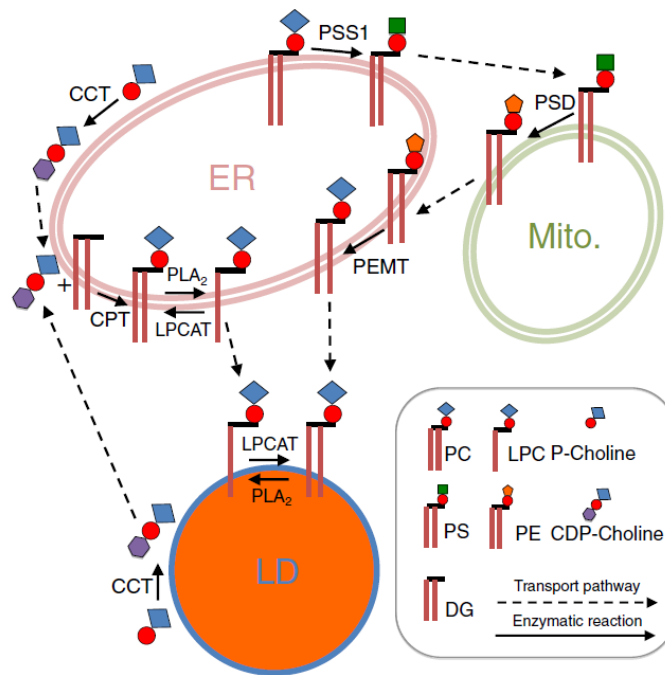


Figura 1. Rutas biosintéticas de PC. La PC puede sintetizarse a partir de la ruta de Kennedy por la acción secuencial de CCT y CPT. Además, hepatocitos y adipocitos pueden sintetizar PC a partir de la ruta PEMT. En esta ruta, el RE produce PS, que se transloca entonces a las mitocondrias, donde se forma PE que es enviada de nuevo al RE para la generación de PC. Tomado de Penno *et al.*, 2013.

La enzima CTP:fosfolina citidiltransferasa (CCT), que cataliza el paso limitante en la biosíntesis *de novo* de PC en la ruta de Kennedy, ha sido localizada recientemente en las LDs (Krahmer *et al.*, 2011). Sin embargo, las LDs no poseen la enzima responsable del último paso en la síntesis de PC, CDP-colina:diacilglicerol fosfolina transferasa (CPT) (Moessinger *et al.*, 2011), que se localiza en el RE. Consecuentemente, la actividad CCT de las LDs por sí sola no puede proporcionar fosfolípidos adicionales para la expansión de la superficie de estos orgánulos. En algunos tipos celulares, como hepatocitos y adipocitos, la PC puede ser sintetizada de forma alternativa por la ruta PEMT (Vance y Vance, 2004). Esta ruta de síntesis secuencial de PC a PS y, de ésta, a PE (catalizadas por las enzimas PS-sintetasa 1 y PS-descarboxilasa, respectivamente) y de PE a PC, catalizada por la enzima PEMT, tiene lugar en el RE y las mitocondrias en estrecha asociación con las LDs (Horl *et al.*, 2011).

2.5. Interacción de las LDs con otros orgánulos celulares

Actualmente se acepta que las LDs son orgánulos altamente dinámicos. Así, además de su asociación con proteínas reguladoras del tráfico intracelular, está

claramente establecido que las LDs interaccionan con otros orgánulos celulares, incluyendo el RE (Pol et al., 2014), las mitocondrias y los peroxisomas (Novikoff et al., 1980; Blanchette-Mackie et al., 1995)

Respecto al RE, aunque se han propuesto varios modelos para explicar la formación de las LDs, todos ellos coinciden en que este proceso ocurre en asociación con dicho compartimento celular (Ploegh, 2007). La hipótesis prevalente propone que la acumulación de lípidos neutros en el interior de la bicapa lipídica del RE conduce al engrosamiento de ésta y a la formación de una LD naciente en la cara citosólica de la membrana, en un proceso que podría estar dirigido por los lípidos neutros que se acumulan y sobresalen de la membrana, o por factores citosólicos que se unen a la membrana del RE y facilitan su salida (Londos et al., 2005).

En esta misma línea, se ha demostrado que la interacción entre mitocondrias y LDs en adipocitos media el intercambio de ácidos grasos para su oxidación, aunque se propone un papel más amplio de dicha interacción en el tráfico de lípidos ya que, en levaduras, donde los peroxisomas son los únicos orgánulos implicados en la β -oxidación, también existen asociaciones claras entre LDs y mitocondrias. Estas interacciones sirven de hecho para facilitar el transporte de fosfolípidos entre las membranas del RE y las mitocondrias, lo que ocurre en regiones especializadas del RE que se encuentran estrechamente asociadas a las mitocondrias (Gaigg et al., 1995) y que, por ello, se denominan *mitochondria-associated membranes* (MAMs) (Vance, 1990). Estos dominios se caracterizan por estar enriquecidos en ciertos lípidos y enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos. En las MAMs, las membranas del RE y las mitocondrias están separados por solamente 10-25 nm (Csordas *et al.*, 2006), una distancia que permite el contacto directo de proteínas y lípidos del RE con los de la membrana mitocondrial externa (OMM) (*Figura 2.*). Dos estudios proteómicos recientes de MAMs aisladas a partir de células y tejido cerebral de ratón (Zhang *et al.*, 2011; Poston *et al.*, 2013) han permitido la identificación de aproximadamente 1.000 proteínas diferentes, de las cuales sólo el 44% son comunes en ambos estudios. Sin embargo, todas las proteínas identificadas están involucradas en procesos biológicos relevantes, incluyendo el transporte no vesicular de fosfolípidos (Hayashi *et al.*, 2009). Además, diferentes proteínas de las vías de señalización de la insulina fueron indentificadas recientemente en la interfaz de las MAMs, como la proteína quinasa B (PKB) (Giorgi *et al.*, 2010).

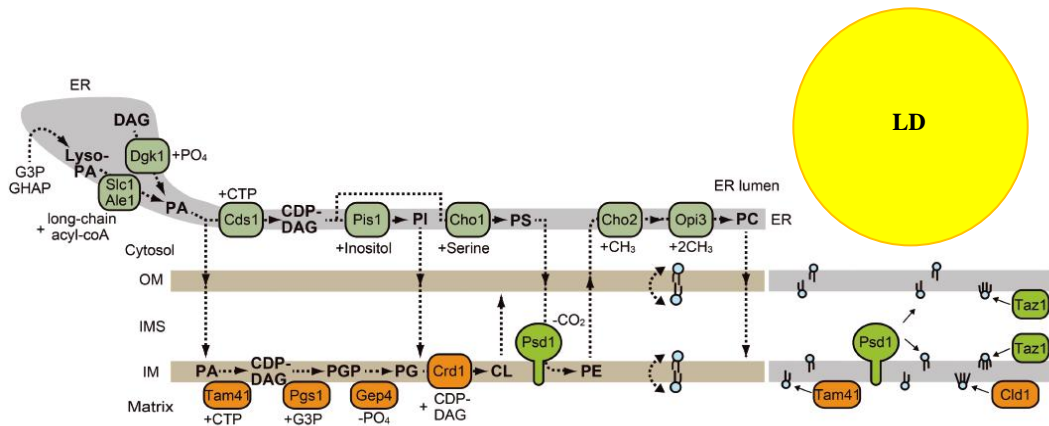


Figura 2. Rutas biosintéticas de PE y PC en las MAMs, entre RE, mitocondria y LD. El transporte de lípidos entre las membranas del RE y la mitocondria también podría darse entre estos orgánulos y las LDs que estén en íntimo contacto. Modificado a partir de Tamura *et al.*, 2014.

Por otro lado, al igual que lo observado para las mitocondrias, los peroxisomas se localizan frecuentemente cercanos a las LDs (Novikoff *et al.*, 1980). Los peroxisomas están implicados en una importante variedad de rutas metabólicas ligadas al metabolismo lipídico, incluyendo el catabolismo (α y β oxidación) de ácidos grasos de cadena muy larga (>22C) o ramificados, la biosíntesis de éter-fosfolípidos y ácidos biliares y el metabolismo del colesterol (Schrader, 2001). Se ha propuesto que los contactos LDs-peroxisomas deben facilitar el acoplamiento de la lipólisis de las LDs a la oxidación de los ácidos grasos resultantes en el peroxisoma (Ozeki *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2009).

En este contexto, estudios del grupo de investigación en el que se ha desarrollado este TFM han mostrado que las zonas de la superficie de las LDs enriquecidas en Rab18 establecen contactos, además de con las membranas del RE, con mitocondrias y peroxisomas, especialmente en condiciones de estimulación de la lipólisis o la lipogénesis (Rabanal, 2014). En el caso particular del RE, las LDs con Rab18 interactúan con subdominios enriquecidos en la enzima DGAT2, relacionada con procesos de lipogénesis (Martin, 2005) y que, curiosamente, se ha descrito que se localiza en las MAMs (Martin, 2005). El conjunto de estos resultados, junto con los datos previos que apoyan su participación en los procesos de lipogénesis y lipólisis (Pulido *et al.*, 2013, 2014), han llevado a proponer a esta GTPasa como un posible mediador de la interacción de las LDs con otros orgánulos relacionados con el metabolismo lipídico, participando en el transporte no vesicular de lípidos en ambos sentidos.

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Máster ha sido establecer las bases metodológicas para caracterizar Rab18 en la interacción entre las LDs y otros orgánulos celulares implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos, retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas, en el contexto de la regulación de la composición de las LDs en dichas células. Para conseguir este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la distribución de Rab18 en la intersección RE-mitocondrias, mediante el análisis de MAMs aisladas e imágenes de microscopía confocal.
2. Optimización de un protocolo de lipidómica de LDs aisladas para la caracterización del papel de Rab18 en la regulación del metabolismo lipídico mediado por RE, mitocondrias y peroxisomas.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Cultivo de líneas celulares

En el presente estudio, se ha utilizado la línea celular 3T3-L1 de células de tipo fibroblástico que provienen de embriones de ratón. Esta línea celular se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection; LGC Standars S.L.U., Barcelona) y fue cultivada siguiendo las indicaciones del comerciante, considerando que las células no alcanzaran un grado de confluencia superior al 70-80%, que puede interferir en su capacidad de diferenciación a adipocitos. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37 °C, con un 5% de CO₂. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando células de los pases 1 y 2.

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM, Lonza (Vervies, Bélgica)] con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con L-glutamina 4 mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), 1,4 g/L de bicarbonato sódico y suero de neonato bovino (NCS) al 10% (v/v) (GibcoBRL; Barcelona). Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas de 75 ó 150 cm² a una densidad de 2.000 células/cm², refrescándose 2 veces a la semana mediante el uso de una solución comercial de 0,5 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA (Sigma-Aldrich, Química S.A., Madrid). Las células obtenidas se sometieron a un test de viabilidad celular con azul tripán y posteriormente se sembraron en el soporte adecuado según la finalidad del experimento. De esta forma, las células dirigidas a estudios de microscopía fueron sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro, que fueron colocados sobre placas individuales de 35 mm de diámetro o placas de 6 pocillos. Las células utilizadas para la extracción de extractos proteicos se sembraron en placas individuales de 35 mm de diámetro o placas de 6 pocillos, y en el caso de las células destinadas a experimentos de electroporación, la siembra se realizó sobre placas de 150 mm de diámetro. En todos los casos, se mantuvo la misma densidad de siembra (3.000 células/cm²). Para su diferenciación, las células se dejaron crecer hasta alcanzar un 100% de confluencia y, en ese momento, se incubaron en DMEM con 4,5 g/L de glucosa suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/L), NCS al 10% (v/v) (PAA, Pasching, Austria), 10 µg/ml de insulina, 0,35 µM de dexametasona y 0,5 mM de IBMX (Medio de diferenciación I) durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron en DMEM con glucosa (4,5 g/L)

suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/L), NCS al 10% (v/v) e insulina (10 µg/ml) (Medio de diferenciación II), durante otras 72 horas. A partir de ese momento, los cultivos celulares se mantuvieron en DMEM con 4,5 g/L de glucosa suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica (1% v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/L) y NCS (10% v/v) (Medio de diferenciación III). El medio se renovó cada 48 horas, hasta que las células fueron utilizadas para las distintas manipulaciones experimentales (día 6 para los experimentos de electroporación; días 6-10 para estudios de microscopía).

4.2. Electroporación de cultivos celulares

La introducción de vectores plasmídicos de expresión en células 3T3-L1 se llevó a cabo mediante electroporación cuando las células se encontraban a día 6 de diferenciación. Se utilizó el sistema Gene Pulse Xcell (Biorad) y cubetas de 2 mm de grosor (Biorad). Cada electroporación se realizó en un volumen final de 100 µl de medio D-PBS (Dulbecco-PBS sin Mg²⁺ ni Ca²⁺; GibcoBRL), conteniendo cada cubeta 10 µg de vector. Los parámetros de electroporación consistieron en un voltaje de 0,11 Kv y 500 µF de capacitancia. Terminada la electroporación, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio completo y posteriormente sembradas en las placas correspondientes. Transcurridas 24 horas, se cambió el medio a las placas y a las 48 horas las células fueron utilizadas. En caso de los cultivos destinados a experimentos de imagen celular, los cubreobjetos se trataron con Colágeno Tipo I de cola de rata (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.) a una concentración de 0,77 mg/ml. En la *Tabla 1* se resumen los vectores utilizados en la electroporación de adipocitos 3T3-L1.

Nombre	Proporcionado por
pCMV-cMyc (<i>Mock</i>)	Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.)
pCMV-cMyc-Rab18 (cMyc-Rab18)	Grupo de Adipobiología (IMIBIC/HURS/UCO)
phrGFP-N1-Rab18 (GFP-Rab18)	Grupo de Adipobiología (IMIBIC/HURS/UCO)

Tabla 1. Vectores plasmídicos de expresión utilizados.

4.3. Aislamiento de MAMs

Para el aislamiento de fracciones enriquecidas en mitocondrias y MAMs ya descrito (Myhill *et al.*, 2008), se sembraron células 3T3-L1 en placas de 10 cm de diámetro hasta el día 10 de diferenciación. El fraccionamiento utilizado requiere la preparación previa de un gradiente de Optiprep (Sigma-Aldrich) comprendido entre 10-30% de concentración. Concretamente, las concentraciones de Optiprep utilizadas para el gradiente fueron: 30%, 25%, 20%, 15% y 10%. Se pusieron 620 µl de cada una de las concentraciones, de mayor a menor, en un tubo de centrifugación de 6 ml utilizando una jeringa de 1 ml. Una vez terminado el gradiente, se selló con parafilm y se mantuvo durante toda la noche a 4 °C para su equilibrio. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS frío y recogidas en 1,4 ml de tampón de homogeneización (sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM) con inhibidores de proteasas (PMSF y CLAP). La suspensión celular resultante se homogeneizó en un homogeneizador y se transfirió a una jeringa de 1 ml acoplada a una aguja de 25G, por la cual se hizo pasar 10 veces. Los núcleos fueron eliminados por centrifugación a 800 g durante 10 minutos a 4 °C. Por último, se pusieron 0,7 ml de muestra sobre el gradiente con la jeringa, obteniendo finalmente un volumen final de 3,8 ml. La mezcla se centrifugó durante 3 horas a 130.000 g a 4 °C, tras lo cual se recogieron 6 fracciones de 633 µl cada una: correspondientes a la suma de citosol, Golgi y LDs (fracciones 1 y 2), RE (fracciones 3-5) y a la suma de mitocondrias y MAMs (fracción 6). Todas ellas se precipitaron con acetona y fueron caracterizadas de forma individual mediante estudios de *Western Blotting* usando marcadores de diferentes compartimentos celulares (LDs, mitocondrias, RE, aparato de Golgi y citosol).

4.4. Aislamiento de LDs

Para el aislamiento de fracciones enriquecidas en LDs, las células transfectadas, con el vector de expresión de Rab18 o con el vector vacío correspondiente, se lavaron con D-PBS, se levantaron y se centrifugaron a 70 g. El pellet obtenido se resuspendió en 3 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, pH 7,4 e inhibidores de proteasas), se pasó 30 veces por una aguja 25G en hielo y se mezcló con un volumen igual (3 ml) de tampón de lisis que contenía 1,08 M de

sacarosa. Las células se centrifugaron a 1.500 g durante 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido incluye la fracción de núcleos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrifugación de 12 ml y se añadieron secuencialmente 2 ml de tampón de sacarosa al 0,27 M, 2 ml de tampón de sacarosa 0,135 M y 2 ml de Top Solution (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, pH 7,4). La mezcla se centrifugó a 150.500 g durante 2 horas a 4 °C. Se recogieron 8 fracciones, correspondientes a las LDs (fracciones 1 y 2), zona intermedia entre LDs y citosol (fracciones 3 y 4), y el citosol (fracciones 5-7). La fracción 8 y el *pellet* constituyen la fracción total de membrana. Esta fracción de membrana así como la fracción de núcleos se solubilizaron en 1,5 ml de tampón Top Solution. Para eliminar los lípidos de las fracciones 1-2 conteniendo las LDs, se utilizó el protocolo de precipitación con acetona, mientras que el resto de las fracciones obtenidas del gradiente se precipitaron utilizando cloroformo/metanol. Dichas fracciones fueron caracterizadas de forma conjunta mediante estudios de *Western Blotting* usando marcadores de diferentes compartimentos celulares (LDs, RE y citosol).

4.4.1. Precipitación de proteínas mediante acetona

Para llevar a cabo este protocolo, se añadieron 4 volúmenes de acetona fría por cada volumen de proteína, y la mezcla correspondiente se mantuvo a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó la mezcla a 1.400 g durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante con cuidado para no perder el *pellet*. Se añadieron 100 µl de metanol frío para eliminar la acetona y se centrifugó de nuevo a 1.400 g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se eliminó el metanol y se dejó secar el *pellet* para luego resuspenderlo en 40 µl de tampón de carga 1,5X para su posterior análisis por *Western Blotting*.

4.4.2. Precipitación de proteínas mediante el método cloroformo/metanol

La precipitación de proteínas mediante el método cloroformo/metanol permite la eliminación de restos de sales y detergentes de la muestra. Para ello, y por cada 100 µl de muestra, se añadieron en orden sucesivo 400 µl de metanol, 100 µl de cloroformo y 300 µl de H₂O destilada, mezclando siempre mediante vórtex tras cada paso. La mezcla se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 g y se eliminó la capa acuosa superior. Posteriormente, se añadieron de nuevo 400 µl de metanol y se centrifugó 2 minutos a

14.000 g. Finalmente, se eliminaron los restos de metanol y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 40 µl de tampón de carga 1,5X para su posterior análisis por *Western Blotting*.

4.4.3. Obtención de extractos proteicos de los cultivos cel. electroporados

Aparte de los cultivos destinados a la separación de las LDs, se prepararon cultivos paralelos bajo las mismas condiciones experimentales, que se utilizaron para investigar la eficacia del proceso de sobreexpresión. Así, 72 h tras la electroporación, los cultivos celulares se lavaron tres veces con PBS 0,01 M, pH 7,4, y se trataron con tampón de extracción RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v) y SDS 0,1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 µg/mL, leupeptina 5 µg/mL, antipaina 5 µg/mL y peptatina A 5 µg/mL). Las células se despegaron en un volumen adecuado de tampón de extracción (entre 300 y 500 µl). A continuación, los extractos se homogeneizaron con ayuda de una jeringa de 1 ml y aguja de 25G y sonicación (3 pulsos de 3 segundos, cada uno). Los homogenados fueron incubados durante 30 minutos en hielo y, posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 9.000 g a 4 °C para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se procesaron y conservaron a -20 °C hasta su análisis mediante *Western Blotting*. Todos los lavados, homogeneización e incubaciones se realizaron en hielo.

4.5. Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia

Una vez obtenidos los diferentes extractos, se determinó la concentración de proteína total presente en cada muestra utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se diluyó la muestra a la mitad (dilución 1:2) y se mezclaron 5 µl de la muestra y 200 µl de reactivo de Bradford. Tras incubar 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, se determinó el valor de densidad óptica (DO) a 595 nm mediante espectrofotometría. La proteína total del extracto se determinó en relación a una recta patrón de BSA (de 0 a 1,5 mg/mL). Posteriormente, las muestras se prepararon para su separación electroforética mezclando 4 volúmenes del extracto proteico con un volumen de tampón de carga 5X [Tris-HCl 500 mM, SDS 7,5% (m/v), EDTA 10 mM, sacarosa 50% (m/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), DTT 250 mM, azul de

bromofenol 5 mg/mL, pH 6,8] y se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas de la muestra. Una vez preparado los extractos proteicos, se sometieron (aproximadamente 40 µg de proteína por ensayo) a electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Madrid). La electroforesis se realizó en geles con un porcentaje de poliacrilamida del 10%. La migración se llevó a cabo con un voltaje inicial de 80 V hasta que las muestras pasaran el gel *stacking* (poliacrilamida al 4%) seguido de un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de migración llegara al final del gel. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corp., Pensacola, FL, EE.UU.). La transferencia transcurrió a un voltaje constante de 60 V durante 75 minutos y con recirculación continua del tampón de transferencia previamente enfriado [Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 0,2% (m/v), metanol al 20% (v/v)]. Terminada la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau [Ponceau S al 0,1% (m/v) en ácido acético al 1% (v/v)] durante 5 minutos para comprobar que la transferencia había sido correcta en todos los casos. Finalmente, los restos de Rojo Ponceau fueron eliminados con tres lavados de 5 minutos con ácido acético al 1%.

4.5.1. Inmunodetección

Las membranas fueron incubadas con tampón de lavado TTBS [TBS conteniendo Tween-20 al 0,05% (v/v)] y bloqueadas durante 1 hora con tampón de bloqueo [TBS (Tris-HCl 150 mM, pH 7,5), Tween 20 al 0,05% (v/v) (TTBS) y leche desnatada en polvo (Biorad) al 5% (m/v)]. Después, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Las características de los diferentes anticuerpos primarios utilizados se resumen en la *Tabla 2*. A continuación, las membranas se lavaron tres veces durante 15 minutos con tampón de lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, España) en tampón de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces durante 15 minutos con tampón de lavado. El revelado de la peroxidasa se llevó a cabo con el kit de detección de la peroxidasa basado en quimioluminiscencia (ECL-Plus GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) y películas auto-radiográficas (BioMax XAR Kodak, Sigma) o mediante un sistema de documentación de geles (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare, Barcelona). Tras el revelado, las películas y/o membranas se escanearon.

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Anti-Rab18	Conejo	1/500	Sigma-Aldrich (Madrid)
Anti-Rab34	Conejo	1/500	Sigma-Aldrich (Madrid)
Anti-Perilipina	Cobaya	1/2000	Progen (Heidelberg, Alemania)
Anti-Calnexina	Cabra	1/100	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania)
Anti-cMyc	Ratón	1/1000	AbD Serotec (Oxford, Reino Unido)
Anti- β -Actina	Ratón	1/50000	Sigma-Aldrich (Madrid)
Anti-GM130	Ratón	1/750	BD Biosciences (Bedford, MA)
Anti-Mitofilina	Conejo	1/500	Abcam (Cambridge, Reino Unido)

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los estudios de Western Blotting.

4.6. Estudios de microscopía confocal

Para determinar la posible colocalización de Rab18 en la interfase LDs-mitocondrias se analizó la distribución de la proteína exógena unida a un marcador fluorescente en relación a estos orgánulos celulares. Para ello, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 previamente electroporados con el vector GFP-Rab18 e incubadas con el marcador vital Mitotracker Red CMXRos 250 nM (Invitrogen, Barcelona), durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4% (m/v) a temperatura ambiente en tampón PBS [PBS 0,01M pH 7,4] durante 4 minutos. El exceso de paraformaldehído fue eliminado mediante tres lavados con tampón PBS y finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje de PBS:Glicerol (1:1).

Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía confocal utilizando un equipo LSM 5 Exciter (Carl Zeiss, Alemania). Para la adquisición de la señal de GFP, las muestras fueron excitadas a 488 nm y se adquirió la fluorescencia emitida entre 500 y 550 nm. En el caso del Mitotracker, la excitación se realizó a 543 nm y se recogió la emisión entre 610 y 700 nm. Dependiendo de la localización de la señal fluorescente y del tamaño celular, se adquirieron entre 10 y 20 planos focales por cada canal. El conjunto de todos los planos para cada célula y canal fueron sometidos a

un proceso de deconvolución con el software Huygens Essential 2.4.4 (SVI, Hilversum, Holanda) y se procesaron y analizaron utilizando el programa Image J 1.40g. En los ensayos llevados a cabo con el fin de estudiar la asociación con otros orgánulos de las Rab18-LDs se trabajó sobre la población de LDs que presentaban Rab18 claramente asociado a su superficie. Todas las gotas se analizaron con Image J 1.40g para obtener los coeficientes de colocación de Mander. Este parámetro mide el grado de solapamiento entre dos señales y asigna un valor numérico entre 0 y 1, donde 0 indica la falta de solapamiento de señales y 1 implica coincidencia total de las dos señales. Se consideró colocación entre dos señales cuando el índice de colocación de Mander superó un valor de 0,1 u.a. Por debajo de este valor se consideró que las señales fluorescentes no coincidían.

4.7. Estudios de lipidómica

Con el fin de optimizar el proceso de extracción lipídica, se realizaron varios ensayos con protocolos diferentes sobre las fracciones enriquecidas en LDs obtenidas mediante el protocolo de aislamiento detallado en el apartado “*Aislamiento de LDs*”.

4.7.1. Ensayo 1

Se realizaron dos ensayos iniciales de optimización con células 3T3-L1 electroporadas con el vector vacío (*Mock*). En el primero de ellos, se tomaron por separado las fracciones F1 y F2 del primer experimento de aislamiento de LDs y, en el segundo, se mezclaron las dos fracciones correspondientes a un segundo aislamiento de LDs. Dichas muestras fueron liofilizadas (Departamento de Genética, Universidad de Córdoba) y, posteriormente, se extrajeron los lípidos contenidos en las mismas por el método del MTBE que se detalla a continuación. Finalmente, las muestras fueron enviadas al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, donde se analizaron mediante un cromatógrafo acoplado a espectrofotómetro de masas de triple cuadrupolo (Qq0 modelo 6460, Agilent Tech) equipado con fuente de ionización de electrospray. La posterior identificación de los compuestos biológicos se llevó a cabo mediante la utilización de dos bases de datos diferentes: METLIN

(<https://metlin.scripps.edu/index.php>) o la del propio sistema (Agilent), con el fin de comparar ambos resultados.

Protocolo 1: Extracción de Lípidos con MTBE

1. Añadir al liofilizado 2,5 ml de MTBE (Fisher Scientific, EE.UU.) e incubar 1 h a temperatura ambiente en agitación.
2. Añadir 625 μ l de agua destilada e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación.
3. Centrifugar a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C y recoger la fase superior con ayuda de una pipeta pasteur.
4. La fase inferior se reextrae con 2,5 ml de MTBE y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente en agitación.
5. Añadir 625 μ l de H₂O destilada e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación.
6. Centrifugar a 100 g durante 10 minutos, a 4 °C, y recoger la fase superior combinándola con la anterior.
7. Evaporar el disolvente con una corriente de N₂, sellar con parafilm y almacenar a -20 °C hasta su uso.

Todo el material utilizado para la extracción de lípidos fue de vidrio y previamente limpiado con mezcla crómica [800 ml de ácido sulfúrico (Fisher Scientific) con 100 g de dicromato potásico (Sigma, España) y 100 ml de agua destilada].

Los resultados obtenidos a partir de este ensayo revelaron que la mezcla de ambas fracciones (F1 y F2) diluía demasiado la muestra, dificultando con ello la identificación de los lípidos presentes en la misma, por lo que a partir de este momento, las fracciones F1 y F2 se analizaron siempre de forma independiente.

4.7.2. Ensayo 2

En un segundo set de experimentos, se liofilizaron las fracciones F1 y F2 de forma independiente de dos réplicas de LDs aisladas a partir de células 3T3-L1 que fueron electroporadas con el vector vacío (*mock*). A partir de las mismas, se extrajeron

los lípidos por dos métodos diferentes: MTBE y Cloroformo/Metanol. Estos procedimientos presentan ciertas modificaciones con respecto al protocolo original tomado de referencia, que se detallan a continuación. Concretamente, se añadió ácido fórmico a las mezclas de extracción para mejorar el rendimiento de la técnica. Una vez finalizado el protocolo de extracción correspondiente, las muestras fueron enviadas al Departamento de Química Analítica (UCO) para su análisis. Para estos ensayos, y antes de realizar los estudios de cromatografía, las fracciones se pasaron o no a través de columnas SPE (*Hybrid-Phospholipid*; Sigma-Aldrich), con el fin de evaluar la eficacia de la concentración previa de los lípidos de las muestras. La posterior identificación de los compuestos biológicos se llevó a cabo mediante la utilización de la base de datos METLIN.

Protocolo 2: Extracción de lípidos con MTBE + Ácido Fórmico

1. Añadir al liofilizado 2,5 ml de MTBE conteniendo ácido fórmico (Fisher Scientific) al 0,1% e incubar 1 h a temperatura ambiente en agitación.
2. Añadir 625 μ l de agua destilada e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación.
3. Centrifugar a 1000 g durante 10 minutos, a 4 °C, y recoger la fase superior con ayuda de una pipeta pasteur.
4. La fase inferior se reextrae con 2,5 ml de MTBE conteniendo ácido fórmico al 1%. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente en agitación.
5. Añadir 625 μ l de agua e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación.
6. Centrifugar a 100 g durante 10 minutos, a 4 °C, y recoger la fase superior combinándola con la anterior.
7. Evaporar el disolvente con una corriente de N₂, sellar con parafilm y almacenar a -20 °C hasta su uso.

Protocolo 3: Cloroformo/Metanol + Ácido Fórmico

1. Añadir al liofilizado 1,5 ml de Metanol (*Analytical reagent grade*, Fisher Scientific), 1,5 ml de Ácido Fórmico al 0,3% y 1,5 ml de Cloroformo frío (Carlo Erba, Barcelona). Agitar en vórtex durante 2 minutos.
2. Centrifugar a 1000 g durante 15 minutos, a 4 °C. Eliminar la fase superior, trasvasar la interfase a un nuevo tubo y guardar la fase inferior.
3. La interfase proteica se reextrae con 1,5 ml de Metanol, 1,5 ml de Ácido Fórmico al 0,3% y 1,5 ml de Cloroformo frío. Agitar en vórtex durante 2 minutos.
4. Centrifugar a 1000 g durante 10 minutos, a 4 °C. Recoger la fase inferior y combinar con la fase inferior anterior.
5. Evaporar el disolvente con una corriente de N₂, sellar con parafilm y almacenar a -20 °C hasta su uso.

RESULTADOS

5.1. Distribución de Rab18 en membranas asociadas a mitocondrias (MAMs)

Como se ha indicado en apartados anteriores, este trabajo se basa en resultados previos obtenidos por el grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFM (Rabanal, 2014) que demostraban la localización de Rab18 en subdominios de las LDs que interaccionan con otros orgánulos celulares relacionados con el metabolismo lipídico, retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas, sugiriendo un papel para esta GTPasa en la interfaz entre dichos orgánulos, como posible mediador del intercambio de lípidos que tiene lugar entre los mismos. Dada la conocida interacción entre RE y mitocondrias, que ocurre en las denominadas MAMs (Vance, 1990), y la implicación de éstas en el tráfico de lípidos (Hayashi *et al.*, 2009), en este trabajo nos planteamos determinar en primer lugar la posible localización de Rab18 en MAMs. Para ello, utilizamos análisis bioquímicos de MAMs aisladas, así como estudios de microscopía confocal.

En primer lugar, se llevó a cabo el aislamiento de MAMs mediante subfraccionamiento celular en gradiente de Optiprep a partir de adipocitos 3T3-L1. Los extractos proteicos recogidos de cada fracción fueron procesados para su análisis mediante *Western Blotting*. En la *Figura 3*. se muestra un inmunoblot de las distintas fracciones del gradiente, en el que se puede observar el enriquecimiento de las fracciones más ligeras (F1 y F2) en los marcadores de LDs (PLIN), citosol (β -actina) y membranas del aparato de Golgi (GM130). Por su parte, la fracción más pesada (F6) sólo presentó inmunoreactividad para el marcador de mitocondrias y MAMs, mitofilina. En cambio, la inmunoreactividad para Rab18 se distribuyó a lo largo del gradiente, siendo predominante en las fracciones F1 y F2 de acuerdo a su presencia en la superficie de LDs en su estado activo y en el citosol en su estado inactivo (Pfeffer, 2005), así como en la fracción F6 enriquecida en mitocondrias y MAMs. Como control en el estudio, determinamos la distribución de otra proteína Rab, Rab34, en el gradiente. Estudios inmunocitoquímicos del laboratorio (Trávez *et al.*, 2015) nos han permitido demostrar que Rab34 se asocia tanto a las membranas del aparato de Golgi como a las LDs, lo que coincide con la distribución de esta GTPasa en el gradiente mostrado en la

Figura 3., para la que sólo aparece banda inmunoreactiva en las fracciones donde se separan estos orgánulos (F1 y F2).

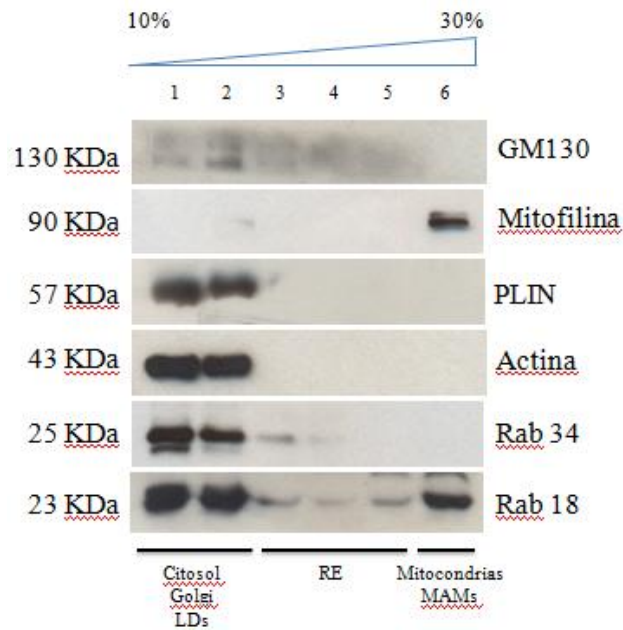


Figura 3. Fraccionamiento subcelular de adipocitos 3T3-L1. La validación del fraccionamiento se llevó a cabo utilizando α -actina como marcador de citosol, GM130 como marcador del aparato de Golgi y perilipina (PLIN) como marcador de las LDs, que se separan en las fracciones más ligeras, y mitofilina como marcador de mitocondrias, que se separan, asociadas a las MAMs en las fracciones más densas.

Para poder discernir entre mitocondrias y MAMs y poder así desvelar la localización exacta de Rab18 en esta interfase se recurrió a la microscopía confocal sobre adipocitos 3T3-L1 transfectados con el vector GFP-Rab18 e incubados con el marcador vital de mitocondrias MitoTracker. Como se muestra en la *Figura 4.*, la fluorescencia de GFP-Rab18 no se asocia de forma evidente a las mitocondrias, si no que se concentra fundamentalmente en zonas discretas de la superficie de las LDs. Existen, no obstante, algunas regiones donde las dos señales fluorescentes coinciden puntualmente (ver flecha de la *Figura 4.*), que podrían corresponder a las zonas de intersección RE-mitocondrias (p.e. MAMs).

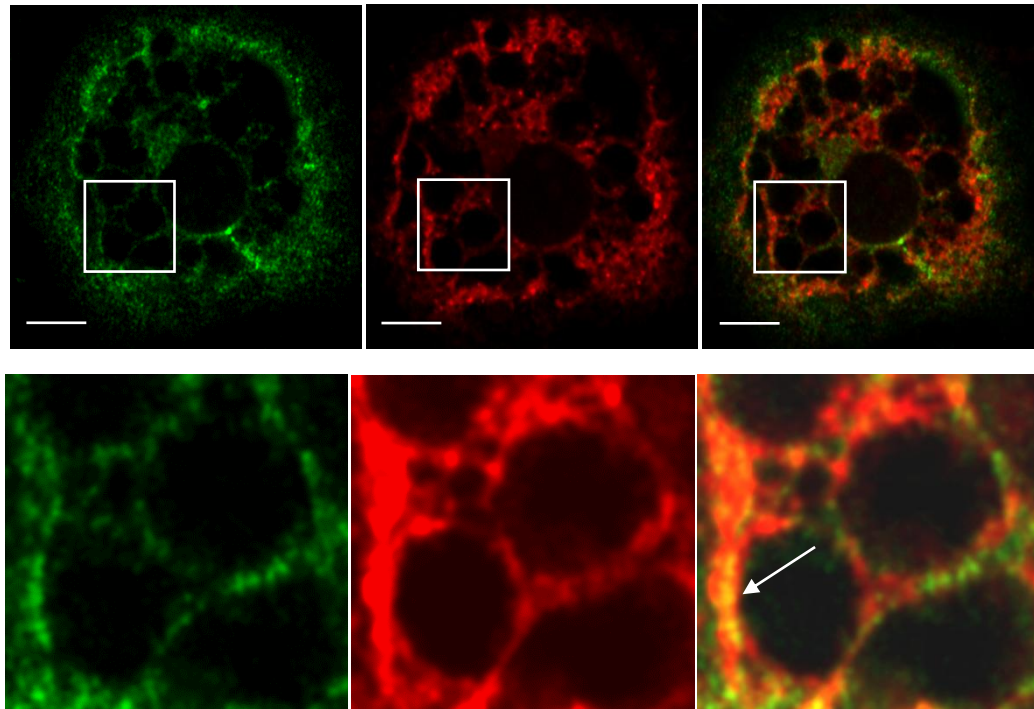


Figura 4. Análisis de la colocalización de Rab18 (verde) con MitoTracker (rojo) en adipocitos 3T3-L1. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 sometidas a la electroporación con el vector de expresión GFP-Rab18. Las células fueron, posteriormente, procesadas para inmunofluorescencia con el marcador mitocondrial MitoTracker. Adipocito completo (paneles superiores) y aumento de una zona rica en LDs (paneles inferiores) con ambos marcajes por separado y la combinación de ambos o Merge. La flecha señala la colocalización de Rab18 y mitocondrias en amarillo. Barra de escala, 5 μ m.

5.2. Lipidómica de LDs

En relación a los resultados anteriores, y los datos proporcionados por Y. Rabanal en su Tesis Doctoral (2014), que sugerían la participación de Rab18 como mediador molecular en el intercambio de lípidos entre las LDs y los compartimentos de RE, mitocondrias y peroxisomas, nos planteamos comprobar dicha hipótesis mediante el análisis lipidómico de LDs aisladas de células 3T3-L1 que sobreexpresan Rab18 vs. células 3T3-L1 control (i.e. *mock*). Esto suponía, por una parte, aislar LDs de los dos grupos experimentales y, por otra, optimizar la técnica de extracción de lípidos de las mismas para conseguir la mayor sensibilidad y especificidad mediante la aproximación lipidómica.

Para abordar la primera parte, se llevaron a cabo 6 ensayos distintos de aislamiento de LDs a partir de cultivos independientes de adipocitos 3T3-L1

electroporados con los vectores cMyc-Rab18 o cMyc vacío (*mock*). Así, 48 h tras la transfección, se recogieron los extractos proteicos obtenidos en cada ensayo, que fueron procesados para su análisis mediante *Western Blotting*. Este análisis tenía como finalidad evaluar y confirmar la sobreexpresión de Rab18, mediante la determinación del marcador cMyc, en cada una de las 6 réplicas realizadas, de forma previa a la realización del análisis subsiguiente de los mismos mediante aproximaciones lipidómicas. En la *Figura 5*, se muestran los 6 inmunoblots correspondientes, en los que se puede observar la ausencia de inmunoreactividad de cMyc en la zona de la membrana correspondiente al peso molecular de cMyc-Rab18 (23 KDa) para los extractos de células transfectadas con el vector vacío (*mock*) y la presencia de una banda inmunoreactiva del tamaño adecuado en extractos de células transfectadas con el vector cMyc-Rab18. Este patrón de distribución se repitió en cada una de las réplicas. Como marcador interno de carga se utilizó β -actina que, como se puede observar en el blot, mostró una intensidad de inmunorreacción similar en extractos de células *mock* y de células transfectadas con cMyc-Rab18 en todas las réplicas. Estos resultados confirmaron que el proceso de electroporación fue eficaz y que las células expresaban cantidades elevadas de la proteína exógena.

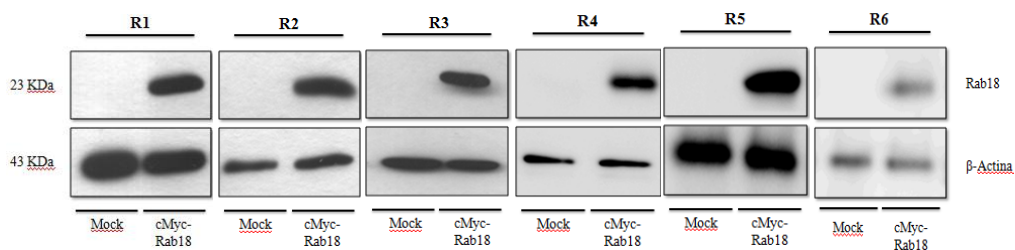


Figura 5. Electroporación de adipocitos 3T3-L1 con vector cMyc-Rab18 o con vector vacío (mock). La validación de la electroporación se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-cMyc para detectar la proteína Rab18 fusionada a cMyc (23 kDa) en los 6 ensayos distintos de electroporación que se llevaron a cabo en el estudio (R1-R6). Como control del proceso, las membranas se inmunotifieron con un anticuerpo contra la proteína citosólica β -actina.

Además de confirmar la eficacia de la electroporación de los cultivos celulares utilizados, también se llevó a cabo el análisis bioquímico de las fracciones obtenidas tras la separación de los extractos proteicos en gradientes de sacarosa para el aislamiento de las LDs. En particular, realizamos estudios de *Western Blotting* para determinar la presencia de marcadores moleculares de diferentes orgánulos en las distintas fracciones celulares derivadas del gradiente de sacarosa. En este caso, las 9 fracciones obtenidas se agruparon en tres para separar los siguientes compartimentos

celulares: fracciones F1 y F2, correspondientes a las LDs, fracciones F3-F7, correspondientes al citosol, y fracciones F8 y F9, que incluye las membranas celulares (Pulido et al., 2011). En la *Figura 6*, se muestra un inmunoblot de las distintas fracciones del gradiente, en el que se puede observar el enriquecimiento de las fracciones más ligeras (F1 y F2) en el marcador de LDs, perilipina (PLIN), de las fracciones más pesadas (F8 y F9) en el marcador de microsomas, calnexina, y de las fracciones intermedias (F3-F7) en el marcador de citosol, β -actina.

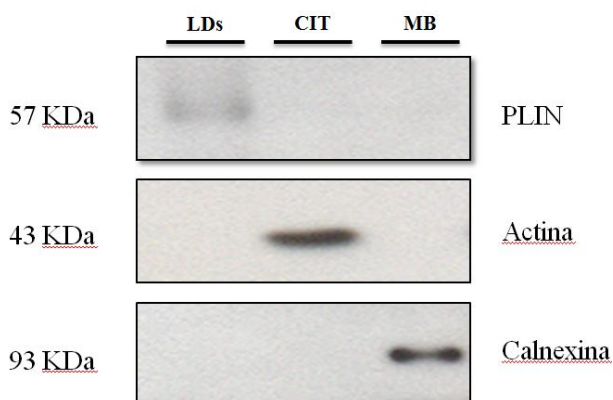


Figura 6. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa de extractos proteicos aislados a partir de adipocitos 3T3-L1. La validación del fraccionamiento se llevó a cabo utilizando perilipina (PLIN) como marcador de las LDs, que se separan en las fracciones más ligeras, β -actina como componente citosólico, en las fracciones intermedias, y calnexina, marcador de membranas del RE, que se separa, junto a otras membranas celulares, en las fracciones más densas.

Tras el aislamiento de fracciones enriquecidas en LDs, (F1 y F2), éstas fueron procesadas para su posterior análisis lipídico en dos ensayos diferentes. Los resultados de la identificación de lípidos obtenida en el primer ensayo se muestran en la *Tabla S1* (suplementaria), mientras que los obtenidos en el segundo ensayo aparecen en la *Tabla S2*. El primer ensayo tuvo como objetivo comparar los resultados a partir de las fracciones enriquecidas en LDs F1 y F2 por separado y de la combinación de ambas en extractos lipídicos de células electroporadas con el vector *mock* y procesadas siguiendo el protocolo 1 (ver “*Material y Métodos*”) por dos bases de datos de referencia diferentes. En la *Tabla S1* se muestran los resultados en negativo obtenidos usando la F1 de forma independiente, que resultó ser la fracción a partir de la cual se pudieron detectar e identificar de forma fiable (scores superiores a 70 puntos) un mayor número de formas lipídicas diferentes. Como se observa, el uso de la base de datos METLIN supone un aumento significativo en el número de componentes identificados, tanto en número, como en cuanto a diversidad de ácidos grasos. No obstante, de las

ocho clases principales de lípidos (Fahy *et al.*, 2005) tan sólo 5 han sido extraídos en ambos casos (FA, GL, ST, PR y PK). Por último, cabe destacar la presencia de aminoácidos, glúcidos e incluso vitaminas.

En el posterior ensayo se estudió el rendimiento de la técnica tomando dichas fracciones sin agrupar y bajo diferentes protocolos. En general, el análisis lipidómico permitió la identificación de un total de 50 fosfolípidos y 9 ácidos grasos en las LDs de adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales (electroporadas con el vector *mock*). La *Figura 7*. resume el número de componentes lipídicos detectados con una muy buena sensibilidad, lo que permitió su identificación con valores de “score” comprendidos entre 80 y 90 puntos. Como se observa en la misma, pese a que el número de ácidos grasos identificados es mucho menor respecto al ensayo 1, el de fosfolípidos ha aumentado considerablemente. Los mejores resultados en la identificación de fosfolípidos fueron obtenidos a partir de la muestra F1 realizando la extracción de lípidos siguiendo el protocolo 3 (Cloroformo/Metanol + Ácido Fórmico). Por otra parte, se obtuvo una mejor sensibilidad en la identificación de ácidos grasos utilizando el método de extracción de lípidos MTBE + Ácido Fórmico (Protocolo 2). Debido a que el objetivo del presente trabajo es analizar el número de fosfolípidos se decidió escoger el primero de ellos. En concreto, el mayor nivel de identificación de fosfolípidos se obtiene con análisis directo. Además, como en la situación anterior, se obtuvieron otros compuestos de tipo no lipídico, especialmente aminoácidos, que quedan recogidos en la *Tabla S2*.

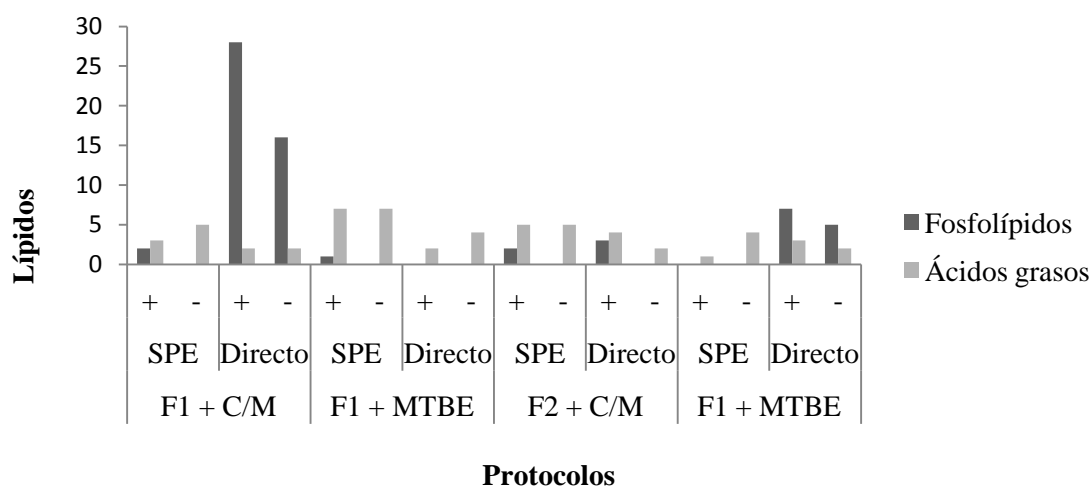


Figura 7. Número de componentes lipídicos (fosfolípidos y ácidos grasos) identificados tras el análisis lipidómico de las fracciones enriquecidas en LDs del ensayo 2. Las fracciones (F1 y F2) fueron procesadas mediante protocolos diferentes (C/M: Cloroformo/Metanol y MTBE) y con la utilización de columna SPE o no (Directo), tanto en positivo (+) como en negativo (-).

Todos estos resultados, tomados en conjunto, reflejan que la metodología más apropiada para el estudio lipidómico de las LDs de adipocitos 3T3-L1 sería la de procesar exclusivamente la fracción F1 del gradiente de densidad de sacarosa y extraer los lípidos contenidos en ella mediante el protocolo Cloroformo/Metanol + Ácido fórmico, para proceder a su posterior análisis lipidómico directo, sin necesidad de realizar una etapa de purificación en fase sólida.

DISCUSIÓN

Discusión

Las gotas lipídicas han sido consideradas durante mucho tiempo como simples almacenes de energía. Sin embargo, cada vez hay más estudios que apoyan firmemente la idea de que estos orgánulos constituyen estructuras altamente dinámicas y complejas, que intervienen en numerosos procesos celulares y, en el caso de los adipocitos, cumplen funciones fundamentales en la regulación del metabolismo lipídico corporal (Reue, 2011), en estrecha colaboración con otros orgánulos celulares (Pol *et al.*, 2014).

En este sentido, el RE no es el único orgánulo que establece asociación con las LDs. Ya en los estudios de microscopía electrónica de Novikoff y colaboradores, realizados en 1980 sobre adipocitos 3T3-L1, se demostró que otros orgánulos celulares relacionados con el metabolismo lipídico, como las mitocondrias y peroxisomas, mantienen contactos directos con las LDs (Novikoff *et al.*, 1980). En la actualidad se propone que estas interacciones, en las que intervendrían las proteínas Rab, entre otras, pueden constituir sitios de contacto entre orgánulos o proporcionar un mecanismo de tipo hemifusión para facilitar la transferencia no vesicular de lípidos (Murphy *et al.*, 2009). Por otra parte, se sabe de la existencia de otras interacciones que sirven para facilitar el transporte de fosfolípidos entre las membranas del RE y las mitocondrias, las MAMs (Vance, 1990). Por este motivo, en el presente trabajo nos planteamos investigar si, además de estar presente en la superficie de las LDs, Rab18 se podría localizar en MAMs en adipocitos 3T3-L1. Los resultados bioquímicos tras el aislamiento de MAMs confirman que Rab18 se localiza en LDs y, además muestran que también está presente en la fracción celular correspondiente a la suma de mitocondrias y MAMs. Por otra parte, los resultados obtenidos tras el análisis mediante microscopía confocal sobre células fijadas no mostraron evidencias de que esta GTPasa se asocie a la superficie de mitocondrias aisladas, pero sí existen puntos discretos de colocalización en la interfase entre la superficie de la LDs donde predomina la GTPasa y ciertas mitocondrias que se encuentran en íntimo contacto con estos orgánulos. Por ello, y teniendo en cuenta el conjunto de nuestros resultados, es razonable proponer que Rab18 podría representar un componente más de las MAMs de adipocitos. De acuerdo con esta idea, un estudio proteómico realizado en fibroblastos humanos ha identificado, entre muchas otras proteínas, Rab18 como proteína presente en los contactos de membrana que se organizan entre el RE y las mitocondrias en este tipo celular (Zhang *et al.*, 2011). La

presencia de Rab18 en estas especializaciones de la membrana del RE podría ayudar al acercamiento físico de las LDs y las mitocondrias a las MAMs para, de esta manera, facilitar el tráfico de lípidos entre estos orgánulos en condiciones de demanda energética, la hidrólisis de TAGs contenidos en las LDs podría acoplarse fácilmente al proceso de β -oxidación de los ácidos grasos resultantes que tiene lugar en la mitocondria. Por otra parte, en situaciones de exceso de energía, en las que se ponen en marcha los procesos de síntesis y acumulación de TAGs en los adipocitos, la cercanía entre LDs, mitocondrias y MAMs favorecida por la mayor presencia de Rab18 en esta interfase (Yoana, 2014) podría, por una parte, facilitar el suministro de energía en forma de ATP que requieren la acil-CoA sintasas presentes en membranas tanto del RE como de la mitocondria (Stone *et al.*, 2009) para la síntesis de los grupos acil-CoA que deben añadirse a los ácidos grasos previamente a la síntesis de TAGs. Por otro lado, dado que en estas condiciones tiene lugar un aumento de la carga de TAGs en las LDs, éstas deben aumentar su superficie de manera proporcional al incremento de TAGs (Pol *et al.*, 2014). Para ello, la célula debe incorporar fosfolípidos de nueva síntesis a la monocapa que forma la superficie de las LDs que permita la expansión de éstas, para lo que se requeriría la actividad de síntesis de fosfolípidos de las mitocondrias en coordinación con la asociada a las membranas del RE.

El desarrollo reciente de las plataformas de lipidómica junto con herramientas biocomputacionales adaptadas para el análisis de formas lipídicas que permiten modelar rutas metabólicas ofrecen una oportunidad sin precedentes para analizar la carga alostática que soporta el organismo en condiciones fisiopatológicas con el fin de mantener un fenotipo normal. Por ello, en el presente TFM nos propusimos profundizar en la función de Rab18 en la regulación del tráfico intracelular de lípidos en adipocitos mediante el análisis de los cambios en la composición lipídica total de las LDs en adipocitos 3T3-L1 que sobreexpresan la GTPasa. En primer lugar, llevamos a cabo la optimización de un protocolo de extracción de lípidos a partir de LDs aisladas de células que sobreexpresan Rab18 que permitiera la identificación del mayor número de formas posibles de lípidos (ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos) (Fahy *et al.*, 2005) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (QqQ). De los protocolos ensayados, el más apropiado para este propósito fue la extracción de lípidos a partir de la primera fracción independiente enriquecida en LDs mediante el método cloroformo/metanol en

presencia de ácido fórmico seguido de la detección tras una ionización negativa de la muestra sin que ésta requiera de una purificación previa en fase sólida.

Aunque no se puede descartar que algunos de los lípidos detectados en el presente trabajo, en condiciones basales, puedan corresponder a artefactos generados durante el proceso de extracción de las LDs, éstos coinciden con el patrón general de grupos de lípidos identificados en estudios lipidómicos previos (Leber *et al.*, 1994; Pietiläinen *et al.*, 2011). En particular, detectamos la presencia de fosfolípidos (PL), ácidos grasos (FA) y mono, di y triglicéridos (MAG, DAG y TAG), que, como ya se ha mencionado en la introducción, son los componentes mayoritarios de las LDs (Leber *et al.*, 1994). Dentro de las formas de fosfolípidos identificadas, aparecen diferentes tipos de PC, PE, tanto en sus formas aciladas como desaciladas (i.e. liso). Además, se identificaron diversos derivados éter de PC y PE, normalmente poliinsaturados [PC(O-32:1), PC(O-34:2), PC(O-36:3), PC(O-38:6), PE(O-34:3), PE(O-36:0) y PE(O-36:2)]. Es importante destacar que estos éter-fosfolípidos (i.e. plasmalógenos) han sido indentificados en estudios previos como los PL que mayores cambios cuantitativos sufren en adipocitos de pacientes obesos (Pietiläinen *et al.*, 2011). En concreto, en este estudio se descubrió una disminución importante en la cantidad de plasmalógenos en el TA de pacientes obesos mórbidos (Pietiläinen *et al.*, 2011), lo que llevó a los autores a sugerir que, debido a las propiedades anti-inflamatorias de estos lípidos, en obesidad el TA es más vulnerable a la inflamación. El hecho de que en este trabajo hayamos podido detectar de forma fiable estas formas de PLs abre el camino para futuros estudios comparativos no sólo sobre los cambios que sufre la cubierta de PLs de las LDs en condiciones de sobreexpresión de Rab18, sino también sobre la relación de la expresión de esta GTPasa, que se encuentra aumentada en pacientes obesos (Pulido *et al.*, 2011), con los cambios adaptativos que sufren las LDs en respuesta a desregulaciones de la homeostasis lipídica.

En cuanto a ácidos grasos, ambos protocolos utilizados en este trabajo permitieron la identificación de un número importante de estos compuestos. En concreto, se detectaron de manera fiable ácido oléico, linoléico, palmítico, esteárico y araquidónico, entre otros. Cabe destacar que en un estudio previo en el que se comparan los perfiles lipidómicos del suero de pacientes obesos metabólicamente sanos y no sanos, se encontraron diferencias importantes en la presencia de la mayoría de estos compuestos (sobre todo en la cantidad de ácido araquidónico) (Perreault *et al.*, 2014), por lo que los resultado obtenidos en este trabajo nos permitirán hacer estudios

comparativos en el lipidoma de LDs de pacientes con distintos grados de resistencia a insulina y correlacionarlos con la expresión de Rab18 y de otras proteínas importantes en el control del metabolismo lipídico en adipocitos.

Finalmente, la detección de diferentes formas de MAGs, DAGs y TAGs fue considerablemente mejor en el ensayo realizado siguiendo el protocolo de extracción de MBTE. Esta diferencia podría deberse a la elección de bases de datos para la identificación de las formas detectadas mediante cromatografía. Concretamente, en el primer ensayo se utilizó la base de datos METLIN mientras que en los ensayos posteriores se hizo uso de la base de datos incorporada en el software asociado al cromatógrafo (Agilent), por lo que en subsecuentes estudios, utilizaremos la base de datos METLIN para la identificación de estas formas lipídicas. Este hecho será crítico en futuros estudios ya que se ha demostrado que el estrés nutricional no provoca dramáticas alteraciones estructurales en la composición de DAGs y PLs en las LDs de hepatocitos de ratones sometidos a dietas alta y baja en grasas. Sin embargo, sí se observó un importante aumento en el número y la cantidad de especies de TAGs detectadas (Chitraju *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Rab18 podría desempeñar un papel importante como mediador del transporte no vesicular de lípidos entre las gotas lipídicas y los orgánulos relacionados con la regulación del metabolismo lipídico (retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas), facilitando el anclaje entre estos orgánulos, lo que podría ocurrir a nivel de las *mitochondria-associated membranes* o MAMs.

2. Para obtener un perfil lipidómico óptimo de LDs aisladas de adipocitos 3T3-L1 y poder desarrollar así estudios comparativos es recomendable realizar la extracción de lípidos mediante el uso de cloroformo/metanol + ácido fórmico y la realización del análisis de cromatografía líquida sin previa purificación en fase sólida, analizando los resultados subsiguientes mediante el uso de la base de datos METLIN.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Arner P.** The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. 2003. *Trends Endocrinol Metab.* 14: 137-45.
- Blanchette-Mackie EJ, Scow RO.** Movement of lipolytic products to mitochondria in Brown adipose tissue of Young rats: an electron microscope Study. 1983. *J Lipid Res.* 24: 229-244.
- Bloor ID, Symonds ME.** Sexual dimorphism in White and Brown adipose tissue with obesity and inflammation. 2014. *Horm Behav.* En prensa.
- Blouin CM, Le Lay S, Eberl A, Kofeler HC, Guerrera IC, Klein C, Le Liepvre X, Lasnier F, Bourron O, Gautier JF, Ferre P, Hajdouch E, Dugail I.** Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. 2010. *J Lipid Res.* 51: 945-956.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R.** Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. 2004. *J Biol Chem.* 270: 46835-46842.
- Chitraju C, Trötz Müller M, Hartler J, Wolinski H, Thallinger GG, Lass A, Zechner R, Zimmermann R, Köfeler J, Spener F.** Lipidomics analysis of lipid droplets from murine hepatocytes reveals distinct signatures for nutritional stress. 2012. *J Lipid Research.* 3: 2141-52.
- Christoloudides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A.** Adipogenesis and WNT signalling. 2009. *Trends Endocrinol Metab.* 20: 16-24.
- Csordas A, Wick G, Bernhard D.** Hydrogen peroxide-mediated necrosis induction in HUVECs is associated with an atypical pattern of caspase-3 cleavage. 2006. *Exp Cell Res.* 10: 1753-64.
- Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M.** Insulin signaling mechanisms for triacylglycerol storage. 2013. *Diabetologia.* 56: 949-964.
- Ducharme NA, Bickel PE.** Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. 2008. *Endocrinology.* 149: 942-9.
- Farese RV, Stone SJ, Levin MC, Zhou P, Han JY, Walther TC.** The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. 2009. *J Biol Chem.* 284:5352-5361.
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW.** Integrative physiology of human adipose tissue. 2003. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27: 875-888.

- Fujimoto T, Parton RG.** Nor just fat: the structure and function of the lipid droplet. 2011. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: a004838.
- Gaigg B, Simbeni R, Hrastnik C, Paltauf F, Daum G.** Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. 1995. *Biochim Biophys Acta.* 1234: 214-220.
- Gidda SK, Shockey JM, Falcone M, Kim PK, Rothstein SJ, Andrews DW, Dyer JM, Mullen RT.** Hydrophobic-Domain-Dependent Protein-Protein Interactions Mediate the Localization of GPAT Enzymes to ER Subdomains. 2011. *Traffic.* 12: 452-472.
- Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P.** Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. 2015. *Antioxid Redox Signal.* 22: 995-1019.
- Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, Yan QW, Miyoshi H, Mashek DG.** The role of the lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. 2011. *J Clin Invest.* 121: 2102-2110.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP.** Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and Type 2 diabetes. 2008. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 367-377.
- Hansen T.** Type 2 diabetes mellitus: a multifactorial disease. 2002. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.* 57: 544-9.
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP.** MAM. More than just a housekeeper. 2009. *Trends Cell Biol.* 19: 81-8.
- Horl G, Wagner A, Cole LK, Malli R, Reicher H, Kotzbeck P, Kofeler H, Hofler G, Frank S, Bogner-Strauss JG, Sattler W, Vance DE, Steyrer E.** Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo. 2011. *J Biol Chem.* 286: 17338-17350.
- Kanzaki M.** Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. 2006. *Endocr J.* 53: 267-293.
- Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH.** Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. 2000. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278: E941-948.
- Kershaw EE, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. 2004. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2548-56.
- Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztakryd C, Londos C.** Adoption of perilipins as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. 2010. *J Lipid Res.* 51: 468-71.

- Kolditz CI, Langin D.** Adipose tissue lipolysis. 2010. *Curr Clin Nutr Metab Care.* 13: 377-381.
- Konige M, Wang H, Sztalryd C.** Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. 2013. *Biochim Biophys Acta.* 1842: 393-401.
- Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, Hilger M, Lingrell S, Heger K, Newman HW, Schmidt-Supprian M, Vance DE, Mann M, et al.** Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. 2011. *Cell Metab.* 14:504–515.
- Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C.** Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. 2008. *Traffic.* 9: 338-352.
- Leber R, Zinser E, Zelning G, Paltauf F, Daum G.** Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. 1994. *Yeast.* 10: 1421-8.
- Liu P, Bartz R, Zehmer JK, Ying YS, Zhu M, Serrero G, Anderson RG.** Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. 2007. *Biochim Biophys Acta.* 1773: 784-793.
- Londos C, Sztalryd C, Tansey J, Kimmel A.** Role of PAT proteins in lipid Metabolism. 2005. *Biochimie.* 87: 45-49.
- Malagón MM, Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Jiménez-Gómez Y, Moreno NR, García-Navarro S, Vázquez-Martínez R, Peinado JR.** Adipobiology for Novel Therapeutic Approaches in Metabolic Syndrome. 2013. *Curr asc Pharmacology.* 11: 954-967.
- Marimam CM, Wang P.** Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. 2010. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 1277-1292.
- Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M, Parton RG.** Regulated localization of Rab 18 to lipid droplets: Effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. 2005. *J Biol Chem.* 280: 42325-42335.
- McIntosh AL, Storey SM, Atshaves BP.** Intracellular lipid droplets contains dynamic pools of sphingomyelin: ADRP binds phospholipids with High affinity. 2010. *Lipids.* 45: 465-477.
- Mishra R, Simonson MS.** Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and mitochondrial release of endonuclease G. 2005. *Cardiovasc Diabetol.* 4: 267-88.
- Moessinger C, Kuerschner L, Spandl J, Shevchenko A, Thiele C.** Human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. 2011. *J Biol Chem.* 286: 21330-21339.
- Murphy DJ.** The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. 2001. *Prog Lipid Res.* 40: 325-438.

- Murphy S, Martin S, Parton RG.** Lipid droplet-organelle interactions; sharing the facts. 2009. *Biochim Biophys Acta*.1791: 441-447.
- Myhill N, Lynes EM, Nanji JA, Blagoveschenskaya AD, Fei H, Carmine Simmen K, Cooper TJ, Thomas G, Simmen T.** The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2. 2008. *Mol Biol Cell*. 19: 2777-88.
- Nielsen TS, Jessen N, Jorgensen JO, Moller N, Lund S. *Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease*. 2014. *Society for Endocrinology*. 52: R199-222.
- Novikoff AB, Novikoff PM, Rosen OM; Rubin CS.** Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. 1980. *J Cell Biol*. 87: 180-196.
- Ohsaki Y, Maeda T, Maeda M, Tauchi-Sato K, Fujimoto T.** Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft. 2006. *Biochem Biophys Res Commun*. 347: 279-287.
- Osman C, Voelker DR, Langer T.** Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. 2011. *J Cell Biol*. 192: 7-16.
- Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T.** Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. 2005. *J Cell Sci*. 118: 2601-857.
- Penno A, Hackenbroich G, Thiele C.** Phospholipids and lipid droplets. 2013. *Biochim Biophys Acta*. 1831: 589-594.
- Perreault M, Zulyniak MA, Badoud F, Stephenson S, Dadawi A, Buchholz A, Mutch DM.** A distinct fatty acid profile underlines the reduced inflammatory state of metabolically healthy obese individuals. 2014. *PLoS one*. 9: e88539.
- Pfeffer SR.** Filling the Rab GAP. 2005. *Nat Cell Biol*. 7: 856-857.
- Pietlinäinen KH, Røg T, Seppänen-Laakso T, Virtue S, Gopalachatyulu P, Tang J, Rodriguez-Cuenca S, Maciejewski A, Naukkarinen J, Ruskeepää AL, Niemelä PS, Yetukuri L, Tan CY, Velagapudi V, Castillo S, Nygren H, Hyötyläinen T, Rissanen A, Kaprio J, Yki-Järvinen H, Vattulainen I, Vidal-Puig A, Orešič M.** Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity in humans. 2011. *PLoS Biol*. 9: e1000623.
- Ploegh H.** A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. 2007. *Nature*. 448: 435-438.
- Pol A, Gross SP, Parton RG.** Biogenesis of the multifunctional droplet: Lipids, proteins and sites. 2014. *J Cell Bio*. 204: 635-646.
- Pulido MR, Díaz-Ruiz A, Jiménez-Gómez Y, García-Navarro F, Tinahones F, López-Miranda J, Fruhbeck G, Vázquez-Martínez R, Malagón MM.** Rab18 in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. 2011. *PLoS One*. 6: e22931.

- Pulido MR, Rabanal-Ruiz Y, Almabounada F, Díaz-Ruiz A, Burrel M, Vázquez M, Castaño J, Kineman Rd, Luque Rm, Dieguez C, Vázquez-Martínez R, Malagón MM.** Nutritional, hormonal, and depot-dependent regulation of the small GTPase Rab18 in rodent adipose tissue. 2013. *J Mol Endocrinol.* 50: 19-29.
- Qui L, Jin X, Kingston PA, Luo X, Ding X.** Experimental study on BMSCS transfected by endogene inhibiting hypertrophic scar. 2008. *Zhongguo Xiu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 22: 212-6.
- Reue K.** Lipid droplet storage and Metabolism: from yeast to man. 2011. *J Lipid Res.* 52: 1865-1868.
- Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM.** Identification of White adipocyte progenitor cells in vivo. 2008. *Cell.* 135: 240-249.
- Ryden M, Dicker A, van Harmelen H, Perbeck L, Lonnqvist Y, Arner P.** Mapping of early signalling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells. 2002. *J Biol Chem.* 277: 1085-1091.
- Schrader M.** Tubulo-Reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: Dynamic behaviour and association. 2001. *J Histochem Cytochem.* 49: 1421-1429.
- Sethi JK, Vidal-Puig AJ.** Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. 2007. *J Lipid Res.* 48: 1253-1262.
- Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ.** Sexual differences in the control of energy homeostasis. 2009. *Front Neuroendocrinol.* 30: 396-404.
- Shulman GI.** Cellular mechanisms of insulin resistance. 2000. *J Clin Invest.* 106: 171-6.
- Stone SJ, Levin MC, Zhou P, Han JY, Walther TC, Farese RV.** The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. 2009. *J Biol Chem.* 284:5352–5361.
- Trayhurn P, Wood IS.** Adipokines inflammation and the pleiotropic role of White adipose tissue. 2004. *Br. J. Nutr.* 92: 347-355.
- Vance JE, Vance DE.** Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. 2004. *Biochem Cell Biol.* 82: 113-128.
- Vance JE.** Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. 1990. *J Biol Chem.* 265: 7248-7256.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Weserergren R, Niemi T, Tauttonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P.** Functional Brown adipose tissue in healthy adults. 2009. *N Engl J Med.* 360: 1518-1525.

- Wajchenberg BL.** Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. 2000. *Endocr Rev.* 21: 697-738.
- Walther TC, Farese RV Jr.** Lipid droplets and cellular lipid Metabolism. 2012. *Annu Rev Biochem.* 81: 687-714.
- Welte MA.** Expanding roles for lipid droplets. 2015. *Curr Biol.* 25: R470-R481.
- White MF.** Insulin signaling in health and disease. 2003. *Science.* 302: 1710-1711.
- Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE.** A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. 2006a. *FEBS Lett.* 580: 5484-5491.
- Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khadekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, Spiegelman BM.** Beige adipocytes are a distinct Type of thermogenic fat cell in mouse and human. 2012. *Cell.* 150: 366-376.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. 2003. *J Clin Invest.* 112: 1821-30.
- Zang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. 1994. *Nature.* 372: 425-32.
- Zehmer JK, Huang Y, Peng G, Pu J, Anderson RG, Liu P.** A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. 2009. *Proteomics.* 9: 914-21.
- Zerial M, McBride H.** Rab proteins as membrane organizers. 2001. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 107-117.

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Resultados obtenidos del análisis lipídico de LDs de adipocitos 3T3-L1 en estado basal (electroporados con el vector de expresión cMyc vacío o mock) del ensayo 1. Se muestran los lípidos identificados agrupados de acuerdo a la clasificación vigente y compuestos de naturaleza no lipídica pertenecientes a la F1 analizada independientemente bajo un mismo tratamiento (Protocolo 1), mediante la base de datos Metlin (tabla superior) y la base de datos Agilent (tabla inferior).

Ácidos grasos (FA)		
(+) - Isostearic acid	2-Octanone	C16:1n-20
10-[5]-Ladderane-decanoic acid	4,14-Dimethyl-hexadecanoic acid	C16:1n-21
10E-Octadecenoic acid	2-Oxo-heneicosanoic acid	C18:1n-1
10E-Tetradecenyl acetate	2-Propyl-tridecanoic acid	C18:1n-13
10-Hexadecenoic acid	2Z-Octadecenoic acid	C18:1n-14
10-Methyl-heptadecanoic acid	3,5-Dimethyl-tetradecanoic acid	C18:1n-15
10-Methyl-heptadecanoic acid	3E-Hexadecenoic acid	C16:1n-18
10Z-Hexadecenyl acetate	3E-Tetradecenyl acetate	C18:1n-2
11,15-Dimethyl-hexadecanoic acid	2-Hydroxyhexadecanal	Decyl octanoate
11,15-Dimethyl-hexadecanoic acid	3-Methyl-pentadecanoic acid	C18:1n-5
11-Cycloheptylundecanoic acid	3-Octadecylenic acid	C22:5n-3,6,9,12,15
11E-Hexadecenyl acetate	3-Oxo-heneicosanoic acid	C22:5n-3,7,10,14,18
11E-Tetradecenyl acetate	3Z-Hexadecenyl acetate	Decyl octanoate
11-Hexadecenoic acid	3Z-Octadecenoic acid	Cis-10-oleic acid
11Z-Hexadecenoic acid	4,14-Dimethyl-hexadecanoic acid	Cis-10-palmitoleic acid
11Z-Hexadecenyl acetate	6,14-Dimethyl-hexadecanoic acid	Cis-12-oleic acid
12E-Tetradecenyl acetate	3-Ethyl-3-methyl-tridecanoic acid	Cis-2-octadecenoic acid
12Z-Hexadecenyl acetate	4,14-Dimethyl-hexadecanoic acid	Cis-7-Hexadecenoic acid
13,13-Dimethyl-tetradecanoic acid	6E-Hexadecenyl acetate	Cis-7-octadecenoic acid
13-Hexadecenoic acid	4,8,12,15,19-Docosapentaenoic acid	Cis-8-oleic acid
13-Methyl-pentadecanoic acid	4,8,12-Trimethyl-tridecanoic acid	Cis-9-palmitoleic acid
13Z-Hexadecenoic acid	4,8-Dimethyl-hexadecanoic acid	Cis-vaccenic acid
13Z-Octadecenoic acid	4-Hexyl-decanoic acid	Decyl hexanoate
14:0(10Me,13Me)	4-Hydroxyethinylestradiol	Decyl octanoate
14-Methylheptadecanoic acid	4-Octadecylenic acid	Docosapentaenoic acid
15E-Octadecenoic acid	4Z-Octadecenoic acid	Dodecyl 2-methylpropanoate
15-,Methyl-heptadecanoic acid	5E-Hexadecenyl acetate	Eicosapentaenoic Acid ethyl ester
15Z-Octadecenoic acid	5Z-Hexadecenyl acetate	Elaidic Acid
16E-Octadecenoic acid	5Z-Octadecenoic acid	Ethyl 7Z-hexadecenoate
16Z-Octadecenoic acid	6,14-Dimethyl-hexadecanoic acid	Ethyl 9-hexadecenoate
17:1 (12) (7Me)	7-Palmitoleic acid	Formyl 14-methyl-8E-hexadecenoate
17:1 (4) (15Me)	6E-Tetradecenyl acetate	Formyl 14-methyl-8Z-hexadecenoate
17:1 (4) (16Me)	6-Ethyl-tetradecanoic acid	Formyl 2,6,10-trimethyl-dodecanoate
17:1 (6) (9Me)	6-Hydroxyethinylestradiol	Formyl heptadecanoate
17a-Ethynylestriol	6Z-Hexadecenoic acid	Glycerol 1 - (5-hydroxydodecanoate)
17-Octadecenoic acid	4,7,10,13,16-Docosapentaenoic acid	Hexadecyl acetate
18:1 (13E)	7,10,13,16,19-Docosapentaenoic acid	Hexyl decanoate
18:1 (14E)	7E-Octadecenoic acid	Isopalmitic acid
18:1 (14Z)	7-Hexadecenyl acetate	Lambda isostearic acid
18-Octadecanolide	7-Methyloctyl 5-methylhexanoate	Linoleic acid (d4)
19-Norpregna-1,3,5 (10)-trien-20-yne-3,6,17-triol, (6b,17a)-	7-Methyloctyl 7-methyloctanoate	Methyl 14-methyl-8-hexadecenoate
2,14-Dimethyl-hexadecanoic acid	7-Palmitoleic acid	Myristic Acid ethyl ester
2,15,16-Trihydroxy palmitic acid	7Z-Hexadecenyl acetate	Neostearic acid
2,4-Dimethyl-tetradecanoic acid	7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z-docosapentaenoic acid	Octyl octanoate
2,6-Dimethyl-5-heptenyl nonanoate	7Z-Octadecenoic acid	Oleic Acid
2-Octanone	8,9,16-Trihydroxy palmitic acid	Palmitic acid
2,6-Dimethyl-hexadecanoic acid	8E-Hexadecenyl acetate	Palmitic Acid ethyl ester
2,6-Dimethyl-tetradecanoic acid	9,10,16-Trihydroxy palmitic acid	Petroselinic acid
20-Oxo-heneicosanoic acid	9E-Hexadecenyl acetate	Stearic acid
22:5 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)	9Z-Hexadecenyl acetate	Tetradecyl acetate
	Butyl dodecanoate	
	C16:1n-14	

2-Ethyl-2-butyl-decanoic acid 2-Hexyldecanoic acid 2-Heptyl-nonanoic acid 2-Hydroxyethinylestradiol 2-Methyl-16-heptadecenoic acid	C16:1n-15 C16:1n-16 C16:1n-17 C16:1n-19	Tetradecyl isobutyrate Trans-7-octadecenoic acid Trans-8-elaidic acid Trans-12-elaidic acid Vaccenic acid
Glicerolípidos (GL)	Lípidos esterol (ST)	Lípidos prenol (PR)
1-Monopalmitin Hexadecyl Acetyl Glycerol MG (0:0/16:0/0:0) MG (0:0/18:0/0:0) MG (16:0/0:0/0:0) MG (18:0/0:0/0:0) TG (8:0/8:0/8:0)	1- α -hydroxy-23,24,25,26,27-pentanorvitamin D3 22-Hydroxy-23,24,25,26,27-pentanorvitamin D3 25-Hydroxy-16,17,23,23,24,24-hexadehydrovitamin D3 Glycidyl stearate N-n-Hexanoylglycine methyl ester	10,39-Apo- β -carotenal 7,8-Dehydro- β -micropteroxanthin All-trans-Carophyll yellow Phytyl phosphate Taxa-4 (20),11 (12)-dien-5- α -yl acetate
Policétidos (PK)	Aminoácidos (AA)	Glúcidos (GLU)
2-Octanone	N-omega-propyl-L-Arginine	α,β -Trehalose α -D-Glucosyl-(1,3)-D-mannose β -D-Lactose DEAE-Cellulose D-Fructosyl-D-fructofuranose Glucinol Mannobiose Se-Adenosylselenomethionine
Vitaminas (VIT)		
(17Z)-1- α ,25-Dihydroxy-26,27-dimethyl-17,20,22,22,23,23-hexadehydrovitamin D3 Flavine mononucleotide (FMN)		

Ácidos grasos (FA)	Glicerolípidos (GL)	Glicerofosfolípidos (GP)
2-Glyceryl-PGE2 8,11,14-Docosatriynoic acid	DG(20:2(11Z,14Z) / 20:4(8Z,11Z,14Z,17Z) / 0:0	PG (16:0/0:0) PI (22:2(13Z,16Z) / 18:1(9Z))
Lípidos esterol (ST)	Aminoácidos (AA)	
16-Oxoestrone 2-Methoxy-17 α -ethynylestradiol	Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine methyl ester	

Tabla S2. Resultados obtenidos del análisis lipídico de LDs de adipocitos 3T3-L1 en estado basal del ensayo 2. Se muestran los lípidos identificados agrupados de acuerdo a la clasificación vigente y compuestos de naturaleza no lipídica pertenecientes a la F1 (tabla superior) y F2 (tabla inferior) analizadas independientemente y bajo tratamientos distintos (C/M: Protocolo 2; MTBE: Protocolo 3).

F1		C/M		MTBE	
Directo	-	FA	Arachidonic acid (C20:4) Eicosadienoic acid (20:2) Linoleic acid (C18:2) Oleic acid (C18:1) Undecanedioic acid	D-Lactic acid Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0)	
		GP	LysoPC (17:0)_23.9Tr LysoPC (18:0)_24.9 LysoPE (20:4)_tR21.2		
	+	FA	Margaric acid (C17:0) Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Palmitoleic acid (C16:1) Stearic acid (C18:0)	3-Hydroxy-hexadecanoic acid Glycocholic acid Myristic acid (C14:0) Linoleic acid (C18:2) Margaric acid (C17:0) Palmitoleic acid (C16:1)	
		GP	LysoPC (16:0)_tR23.1 LysoPC (18:0)_24.9 LysoPE (20:3)_tR22.4 LysoPE (20:4)_tR21.2		
		AA	Choline L-Valine	L-Valine	
		GLU	Threonate		
SPE	-	FA	Margaric acid (C17:0) Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Palmitoleic acid (C16:1) Stearic acid (C18:0)	Hydroxyvaleric acid Linolenic Acid (C18:3) Margaric acid (C17:0) Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0)	
		FA	Margaric acid (C17:0) Myristic acid (C14:0) Octadecylcarnitine Palmitic acid (C16:0) Palmitoleic acid (C16:1) Palmitoylcarnitine Stearic acid (C18:0)	Eicosapentaenoic acid (C20:5) Linoleic acid (C18:2) Myristic acid (C14:0) Octadecylcarnitine Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0)	
	+	GP	LysoPE (20:3)_tR22.4		
		ST	Glycocholic acid		
		AA	L-Valine Phenylalanine	L-Valine Phenylalanine PheLeu	

F2		C/M	MTBE	
Directo	-	FA	D-Lacticacid Linoleylcarnitine Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0)	Arachidonic acid (C20:4) Cholicacid Decanoylcarnitine Dodecanoylcarnitine Eicosadienoic acid (20:2) Linoleic acid (C18:2) Linoleylcarnitine Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0)
	+	FA	3-Hydroxy-hexadecanoicacid Glycocholicacid Linolenic Acid (C18:3) Margaric acid (C17:0) Myristic acid (C14:0) Octadecenylcarnitine Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0) Undecanedioicacid	3-Hydroxy-hexadecanoicacid Glycocholicacid Linolenic Acid (C18:3) Margaric acid (C17:0) Myristic acid (C14:0) Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Palmitoleic acid (C16:1) Stearic acid (C18:0) Tetradecenoylcarnitine
		GP	LysoPE (20:3)_tR22.4	LysoPC (18:0)_24.9 LysoPC (20:1) LysoPC (Hydroxy-16:0) LysoPC (P-16:0) LysoPE (16:0)_tR21.7
		AA	Choline Leucine L-Valine	L-Valine
SPE	-	FA	Linoleylcarnitine Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0)	Decanoylcarnitine Dodecanoylcarnitine Hydroxyvalericacid Linoleic acid (C18:2) Oleic acid (C18:1) Palmitic acid (C16:0) Stearic acid (C18:0)
	+	FA	3-Hydroxy-hexadecanoicacid Decenoylcarnitine Glycocholicacid Linolenic Acid (C18:3) Margaric acid (C17:0) Myristic acid (C14:0) Octadecenylcarnitine Palmitic acid (C16:0) Palmitoleic acid (C16:1) Stearic acid (C18:0)	Eicosapentaenoic acid (C20:5) Glycocholicacid Linoleic acid (C18:2) Linolenic Acid (C18:3) Margaric acid (C17:0) Myristic acid (C14:0) Palmitic acid (C16:0) Palmitoleic acid (C16:1) Octadecenylcarnitine Oleic acid (C18:1) Stearic acid (C18:0)
		GP	LysoPE (20:3)_tR22.4	
		AA	L-Valine Phenylalanine	Choline L-Valine



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DE CÓRDOBA

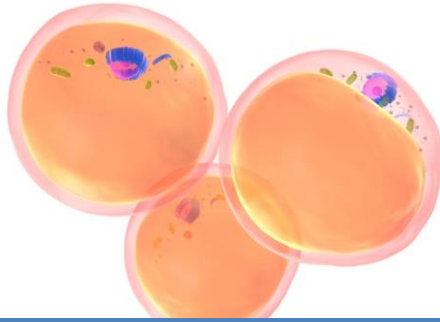


Máster de Investigación Biomédica Traslacional
Trabajo Fin de Máster

Caracterización de Rab18 en el metabolismo lipídico de adipocitos

Julia Sánchez Ceinos
9. Julio. 2015

INTRODUCCIÓN



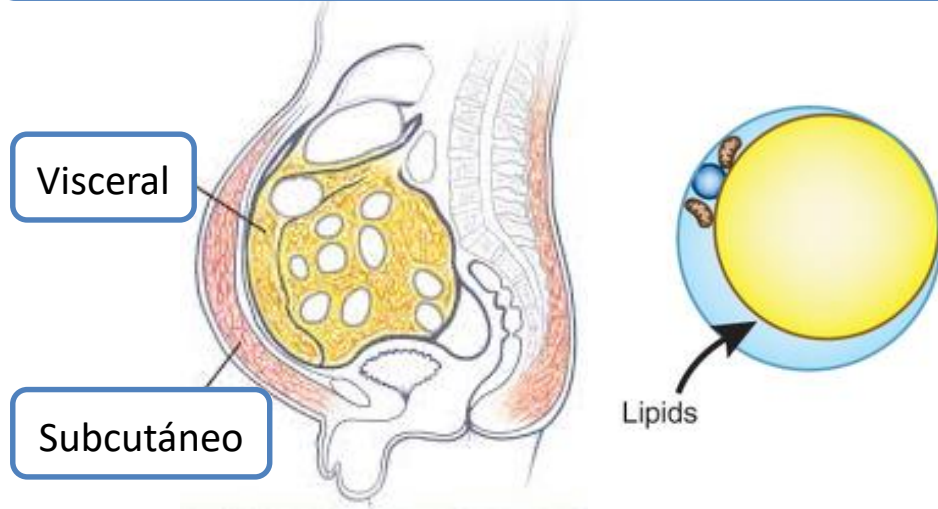
Lipogénesis /
Lipólisis

Captación de
glucosa

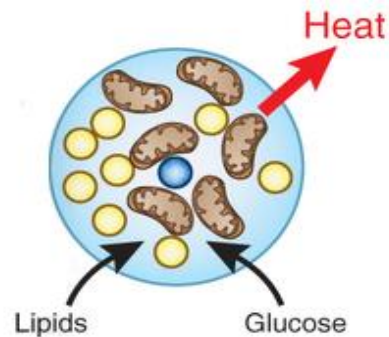
Órgano endocrino:
Secreción de
adipoquinas

Lípidos:
Moléculas
señalizadoras

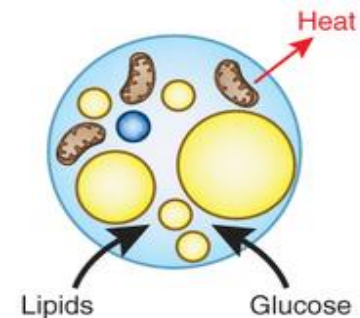
Tejido Adiposo Blanco



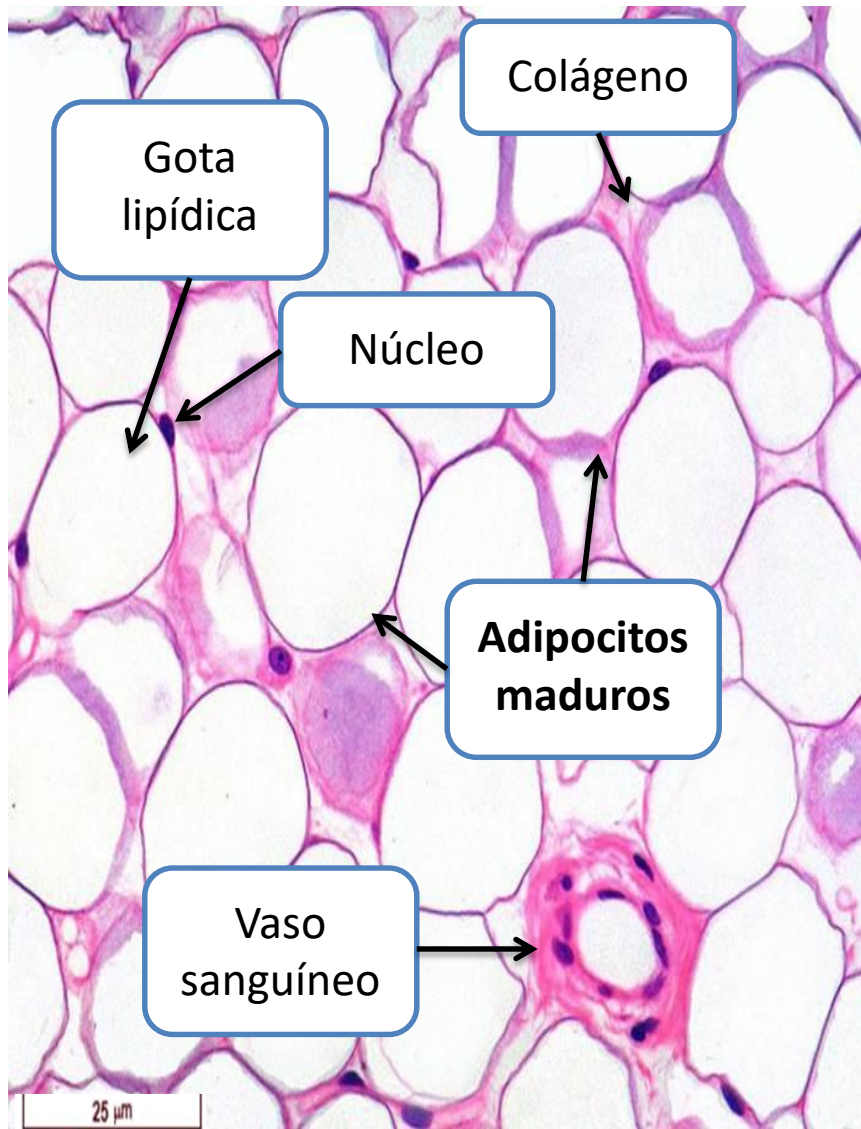
Tejido Adiposo Marrón



Tejido Adiposo Beige



INTRODUCCIÓN



Fracción del Estroma Vascular



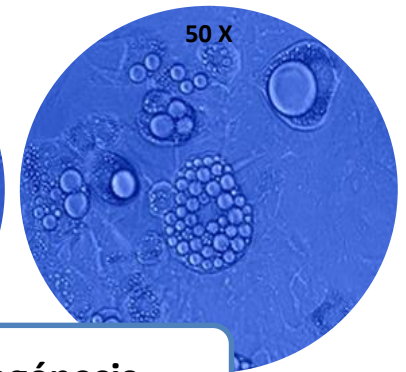
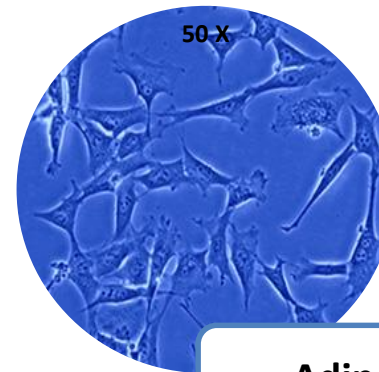
Células madre mesenquimales

Preadipocitos

Terminaciones nerviosas

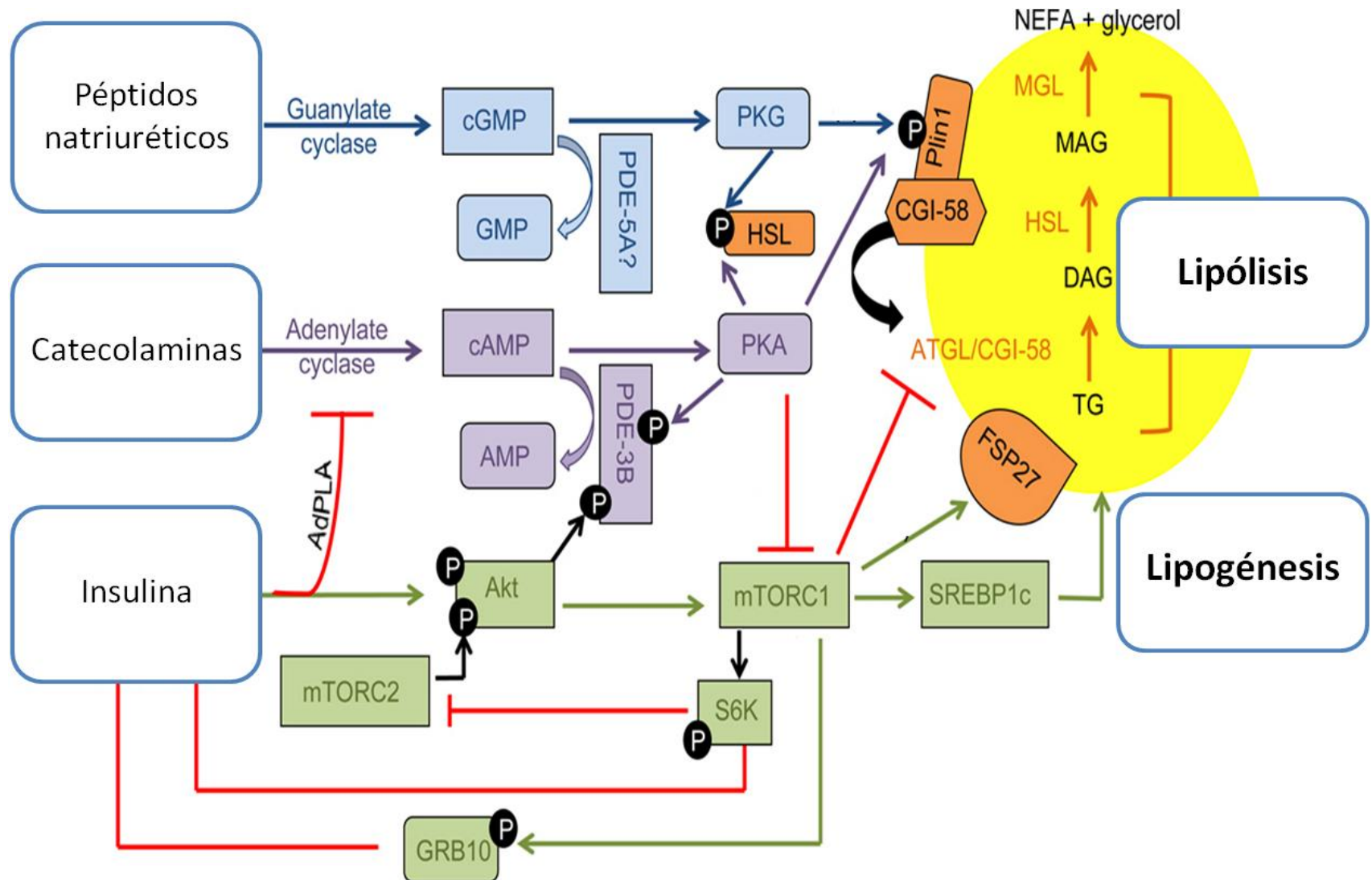
Células sanguíneas

Tejido vascular



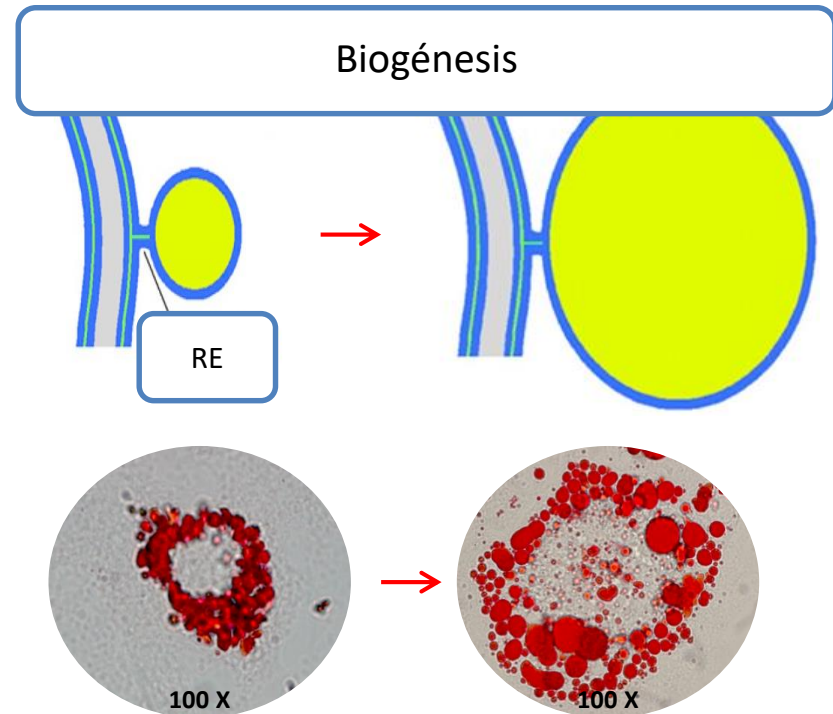
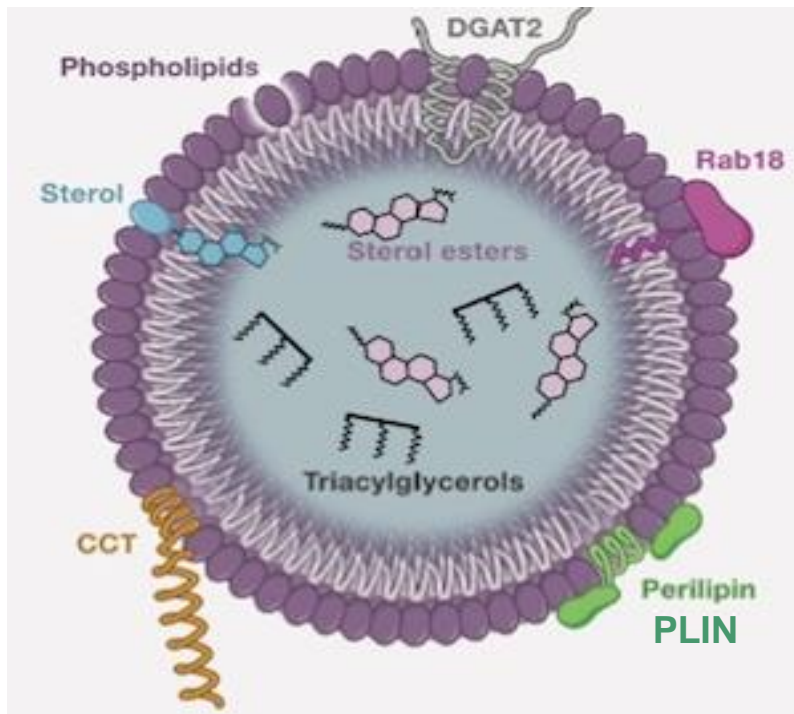
Adipogénesis

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Gotas lipídicas, LDs



Fosfolípidos:

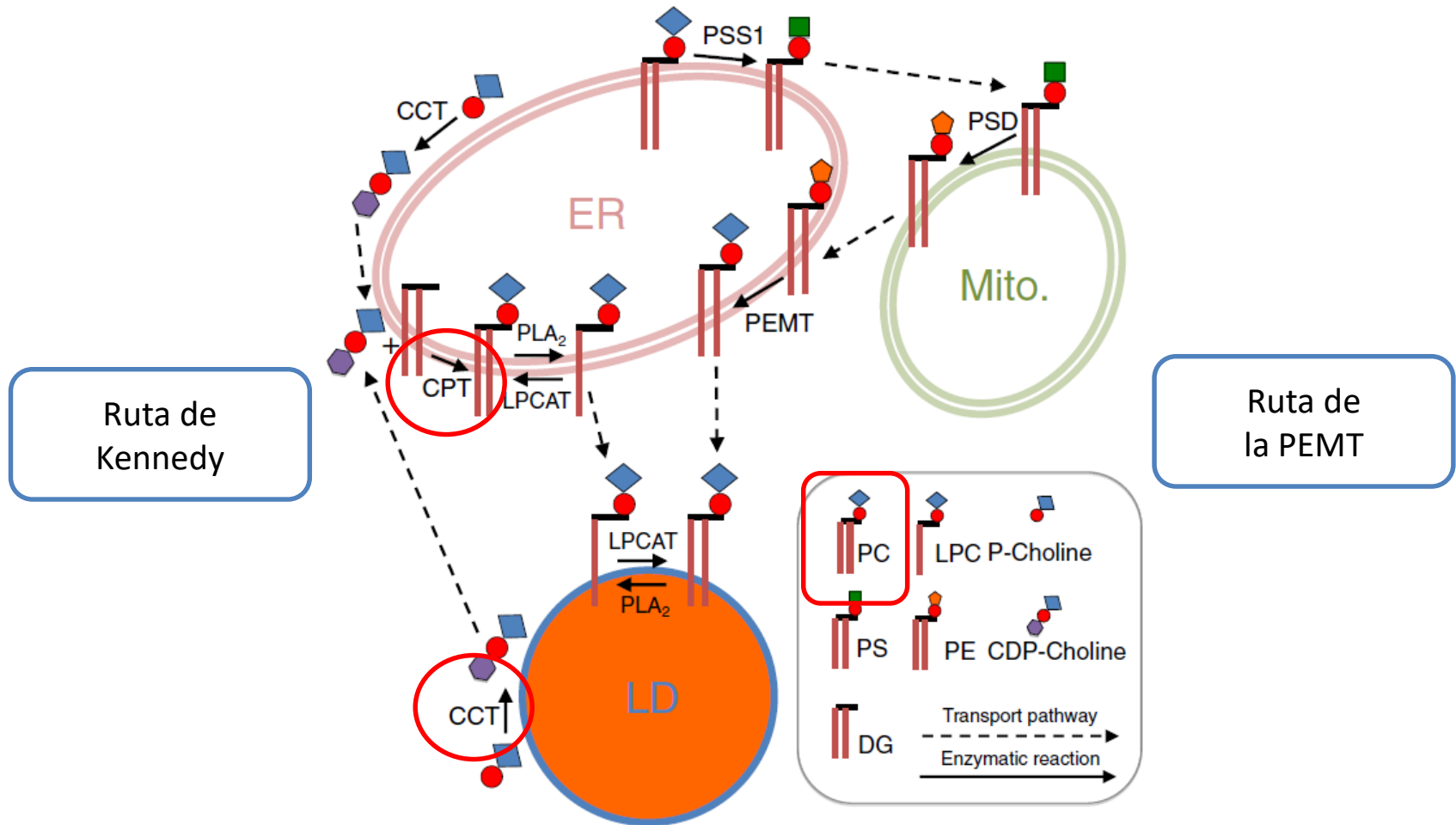
Proteger el núcleo de lípidos

↓ Tensión superficial

Prevenir la coalescencia

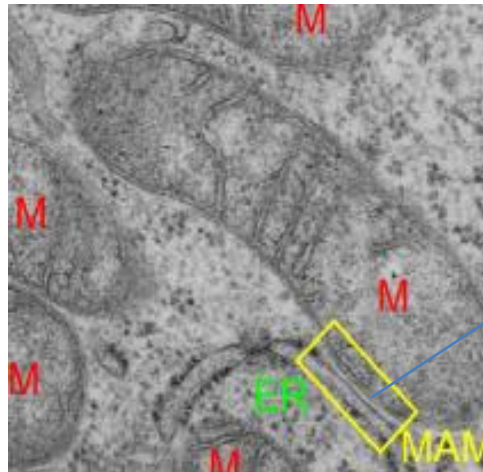
INTRODUCCIÓN

Fosfolípidos

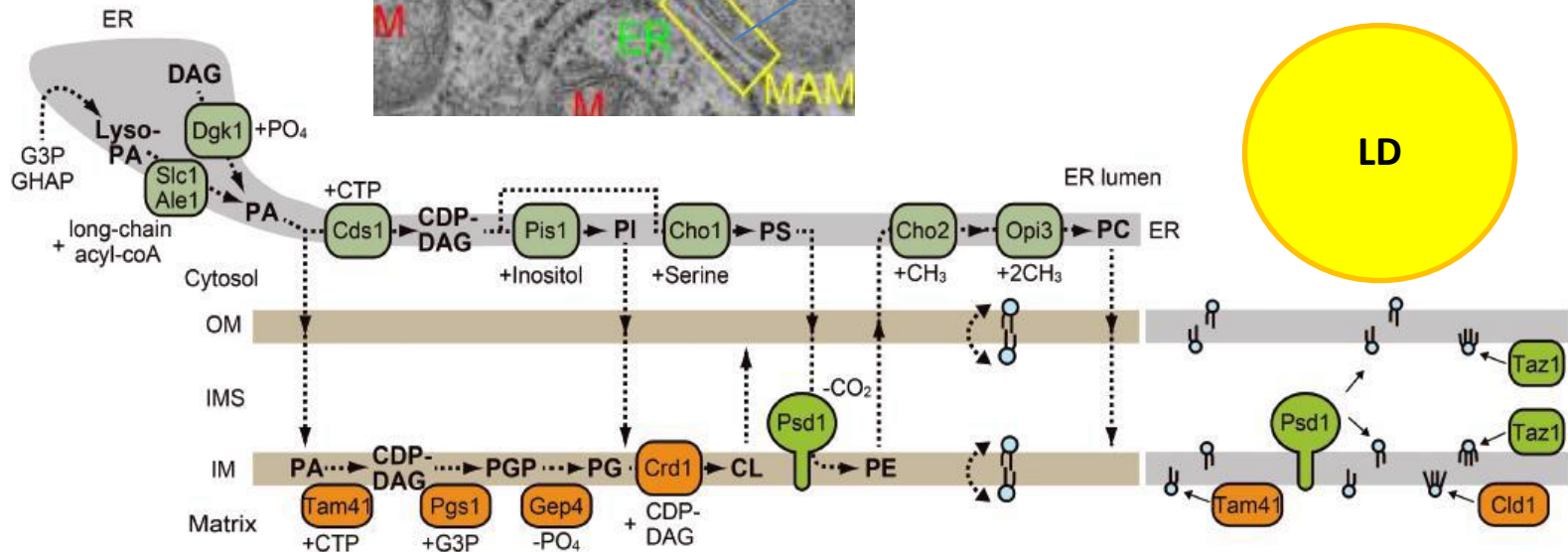


INTRODUCCIÓN

Membranas asociadas a mitocondrias, MAMs



¿Proteínas Rab?

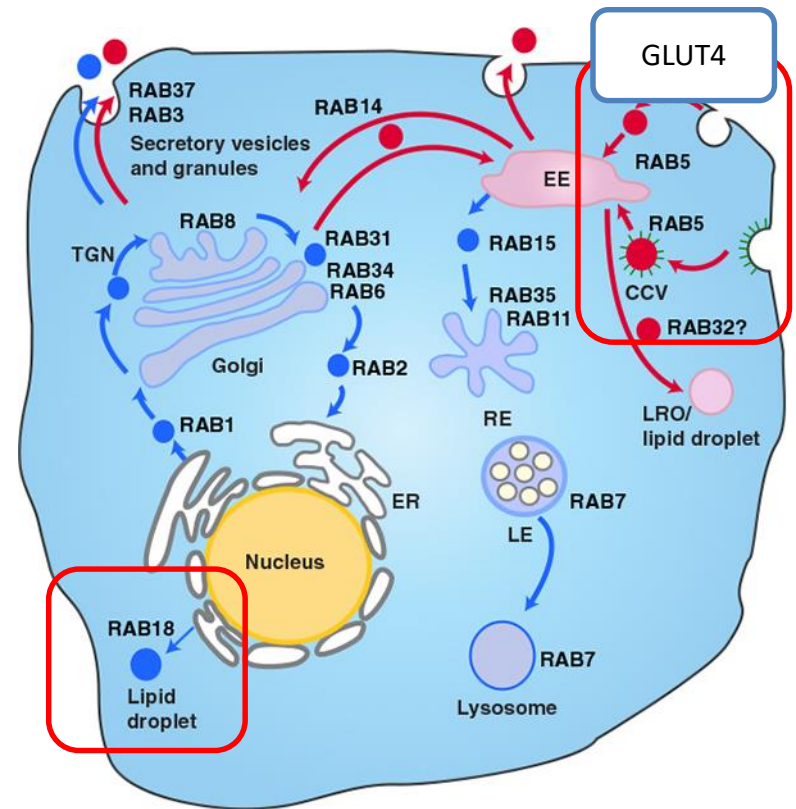
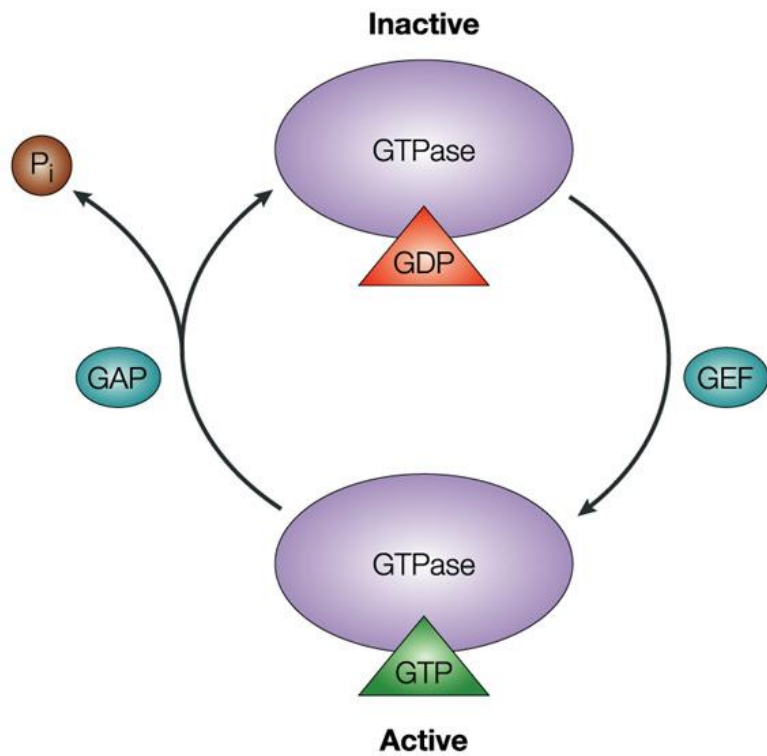


INTRODUCCIÓN

Proteínas Rab

GTPasas: Interruptores moleculares

Adipocitos

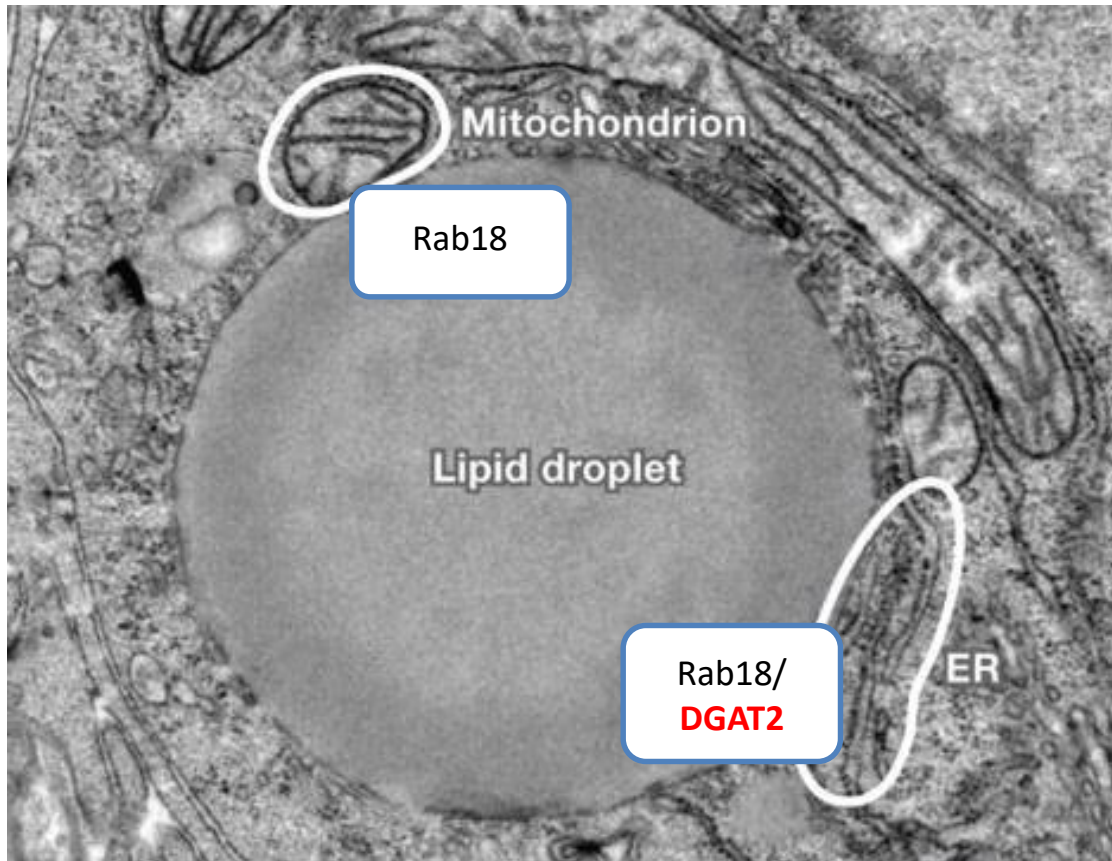


INTRODUCCIÓN

Rab18

Regula la lipogénesis y la lipólisis

¿Media el transporte de lípidos a través de las MAMs?



↑ Rab 18



OBJETIVOS

Establecer las bases metodológicas para caracterizar Rab18 en la interacción entre las LDs y otros orgánulos celulares implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos, en el contexto de la regulación de la composición de las LDs

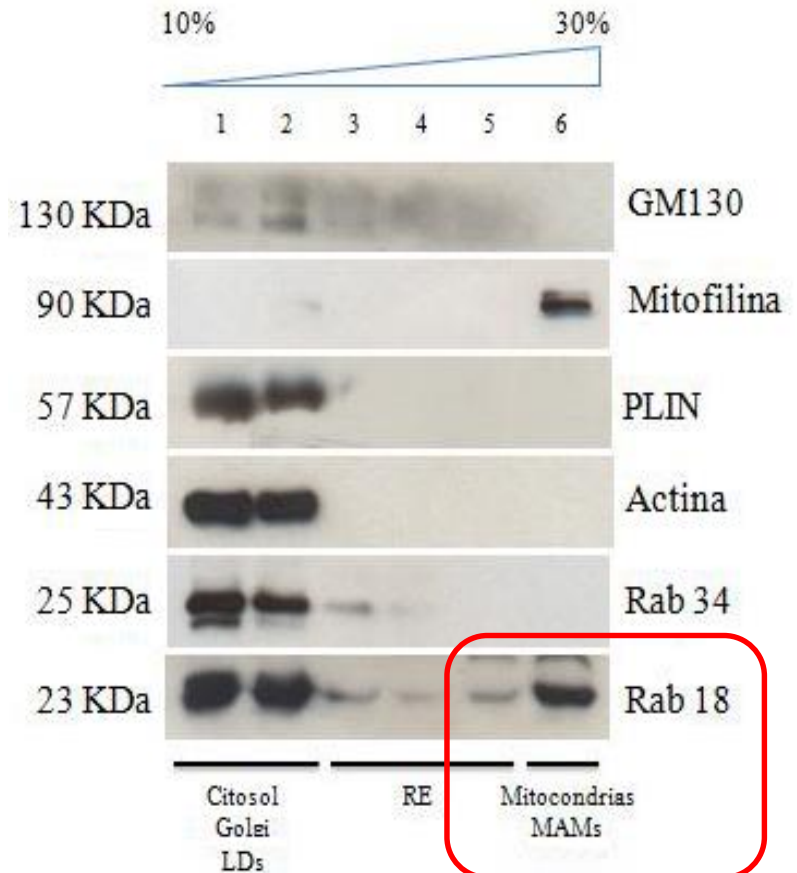
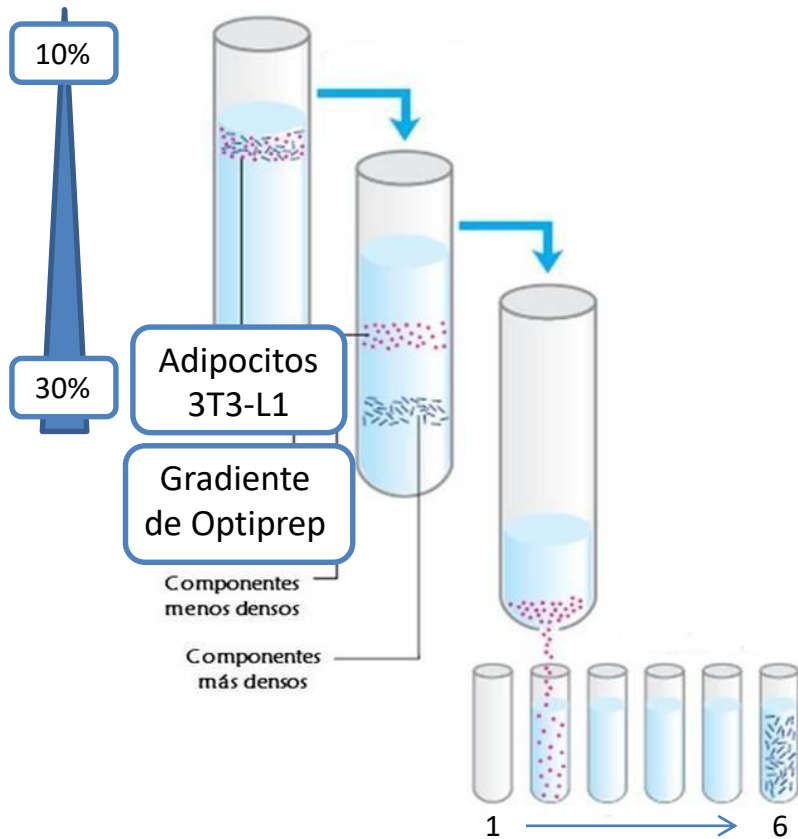
- 1. Determinar la posible localización de Rab18 en la intersección RE-mitocondrias o MAMs**
2. Optimizar un protocolo de análisis lipidómico de LDs aisladas de adipocitos que sobreexpresan Rab18 vs. células control

RESULTADOS

Rab18 está presente en fracciones enriquecidas en Mitocondrias y MAMs

Fraccionamiento celular

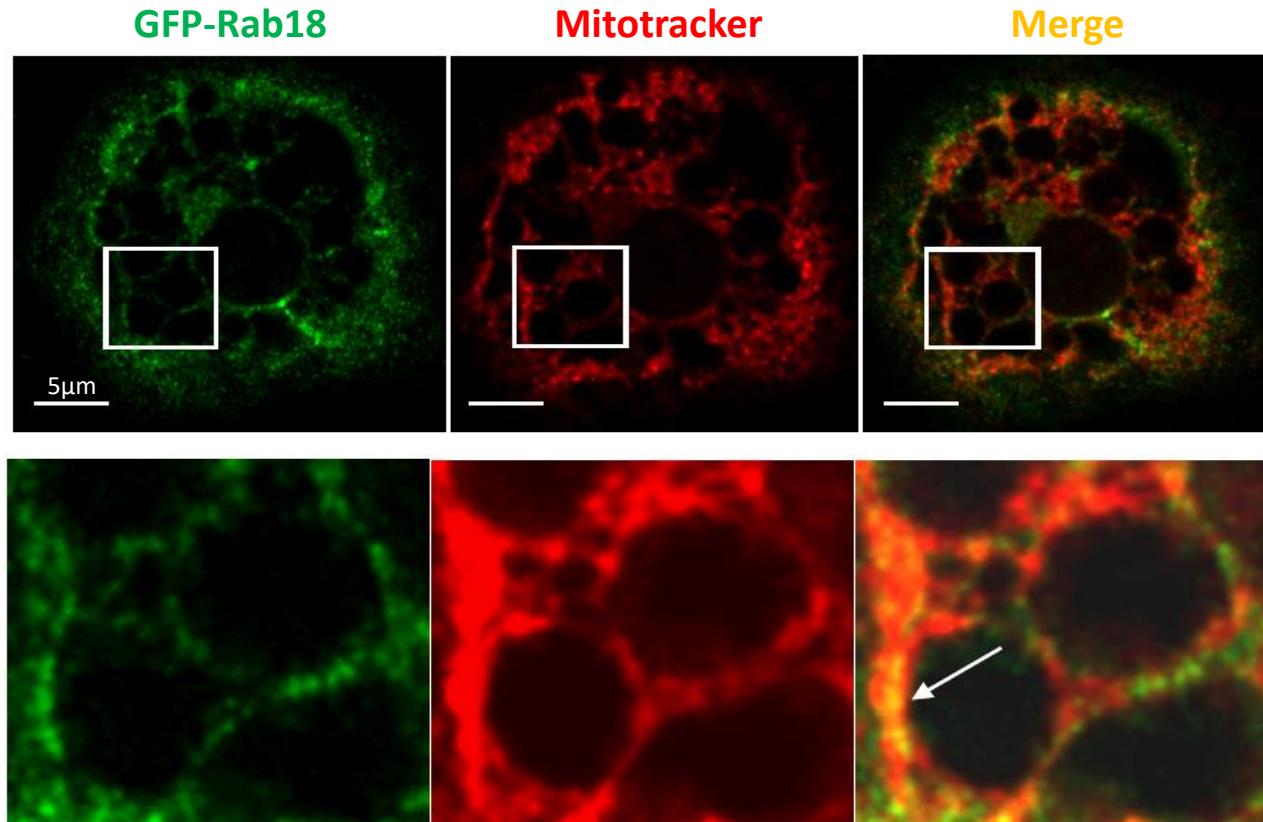
Western Blotting



RESULTADOS

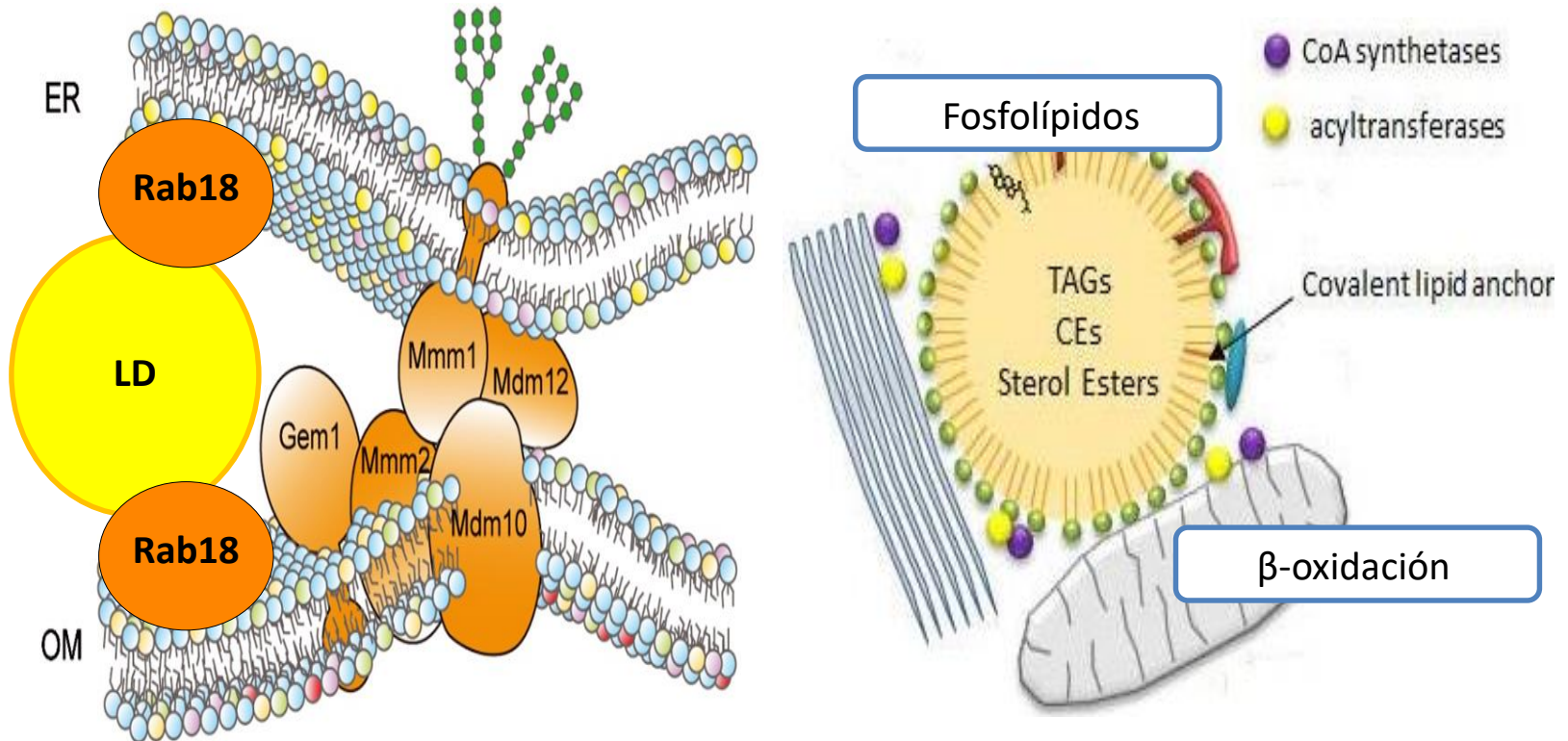
Rab18 colocaliza con mitocondrias en regiones puntuales, MAMs

Microscopía confocal



CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Rab18 podría desempeñar un papel como mediador del transporte de lípidos entre las LDs, el RE y mitocondrias, facilitando el anclaje entre estos orgánulos a nivel de las MAMs



OBJETIVOS

Establecer las bases metodológicas para caracterizar Rab18 en la interacción entre las LDs y otros orgánulos celulares implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos

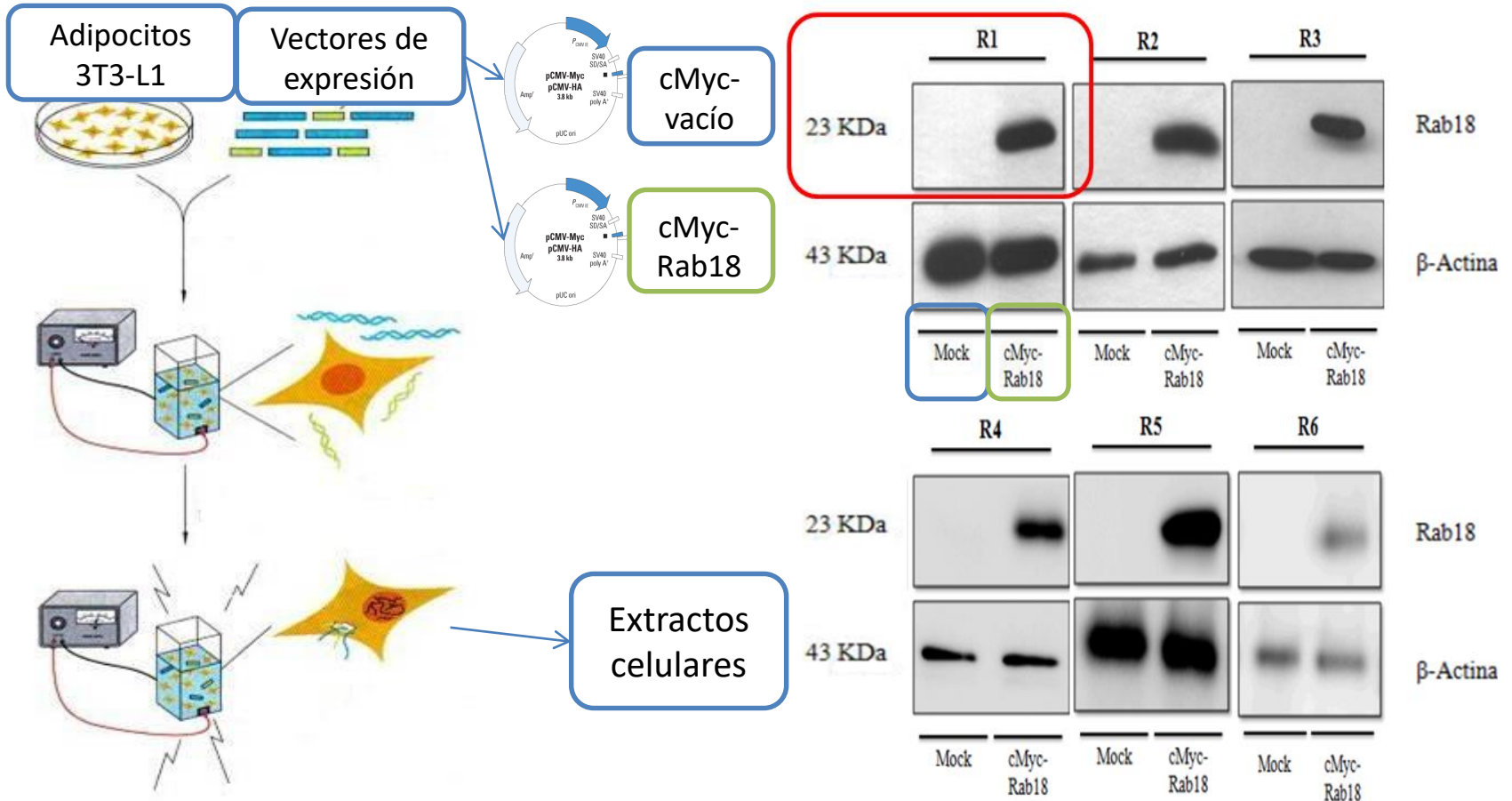
1. Determinar la posible localización de Rab18 en la intersección RE-mitocondrias o MAMs
2. **Optimizar un protocolo de análisis lipidómico de LDs de adipocitos 3T3-L1 que sobreexpresan Rab18 vs. Control**

RESULTADOS

Estudios de sobreexpresión de Rab18

Electroporación

Western Blotting

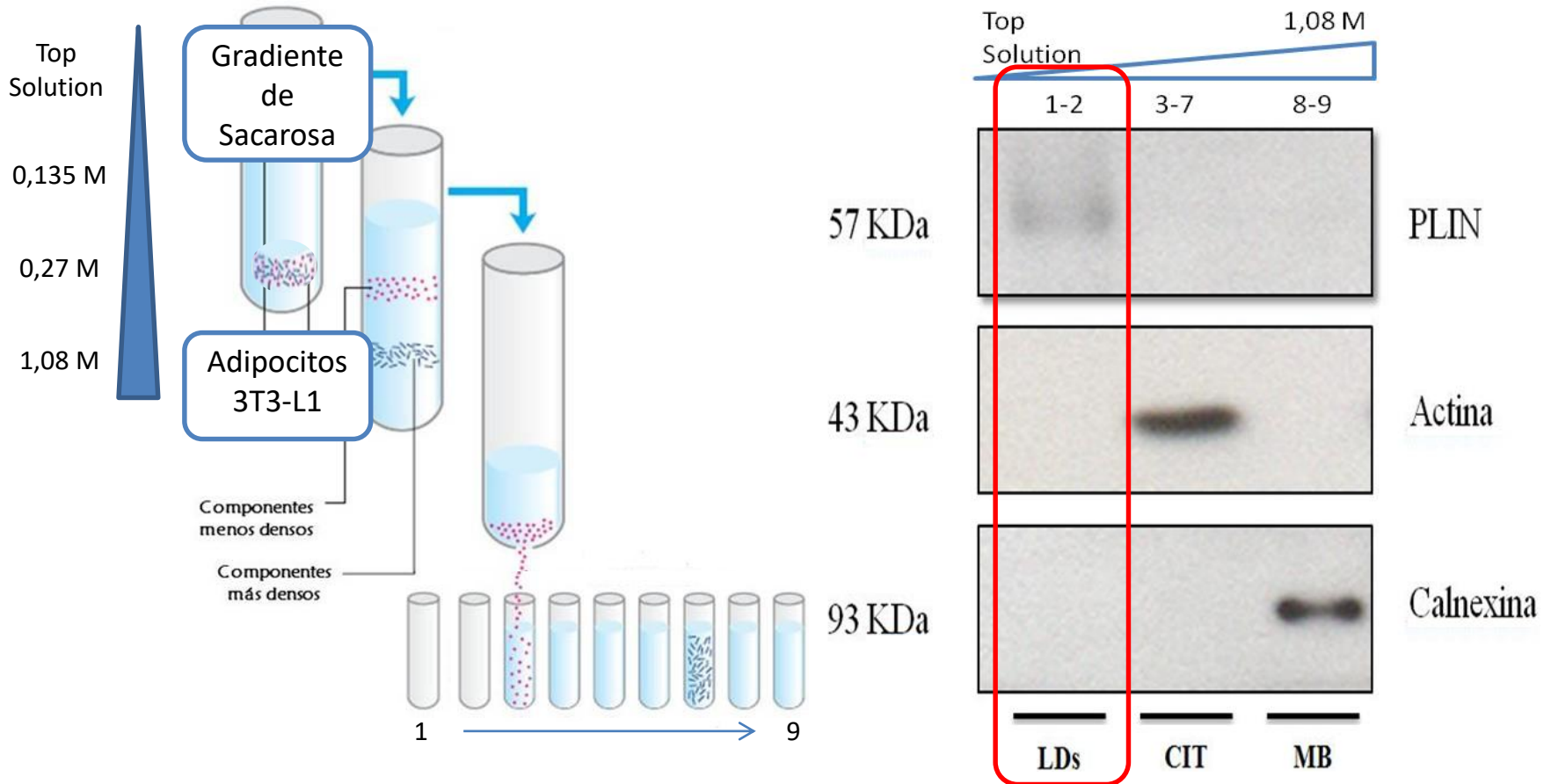


RESULTADOS

Obtención de fracciones enriquecidas en LDs

Fraccionamiento celular

Western Blotting



RESULTADOS

Extracción de lípidos

Ensayo 1: **Mock**

F1

F2

F1 + F2

Liofilización

Protocolo MTBE



Lipidómica

Base de datos METLIN

Mayor cantidad y diversidad de FAs

Base de datos Agilent

Poca detección

La combinación de ambas fracciones diluye la muestra
Pobre detección de fosfolípidos

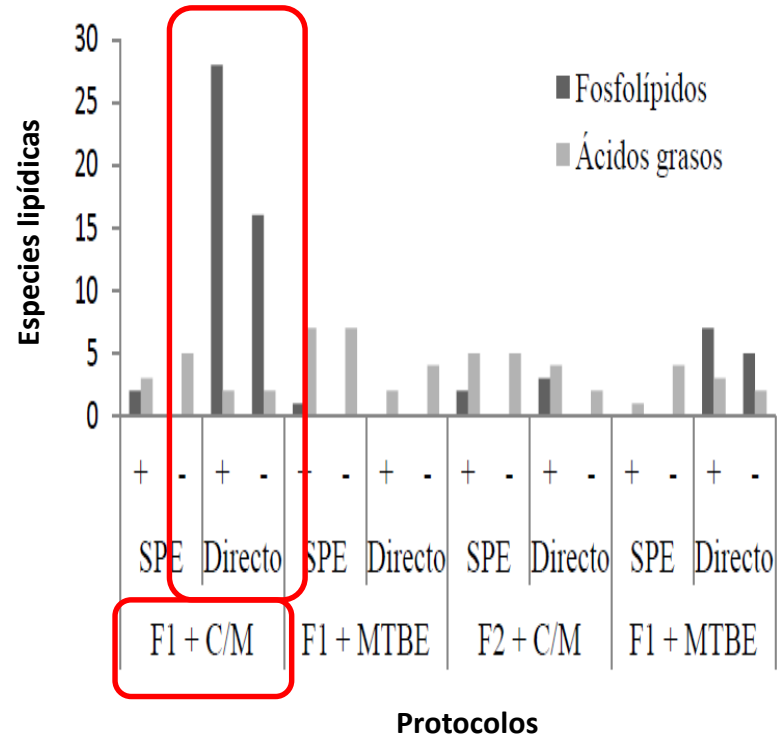
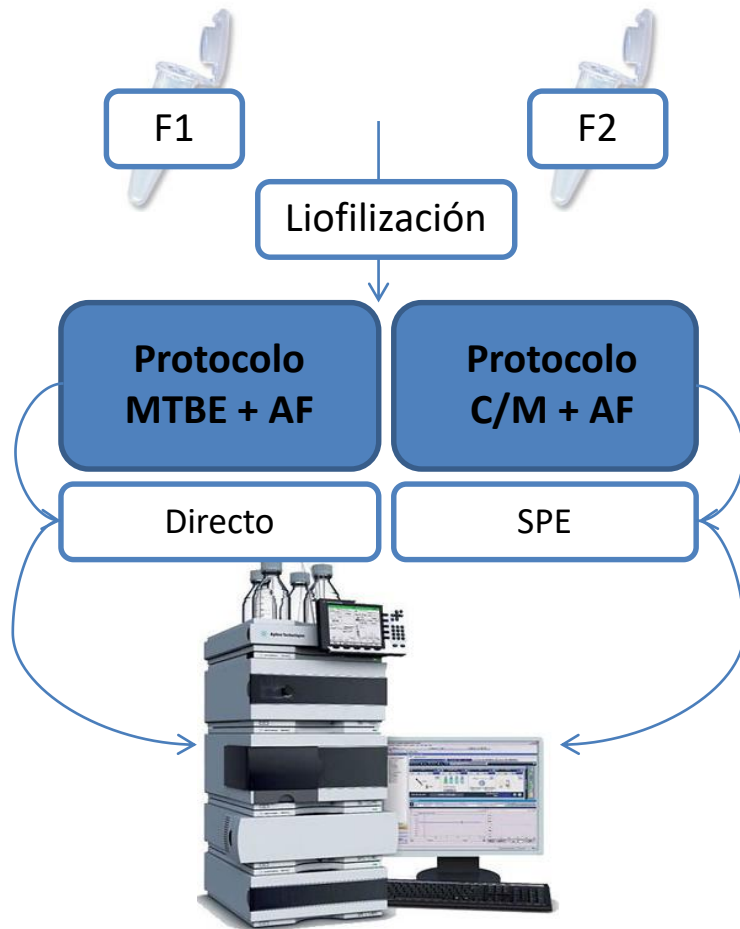
RESULTADOS

Extracción de lípidos

Ensayo 2: **Mock**

Lipidómica

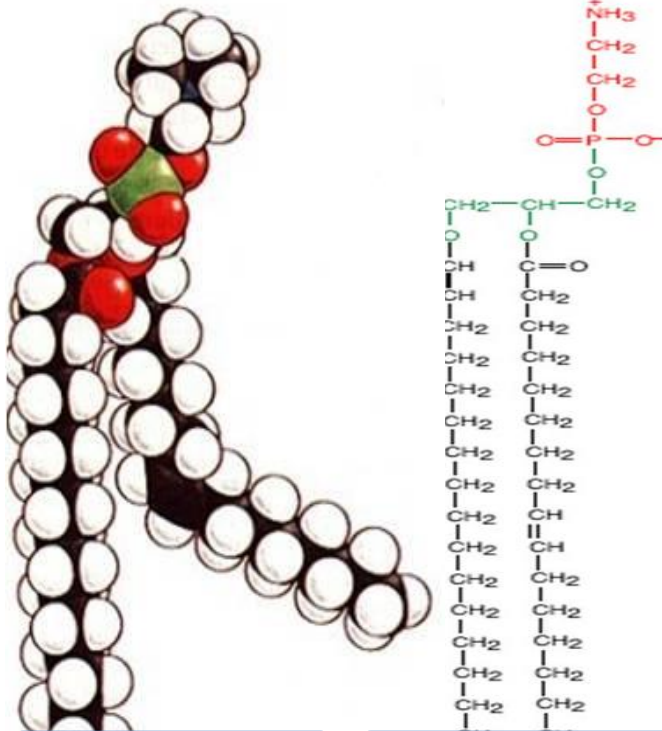
Base de datos METLIN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lípidos identificados

Glicerofosfolípidos, GPs

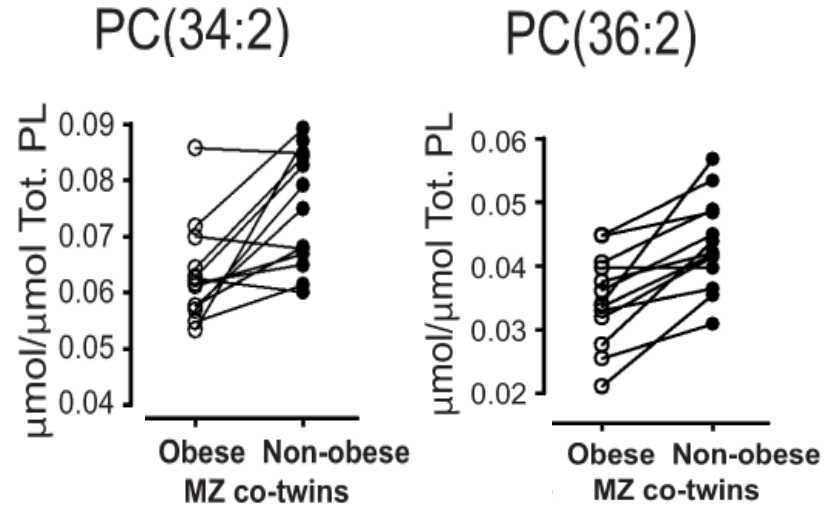


Fosfolípidos

Plasmalógenos

Association of Lipidome Remodeling in the Adipocyte Membrane with Acquired Obesity in Humans

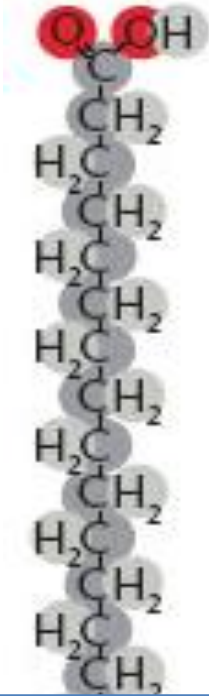
Kirsi H. Pietiläinen^{1,2,3*}, Tomasz Róg^{4*}, Tuulikki Seppänen-Laakso^{5*}, Sam Virtue^{6*}, Peddinti Gopalacharyulu⁵, Jing Tang⁵, Sergio Rodriguez-Cuenca⁶, Arkadiusz Maciejewski^{4,7}, Jussi Naukkarinen^{8,9}, Anna-Liisa Ruskeepää⁵, Perttu S. Niemelä⁵, Laxman Yetukuri⁵, Chong Yew Tan⁶, Vidya Velagapudi⁵, Sandra Castillo⁵, Heli Nygren⁵, Tuulia Hyötyläinen⁵, Aila Rissanen¹, Jaakko Kaprio^{2,3,9}, Hannele Yki-Järvinen¹⁰, Ilpo Vattulainen^{4,11,12}, Antonio Vidal-Puig⁶, Matej Orešič^{3,5*}



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lípidos identificados

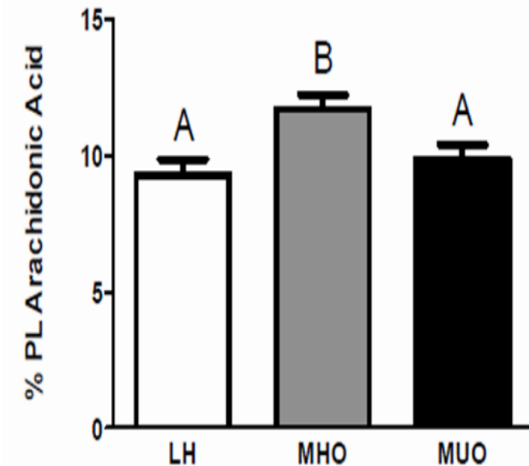
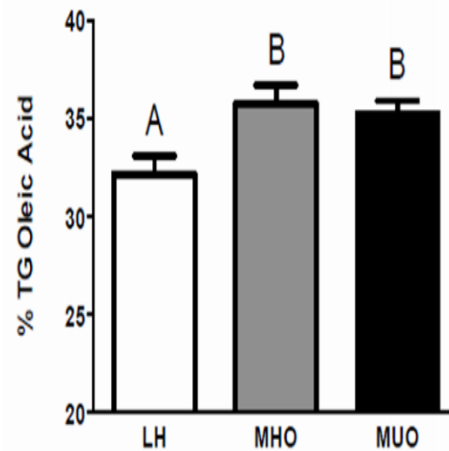
Ácidos grasos, FAs



Ác. Oleico
Ác. Araquidónico

A Distinct Fatty Acid Profile Underlies the Reduced Inflammatory State of Metabolically Healthy Obese Individuals

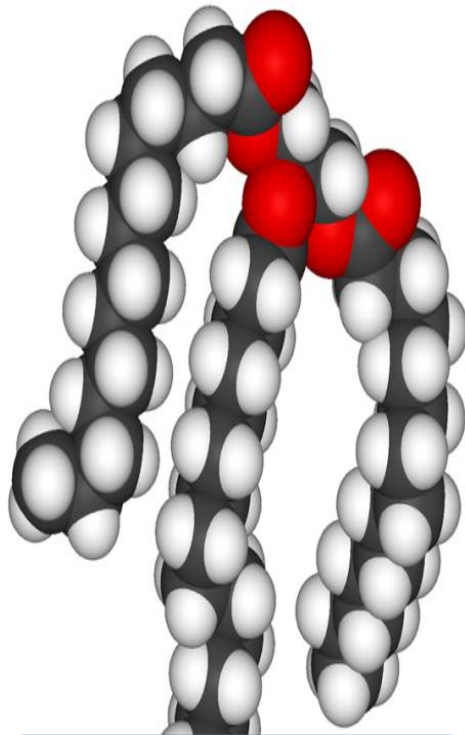
Maude Perreault^{1,9}, Michael A. Zulyniak^{1,9}, Flavia Badoud¹, Susan Stephenson², Alaa Badawi³, Andrea Buchholz⁴, David M. Mutch^{1*}



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lípidos identificados

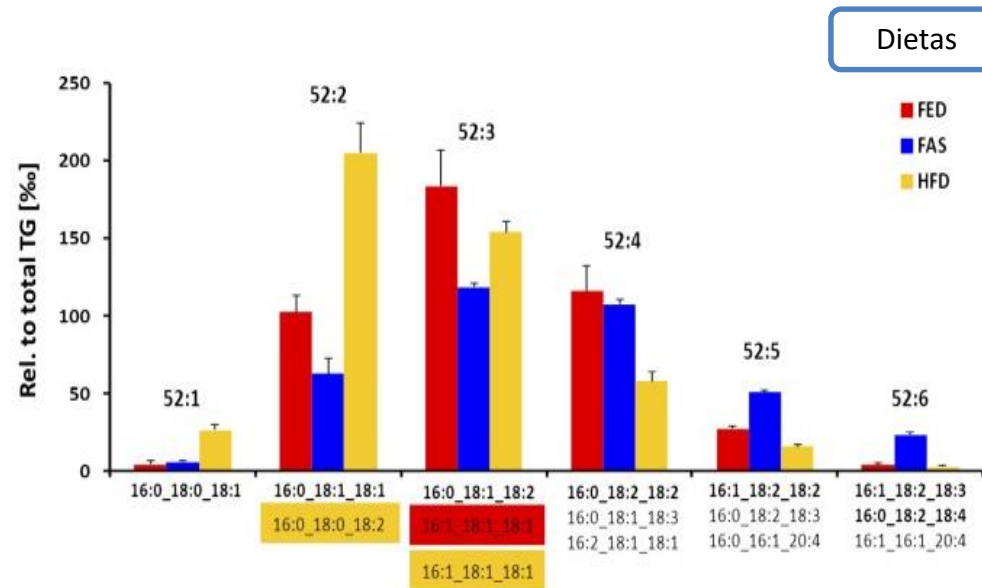
Glicerolípidos, GLs



TAGs

Lipidomic analysis of lipid droplets from murine hepatocytes reveals distinct signatures for nutritional stress

Chandramohan Chitraju,^{1,*} Martin Trötz Müller,^{1,†} Jürgen Hartler,[§] Heimo Wolinski,^{*} Gerhard G. Thallinger,[§] Achim Lass,^{*} Rudolf Zechner,^{*} Robert Zimmermann,^{*} Harald C. Köfeler,[†] and Friedrich Spener^{2,*}



CONCLUSIONES FINALES

Rab18 podría desempeñar un papel como mediador del transporte de lípidos entre las gotas lipídicas y los orgánulos relacionados con el metabolismo lipídico, a través del anclaje entre estos orgánulos, lo que podría ocurrir a nivel de las membranas asociadas a mitocondrias o MAMs

Para obtener un perfil lipidómico óptimo de LDs de adipocitos 3T3-L1 es recomendable realizar la extracción de lípidos mediante el uso de cloroformo/metanol + ácido fórmico y la realización del análisis de cromatografía líquida sin previa purificación en fase sólida, analizando los resultados en la base de datos METLIN