

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Mecanismos moleculares y celulares de la
acción de Rab18 en adipocitos**

**Marina R. Pulido Toledano
Córdoba 2010**

TITULO: *Mecanismos moleculares y celulares de la acción de Rab18 en adipocitos*

AUTOR: *Marina Rosa Pulido Toledano*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-693-4175-9

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Mecanismos moleculares y celulares de la
acción de Rab18 en adipocitos**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Marina R. Pulido Toledano**,
Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de **Doctora en Ciencias**.

Los Directores

Dra. Maria Del Mar Malagón Poyato
Catedrática de Biología Celular de la
Universidad de Córdoba

Dr. Rafael Vázquez Martínez
Profesor Titular de Biología Celular
de la Universidad de Córdoba

En Córdoba, 11 de Mayo de 2010



TÍTULO DE LA TESIS: *Mecanismos moleculares y celulares de la acción de Rab18 en adipocitos.*

DOCTORANDO/A: Marina R. Pulido Toledano

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en el periodo comprendido entre abril de 2006 y marzo de 2010, la doctoranda Marina R. Pulido Toledano no sólo ha superado con creces los objetivos planteados al comienzo de la misma, sino que ha desarrollado y validado técnicas experimentales de una gran utilidad para el grupo de investigación, que le han permitido obtener resultados muy relevantes en el campo de la proteína Rab18 y en la biología celular del adipocito, que, en un futuro cercano, quedarán patentes en varias publicaciones. Concretamente, como fruto de la colaboración de Marina con otros miembros del equipo se han publicado varios trabajos relacionados con su Tesis Doctoral en las revistas "Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism", y "The Annals of New York Academy of Sciences", revistas de referencia dentro de nuestras áreas de investigación. Además, el trabajo realizado por Marina durante su Tesis Doctoral ha generado directamente dos artículos que, actualmente, se encuentran en fase de revisión en las revistas "Endocrinology" y "Molecular and Cellular Endocrinology".

Por último, la doctoranda ha presentado sus resultados en diferentes congresos de ámbito nacional (9 comunicaciones tipo Póster y 4 Orales) e internacional (6 comunicaciones tipo Póster y 4 Orales), de los que han derivado dos capítulos de libro.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de Mayo de 2010

Firma del/de los director/es

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



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CELULAR, FISIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA**



**GRUPO DE
ENDORINOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR**

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

INFORMAN

Que D^a Marina R. Pulido Toledano, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “**Mecanismos moleculares y celulares de la acción de Rab18 en adipocitos**” y que bajo nuestro juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, de 2010

Fdo.: Prof. Dr. María del Mar
Malagón Poyato

Fdo.: Prof. Dr. Rafael
Vázquez Martínez

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. María del Mar Malagón Poyato y Rafael Vázquez Martínez. Dicho proyecto fue subvencionado mediante una beca del Programa Nacional de becas de FPU (FPU- AP2005-3348) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AGRP	Péptido <i>related agouti</i>
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATGL	Lipasa de triglicéridos de tejido adiposo
ATP	5' -adenosina trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CART	Transcritos regulados por cocaína y anfetaminas
CCAAT/EBPs	<i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>
CCK	Colecistoquinina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	Deoxi-ribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDP	Guanosín difosfato
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GH	Hormona del crecimiento (<i>Growth hormone</i>)
GLP	<i>Glucagon like peptide</i>
GTP	Guanosín trifosfato
HSL	Lipasa sensible a hormona
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IL-6	Interleuquina 6
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MGL	Lipasa de monoglicéridos
NPY	Neuropéptido Y
OXM	Oxintomodulina
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria

PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PI3K	Fosfoinositol-3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
POMC	Pro-opiomelanocortina
PP	Polipéptido pancreático
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PYY	Péptido YY
RE	Retículo endoplásmico
RT	Retrotranscripción
SAT	<i>Subcutaneous adipose tissue</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SEM	Error estándar de la media
siRNA	Acido ribonucleico interferente pequeño
SNARE	<i>Soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein recptor</i>
SNC	Sistema nervioso central
SVF	Fracción de estroma vascular
T₃	Triyodotironina
T₄	Tiroxina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TSH	Hormona estimulante de la tiroides o tirotropina
TZD	Tiazolidinediona
u.a.	Unidades arbitrarias
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i>
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
α-MSH	Hormona estimulante de los melanocitos alfa

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Homeostasis del metabolismo lipídico	1
1.1.1. <i>Hipotálamo y homeostasis lipídica</i>	2
1.1.2. <i>Páncreas y homeostasis lipídica</i>	3
1.1.3. <i>Hígado y homeostasis lipídica</i>	6
1.1.4. <i>Músculo y homeostasis lipídica</i>	7
1.1.5. <i>Tejido adiposo y homeostasis lipídica</i>	8
1.2. El tejido adiposo	9
1.2.1. <i>Componentes celulares del tejido adiposo</i>	10
1.2.2. <i>Función endocrina del tejido adiposo</i>	15
1.2.3. <i>Función reguladora del metabolismo lipídico del tejido adiposo</i>	19
1.3. Gotas lipídicas	29
1.3.1. <i>Biogénesis de gotas lipídicas</i>	30
1.3.2. <i>Crecimiento de gotas lipídicas</i>	32
1.3.3. <i>Interacción de las gotas con otros orgánulos celulares</i>	32
1.3.4. <i>Proteínas de la cubierta lipídica</i>	34
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. Materiales y Reactivos	47
3.2. Material biológico	48
3.2.1. <i>Obtención de muestras de tejido adiposo</i>	48
3.2.2. <i>Dispersión de tejido adiposo y obtención de fracción de adipocitos maduros y estroma vascular</i>	49
3.2.3. <i>Cultivo de la línea celular 3T3-L1</i>	49
3.3. Tratamientos experimentales	51
3.3.1. <i>Análisis de la expresión de Rab18 durante el desarrollo posnatal de rata</i>	51
3.3.2. <i>Análisis de la expresión de Rab18 bajo diferentes condiciones metabólicas en ratón</i>	51
3.3.3. <i>Estudio de la influencia de diferentes ejes hipofisarios en la expresión de Rab18 en tejido adiposo</i>	53
3.3.4. <i>Análisis del efecto de diferentes modulares del metabolismo lipídico sobre los niveles de ARNm y proteína de Rab18</i>	55
3.3.5. <i>Estudio de la localización intracelular de Rab18</i>	55
3.3.6. <i>Análisis de la expresión de Rab18 en humanos</i>	56
3.4. Técnicas básicas en Biología Molecular	57
3.4.1. <i>Aislamiento de ARNm</i>	57
3.4.2. <i>Retrotranscripción del ARN</i>	57
3.4.3. <i>Diseño de oligonucleótidos para PCR</i>	57
3.4.4. <i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>	58
3.4.5. <i>Obtención de curvas estándar</i>	59

3.4.6. PCR convencional (PCR a tiempo final).....	60
3.5. Estudios de western blotting.	60
3.5.1. Obtención de extractos proteicos.....	60
3.5.2. Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia.	61
3.5.3. Inmunodetección y análisis densitométrico.	62
3.6. Estudios de localización intracelular mediante inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.	63
3.6.1. Inmunofluorescencia de células 3T3-L1 y adipocitos.	63
3.6.2. Inmunohistoquímica de cortes de tejido adiposo.....	64
3.7. Transfección de cultivos celulares.....	65
3.7.1. Transfección transitoria de líneas celulares con vectores plasmídicos.	65
3.7.2. Transfección transitoria de células 3T3-L1 con secuencias de ARN interferente para el silenciamiento de la expresión de Rab18.	65
3.8. Estudios funcionales.....	66
3.8.1. Análisis del tamaño de las gotas lipídicas en células 3T3-L1 transfectadas.	67
3.8.2. Determinación de la actividad lipolítica celular en células 3T3-L1.....	67
3.8.3. Cuantificación de la actividad lipogénica de células 3T3-L1.	68
3.9. Análisis estadístico.	69
3.10. Protocolos.....	70
<i>Protocolo 1: Dispersión de tejido adiposo para la obtención de adipocitos maduros y fracción de estroma vascular.....</i>	70
<i>Protocolo 2: Tinción de Oil Red O.</i>	71
<i>Protocolo 3: Fraccionamiento subcelular.</i>	72
<i>Protocolo 4: Extracción de ARN.....</i>	73
<i>Protocolo 5: Inmunocitoquímica por fluorescencia.....</i>	75
<i>Protocolo 6: Inmunocitoquímica en suspensión.....</i>	75
<i>Protocolo 7: Inmunohistoquímica.</i>	76
<i>Protocolo 8: Electroporación de células 3T3-L1 utilizando el sistema de Gene Pulse Xcell(BioRad).....</i>	78
<i>Protocolo 9: Medida de actividad lipolítica celular.</i>	78
<i>Protocolo 10: Medida de actividad lipogénica celular.</i>	79
4. RESULTADOS	81
4.1. Rab18 en modelos animales.	83
4.1.1. Expresión de Rab18 durante el desarrollo potsnatal.	85
4.1.2. Expresión de Rab18 en tejido adiposo bajo diferentes condiciones metabólicas.	86
4.1.3. Regulación hormonal de la expresión de Rab18 en tejido adiposo.....	91
4.2. Rab18 en tejido adiposo humano.....	95
4.2.1. Localización de Rab18 en tejido adiposo humano.	95
4.2.2. Expresión de Rab18 en tejido adiposo humano bajo diferentes condiciones metabólicas.	96

4.3. Rab18 en adipocitos 3T3-L1.	98
4.3.1. <i>Evolución de la expresión de Rab18 durante el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1.</i>	99
4.3.2. <i>Regulación de la expresión, contenido proteico y localización subcelular de Rab18 en adipocitos 3T3-L1.</i>	100
4.3.3. <i>Estudios de colocalización de Rab18 y la proteína de la cubierta de las gotas lipídicas, perilipina.</i>	109
4.3.4. <i>Estudios de colocalización de Rab18 y proteínas del retículo endoplasmático.</i>	110
4.3.5. <i>Efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre el tamaño de las gotas lipídicas.</i>	112
4.3.6. <i>Contribución de Rab18 en los procesos de lipólisis y lipogénesis.</i>	117
5. DISCUSIÓN	121
5.1. <i>Rab18 en modelos animales.</i>	123
5.2. <i>Rab18 en adipocitos 3T3-L1.</i>	128
5.3. <i>Rab18 en humanos.</i>	135
6. CONCLUSIONES	139
7. BIBLIOGRAFÍA.....	143

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Homeostasis del metabolismo lipídico.

La homeostasis lipídica del organismo está regulada principalmente por el tejido adiposo, ya que es este tejido el encargado de almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos y gestionarlo en periodos de deficiencia nutricional. Así pues, alteraciones en el control del balance energético en el tejido adiposo, como aquellas que tienen lugar en condiciones de obesidad, pueden conllevar la acumulación de ácidos grasos en otros tejidos también involucrados en el metabolismo lipídico pero que no están especializados en el almacenamiento de ácidos grasos, como hígado y músculo, y con ello, el aumento de la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus de tipo II, etc (Nogueiras *et al.*, 2010). Por lo tanto, es necesaria la existencia de un sistema de regulación dinámico que asegure una masa de tejido adiposo adecuada para mantener la homeostasis lipídica, y para ello, varios órganos y tejidos participan de forma coordinada en el mantenimiento de dicha homeostasis: hipotálamo, hipófisis, páncreas, hígado, músculo y tejido adiposo. En la Figura 1 se resume la regulación de la homeostasis energética corporal bajo la acción integrada de estos órganos y tejidos.

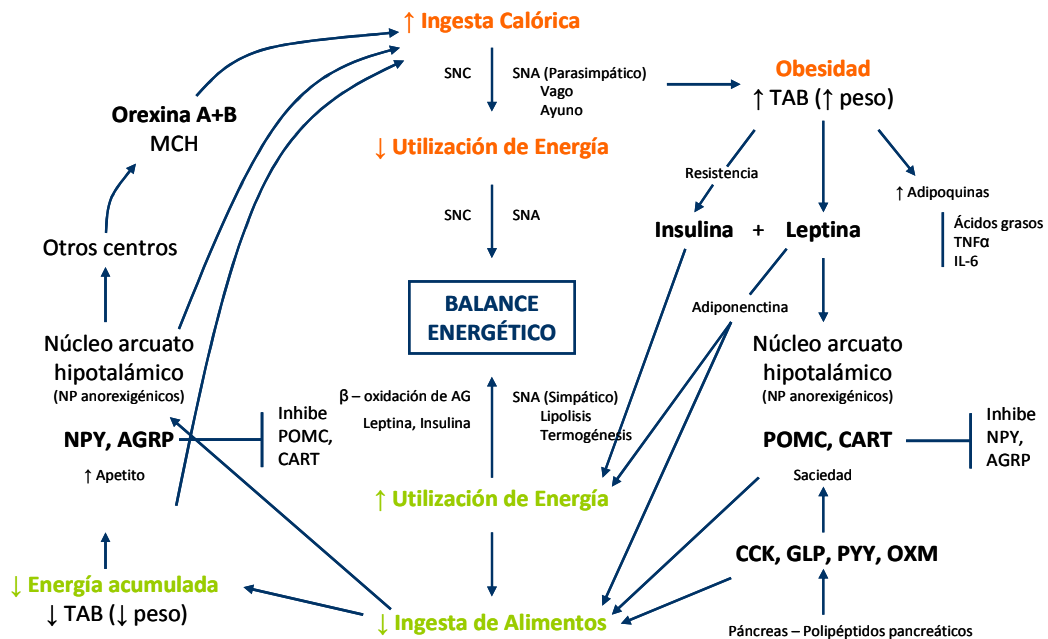


Fig 1. Regulación de la homeostasis lipídica. El incremento de la ingesta calórica asociado a una disminución del uso energético provoca obesidad. Las hormonas leptina, adiponectina e

insulina estimulan la liberación de los péptidos anorexigénicos POMC y CART en el núcleo arcuato del hipotálamo, que junto con las hormonas liberadas en el tracto digestivo (CCK, GLP, PYY, OXM, and PP), disminuyen la ingesta e incrementa el uso energético. Al mismo tiempo, el SNA induce lipólisis incrementando la liberación de ácidos grasos utilizados para la obtención de energía. Por otro lado, el ayuno estimula la liberación de péptidos orexigénicos en el hipotálamo, que estimulan el apetito, junto con la hormona gástrica ghrelina y los péptidos orexin A, orexin B y MCH. Estas acciones son integradas por el sistema nervioso autónomo (SNP y SNS) para favorecer un uso energético adecuado periférico que permita mantener la homeostasis lipídica (modificado de Redinger 2009)

1.1.1. Hipotálamo y homeostasis lipídica.

Numerosos estudios han demostrado que el sistema nervioso central controla el balance energético regulando tanto la ingesta como el gasto energético en respuesta a hormonas, nutrientes y la señalización de neuronas (Nogueiras *et al.*, 2010). Por ejemplo, el sistema nervioso parasimpático facilita el almacenamiento de grasa y disminuye el uso de energía corporal (Kreier *et al.*, 2002). Por su parte, el sistema nervioso simpático estimula los procesos de lipólisis e incrementa la liberación de ácidos grasos (Lafontan y Berlan, 1993; Schwartz *et al.*, 2000). Sin embargo, el hipotálamo, concretamente el núcleo arcuato, es el área más relevante donde se integra la información nutricional originada en los órganos periféricos, actuando como principal regulador de la homeostasis lipídica. En el núcleo arcuato del hipotálamo existen dos poblaciones de neuronas, una que expresa los péptidos orexigénicos NPY y AGRP y otra población que expresa los péptidos anorexigénicos POMC y CART. Ambos tipos de neuronas son las responsables de la integración de la información sobre el estado nutricional del organismo, siendo directa y diferencialmente sensibles a otras hormonas circulantes como leptina, insulina, ghrelina y PYY, así como otros nutrientes como glucosa, ácidos grasos y aminoácidos (Lenard y Berthoud, 2008).

En humanos, durante el período de ayuno de 6 o más horas que ocurre en el estado postprandial se estimula el núcleo arcuato hipotalámico que libera el neuropéptido Y (NPY) y el péptido “*related agouti*” (AGRP) y se produce el aumento del apetito. Al mismo tiempo, el núcleo lateral del hipotálamo también libera los neuropéptidos orexina A y B, que incrementan el comportamiento de búsqueda de alimento y la ingesta. Por otro lado, tras la ingesta de nutrientes se secreta la hormona leptina en plasma que actúa como señal de saciedad (anorexigénica) y provoca la

disminución de la ingesta, lo que también se puede llevar a cabo mediante el aumento de los niveles plasmáticos de los neuropéptidos POMC y CART (Redinger, 2009). Esta acción anorexigénica se sustenta gracias a la insulina y la adiponectina, que incrementan la captación de glucosa y su uso.

En cuanto al control de la ingesta, también son muy importantes las hormonas liberadas por el tracto digestivo como la ghrelina, que es liberada a la circulación sistémica durante el ayuno y provoca aumento del apetito y de la ingesta mediante la estimulación de la liberación de los neuropéptidos hipotálamicos NPY y AGRP. Posteriormente, los nutrientes estimulan la liberación de hormonas intestinales CCK, GLP, PYY, OXM y PP en la circulación, que actúan a nivel hipotalámico sobre la liberación de los péptidos anorexigénicos POMC y CART (Redinger, 2009).

1.1.2. Páncreas y homeostasis lipídica.

El páncreas endocrino está formado por islotes de células con función endocrina dispersas dentro del páncreas exocrino. La mayoría de los islotes contienen tres tipos de células: células A que secretan glucagón, células B que secretan insulina y amilina y células D que secretan somatostatina. Otros islotes distintos contienen células F que secretan el polipéptido pancreático (PP). Cada una de estas hormonas tiene una función particular, pero de manera general, se podría decir que todas ellas participan en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa. La insulina tiene como función principal la eliminación de glucosa de la sangre mediante la estimulación de su captación por el tejido adiposo y el músculo así como la supresión de la liberación de glucosa desde el hígado (Fig. 2). En cambio, el glucagón induce la producción y secreción de glucosa en este órgano (Fig. 2). La amilina, co-secretada junto a la insulina, produce una disminución de la ingesta e inhibe la secreción de glucagón. Por otra parte, la hormona PP actúa de forma muy diversa modulando la motilidad gástrica, la secreción exocrina del páncreas y la comida, efectos relacionados con la modulación del sistema colinérgico. Finalmente, la somatostatina parece tener una función local inhibiendo la secreción de insulina, amilina y glucagón (Woods *et al.*, 2006).

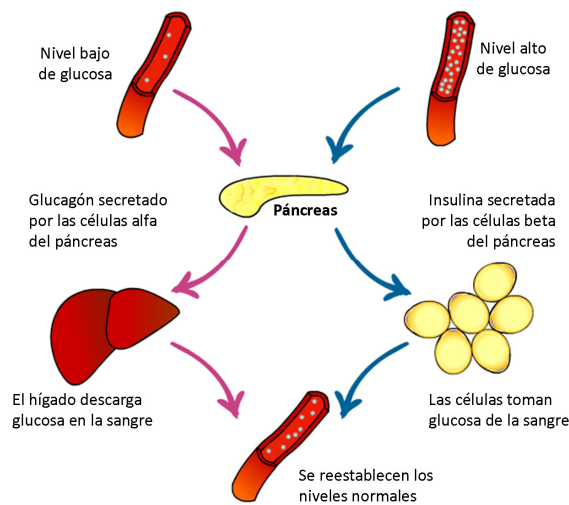


Figura 2. Principales acciones de las hormonas insulina y glucagón. Ambas hormonas actúan de manera coordinada para mantener el equilibrio de la homeostasis energética.

- Insulina

La acción mejor conocida de la insulina es la de incrementar la captación de glucosa en la mayoría de tejidos periféricos, disminuyendo de esta manera la concentración de glucosa en sangre. Esta hormona se pensaba que actuaba de manera exclusiva en tejidos periféricos, siendo incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, puesto que las neuronas no necesitan la estimulación de insulina para captar y oxidar glucosa para la obtención de energía (Seaquist, 2001). Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que esta hormona atraviesa dicha barrera, actuando sobre receptores específicos de neuronas para regular la ingesta y el peso corporal (Plum, 2005; Porte, 2002). De hecho, los receptores de insulina se expresan en muchas partes del cerebro, siendo particularmente abundantes en el núcleo arcuato del hipotálamo (Plum, 2005), lo que contribuye a la sensación de saciedad durante las comidas. La concentración de insulina en condiciones basales es baja, pero aumenta durante la ingesta (estado prandial) o tras la administración de glucosa (condición estimulada). Los niveles de insulina en dichos estados son proporcionales a la cantidad de tejido adiposo existente, de manera que los individuos delgados presentan una cantidad menor de insulina en plasma que los obesos (Bagdade, 1967 .; Polonsky, 1988; Woods, 1974), por lo que los niveles plasmáticos de esta hormona se consideran un indicador de la cantidad de tejido adiposo presente en

un individuo. Por otro lado, la insulina actúa como *feedback* negativo sobre el hipotálamo, regulando la cantidad de tejido adiposo corporal. Cuando un individuo pierde peso, la cantidad de insulina secretada es menor, por lo que hay una menor señalización de esta hormona en el hipotálamo y se incrementa la ingesta hasta que se recupera el peso corporal. Sin embargo, si un individuo gana peso, la señal de insulina aumenta, se reduce la ingesta y hay una pérdida de peso (Woods *et al.*, 2006). De hecho, el sistema de señalización de insulina en el hipotálamo controla muchos aspectos de la homeostasis energética de tal manera que el bloqueo de la cascada de señalización de insulina puede provocar un incremento en la ingesta, lo que conlleva un aumento de la obesidad y la desregulación de la homeostasis de la glucosa (Woods *et al.*, 2006).

- *Amilina*

Se piensa que esta hormona actúa como una señal de saciedad, actuando sobre el área postrema del cerebro. En concreto, durante la comida se produce un aumento rápido de los niveles de amilina en sangre directamente proporcional a la cantidad de comida ingerida (Butler y Chang, 1990; Moore, 1991; Young, 1998). De hecho, el bloqueo de sus receptores en el sistema nervioso central produce un incremento en la ingesta, en el peso corporal y en la adiposidad (Rushing y D'Alessio, 2001). La acción anorexigénica de esta hormona parece que se lleva a cabo incrementando o facilitando la señal de otros péptidos como CCK, con el que actúa de forma sinérgica como señales de saciedad (Bhavsar, 1998; Woods *et al.*, 2006).

- *Glucagón*

El glucagón es una hormona cuya principal función es estimular la producción de glucosa a través de glicogenolisis o gluconeogénesis en el hígado, favoreciendo así el mantenimiento de los niveles normales de glucosa en plasma.

El gen del proglucagón se expresa en el páncreas así como en el intestino y sistema nervioso central. El control de la expresión de proglucagón y de su procesamiento postranduccional es diferente en estos tejidos, lo que permite la

existencia de varios péptidos derivados, como glicentina, oxintomodulina, GLP-1 y GLP-2 (cerebro e intestino) y el glucagón (proglucagón 33-61, sintetizado en páncreas) (Woods *et al.*, 2006).

La ingesta aumenta la producción de glucagón dependiente de la activación del hipotálamo, del complejo vago dorsal o de las ramas gástrica o hepática del nervio vago. A su vez, la producción de glucagón induce la inhibición de la toma de alimentos a nivel de sistema nervioso central, lo que parece estar asociado a su efecto glicogenolítico e hiperglucémico (Woods *et al.*, 2006).

Por otra parte, el glucagón también induce la liberación de ácidos grasos en el tejido adiposo al incrementar la actividad lipolítica celular como consecuencia de un aumento de los niveles de AMPc intracelulares, lo que parece depender del sistema nervioso central ya que ratas sometidas a una denervación del tejido adiposo presentan unos niveles de ácidos grasos libres disminuidos bajo el tratamiento con glucagón (Hagen, 1961; Heppner *et al.*, 2010)

1.1.3. Hígado y homeostasis lipídica.

El hígado tiene una función principal en la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y de energía. La glucosa penetra en el hígado a través del transportador GLUT2, siendo almacenada en dicho tejido en forma de glucógeno. Sin embargo, cuando hay un exceso de glucosa, ésta entra en la ruta de glucólisis originando los precursores para la lipogénesis *de novo* y aumentando la concentración de lípidos. Éstos pueden ser almacenados en forma de triglicéridos en el hígado o exportados en forma de VLDL. Así, la ingestión de un exceso de energía induce la acumulación de ácidos grasos en el hígado, siendo este un fenómeno bastante común en individuos obesos, con resistencia a insulina, con síndrome metabólico, con esteatohepatitis alcohólica y/o con enfermedades que provocan hígado graso no alcohólico (Chen *et al.*, 2007).

La insulina regula la concentración de glucosa plasmática inhibiendo la secreción de esta en el hígado y estimulando la síntesis de glucógeno, que se acumula en dicho órgano. En el hígado existen dos mecanismos a partir de los cuales se puede

producir glucosa: glucogenolisis y gluconeogénesis. La glucogenolisis produce glucosa durante ayunos cortos y es inhibida por la insulina 1-2 h después de la ingesta (Gastaldelli *et al.*, 2001). Durante periodos de ayuno prolongados, el glucógeno almacenado en el hígado se agota, por lo que se incrementa la actividad gluconeogénica y aumenta la síntesis *de novo* de glucosa a partir de diferentes precursores como piruvato, lactato, glicerol y aminoácidos. Los procesos de gluconeogénesis también aumentan cuando los niveles de insulina plasmática son bajos (diabetes de tipo I) o cuando el hígado es resistente a insulina (obesidad y diabetes mellitus de tipo II) (Weickert y Pfeiffer, 2006).

El aumento de glucosa a partir de glucogenolisis y gluconeogénesis engloba cambios en la actividad de diferentes enzimas que participan en dichos procesos, como la PEPCCK y la fosfatasa 6-glucosa, enzimas que son inhibidas por la acción de la insulina. Por otra parte, se ha descrito que otras hormonas, como glucagón y glucocorticoides, también pueden actuar sobre dichas enzimas. Además, niveles elevados de glucosa también inhiben la gluconeogénesis al suprimir el gen PEPCCK (Nordlie *et al.*, 1999). Además, la producción de glucosa en hígado también está regulada por el sistema nervioso central (Weickert y Pfeiffer, 2006).

1.1.4. Músculo y homeostasis lipídica.

El músculo es el responsable de la captación del 70-80% de la glucosa plasmática, acumulándola en su interior en forma de glucógeno que será utilizado para la obtención de energía.

En 1963, Randle publicó el ciclo de glucosa-ácido graso en músculo (Fig.3), según el cual un incremento en la disponibilidad de ácidos grasos plasmáticos provoca un descenso de la utilización de glucosa en el músculo y una acumulación de ácidos grasos en forma de triglicéridos. La disponibilidad y oxidación de ácidos grasos permite un incremento en el ratio acetil-CoA:CoA en mitocondrias, lo que inhibe la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa disminuyendo así la oxidación de glucosa en músculo (Frayn, 2003; Randle, 1963).

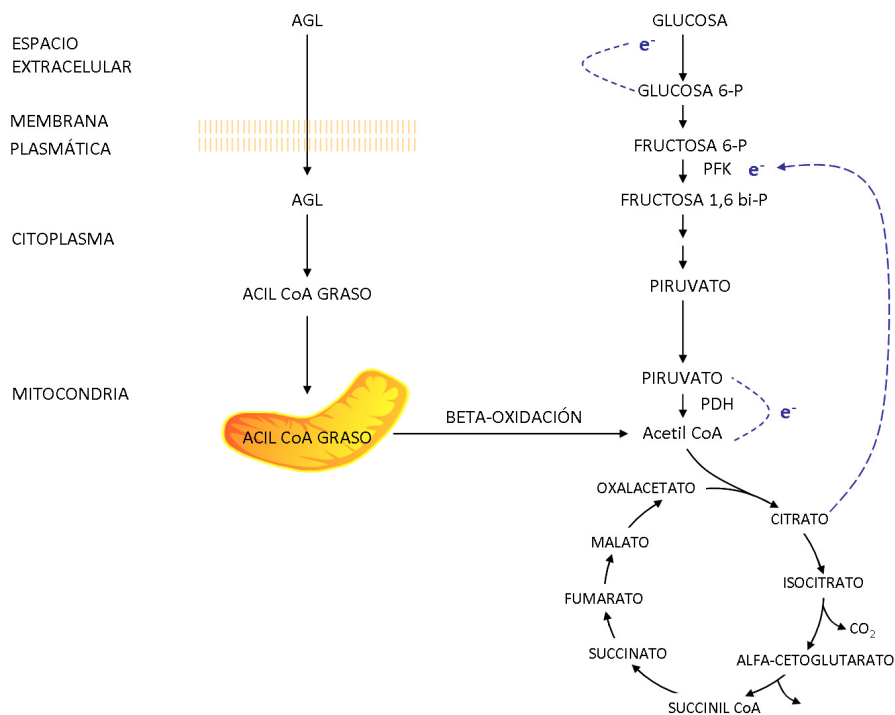


Figura 3. Ciclo de Randle. El exceso de ácidos grasos inhibe la utilización de glucosa en hígado, al aumentar la concentración de acetil-CoA que inhibe la enzima piruvato deshidrogenasa.

El aumento de ácidos grasos plasmáticos también altera la cascada de señalización de insulina, inhibiendo la actividad de la enzima PI3K, la fosforilación de IRS-1 y la translocación de GLUT4 a la membrana. El conjunto de todo ello produce resistencia a insulina en músculo (Koh *et al.*, 2005). En definitiva, se pone de manifiesto que los desórdenes en el metabolismo de ácidos grasos en el músculo son críticos en la patofisiología de la resistencia a insulina (Yu y Ginsberg, 2005).

1.1.5. Tejido adiposo y homeostasis lipídica.

En un principio se pensaba que el tejido adiposo regulaba la homeostasis lipídica sólo a través de los ácidos grasos circulantes, los cuales tienen efecto sobre el metabolismo de la glucosa en el hígado. Sin embargo, se ha demostrado que los ácidos grasos también afectan al metabolismo lipídico en otros tejidos, como músculo y páncreas, donde la acumulación de ácidos grasos o triglicéridos produce lipotoxicidad. Además, el tejido adiposo regula la homeostasis lipídica secretando una gran variedad

de moléculas, las llamadas adipoquinas, que tienen efectos diversos sobre el metabolismo de lípidos y glucosa y sobre la sensibilidad a insulina (Yu y Ginsberg, 2005)

1.2. El tejido adiposo.

Durante mucho tiempo, el tejido adiposo ha sido considerado como un tejido metabólicamente inactivo. Sin embargo, en la actualidad se sabe que el tejido adiposo controla el metabolismo lipídico a través de señales endocrinas, paracrinas y autocrinas, que le permiten regular el metabolismo tanto en adipocitos como en otros tipos celulares del sistema nervioso central, hígado, músculo y páncreas (Kim y Moustaid-Moussa, 2000). Los adipocitos del tejido adiposo son los encargados de almacenar la energía en forma de triglicéridos en orgánulos intracelulares especializados, las gotas lipídicas. Cuando se necesita energía, los triglicéridos son rápidamente hidrolizados y los ácidos grasos resultantes salen del adipocito y son transportados hasta otros tejidos donde son utilizados (Guilherme *et al.*, 2008).

Por otra parte, tras el descubrimiento de la leptina en 1990 (Zhang *et al.*, 1994) se empezó a considerar el tejido adiposo como un verdadero órgano endocrino. Así, hoy en día se conoce 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). Estas moléculas actúan regulando el metabolismo energético en otros tejidos como hígado y músculo, y además presentan funciones específicas en procesos como inmunidad, inflamación y reproducción (Guilherme *et al.*, 2008) (Fig.4).



Fig 4. Funciones del tejido adiposo. El tejido adiposo secreta una gran variedad de moléculas bioactivas que le permite participar en el control de numerosos procesos en el individuo (Modificado de Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2005).

1.2.1. Componentes celulares del tejido adiposo.

El tejido adiposo es muy heterogéneo tanto a nivel de composición celular como en cuanto a su localización anatómica. Así, éste está compuesto por adipocitos maduros inmersos en una matriz de colágeno donde también residen células madre mesenquimales, preadipocitos, terminales nerviosos, células sanguíneas y tejido vascular, que en conjunto se denomina fracción de estroma vascular (SVF) (Frayn *et al.*, 2003). Ambos componentes, adipocitos maduros y SVF, son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo y, en consecuencia, ambos participan en la alteración del metabolismo glucídico y lipídico y en la producción y liberación de adipocinas.

Los adipocitos son las células más abundantes dentro del tejido adiposo, constituyendo el 25% del número total de células. Son células esféricas y de tamaño muy variable que oscila entre 20 y 200 μm de diámetro. Estas células acumulan energía en forma de triglicéridos, diacilglicerol, fosfolípidos, ácidos grasos no

esterificados y colesterol, los cuales son almacenados en el interior de orgánulos altamente especializados, las gotas lipídicas.

Por otro lado, entre las células sanguíneas presentes en tejido adiposo abundan los monocitos y macrófagos. En individuos delgados, los macrófagos de tejido adiposo se caracterizan por presentar una elevada expresión de genes anti-inflamatorios y una elevada capacidad de reparación tisular y angiogénesis (Kershaw y Flier, 2004). Sin embargo, en obesidad el número de macrófagos en tejido adiposo aumenta debido a una mayor infiltración de este tipo celular desde los vasos sanguíneos (Xu *et al.*, 2003), lo que está asociado con un aumento de la secreción de factores inflamatorios (Riordan *et al.*, 2009), como TNF- α , IL-6, amiloide sérico A (SAA), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) o el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), entre otros (Shoelson *et al.*, 2007). El aumento en la producción de estas moléculas desencadena efectos locales a nivel del endotelio que aumentan la producción de moléculas de adhesión (VCAM e ICAM) y modifican la permeabilidad vascular, dando lugar a un aumento en la infiltración de monocitos y la acumulación de macrófagos en el tejido. A su vez, dichos macrófagos producen más factores quimiotácticos atrayentes de otros macrófagos, lo que ayuda al mantenimiento del estado inflamatorio de bajo grado asociado con la obesidad que, en último término, provoca un deterioro progresivo de la señalización de la insulina (Shoelson *et al.*, 2007; Surmi, 2008). Además de los macrófagos, recientemente se ha propuesto que, en condiciones de obesidad, los linfocitos T pueden ser clave en el inicio del proceso inflamatorio, actuando como promotores del reclutamiento y la activación de macrófagos al tejido adiposo (Nishimura *et al.*, 2009). No se conocen con certeza los mecanismos responsables de este enriquecimiento de macrófagos, pero se ha sugerido que puede ser causa de una desregulación en la producción de adipocinas y el incremento del tamaño de los adipocitos (Kershaw y Flier, 2004). De hecho, la obesidad reduce la secreción de adiponectina y aumenta la secreción de leptina, que presentan un efecto anti- y pro-inflamatorio, respectivamente, sobre los macrófagos. Además, se ha observado que el aumento de la liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo, así como la acumulación de lípidos activos (ceramidas) dentro de los macrófagos, pueden activar la producción de citoquinas

inflamatorias en estos últimos (Boden *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2002) . En la figura 5 se esquematiza el estado de tejido adiposo de individuos delgados y obesos.

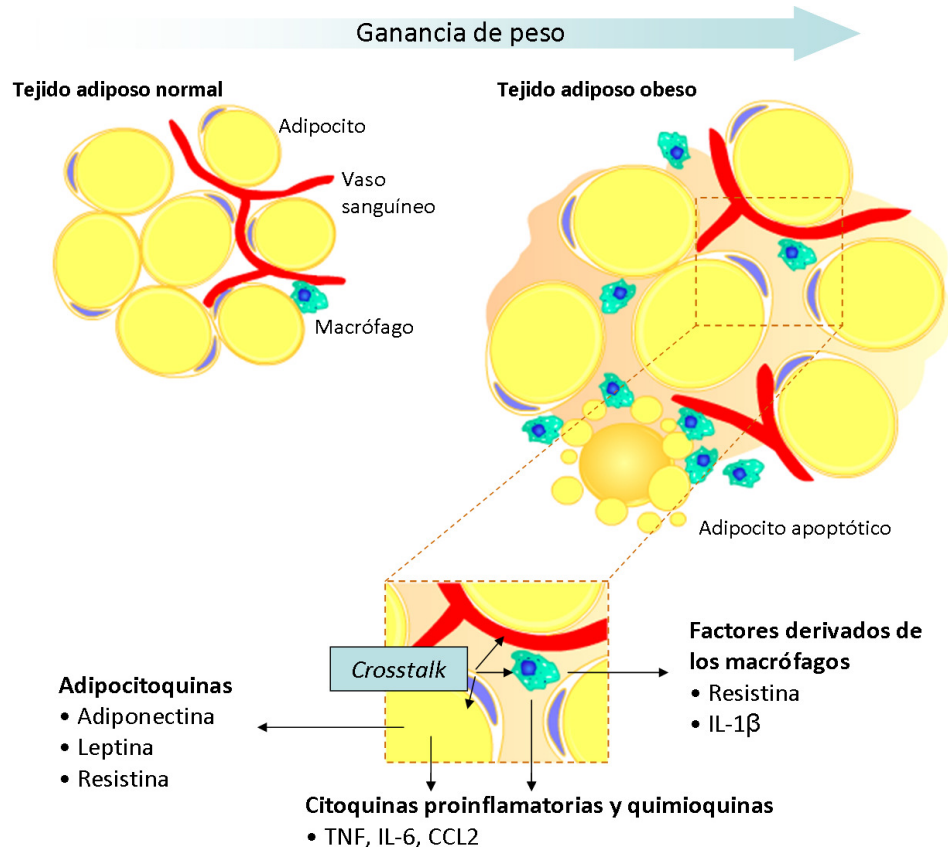


Fig 5. Tejido adiposo en estado normal y en obesidad. En obesidad se induce un estado inflamatorio en tejido adiposo debido a una mayor cantidad de macrófagos en dicho tejido, lo que provoca el deterioro de la señalización de insulina así como la alteración de las hormonas y citoquinas liberadas por tejido adiposo.

Adicionalmente, entre los componentes de la fracción de estroma vascular se encuentran las células madre mesenquimales y preadipocitos, que darán lugar a la renovación de las células maduras del tejido (MacDougald y Mandrup, 2002; Rodeheffer *et al.*, 2008), un proceso que, según se ha demostrado en un estudio reciente (Spalding *et al.*, 2008), se mantiene en el adulto, tanto en individuos delgados como obesos. Actualmente, se han identificado numerosos factores que intervienen en la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros (revisado en Lefterova y Lazar, 2009; White y Stephens, 2010). Por ejemplo, está bien establecido el papel fundamental de las proteínas *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

(PPAR γ) y de varios miembros de la familia CCAAT/*enhancer-binding proteins* (C/EBPs) en la regulación de la adipogénesis, así como la participación en este proceso de, entre otros, los factores de tipo Krüppel (KLF), la ruta de señalización de las proteínas *Wingless* (Wnt), AP-1 y SREBP-1c (revisado en Lefterova y Lazar, 2009; White y Stephens, 2010), que, en su conjunto, son los responsables de la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, secreción de adipoquinas y del establecimiento del fenotipo celular del adipocito (Fig. 6) (Cartwright *et al.*, 2007) .

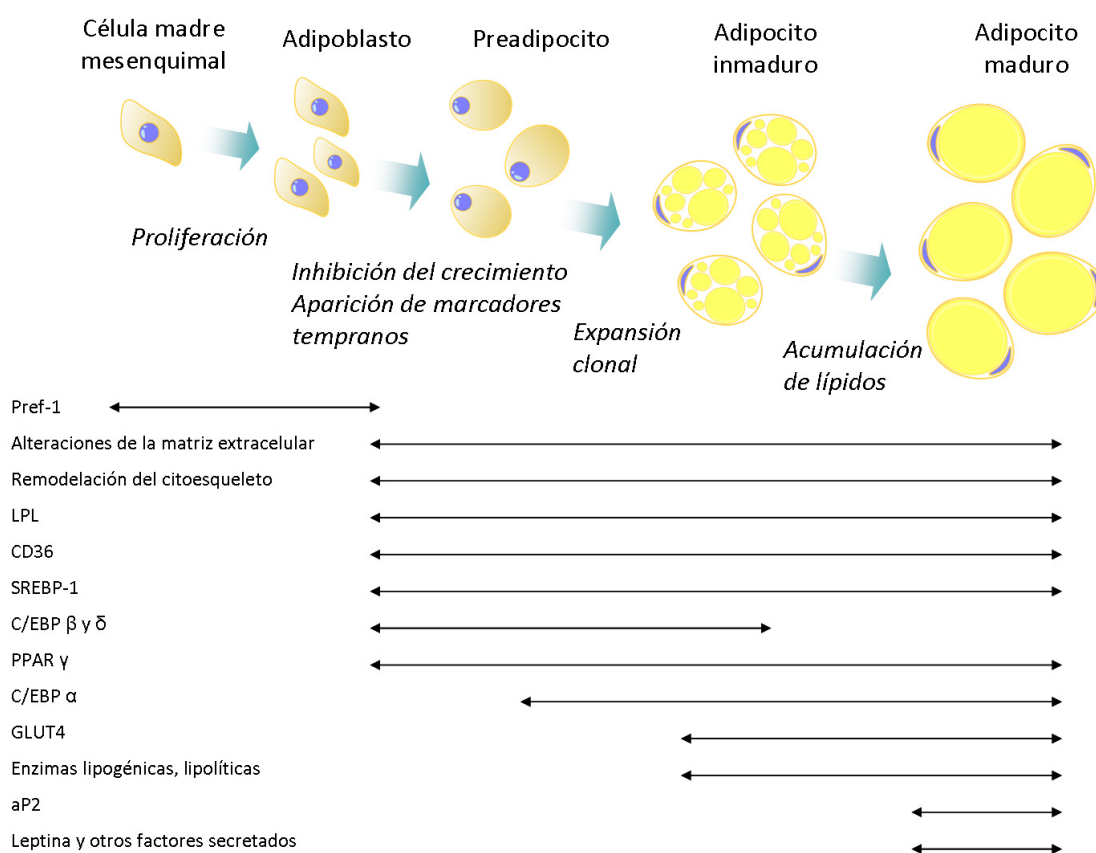


Fig 6. Adipogénesis. Las células madre mesenquimales se diferencian a adipocitos en un proceso que engloba diferentes pasos y en el que participan numerosos factores reguladores (Modificado de Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2005)

No obstante, aún queda por conocer muchos de los factores y mecanismos que están implicados en la adipogénesis y, en especial, aquellos que subyacen en la disminución de la capacidad de diferenciación que presentan los precursores de los adipocitos en condiciones de obesidad (Isakson *et al.*, 2009; Permana *et al.*, 2004; van

Harmelen *et al.*, 2003) que podrían contribuir, al menos en parte, a la propuesta falta de expansibilidad del tejido adiposo que conduce a la resistencia a insulina (Virtue y Vidal-Puig, 2008; Virtue y Vidal-Puig, 2010).

El tejido adiposo se distribuye en distintos depósitos, diferenciándose dos tipos, el tejido adiposo visceral (VAT) y subcutáneo (SAT). El primero engloba el tejido adiposo omental, meséntérico, retroperitoneal así como el perigonadal (Wajchenberg, 2000). El tejido subcutáneo se localiza debajo de la piel a lo largo de todo el cuerpo (Shi *et al.*, 2009). La distribución de ambos tipos de depósitos es diferente en hombres y mujeres. Así, en hombres predomina una acumulación de tejido adiposo visceral, concretamente en la zona de la nuca, en la región lumbosacral y en la región abdominal, mientras que las mujeres presentan una mayor proporción de tejido subcutáneo, principalmente acumulado en nalgas, en la parte anterior y lateral de muslos así como en la zona de las mamas (Shi, 2009; Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2005).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo muestra marcadas diferencias morfológicas y funcionales en relación a su distribución corporal. Así, el tejido adiposo visceral (VAT), además de una mayor actividad metabólica (i.e. transferencia y liberación de ácidos grasos), muestra una menor sensibilidad a insulina y a las drogas antidiabéticas tiazolidinedionas (TZD), pero una mayor sensibilidad a catecolaminas y glucocorticoides que el tejido adiposo subcutáneo (SAT) (revisado en Adams M, 1997; Wajchenberg, 2000; Wajchenberg *et al.*, 2002). Además, los adipocitos viscerales presentan una mayor actividad lipolítica que los subcutáneos, tanto en individuos delgados como obesos, especialmente, en estos últimos (revisado en Wajchenberg, 2000). SAT y VAT también difieren en cuanto a la capacidad proliferativa y de diferenciación de sus preadipocitos (mayor en SAT) así como en la tasa de apoptosis (mayor en VAT) (Tchkonina *et al.*, 2005). Varios estudios también han mostrado la existencia de diferencias en la inervación de SAT y VAT, tanto en relación a los nervios aferentes motores de cada depósito como a la inervación sensorial que transmite la información procedente de los mismos hacia el cerebro (Kreier *et al.*, 2002; Kreier *et al.*, 2006). Finalmente, SAT y VAT muestran perfiles de expresión y

secreción de adipoquinas singulares, incluyendo una mayor producción de adiponectina en SAT (Fain *et al.*, 2003) y de marcadores proinflamatorios (IL-6, TNF- α) en VAT (Fain *et al.*, 2003; Vohl *et al.*, 2004). En línea con estas últimas observaciones, se ha demostrado que SAT presenta un menor número de linfocitos que VAT (Duffaut *et al.*, 2009; O'Rourke *et al.*, 2009), así como una menor infiltración de macrófagos, siendo estas diferencias interdepósito aún mayores en obesidad (Harman-Boehm *et al.*, 2007; O'Rourke *et al.*, 2009). En este contexto, los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento indican que la obesidad visceral está altamente asociada con un mayor riesgo metabólico (i.e. resistencia a insulina, diabetes mellitus de tipo II, dislipidemia, enfermedad cardiovascular) (Hamdy *et al.*, 2006; Snijder *et al.*, 2003; Wajchenberg *et al.*, 2002), mientras que se ha sugerido que SAT puede desempeñar un papel protector (Snijder *et al.*, 2003). Además, las diferencias descritas entre los dos depósitos y su distinta contribución a desórdenes metabólicos pueden estar relacionadas con la distinta influencia que sobre estos depósitos ejercen diferentes hormonas (insulina, catecolaminas, glucocorticoides, etc) (Bjorntorp, 1996) y/o su distinta localización anatómica. En este sentido, se ha demostrado que la alta actividad lipolítica de VAT conlleva una mayor liberación de ácidos grasos a la vena porta que actúan como sustrato para el metabolismo de lipoproteínas y en la producción de glucosa en el hígado. Este incremento de ácidos grasos en el hígado provoca la acumulación de lípidos neutros en este órgano y reduce la degradación de apolipoproteína B y la respuesta a insulina, lo que puede contribuir al desarrollo de dislipidemias, hiperinsulinemia y resistencia a insulina, problemas asociados normalmente a la obesidad visceral (revisado en (Rodríguez *et al.*, 2007))

1.2.2. Función endocrina del tejido adiposo.

Como se ha mencionado con anterioridad, el tejido adiposo secreta una gran variedad de moléculas que poseen actividad biológica, conocidas en su conjunto como adipoquinas. Estas hormonas participan en una gran variedad de funciones fisiológicas como son: regulación de la homeostasis energética y vascular, regulación del metabolismo lipídico, control del apetito, sensibilidad a insulina, angiogénesis e

inmunidad (Ronti *et al.*, 2006) (Tabla 1). Debido a que estos factores participan en una gran variedad de procesos, se requiere un control estricto de su secreción, ya que la modificación de la concentración de adipoquinas en plasma causa importantes alteraciones en la homeostasis energética corporal. De hecho, dicha secreción se encuentra alterada profundamente en obesidad, diabetes mellitus de tipo II y síndrome metabólico (Maury y Brichard, 2010). Concretamente, la secreción de TNF- α y otras adipoquinas pro-inflamatorias se incrementa cuando aumenta la cantidad de tejido adiposo. Sin embargo, otras adipoquinas anti-inflamatorias, como adiponectina, están disminuidas (Maury y Brichard, 2010).

Adipoquinas	Principales efectos metabólicos
Adiponectina	Inhibe la adhesión de monocitos a las células endoteliales, la transformación de macrófagos y la activación de células endoteliales
Leptina	Señal de saciedad, inhibe lipogénesis, estimula lipólisis, mejora la sensibilidad a insulina, actividad angiogénica
IL-6	Inhibe el apetito, inhibe la gluconeogénesis, incrementa la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos y colesterol en hígado
Adipsina	Estimula el almacenamiento de triglicéridos en adipocitos incrementando la captación de glucosa y re-esterificación de ácidos grasos. Inhibe lipólisis
TNF- α	Estimula la libreción de ácidos grasos de adipocitos, reduce la síntesis de adiponectina y afecta a la señalización de la insulina
Resistina	Efectos controvertidos en el metabolismo de la glucosa
Angiotensinógeno	Actúa a través del péptido vasoactivo angiotensina II Correlaciona significativamente con la presión sanguínea
Aromatasa	Convierte androtenediona en estrona y provoca que se acumule tejido adiposo en depósitos subcutáneos y en pecho
Dehidrogenasa 11-hidroxiesteroidea	Regenera cortisol activo de cortisona

Tabla 1. Principales adipoquinas secretadas por el tejido adiposo así como sus principales funciones. (Modificado de Ronti *et al.*, 2006)

- *Leptina*

La leptina es una hormona anorexigénica de 16 kDa, sintetizada de forma mayoritaria por el tejido adiposo (Lago F, 2009). Fue identificada al caracterizar el gen *ob*, cuya delección es responsable de la obesidad en los ratones *ob/ob*, uno de los modelos animales mas utilizados en estudios de obesidad (Zhang *et al.*, 1994). Los niveles circulantes de leptina son proporcionales a la cantidad de tejido graso existente, siendo liberada en función de los cambios en el balance energético resultantes del ayuno y *refeeding* (Ronti *et al.*, 2006). Esta hormona actúa en la regulación central del control del apetito y del balance energético, reduciendo la ingesta de alimento e incrementado el gasto energetico (Ahima, 2000). Así, la leptina circula por plasma hasta el hipotálamo donde se une a receptores que estimulan la síntesis de péptidos anorexigénicos como POMC y CART, inhibiendo la síntesis de los péptidos orexigénicos NPY y AGRP (Ahima *et al.*, 2000). En músculo, hígado y páncreas la leptina reduce la concentración intracelular de lípidos, mejorando así la sensibilidad a insulina. Además de su implicación en la homeostasis energética, también participa en la regulación de los ejes reproductores, del tiroides, de la hormona de crecimiento y de la glándula adrenal (Ahima *et al.*, 2000). Por otra parte, también se ha demostrado que la leptina participa en la regulación de los procesos de lipólisis y lipogénesis. Así, la leptina aumenta los niveles de ARNm de la enzima lipolítica HSL, aumentando la lipólisis y, sin embargo, reduce los de la enzima ácido graso sintasa, disminuyendo con ello la lipogénesis (Lago F, 2009).

- *Adiponectina*

La adiponectina es una hormona de 30 kDa producida principalmente por el tejido adiposo, concretamente por los adipocitos (Maeda *et al.*, 1996; Scherer *et al.*, 1995). En cuanto a su estructura, esta hormona presenta una secuencia señal en el extremo N-terminal, un dominio central variable seguido por un dominio tipo colágeno y, finalmente, un extremo C-terminal globular (Ahima, 2005) que es donde reside su actividad biológica (Ouchi *et al.*, 2003). En condiciones normales, los niveles plasmáticos de adiponectina son elevados, pudiendo encontrarse principalmente en

forma de trímeros, hexámeros y en complejos de mayor tamaño molecular (Ouchi *et al.*, 2003). En estudios previos, se ha descrito que los complejos de alto peso molecular promueven la activación de AMPK en hepatocitos (Waki *et al.*, 2003), mientras que sólo el complejo trimérico activa dicha ruta en músculo (Tsao *et al.*, 2003). Además, existen dos tipos de receptores de adiponectina denominados AdipoR1 y AdipoR2, que presentan un patrón de expresión dependiente de tejido. En concreto, se ha descrito que la expresión de AdipoR1 es más abundante en músculo mientras que AdipoR2 se expresa más en hígado (Yamauchi, 2003). AdipoR1 está ligado a la ruta de señalización intracelular de la AMPK, la cual determina la inhibición de la gluconeogénesis y el incremento de la oxidación de ácidos grasos, mejorando así la sensibilidad celular a insulina (Ronti *et al.*, 2006). Por otra parte, AdipoR2 activa la ruta de PPAR γ , que estimula la oxidación de ácidos grasos e inhibe el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria (disminuye la adhesión de monocitos, la transformación de macrófagos y la acumulación de lípidos en los macrófagos) (Ahima, 2005; Lago F, 2009; Maury y Brichard, 2010). Por otra parte, es interesante destacar que el nivel de la adiponectina en plasma está inversamente relacionado con el índice de masa corporal (BMI). Así, en individuos obesos el nivel de adiponectina en plasma es reducido, mientras que la pérdida de peso así como el tratamiento con TZD provocan un aumento de la concentración de adiponectina circulante, lo que conlleva una mejoría en la sensibilidad a insulina (Arita *et al.*, 1999; Brichard *et al.*, 2003). A nivel molecular, niveles bajos de adiponectina en plasma están relacionados con niveles bajos de LDL y altos niveles de APOB y de triglicéridos (Lago *et al.*, 2009).

- Resistina

La resistina, también conocida como FIZZ3 (*Found in inflammatory zone*) y ADSF (*Adipocyte-specific secretory factor*) (Adeghate, 2004; Stepan y Lazar, 2004), es un péptido de 108 aminoácidos con dominios ricos en cisteína. El nombre de resistina hace referencia a su papel promotor de la resistencia a insulina. En modelos murinos la resistina es secretada por tejido adiposo, pero en humanos es secretada por diversos tipos celulares (Osawa *et al.*, 2005). El papel que ejerce la resistina en la obesidad y la resistencia a insulina no está aún claro, aunque se ha demostrado que la resistina

aumenta la producción de glucosa en el hígado y disminuye la captación y metabolismo de ácidos grasos en el músculo (Steppan y Lazar, 2004). Por otra parte, la resistina puede dañar el endotelio al activar la síntesis y secreción de endotelina-1 en células endoteliales y alterar la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 y MCP-1 (Verma *et al.*, 2003). Además, esta hormona presenta también funciones pro-inflamatorias, ya que altos niveles de resistina están relacionados positivamente con ciertos indicadores de inflamación. Todo ello hace suponer que la resistina puede jugar un papel importante en la aparición de desórdenes metabólicos, aunque el mecanismo exacto de su acción en el control del metabolismo lipídico se desconoce (Gnacinska *et al.*, 2009).

1.2.3. Función reguladora del metabolismo lipídico del tejido adiposo.

Además de su función endocrina, el tejido adiposo cumple una función fundamental en el control de la homeostasis lipídica. Los organismos almacenan el exceso de energía en forma de lípidos neutros, que son empaquetados y acumulados en gotas lipídicas para su posterior utilización en situaciones de déficit de energía, (Ducharme y Bickel, 2008), en la síntesis de membrana o en la lipidación de proteínas (Fujimoto *et al.*, 2008). Las gotas lipídicas están constituidas por un núcleo, donde se almacenan lípidos neutros como triglicéridos, ésteres de esterol, ésteres de retinol y colesterol, rodeado por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian diversas proteínas. El contenido de las gotas varía en gran medida dependiendo del tipo celular. Así, en adipocitos, los principales componentes de las gotas lipídicas son los triglicéridos, mientras que en otras células como las adrenocorticales y las del intersticio de ovario y testículo las gotas lipídicas contienen mayoritariamente ésteres de colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas (Murphy, 2001).

En este escenario, el almacenamiento y la utilización de la reserva energética contenida en las gotas lipídicas de los adipocitos vienen determinados por sistemas reguladores multifactoriales que actúan de una manera coordinada para originar una respuesta celular adecuada a los estímulos extracelulares. En la figura 7 se muestran

los principales sistemas reguladores del metabolismo lipídico a nivel extracelular mejor conocidos en adipocitos.

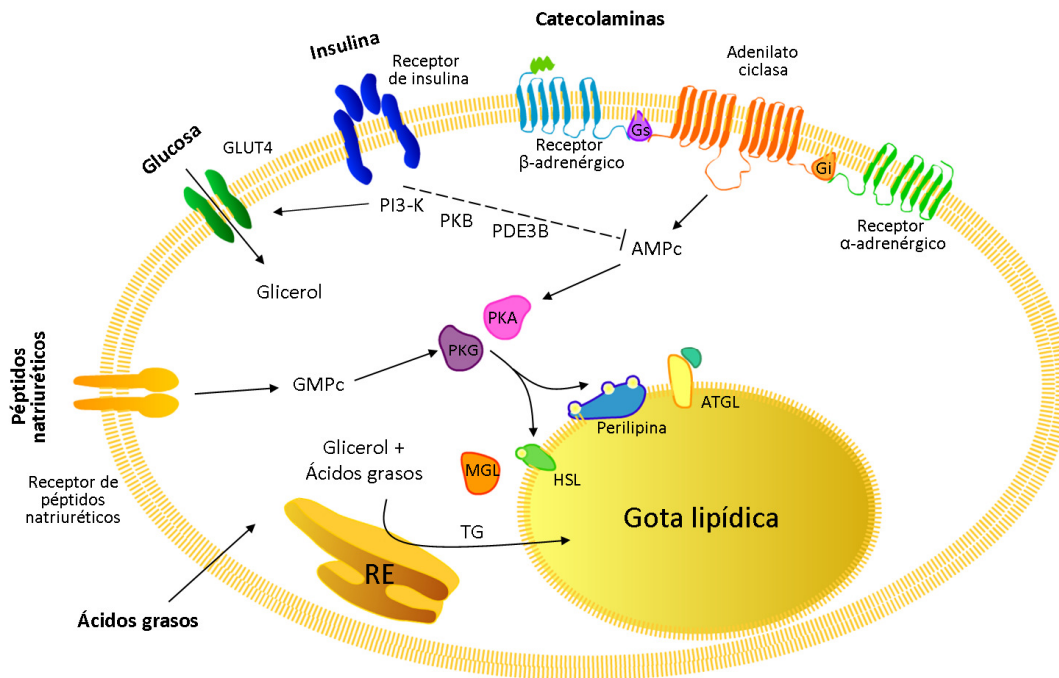


Fig 7. Principales reguladores del metabolismo lipídico en adipocitos. Catecolaminas y péptidos natriuréticos regulan los procesos de lipólisis intracelular aumentando los niveles de AMPc y activando a lipasas que hidrolizan los triglicéridos acumulados en el interior de gotas lipídicas. La insulina inhibe el proceso anterior disminuyendo los niveles de AMPc y aumentando la actividad lipogénica celular. PI3K: Fosfatidil inositol 3-quinasa; PKB: Proteína quinasa B; PDE3B: Fوسفodiesterasa 3B; PKA: Proteína quinasa A; PKG: Proteína quinasa G; MGL: Lipasa de monoglicéridos; HSL: Lipasa sensible a hormonas; ATGL: Lipasa de triglicéridos adipocitaria; TG: Triglicéridos; RE: Retículo endoplasmático (Modificado a partir de Langin, 2010).

- *Regulación por Insulina*

La insulina es un regulador fundamental de la función del adipocito, ejerciendo múltiples acciones sobre el mismo, desde la estimulación de la adipogénesis hasta la regulación de la entrada de glucosa y síntesis de triglicéridos, así como la inhibición de la lipólisis (Arner, 2003). Así, como indican estudios de animales KO selectivos del receptor de insulina en tejido adiposo, la señalización de la insulina en adipocitos es crítica para el desarrollo de la obesidad y sus patologías metabólicas (Bluher *et al.*, 2002). Igualmente, se ha mostrado que factores producidos por el tejido adiposo

involucrados en la resistencia a insulina, como TNF- α , alteran varios pasos de la señalización de insulina en adipocitos (Arner, 2003).

En el tejido adiposo, así como en el hígado y el músculo, la insulina inicia una compleja red de señalización, mediada por una serie de fosforilaciones en cascada, que conlleva la activación de una red de efectores que controlan numerosos procesos celulares. Concretamente, la acción de la insulina está mediada por el receptor de insulina (IR), cuya activación provoca su autofosforilación así como la fosforilación en residuos de tirosina (Tyr) de varios sustratos intracelulares. Entre éstos se encuentran la familia de los sustratos del receptor de insulina (IRS1-6, presentando las isoformas 1 y 2 una función predominante), así como Gab-1, Cbl, varias isoformas de Shc, las proteínas Dock y APS (revisado por (Pessin y Saltiel, 2000; White, 2003)). Los IRS tienen un dominio N-terminal de tipo pleckstrina (PH) adyacente a un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), el cual se une directamente al motivo fosforilado del IR activado. La región central y el extremo C-terminal de las proteínas IRS contienen hasta 20 sitios potenciales de fosforilación en Tyr, que después de ser activados por el IR, proporcionan sitios de unión para proteínas efectoras intracelulares con dominios SH2 (*Src homology 2*). Entre las proteínas con dominios SH2 de unión al IRS fosforilado se incluyen las proteínas adaptadoras Grb2 y Nck, miembros de la familia Src de Tyr quinasas citoplasmáticas (Fyn y Csk), la proteína Tyr fosfatasa SHP2 y, de manera fundamental, la subunidad reguladora (p85) de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de tipo 1A. Concretamente, la interacción del IRS fosforilado y Shc con Grb2 provoca la activación de la ruta Ras/MAPK (revisado en Bevan, 2001), mediando así los efectos mitogénicos de la insulina. Por su parte, la interacción de dos dominios SH2 de la subunidad reguladora de la PI3K con motivos fosfotirosina del IRS induce el reclutamiento y activación de la subunidad catalítica (p110) de dicha enzima, dando lugar a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, que sirve de anclaje para las quinasas de serina/treonina PDK1 y Akt/proteína quinasa B (PKB) (revisado por (Kanzaki, 2006; Pessin y Saltiel, 2000)). Esto provoca la interacción de Akt con sus quinasas reguladoras, PDK1 y el complejo mTOR-Rictor (Hresko y Mueckler, 2005; Kanzaki, 2006), dando lugar a la fosforilación de Akt/PKB en los residuos Thr-308 y Ser-473, respectivamente, y a su subsiguiente activación. Akt/PKB media la mayor parte de las acciones

metabólicas de la insulina a través de la fosforilación y regulación de numerosos sustratos, que traducen finalmente la acción de la insulina (Manning y Cantley, 2007). Así por ejemplo, Akt/PKB regula la entrada de glucosa mediante la fosforilación e inhibición de la proteína activadora de GTPasas Rab, AS160 (Sano *et al.*, 2007), permitiendo así la activación de varias proteínas Rab que intervienen en el tráfico del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática (Kanzaki, 2006). Akt/PKB también fosforila e inhibe a tuberina (o TSC2), la cual forma un complejo con la hamartina (TSC1) (Harris y Lawrence, 2003). Dicho complejo inhibe al regulador del crecimiento mTOR, por lo que la regulación negativa del complejo TSC1/2 por Akt/PKB conduce finalmente a la activación del complejo mTOR-Raptor (mTORC1) (Huang y Manning, 2009), el cual se ha demostrado recientemente que suprime la lipólisis, estimula la lipogénesis y promueve el almacenamiento de lípidos en adipocitos (Chakrabarti *et al.*, 2010). Recientemente, se han identificado otros sustratos fosforilados por Akt/PKB, como la proteína quinasa dependiente de AMP, AMPK, que media los efectos positivos de la insulina sobre el almacenamiento de lípidos en los adipocitos (Berggreen *et al.*, 2009) (Fig.8).

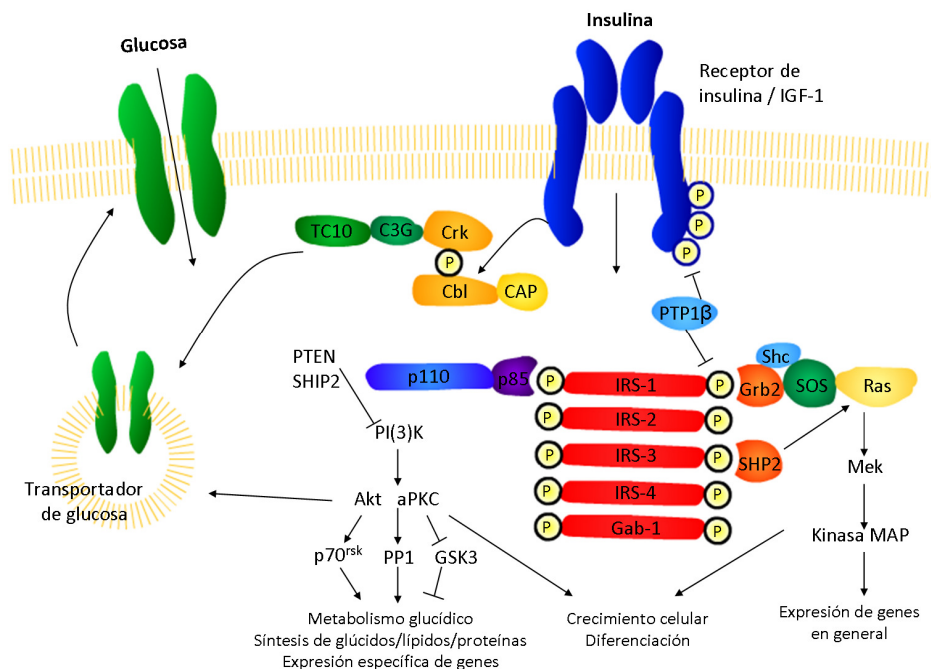


Fig 8. Señalización intracelular de la insulina. La insulina estimula a nivel intracelular diferentes rutas de señalización que activan, entre otras, la actividad lipogénica celular, la

captación de glucosa, la síntesis de proteínas y diferenciación celular además de inhibir la actividad lipolítica (Modificado a partir de Saltiel, 2001).

Además de los reguladores positivos de la señalización de la insulina, se ha demostrado en varios tipos celulares que, tras la activación de dicha ruta, se ponen en marcha mecanismos que revierten dicha señalización, fundamentalmente actuando sobre los residuos de Tyr y/o Ser de los efectores de dicha cascada. Así, por ejemplo, el receptor de insulina es negativamente regulado por tirosina fosfatasas, como PTP1B (revisado en Pessin y Saltiel, 2000; White, 2003), mientras que las proteínas IRS son inactivadas mediante fosforilación en residuos de serina por quinasas como S6K, ERK o JNK. Curiosamente, se ha demostrado la existencia de niveles de expresión elevados de PTP1B así como un aumento de la fosforilación de IRS en condiciones de resistencia a insulina (revisado por (Boura-Halfon y Zick, 2009; Pessin y Saltiel, 2000)). Por su parte, la actividad de Akt/PKB también está regulada, entre otros mecanismos, mediante desfosforilaciones mediadas por proteínas como la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Kuo *et al.*, 2008) o la proteína PHLPP (Gao *et al.*, 2005). Finalmente, además de la Akt/PKB, otros efectores activados por fosforilación inducida por PDK1, son las isoformas atípicas de la proteína quinasa C, PKC ζ y PKC λ (revisado por (Kanzaki, 2006)), que parecen intervenir igualmente en las acciones metabólicas de la insulina (en particular, en el transporte de glucosa en adipocitos) (Sajan *et al.*, 2006). De hecho, se ha descrito la existencia de marcados defectos en la activación de estas proteínas en diferentes condiciones de resistencia a insulina en humanos y otras especies (Farese *et al.*, 2005).

- *Regulación por Catecolaminas*

Durante periodos de escasez de nutrientes, los lípidos acumulados en el interior de las gotas lipídicas son hidrolizados para liberar ácidos grasos y glicerol a la circulación. El glicerol y los ácidos grasos son utilizados en el hígado en los procesos de gluconeogénesis y cetogénesis, respectivamente, mientras que en el músculo, los ácidos grasos son utilizados en procesos de β -oxidación en mitocondrias para liberar energía en forma de ATP (Ducharme y Bickel, 2008). El proceso de lipólisis mejor

caracterizado es el mediado por catecolaminas (Fig. 9), el cual se sabe que está alterado en obesidad (Lafontan y Langin, 2009). Las catecolaminas ejercen su función estimuladora de lipólisis tras su unión a receptores β -adrenérgicos acoplados a proteínas Gs. Hay varios tipos de receptores β -adrenérgicos, siendo los β_1 y β_2 los que presentan una mayor actividad en tejido adiposo humano, mientras que los β_3 son más activos en el de roedores (Barbe *et al.*, 1996; Lonnqvist *et al.*, 1995). En la figura 9 se resume la ruta de señalización intracelular de las catecolaminas. Concretamente, los receptores β -adrenérgicos activan la adenilato ciclasa, que produce un incremento citosólico de AMPc, que a su vez activa a la proteína quinasa A (PKA). Esta quinasa fosforila la enzima lipasa sensible a hormonas (HSL), que se transloca desde el citosol hasta la superficie de las gotas lipídicas donde ejerce su función (Brasaemle *et al.*, 2000). La HSL presenta en su secuencia tres sitios de fosforilación: Ser⁵⁶³, Ser⁶⁵⁹ y Ser⁶⁶⁰, siendo los dos últimos los responsables de la activación de esta enzima *in vitro* (Anthonsen *et al.*, 1998). En ratones KO de HSL se observó que no son los triglicéridos los que se acumulan en los tejidos, sino los diglicéridos (Haemmerle *et al.*, 2002), por lo que se sugirió que debería haber otra lipasa adicional responsable de la hidrólisis de triglicéridos. Así, en 2004, varios grupos descubrieron al mismo tiempo una nueva lipasa a la que denominaron lipasa de triglicéridos de adipocitos (ATGL), desnutrina o fosfolipasa A2 ξ (Jenkins *et al.*, 2004; Villena *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004). Esta enzima presenta una especificidad de sustrato 10 veces mayor por los triglicéridos que por los diglicéridos, por lo que se ha sugerido que el primer paso de la hidrólisis de triglicéridos es llevada a cabo por esta enzima mientras que la conversión de diglicéridos a monoglicéridos es llevada a cabo por la HSL (Zimmermann *et al.*, 2004). Además, existe otra lipasa, la lipasa monoglicérido (MGL), que es la responsable de la hidrólisis de monoglicéridos a ácidos grasos y glicerol (Fredrikson *et al.*, 1986).

Además, la enzima PKA también fosforila a la proteína perilipina A, que está presente de manera constitutiva en la superficie de las gotas lipídicas (Wolins *et al.*, 2006a) y que es crítica para los procesos de lipólisis. La perilipina A presenta seis residuos de Ser que pueden ser fosforilados por la PKA (Lafontan y Langin, 2009). En condiciones basales, la perilipina A está unida a CGI-58, activador de la proteína ATGL, siendo incapaz de activar a dicha proteína. Sin embargo, tras la fosforilación de

perilipina por PKA en el residuo serina 517, CGI-58 se disocia, pudiendo interactuar con la enzima ATGL, que activará la hidrólisis de los triglicéridos acumulados en el interior de las gotas (Granneman *et al.*, 2007; Miyoshi *et al.*, 2007; Subramanian *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2007). Cuando disminuyen los niveles de AMPc intracelulares, la proteína CGI-58 se disocia de ATGL, volviendo a unirse a la perilipina A, lo que provoca que disminuya la actividad lipolítica celular (Lafontan y Langin, 2009). Por otra parte, tras su fosforilación por PKA, la lipasa HSL interacciona con FABP4 (Shen *et al.*, 2001). El complejo formado por ambas proteínas se transloca hacia la superficie de las gotas lipídicas, donde ambas catalizan la hidrólisis de lípidos (Smith *et al.*, 2007).

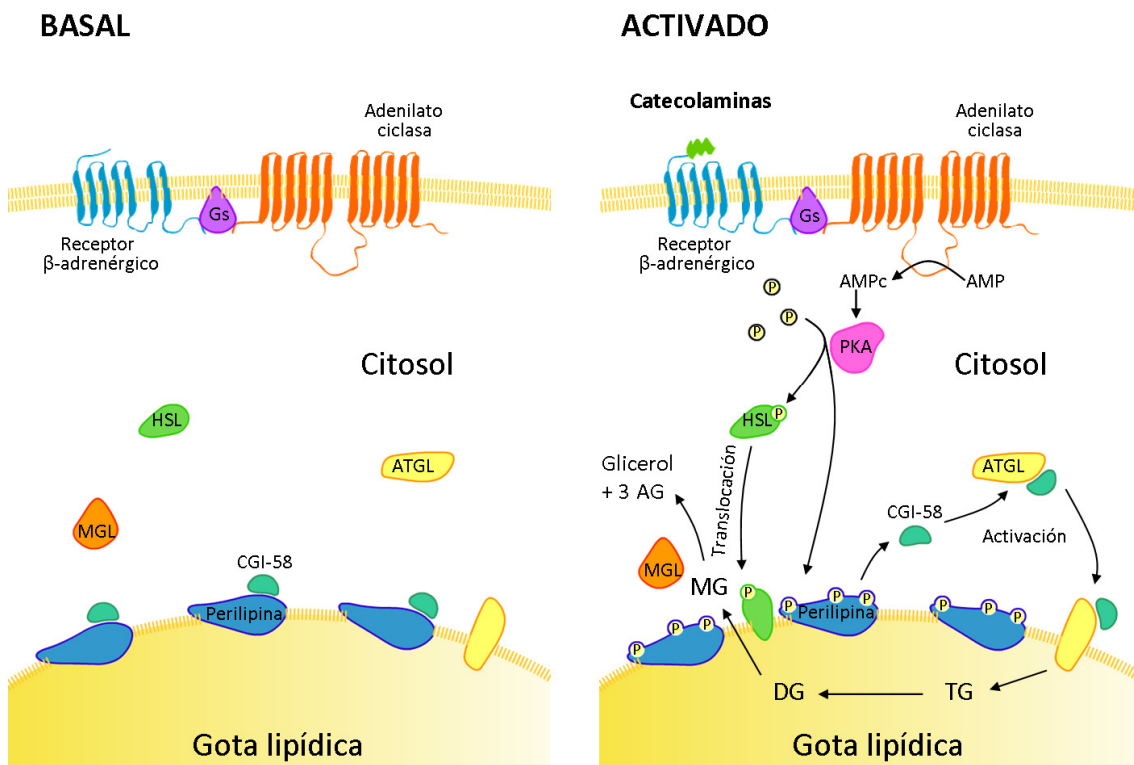


Fig 9. Señalización intracelular de catecolaminas. Las catecolaminas actúan a través de receptores de β-adrenérgicos. En condiciones basales, los triglicéridos se acumulan en el interior de las gotas lipídicas no siendo accesibles a las lipasas. Sin embargo, en estado activado, las catecolaminas provocan un aumento de los niveles intracelulares de AMPc que activa la proteína PKA, que a su vez fosforila a la perilipina y a la enzima HSL, lo que conlleva la hidrólisis de triglicéridos intracelulares.

La activación de la proteína PKA y en consecuencia, el aumento de la actividad lipolítica celular, provoca cambios tanto en la morfología de las gotas lipídicas como en

la distribución de las proteínas asociadas a la superficie de dichas gotas. Si se activa durante varias horas, se produce la fragmentación de las gotas lipídicas, lo que incrementa la superficie disponible para la acción de las lipasas. Esta fragmentación depende de la fosforilación de la perilipina A en el residuo serina 492 (Marcinkiewicz *et al.*, 2006).

Por otra parte, la actividad lipolítica celular inducida por catecolaminas puede ser inhibida por varias rutas, entre las que destacan la mediada por los receptores α 2-adrenérgicos, que se unen a proteínas G inhibitoras (Gi), que inactivan la adenilato ciclasa y disminuyen los niveles intracelulares de AMPc, lo que conlleva una reducción de la actividad de la PKA (Egan *et al.*, 1992). La lipólisis mediada por catecolaminas también es inhibida por la insulina, que activa la fosfodiesterasa 3B, disminuyendo la concentración de AMPc intracelular y, por tanto, la actividad de la PKA (Lafontan y Langin, 2009).

- *Regulación por péptidos natriuréticos.*

Los péptidos natriuréticos están implicados en la regulación de la presión y volumen sanguíneo. Además, inhiben la liberación de renina, vasopresina y aldosterona, estimulan la diuresis y natriuresis, y actúan como potentes vasodilatadores (Sengenés *et al.*, 2000). Recientemente, se ha descubierto que los péptidos natriuréticos también tienen efecto sobre la lipólisis, que parece ser especialmente relevante cuando los receptores β -adrenérgicos están bloqueados (Moro *et al.*, 2004). Hasta el momento, se conocen tres tipos de péptidos natriuréticos: el atrial, el cerebral y el de tipo C. Los dos primeros estimulan la lipólisis en adipocitos en el mismo grado que el isoproterenol, un potente agonista β -adrenérgico, mientras que el tercero tiene un efecto mucho más suave sobre este proceso (Lafontan y Langin, 2009). Además, se ha demostrado que su acción estimuladora de la lipólisis se ejerce a través de la activación de sus receptores canónicos, que son expresados en adipocitos (Sengenés *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008). Tras la activación de estos receptores, se forma GMPc que activa a la proteína quinasa G. Esta fosforila la proteína HSL, lo que provoca la estimulación de la lipólisis (Sengenés *et al.*, 2003). Diferentes estudios han demostrado el potente efecto lipolítico del péptido natriurético atrial en

el tejido adiposo subcutáneo en humanos, de manera que, si se inyecta de forma intravenosa en pacientes delgados y obesos, se produce un incremento en la liberación de ácidos grasos y glicerol en ambos (Birkenfeld *et al.*, 2005; Galitzky *et al.*, 2001; Sengenès *et al.*, 2002).

- *Regulación a través de hormonas hipofisarias.*

Los adipocitos también expresan receptores específicos para la mayoría de las hormonas liberadas por la hipófisis (Schaffler *et al.*, 2005). Dichas hormonas regulan tanto el metabolismo lipídico en el tejido adiposo como la secreción de adipocinas (Schaffler *et al.*, 2006).

Concretamente, el tratamiento de tejido adiposo con prolactina aumenta la activación de la ruta de señalización intracelular de JAK-STAT así como MAPK (Ling y Billig, 2001). La prolactina participa en adipogénesis (Freemark *et al.*, 2001), en la remodelación de tejido adiposo durante el embarazo y la lactancia (Flint *et al.*, 2003) y también actúa como hormona antilipogénica, reduce el transporte de glucosa y la unión de la insulina a adipocitos, presentando un efecto lipolítico (Ling *et al.*, 2003).

Por otra parte, TSH activa las enzimas quinasa serina/treonina p70S6K y fosfatidil-inositol-3 quinasa, actuando como un factor de supervivencia en adipocitos que reduce la apoptosis (Bell *et al.*, 2002). Además, también estimula la lipólisis al aumentar la concentración de AMPc intracelular (de Lloyd *et al.*, 2010), aunque esta capacidad disminuye con la edad (Janson *et al.*, 1998) La TSH actúa regulando la secreción de las hormonas tiroideas, T₃ y T₄, ambas estimuladoras de la actividad lipolítica celular (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007).

La hormona GH actúa a través de la ruta de señalización JAK-STAT y se ha descrito que tiene una gran variedad de efectos sobre el tejido adiposo (Flint *et al.*, 2003). La GH regula la proliferación y diferenciación del tejido adiposo (Flint *et al.*, 2003) y, además, ejerce un efecto antagonista a insulina, lipolítico y antilipogénico (Flint *et al.*, 2003; Schaffler *et al.*, 2006).

Por otra parte, la hipófisis también libera ACTH, que actúa sobre el tejido adiposo incrementando la lipólisis vía PKA (Cho *et al.*, 2005). Este efecto también se observa tras el tratamiento de adipocitos con α -MSH (Cho *et al.*, 2005). La hormona

ATCH actúa sobre la glándula adrenal induciendo la síntesis de glucocorticoides. Estas hormonas también regulan el metabolismo lipídico en tejido adiposo a través de receptores nucleares induciendo la diferenciación celular a adipocitos (Frühbeck Y Gómez-Ambrosi, 2005) y, por otra parte, también actúa incrementado la lipólisis (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007).

- *Otros reguladores.*

En la siguiente tabla se muestran otros reguladores del metabolismo lipídico que son importantes para mantener la homeostasis lipídica.

Reguladores	Efecto sobre el metabolismo del adipocito
Adenosina	Inhibición de lipólisis
Angiotensina	Aumento de lipogénesis
IFG-I y II	Inhibición de lipólisis. Estimulación del transporte de glucosa y oxidación
IL-6	Inhibición de la actividad de LPL. Activación de lipólisis
Prostaglandinas	Inhibición de lipólisis y modulación de la diferenciación de preadipocitos
TGF- β	Inhibición de la diferenciación a adipocitos
TNF- α	Estimulación de lipólisis. Regulación de la secreción de leptina. Inhibición de la diferenciación a adipocitos
VEGF	Estimulación de angiogénesis
Andrógenos	Antiadipogénico. Modula la expresión de leptina
Estrógenos	Proadipogénico. Modula la expresión de leptina

Tabla 2. Otros reguladores que modulan el metabolismo lipídico en adipocitos (Modificado a partir de Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2005).

1.3. Gotas lipídicas.

Al contrario de lo que se podría pensar, no sólo los adipocitos tienen la capacidad de formar orgánulos intracelulares altamente especializados en el almacenamiento y gestión de lípidos, las gotas lipídicas, sino que la gran mayoría de tipos celulares forman estas estructuras, ya que todos ellos requieren una renovación continua de sus sistemas de endomembranas y una estrategia de protección contra la citotoxicidad inducida por los ácidos grasos libres (Murphy, 2001; SchaVer, 2003). En su superficie, las gotas lipídicas presentan una gran variedad de proteínas que cumplen diversas funciones relacionadas no sólo con la homeostasis lipídica, sino también con la biogénesis de estos orgánulos, la síntesis de fosfolípidos de membrana y hormonas esteroideas, la señalización intracelular o, incluso, el almacenamiento temporal y lipidación de ciertas proteínas. (Fujimoto y Ohsaki, 2006; Martin y Parton, 2006; Murphy, 2001; Zweytick *et al.*, 2000). En la figura 10 se muestra la organización estructural de una gota lipídica.

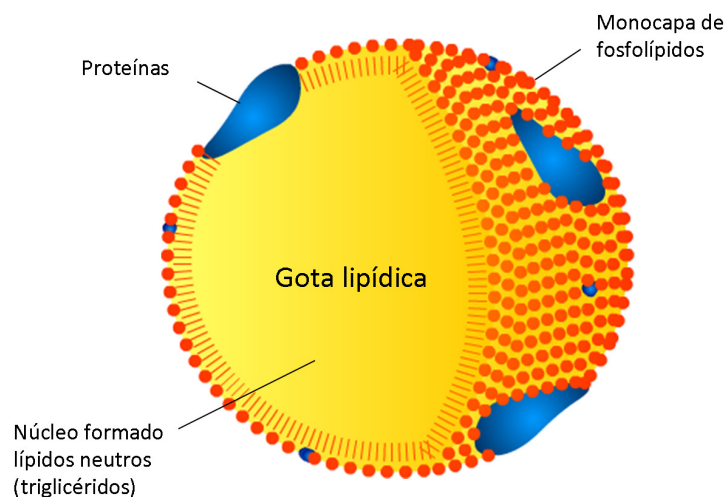


Fig 10. Estructura de una gota lipídica. Las gotas lipídicas están formadas por una monocapa de fosfolípidos y proteínas que rodea un núcleo donde se almacenan lípidos neutros.

Además, estudios proteómicos recientes realizados sobre fracciones enriquecidas de gotas lipídicas han descubierto la presencia de otros muchos tipos de proteínas relacionadas con el tráfico intracelular de vesículas y el establecimiento de la localización subcelular de los distintos orgánulos, como proteínas SNARE y diversas

Rab GTPasas de bajo peso molecular, lo que ha llevado a considerar a las gotas lipídicas como orgánulos intracelulares altamente dinámicos (Goodman, 2008). De hecho, la movilización intracelular de las gotas lipídicas parece ser necesaria para el control de su biogénesis, el crecimiento por fusión y su regresión (Martin y Parton, 2006; Welte, 2009).

1.3.1. Biogénesis de gotas lipídicas.

En el tejido adiposo, los ácidos grasos son sintetizados a partir de carbohidratos, principalmente glucosa (lipogénesis *de novo*), pero también pueden ser incorporados del espacio extracelular, donde son transportados asociados a albumina o lipoproteínas, son liberados mediante la acción de la enzima lipoproteína lipasa y son internalizados mediante difusión pasiva facilitada por translocasas de ácidos grasos (Ehehalt *et al.*, 2006; Schaffer y Lodish, 1994). A continuación, los ácidos grasos se conjugan con CoA formando ácido graso-CoA, que es procesado por las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa y sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa en el retículo endoplasmático generando diglicéridos. Los diglicéridos son el sustrato de la enzima diacilgliceroltransferasa que cataliza su conversión a lípidos neutros o triglicéridos, o bien pueden entrar en la ruta de síntesis de fosfolípidos (Guo *et al.*, 2009). Una vez que se han formado los lípidos neutros en el retículo, se empiezan a acumular en dicho orgánulo hasta que, finalmente, se forma la gota lipídica. En este sentido, hay varios modelos que explican como se forman dichas gotas. Según el modelo más citado, los lípidos neutros se acumulan dentro de la bicapa de la membrana del retículo, formándose la gota a partir del engrosamiento del espacio intermembrana y la gemación de la monocapa citosólica en un proceso dependiente de factores citosólicos que actúan como coatómeros (Fig. 11a) (Walther y Farese, 2009). En una variante de este modelo, las gotas no se escindirían completamente de la membrana del retículo, quedando conectadas con esta a través de una prolongación de la membrana externa del retículo denominada *stalk* (Goodman, 2008). En un segundo modelo también se contempla la acumulación de ácidos grasos en el espacio intermembrana y el, subsiguiente engrosamiento de esta, pero se sugiere que las gotas

lipídicas se forman cuando se escinden las dos hemicapas de la membrana del retículo, y por ello se denomina formación tipo bicelo (Figura 11b) (Ploegh, 2007). Sin embargo, esta hipótesis presenta un importante dilema; al producirse la rotura de ambas hemicapas de la membrana del retículo se violaría la integridad de dicha membrana permitiendo la salida descontrolada de iones calcio y proteínas residentes en el retículo (Walther y Farese, 2009). En el tercer modelo propuesto, denominado gemación vesicular, las gotas lipídicas se formarían mediante un proceso similar a la gemación de vesículas y la carga posterior de ácidos grasos y el crecimiento de la gota lipídica provocaría el desplazamiento de su hemicapa interna hasta su práctica desaparición (Fig 11c) (Robenek *et al.*, 2005).

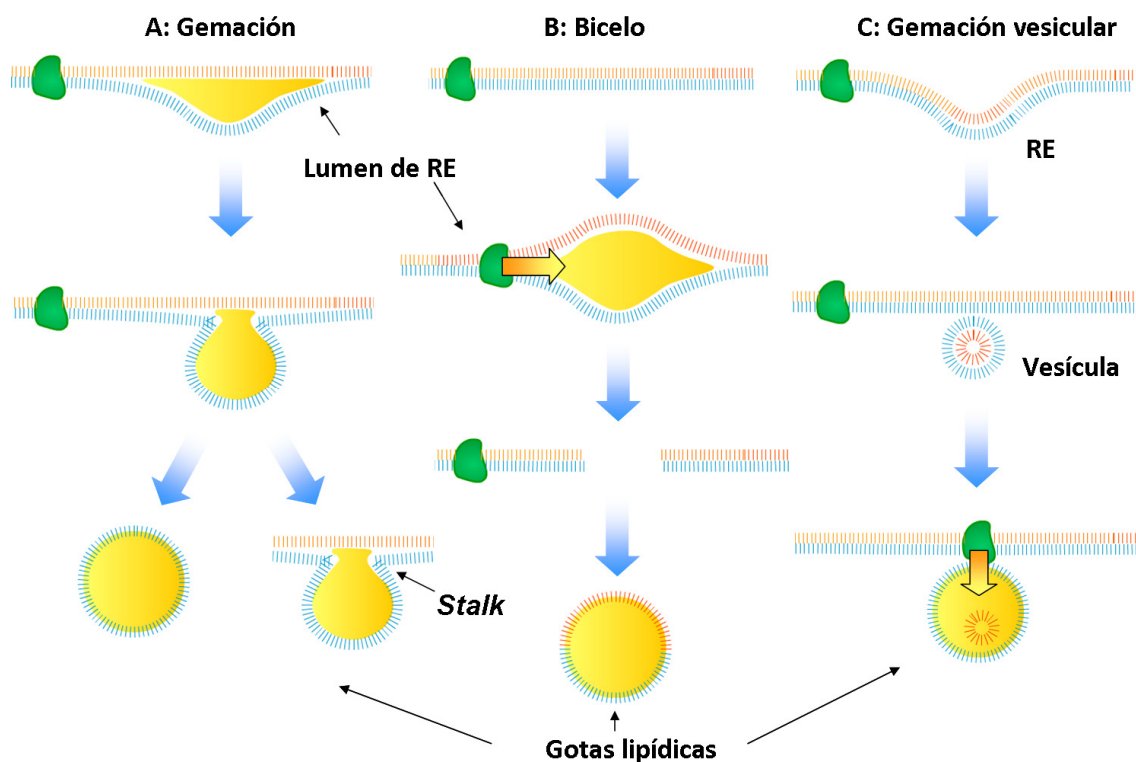


Fig 11. Formación de las gotas lipídicas. Las gotas lipídicas se forman a partir de zonas especializadas del retículo endoplasmático donde se acumulan los triglicéridos. La formación de las gotas se puede realizar por gemación a partir de una de las hemicapas de la membrana del retículo (A), de la excisión de ambas hemicapas (B) o bien, a partir de la carga de triglicéridos en una vesícula (C).

Todas las enzimas necesarias para la síntesis de las gotas lipídicas se encuentran presentes en la membrana del retículo endoplasmático, así como en la

membrana plasmática, de manera que esta última también tiene la capacidad de generar gotas lipídicas a partir de ácidos grasos extracelulares. Esta biogénesis tiene lugar en regiones concretas de la membrana plasmática, las caveolas. De hecho, también se ha aislado el marcador específico de caveolas, la caveolina, en la superficie de las gotas lipídicas (Liu *et al.*, 2004).

1.3.2. Crecimiento de gotas lipídicas.

Las gotas lipídicas son orgánulos muy variables en cuanto a su tamaño, oscilando entre 20 nm y 100 μm (Murphy, 2001), por lo que deben existir mecanismos que permitan su crecimiento. En este sentido, en la literatura se barajan diversas posibilidades: i) las gotas lipídicas podrían expandirse siempre en asociación con la membrana del retículo endoplasmático, de manera que los lípidos podrían difundir libremente entre los dos compartimentos (Robenek *et al.*, 2006), ii) las gotas lipídicas podrían cargar lípidos gracias a la síntesis de éstos mediada por diacilgliceroltransferasas presentes en la superficie de las gotas (Guo *et al.*, 2008), y por último iii) las gotas lipídicas podrían crecer mediante fusión de gotas pequeñas mediada por proteínas SNAREs presentes en su superficie (Bostrom *et al.*, 2007).

1.3.3. Interacción de las gotas con otros orgánulos celulares.

Como se ha dicho en el apartado anterior, las gotas lipídicas interaccionan con retículo endoplasmático para su crecimiento, habiéndose sugerido que también interacciona con el mismo cuando se produce la recesión de las gotas (Zehmer *et al.*, 2009a).

Además, las gotas lipídicas interaccionan con otros orgánulos, como por ejemplo, mitocondrias. Este tipo de asociación se cree que se da para la transferencia directa de ácidos grasos desde las gotas lipídicas a mitocondrias, donde serán utilizados para la obtención de energía por β -oxidación, lo que parece ser especialmente relevante en músculo (Vock *et al.*, 1996). Otros orgánulos con los que interaccionan las gotas lipídicas son los peroxisomas, que se encuentran frecuentemente cercanos a dichas gotas (Novikoff *et al.*, 1980). Dicha relación puede

facilitar el movimiento bidireccional de lípidos entre ambos orgánulos (Goodman, 2008), que pueden ser utilizados en peroxisomas para la obtención de energía por β -oxidación (Murphy *et al.*, 2009). Además, las gotas lipídicas también interactúan con los endosomas. Se ha descrito que en respuesta a ácidos grasos hay un transporte de proteínas SNAREs desde la membrana plasmática y endosomas hasta las gotas. Además, a través de endosomas, también se produce el tráfico de la proteína caveolina hasta la superficie de las gotas, así como el transporte de colesterol y proteínas de unión a ácidos grasos que normalmente residen en caveolas (Goodman, 2008). Todo esto sugiere que las gotas lipídicas son estructuras altamente dinámicas, que muestran un movimiento bidireccional basado en su interacción con microtúbulos, lo cual puede facilitar su interacción con el resto de orgánulos celulares (Martin y Parton, 2006).

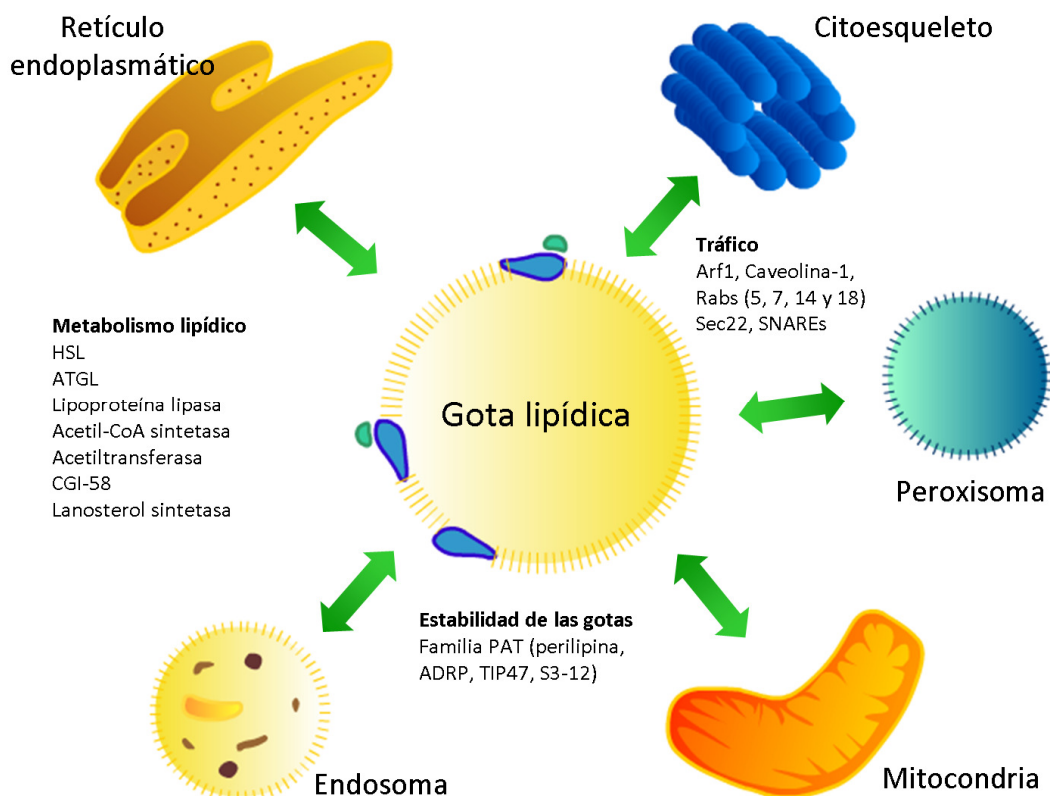


Fig 12. Interacción de gotas lipídicas con otros orgánulos intracelulares. Las gotas lipídicas pueden interactuar con otros orgánulos intracelulares. En dicha interacción pueden participar numerosas proteínas de la cubierta de las gotas.

1.3.4. Proteínas de la cubierta lipídica.

- Proteínas PAT

La familia de proteínas PAT recibe su nombre de acuerdo a los primeros miembros descubiertos Perilipina, ADRP (o adipofilina) y la proteína “Tail-interacting protein” de 47 kDa (TIP47) (Miura *et al.*, 2002). Otros miembros de esta familia descubiertos más recientemente son S3-12 y MDLP/OXPAT/PAT-1 (Brasaemle, 2007; Londos *et al.*, 2005). Recientemente, se ha propuesto una nueva nomenclatura para esta familia de proteínas, denominando *PLIN1* a perilipina, *PLIN2* a ADRP, *PLIN3* a TIP47, *PLIN4* a S3-12 y *PLIN5* a OXPAT (Kimmel *et al.*, 2010). Las proteínas perilipina y ADRP se localizan de forma constitutiva en la superficie de las gotas lipídicas (proteínas no intercambiables), mientras que el resto de las proteínas PAT se localizan en el citosol y tras la estimulación con diferentes sustancias, se translocan hacia la superficie de las gotas (proteínas intercambiables) (Wolins *et al.*, 2006a). En cuanto a la perilipina, existen tres isoformas generadas por *splicing* alternativo: A, B y C. Las isoformas A y B se expresan en adipocitos mientras que la C se expresa principalmente en células esteroideogénicas (Fujimoto *et al.*, 2008). Como se ha explicado anteriormente, la proteína perilipina tiene una función principal en la regulación de la lipólisis ya que, en condiciones basales, actúa protegiendo a las gotas lipídicas de la acción de las lipasas, pero tras la estimulación de la lipólisis es forzada, permitiendo a dichas enzimas (HSL y ATGL) acceder a la superficie de las gotas e hidrolizar los triglicéridos localizados en su interior (Sztalryd *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2004). Los adipocitos presentan gotas lipídicas centrales de mayor tamaño con bajo contenido en perilipina y gotas periféricas de menor tamaño donde la perilipina es más abundante, siendo esta última población, por tanto, lipolíticamente más activa (Moore *et al.*, 2005). Por otra parte, ADRP se expresa más en células no adipocitarias (Brasaemle *et al.*, 1997), donde parece que actúa evitando el acceso de las lipasas a las gotas, al igual que la perilipina (Listenberger *et al.*, 2007). En adipocitos procedentes de ratones KO para perilipina, las gotas lipídicas de los adipocitos presentan ADRP (Tansey *et al.*, 2001), si bien no puede cumplir la función de la perilipina, ya que se ha observado que dichos ratones tienen una actividad lipolítica elevada en condiciones

basales, un contenido lipídico bajo y son resistentes a la obesidad inducida por dieta (Tansey *et al.*, 2001). Además, ADRP se expresa de forma elevada al principio de la diferenciación de los adipocitos, siendo sustituida progresivamente por la proteína perilipina (Brasaemle *et al.*, 1997), por lo que su presencia en gotas de adipocitos de ratones KO para la perilipina puede deberse a una reminiscencia de las etapas de diferenciación de dichas células. En cuanto a TIP47, esta proteína también parece desempeñar una función de protección frente a la lipólisis (Fujimoto *et al.*, 2008). Además, se ha sugerido que TIP47 facilita el reciclado del receptor de manosa-6-fosfato a través de endosomas tardíos hacia la red trans del Golgi, formando un complejo con dicho receptor y la proteína Rab9 (Aivazian *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2001). Por su parte, MLDP/OXPAT/PAT-1 se localizan en músculo cardiaco y esquelético, donde inhiben la lipólisis además de favorecer la β -oxidación de ácidos grasos y la acumulación de los triglicéridos (Wolins *et al.*, 2006b)

- *Proteínas SNARE*

Los estudios de proteómica también han revelado la presencia de proteínas SNARE en la superficie de las gotas lipídicas (Bostrom *et al.*, 2007). En general, las proteínas SNARE participan en procesos de reconocimiento y fusión de membranas intracelulares, (Jahn y Scheller, 2006), de manera que las SNAREs presentes en la membrana diana (t- o Q-SNAREs) interaccionan específicamente con las presentes en las vesículas (v- o R-SNARE), permitiendo así el acercamiento y la fusión de las membranas (Jahn y Scheller, 2006). En adipocitos, se ha descubierto que la presencia de estas proteínas en la cubierta de las gotas lipídicas es imprescindible para que se lleve a cabo la fusión de las gotas lipídicas (Fig. 13) y, por lo tanto, el crecimiento de estas (Bostrom *et al.*, 2007).

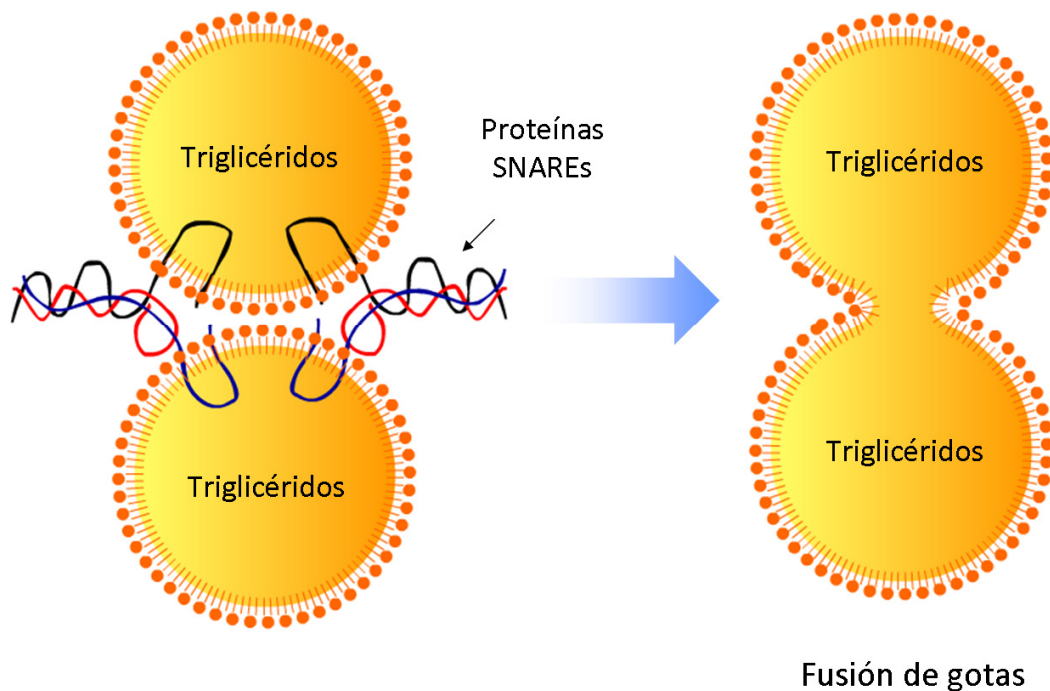


Fig 13. Fusión de gotas lipídicas. Las gotas lipídicas pueden fusionarse para formar una gota de mayor tamaño, en cuyo proceso pueden participar las proteínas SNAREs (Modificado a partir de Olofsson, 2009).

- *Proteínas Rabs*

Las proteínas Rab constituyen la denominada familia de GTPasas Rab de bajo peso molecular, que en humanos está formada por más de 60 miembros (Jordens *et al.*, 2005; Zerial y McBride, 2001). Numerosos estudios han demostrado que distintas proteínas Rabs se localizan en las distintas vesículas intracelulares (Novick y Zerial, 1997), y que participan en los procesos de formación de vesículas, y en su transporte dirigido mediado por interacciones con componentes del citoesqueleto, así como en el reconocimiento, ensamblaje y fusión de las mismas con el orgánulo diana (Fig.14).

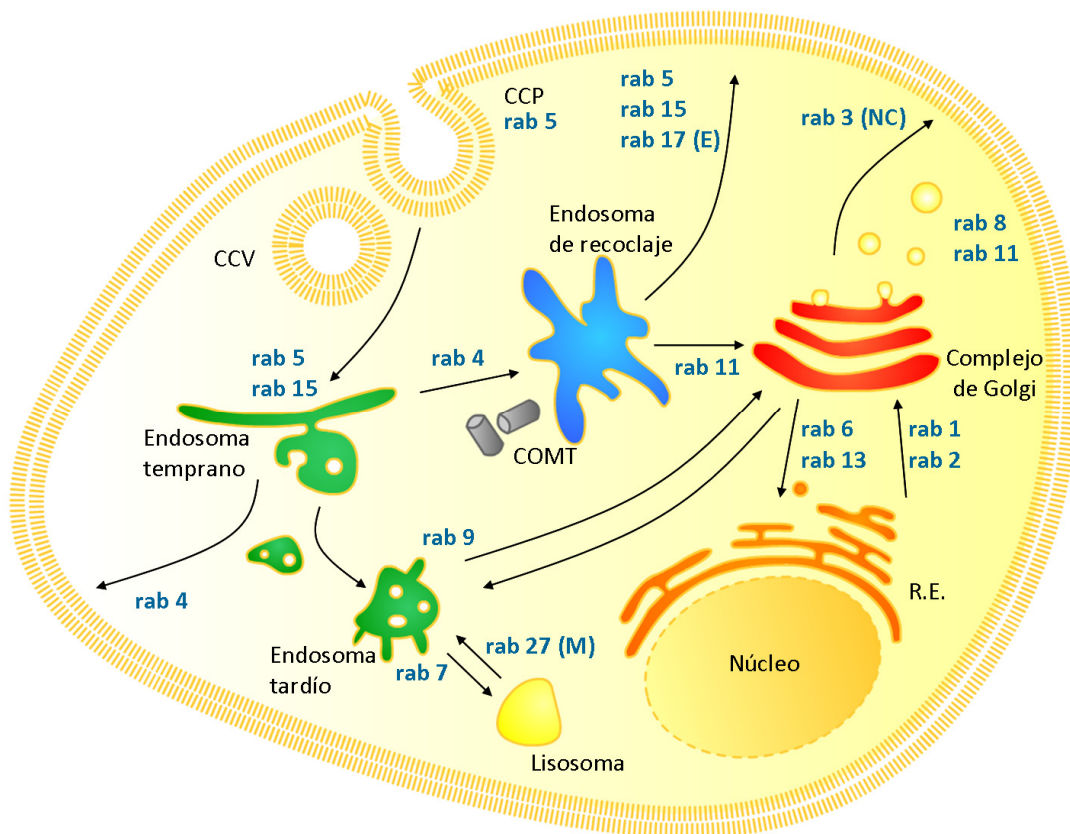


Fig 14. Función de las proteínas Rabs. Las proteínas Rabs participan en todos los procesos intracelulares de formación de vesículas, transporte, anclaje y fusión a las membranas diana.

Las proteínas Rab alternan entre dos estados, uno inactivo, unido a GDP y soluble en el citosol y otro activo, unido a GTP y asociado a la membrana diana (Stenmark y Olkkonen, 2001). Tanto la hidrólisis de GTP como la unión de GTP a la proteína Rab están catalizadas por proteínas específicas denominadas de forma genérica *GTPase Activating Proteins (GAPs)* y *Guanin Exchange Factors (GEFs)*, respectivamente (Grosshans *et al.*, 2006) (Fig.15). Además, las proteínas Rab activas necesitan de la asociación con otras proteínas efectoras para cumplir su función. En algunos casos, existen diferentes proteínas efectoras con afinidad por una misma proteína Rab, de manera que, dependiendo del complejo que se forme, la proteína Rab puede cumplir diferentes funciones intracelulares (Grosshans *et al.*, 2006).

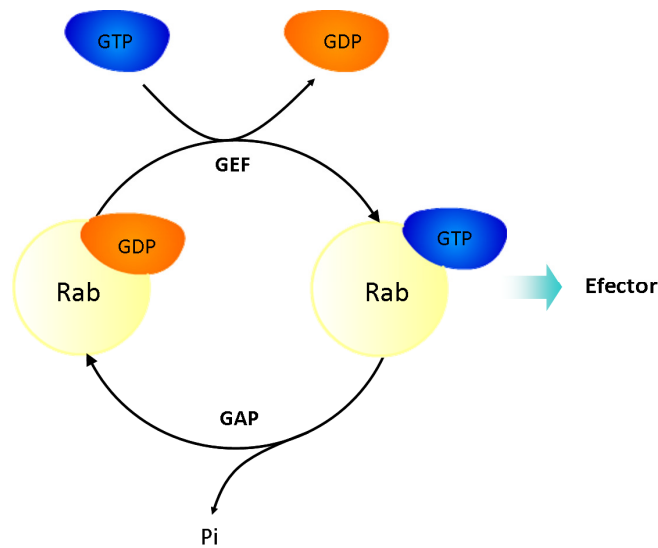


Fig 15. Activación de las proteínas Rabs. Las proteínas Rabs alternan entre dos estados, uno unido a GDP en el que se encuentran inactivas, y otro unido a GTP el que se unen a la membrana diana para ejercer su función que dependerá del efector al que se una (Modificado a partir de Stenmark, 2001).

En adipocitos, los estudios proteómicos han desvelado la presencia de un número importante de proteínas Rab en la superficie de las gotas lipídicas: Rabs 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21, 24, 33, 34, 35, 39 y 41 (Brasaemle *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). De ellas, sólo Rab1, Rab5, Rab7 y Rab18 se han identificado en cuatro o más *screenings* y, particularmente, sólo se han llevado a cabo estudios más detallados con Rab5 y Rab18 en adipocitos y otros tipos celulares (Liu *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2005; Ohsaki *et al.*, 2006; Ozeki *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en estos trabajos sugieren que estas proteínas Rab median la interacción de las gotas lipídicas y otros orgánulos intracelulares. Concretamente, en estudios previos se ha demostrado que Rab5 media el tráfico de endosomas tempranos (Liu *et al.*, 2007), mientras que Rab18 participa en la regulación del tráfico de gránulos de secreción (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007) y de vesículas de tránsito entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi (Dejgaard *et al.*, 2008). En el caso concreto de adipocitos, Rab18 se encuentra asociada a una población particular de gotas lipídicas (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005) y dicha asociación aumenta en condiciones de sobreexpresión de la GTPasa (Ozeki *et al.*, 2005) y tras la activación de los receptores β -adrenérgicos inducida por isoproterenol (Martin *et al.*, 2005). En

conjunto, estos resultados han conducido a los autores a sugerir que Rab18 podría controlar el tránsito de lípidos hacia dentro y/o fuera de la gota lipídica (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Sin embargo, aún se requiere una caracterización más profunda de la implicación de Rab18 en el metabolismo lipídico con el fin de aumentar nuestro conocimiento sobre las bases moleculares que subyacen a la regulación de la homeostasis lipídica en adipocitos y sus posibles implicaciones patológicas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la caracterización celular y funcional de Rab18 en adipocitos. Para alcanzar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Investigar el tipo de regulación a la que se encuentra sometida la expresión de Rab18 en el tejido adiposo bajo condiciones metabólicas fisiológicas y patológicas en modelos biológicos murinos y humanos.
- 2- Analizar el nivel de expresión y la distribución intracelular específica de Rab18 en adipocitos en respuesta a diferentes moduladores de la hidrólisis (lipólisis) y síntesis (lipogénesis) de triglicéridos y su relación con otras proteínas de la cubierta de las gotas lipídicas y del retículo endoplasmático.
- 3- Elucidar la función específica de Rab18 en relación con el metabolismo lipídico, analizando la actividad lipolítica y lipogénica en adipocitos bajo condiciones de sobreexpresión y silenciamiento de Rab18.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y Reactivos.

Los materiales y reactivos necesarios para la realización de los experimentos así como los programas informáticos utilizados se adquirieron de diversas compañías, tal y como se detalla a continuación:

Abcam (Cambridge, UK): Anticuerpo primario monoclonal anti-PDI de rata.

Alexis Biochemicals (San Diego, CA, E.E.U.U.): Rosiglitazona

Bellco Biotechnology (Vineland, NJ, E.E.U.U.): cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro.

BioRad (Barcelona): "IQ SYBR Green supermix".

Calbiochem (Barcelona): Anticuerpo primario anti- Rab18 de rata.

Cambrex Bioscience (Verviers, Bélgica): DMEM.

EcoGen (Madrid): dNTPs, Taq polimerasa Ecozyme o EcoTaq.

Fermentas (Hanover, MD, E.E.U.U.): "cDNA First Strand Synthesis kit", T4 ADN ligasa y "2X Master Mix PCR reagent".

GE Healthcare (Buckinghamshire, UK): random primers and ECL Plus Western Blotting Detection System from GE Healthcare.

Gibco (Barcelona): D-PBS, suero de recién nacido bovino (NCS).

Invitrogen (Barcelona): Opti-MEM, Trizol, el vector de clonación pCDNA3.1+, anticuerpos secundarios Alexa 594 anti- conejo y Alexa 488 anti- cabra.

Labotaq (Sevilla): kits de Bioneer "AccuPrepR Plasmid Extraction Kit" y "AccuPrepR Gel Purification Kit".

Quiagen (Madrid): "RNeasy Lipid Tissue Mini Kit", "RNase-Free DNase Set" y "QIAfilter Plasmid Maxi Kit"

Research Diets (Brunswick, NJ, E.E.U.U.): pienso granulado con alto y bajo contenido en grasa.

Roche (Madrid): glucógeno.

Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Alemania): Anticuerpo primario anti-calnexina humana desarrollado en cabra, anti-perilipina humana desarrollado en cabra.

Sera-Lab LTD (Crawley Down, R.U.): Suero fetal bovino (FBS).

Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, E.E.U.U.): Antibiótico-antimicótico , Tripsina-EDTA, DMEM sin rojo fenol, DEPC, β -mercaptoetanol, L-Glutamina, colagenasa, EDTA, Tritón X-100, BSA, isopropanol, isoproterenol, insulina, dexametasona, IBMX, PACAP38, H89, MDL 12, 330A, wortmanina, forskolina, anticuerpo primario anti- β - actina, “Free Glycerol Reagent”, HEPES

TPP (Albus, Córdoba): Todo material de plástico de cultivo celular.

Harbor University of California (CA, E.E.U.U.): GH de rata, suministrada por el Dr. A. F. Parlow.

3.2. Material biológico.

3.2.1. Obtención de muestras de tejido adiposo.

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado ratas Wistar adultas procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba y muestras de tejido proporcionadas por la Dra. R.D. Kineman y por el Dr. R. Luque de la Universidad de Illinois en Chicago (EE.UU.), obtenidos de ratones macho adultos de la cepa C57Bl/6J y ratones *ob/ob* así como de ratones obesos *New Zealand* y los controles de éstos (Ratones NON) suministrados por Laboratorios Jackson. Además, se utilizaron muestras de tejido adiposo de ratas Sprague-Dawley proporcionadas por el Dr. Carlos Diéguez, de la Universidad de Santiago de Compostela. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (22 °C), con un período luz-oscuridad de 12 h (de 7:00 a 19:00 h), y con libre acceso a comida y agua. Para la realización de los experimentos, los animales fueron sacrificados por decapitación, siguiendo la normativa recogida en la legislación nacional y europea, y aprobada por el Comité de Bioética de las respectivas Universidades involucradas en el estudio sobre manipulación y uso de animales de experimentación.

Por otra parte, se utilizaron muestras de tejido adiposo humano, tanto visceral como subcutáneo. Estas muestras se obtuvieron siguiendo la normativa recogida en la legislación nacional y europea y aprobada por el Comité Bioético del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba así como de la Clínica Universitaria de Navarra y

del Hospital Virgen de la Victoria de Málaga. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado del paciente.

Los tejidos destinados a dispersión celular (tejido adiposo blanco visceral y/o subcutáneo) se introdujeron en Krebs-Ringer Hepes buffer inmediatamente después de su extracción y a continuación se realizó la dispersión celular. Los tejidos destinados a la extracción de ácidos nucleicos o proteínas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

3.2.2. Dispersión de tejido adiposo y obtención de fracción de adipocitos maduros y estroma vascular.

La separación celular del tejido adiposo blanco se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rodbell (1964) y modificado por Cushman & Malide (2001). Para llevar a cabo los estudios, se recogieron muestras de tejido adiposo visceral y/o perigonadal así como subcutáneo sumergiéndose rápidamente en 20 ml de medio de cultivo estéril Krebs-Ringer Hepes pH 7,4 (NaCl 119 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, Hepes 20 mM, Glucosa 2 mM y BSA 2%). Con objeto de obtener una suspensión de células monodispersas de adipocitos y/o estroma vascular, el tejido adiposo se sometió a un proceso de dispersión enzimático-mecánico como se detalla en el **protocolo 1**.

3.2.3. Cultivo de la línea celular 3T3-L1.

La línea celular utilizada para realizar este trabajo es la línea celular 3T3-L1. Se trata de células de tipo fibroblástico obtenidas a partir de embrión de ratón y fueron obtenidas gracias a la generosidad del Dr. C. López Otín, de la Universidad de Oviedo. Originalmente, estas células provienen de la línea celular 3T3 (Swiss albino) sometidas a un proceso de aislamiento clonal desarrollado por Green y colaboradores (Green y Meuth, 1974), eligiendo aquellos clones capaces de diferenciarse de fibroblastos a adipocitos en presencia de un cocktail hormonal.

El cultivo de esta línea celular se realizó siguiendo las pautas indicadas por la ATCC (*American Type Culture Collection*), teniendo siempre en cuenta que las células

no alcancen un grado de confluencia superior al 70-80%, ya que, de lo contrario, se reduciría su capacidad de diferenciación a adipocitos. Todos los cultivos celulares se han llevado a cabo en un incubador a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO₂. Por último, es importante destacar que todos los experimentos sobre células 3T3-L1 incluidos en este trabajo se han llevado a cabo con células entre los pases 4-15. A partir de 15º pase, los cultivos fueron desechados y sustituidos por un nuevo vial de células mantenidas en nitrógeno líquido.

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio DMEM conteniendo 4,5 g/l glucosa y suplementado con L-glutamina 4 mM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), 1,5 g/l bicarbonato y suero de bovino recién nacido (NCS) al 10% (v/v). Los cultivos de mantenimiento de estas células se realizaron en botellas de 75 ó 150 cm² a una densidad inicial de 2.000 células/cm², y fueron refrescados dos veces por semana mediante el uso de una solución comercial que contiene tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l. Las células obtenidas se sometieron a un test de viabilidad celular mediante la técnica de azul tripán y, a continuación, se sembraron en diferentes soportes según la finalidad del experimento en cuestión. Así, las células utilizadas para microscopía de fluorescencia se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro que fueron colocados en placas individuales de 35 mm o en placas de 6 pocillos a una densidad de 30.000 células/cm². Las células destinadas a la obtención de extractos de ARN o proteína se sembraron en placas individuales de 35 mm de diámetro o placas de 6 pocillos a la misma densidad que en el caso anterior y aquellas destinadas a experimentos de electroporación se cultivaron en placas de 150 mm de diámetro a una densidad de 2.700 células/cm². En todos los casos mencionados anteriormente, las células se sometieron a un proceso de diferenciación a adipocitos. Brevemente, se dejaron crecer las células hasta alcanzar un 100% de confluencia, momento en el cual se incubaron con DMEM con glucosa (4,5 g/l) y suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato (1,5 g/l), suero fetal bovino al 10% (v/v), 10 µg/ml de insulina, 0,25 µM de dexametasona y 0,5 mM de IBMX (medio de diferenciación I) durante 72 h. Transcurrido este período, las células se incubaron en DMEM con glucosa (4,5 g/l) y suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato (1,5 g/l), suero fetal bovino

al 10% (v/v) y 10 µg/ml de insulina, manteniéndose en este medio 72 h. A partir de ese momento, se mantiene el cultivo celular con DMEM con glucosa (4,5 g/l) y suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), 1,5 g/l bicarbonato, suero fetal bovino al 10% (v/v) (medio de diferenciación II), el cual se mantuvo, renovándose cada 48 h, hasta que las células fueron utilizadas para las distintas manipulaciones experimentales.

El grado de diferenciación se comprobó mediante la observación de las células teñidas con una solución de Oil Red O (Ramirez-Zacarias *et al.*, 1992), que se une específicamente a los triglicéridos neutros acumulados en las células (ver **protocolo 2**).

3.3. Tratamientos experimentales.

3.3.1. Análisis de la expresión de Rab18 durante el desarrollo posnatal de rata.

Para estudiar los posibles cambios en la expresión de Rab18 durante el desarrollo postnatal, se analizaron los niveles de ARNm de Rab18 mediante RT-PCR en tejido adiposo perigonadal de ratas macho y hembra a diferentes edades: 15, 45, 60 y 90 días de edad. Las muestras se extrajeron inmediatamente tras el sacrificio de los animales, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

3.3.2. Análisis de la expresión de Rab18 bajo diferentes condiciones metabólicas en ratón.

Con objeto de estudiar la regulación de la expresión de Rab18 en ratones sometidos a diferentes condiciones metabólicas, se analizaron los niveles de ARNm de Rab18 mediante RT-PCR en muestras de tejido adiposo (visceral y subcutáneo) de los siguientes grupos experimentales:

- *Ayuno:*

Los ratones se dividieron en cuatro grupos de entre 5 y 8 animales. El primer grupo de animales fue alimentado *ad libitum* (Control), y los demás grupos se sometieron a ayuno durante 12, 24 y 48 h. Finalmente, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción de tejidos y posterior extracción de ARNm.

- *Obesidad inducida por la dieta (DIO):*

Para evaluar el posible efecto de la obesidad inducida por una dieta rica en grasa sobre la expresión de Rab18 en tejido adiposo, se utilizaron dos grupos de ratones obesos: uno de ellos fue alimentado con una dieta baja en grasa (LFD, 10% kcal de grasa, 70% kcal de carbohidratos, 20% kcal de proteína; similar a la alimentación normal de roedores) y el otro, fue alimentado con una dieta con alto contenido en grasa (HFD, 60% kcal de grasa, 20% kcal en carbohidratos, 20% kcal de proteína), administrada en ambos casos durante 10 o 16 semanas (Luque y Kineman, 2006). Finalizado este periodo, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción de tejidos para examinar la expresión de los genes de interés.

- *Obesidad por deficiencia en leptina (ratones ob/ob):*

Los ratones portadores de mutaciones en el gen *ob* murino (ratones *ob/ob*) carecen de leptina sérica y presentan un fenotipo de obesidad severa asociada a otros problemas como hiperlipemia, resistencia a la insulina, menor temperatura corporal, menor actividad locomotora, menor actividad del sistema inmune e infertilidad. La administración de leptina exógena corrige estas alteraciones.

Para estudiar el efecto de la obesidad causado por la deficiencia en leptina, estudiamos la expresión de Rab18 en tejido adiposo de ratones *ob/ob* y en ratones normales (WT).

- *Obesidad inducida por factores genéticos:*

Para estudiar el efecto de la obesidad inducida de forma genética, estudiamos los niveles de expresión en tejido adiposo de ratones *New Zealand*. Siguiendo las instrucciones del proveedor, se utilizaron como controles ratones *NON*. Además, por

otra parte, se realizó un segundo estudio en el que se formaron dos grupos de animales *New Zealand*. El primer grupo fue alimentado *ad libitum* (Control) y los animales del segundo grupo fueron sometidos a un ayuno de 48 h. Finalmente, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los tejidos para la extracción de ARNm.

3.3.3. Estudio de la influencia de diferentes ejes hipofisarios en la expresión de Rab18 en tejido adiposo.

Para analizar si la regulación de la expresión de Rab18 en tejido adiposo está bajo la regulación de las hormonas liberadas por la hipófisis o por las liberadas por las glándulas diana de la misma, se evaluaron los niveles de ARNm de Rab18 mediante RT-PCR en muestras de tejido adiposo visceral de ratas en las que se había bloqueado selectivamente distintos ejes endocrinos. En todos los casos en los que hubo una intervención quirúrgica y para descartar el efecto de la misma sobre la expresión de Rab18 en grasa, se incluyó un grupo adicional de animales que fueron sometidos a las mismas condiciones de anestesia y a los que se les realizó el mismo tipo de operación sin extracción de órganos y se le aplicaron puntos para simular el estrés de la intervención (grupo *sham-operated*).

- Efecto de la hipofisectomía

En este estudio, a un grupo de 6 animales macho de 30 días se les extrajo la hipófisis bajo anestesia de ketamina (40 mg/ kg). Después de la operación, los animales se mantuvieron en condiciones estándar con libre acceso a agua y comida durante cuatro semanas, tras lo cual fueron sacrificados.

- Efecto de déficit de hormona de crecimiento.

Para estudiar el posible efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión de Rab18 en tejido adiposo, se utilizaron ratas *Dwarf* de 7 semanas, las cuales carecen de GH como consecuencia de una mutación en el gen correspondiente {Charlton HM, 1988 #217}. Siguiendo las instrucciones del proveedor, se utilizaron como controles de este experimento ratas *Lewis*, modelo genético similar a las ratas

Dwarf con niveles plasmáticos normales de GH. Los animales de este último grupo fueron sacrificados tras una semana en el animalario para su adaptación y estabilización.

- Efecto de la gonadectomía

Se utilizaron ratas macho y hembra de 30 días. Se operaron orquidectomizando los machos y ovariectomizando las hembras bajo anestesia de ketamina. Después de la operación, los animales fueron mantenidos en condiciones estándar con libre acceso a agua y comida. Tras 15 días, a los 45 días de edad, fueron sacrificados.

- Efecto de la adenolectomía y tratamiento con dexametasona

Se operaron ratas macho adultas eliminando las glándulas adrenales bajo anestesia de ketamina. Tras la operación, los animales fueron mantenidos en condiciones estándar con libre acceso a agua y comida. Tanto las ratas adenolectomizadas como el grupo control recibieron una inyección subcutánea diaria de 40 µg de dexametasona disuelta en 200 µl de salino durante 8 días. También se dispuso de un grupo control al que como tratamiento se le inyectó sólo el vehículo. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección.

- Efecto de las hormonas tiroideas

Para analizar la influencia de las hormonas tiroideas sobre la expresión de Rab18 en el tejido adiposo, se utilizaron ratas macho de 60 días. El hipotiroidismo se indujo mediante la adición de 0.1% aminotriazol (3-amino-1,2,4-triazol) en el agua. El hipertiroidismo fue provocado mediante la administración crónica subcutánea de L-tiroxina (T₄; 100 µg/día sal pentahidrato de L-tiroxina sódica). El tratamiento fue mantenido durante 2 semanas, tras lo cual se sacrificaron los animales. La eficacia de los tratamientos fue confirmada estimando la concentración en plasma de la hormona TSH como se ha descrito previamente (Lopez, 2001).

Las muestras de tejido adiposo blanco fueron gentilmente cedidas por el Doctor Carlos Diéguez, del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela.

3.3.4. Análisis del efecto de diferentes modulares del metabolismo lipídico sobre los niveles de ARNm y proteína de Rab18.

Para analizar el efecto de diferentes modulares del metabolismo lipídico en la expresión de Rab18, se utilizaron células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos (ver apartado 3.2.3.) a día 10 de diferenciación. De esta manera, en el día del experimento, las células se incubaron durante 2 h en 1 ml de medio DMEM libre de suero (pre-tratamiento). Pasado ese tiempo, se reemplazó dicho medio con medio DMEM solo (condición control) o conteniendo las siguientes sustancias: isoproterenol 10 μ M, GH 10 nM, PACAP38 4.8 nM, insulina 100 nM, dexametasona 100 nM o rosiglitazona 10 μ M. Después de 24 horas, las células fueron recogidas en 1 ml de *TRizol Reagent* y procesadas para el análisis de los niveles de ARNm mediante RT-PCR.

Por otra parte, también se evaluó mediante western blot el efecto de los principales modulares del metabolismo lipídico sobre los niveles de proteína de Rab18. Para llevar a cabo estos experimentos, las células se preincubaron durante 2 h con DMEM libre de suero seguido de tratamientos de 24 h con DMEM solo o con isoproterenol 10 μ M o con insulina 100 nM. Posteriormente, las células fueron recogidas en tampón de lisis para la obtención de los extractos proteicos correspondientes utilizados para llevar a cabo el análisis de la proteína intracelular mediante western blot.

3.3.5. Estudio de la localización intracelular de Rab18.

El efecto del isoproterenol e insulina así como la contribución de diferentes componentes de las rutas de señalización intracelular de ambos modulares sobre la distribución intracelular de Rab18 fue analizado mediante inmunocitoquímica en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Así, las células fueron tratadas durante 4 h con isoproterenol 10 μ M solo o en combinación con bloqueadores específicos de la

adenilato ciclasa (AC), MDL 12,330 (1 μ M), o de la proteína quinasa A (PKA), H89 (1 μ M). En otros experimentos, las células se trataron con insulina 100 nM en ausencia o presencia del inhibidor de la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K), wortmanina (1 μ M), durante 4 h. Todos los inhibidores fueron añadidos a los cultivos celulares 90 min antes de los tratamientos combinados para asegurar la inhibición de la ruta de señalización específica al comienzo de dichos tratamientos. Los resultados de los experimentos en los que se trataron las células con isoproterenol e insulina se confirmaron mediante fraccionamiento subcelular (ver **protocolo 3**) y análisis de las fracciones obtenidas mediante western blot.

Por otra parte, también se analizó la colocalización de Rab18 con otras proteínas de otros orgánulos intracelulares. Concretamente, se analizó la colocalización de Rab18 con las proteínas del retículo endoplasmático, calnexina y PDI, y de las gotas lipídicas, perilipina, tanto en condiciones basales como tras tratamientos con isoproterenol 10 μ M ó insulina 100 nM.

3.3.6. Análisis de la expresión de Rab18 en humanos.

Con objeto de estudiar si la expresión de Rab18 se modifica en tejido adiposo de humanos en relación con la obesidad y la sensibilidad a insulina, se analizaron los niveles de ARNm de Rab18 mediante RT-PCR en muestras de tejido adiposo (visceral y subcutáneo) procedentes de individuos con normopeso así como de individuos obesos normoglucémicos, con resistencia a insulina o con diabetes mellitus de tipo II. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a su índice de masa corporal. Las muestras fueron recogidas de pacientes sometidos a cirugía bariátrica (pacientes obesos) así como funduplicación de Nissen aplicada en pacientes con hernia de hiato. Las muestras fueron rápidamente congeladas en nitrógeno y almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento para la extracción de ARN.

Las muestras de tejido humano fueron gentilmente cedidas por la Dra. Gema Frühbeck (Universidad de Navarra) y por el Dr. Francisco Tinahones de la Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga.

3.4. Técnicas básicas en Biología Molecular.

3.4.1. Aislamiento de ARNm.

El aislamiento del ARNm total de las muestras procedentes de la línea celular 3T3-L1 así como de las muestras de tejido adiposo visceral o subcutáneo de rata y ratón se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se añadió 1 ml de dicho reactivo a cada muestra. El procedimiento seguido se detalla en el **protocolo 4**.

Las muestras de tejido adiposo humano, se procesaron de manera similar, pero se incluyó un tratamiento con DNAsa I (Promega), utilizando 1U de enzima por cada μg de ARN inicial.

En todos los casos, la concentración de ARN total obtenido se determinó por espectrofotometría y su calidad se comprobó mediante la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm.

3.4.2. Retrotranscripción del ARN.

La retrotranscripción de ARN se realizó utilizando el kit comercial *cDNA First Strand Synthesis kit* sobre una cantidad de ARN total de partida de 2 μg . La retrotranscripción se llevó a cabo con hexanucleótidos de secuencia aleatoria (150 ng/reacción, Amersham Biosciences, Munich, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor comercial.

3.4.3. Diseño de oligonucleótidos para PCR.

Para el diseño de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se utilizó el programa Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.). En todos los casos, se eligieron oligonucleótidos altamente específicos para la secuencia de interés. Se evitaron oligonucleótidos que pudieran formar estructuras secundarias muy estables tanto consigo mismo como entre el par. También se evitaron los que pudieran amplificar de forma inespecífica otros genes así como los que presentaran otros sitios de unión inespecífica. Además, se seleccionaron oligonucleótidos cuya temperatura de alineamiento rondase los 60 °C. Por último, las parejas de oligonucleótidos se

diseñaron en exones distintos para evitar la amplificación del ADN genómico que pudiera contaminar la muestra. Una vez diseñados, se verificaron las características de los oligonucleótidos con el programa Primer3 (v. 0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Steve Rozen, Whitehead Institute for Biomedical Research).

3.4.4. PCR cuantitativa en tiempo real.

Para el análisis cuantitativo de la expresión de Rab18 en las diferentes muestras generadas en el presente estudio, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) empleándose un termociclador iCycler IQ de BioRad y el reactivo fluorescente SYBR green, capaz de emitir fluorescencia cuando se intercala en el ADN de doble cadena. Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en un volumen final de 25 µl conteniendo 100 ng de ADNc como molde, 10 nM de cada oligonucleótido cebador y 12,5 µl de IQ SYBR Green supermix 2x (Bio-Rad). Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos para Rab18 detalladas en la Tabla 3 y los cebadores para amplificar el ARN ribosómico 18S como gen estándar interno, elegido entre varios genes (HPRT, ciclofilina y 18S) como el estándar interno más estable en nuestras muestras (Tabla 3).

	Nombre	# acceso Genbank	Secuencia	Tamaño esperado	Tª aneling
Ratón	Rab18	NM_181070	5' -CTCTGAAGATACTCATCATCGG- 3' 5' -CCTCTCTTGACCAGCTGTATCCCA- 3'	185 pb	60 °C
Rata	Rab18	NM_001012468	5' -CTCTGAAGATCCTCATCATTGG- 3' 5' -CTTCTTGACCAGCTGTATCCCA- 3'	185 pb	60 °C
Humano	Rab18	NM_021252	5' -CCCTGAAGATCCTCATCATCGG- 3' 5' -CCTCTCTTGACCAGCAGTATCCCA- 3'	185 pb	60 °C
Ratón/ Rata/ Humano	18S	NM_008907	5' -CCCATTGGAACGTCTGCCCTAT- 3' 5' -TGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTA- 3'	137 pb	60 °C
Ratón	Ciclophilin A	NM_008907	5' -TGGTCTTTGGGAAGGTGAAAG-3' 5' -TGTCACAGTCGGAAATGGT- 3'	109 pb	60 °C
Rata	HPRT	NM_012583	5' -CAGTCCCAGCGTCGTGATTA- 3' 5' -CTCTGAAGATCCTCATCATTGG- 3'	139 pb	60 °C

Tabla 3. Secuencia, código de acceso, tamaño del producto de amplificación y temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación específica de los genes analizados en este estudio mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

La amplificación de los diferentes genes se llevó a cabo siguiendo un programa que consistió en un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 min seguido por 40 ciclos de amplificación formados por un paso de desnaturalización a 94 °C durante 15 seg, alineamiento a 60 °C durante 15 seg y extensión a 72 °C durante 15 seg. Tras los ciclos de amplificación, se realizó una curva de fusión para asegurar la especificidad de los productos amplificados.

El cálculo de la expresión génica se realizó usando los valores de “ciclo umbral” (Ct) proporcionados por el termociclador, mediante la ecuación $e^{-\Delta\Delta Ct}$, donde e es la eficiencia de amplificación de cada gen, que fue cercana a 1 en todos los casos, y ΔCt se determinó restando el valor de Ct de la amplificación del ARN ribosómico 18S (control interno) al valor de Ct específico de cada gen de interés. Finalmente, el valor $\Delta\Delta Ct$ se calculó restando el ΔCt de cada muestra problema al valor de la muestra utilizada como control (100%).

Para la cuantificación absoluta de cada uno de los transcritos de interés se amplificó en cada placa de PCR una curva estándar constituida por concentraciones conocidas crecientes del número de copias de ADNc del transcrito de interés, generada como se detalla en el siguiente apartado. De esta manera, la extrapolación de los resultados de la cuantificación de los genes de interés con los valores de la recta patrón permite determinar el número de copias específico de cada gen estudiado en cada una de las muestras problema.

3.4.5. Obtención de curvas estándar.

Para llevar a cabo la obtención de la curva estándar a utilizar para la cuantificación absoluta del transcrito de interés, se realizaron 8 reacciones de PCR convencional con los oligonucleótidos específicos de PCR a tiempo real de cada gen objeto de estudio, utilizando para ello el kit comercial *2X Master Mix PCR reagent*. A continuación, se unió el producto de PCR de las 6 reacciones y se purificó el producto siguiendo las indicaciones del kit *AccuPrepR Gel Purification Kit*. Para confirmar que sólo se había amplificado una única banda del tamaño adecuado correspondiente al gen de interés, se realizó una dilución 1:800 y se hizo una electroforesis en gel de

agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,4 µg/ml). La especificidad de los productos de PCR se determinó mediante la secuenciación de los mismos. A continuación, se determinó la concentración de los productos de PCR purificados mediante el kit comercial *Picogreen DNA cuantificación kit* (Molecular Probes, Invitrogen), elaborándose la curva estándar mediante diluciones seriadas de los productos de PCR hasta obtener una recta patrón comprendida entre 10^{10} a 10^0 copias de cada gen de interés.

3.4.6. PCR convencional (PCR a tiempo final).

Para obtener los transcritos de los genes de interés en cantidad suficiente para la obtención de la curva estándar utilizada en la PCR a tiempo real para la cuantificación absoluta de los genes estudiados, se utilizó el sistema de PCR a tiempo final. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador iCycler IQ (Bio-Rad, Barcelona). Cada reacción consistió en una mezcla de 25 µl conteniendo 100 ng de ADNc como molde, dNTPs 100nM y el kit comercial *2X Master Mix PCR reagent*. La amplificación de los diferentes genes se llevó a cabo siguiendo un programa de PCR tipo que consistió en un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 4 min seguido por el número de ciclos determinado para la amplificación óptima de cada gen, normalmente unos 30-35 ciclos. A su vez, cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización a 94 °C durante 30 seg, alineamiento a 60 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 30 seg. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se detalla anteriormente en la Tabla 3.

3.5. Estudios de western blotting.

3.5.1. Obtención de extractos proteicos.

Durante el presente estudio se llevaron a cabo análisis de proteínas mediante western blot. Los extractos proteicos se obtuvieron de tejidos y de cultivos celulares utilizando un tampón de extracción que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, 1% Tritón X-100, 1mM EDTA, suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, antipaina 5 µg/ml, pepstatina A 5

µg/ml). En el caso de tejidos, se homogeneizaron fragmentos de tejido de aproximadamente 100-150 mg en 500 µl de tampón de extracción en un homogeneizador vidrio-vidrio durante 1 min. Todas las muestras se sometieron al mismo procedimiento para garantizar la homogeneidad proteica de las mismas.

En cuanto a los cultivos celulares, antes de la extracción de proteínas, éstos se lavaron tres veces con PBS 0,01 M, pH 7,4, para eliminar restos de medio de cultivo, y las células se rasparon en un volumen adecuado de tampón de extracción. A continuación, los extractos procedentes tanto de tejido como de células se homogeneizaron con ayuda de una jeringa de 1 ml y aguja de 25 G. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 5 min a 9000 x g a 4 °C para eliminar restos de tejido y células y los sobrenadantes se conservaron a -80 °C hasta su uso. Todos los lavados, homogeneización e incubaciones se realizaron en hielo para minimizar la degradación de las proteínas. Por último, se cuantificó la concentración de proteína total de los extractos utilizando el método de Bradford.

3.5.2. Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia.

Para la detección de las proteínas de interés mediante la técnica de western blot, el siguiente paso fue preparar las muestras para su separación electroforética. Para ello, se utilizaron 150 µg de proteína y se mezclaron con el 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]. A continuación, las muestras se hirvieron durante 5 min a 96 °C para desnaturar las proteínas y, finalmente, se centrifugaron a 8000 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar restos insolubles. Una vez preparado el extracto proteico, éste se sometió a electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12,5% de poliacrilamida) utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad). La migración se llevó a cabo en un voltaje inicial de 90 V hasta que las muestras pasaran el gel *stacking* (al 4% de acrilamida) seguido de un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de migración llegó 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 50 V durante 1 h y con recirculación continua del tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 0,2% (m/v), metanol al 20% (v/v)]. Una vez terminado el tiempo de transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente durante una hora para mejorar la fijación de las proteínas de pequeño tamaño molecular a la membrana.

3.5.3. Inmunodetección y análisis densitométrico.

Una vez transcurrido el tiempo de secado, las membranas fueron bloqueadas con tampón de bloqueo [TBS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), Tween-20 al 0,05% (v/v) (TTBS) y leche desnatada en polvo (Biorad) al 5% (m/v)]. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS y leche desnatada en polvo al 3% durante toda la noche a 4 °C. Las características de los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 4. A continuación, se dieron tres lavados de TTBS durante 15 min a las membranas y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma) correspondiente y diluido en tampón TTBS y leche desnatada en polvo al 1%. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con tampón TTBS durante 15 min y dos veces con TBS durante 5 min para eliminar los restos de Tween-20 que pudieran interferir con el revelado. El revelado de la peroxidasa se realizó con un kit basado en quimioluminiscencia (ECL-Plus, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) y películas auto-radiográficas (BioMax XAR Kodak, Sigma). Tras el revelado, las películas se escanearon y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa ImageJ 1.32j (NIH, EEUU) para realizar el análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas mediante la cuantificación de la densidad óptica de cada una. Para normalizar la carga de las diferentes calles, se realizó la inmunotinción contra β -actina y la densidad óptica para la proteína de interés se refirió a aquella de β -actina.

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Rab18	Conejo	1/500	Calbiochem
Perilipina	Cabra	1/200	AbCam
Calnexina	Cabra	1/200	Santa Cruz Biotechnology, Inc
PDI	Ratón	1/500	137 pb
β -Actina	Ratón	1/50.000	Sigma

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en los experimentos de western blotting.

3.6. Estudios de localización intracelular mediante inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

3.6.1. Inmunofluorescencia de células 3T3-L1 y adipocitos.

La distribución intracelular de la proteína Rab18 en células 3T3-L1 diferenciadas, así como en adipocitos humanos y murinos se estudió mediante microscopía confocal de fluorescencia. En el caso de células fijadas sobre cubres se siguió el **protocolo 5**. En el caso de adipocitos maduros, las células no se unen a una superficie puesto que tienen baja densidad por las gotas lipídicas que contienen. Por este motivo, en este tipo celular se lleva a cabo una inmunocitoquímica en células en suspensión siguiendo el **protocolo 6**. En la tabla 5 se detallan los anticuerpos que se utilizaron en los estudios de inmunofluorescencia.

Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía confocal de fluorescencia utilizando un equipo Leica TCS-SP2-AOBS (Leica Corp., Heidelberg, Alemania). Para la adquisición de la señal del fluorocromo Alexa488 y de la GFP, la muestra fue excitada a 488 nm y se adquirió la fluorescencia emitida entre 500 y 550 nm. En el caso del fluorocromo Alexa594, la excitación se realizó a 594 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 10-20 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).

En algunos experimentos, se cuantificó la cantidad de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas, para lo cual, las imágenes se procesaron y analizaron utilizando el programa ImageJ 1.32j. En primer lugar, se obtuvo una proyección máxima bien del conjunto de planos obtenidos o bien de los planos medios de la célula. A dicha proyección se le aplicó un umbral entre los niveles de grises 50 y 255 y la imagen así obtenida se binarizó. En las imágenes obtenidas, se seleccionaron las regiones de interés alrededor de las gotas lipídicas. Finalmente, la superficie de la célula ocupada por gotas lipídicas así como la superficie de las gotas ocupada por Rab18 se calculó y se refirió a unidades de área. Se realizaron 3 experimentos independientes, tomándose 10 células y se analizaron 275-375 gotas lipídicas.

Para los experimentos de análisis de colocalización entre Rab18 y otras proteínas del adipocito, se obtuvo una proyección máxima bien del conjunto de planos obtenidos o bien de los planos medios de la célula con el programa ImageJ 1.32j para cada uno de los marcadores y se determinó el grado de colocalización calculando el coeficiente de Pearson's con dicho programa.

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Rab18	Conejo	1/500	Calbiochem
Perilipina	Cabra	1/200	AbCam
Calnexina	Cabra	1/200	Santa Cruz Biotechnology, Inc
PDI	Ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnology, Inc

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia.

3.6.2. Inmunohistoquímica de cortes de tejido adiposo.

La distribución intracelular de Rab18 en tejido adiposo se estudió mediante inmunohistoquímica. Se analizó tanto en tejido adiposo perigonadal de rata como tejido adiposo omental y subcutáneo humano. Una vez obtenidas las muestras de tejido, éstos se dividieron en fragmentos de 1 cm x 1 cm y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se incluyeron las muestras en parafina (**protocolo 7**) Se obtuvieron Los cortes de tejido de 5 µm de grosor que se depositaron en portas. Para llevar a cabo

la inmunohistoquímica se utilizó el **protocolo 7**. Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía óptica.

3.7. Transfección de cultivos celulares.

3.7.1. Transfección transitoria de líneas celulares con vectores plasmídicos.

Para sobreexpresar la proteína Rab18 se clonó dicha proteína en el vector de expresión phrGFP-N1, que contiene un promotor de expresión en mamíferos y además, codifica para la proteína *Green Fluorescence Protein* (GFP), que permite localizar la proteína intracelularmente. Se clonó en dicho vector la proteína silvestre así como una versión mutada de la misma, Rab18(Q67L), que presenta una mutación en el sitio de unión a GTP que hace que la proteína Rab18 esté constitutivamente activa puesto que no puede hidrolizar dicha molécula.

La introducción de vectores plasmídicos de expresión en células 3T3-L1 se llevó a cabo mediante electroporación (**Protocolo 8**) entre los días 6-8 de diferenciación. Se utilizaron en cada electroporación 50 µg de cada plásmido (phrGFP-N1, phrGFP-N1-Rab18 y phrGFP-N1-Q67L). Para la obtención de plásmido altamente concentrado se utilizó el sistema de purificación de plásmido de *QiaFilter MaxiPrep* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una placa de 150 mm de diámetro por cada electroporación sembrándose posteriormente en placas de 35 mm de diámetro. Los experimentos se realizaron a las 48 horas de electroporar las células, una vez que nos aseguramos mediante microscopía de fluorescencia que el 80-90% de las células están sobreexpresando la proteína de interés.

3.7.2. Transfección transitoria de células 3T3-L1 con secuencias de ARN intereferente para el silenciamiento de la expresión de Rab18.

Los experimentos de silenciamiento se llevaron a cabo mediante secuencias específicas de ARN intereferente (siRNA) obtenidas de una casa comercial (Ambion). Se utilizó una secuencia de siRNA frente Rab18 (Nº Cat. AM16704) y una secuencia de siRNA como control negativo (Nº Cat. AM4635) que no disminuye la expresión de

ningún gen en mamíferos. Para optimizar el silenciamiento de la expresión de Rab18 se utilizaron diferentes concentraciones de siRNA (1-2 nmoles) y distintos tiempos de silenciamiento (0, 24, 48 y 72 h), eligiendo una concentración de uso de 2 nmoles y un tiempo de silenciamiento de 72 h, obteniéndose una disminución del 60% de los niveles de ARNm de Rab18 y un 70% de los niveles de proteína. En este caso, puesto que la eficiencia de electroporación es mayor que en el caso del uso de vectores de expresión, se sembraron 4 placas de 35 mm de diámetro por cada placa de 150 mm de partida.

3.8. Estudios funcionales.

Uno de los objetivos de este trabajo fue investigar la posible función de la proteína Rab18 en relación con el metabolismo lipídico en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Para ello, se analizó el efecto de la modificación de la expresión de Rab18 mediante su sobreexpresión y/o silenciamiento sobre varios parámetros celulares indicadores de la actividad metabólica celular, como la lipólisis y lipogénesis. Para los experimentos de sobreexpresión, se utilizaron células electroporadas (ver **protocolo 8**) con el vector de expresión phrGFP-N1-Rab18 y el mutante constitutivamente activo de Rab18. Como control, se utilizaron células electroporadas con el vector phrGFP-N1. Para los experimentos de silenciamiento, se utilizaron células electroporadas bien con la secuencia de siRNA descrita previamente específica para Rab18 o bien con la secuencia de siRNA control. Los experimentos se realizaron 48 horas después de la electroporación en el caso de sobreexpresión de Rab18 ó 72 horas en el caso del silenciamiento. La sobreexpresión de los distintos vectores plasmídicos se verificó antes de realizar los experimentos mediante la observación de las células mediante microscopía de fluorescencia observando si las células presentaban GFP. El silenciamiento se verificó posteriormente mediante western blot y RT-PCR.

3.8.1. Análisis del tamaño de las gotas lipídicas en células 3T3-L1 transfectadas.

Una vez que las células fueron electroporadas con GFP o con GFP-Rab18, se mantuvieron en cultivo durante 48 h. A continuación, las células se mantuvieron durante 2 h en medio libre de suero y posteriormente, se incubaron con 1 ml de medio en la presencia o ausencia de isoproterenol 10 μM o insulina 100 nM. Después, las células se fijaron con paraformaldehído 4% y se tiñeron con Oil Red o (ver **protocolo 2**). Las células teñidas se observaron al microscopio confocal y se adquirieron, de forma aleatoria, 10 células por condición. Las imágenes fueron deconvolucionadas con el software Huygens Essential 2.4.4. El número medio de gotas lipídicas y el tamaño medio de las mismas se estimaron utilizando el software ImageJ 1.32. La frecuencia de la distribución del tamaño de las gotas lipídicas se calculó siguiendo la ecuación $K = 1 + 3.3 \times \log(N)$, donde K es el número de intervalos y N el número total de observaciones.

3.8.2. Determinación de la actividad lipolítica celular en células 3T3-L1.

Concretamente, las células electroporadas se lavaron una vez con medio DMEM sin rojo fenol (Sigma) complementado con NaHCO_3 20 mM y HEPES 1 mM, pH 7,4, para eliminar restos celulares y posteriormente se incubaron durante 2 h en dicho medio (pre-tratamiento). A continuación, las células se trataron con forskolina 50 μM durante 30 min. Tras ese tiempo, se recogió el medio de tratamiento para la cuantificación de glicerol libre utilizando el método colorimétrico del kit comercial *Free Glycerol Reagent* de Sigma (ver **protocolo 9**). Este kit contiene las enzimas y sustratos necesarios para que se lleven a cabo las reacciones que se muestran en la figura 15. Por otra parte, tras el tratamiento también se recogieron las células de cada pocillo en PBS para la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

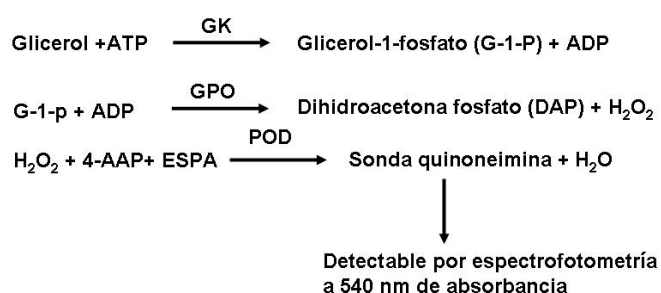


Figura 16: Reacciones que se llevan a cabo durante la cuantificación del glicerol libre en medio.

3.8.3. Cuantificación de la actividad lipogénica de células 3T3-L1.

Concretamente, las células electroporadas se lavaron una vez con medio DMEM sin rojo fenol (Sigma) complementado con NaHCO₃ 20 mM y HEPES 1 mM, pH 7,4, para eliminar restos celulares y posteriormente se incubaron durante 2 h en dicho medio (pre-tratamiento). A continuación, las células se trataron con insulina 100 nM durante 4 h. Tras ese tiempo, se recogieron las células para la determinación de triglicéridos intracelulares en buffer RIPA, tomándose además una pequeña alicuota de células para la determinación de proteína de cada pocillo mediante el método de Bradford.

Para valorar la lipogénesis, se midió la cantidad de triglicéridos intracelulares acumulados en las células utilizando el método colorimétrico del kit comercial *Infinity Triglycerides Liquid Stable Reagent* de Thermo Electron Corporation. Este kit contiene las enzimas y sustratos necesarios para que se lleven a cabo las siguientes reacciones:

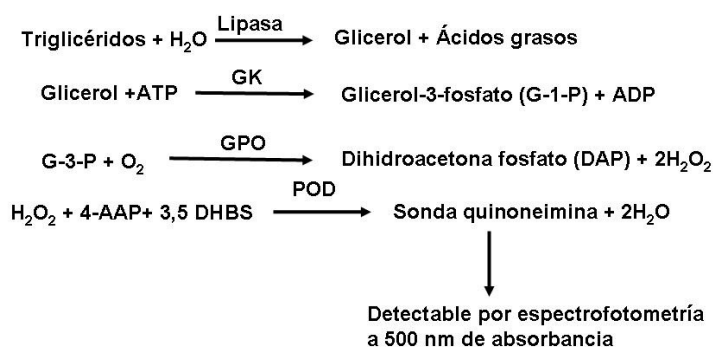


Figura 17: Reacciones que se llevan a cabo durante la cuantificación del triglicéridos.

3.9. Análisis estadístico.

Los valores que se muestran en las figuras representan la media \pm SEM (error estándar de la media) de los resultados obtenidos a partir de, al menos, 3 experimentos independientes, realizados sobre cultivos celulares independientes obtenidos en días diferentes. En el caso de animales, se utilizaron al menos 4 animales por condición experimental. En el análisis de la distribución intracelular de Rab18 en los experimentos donde se evaluó el efecto del isoproterenol, insulina y los bloqueadores específicos de la ruta de señalización de ambos se analizaron 275-375 gotas lipídicas de 10 células por cada condición experimental obtenidas en tres experimentos diferentes. El efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre el tamaño y el número de las gotas lipídicas se analizó en 275-375 gotas lipídicas de 10 células en cada grupo experimental.

En los estudios en los que se compararon únicamente dos grupos experimentales, se utilizó una prueba *t*-Student. En estudios con más de dos grupos experimentales, el análisis estadístico se realizó empleando un análisis de varianza de una vía (*one way ANOVA*) seguido de la prueba de comparación de rangos múltiples de Newman-Keuls o Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn's para datos paramétricos o no paramétricos, respectivamente. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ($P < 0,05$).

3.10. Protocolos.

Protocolo 1: Dispersión de tejido adiposo para la obtención de adipocitos maduros y fracción de estroma vascular.

1. Recoger el tejido adiposo en 20 ml de buffer Krebs-Ringer Hepes pH 7,4 (KRB) (NaCl 119 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Hepes 20 mM, pH 7.4, Glucosa 2 mM, BSA 2%)
2. Trocear el tejido en pequeños fragmentos en una placa de Petri de cristal con KRB utilizando dos bisturís. Desechar los restos de vasos sanguíneos.
3. Recoger los fragmentos de tejido adiposo en un falcon con 25 ml de KRB usando una pipeta Pasteur.
4. Añadir la solución de colagenasa 2 mg/ml a un tubo Falcon.
5. Incubar durante una hora a 37 °C en baño María en agitación suave. Cada 15 minutos agitar la muestra suavemente para facilitar la dispersión.
6. Filtrar la solución a través de un filtro (tipo *cell strainer*) de 100 µm de poro para eliminar el tejido no disperso
7. Lavar la solución con DMEM suplementado con glutamina 4 mM, 1% de mezcla de antibiótico-antimicótico, 1,5 g/l de bicarbonato y 10% FCS (medio DMEM completo) para detener la reacción enzimática.
8. Centrifugar 10 min a 600g a 37 °C para separar los adipocitos maduros de la fracción de estroma vascular.
9. Recoger los adipocitos maduros de la capa superior flotante en criotubos para congelarlos en nitrógeno líquido y almacenarlos a -80 °C para su posterior procesamiento para la extracción de proteínas o ARN o para los estudios de inmunocitoquímica.
10. Para obtener la fracción de estroma vascular, resuspender el pellet en medio DMEM completo y filtrar con un *cell strainer* de 40 µm de poro.
11. Centrifugar durante 5 min a 400 g.
12. Resuspender el pellet resultante en 500 µl del buffer de lisis de eritrocitos (*RBC Lysis Solution*, Purigene, MN, EEUU) e incubar 3 min a temperatura ambiente.
13. Centrifugar a 400 g durante 10 min.

14. Resuspender el pellet en el buffer correspondiente, congelar en nitrógeno líquido y almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Todo el proceso de dispersión y manipulación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y empleando material estéril.

Protocolo 2: Tinción de Oil Red O.

Stock de Oil Red O

0,35g /0.7 g Oil Red O

100 ml /200 ml Isopropanol

Agitar o/n filtrar ($0.2\text{ }\mu\text{m}$) y almacenar a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Solución de trabajo de Oil Red O

6 partes del stock de Oil Red O

4 partes de dH_2O

Mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 20 min.

Filtrar ($0,2\text{ }\mu\text{m}$)

Protocolo:

1. Eliminar el medio.
2. Añadir para-formaldehído e incubar a T.A. durante 15 min.
3. Eliminar el para-formaldehído con la ayuda de una pipeta.
4. Lavar las placas con isopropanol al 60%.
5. Dejar que las placas se sequen completamente.
6. Añadir la solución de trabajo de Oil Red O durante 30 min.
7. Eliminar todo el Oil Red O y añadir H_2O INMEDIATAMENTE. Lavar con H_2O 4-6 veces.
8. Montar las placas con glicerol/ PBS (1:1).

9. Observar las células en el microscopio de campo visible o en el microscopio confocal.

Protocolo 3: Fraccionamiento subcelular.

1. Lavar las células con D-PBS en frío.
2. Levantar las células y centrifugarlas a baja rpm.
3. Resuspender el pellet en 3 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, cloruro de potasio 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, pH 7,4 e inhibidores de proteasas)
4. Pasar las células 30 veces por una aguja de 25 G en hielo o sonicar en el nivel 1 durante 5 seg 2 veces, poniendo la muestra en hielo entre cada vez.
5. Mezclar con un volumen igual (3ml) de buffer de lisis que contenga 1,08 M de sacarosa.
6. Centrifugar las células a 1500 g a 4 °C 10 min. El pellet es la fracción de núcleos.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo de ultracentrifugación de 12 mL y añadir secuencialmente 2 mL de buffer sacarosa 0,27 M, 2 mL de buffer sacarosa 0,135 M y 2 mL de *Top solution* (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, y EGTA 1 mM, pH 7.4)
8. Centrifugar durante 1 h a 150500 g a 4 °C.
9. Recoger las diferentes fracciones (las gotas lipídicas (Nos. 1 and 2), zona intermedia (Nos. 3 and 4) entre gotas lipídicas y citosol, y el citosol (Nos. 5-8)). El pellet es la fracción total de membrana.
10. Solubilizar la fracción de membrana y de núcleos en 1,5 mL del buffer *Top Solution* sonicando.

Para eliminar los lípidos de la fracción de gotas lipídicas se siguió el siguiente protocolo:

1. Añadir 4 volúmenes de acetone fría por cada volumen de proteína. Mezclar y dejar a -20 °C durante toda la noche.
2. Centrifugar a 3500 rpm a 4 °C durante 10 min.

3. Eliminar el sobrenadante con cuidado para no perder el pellet.
4. Añadir 100 µl de metanol frío para eliminar la acetona.
5. Centrifugar a 3500 rpm a 4 °C durante 10 min.
6. Eliminar el methanol y se deja secar el pellet.
7. Resuspender el pellet en buffer.

Para precipitar la proteína obtenida en cada fracción se siguió el siguiente protocolo:

Por cada 100 µl de muestra inicial:

1. Añadir 400 µl de metanol.
2. Vortear para mezclar bien.
3. Añadir 100 µl de cloroformo.
4. Vortear para mezclar bien.
5. Añadir 300 µl de H₂O.
6. Vortear para mezclar bien.
7. Centrifugar 1 min. a 14000 g.
8. Eliminar la capa acuosa (la proteína se sitúa entre capas).
9. Añadir 400 µl de metanol.
10. Vortear para mezclar bien.
11. Centrifugar 2 min. a 14000 g.
12. Eliminar todo el metanol que sea posible.
13. Secar el pellet.
14. Resuspender la muestra en buffer.

Consideraciones a tener en cuenta: Todas las soluciones que se añadan a la muestra deben estar frías. Las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente para que la proteína se precipite bien.

Protocolo 4: Extracción de ARN

1. Descongelar las muestras en hielo.

2. Para eliminar el exceso de grasa de las muestras, se centrifugan a velocidad máxima durante 10 min a 4 °C.
3. Eliminar la capa de grasa que queda en la parte superior de cada muestra.
4. Añadir a la muestra 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol añadido inicialmente.
5. Mezclar la muestra y el cloroformo durante 5-10 seg e incubar a temperatura ambiente durante 2-3 min.
6. Centrifugar a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Tras la centrifugacion, se observan 3 fases distintas: la fase inferior o fase orgánica que contiene las proteínas, la fase intermedia donde se localiza el ADN y la fase superior o fase acuosa que contiene el ARN.
7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
8. Añadir 1 µl de glucógeno y 500 µl de isoproterenol a cada muestra por cada ml de Trizol utilizado inicialmente. En este paso el ARN precipita. Incubar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 10 min en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 4 y retirar el sobrenadante.
10. Lavar la pella con 1 ml de etanol al 75%.
11. Centrifugar a 7500 g durante 5 min a 4 °C.
12. Retirar el etanol y dejar secar el ARN a temperatura ambiente.
13. Resuspender el ARN en H₂O dietilpirocarbonato (DEPC) en un volumen apropiado en función del pellet obtenido.
14. Incubar 10 min a 60 °C para facilitar la resuspensión del pellet de ARN.
15. Cuantificar la cantidad y calidad del ARN total obtenido en el espectrofotómetro haciendo una dilución 1:100.

Para la extracción de ARN, siempre se prestó especial atención a la limpieza del material utilizado, empleando tanto H₂O como materiales tratados previamente con DEPC, un potente inhibidor de ARNasa.

Protocolo 5: Inmunocitoquímica por fluorescencia.

1. Lavar las células tres veces con tampón PBS [PBS 0,01M, pH 7,4] durante 5 min a temperatura ambiente.
2. Fijar las células con paraformaldehído al 4% (m/v) en tampón PBS durante 15 min.
3. Lavar las células tres veces con tampón PBS.
4. Incubar con tampón de bloqueo [PBS conteniendo Tritón X-100 al 0,3% (v/v) y BSA al 1% (m/v)] durante 1 h.
5. Incubar las células con el anticuerpo primario diluido en tampón PBS conteniendo Tritón X-100 al 0,3% (v/v) y BSA al 0,5% (m/v) durante toda la noche a 4 °C.
6. Lavar las células tres veces con tampón PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido.
7. Incubar las células con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con el fluorocromo Alexa 488 o 594 diluido en PBS conteniendo Tritón X-100 al 0,3% (v/v) y BSA al 0,5% (m/v) durante 2 h a temperatura ambiente. En el caso de que se utilizaran dos anticuerpos primarios diferentes en un mismo pocillo para realizar estudios de colocalización, en este paso se incubaron con los dos anticuerpos secundarios apropiados, teniendo en cuenta siempre que fueran compatibles tanto entre sí como con los primarios utilizados.
8. Lavar las células 3 veces con PBS.
9. Montar el cubreobjetos conteniendo las células inmuno teñidas sobre un portaobjetos utilizando con medio de montaje de PBS: Glicerol o medio conteniendo DAPI para marcar los núcleos [Tris-HCl 0,1 M, glicerol al 70% (v/v), *n*-propilgalato al 2% (m/v), DAPI 1 µg/ml (Sigma), pH 9].

Protocolo 6: Inmunocitoquímica en suspensión.

Una vez obtenidos los adipocitos maduros dispersos según el **protocolo 1**, se sigue el siguiente protocolo para realizar la inmunocitoquímica de las células obtenidas:

1. Recoger aproximadamente 1 ml de adipocitos maduros dispersos.
2. Fijar las células en 25 ml de paraformaldehído al 4% (m/v) en PBS [PBS 0,01M pH 7,4] durante 20 min a temperatura ambiente en agitación suave.
3. Lavar las células tres veces con PBS + BSA al 1% (m/v) centrifugando suavemente (210 g durante 30 seg). Para no perder células, quitar (aspirando) el medio, dejando la capa de adipocitos en la superficie del PBS.
4. Pasar las células a eppendorf de 1,5ml y permeabilizar las células y bloquear los sitios de unión inespecíficos con PBS + BSA al 1% (m/v) + saponina al 1% (m/v) (buffer 1) durante 45 min. a temperatura ambiente y agitación suave.
5. Centrifugar las células suavemente durante 30 seg. a 210 g.
6. Aspirar el buffer 1 con aguja y jeringa, evitando coger células (quedan en una capa superficial).
7. Incubar las células con el anticuerpo primario diluido en buffer 1 durante 2 h a temperatura ambiente en agitación suave.
8. Lavar las células tres veces mediante centrifugación (210 g durante 30 seg) con PBS + saponina al 1% (m/v) (buffer 2). Entre lavados, eliminar el buffer aspirando dejando la capa de adipocitos en la superficie.
9. Incubar las células con el anticuerpo secundario diluido en el buffer 1 durante 45 min a temperatura ambiente.
10. Lavar tres veces las células mediante centrifugación (210 g durante 30 seg) con el buffer 2.
11. Preparar una mezcla de PBS:Glicerol y DAPI homogeneizado con pipeta. Añadir 75 µl de dicha mezcla en cada uno de los eppendorf de adipocitos. Coger 50 µl de adipocitos y añadirlos sobre un porta. Poner el cubre encima y sellar la preparación.

Protocolo 7: Inmunohistoquímica.

1. Se fija el tejido en paraformaldehído al 4% durante toda la noche en agitación y se montan en parafina.

INCLUSIÓN

2. Lavar en agua corriente toda la noche

3. Incubar en alcohol 70 °C 1h
4. Incubar en alcohol 86 °C 1 h.
5. Incubar en alcohol 90 °C 1 h
6. Incubar en alcohol 100 1 h. Repetir este paso dos veces.
7. Incubar en Xilol 1 h a 60 °C. Repetir este paso dos veces.
8. Incubar en Xilol- Parafina toda la noche a 60 °C.
9. Incubar en Parafina I 1h a 60 °C.
10. Incubar en Parafina II 1h a 60 °C.
11. Incubar en Parafina III 1h a 60 °C.
12. Dejar solidificar los bloques a -20 °C.
13. Cortar secciones de tejido de 5 µm de grosor.
14. Desparafinar los cortes de parafina con xilol y rehidratarlos en un gradiente de etanol a agua (15 min en xilol, y lavados en etanol 100, 90, 70 y 50% durante 5 min.)
15. Lavar los cortes en agua (3x 5min.).
16. Bloquear la actividad interna peroxidada con una solución de hidróxido de peróxido al 3% durante 30 min.
17. Lavar en agua (3 x 5min.).
18. Lavar en PBS 1X (3 x 5min.)
19. Incubar las preparaciones 1 hora en PBS 1X + BSA 1% + Triton x-100 0,3%.
20. Incubar las preparaciones toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en PBS 1X + BSA 0,5% + Triton x-100 0,3% en cámara húmeda
21. Dar lavados con PBS 1X (3 x 5min.)
22. El sistema de detección utilizado fue el método Envision (Dako), consistente en un anticuerpo secundario anti- IgG de conejo desarrollado en cabra acoplado a un polímero dextrano marcado con peroxidasa. Incubar con el anticuerpo secundario 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente
23. Lavar dos veces con PBS durante 5 min.
24. Revelar la actividad de la peroxidasa utilizando 0.03% de 3,3diaminobenzidina (DAB; Sigma, St Louis, MO) (solución de sustrato proporcionada en el kit). Incubar 5- 10 min.

25. La reacción se detuvo lavando en PBS.
26. Posteriormente, las secciones fueron deshidratadas y montadas con DPX.

Protocolo 8: Electroporación de células 3T3-L1 utilizando el sistema de Gene Pulse Xcell(BioRad).

1. Lavar dos veces con 20 ml de PBS las células sembradas en placas de 150 mm².
2. A continuación, levantar las células de forma mecánica en un volumen de 10 ml de PBS por placa.
3. Centrifugar las células a 890 rpm durante 5 min.
4. Se lavan las células resuspendiéndolas en 20 ml de D-PBS (Dulbecco-PBS sin Mg⁺² ni Ca⁺², Referencia: GibcoBRL, Cat # 14190-029).
5. Centrifugar las células a 890 rpm 5 min y repetir el lavado.
6. Resuspender el pellet en 100 µl de D-PBS/placa de 150 mm utilizada para estudios de funcionales. Para estudios de imagen, resuspender el pellet en 200 µl/ placa de 150 mm utilizada y realizar dos electroporaciones/placa.
7. A continuación, poner la cantidad de de plásmido (50 µg de plásmido) o siRNA (2 nmoles) en la cubeta de electroporación. Las cubetas utilizadas son de 0,2 cm de grosor.
8. Añadir 100 µl de células resuspendidas en D-PBS. Mezclar bien.
9. Utilizar el programa: 500 µF de capacitancia, 0,11 Kv. Dar un pulso.
10. Inmediatamente después de electroporar, añadir 1ml de medio completo a las células electroporadas.
11. Pasar las células a un tubo con medio completo y esperar 10 minutos.
12. A continuación, sembrar las células en placas de 35 mm. Si se necesita utilizar cubres, se debe utilizar colágeno (0,77 mg/ml) para que se peguen bien las células al cristal.
13. Cambiar el medio a las células electroporadas a las 12-24 h.

Protocolo 9: Medida de actividad lipolítica celular.

La cuantificación de glicerol libre en medio se llevó a cabo como se describe a continuación:

- Centrifugar el medio de tratamiento a 8000 rpm durante 5 min para eliminar los posibles restos celulares.
- Añadir 100 μl del medio de cada tratamiento a cubetas de espectrofotómetro y 800 μl del reactivo de Sigma *Free Glycerol Reagent*.
- Obtener una curva estándar de concentraciones conocidas de glicerol tal y como se muestra en la tabla 6. Añadir 10 μl de cada uno de los puntos y 800 μl del reactivo. Hacer la curva estándar en el mismo medio DMEM sin rojo fenol en el que se le han dado los tratamientos a las células.
- Incubar la mezcla (muestra o patrón más reactivo) durante 15 min a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia de las muestras y patrón a 540 nm.

La concentración de glicerol en cada una de las muestras se obtendrá a partir de la recta patrón obtenida.

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN GLICEROL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CONCENTRACIÓN GLICEROL (nmol/mL)
Solución estándar de glicerol sin diluir	260	2824
1:2,5	104	1129,6
1:5	52	564,8
1:10	26	282,4
1:20	13	141,2
1:40	6,5	70,6
1:80	3,25	35,3
1:160	1,625	17,65
1:320	0,8125	8,825
Blanco	0	0

Tabla 6. Recta patrón para la determinación de la concentración de glicerol libre en medio.

Protocolo 10: Medida de actividad lipogénica celular.

La cuantificación de triglicéridos intracelulares se llevó a cabo como se describe a continuación:

- Pasar las células por una aguja de 25 G y centrifugar a 13500 rpm a 4 °C durante 10 min. Pasar el sobrenadante a un nuevo eppendorf.

- Añadir 50 µl de las células de cada tratamiento a cubetas de espectrofotómetro y 1 ml del reactivo *Infinity Triglycerides Liquid Stable Reagent*.
- Obtener una curva estándar de concentraciones conocidas de triglicéridos tal y como se muestra en la tabla 7. Añadir 50 µl de cada uno de los puntos y 1000 µl del reactivo. Hacer la curva estándar en el mismo buffer RIPA en el que se han recogido las células.
- Incubar la mezcla (muestra o patrón más reactivo) durante 5 min. a 37 °C.
- Medir la absorbancia de las muestras y patrón a 500 y 660 nm.

La concentración de glicerol en cada una de las muestras se obtendrá a partir de la recta patrón obtenida a partir de la diferencia de absorbancias cuantificadas y las concentraciones conocidas de triglicéridos.

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN Triglicéridos (µg/mL)	CONCENTRACIÓN Triglicéridos (mmol/L)
Solución estándar de glicerol sin diluir	200	2,26
1:2	100	1,13
1:4	50	0,565
1:8	25	0,2825
1:16	12,5	0,1412
1:32	6,25	0,0706
1:64	3,125	0,0353
1:128	1,5625	0,01765
1:256	0,7812	0,008825
Blanco	0	0

Tabla 7. Recta patrón para la determinación de la concentración de triglicéridos intracelulares.

4. RESULTADOS

4.1. Rab18 en modelos animales.

Previamente, diferentes estudios han demostrado la presencia de Rab18 en la superficie de las gotas lipídicas (Brasaemle *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Sin embargo, todos estos estudios se han llevado a cabo en líneas celulares, no existiendo hasta la fecha ningún trabajo sobre la expresión de Rab18 a nivel tisular. Por ello, en este estudio nos propusimos en primer lugar comprobar la presencia de Rab18 en tejido adiposo murino, así como su localización intracelular específica. En particular, mediante western blot analizamos el contenido de Rab18 en extractos proteicos de tejido adiposo de rata y en adipocitos individuales obtenidos tras la dispersión mecánico/enzimática de dicho tejido. Estos análisis se llevaron a cabo tanto en tejido adiposo visceral como subcutáneo, ya que se ha descrito previamente que estos depósitos presentan diferencias importantes en cuanto a la expresión de distintos genes y a su respuesta frente a diferentes reguladores extracelulares (Tchkonia *et al.*, 2007). Por otra parte, la localización intracelular de Rab18 se analizó utilizando tanto inmunohistoquímica de cortes de tejido adiposo visceral como inmunocitoquímica de fluorescencia de adipocitos maduros separados.

Así pues, mediante estas aproximaciones experimentales hemos podido demostrar que Rab18 se expresa tanto en tejido adiposo visceral como subcutáneo de rata. Además, comparando la producción de Rab18 en las distintas fracciones que componen el tejido adiposo, pudimos comprobar que esta GTPasa se expresa tanto en adipocitos maduros como en la fracción de estroma vascular de ambos depósitos. (Fig.18).

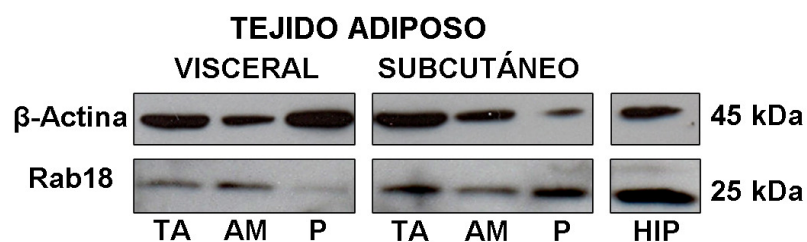


Fig.18. Análisis del contenido proteico de Rab18 en tejido adiposo de rata. Los niveles de proteína de Rab18 se midieron mediante western blot en extractos proteicos de tejido adiposo

(TA) visceral y subcutáneo, así como en las diferentes fracciones resultantes de la separación de los distintos componentes celulares de dichos tejidos: adipocitos maduros (AM) y fracción de estroma vascular y preadipocitos (P). Como control positivo se utilizó tejido de hipófisis (HIP). En todos los casos, se utilizó como estándar interno la proteína β -actina.

Por otra parte, la inmunohistoquímica contra Rab18 en cortes de tejido adiposo visceral de rata reveló la existencia de inmunoreactividad en la superficie de la gran gota lipídica central, así como alrededor de las gotas lipídicas pequeñas situadas entre la gota mayor y la superficie celular (Fig.19).

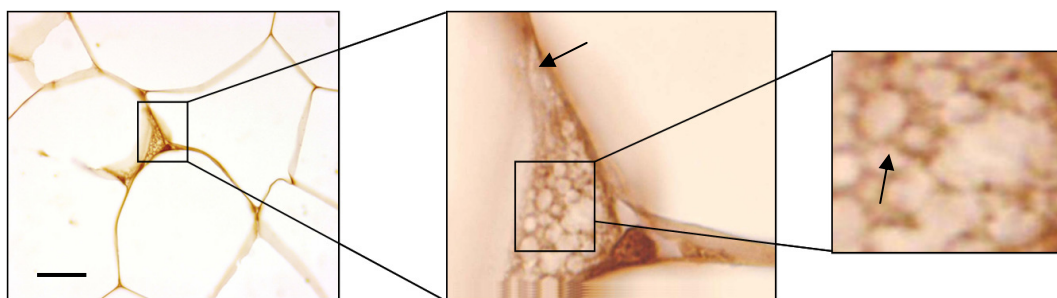


Fig.19. Inmunohistoquímica de Rab18 en tejido adiposo visceral de rata. Los cortes se inmunotifieron con el anticuerpo de anti-Rab18 de rata (1:500). Las fechas indican la presencia de inmunoreactividad para Rab18 en la superficie de la gota lipídica central así como de las gotas de pequeño tamaño. Barra de escala 25 μ m.

Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal de adipocitos maduros aislados a partir de tejido adiposo de ratón mostraron que, al igual que lo observado en cortes de tejido, Rab18 se distribuye en torno a la gran gota lipídica central y a las pequeñas gotas lipídicas periféricas (Fig. 20).

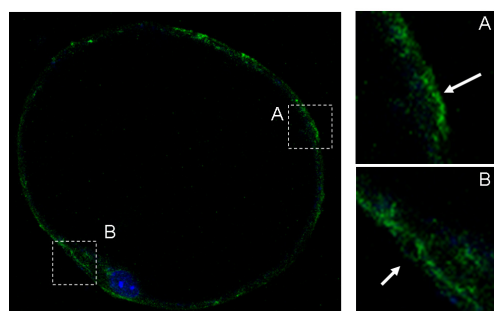


Fig.20. Inmunocitoquímica de fluorescencia para Rab18 en adipocitos maduros tejido adiposo visceral de ratón. Las células se inmunotifieron con el anticuerpo de anti-Rab18 de rata (1:500). Las fechas indican inmunofluorescencia en la superficie de la gota de mayor

tamaño así como en las gotas más pequeñas. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI. Barra de escala 25 μm .

Estos resultados confirman que Rab18 se expresa en tejido adiposo, tanto visceral como subcutáneo y que en adipocitos maduros la GTPasa se localiza preferentemente alrededor de las gotas lipídicas, al igual que ocurre en líneas celulares adipocitarias y no adipocitarias (Brasaemle *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005).

A raíz de estos resultados, nos propusimos analizar los mecanismos de regulación de la expresión de Rab18 en el tejido adiposo. Concretamente, analizamos la expresión de Rab18 durante el desarrollo postnatal de rata, la regulación hormonal a la que se encuentra sometida la expresión de la proteína en este tipo de tejido y el efecto del estado metabólico del organismo sobre la expresión de esta GTPasa en los depósitos visceral y subcutáneo. Para ello, se evaluó el contenido de ARNm de Rab18 mediante RT-PCR en muestras de tejido adiposo procedentes de los diferentes modelos experimentales que se detallan a continuación.

4.1.1. Expresión de Rab18 durante el desarrollo postnatal.

En primer lugar, analizamos la evolución de la expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral de ratas Sprague-Dawley macho y hembra a lo largo del desarrollo postnatal. Concretamente, analizamos los niveles de ARNm a los días P15, P45, P60 y P90. Como se muestra en la Figura 21, el nivel de transcritos de Rab18 no pudo ser detectado en machos ni en hembras en el estadio más temprano incluido en este estudio, P15. Sin embargo, la expresión de Rab18 en el tejido adiposo aumentó fuertemente en ambos sexos a P45, manteniéndose los niveles elevados en los estadios posteriores analizados (P60 y P90). Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas relacionadas con el género en la tasa de expresión de Rab18 en ninguno de los estadios de desarrollo postnatal incluidos en el presente estudio.

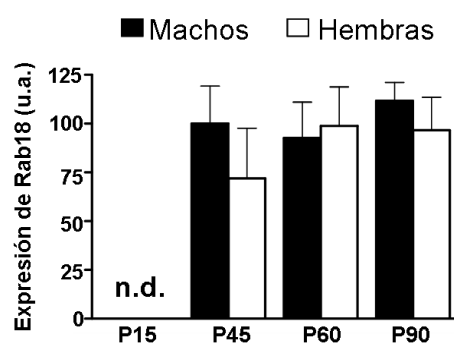


Fig.21. Expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral durante el desarrollo postnatal de rata. Los niveles de ARNm de Rab18 fueron evaluados mediante RT-PCR cuantitativa en muestras procedentes de machos (en negro) y de hembras (en blanco) a los días indicados. Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 4 animales. n.d., no detectable.

4.1.2. Expresión de Rab18 en tejido adiposo bajo diferentes condiciones metabólicas.

Para profundizar en el estudio de la regulación de Rab18 en el tejido adiposo en relación al estado metabólico del organismo, utilizamos muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo procedentes de ratones adultos sometidos a distintas condiciones experimentales. Específicamente, analizamos los niveles de expresión de Rab18 en muestras de tejido adiposo procedentes de ratones sometidos a diferentes tiempos de ayuno, de ratones con obesidad inducida por dieta y de animales con obesidad inducida genéticamente (ratones deficientes en leptina *ob/ob* y ratones *New Zealand* que presentan obesidad debida a un polimorfismo genético) mediante RT-PCR cuantitativa.

En concreto, el efecto de la restricción calórica sobre la expresión de Rab18 en el tejido adiposo se analizó en ratones sometidos a ayuno durante 12, 24 y 48 horas. Como se muestra en la Figura 22A, los niveles de ARNm de Rab18 en tejido adiposo visceral aumentaron de forma dependiente del tiempo, alcanzando un nivel máximo transcurridas 24 h de ayuno (11 veces más elevado que el observado en animales control). En tejido adiposo subcutáneo (Fig. 22B), al igual que en grasa visceral, se observó un incremento en la expresión de Rab18 tras 12 h de ayuno (15 veces superior a los niveles observados en los animales alimentados *ad libitum*), sin embargo, los

niveles de ARNm de Rab18 descendieron marcadamente en dicho depósito tras 24 y 48 h de ayuno, no observándose diferencias significativas con respecto a las condiciones control. En conjunto, los resultados anteriores indican que la expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral y subcutáneo se encuentra aumentada en condiciones de ayuno, aunque ambos depósitos responden de manera diferente. Así, el tejido adiposo visceral muestra una respuesta tardía (24 h) y sostenida, mientras que en el tejido adiposo subcutáneo el incremento de los niveles de ARNm de Rab18 se produce más rápidamente (12 h), aunque es una respuesta transitoria.

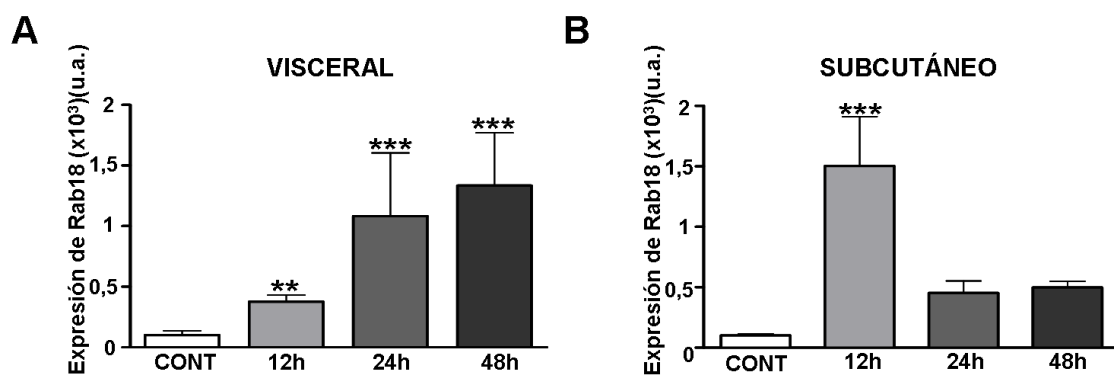


Fig.22. Expresión de Rab18 durante ayuno. Los niveles de ARNm de Rab18 se cuantificaron en tejido adiposo visceral y subcutáneo procedente de ratones alimentados *ad libitum* (Cont) y de ratones sometidos a ayuno durante 12, 24 y 48 h. Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 5 animales. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. su control correspondiente.

A continuación, analizamos el efecto de la obesidad, condición que conlleva importantes alteraciones en la homeostasis lipídica (Shoelson *et al.*, 2007), sobre la expresión de Rab18 en tejido adiposo. Para ello, cuantificamos el contenido de ARNm de Rab18 en muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo procedentes de ratones con obesidad inducida por dieta y de ratones con obesidad inducida de forma genética (ratones *ob/ob* y *New Zealand*).

En el caso de obesidad inducida por dieta, los ratones fueron alimentados con una dieta baja o rica en grasa durante 10 ó 16 semanas. A las 10 semanas, los niveles de ARNm de Rab18 resultaron 6 veces mayores en ratones alimentados con la dieta rica en grasa que en los ratones sometidos a la dieta baja en grasa (Fig. 23A). De forma

similar, la expresión de Rab18 en tejido adiposo subcutáneo fue 10 veces mayor en ratones alimentados con la dieta rica en grasa que en los que se les administró una dieta con bajo contenido en grasa (Fig. 23B). De este modo, estos resultados sugieren que el exceso calórico induce en tejido adiposo, tanto visceral como subcutáneo, un incremento en la expresión de Rab18. A 16 semanas de dieta alta en grasa también se observó un incremento en la expresión de Rab18, aunque el efecto observado no fue tan marcado como tras 10 semanas de alimentación con dicha dieta (1,44 y 1,83 veces mayores que en animales alimentados con una dieta con bajo contenido en grasa, respectivamente; Fig. 23C y 23D)

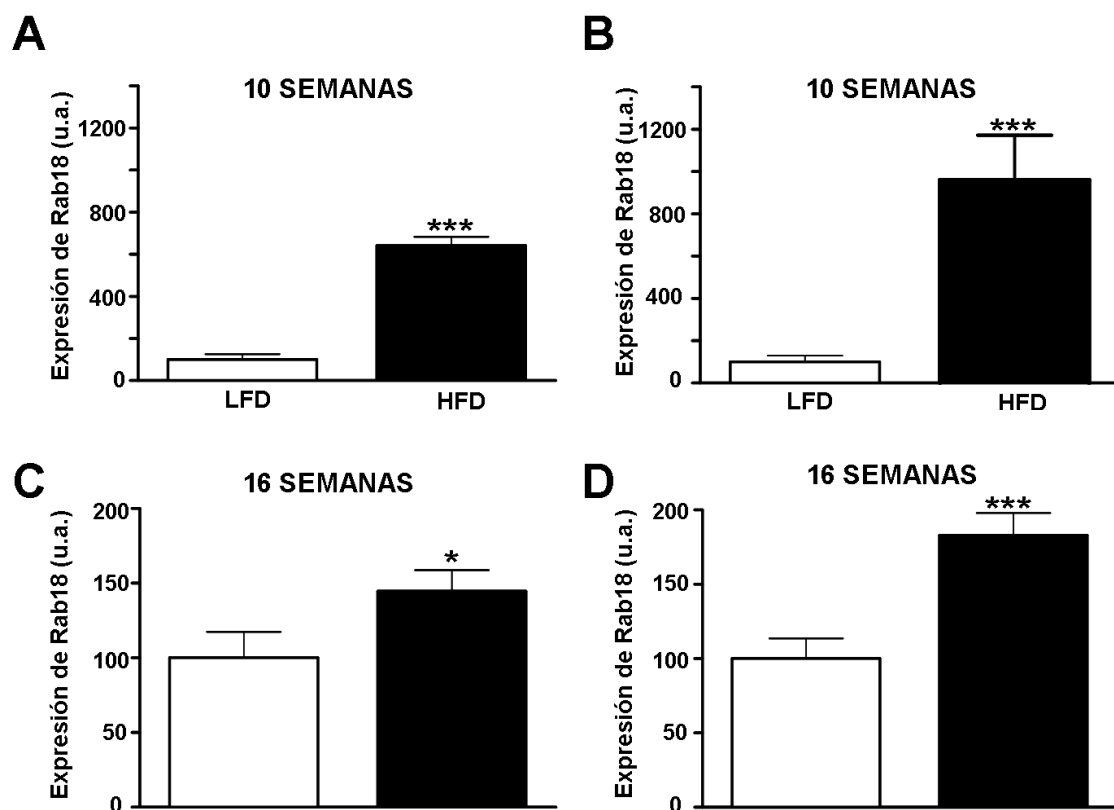


Fig.23. Expresión de Rab18 en ratones con obesidad inducida por dieta. Los niveles de ARNm de Rab18 se cuantificaron en tejido adiposo visceral (A y C) y subcutáneo (B y D) procedente de ratones alimentados con dieta baja (LFD) o alta en grasa (HFD) durante 10 ó 16 semanas. Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 3 animales. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ vs. animales controles (LFD).

Por otra parte, el análisis de los niveles de ARNm de Rab18 mediante RT-PCR de muestras de tejido adiposo visceral (Fig. 24A) o subcutáneo (Fig. 24B) procedentes de ratones *ob/ob* reveló que la expresión de Rab18 está extremadamente elevada

comparada con la expresión de la GTPasa en muestras de tejido adiposo de ambos depósitos corporales obtenidas a partir de ratones controles delgados. Específicamente, la cantidad de transcritos de Rab18 fue, respectivamente, 400 y 300 veces mayor en tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratones *ob/ob* que en muestras obtenidas de ratones delgados.

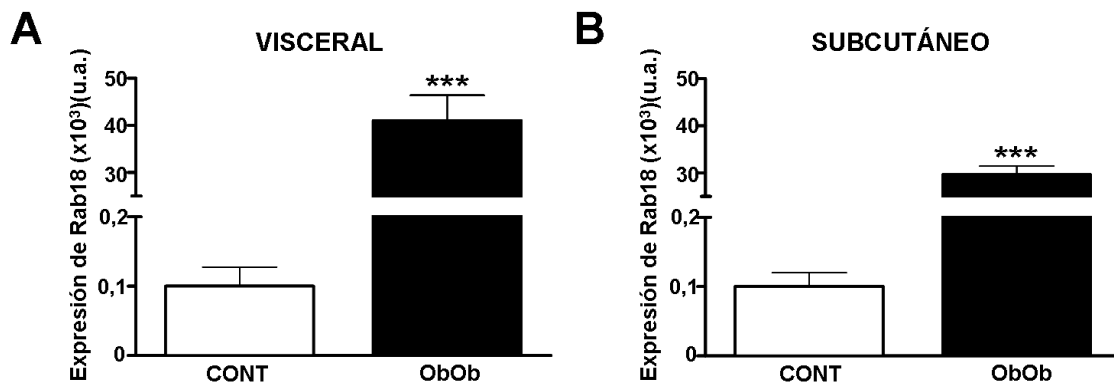


Fig.24. Expresión de Rab18 en ratones *ob/ob*. Los niveles de ARNm de Rab18 se cuantificaron en tejido adiposo visceral y subcutáneo procedente de ratones delgados (Cont) y de ratones obesos deficientes en leptina (*ob/ob*). Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 5 animales. ***, $P < 0,001$ vs. animales delgados.

De manera similar, se cuantificaron los niveles de ARNm de tejido adiposo visceral procedente de ratones obesos *New Zealand*. En este caso, se observó un fuerte incremento en la expresión de Rab18 comparado con el nivel de expresión que presentan los ratones delgados control (Fig. 25), si bien estas diferencias no fueron tan marcadas como las observadas en ratones *ob/ob*.

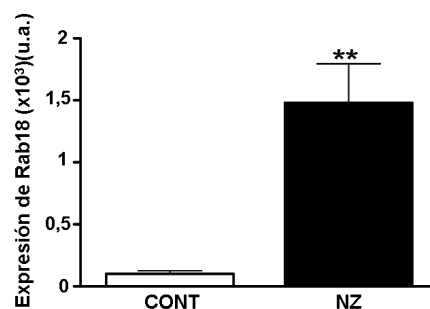


Fig.25. Expresión de Rab18 en ratones obesos *New Zealand*. Los niveles de ARNm de Rab18 se cuantificaron en tejido adiposo visceral procedente de ratones delgados (Cont) y de ratones

obesos *New Zealand* (NZ). Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 3 animales. **, $P < 0,01$ vs. animales delgados.

Utilizando este modelo de ratones obesos, investigamos si la obesidad podría influir en la respuesta que presenta el tejido adiposo en relación a la expresión de Rab18 bajo condiciones de restricción calórica. De esta manera, el análisis de los niveles de ARNm de Rab18 mediante RT-PCR mostró que, en tejido adiposo visceral, el contenido de esta GTPasa estaba aumentado de manera significativa (Fig. 26A), lo que fue similar a lo que observado en ratones delgados, si bien el incremento fue mucho más moderado que el obtenido en este último grupo. En cuanto a la expresión de Rab18 en tejido adiposo subcutáneo, se observó que los niveles de ARNm de esta proteína aumentaron tras el ayuno, lo que también se observó en ratones delgados, si bien las diferencias observadas en el caso de ratones *New Zealand* fueron estadísticamente significativas al compararlos con sus controles (Fig. 26B)

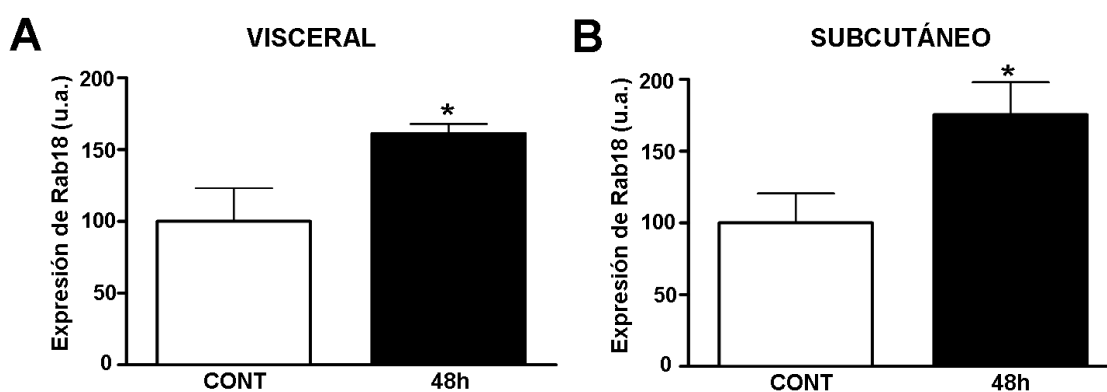


Fig.26. Expresión de Rab18 en ratones obesos *New Zealand* bajo restricción calórica. Los niveles de ARNm de Rab18 se cuantificaron en tejido adiposo visceral y subcutáneo procedente de ratones obesos *New Zealand* alimentados *ad libitum* (Cont) o bajo condiciones de ayuno (48h). Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 3 animales. *, $P < 0,05$ vs. animales controles.

El conjunto de estos resultados sugieren que la expresión de Rab18 se modifica en tejido adiposo, tanto visceral como subcutáneo, en situaciones en las que está alterada la homeostasis lipídica.

4.1.3. Regulación hormonal de la expresión de Rab18 en tejido adiposo.

Puesto que el tejido adiposo expresa los receptores para muchas de las hormonas liberadas por la hipófisis y por las glándulas diana de la misma (Schaffler *et al.*, 2005; Schaffler *et al.*, 2006), nos propusimos analizar si dichas hormonas podrían participar en la regulación de la expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral.

En primer lugar, y para tener una idea de la contribución general de la hipófisis en la producción de Rab18 en el tejido adiposo, cuantificamos la cantidad de transcritos de Rab18 en tejido adiposo visceral de ratas hipofisectomizadas. Estos valores se compararon con los obtenidos a partir de muestras de tejido adiposo de ratas que habían sido sometidas a la misma intervención quirúrgica pero manteniendo la hipófisis intacta (ratas *sham-operated*). Como se muestra en la Figura 27, los niveles de expresión de Rab18 fueron 1,99 veces mayores que en sus correspondientes controles en el tejido adiposo procedente de ratas hipofisectomizadas.

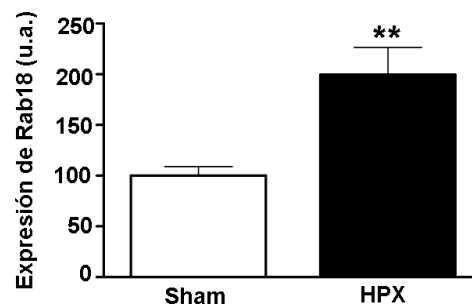


Fig.27. Expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral de ratas hipofisectomizadas. Los niveles de ARNm de Rab18 fueron evaluados mediante RT-PCR cuantitativa en muestras procedentes de ratas controles (*Sham*) e hipofisectomizadas (HPX). Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 6 animales. **, $P < 0,01$ vs. *Sham*

Una vez comprobado que la expresión de Rab18 en el tejido adiposo se modificaba tras la extirpación de la hipófisis, quisimos profundizar en el análisis de la contribución de los diferentes ejes hipofisarios en este proceso. Para ello, utilizamos diferentes modelos animales en los que se bloquearon diferentes ejes hipofisarios, bien de forma quirúrgica o mediante tratamientos con sustancias químicas específicas.

Concretamente, para conocer si la expresión de Rab18 se encuentra regulada por hormonas gonadales, se cuantificaron mediante RT-PCR los niveles de transcritos de esta GTPasa en ratas macho y hembra adultas sometidas a gonadectomía. En ambos casos, se dispuso de un grupo control *Sham-operated*. Este análisis reveló que la expresión de Rab18 en el tejido adiposo no varía de forma significativa tras la eliminación de las gónadas, ni en machos ni en hembras (Figura 28).

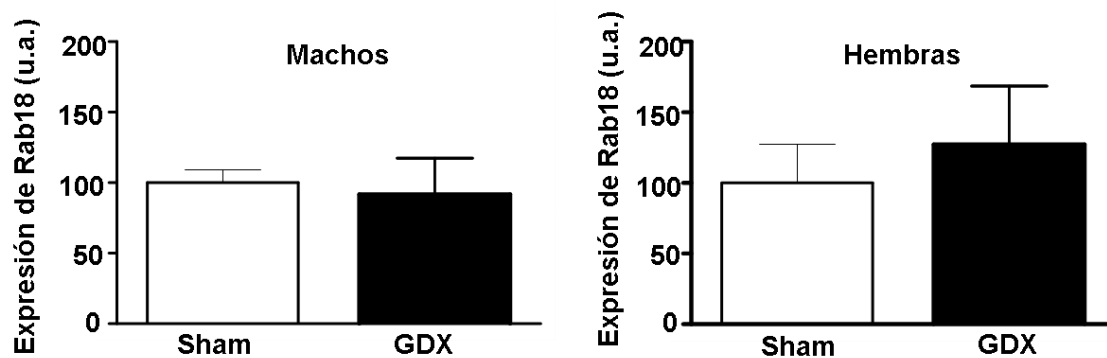


Fig.28. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de Rab18 en tejido adiposo de ratas macho y hembra gonadectomizadas (GDX). Los datos están expresados como porcentaje de los valores de los controles (*Sham*) y representan la media \pm SEM de, al menos, 3 animales.

El siguiente eje hipofisario analizado fue el eje hipófisis- adrenal. En este caso, se utilizaron ratas macho sometidas a adenolectomía y ratas *sham operated*. Además, se hicieron dos subgrupos de los anteriores, tratándose cada uno durante 8 días con dexametasona (40 μ g/día, lo que sirve como reemplazo de glucocorticoides) o con vehículo. Mediante esta aproximación experimental, pudimos comprobar que la adenolectomía no influye de manera significativa en la expresión de Rab18 en tejido adiposo. Además, ni el aumento de los niveles de glucocorticoides en el grupo control mediante tratamiento con dexametasona ni el restablecimiento de los niveles de glucocorticoides en ratas adenolectomizadas alteraron de forma significativa la expresión de Rab18 (Figura 29).

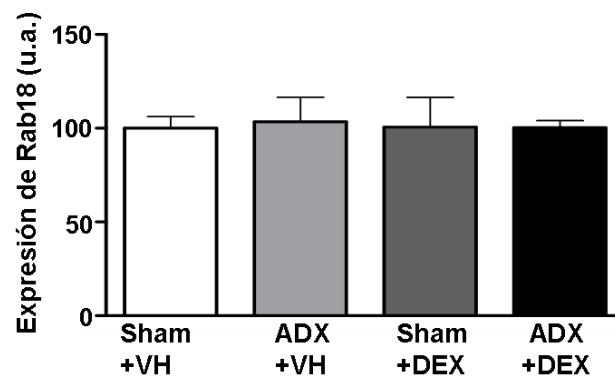


Fig.29. Contribución del eje hipófisis- adrenal en la regulación de la expresión de Rab18. Los niveles de ARNm se cuantificaron en el tejido adiposo procedente de ratas adenolectomizadas (ADX) o ratas control (Sham), bien tratadas con vehículo (VH) o con dexametasona 40 $\mu\text{g}/\text{día}$ (DEX). Todos los datos están expresados como porcentaje de los valores obtenidos a partir de las muestras de ratas *sham-operated* que recibieron inyecciones diarias de vehículo (*Sham+VH*). Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 6 animales.

A continuación, analizamos la contribución de la hormona del crecimiento (GH) en la regulación de la expresión de Rab18 en tejido adiposo. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron muestras de tejido adiposo de ratas *Dwarf*, que se caracterizan por presentar una mutación causante de una disminución en la liberación hipofisaria de dicha hormona, siendo el enanismo aparente a las 4-5 semanas de edad {Charlton HM, 1988 #217}. Como control se utilizaron animales con niveles plasmáticos normales de GH (ratas *Lewis*). Como se muestra en la Figura 30, la carencia de GH tampoco modificó los niveles de ARNm de Rab18 en tejido adiposo.

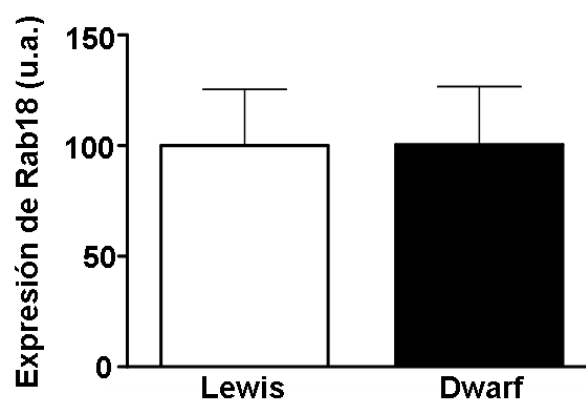


Fig.30. Análisis de la contribución de la hormona del crecimiento en la regulación de Rab18 en tejido adiposo. Los niveles de ARNm de Rab18 se cuantificaron en el tejido adiposo

procedente de ratas control (*Lewis*) o ratas deficientes en GH (*Dwarf*). Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 4 animales.

Finalmente, analizamos la influencia del eje hipófisis-tiroides sobre la expresión de Rab18 en tejido adiposo. Para ello, utilizamos animales a los que se les indujo hipero o hipotiroidismo (ver sección 3.3.3. de Materiales y Métodos). Como control, se utilizaron ratas eutiroideas. Como puede observarse en la Figura 31, el hipertiroidismo no varió de forma significativa la expresión de Rab18. Sin embargo, el hipotiroidismo provocó un incremento del 34% en los niveles de ARNm de Rab18 en tejido adiposo en comparación a lo observado en las ratas control.

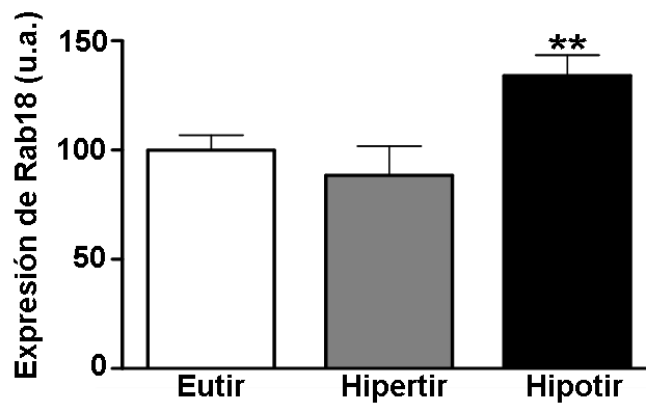


Fig.31. Influencia del eje endocrino hipófisis-tiroides en la expresión de Rab18 en tejido adiposo. Los niveles de ARNm de Rab18 se cuantificaron en tejido adiposo procedente de ratas eutiroideas (Eutir), hipertiroideas (Hipertir) e hipotiroideas (Hipotir). Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 5 animales. **, $P < 0,01$ vs. ratas eutiroideas.

4.2. Rab18 en tejido adiposo humano.

De manera similar a los estudios realizados en modelos animales, nos propusimos analizar la presencia y localización intracelular de Rab18 en tejido adiposo humano, tanto visceral (omental) como subcutáneo, así como el efecto de distintos estados metabólicos en la expresión de dicha proteína. Concretamente, analizamos la expresión de Rab18 en tejido adiposo procedente de individuos delgados, obesos normoglucémicos, obesos con resistencia a insulina y obesos con diabetes mellitus de tipo II.

4.2.1. Localización de Rab18 en tejido adiposo humano.

En primer lugar, quisimos analizar la localización intracelular de Rab18 en adipocitos maduros. Para ello, obtuvimos la fracción de adipocitos maduros tras la dispersión de tejido adiposo humano, tanto visceral como subcutáneo, y a continuación llevamos a cabo una tinción inmunocitoquímica. El análisis de las muestras mediante microscopía confocal demostró la presencia de Rab18 en adipocitos maduros procedentes de ambos tipo de depósitos, localizándose alrededor de la gota lipídica de mayor tamaño. Además, se pudo observar inmunofluorescencia alrededor de las gotas lipídicas de menor tamaño (Figura 32).

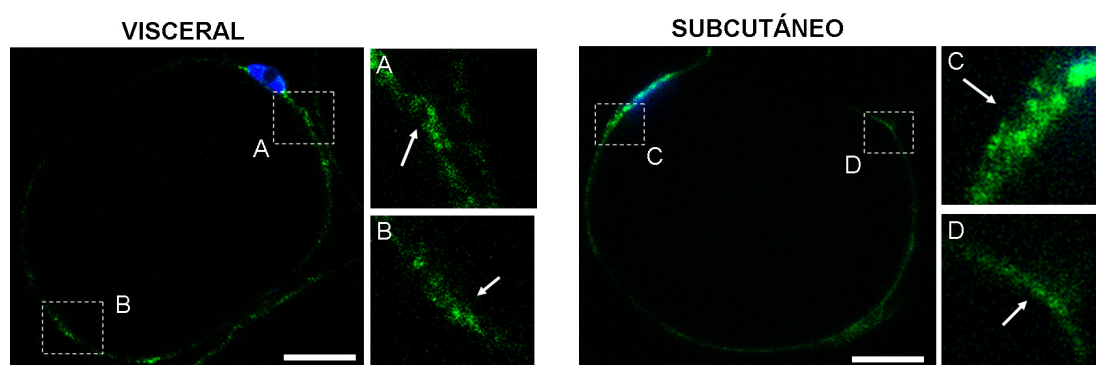


Fig.32. Inmunocitoquímica de fluorescencia de Rab18. Se obtuvieron adipocitos maduros procedentes de tejido adiposo humano, visceral y subcutáneo. Las células se inmunotifieron con el anticuerpo de anti-Rab18 de rata (1:500) y se observaron mediante microscopía confocal. Las fechas de los insertos indican la inmunoseñal de Rab18 alrededor de gotas lipídicas pequeñas y gotas de mayor tamaño. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI. Barra de escala 25 µm.

Estos resultados confirman la presencia de Rab18 en tejido adiposo humano, tanto visceral como subcutáneo, localizándose alrededor de las gotas lipídicas de manera similar a lo observado en los modelos animales utilizados en este estudio. La presencia de Rab18 en tejido adiposo humano, unida al hecho de que la expresión de Rab18 en ratas y ratones se modifica en situaciones en las que el metabolismo lipídico está alterado, como en obesidad y ayuno, nos llevó a abordar el análisis de la expresión de Rab18 en individuos delgados y obesos.

4.2.2. Expresión de Rab18 en tejido adiposo humano bajo diferentes condiciones metabólicas.

Para ello, se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de ARNm de Rab18 en muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo procedentes de mujeres y hombres delgados (BMI = $21.8 \pm 1.3 \text{ kg/m}^2$) y obesos (BMI = $48.2 \pm 2.6 \text{ kg/m}^2$). Este último grupo estaba formado por individuos normoglucémicos, individuos que presentan resistencia a insulina y pacientes con diabetes mellitus de tipo II.

En concreto, este análisis reveló que los niveles de ARNm de Rab18 en muestras de tejido adiposo visceral procedente de mujeres obesas estaban significativamente disminuidos comparados con los niveles observados en mujeres delgadas (Figura 33A). En tejido adiposo visceral procedente de hombres existía la misma tendencia, es decir, los niveles de ARNm de Rab18 se encontraban disminuidos en individuos obesos. Sin embargo, las diferencias observadas en hombres no fueron estadísticamente significativas (Figura 33B).

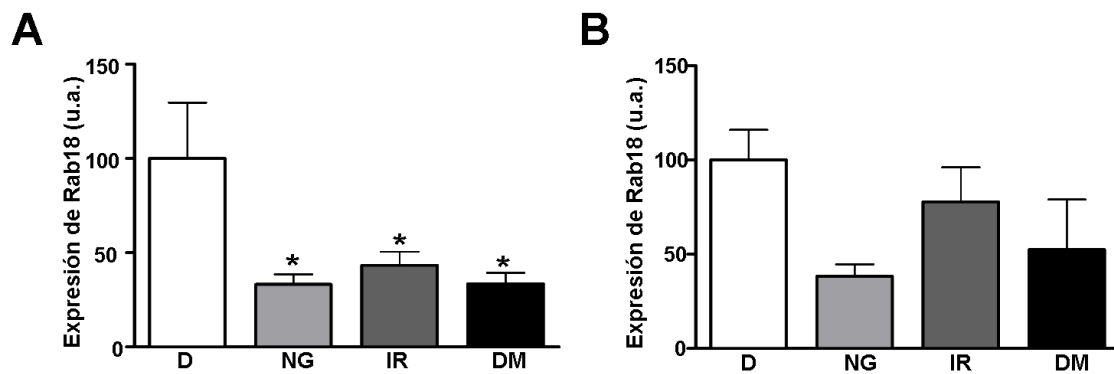


Fig.33. Expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral humano. Los niveles de ARNm de Rab18 se midieron mediante RT-PCR cuantitativa en tejido adiposo visceral procedente de mujeres (A) y hombres (B), delgados (D), obesos normoglucémicos (NG), obesos insulino-resistentes (IR) y obesos con diabetes mellitus de tipo II. Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 5 individuos. *, $P < 0,05$; vs. Individuos delgados.

En cuanto a la expresión de Rab18 en muestras de tejido adiposo subcutáneo, se observó que los niveles de ARNm de dicha proteína seguían la misma tendencia que en tejido visceral en muestras obtenidas de mujeres, aunque las diferencias obtenidas no fueron estadísticamente significativas (Fig. 34A). Por otra parte, en hombres obesos se observó que los niveles de expresión de Rab18 se encontraban aumentados con respecto a los observados en hombres delgados. Aunque, de nuevo, las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (Fig. 34B).

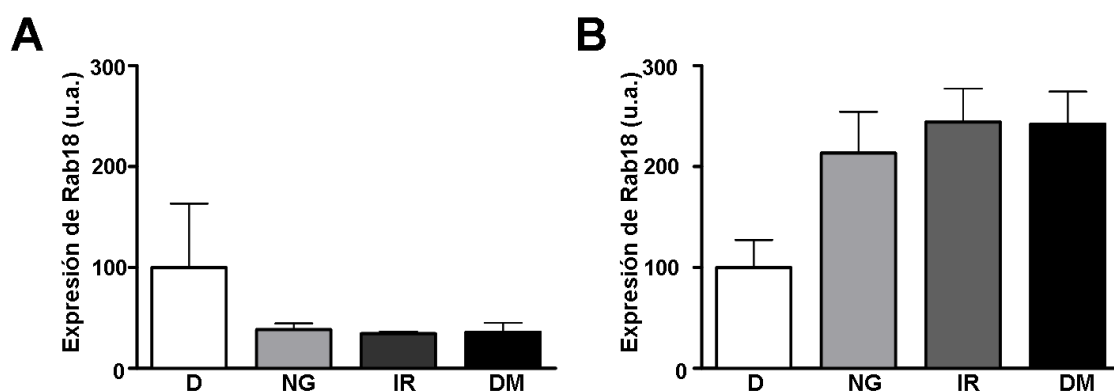


Fig.34. Expresión de Rab18 en tejido adiposo subcutáneo humano. Los niveles de ARNm de Rab18 se midieron mediante RT-PCR cuantitativa en el tejido adiposo subcutáneo procedente de mujeres (A) y hombres (B), delgados (D), obesos normoglucémicos (NG), obesos insulino-resistentes (IR) y obesos con diabetes mellitus de tipo II. Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 3 individuos.

4.3. Rab18 en adipocitos 3T3-L1.

Todos los estudios *in vitro* realizados en el este trabajo se han llevado a cabo en la línea celular 3T3-L1. Estas células se diferencian a adipocitos tras el tratamiento con un cocktail hormonal (insulina, IBMX y dexametasona, ver sección 3.2.3. de Materiales y Métodos). El seguimiento del proceso de diferenciación se llevó a cabo mediante el uso de Oil Red O, compuesto que se une a los lípidos neutros almacenados en las gotas lipídicas. En la figura 35 se muestra una tinción de dichas células a lo largo del proceso de diferenciación. Así, a día 0, las células presentan por lo general una morfología fibroblástica y una cantidad de gotas lipídicas intracelulares reducida. A medida que progresa la diferenciación, las células aumentan de tamaño, adquiriendo una morfología más redondeada y con un mayor contenido intracelular de lípidos.

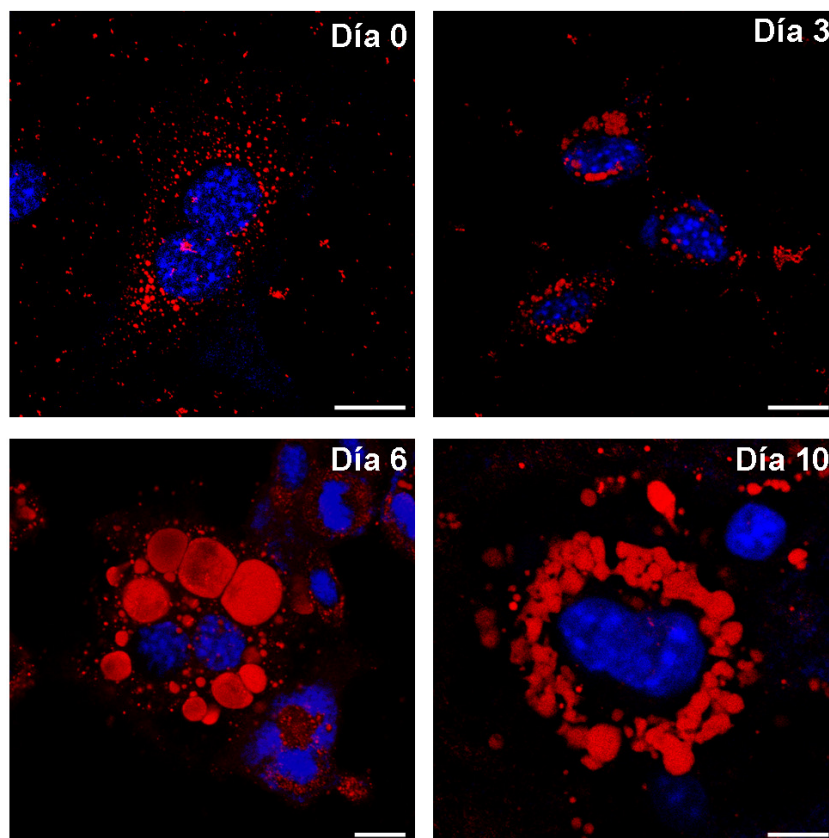


Fig.35. Diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 a días 0, 3, 6 y 10 de diferenciación. Las gotas lipídicas fueron marcadas con Oil Red O (rojo), y los núcleos celulares con DAPI (azul). Barra de escala, 5 μm .

4.3.1. Evolución de la expresión de Rab18 durante el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1.

En primer lugar, cuantificamos la producción de Rab18 en células 3T3-L1 a diferentes días de diferenciación adipocitaria. Concretamente, medimos los niveles de ARNm y el contenido de proteína mediante RT-PCR y western blot, respectivamente, en células a días 0, 3, 6, 10 y 12 en presencia del cocktail de diferenciación. Como se muestra en la Figura 36A, la expresión de Rab18 fue significativamente mayor en todos los tiempos analizados comparado con la obtenida en células no diferenciadas (día 0). Concretamente, la expresión de Rab18 a día 3 fue 3.5 veces mayor que el nivel de expresión en células no diferenciadas. A días 6 y 10, el contenido de ARNm de Rab18 disminuyó con respecto al día 3 de diferenciación, aunque los niveles de expresión se mantuvieron un 75% y 50% superiores, respectivamente, que lo observado en células no diferenciadas. En cuanto al contenido de proteína de Rab18 a lo largo de la diferenciación, el análisis mediante western blot mostró que éste seguía aproximadamente la misma tendencia que los niveles de ARNm (Fig. 36B). Así, la inmunoreactividad de Rab18 fue muy baja en células no diferenciadas pero aumentó significativamente a día 3, manteniéndose los niveles de proteína elevados a lo largo del proceso de diferenciación.

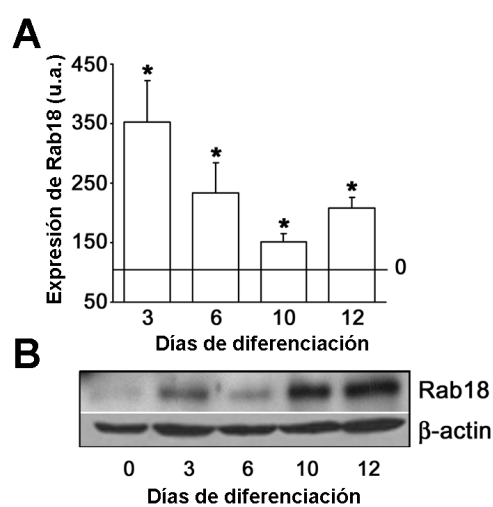


Fig.36. Expresión de Rab18 durante la diferenciación de las células 3T3-L1. (A) Niveles de ARNm de Rab18 en células 3T3-L1 a días 0, 3, 6, 10 y 12 de diferenciación. Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; vs.

células no diferenciadas. (B) Western blot representativo de las variaciones en el contenido de proteína de Rab18 durante el proceso de diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos. Como referencia de carga se utilizó β -actina.

4.3.2. Regulación de la expresión, contenido proteico y localización subcelular de Rab18 en adipocitos 3T3-L1.

Puesto que nuestros estudios previos en modelos murinos y en humanos mostraron que la expresión de Rab18 se encuentra regulada por el estado metabólico del organismo, a continuación investigamos el efecto de diferentes reguladores conocidos del metabolismo lipídico sobre la síntesis y el nivel de actividad de esta GTPasa en células 3T3-L1 diferenciadas (día 10).

Como se muestra en la Figura 37, tanto el tratamiento de 24 h con isoproterenol 10 μ M (estimulador de lipólisis; Brasaemle *et al.*, 2004) como el de insulina 100 nM (estimulador de lipogénesis; Saltiel y Kahn, 2001) provocaron un incremento significativo de los niveles del ARNm de Rab18 en células 3T3-L1, aumentando un 183% y un 108% sobre los niveles basales obtenidos en células control, respectivamente. Otros tratamientos incluidos en el presente estudio, como dexametasona 100 nM y GH 10 nM (estimuladores de lipólisis; (Xu *et al.*, 2009; Zechner *et al.*, 2005)) también incrementaron la expresión de Rab18 en células 3T3-L1, aunque los efectos observados no alcanzaron diferencias estadísticas. Por otra parte, la exposición de dichas células a tratamientos con otros moduladores del metabolismo lipídico en adipocitos, PACAP38 (4,8 nM) o rosiglitazona (10 mM) (estimuladores de lipólisis y lipogénesis, respectivamente (Festuccia *et al.*, 2009; Gericke *et al.*, 2009) no afectaron a los niveles de ARNm de Rab18 en las condiciones estudiadas.

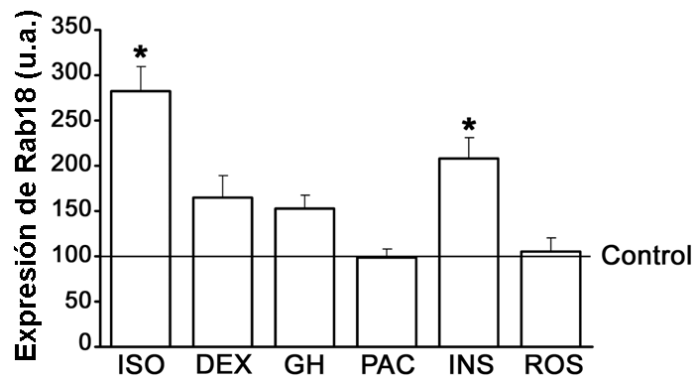


Fig.37. Regulación de la expresión de Rab18 en adipocitos 3T3-L1. Células 3T3-L1 a día 10 de diferenciación se trataron con isoproterenol 10 μ M (ISO), dexametasona 100 nM (DEX), hormona del crecimiento 10 nM (GH), PACAP38 4,8 nM, insulina 100 nM y rosiglitazona 100 nM. Los niveles de ARNm en células 3T3-L1 diferenciadas se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes con, al menos, tres réplicas cada uno. *, $P < 0,05$; vs. células no tratadas.

A continuación, analizamos el efecto del isoproterenol y de la insulina sobre el contenido proteico de Rab18 en adipocitos 3T3-L1. Tras 24 h de tratamiento con isoproterenol 10 μ M, el contenido de de Rab18 fue 59% mayor que en células control. Por su parte, el tratamiento de 24 h con insulina 100 nM indujo un aumento del 38% del contenido de Rab18 (Figura 38).

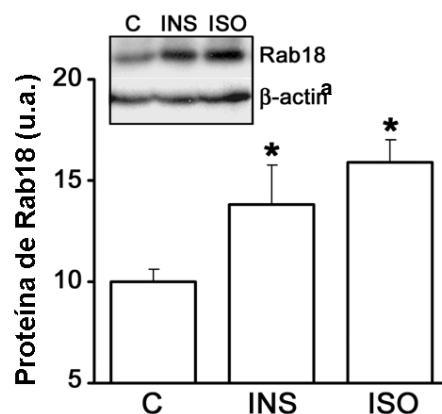


Fig.38. Regulación del contenido proteico de Rab18 en adipocitos 3T3-L1. Células 3T3-L1 a día 10 de diferenciación se trataron con insulina 100 nM (INS) o isoproterenol 10 μ M (ISO). Los extractos proteicos obtenidos a partir de las células se analizaron para Rab18 mediante western blot. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Como proteína estándar se utilizó β -actina. *, $P < 0,05$; vs. células control.

En conjunto, estos datos indican que factores extracelulares reguladores de la homeostasis lipídica en adipocitos, como el isoproterenol y la insulina, son capaces de inducir la síntesis de Rab18 en estas células, lo que sugiere un papel de esta GTPasa en los mecanismos moleculares activados durante la regulación del metabolismo lipídico.

Por otra parte, investigamos los cambios en la distribución intracelular de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 en respuesta a isoproterenol e insulina mediante inmunocitoquímica y microscopia confocal. Este análisis mostró que, en condiciones basales, la inmunoseñal de Rab18 se localizó preferentemente de forma punteada en todo el área celular, y en menor medida en torno a las gotas lipídicas (Figura 39A). Sin embargo, tras el tratamiento de las células con isoproterenol a 10 μ M la inmunotinción de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas aumentó de forma considerable (Figura 39A). Además, también se analizó la localización intracelular de Rab18 mediante fraccionamiento celular en gradiente de sacarosa. Estos estudios mostraron que, en condiciones basales, Rab18 se localiza mayoritariamente en las fracciones de baja densidad, que corresponden con las fracciones enriquecidas en gotas lipídicas. Sin embargo, tras la estimulación de la lipólisis mediante tratamiento con isoproterenol, el contenido de Rab18 en esas fracciones aumentó un 20% (Figura 39B, panel superior). Asimismo, este tratamiento también provocó la acumulación de Rab18 en las fracciones más densas, donde sedimentan las membranas intracelulares, incluyendo las del retículo endoplasmático, tal como demuestra la presencia de inmunoreactividad para la calnexina, proteína marcadora de dicho orgánulo intracelular (Martin *et al.*, 2005) (Figura 39B; panel inferior).

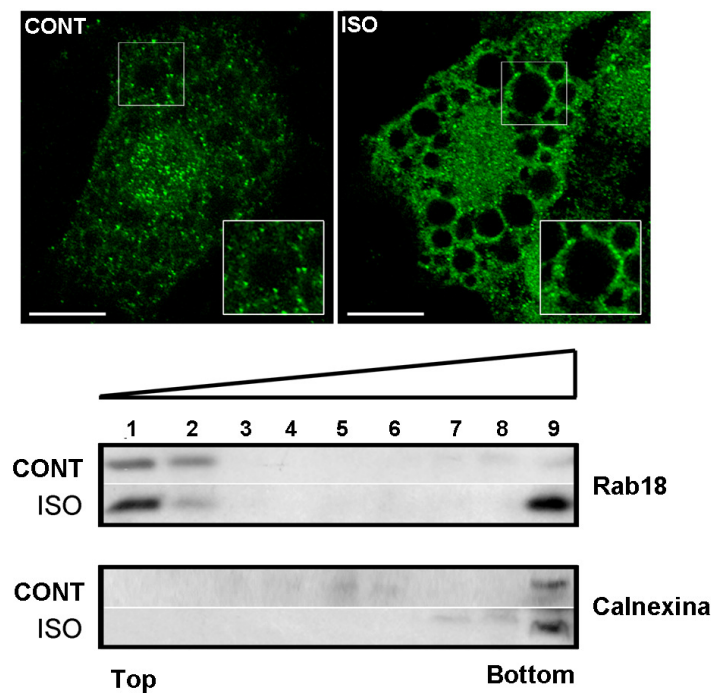


Fig.39. Localización intracelular de la proteína Rab18 en adipocitos 3T3-L1. El estudio de la localización intracelular de Rab18 se llevó a cabo en células 3T3-L1 a día 10 de diferenciación bajo condiciones basales (CONT) o tras el tratamiento con isoproterenol 10 μ M (ISO) mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (A) o fraccionamiento subcelular y western blot (B). Barra de escala, 5 μ m.

Debido a que el isoproterenol media su acción en adipocitos a través de su unión a receptores β -adrenérgicos, a continuación investigamos si la ruta de señalización intracelular clásica activada por estos receptores (i.e. AC/AMPC/PKA) es responsable de la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducida con dicho compuesto. Para ello, sometimos a células 3T3-L1 a tratamientos de 4 h con isoproterenol en presencia o ausencia de MDL 12,330A 1 μ M (bloqueador de la adenilato ciclasa) o H89 1 μ M (inhibidor de la proteína quinasa A). Así, encontramos que la inhibición de la adenilato ciclasa con MDL 12,330A no afectaba a la localización intracelular de Rab18 en condiciones basales (Figura 40A), mientras la presencia de MDL 12,330A en el medio de cultivo inhibió el reclutamiento de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducida por isoproterenol (Figura 40B). Del mismo modo, la inhibición de la PKA mediante el inhibidor H89 no modificó la distribución intracelular de Rab18 en condiciones basales (Figura 40C) aunque sí

bloqueó la asociación de Rab18 a la superficie de las gotas lipídicas estimulada por isoproterenol (Figura 40D).

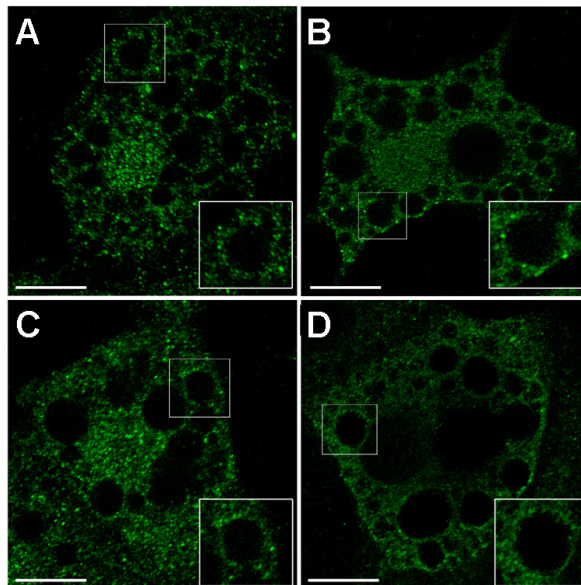


Fig.40. Localización intracelular de la proteína Rab18 en adipocitos 3T3-L1 tras la inhibición de distintos efectores de la ruta de señalización de los receptores β -adrenérgicos. La implicación de la ruta de señalización intracelular de los receptores β -adrenérgicos en la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducida por isoproterenol se analizó mediante los tratamientos con MDL 12,330A 1 μ M (A), MDL 12,330A 1 μ M + isoproterenol 10 μ M (B), H89 1 μ M (C), o H89 1 μ M + isoproterenol 10 μ M (D). La localización intracelular de Rab18 se visualizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Barra de escala, 5 μ m.

Cuantitativamente, la intensidad de la inmunoseñal de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas en células tratadas con isoproterenol resultó 3,4 veces mayor que en células en condiciones basales, lo que indica que el isoproterenol induce la movilización de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas. Además, el análisis de la inmunofluorescencia alrededor de las gotas lipídicas tras los tratamientos combinados con MDL12,330A o H89 mostró que las gotas presentaban un contenido de Rab18 similar a las células no tratadas y significativamente más bajo que el observado en células tratadas (Figura 41). A partir de estas observaciones, podemos concluir que el reclutamiento de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducido por isoproterenol está mediado por su unión a receptores β -adrenérgicos y la posterior activación de la ruta de señalización intracelular canónica asociada a estos receptores.

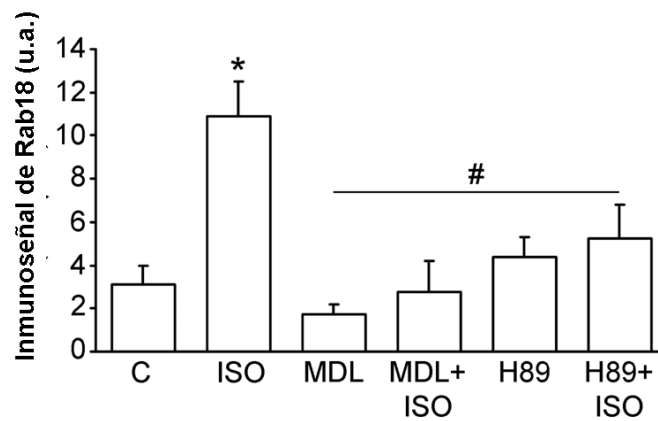


Fig.41. Cuantificación de la inmunosignal de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas en adipocitos 3T3-L1 tras la inhibición de la ruta de señalización asociada a la activación de los receptores β -adrenérgicos. La cantidad de Rab18 asociada a las gotas lipídicas se cuantificó en células tratadas con isoproterenol 10 μ M (ISO) solo o en combinación con MDL 12,330A 1 μ M (MDL) o con H89 1 μ M. Se analizaron al menos 350 gotas lipídicas por grupo experimental. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; vs. células control; #, $P < 0,05$; vs. células tratadas con isoproterenol.

Por su parte, el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con insulina también produjo una redistribución de la localización de Rab18 en dichas células. Concretamente, la insulina indujo un incremento de la distribución de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas, distribuyéndose en un anillo continuo en torno a estos orgánulos (Figura 42A), similar a lo observado tras el tratamiento con isoproterenol. El efecto de la insulina sobre la localización celular de Rab18 también se analizó mediante fraccionamiento celular y el posterior análisis del contenido de Rab18 en las distintas fracciones mediante western blot. Así, la inmunoreactividad para Rab18 en las fracciones más ligeras enriquecidas en gotas lipídicas fue un 56% mayor en células tratadas con insulina que en células control (Figura 42B, panel superior). Por otra parte, el tratamiento con insulina también provocó un aumento del contenido de la proteína Rab18 en la fracción más pesada enriquecida en membranas intracelulares, coincidiendo con la inmunosignal correspondiente a calnexina (Figura 42B, panel inferior), así como en fracciones de citosol (Fracciones 5-8).

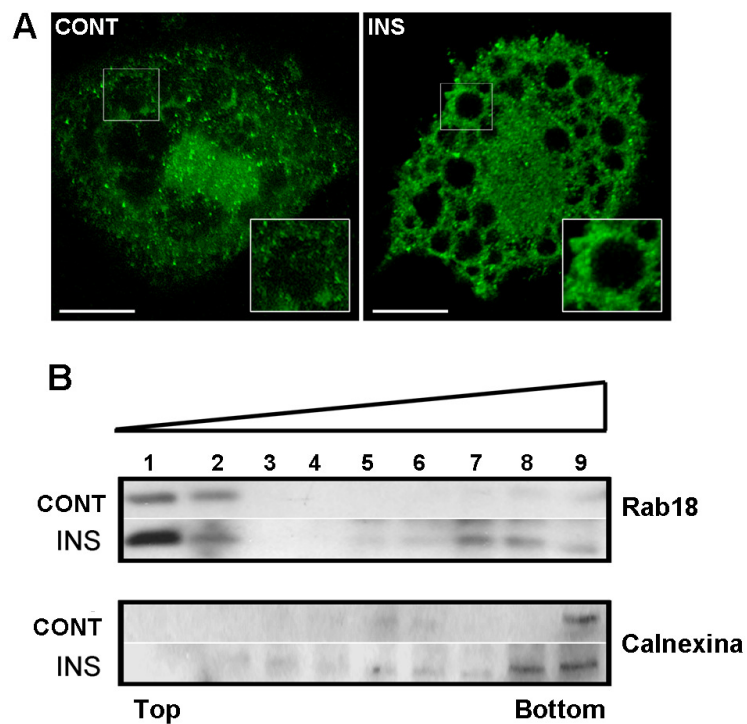


Fig.42. Localización intracelular de la proteína Rab18 en adipocitos 3T3-L1. El análisis de la distribución intracelular de Rab18 se llevó a cabo en células 3T3-L1 a día 10 de diferenciación bajo condiciones basales (CONT) o tras el tratamiento con insulina 10 nM (4h) (INS) mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (A) o fraccionamiento subcelular y western blot (B). Barra de escala, 5 μ m.

Al igual que en el caso del isoproterenol, también analizamos si el cambio en la distribución intracelular de Rab18 tras el tratamiento con insulina está mediado por la activación de la ruta de señalización intracelular activada por el receptor de la insulina, en la que, entre otras, interviene la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K; (Saltiel y Kahn, 2001). Para ello, utilizamos el inhibidor de PI3K wortmanina. Así, pudimos observar que el tratamiento de 5 h y 30 min con wortmanina 1 μ M no alteró la localización intracelular de Rab18 en condiciones basales en ausencia de insulina (Figura 43A), mientras que bloqueó completamente la translocación de Rab18 hacia las gotas lipídicas inducida por insulina (Figura 43B).

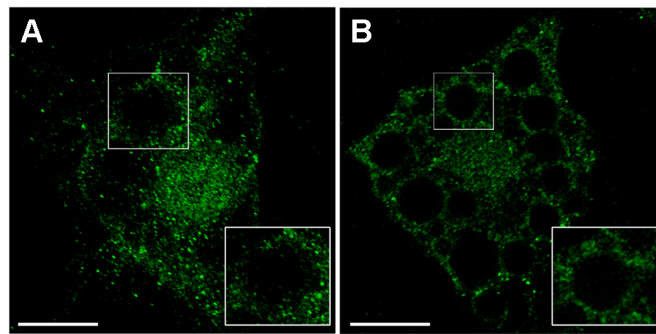


Fig.43. Localización intracelular de la proteína Rab18 en adipocitos 3T3-L1 tras la inhibición de la ruta de señalización de insulina. La implicación de la ruta de señalización intracelular de insulina en la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducida por insulina se analizó mediante los tratamientos con wortmanina 1 μ M (A) o wortmanina + insulina (B). La localización intracelular de Rab18 se visualizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Barra de escala, 5 μ m.

Cuantitativamente, la localización de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas fue 5,6 veces mayor tras el tratamiento con insulina comparado con células no estimuladas, observándose así un efecto más potente que en el caso del isoproterenol. Por su parte, el tratamiento con el inhibidor de la PI3K, wortmanina, no alteró la distribución intracelular de Rab18, mientras que el tratamiento combinado con insulina y wortmanina bloqueó completamente la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducida por insulina (Figura 44). En conjunto, estos resultados indican que la insulina ejerce su efecto sobre la localización intracelular de Rab18 mediante la activación de la cascada de señalización de la PI3K/AKT.

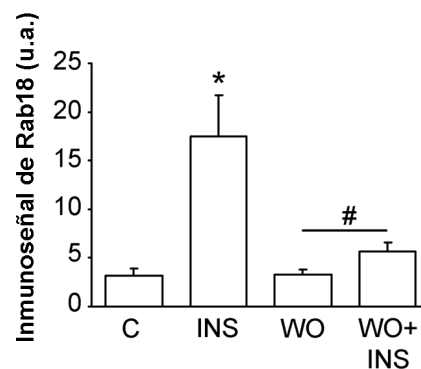


Fig.44. Cuantificación de la inmunoseñal de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas en adipocitos 3T3-L1 tras la inhibición de la ruta de señalización mediada por insulina. Los niveles de Rab18 asociados a las gotas lipídicas se cuantificaron en células tratadas con insulina

100 nM (INS) sola o en combinación con wortmanina 1 μ M. Se analizaron al menos 350 gotas lipídicas por grupo experimental. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; vs. células control; #, $P < 0,05$; vs. células tratadas con insulina.

Por otra parte, la inmunocitoquímica para Rab18 en adipocitos 3T3-L1 tratados durante 1 h con isoproterenol 10 μ M o insulina 100 nM reveló que, de forma similar a lo obtenido tras tratamientos de 4 h con dichos compuestos, también se induce el reclutamiento de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas (Figura 45A). Concretamente, la cantidad de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas fue 3,63 y 2,52 veces mayor en células tratadas con isoproterenol e insulina, respectivamente, comparados con los niveles observados en células control (Figura 45B). Además, el tratamiento conjunto con isoproterenol e insulina durante 1 h también provocó la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas, aunque este efecto no fue aditivo (Figura 45A y 45B).

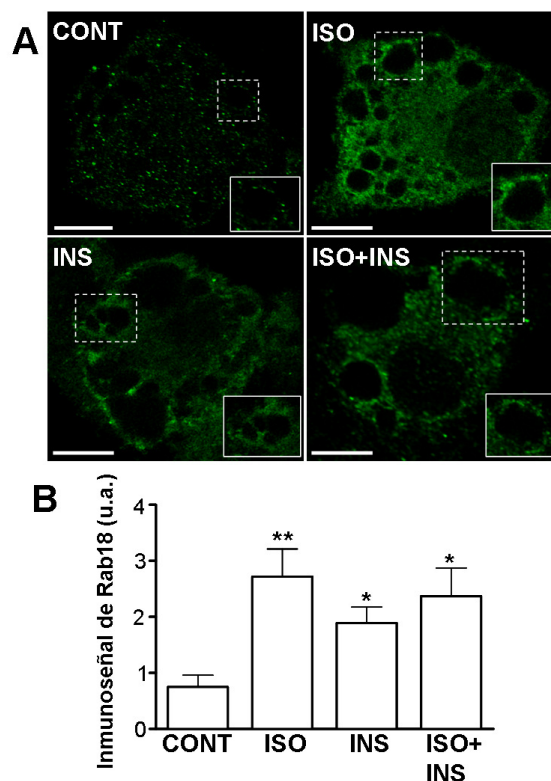


Fig.45. Localización intracelular y cuantificación de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas en adipocitos 3T3-L1 tras tratamientos cortos con isoproterenol e insulina. El análisis de la distribución intracelular de Rab18 se llevó a cabo en adipocitos 3T3-L1 tratados 1 h con isoproterenol 10 μ M, insulina 100 nM y la mezcla de isoproterenol 10 μ M + insulina 100 nM mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (A). Además, se cuantificó la intensidad

de inmunoseñal de Rab18 asociada a la superficie de gotas lipídicas (B). Se analizaron al menos 350 gotas lipídicas por grupo experimental. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,001$; vs. células control. Barra de escala, 5 μm .

4.3.3. Estudios de colocalización de Rab18 y la proteína de la cubierta de las gotas lipídicas, perilipina.

En estudios previos se ha demostrado que la perilipina se encuentra asociada a una subpoblación particular de gotas lipídicas que varía dependiendo del estado metabólico en el que se encuentran las células (Wolins *et al.*, 2006a). Por lo tanto, en el presente estudio nos propusimos determinar si Rab18 se asocia a esta misma subpoblación de gotas lipídicas que presentan en su superficie perilipina o, bien, si la GTPasa es reclutada a otra subpoblación de gotas lipídicas libre de perilipina. Para ello, realizamos estudios de doble inmunofluorescencia y microscopía confocal en células 3T3-L1 en estado basal y tras el tratamiento de 1 h con isoproterenol 10 μM o insulina 100 nM.

Concretamente, en condiciones basales el índice de colocalización de Rab18 y perilipina fue bajo (CP= 0.061 ± 0.013 ; Fig. 46, paneles superiores). Sin embargo, tras el tratamiento con isoproterenol o insulina el grado de colocalización entre ambas proteínas aumentó significativamente (CP= 0.105 ± 0.055 y 0.130 ± 0.025 , después del tratamiento con isoproterenol e insulina respectivamente, Fig. 46, paneles centrales e inferiores). Estos resultados pusieron, por tanto, de manifiesto que Rab18 y perilipina coexisten en la superficie de las gotas lipídicas en células 3T3-L1 lipolítica o lipogénicamente activas.

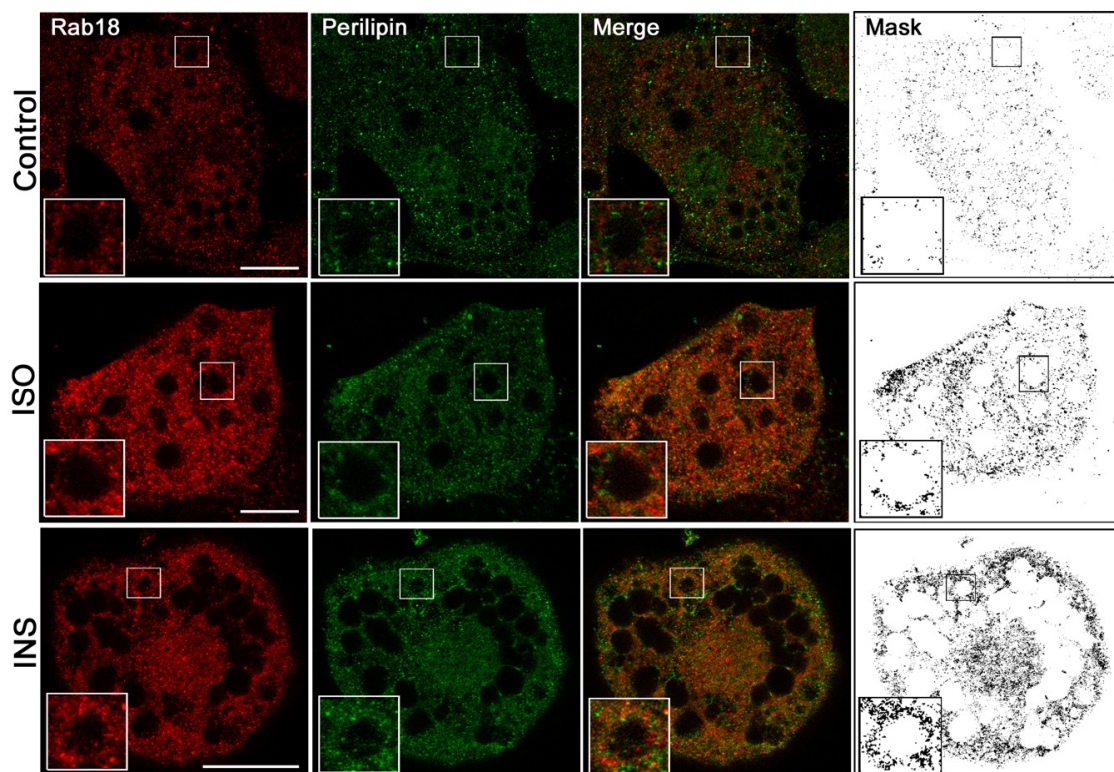


Fig.46. Colocalización de Rab18 y perilipina. La colocalización en células no tratadas (paneles superiores) fue baja, como se muestra en la máscara (Mask) obtenida a partir de los píxeles que presentan señal tanto para Rab18 como para perilipina (paneles situados a la derecha, sólo muestra los píxeles en los que ambas señales coinciden). Después de 1 h de tratamiento con isoproterenol 10 μ M e insulina 100 nM (paneles centrales e inferiores, respectivamente), la colocalización entre Rab18 y perilipina aumentó significativamente, como se muestra en las superposición de imágenes (Merge, en amarillo se muestra los puntos donde existe colocalización) o en las máscaras. En los insertos se muestra la colocalización de ambas proteínas. Barra de escala, 5 μ m.

4.3.4. Estudios de colocalización de Rab18 y proteínas del retículo endoplasmático.

En un estudio previo, Ozeki y colaboradores (Ozeki *et al.*, 2005) observaron que la sobreexpresión de Rab18 conlleva un acercamiento de las gotas lipídicas al retículo endoplasmático, por lo que nos propusimos investigar si este proceso está mediado por señales lipolíticas y lipogénicas. Para ello, analizamos el grado de colocalización de Rab18 y dos proteínas marcadoras del retículo endoplasmático, calnexina y PDI, en adipocitos 3T3-L1 tratados o no con isoproterenol o insulina. Concretamente, en condiciones basales, la inmunoseñal de Rab18 raramente colocaliza con calnexina, como se muestra en la Figura 47 (paneles superiores) De acuerdo con esta

observación, el grado de colocalización entre ambas proteínas bajo condiciones basales fue muy reducido a nivel cuantitativo ($CP = -0,040 \pm 0,020$). Sin embargo, la exposición de las células a isoproterenol $10 \mu\text{M}$ (paneles centrales) o insulina 100 nM (paneles inferiores) indujo un aumento significativo en el índice de colocalización entre Rab18 y calnexina ($CP = 0.035 \pm 0.020$ y 0.064 ± 0.036 en células tratadas con isoproterenol e insulina, respectivamente).

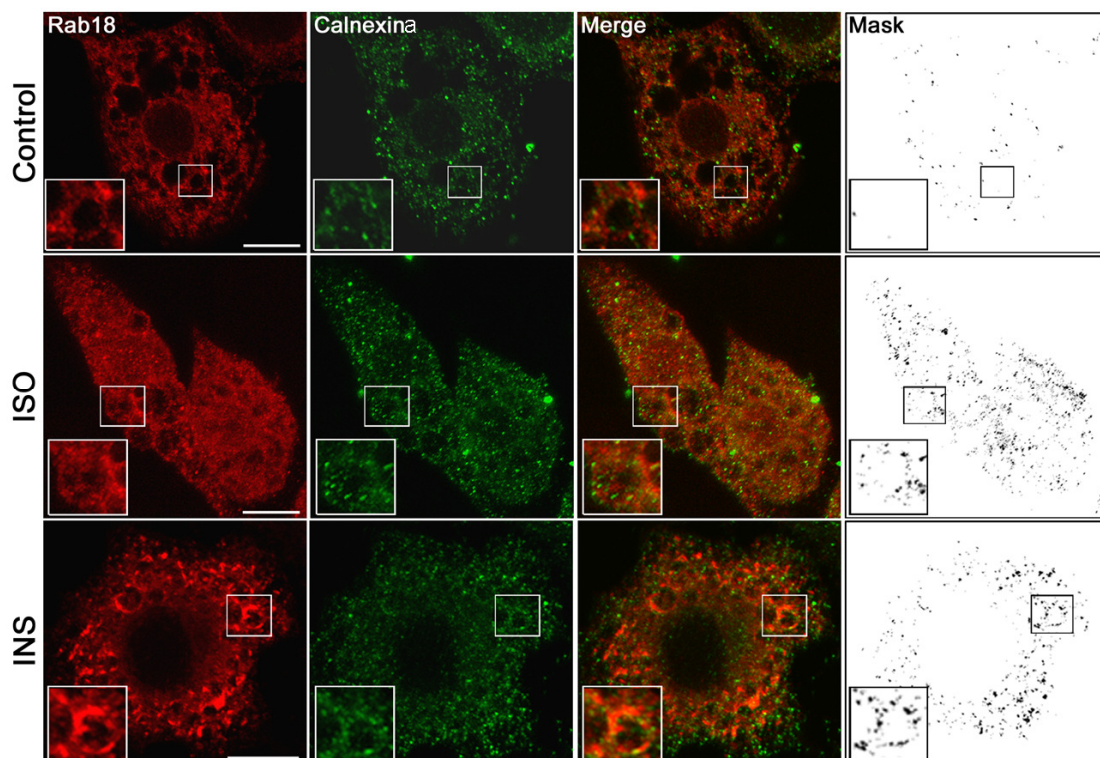


Fig.47. Colocalización de Rab18 y calnexina. El grado de colocalización entre Rab18 y el marcador de retículo endoplasmático, calnexina, se evaluó en adipocitos 3T3-L1 no tratados (paneles superiores) y en células tratadas 1 h con isoproterenol $10 \mu\text{M}$ o insulina 100 nM (paneles centrales e inferiores, respectivamente). El aumento en el grado de colocalización de Rab18 y calnexina inducido por isoproterenol e insulina puede apreciarse en mayor detalle en las imágenes *mask*. Barra de escala, $5 \mu\text{m}$.

En cuanto a la colocalización entre Rab18 y PDI, los resultados fueron similares a los observados con calnexina, de tal modo que, en condiciones basales, el grado de colocalización entre ambas proteínas fue bajo ($CP = 0,087 \pm 0,019$) mientras que la estimulación con isoproterenol o insulina indujo un aumento en la colocalización entre Rab18 y PDI ($CP = 0,143 \pm 0,016$ y $0,136 \pm 0,019$; respectivamente) (Figura 48).

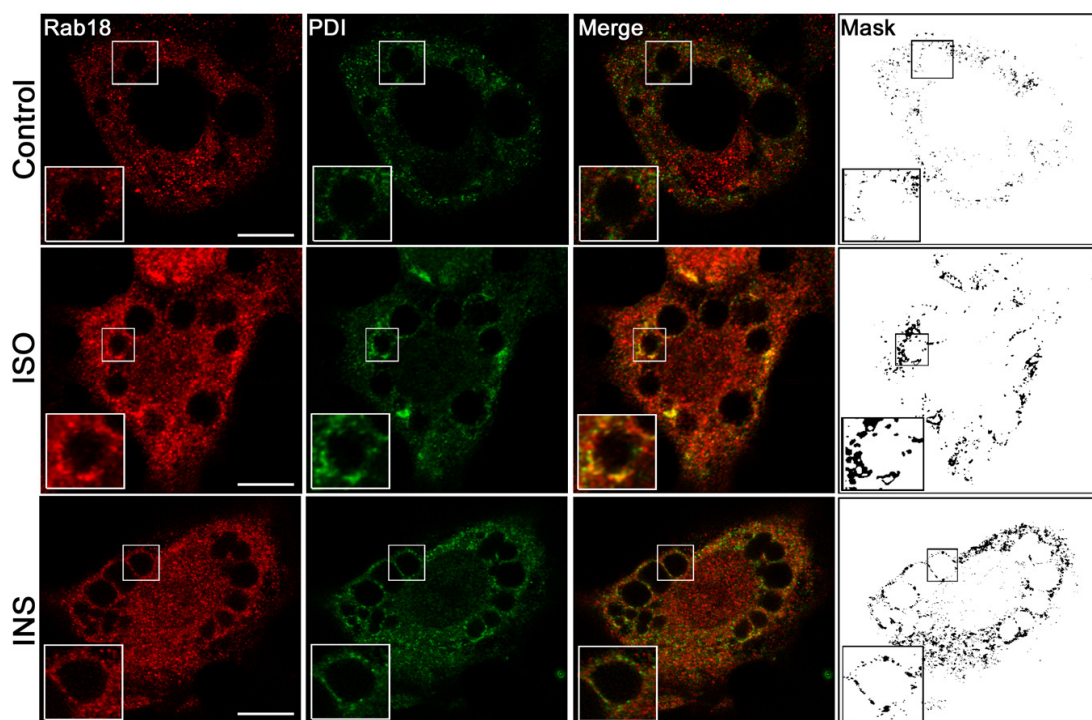


Fig.48. Colocalización de Rab18 y PDI. La colocalización entre Rab18 y PDI fue baja en células en condiciones basales (paneles superiores). Sin embargo, el tratamiento de 1 h con isoproterenol 10 μ M o insulina 100 nM provocó un aumento del grado de colocalización entre ambas proteínas (paneles centrales e inferiores, respectivamente). El aumento en el grado de colocalización de Rab18 y PDI inducido por isoproterenol e insulina puede apreciarse en mayor detalle en las imágenes *mask*. Barra de escala, 5 μ m.

4.3.5. Efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre el tamaño de las gotas lipídicas.

Para llevar a cabo los estudios de sobreexpresión, se optimizó las condiciones de electroporación de células 3T3-L1. Así, se utilizaron diferentes cantidades de plásmido (50, 100, 150, 200 μ g de plásmido) observándose posteriormente las células en un microscopio de fluorescencia. En todas las concentraciones de plásmido utilizadas se obtuvo el mismo grado de transfección celular (80-90%), si bien al aumentar la concentración del plásmido se obtuvo una mayor muerte celular. Así, se utilizó una concentración de 50 μ g de plásmido para llevar a cabo todos los estudios de sobreexpresión.

En la Figura 49 se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 transfectadas con un plásmido que codifica únicamente la GFP

(células *mock*; paneles superiores) o con un plásmido que codifica para la proteína quimera GFP-Rab18 (paneles inferiores), teñidas con Oil Red O. En todos los casos, la distribución de GFP fue difusa, ocupando todo el citosol y el núcleo, estando, por el contrario, ausente en el interior de las gotas lipídicas. Por otra parte, GFP-Rab18 se localizó alrededor de las gotas lipídicas en todas las condiciones analizadas. En condiciones basales, la proteína Rab18 endógena presentó una distribución intracelular punteada alrededor de las gotas lipídicas y en citosol. Cuando se sobreexpresa Rab18, prácticamente toda la proteína se localizó alrededor de la gota en dicha condición, lo que puede explicarse por un mayor contenido de proteína intracelular.

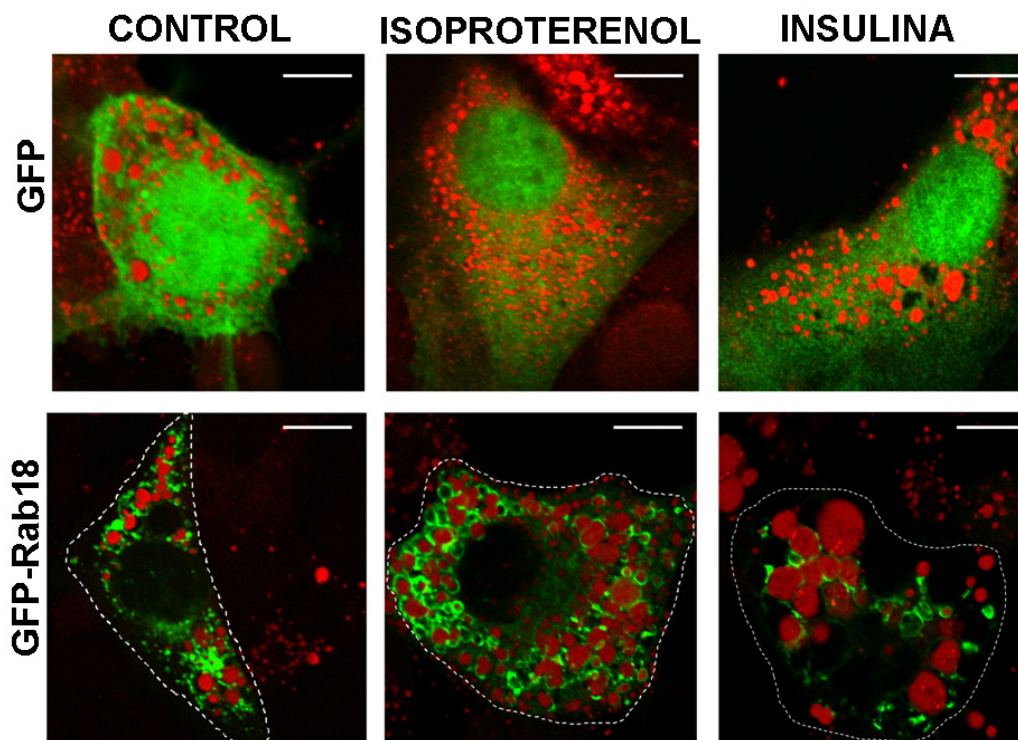


Fig.49. Localización intracelular de GFP y GFP-Rab18 en adipocitos 3T3-L1. Las células se electroporaron con los vectores de expresión GFP y GFP-Rab18 (en verde) a día 6 de diferenciación. Tras 48 h de cultivo, las células se trataron con isoproterenol 10 μ M e insulina 100 nM durante 1 h. A continuación, las células se fijaron y los lípidos intracelulares se tiñeron con Oil Red O (en rojo) y se visualizaron mediante microscopía confocal. Barra de escala, 5 μ m.

Profundizando en el análisis de la localización de GFP-Rab18 alrededor de la gota, hicimos una reconstrucción tridimensional de una gota lipídica. En la Figura 50A

se muestra una proyección en el eje Z de una gota lipídica, pudiéndose observar que, en condiciones basales, GFP-Rab18 se localiza formando una estructura alrededor de la gota lipídica que no la engloba completamente, lo que se puede observar mejor tras obtener la imagen tridimensional renderizada de las imágenes tomadas (Fig.50B y 50C).

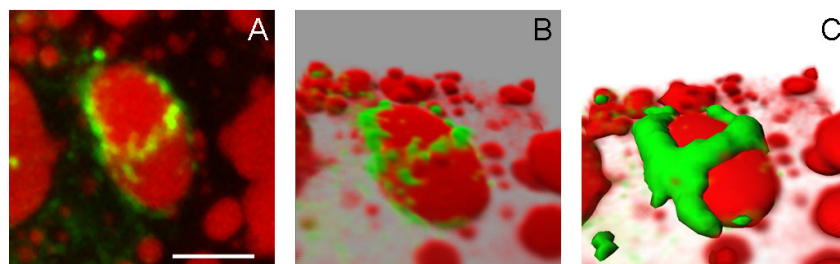


Fig.50. Localización de GFP-Rab18 en gotas lipídicas. GFP-Rab18 se localiza alrededor de la gota formando un halo (A). Tras la reconstrucción renderizada 3D de la gota obtenida utilizando el software Imaris (Bitplane), se pudo observar que Rab18 no engloba todo el volumen de la gota, sino que forma una estructura alrededor de la misma. Barra de escala, 5 μ m.

La comparación del tamaño medio de la población de gotas lipídicas en células que expresan GFP con el de las gotas en células que sobreexpresan GFP-Rab18 reveló que, en este último grupo, las gotas lipídicas fueron significativamente más grandes que en células *mock*, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con isoproterenol e insulina. En este sentido, fue llamativo el fuerte efecto de la insulina sobre el tamaño de las gotas lipídicas comparado con las células *mock* (Figura 51).

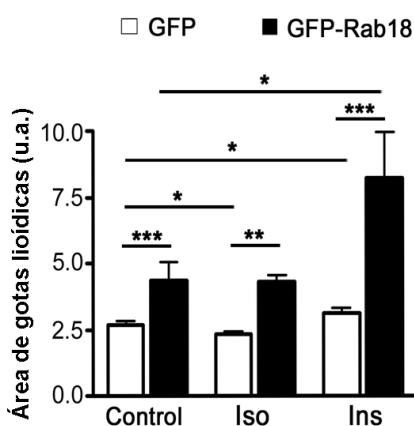


Fig.51. Efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre el tamaño de las gotas lipídicas. El tamaño medio de la población de gotas lipídicas presentes en células que sobreexpresaban

GFP o GFP-Rab18 se cuantificó en condiciones basales y tras la estimulación con isoproterenol o insulina. La sobreexpresión de GFP-Rab18 produjo un incremento general del tamaño de las gotas lipídicas *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ vs. los grupos indicados en la gráfica.

Además, en todos los casos el aumento del tamaño de las gotas estuvo acompañado por una disminución en el número de las mismas, tanto en condiciones basales como en condiciones de estimulación de isoproterenol e insulina ($71,46 \pm 3,19$ gotas lipídicas/célula en condiciones control y $64,26 \pm 6,31$ y $65,83 \pm 4,38$ gotas/célula en condiciones de estimulación con isoproterenol e insulina, respectivamente), lo que sugiere que la sobreexpresión de Rab18 provoca un aumento en el número de fusiones entre gotas lipídicas.

Para analizar en detalle el efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre el tamaño de las gotas lipídicas, clasificamos las gotas en diferentes grupos dependiendo de su tamaño y calculamos la distribución de frecuencias de estos grupos en condiciones basales y tras la estimulación con isoproterenol o insulina. Así, encontramos que en células que sobreexpresan GFP, el tratamiento con isoproterenol causó un incremento importante en el número de gotas lipídicas pequeñas (el intervalo de tamaño comprendido entre $0,3$ y $1,2 \mu\text{m}^2$). En cambio, en este grupo de células el tratamiento con insulina provocó un incremento en el número de gotas lipídicas de mayor tamaño (entre $2,4$ y $> 5,4 \mu\text{m}^2$). Ambos resultados están en consonancia con un incremento en la actividad lipolítica y lipogénica celular que se produce tras el tratamiento con isoproterenol e insulina, respectivamente (Figura 52, panel superior). Por otra parte, en células que sobreexpresaban GFP-Rab18, encontramos un cambio de distribución hacia los intervalos de mayor tamaño en condiciones basales y tras el tratamiento con isoproterenol (Figura 52, panel inferior). En cuanto al tratamiento con insulina, éste no sólo produjo un incremento en el número de las gotas lipídicas de mayor tamaño ($>5,4 \mu\text{m}^2$), sino que también indujo un aumento del número de gotas de menor tamaño (gotas comprendidas entre los tamaños de $<0,3 \mu\text{m}^2$ y $0,9 \mu\text{m}^2$) (Figura 52, panel inferior), lo que podría representar la formación *de novo* de gotas lipídicas inducida por este agente lipogénico.

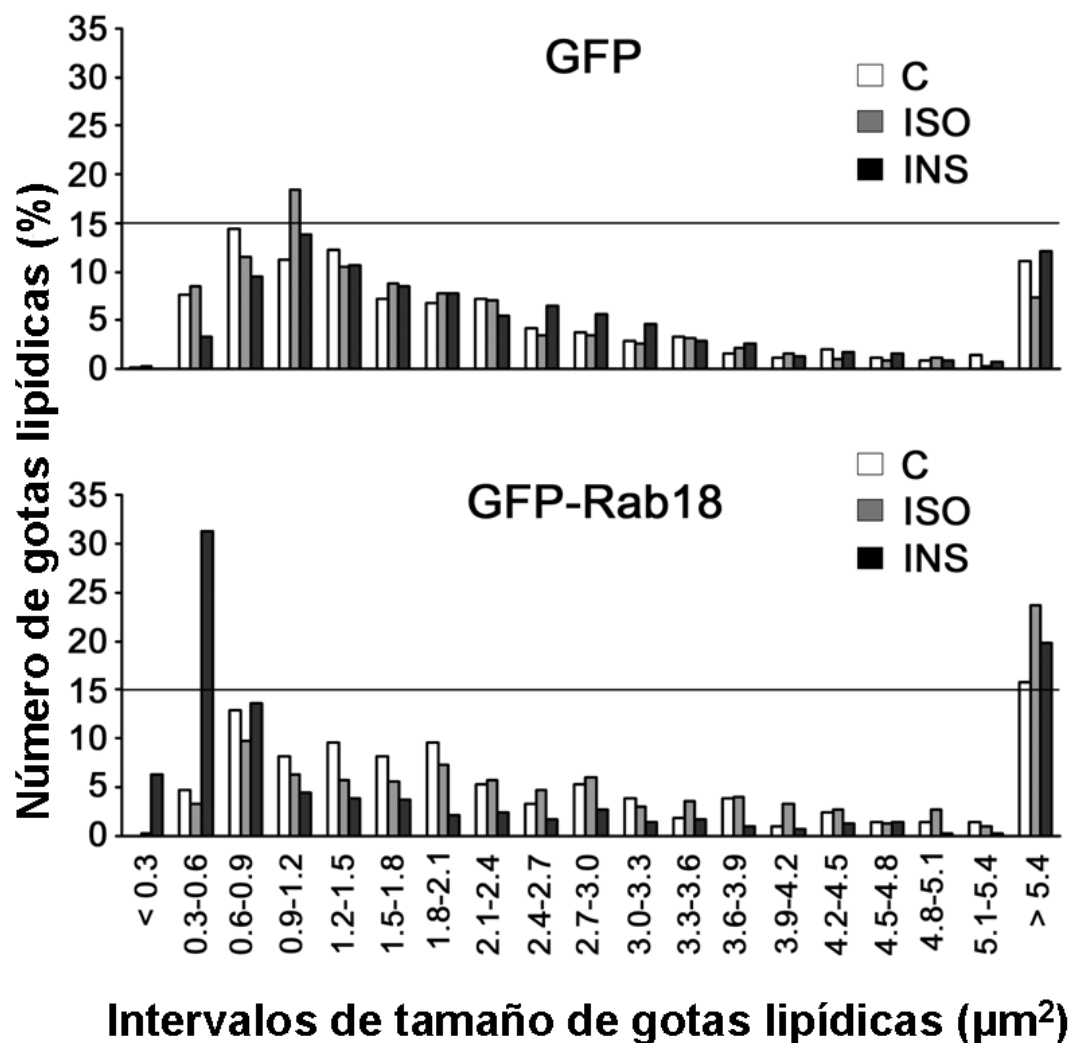


Fig.52. Efecto de la sobreexpresión de Rab18 en la distribución de tamaño de las gotas lipídicas en adipocitos 3T3-L1. El tamaño medio de la población de gotas lipídicas presentes en células que sobreexpresaban GFP o GFP-Rab18 se cuantificó en condiciones basales y tras la estimulación con isoproterenol o insulina

Además, quisimos analizar la distribución intracelular del mutante constitutivamente activo de Rab18, para lo cual transfectamos adipocitos 3T3-L1 con un plásmido que codifica GFP-Rab18(Q67L) y teñimos las células con Oil Red O. Tras el análisis por microscopía confocal, se observó que dicho mutante se localizaba alrededor de las gotas lipídicas en todas las condiciones analizadas, de manera similar a la proteína GFP-Rab18 (Fig.53).

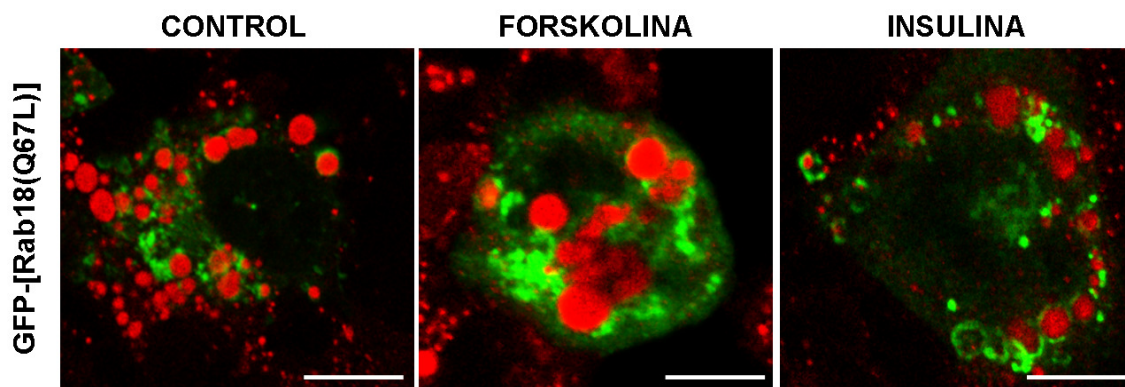


Fig.53. Localización intracelular de GFP-Rab18(Q67L). Las células se electroporaron con el vector de expresión GFP-Rab18(Q67L) (en verde) a día 6 de diferenciación. Tras 48 h de cultivo, las células se trataron con isoproterenol 10 μ M e insulina 100 nM durante 1 h. A continuación, las células se fijaron y los lípidos intracelulares se tiñeron con Oil Red O (en rojo) y se visualizaron mediante microscopía confocal. Barra de escala, 5 μ m.

4.3.6. Contribución de Rab18 en los procesos de lipólisis y lipogénesis.

El conjunto de nuestros resultados, así como los de otros autores (Martin *et al.*, 2005) sugieren que Rab18 podría participar en el control del metabolismo lipídico en adipocitos. Por ello, a continuación nos propusimos investigar la función de Rab18 en relación a la actividad lipolítica y lipogénica en adipocitos 3T3-L1.

En concreto, evaluamos la participación de Rab18 en la actividad lipolítica en condiciones de sobreexpresión o silenciamiento de Rab18, cuantificando la concentración de glicerol libre liberado al medio tras el tratamiento de las células con el agente lipolítico forskolina. Como se muestra en la Figura 54A, la sobreexpresión de GFP-Rab18 provocó un aumento del 44% en la liberación de glicerol al medio de cultivo en condiciones basales, imitando el efecto de la forskolina en células *mock* (33% superior al observado en condiciones basales). Además, bajo condiciones de sobreexpresión de Rab18, la forskolina fue incapaz de aumentar los niveles extracelulares de glicerol por encima de los valores alcanzados por el mismo grupo experimental en ausencia de forskolina, lo que sugiere que la actividad lipolítica en células que sobreexpresan la GTPasa se encuentra al máximo de su capacidad. De manera similar, el uso de una versión mutada de Rab18 incapaz de hidrolizar GTP y,

por tanto, constitutivamente activo Rab18(Q67L), también provocó un incremento significativo de la actividad lipolítica basal en adipocitos 3T3-L1 (Figura 54A).

Por otra parte, también llevamos a cabo experimentos de silenciamiento, para lo cual se optimizó previamente tanto la concentración de siRNA como el tiempo necesario para obtener una reducción de la proteína de Rab18. Así, utilizando 2 nmoles de una secuencia comercial específica de siRNA para Rab18 se redujo aproximadamente un 60% los niveles de ARNm de Rab18 y un descenso del 70% en los de proteína tras 72 h (inserto en las figuras 54B y 55B). Como control, se utilizó la misma concentración de una secuencia de siRNA comercial considerada como control negativo. En estas condiciones, la liberación de glicerol no resultó alterada en células transfectadas con un siRNA control, mientras que en las células transfectadas con el siRNA específico para Rab18 se inhibió la respuesta estimuladora de la forskolina. (Figura 54B).

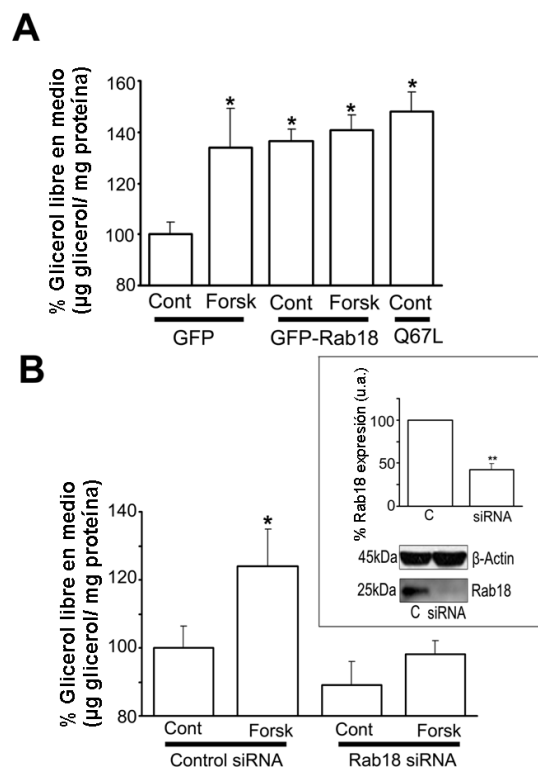


Fig.54. Efecto de la sobreexpresión o silenciamiento de Rab18 en la actividad lipolítica celular en respuesta a forskolina. La liberación de glicerol inducida por forskolina se evaluó en células que sobreexpresan GFP-Rab18 y Rab18(Q67L) (A) o en células silenciadas para Rab18 (B). Como se muestra en la gráfica, la sobreexpresión de Rab18 indujo un aumento en la actividad

lipolítica celular en condiciones basales y bloqueó el efecto estimulador de la forskolina. En el inserto de la figura B se muestra la cuantificación del contenido de ARNm de Rab18 en células en las que Rab18 estaba silenciada y un western blot representativo, observándose en ambos casos una marcada reducción del contenido intracelular tanto de ARNm como de proteína tras 72 h de silenciamiento. Dicha disminución no provocó variaciones en la liberación del glicerol en condiciones basales pero inhibió la lipólisis inducida por forskolina. Como control, se utilizaron células electroporadas con GFP sólo o con un siRNA control negativo en los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento, respectivamente. Los datos representan la media \pm SEM, de al menos, 3 experimentos. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. células control.

Para estudiar la posible participación de Rab18 en la actividad lipogénica de adipocitos 3T3-L1, se llevaron a cabo experimentos de sobreexpresión y silenciamiento similares a los descritos en el caso anterior, evaluándose el contenido intracelular de triglicéridos en ausencia o presencia de insulina. Como muestra la Figura 55A, la sobreexpresión de Rab18 provocó un incremento del 38% en la actividad lipogénica basal. No obstante, el tratamiento con insulina no fue capaz de aumentar los niveles intracelulares de triglicéridos acumulados en los adipocitos 3T3-L1 por encima de los alcanzados por el mismo grupo experimental en condiciones basales. En este sentido, el uso del mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L) también provocó un efecto estimulador sobre la lipogénesis basal similar al inducido por la insulina en células transfectadas con el control GFP. Por otra parte, el silenciamiento de Rab18 no indujo ningún efecto sobre los niveles de triglicéridos intracelulares acumulados, pero bloqueó el efecto estimulador de la insulina (Figura 55B).

Estos resultados sugieren que Rab18 participa en el control tanto de lipólisis como de lipogénesis en adipocitos 3T3-L1.

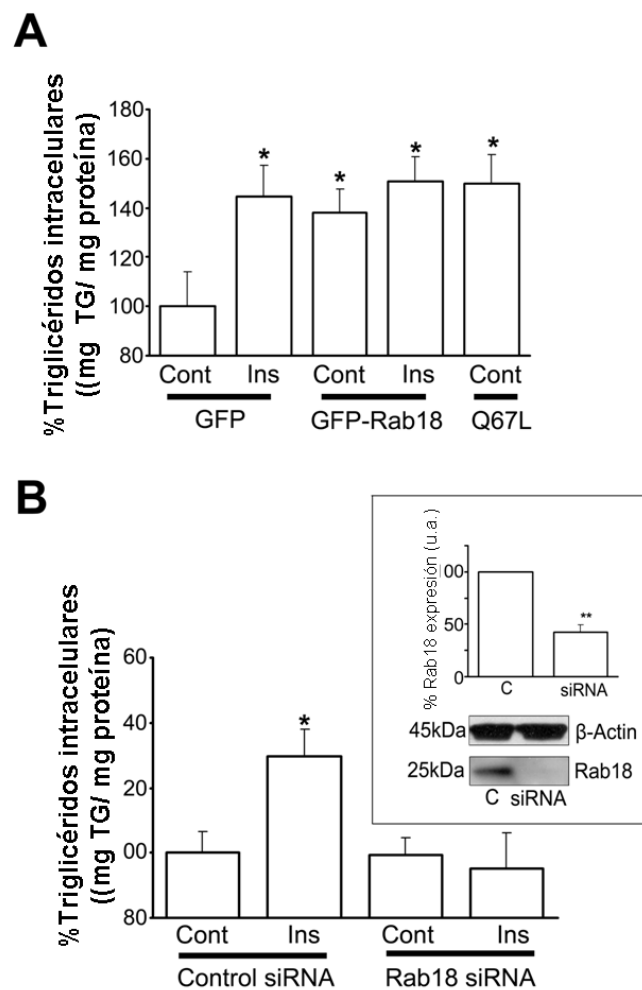


Fig.55. Efecto de la sobreexpresión o silenciamiento de Rab18 en la actividad lipogénica celular en respuesta a insulina. El contenido intracelular de triglicéridos se evaluó en células que sobreexpresan GFP-Rab18 y Rab18(Q67L) (A) o en células silenciadas para Rab18 (B). Como se muestra en la gráfica, la sobreexpresión de Rab18 indujo un aumento en la actividad lipolítica celular en condiciones basales y bloqueó el efecto estimulador de la insulina. En el inserto de la figura B se muestra la cuantificación del contenido de ARNm de Rab18 en células en las que Rab18 estaba silenciada y un western blot representativo, observándose en ambos casos una marcada reducción del contenido intracelular tanto de ARNm como de proteína, respectivamente, tras 72 h de silenciamiento. Dicha disminución no provocó variaciones en el contenido de triglicéridos intracelulares en condiciones basales pero inhibió la lipogénesis inducida por insulina. Como control, se utilizaron células electroporadas con GFP sólo o con un siRNA control negativo en los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento, respectivamente. Los datos representan la media \pm SEM, de al menos, 3 experimentos por condición. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. células control.

5. DISCUSIÓN

Numerosos estudios se han centrado en el estudio de la regulación endocrina y metabólica a la que está sujeto el tejido adiposo. No obstante, los mecanismos intracelulares que subyacen en la regulación de la acumulación de triglicéridos, así como su hidrólisis y movilización (factores por otro lado críticos en la regulación de la homeostasis lipídica) han sido relativamente poco explorados. En el presente trabajo hemos llevado a cabo un estudio tanto *in vivo*, en tejido adiposo procedente de modelos animales y humanos, así como *in vitro*, en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, con el fin de elucidar las características celulares, moleculares y funcionales de Rab18, una proteína perteneciente a la familia de proteínas Rab GTPasas de bajo peso molecular que forma parte de la cubierta de las gotas lipídicas (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005).

5.1. Rab18 en modelos animales.

Los estudios realizados hasta el momento sobre Rab18 se han llevado a cabo exclusivamente en líneas celulares, adipocitarias (3T3-L1) o no adipocitarias (Brasaemle *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). En el presente trabajo, nos planteamos abordar el análisis de esta GTPasa en modelos fisiológicos analizando, en primer lugar, su distribución en adipocitos primarios aislados de tejido adiposo visceral de rata mediante inmunocitoquímica. Dicho análisis nos permitió observar que Rab18 se localiza en la superficie de la gota lipídica de gran tamaño característica de este tipo celular, formando un halo. Además, Rab18 también rodea las pequeñas gotas situadas entre ésta y la superficie celular de los adipocitos de ratas adultas. En esta especie, la expresión de Rab18 no pudo ser detectada en tejido adiposo visceral de animales de 15 días, machos o hembras, sugiriendo que esta proteína no es necesaria para la expansión inicial del tejido que ocurre en las etapas tempranas del desarrollo postnatal. Sin embargo, el contenido de ARNm de Rab18 aumentó de manera significativa durante la pubertad en ambos sexos, alcanzando un nivel máximo a los 45 días tras el nacimiento y manteniéndose elevado en estadios posteriores. Este aumento de la expresión de Rab18 en relación con la edad coincide temporalmente con el periodo de hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo de

rata, que tiene lugar entre P40 y P80, y que está caracterizado por un incremento de la actividad lipogénica del tejido y una disminución de la lipólisis (HerrerayAmusquivar, 2000). Estas observaciones sugieren que Rab18 podría participar en los cambios de actividad metabólica que tienen lugar en los adipocitos durante dicho periodo y, en particular, en lipogénesis.

En consonancia con los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica, el análisis por western blot confirmó la presencia de una banda inmunorreactiva para Rab18 en extractos procedentes de adipocitos maduros, tanto de tejido adiposo visceral como subcutáneo. Adicionalmente, estos análisis revelaron que, además de en esta fracción, Rab18 también está presente en la fracción de estroma vascular del tejido adiposo, presumiblemente en los preadipocitos incluidos en la misma, lo que sugiere que, además de participar en el control del metabolismo lipídico en células maduras, esta proteína podría jugar un papel en el proceso de diferenciación.

Por otra parte, el uso de modelos animales sometidos a diferentes condiciones metabólicas nos permitió profundizar en el conocimiento de la regulación a la que está sometida la expresión de Rab18 en tejido adiposo, visceral y subcutáneo. Nuestros resultados en ratones mostraron que el ayuno prolongado produce un fuerte incremento en los niveles de ARNm de Rab18 dependiente del tiempo, lo que apoya la participación de esta proteína en la respuesta adaptativa que tiene lugar en el tejido adiposo durante periodos de restricción calórica para mantener la homeostasis lipídica del organismo. Este aumento en la expresión de Rab18 también se mantiene en condiciones de restricción calórica cuando se parte de una situación de obesidad, ya que los ratones obesos *New Zealand* sometidos a ayuno también muestran un incremento en la cantidad de transcritos de Rab18 en el tejido adiposo, si bien este aumento es menor que en animales delgados.

En conjunto, estos datos permiten sugerir una relación entre la función de Rab18 y la activación de la lipólisis característica del estado de ayuno. En este sentido, está claramente establecido que, en tales condiciones, la actividad lipolítica de los adipocitos aumenta debido principalmente a la acción de las catecolaminas sobre el

tejido adiposo (Brasaemle, 2010). Esta ruta es iniciada por la activación de receptores β -adrenérgicos que provocan el incremento de la actividad de la adenilato ciclasa (AC), la elevación de los niveles intracelulares de AMPc y, con ello, la activación de la PKA. Posteriormente, PKA fosforila la proteína de la superficie de las gotas lipídicas perilipina A en residuos de serina de su extremo amino terminal, lo que permite e la accesibilidad de la lipasa sensible a hormonas (HSL) al contenido de las gotas lipídicas (Bezaire y Langin, 2009; Brasaemle, 2010). Al mismo tiempo PKA también fosforila a HSL, lo que induce la translocación de esta proteína hacia la superficie de las gotas lipídicas y la hidrólisis de los triglicéridos acumulados en su interior (Brasaemle, 2010). Por otra parte, el ayuno también induce un aumento de la actividad lipolítica a través de otras rutas de señalización independientes de AMPc menos conocidas. Estas rutas pueden actuar de forma independiente o en coordinación con la señalización llevada a cabo por el AMPc con el fin de lograr satisfacer las necesidades energéticas del organismo bajo condiciones de restricción calórica. Entre ellas se encuentran la activación de PLC/PKC mediada por pancreastatina, la ruta de los ésteres de forbol/PKC/MAPK, la liberación de calcio intracelular dependiente de PLC/CAMK, el péptido natriurético atrial y el óxido nítrico (Carmen y Victor, 2006). Se ha descrito que, al menos, algunas de estas señales pro-lipolíticas independientes de AMPc también estimulan la lipólisis mediante fosforilación de HSL y de perilipina A, como ocurre en la ruta de señalización dependiente de AMPc (Fricke *et al.*, 2004; Sengenés *et al.*, 2003). En este escenario, y dado la complejidad del sistema, cabría pensar que Rab18 puede representar un nuevo componente de la maquinaria multifactorial responsable del mantenimiento de un balance estricto en la homeostasis lipídica. Aún no conocemos la función exacta de Rab18 en adipocitos bajo condiciones de ayuno, pero teniendo en cuenta que Rab18 se asocia a la superficie de las gotas lipídicas tras la estimulación de la lipólisis por el análogo β -adrenérgico isoproterenol, como se ha mostrado previamente (Martin *et al.*, 2005) y se ha confirmado en este estudio, y que la expresión de Rab18 aumenta en condiciones de una demanda lipolítica elevada (como ocurre en ayuno prolongado), esta GTPasa podría participar bien facilitando la accesibilidad de HSL hacia las gotas lipídicas, o favoreciendo la salida de los productos

formados a partir de la hidrólisis de los triglicéridos (glicerol y ácidos grasos) de las gotas lipídicas.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que los niveles de ARNm de Rab18 en tejido adiposo visceral y subcutáneo se encuentran aumentados en condiciones de obesidad genética inducida por hiperfagia debida a la deficiencia de leptina (ratones *ob/ob*) o por alteraciones poligénicas (ratones *New Zealand*), así como en obesidad inducida por una dieta rica en grasa. Esto sugiere que Rab18 también podría contribuir en los cambios que ocurren en la actividad metabólica del tejido adiposo en condiciones de exceso de energía, como sucede en obesidad. En obesidad, el tejido adiposo aumenta la síntesis de triglicéridos (lipogénesis), lo que conlleva la acumulación de éstos en el interior de gotas lipídicas. En esta condición de exceso energético existen múltiples variables que afectan a la homeostasis lipídica. Cuando la adiposidad incrementa, también se produce una mayor infiltración de macrófagos en el tejido adiposo que producen y secretan factores pro-inflamatorios (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Un grupo de estas citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-6) inhiben los procesos de lipogénesis inducidos por insulina y además, promueven un aumento de la lipólisis mediante la reducción del contenido celular de la proteína perilipina A, lo que finalmente facilita la accesibilidad de la HSL a la superficie de las gotas y el incremento en la liberación de ácidos grasos y glicerol al torrente sanguíneo (Yang *et al.*, 2008b; Zhang *et al.*, 2002). Recientemente, se ha demostrado que estos factores también son producidos y secretados por los adipocitos, pudiendo actuar como reguladores paracrinós/autocrinós de la función del adipocito (Ahima, 2005; Ronti *et al.*, 2006). Así pues, a raíz de nuestros resultados podemos sugerir que en obesidad, al igual que en ayuno, el incremento de la expresión de Rab18 puede relacionarse con la asociación de la proteína HSL a la superficie de las gotas lipídicas y/o el transporte de los productos derivados de la lipólisis de triglicéridos hacia el exterior de las gotas lipídicas.

Estos estudios también desvelaron diferencias en la regulación de la expresión de Rab18 entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo. Estas diferencias fueron mucho

más marcadas en los experimentos de ayuno, donde el tejido adiposo visceral mostró un fuerte incremento de la expresión de Rab18 a lo largo del periodo de restricción calórica analizado, mientras que el tejido adiposo subcutáneo exhibió un fuerte aumento a las 12 h de ayuno y, posteriormente, los niveles de ARNm de Rab18 disminuyeron hasta alcanzar los valores de muestras obtenidas a partir de los animales control. Sin embargo, el incremento de la expresión de Rab18 observado en condiciones de obesidad fue similar en tejido adiposo visceral y subcutáneo, tanto en ratones genéticamente obesos como en ratones con obesidad inducida por dieta. En conjunto, estos resultados sugieren que ambos tipos de tejido adiposo son heterogéneos en cuanto a los cambios funcionales que se producen en periodos de deficiencia energética. De hecho, existen evidencias que demuestran que ambos depósitos son diferentes en relación, entre otras, a la producción de adipoquinas, actividad metabólica, capacidad proliferativa y tamaño de adipocitos, así como a su diferente contribución en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el metabolismo lipídico (Niesler *et al.*, 1998; Van Harmelen *et al.*, 2004; Wajchenberg *et al.*, 2002).

Además de la modificación del nivel de ARNm de Rab18 en el tejido adiposo inducido por cambios en el estado metabólico/energético del organismo, la eliminación de la hipófisis también alteró la expresión de la GTPasa en este tejido. Específicamente, los niveles de ARNm de Rab18 aumentaron de forma significativa en ratas hipofisectomizadas lo que sugiere que las hormonas liberadas por la hipófisis y/o las hormonas liberadas por las glándulas diana de la misma actúan como reguladores de la expresión de Rab18 en el tejido adiposo. Sin embargo, ningún procedimiento experimental llevado a cabo para bloquear los diferentes ejes hipofisarios alteró el patrón de expresión de Rab18 en el tejido adiposo, excepto la inducción de hipotiroidismo, que, de manera similar a lo observado en animales hipofisectomizados, provocó un aumento significativo del contenido de ARNm de Rab18. Por tanto, se podría proponer que el efecto provocado por la hipofisectomía en la expresión de Rab18 en el tejido adiposo puede estar mediado por un descenso de los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas como consecuencia de la carencia de la hormona

TSH. De hecho, la reducción o ausencia de la señalización de las hormonas tiroideas, como ocurre en ratones que presentan mutaciones “null” en los receptores de dichas hormonas, provocan importantes desórdenes metabólicos que directamente afectan a la homeostasis lipídica del tejido adiposo (Liu *et al.*, 2003; Sjogren *et al.*, 2007; Ying *et al.*, 2007). No obstante, no podemos excluir la posibilidad que otras hormonas hipofisarias que afectan directamente al metabolismo lipídico del adipocito, pero que no han sido incluidas en este estudio, como la hormona PRL (Brandebourg *et al.*, 2007), pudieran ser también responsables, al menos en parte, del incremento de la expresión de Rab18 en tejido adiposo inducido por la hipofisectomía.

En resumen, el conjunto de estos resultados muestra que la expresión de Rab18 siempre aumenta en tejido adiposo visceral y subcutáneo de roedores en respuesta a condiciones metabólicas extremas. Así, la expresión de Rab18 aumenta i) en estados de actividad lipogénica elevada y actividad lipolítica reducida, como los que tienen lugar durante el desarrollo postnatal, ii) en estados de actividad lipolítica incrementada debido a la estimulación por catecolaminas, como ocurre en el ayuno prolongado, y iii) en estados donde ambas actividades se encuentran aumentadas, como en condiciones de obesidad, en las que se estimula tanto lipogénesis como lipólisis. En definitiva, estos datos apoyan la participación de Rab18 en la regulación del metabolismo lipídico en adipocitos en diferentes condiciones (pato) fisiológicas, lo que se puede llevar a cabo mediante el establecimiento de un equilibrio entre las actividades lipolítica y lipogénica del tejido adiposo.

5.2. Rab18 en adipocitos 3T3-L1.

Para analizar las bases celulares y moleculares que subyacen la función de Rab18 en adipocitos, en este estudio hemos utilizado la línea celular 3T3-L1. Así, mediante diferentes aproximaciones metodológicas hemos demostrado que la expresión de Rab18 aumenta a lo largo de la diferenciación de estas células a adipocitos, así como tras la estimulación celular de la lipólisis (tratamiento con isoproterenol) y la lipogénesis (tratamiento con insulina). También demostramos que

dichos tratamientos provocan un incremento en la localización de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas así como un aumento en la colocalización de Rab18 con otras proteínas propias de la superficie de las gotas lipídicas (perilipina A) o del retículo endoplasmático (calnexina y PDI). Por último, hemos podido observar que variaciones en el nivel de expresión de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 (sobreexpresión y silenciamiento) causa alteraciones en el tamaño de las gotas lipídicas así como en la actividad lipolítica y lipogénica basal y estimulada.

En los últimos años, la diferenciación de las células precursoras de adipocitos a adipocitos maduros ha adquirido especial importancia debido a que este proceso influye de manera importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas humanas, como la obesidad (Ntambi y Young-Cheul, 2000). No obstante, llevar a cabo este estudio *in vivo* es complicado, ya que en el tejido adiposo sólo existe una pequeña proporción de células que presentan la capacidad de diferenciación a adipocitos, los preadipocitos, mientras que el resto de tipos celulares que lo componen, adipocitos maduros, células del estroma vascular, fibroblastos y células nerviosas, no poseen dicha capacidad de diferenciación. Así pues, la mayoría de estudios encaminados a investigar este proceso se han realizado hasta el momento en modelos de adipogénesis *in vitro* consistentes en líneas celulares con capacidad de diferenciación a adipocitos en respuesta a un cocktail hormonal (Ntambi y Young-Cheul, 2000). La línea celular 3T3-L1 representa una de las líneas celulares más frecuentemente utilizadas para estudiar este proceso, ya que estas células simulan la diferenciación a adipocitos primarios tanto a nivel ultraestructural como funcional. La inducción de la diferenciación de las células 3T3-L1 se inicia en respuesta a una mezcla de insulina, glucocorticoides (dexametasona), un agente elevador de los niveles de AMPc (IBMX) y los factores de crecimiento incluidos en el suero. A continuación, las células atraviesan diferentes etapas, que incluyen i) replicación del ADN (día 1), ii) inhibición de crecimiento (día 2), iii) expresión de genes de diferenciación tardíos (día 3), que conlleva el compromiso de diferenciación, y, finalmente, iv) formación de gotas lipídicas (días 5-7) (Ntambi y Young-Cheul, 2000; Student *et al.*, 1980). A nivel proteico, durante el proceso de diferenciación se expresan factores de transcripción como

C/EBP α y PPAR γ (día 1), que serán los responsables la activación de la expresión de, entre otras, las proteínas aP2, adiponectina, ácido graso sintasa, leptina, GLUT4, HSL y perilipina (día 3), que determinan la adquisición y el mantenimiento del fenotipo característico del adipocito (Cartwright *et al.*, 2007). En el presente estudio, observamos que la expresión y contenido de proteína de Rab18 en células 3T3-L1 muestran un pico a día 3 de diferenciación, manteniéndose los niveles de ARNm y proteína elevados en el resto de días analizados. Estos resultados sugieren que Rab18 podría ser un marcador tardío de diferenciación que, junto con las otras proteínas expresadas durante este estadio, determinen la adquisición del fenotipo adipocitario. También encontramos que los niveles de ARNm y proteína de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 aumentan en respuesta a isoproterenol e insulina. Dado que para que se lleve a cabo la diferenciación celular, las células 3T3-L1 requieren la presencia de insulina y de niveles de AMPc elevados (similar a los evocados por isoproterenol), sería razonable proponer que el incremento en la producción de Rab18 observado durante los estadios tempranos del proceso de diferenciación puede ser el resultado de la señalización mediada por insulina y AMPc. Desafortunadamente, nuestros resultados no nos permiten discernir si el incremento de Rab18 ocurre cronológicamente antes o después del compromiso adquirido por las células para su diferenciación a adipocitos, pero resulta atractivo suponer que Rab18 pueda jugar un papel relevante en la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos y, por tanto, pueda representar un nuevo componente de la maquinaria intracelular responsable del aumento de la adipogénesis necesaria para la adquisición del fenotipo adipocitario. Esta idea está sustentada por los datos obtenidos durante el desarrollo postnatal en ratas, que muestran un aumento en la expresión de Rab18 durante la fase de mayor actividad adipogénica del tejido adiposo, la fase de hipertrofia y por los estudios realizados sobre otras proteínas Rab, que demuestran su papel crítico en la iniciación del proceso de diferenciación en diversos tipos celulares. Por ejemplo, Rab3A estimula la diferenciación de oligodendrocitos (Anitei *et al.*, 2009), Rab23 regula la diferenciación de células progenitoras de condrocitos (Yang *et al.*, 2008a) y Rab11 es necesario para la diferenciación de neuronas embrionarias (Bhuin y Roy, 2009).

Por otra parte, en este trabajo también hemos descubierto que tanto agentes lipolíticos (isoproterenol) como lipogénicos (insulina) inducen la producción de Rab18 en adipocitos 3T3-L1, pero que otros inductores de lipólisis y lipogénesis, como GH, PACAP, dexametasona o roziglitazona, no alteran los niveles de Rab18 en estas células. Esto indica que Rab18 es una diana específica de la ruta de señalización intracelular mediada por receptores β -adrenérgicos y por los receptores de la insulina.

Además, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con isoproterenol o insulina provoca una mayor asociación de Rab18 con la superficie de las gotas lipídicas. Estudios previos en adipocitos 3T3-L1 y en otras líneas celulares no adipocitarias que forman gotas lipídicas (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005), mostraron que tanto el tratamiento con isoproterenol (Martin *et al.*, 2005) como la sobreexpresión de Rab18 (Ozeki *et al.*, 2005) inducen el reclutamiento de la GTPasa hacia la superficie de estos orgánulos intracelulares. En el presente trabajo, confirmamos que el tratamiento con isoproterenol incrementa la cantidad de inmunoreactividad de Rab18 alrededor de las gotas lipídicas. Además, hemos ampliado los estudios previos demostrando que este efecto es dependiente de la activación de la proteína AC, que aumenta los niveles de AMPc, así como de la actividad de PKA, que fosforila la enzima HSL y la perilipina A (Carmen y Victor, 2006). Como se ha mencionado anteriormente, AC y PKA son dos componentes clave en el aumento de la actividad lipolítica mediada por los receptores β -adrenérgicos (Carmen y Victor, 2006), por lo que nuestros resultados indican que la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducida por el isoproterenol depende directamente de la ruta de señalización canónica de estos receptores. Además, el análisis de la localización intracelular de Rab18 mediante fraccionamiento subcelular confirmó los resultados anteriores, ya que el tratamiento con isoproterenol aumenta la inmunoreactividad de Rab18 asociada a la fracción enriquecida en gotas lipídicas. No obstante, esta aproximación metodológica también mostró que el tratamiento con isoproterenol también incrementa la asociación de Rab18 con la fracción enriquecida en membranas celulares, donde, entre otras, precipitan las membranas del retículo endoplasmático. Estos resultados, junto con los obtenidos en otros estudios que demuestran que Rab18 se une a la membrana de diferentes orgánulos intracelulares

como retículo endoplasmático, endosomas, vesículas de transporte entre Golgi-RE y gránulos de secreción (Dejgaard *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2007; Lutcke *et al.*, 1994; Ozeki *et al.*, 2005; Vazquez-Martinez *et al.*, 2007), sugieren que en adipocitos esta GTPasa puede desempeñar funciones relacionadas con la reorganización de otros orgánulos intracelulares diferentes a las gotas lipídicas.

Asimismo, en este trabajo hemos demostrado que el tratamiento con insulina también provoca la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas, efecto incluso más potente que el inducido por el isoproterenol. En este caso, la asociación de Rab18 a la superficie de gotas lipídicas depende de la activación de la proteína fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K), principal mediador de las acciones metabólicas de la insulina en adipocitos (Kanzaki, 2006). Estos resultados indican que Rab18 también actúa como efector *downstream* de la proteína PI3K. Así pues, estos datos muestran por primera vez la translocación de Rab18 hacia la superficie de las gotas lipídicas inducida por insulina y, junto con los resultados de isoproterenol, indican que esta GTPasa es un punto regulador común de los procesos de lipólisis y lipogénesis.

En estudios previos se ha propuesto que el retículo endoplasmático juega un papel importante en la homeostasis lipídica ya que actúa como compartimento de tránsito de productos del metabolismo lipídico (Zehmer *et al.*, 2009b). Así, durante la lipólisis los productos derivados de la hidrólisis de triglicéridos (glicerol y ácidos grasos) son transportados hasta el lumen del retículo endoplasmático como resultado del acercamiento y contacto directo de la monocapa fosfolípida de las gotas lipídicas y la membrana del retículo endoplasmático, lo que provoca, el vaciado de los lípidos acumulados en las gotas lipídicas y, como consecuencia, su regresión (Zehmer *et al.*, 2009b). Por otra parte, cuando el mantenimiento de la homeostasis lipídica exige la acumulación de ácidos grasos mediante lipogénesis *de novo*, los ácidos grasos son recogidos por proteínas de unión a ácidos grasos citosólicos y son transportados al lumen del retículo endoplasmático para su posterior procesamiento hacia triglicéridos (Vazquez-Vela, 2008). Los ésteres de lípidos son posteriormente cargados en las gotas

lipídicas por un proceso que, aunque aún no se conoce muy bien, parece depender de la interacción de la superficie de gotas lipídicas con zonas especializadas del retículo endoplasmático (Fujimoto *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009; Walther y Farese, 2009). En este sentido, nuestros resultados muestran un aumento en el índice de colocalización de Rab18 y marcadores del retículo endoplasmático en respuesta a agentes lipolíticos (isoproterenol) y lipogénicos (insulina) que, junto con la función general asignada a las proteínas GTPasas Rab en el control del tráfico intracelular de membranas (Zerial y McBride, 2001), sugieren que Rab18 puede mediar el acercamiento de la superficie de las gotas con la membrana del retículo endoplasmático, facilitando así la carga y descarga de las gotas lipídicas de acuerdo con las necesidades metabólicas del adipocito. En este escenario, no podemos descartar la posibilidad de que el incremento de colocalización entre Rab18 y los marcadores del retículo inducido por isoproterenol e insulina se deba a la asociación directa de esta GTPasa con las membranas de este compartimento, sobre todo tras el tratamiento con isoproterenol, ya que los resultados obtenidos a partir de fraccionamientos subcelulares muestran que este agente lipolítico induce la asociación de Rab18 con compartimentos de membrana que incluyen las derivadas del retículo endoplasmático. Sin embargo, la insulina no provoca tal efecto, por lo que el incremento de la colocalización de Rab18 y los marcadores del retículo observado tras este tratamiento refleja, de hecho, el acercamiento de la superficie de las gotas lipídicas hacia zonas específicas del retículo endoplasmático. Esta idea también está apoyada por el aumento de colocalización inducido por isoproterenol e insulina entre Rab18 y perilipina A, proteína que constitutivamente está asociada a la superficie de las gotas lipídicas independientemente del estado del metabolismo lipídico del adipocito (Wolins *et al.*, 2006a).

Nuestros resultados funcionales también sustentan la hipótesis de la participación de Rab18 en el metabolismo lipídico, lo que podría derivarse de la asociación de las gotas lipídicas que presentan Rab18 en su superficie y las membranas del retículo endoplasmático. En este trabajo, hemos demostrado que en adipocitos que sobreexpresan GFP-Rab18 el tamaño medio de las gotas lipídicas es mayor que en

células transfectadas con GFP, tanto en condiciones basales como tras la administración de isoproterenol e insulina, lo que sugiere que esta proteína promueve el almacenamiento de los lípidos en las gotas lipídicas y/o los procesos de fusión de las mismas. Este efecto fue especialmente dramático en presencia de insulina, lo que puede ser resultado del efecto combinado de la insulina sobre las gotas lipídicas y el aumento del tamaño de las gotas lipídicas inducido por la sobreexpresión de Rab18. De manera sorprendente, la sobreexpresión de Rab18 indujo aumentos en lipólisis y lipogénesis basales e impidió que las células aumentaran la actividad lipolítica o lipogénica en respuesta a forskolina o insulina, respectivamente. Por otra parte, el silenciamiento de Rab18 no afectó a los niveles basales de lipólisis o lipogénesis, pero bloqueó los efectos estimuladores de la forskolina y de la insulina. En vista de estos datos, cabe proponer que Rab18 o el acercamiento de las gotas lipídicas a las membranas del retículo endoplasmático mediado por Rab18 debe afectar de alguna manera la maquinaria bioquímica responsable de la hidrólisis y la síntesis de triglicéridos. En general, las proteínas Rab cumplen sus respectivas funciones celulares mediante la activación de efectores *downstream* que son en realidad los que afectan la maquinaria molecular de un proceso determinado (Grosshans *et al.*, 2006). Por ejemplo, Rab27A, que está presente en los gránulos de secreción de una gran variedad de células secretoras, participa en el control del tráfico de estos orgánulos a través de su interacción con proteínas de interacción con Rab27A que son dependientes del tipo celular o del tejido en cuestión (Fukuda, 2006). Hasta la fecha, se han identificado un total de 11 efectores de Rab27A diferentes en humanos y ratones, cada uno de los cuales produce un efecto distinto en el proceso de anclaje/fusión de los gránulos de secreción. En particular, cuando Rab27A recluta la proteína Slp4-a, las células disminuyen dramáticamente su tasa de secreción hormonal (Tsuboi y Fukuda, 2006), mientras que cuando Rab27A se une a rabphilin, la actividad secretora aumenta considerablemente (Tsuboi y Fukuda, 2005).

Así pues, podría ocurrir que, dependiendo de la señal extracelular que alcance los adipocitos (i.e. catecolaminas o insulina), Rab18 podría reclutar y activar diferentes efectores que iniciaran bien las reacciones bioquímicas que conducen a la hidrólisis de triglicéridos o a su síntesis. De esta manera, tras la estimulación de la lipólisis inducida

por catecolaminas, Rab18 podría reclutar efectores específicos que promuevan la actividad o accesibilidad de las lipasas al contenido de las gotas lipídicas, facilitando así la hidrólisis de triglicéridos. Por otro lado, tras la estimulación de la lipogénesis inducida por insulina, Rab18 se asociaría a efectores específicos para la activación de acil-transferasas, lo que conllevaría un aumento de la síntesis de triglicéridos. Este punto de vista está de acuerdo con dos observaciones importantes acerca de las gotas lipídicas: i) en su superficie se ha descubierto la presencia de enzimas anabólicas y catabólicas y ii) se ha demostrado la existencia de subpoblaciones de gotas lipídicas diferentes que, dependiendo de la composición proteica de su cubierta, están especializadas en síntesis o hidrólisis de triglicéridos (Ducharme y Bickel, 2008) Desgraciadamente, aún se desconocen los efectores específicos que interaccionan con Rab18 en adipocitos. En estos momentos, nuestro laboratorio está llevando a cabo experimentos de *Yeast-Two-Hybrid* para identificar y caracterizar las proteínas que interaccionan con esta GTPasa en adipocitos en condiciones basales y tras la estimulación de la lipólisis o la lipogénesis, lo que ayudaría a comprender mejor la función de Rab18 en el tejido adiposo y su relación con el metabolismo lipídico.

En resumen, nuestros datos apoyan la idea de que Rab18 actúa como un regulador intracelular del estado del metabolismo lipídico de los adipocitos y, por tanto, esta GTPasa representa un factor novedoso a tener muy en cuenta a la hora de investigar las consecuencias patológicas de desequilibrios en la homeostasis lipídica del organismo, como las que conlleva la obesidad.

5.3. Rab18 en humanos.

Para estudiar la contribución de Rab18 en patologías del metabolismo lipídico en humanos, iniciamos el análisis de la expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes con distintas condiciones metabólicas: pacientes delgados, obesos normoglucémicos, obesos con resistencia a insulina y obesos con diabetes mellitus de tipo II. En primer lugar, comprobamos que la distribución intracelular de la GTPasa en adipocitos maduros de pacientes delgados es similar que en adipocitos murinos, es decir, Rab18 se localiza alrededor de la gota lipídica de mayor tamaño así

como de las de menor tamaño. Estos resultados muestran por primera vez la localización subcelular de Rab18 en adipocitos humanos, lo que sugiere que, al igual que en ratas y ratones, esta GTPasa también podría participar en la regulación del metabolismo lipídico en humanos. En concreto, y al contrario que lo observado en modelos de obesidad murinos, la expresión de Rab18 en tejido adiposo visceral en humanos se encuentra disminuida en condiciones de obesidad tanto en hombres como en mujeres, aunque sólo en este último grupo las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas. En cambio, en tejido adiposo subcutáneo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los individuos delgados. Estos resultados, opuestos a los obtenidos en modelos murinos, podrían surgir de diferencias inter-especies, como se ha demostrado que ocurre con otros genes expresados en el tejido adiposo (Gesta *et al.*, 2006). Por ejemplo, la leptina presenta un mayor nivel de expresión en tejido subcutáneo de humano que en tejido visceral, mientras que en ratones es mayor en tejido visceral; el receptor de α 2-adrenérgicos se expresa en el tejido adiposo humano pero no en el de ratón; los receptores de β 3-adrenérgicos son ampliamente expresados en tejido adiposo de ratón, mientras que en humanos su expresión es muy baja, etc (Gesta *et al.*, 2006). En cuanto a la expresión de Rab18 en condiciones de obesidad, las diferencias inter-especies podrían ser responsables de la expresión diferencial de proteínas efectoras de la GTPasa. En estudios futuros aislaremos el interactoma de Rab18 en el tejido adiposo de humanos y lo compararemos con el iniciado ya usando el tejido adiposo de ratones, para caracterizar y comparar las proteínas de interacción con la GTPasa en ambas especies.

Por otra parte, el comportamiento diferente de los depósitos de tejido adiposo visceral y subcutáneo en humanos en cuanto a las variaciones en la expresión de Rab18 puede explicarse sobre base de sus propiedades bioquímicas específicas (Montague *et al.*, 1998). Estas diferencias entre tejido adiposo visceral y subcutáneo conllevan que dichos tejidos estén implicados de forma desigual en el desarrollo de enfermedades como diabetes, aterosclerosis, hipertensión y síndrome metabólico, siendo el tejido adiposo visceral particularmente importante en el desarrollo de dichas enfermedades (Tchkonina *et al.*, 2007). Concretamente, entre los genes que se expresan

diferencialmente en ambos tipos de tejido destacan genes implicados en la lipólisis y metabolismo lipídico y genes implicados en la diferenciación y desarrollo (Tchkonia *et al.*, 2007). Por ejemplo, como se ha mencionado anteriormente las catecolaminas estimulan la actividad lipolítica a través de los receptores β -adrenérgicos. Sin embargo, las catecolaminas también presentan un efecto anti-lipolítico cuando activan los receptores α 2-adrenérgicos. Como hemos mencionado anteriormente, los primeros actúan a través de AC/AMPc/PKA, lo que induce la fosforilación de HSL y con ello la hidrólisis de triglicéridos (Carmen y Victor, 2006). Sin embargo, cuando se estimulan los receptores α 2-adrenérgicos, se inactiva esta ruta de señalización y como consecuencia, la actividad lipolítica celular disminuye. Se ha descrito que la respuesta lipolítica a catecolaminas es muy baja en tejido adiposo subcutáneo en comparación con la observada en tejido adiposo visceral (Arner, 1995; Bays *et al.*, 2008), lo que se ha relacionado con una mayor actividad anti-lipolítica mediada por los receptores α 2-adrenérgicos, un descenso en la respuesta de receptores β -adrenérgicos o un descenso en la expresión o función de la HSL o de las proteínas que interaccionan con dicha enzima, como la perilipina A (Rodríguez *et al.*, 2007). Por otro lado, la insulina disminuye la actividad lipolítica celular, inhibiendo la salida de ácidos grasos al torrente sanguíneo e incrementando el almacenamiento de grasas al esterificarlos y transformarlos en triglicéridos. Esta acción se lleva a cabo gracias de la actividad de la ruta de señalización PI3K/Akt que activa la proteína fosfodiesterasa 3B (PD3B) que, a su vez, cataliza la degradación de AMPc a AMP 5'. Esto conlleva la inactivación de la PKA y la inhibición de la actividad de HSL. El tejido adiposo subcutáneo es más sensible al efecto anti-lipolítico de la insulina que el visceral, encontrándose diferencias entre ambos depósitos tanto a nivel de la expresión del receptor de insulina como al de la ruta de señalización intracelular activada (Rodríguez *et al.*, 2007). Por lo tanto, las diferencias observadas en la variación de la expresión de Rab18 dependiente de la obesidad en los depósitos subcutáneo y visceral en humanos pueden originarse por el hecho de que en obesos el tejido adiposo visceral esté más afectado por los desórdenes metabólicos que ocurren durante la obesidad. Sin embargo, el tejido adiposo subcutáneo parece ser más resistente a dichos cambios metabólicos.

Por otra parte, se observaron diferencias de expresión de Rab18 debidas al sexo, las cuales fueron más marcadas en tejido subcutáneo. Se han encontrado diferencias en la expresión génica en tejido adiposo en hombres y mujeres, muchas de las cuales se deben a una distribución de dicho tejido distinta en hombres y mujeres, acumulándose mayor cantidad de tejido subcutáneo en mujeres y más visceral en hombres (Shi *et al.*, 2009; Tchkonina *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, la expresión de resistina es considerablemente mayor en tejido adiposo de hombres que en mujeres (Klaus y Keijer, 2004), mientras que la de leptina es mayor en mujeres (Shi y Clegg, 2009). Asimismo, los hombres son más sensibles a la acción de la insulina (Shi *et al.*, 2009). Además, también hay una regulación diferencial del metabolismo lipídico en adipocitos mediado por las hormonas sexuales (Shi *et al.*, 2009). Todo ello contribuye a la existencia de diferencias en la expresión de receptores en tejido adiposo de mujeres y hombres así como de efectores y, por tanto, en el procesamiento de rutas de señalización intracelular que contribuyen a que el tejido se comporte de manera distinta (Tchkonina *et al.*, 2007). Así, todo ello puede provocar que se cree un “microambiente” en tejido adiposo que sea el responsable de que el tejido adiposo subcutáneo de hombres y mujeres presenten una expresión diferencial de Rab18.

En resumen, nuestros resultados muestran que, en humanos, la tasa de expresión de Rab18 en el tejido adiposo se modifica en condiciones extremas que alteran la homeostasis lipídica del organismo, por lo que un conocimiento profundo de esta GTPasa en relación con las patologías del metabolismo lipídico en humanos puede ser importante para abrir nuevas vías de intervención terapéutica desde un punto de vista estrictamente celular.

6. CONCLUSIONES

1.- La proteína GTPasa de bajo peso molecular Rab18 se expresa en adipocitos del tejido adiposo de roedores y de humanos, donde presenta una localización subcelular específica en asociación con la superficie de las gotas lipídicas.

2.- El nivel de expresión de Rab18 en el tejido adiposo se modifica en respuesta a cambios en la homeostasis lipídica (obesidad y ayuno), lo que sugiere que esta GTPasa participa en la regulación del metabolismo lipídico en condiciones (pato)-fisiológicas.

3.- El nivel de expresión de Rab18 en el tejido adiposo aumenta durante el desarrollo postnatal de rata y durante la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos, lo que sugiere que esta proteína juega un papel en la adquisición del compromiso de diferenciación adipocitaria.

4.- La expresión de Rab18 en el tejido adiposo está regulado por la hipófisis, presumiblemente a través de la acción directa de la hormona TSH o bien a través de la acción de las hormonas tiroideas sobre dicho tejido.

5.- Estimuladores específicos de la lipólisis (isoproterenol) o lipogénesis (insulina) inducen aumentos en el nivel de expresión y contenido de Rab18 en adipocitos, así como en el grado de asociación de la GTPasa con la superficie de las gotas lipídicas, lo que sugiere que en adipocitos Rab18 es un efector común de las rutas de señalización intracelular mediadas por la activación de los receptores β -adrenérgicos y de la insulina.

6.- La sobreexpresión y el silenciamiento de Rab18 provocan alteraciones importantes en las actividades lipolítica y lipogénica de los adipocitos en condiciones basales y tras la estimulación de éstos con isoproterenol o insulina, lo que sugiere que esta GTPasa puede jugar un papel importante en la reorganización intracelular de las gotas lipídicas necesaria para ajustar la actividad celular de los adipocitos a las demandas energéticas del organismo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams M, M. C., Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK, O'Rahilly S. (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100, 3149-3153.
- Adeghate, E. (2004). An update on the biology and physiology of resistin. *Cell Mol Life Sci* 61, 2485-2496.
- Ahima, R. S. (2000). Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res* 26, 42-56.
- Ahima, R. S. (2005). Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab* 16, 307-313.
- Ahima, R. S. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14, 242S-249S.
- Ahima, R. S., Saper, C. B., Flier, J. S. and Elmquist, J. K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21, 263-307.
- Aivazian, D., Serrano, R. and Pfeffer, S. (2006). TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *The Journal of Cell Biology* 173, 917-926.
- Anitei, M., Cowan, A. E., Pfeiffer, S. E. and Bansal, R. (2009). Role for Rab3a in oligodendrocyte morphological differentiation. *J Neurosci Res* 87, 342-352.
- Anthonsen, M. W., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Degerman, E. and Holm, C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem* 273, 215-221.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 79-83.
- Arner, P. (1995). Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med.* 27, 435-438.
- Arner, P. (2003). The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 14, 137-145.
- Bagdade, J. D., Bierman, E. L. & Porte Jr, D. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 46, 1549-1557.
- Barbe, P., Millet, L., Galitzky, J., Lafontan, M. and Berlan, M. (1996). In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol* 117, 907-913.
- Bays, H. E., Gonzalez-Campoy, J. M., Bray, G. A., Kitabchi, A. E., Bergman, D. A., Schorr, A. B., Rodbard, H. W. and Henry, R. R. (2008). Pathogenic potential of adipose tissue

and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6, 343-368.

Bell, A., Gagnon, A., Dods, P., Papineau, D., Tiberi, M. and Sorisky, A. (2002). TSH signaling and cell survival in 3T3-L1 preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1056-C1064.

Berggreen, C., Gormand, A., Omar, B., Degerman, E. and Goransson, O. (2009). Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E635-E646.

Bevan, P. (2001). Insulin signalling. *J Cell Sci* 114, 1429-1430.

Bezair, V. and Langin, D. (2009). Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proc Nutr Soc* 68, 350-630.

Bhavsar, S., Watkins, J. & Young, A. (1998). Synergy between amylin and cholecystokinin for inhibition of food intake in mice. *Physiol. Behav.* 64, 557-561.

Bhuin, T. and Roy, J. K. (2009). Rab11 is required for embryonic nervous system development in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 335, 349-56.

Birkenfeld, A. L., Boschmann, M., Moro, C., Adams, F., Heusser, K., Franke, G., Berlan, M., Luft, F. C., Lafontan, M. and Jordan, J. (2005). Lipid mobilization with physiological atrial natriuretic peptide concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3622-3628.

Bjorntorp, P. (1996). The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20, 291-302.

Bluher, M., Michael, M. D., Peroni, O. D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B. B. and Kahn, C. R. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3, 25-38.

Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z. and Ruderman, N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 54, 3458-3465.

Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B. R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Boren, J. and Olofsson, S. O. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* 9, 1286-1293.

Boura-Halfon, S. and Zick, Y. (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E581-E591.

Brandebourg, T. D., Bown, J. L. and Ben-Jonathan, N. (2007). Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 408-413.

Brasaemle, D. L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48, 2547-2559.

Brasaemle, D. L. (2010). Lipolysis control: the plot thickens. *Cell Metab* 11, 173-174.

- Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J. and Londos, C. (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 38, 2249-2263.
- Brasaemle, D. L., Dolios, G., Shapiro, L. and Wang, R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279, 46835-46842.
- Brasaemle, D. L., Levin, D. M., Adler-Wailes, D. C. and Londos, C. (2000). The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta* 1483, 251-262.
- Brichard, S. M., Delporte, M. L. and Lambert, M. (2003). Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm Metab Res* 35, 337-342.
- Butler, P. C., Chou, J., Carter, W. B., Wang, Y. N., Bu, B. H., and Chang, D., Chang, J. K. & Rizza, R. A. (1990). Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* 39, 752-756.
- Carmen, G. Y. and Victor, S. M. (2006). Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18, 401-8.
- Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. and Pfeffer, S. R. (2001). Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* 292, 1373-1376.
- Cartwright, M. J., Tchkonina, T. and Kirkland, J. L. (2007). Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol* 42, 463-471.
- Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C. M. and Kandror, K. V. (2010). Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* 59, 775-781.
- Charlton, H.M., Clark, R.G., Robinson, I.C., Goff, A.E., Cox, B.S., Bugnon, C., Bloch, B.A. (1988). Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *Journal of Endocrinology* 119, 51-58
- Chen, Y. X., Huang, A. L. and Ruan, X. Z. (2007). Nuclear transcription factors and lipid homeostasis in liver. *Chin Med J (Engl)* 120, 2290-2296.
- Cho, K. J., Shim, J. H., Cho, M. C., Choe, Y. K., Hong, J. T., Moon, D. C., Kim, J. W. and Yoon, D. Y. (2005). Signaling pathways implicated in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 96, 869-878.
- de Lloyd, A., Bursell, J., Gregory, J. W., Rees, D. A. and Ludgate, M. (2010). TSH receptor activation and body composition. *J Endocrinol* 204, 13-20.
- Dejgaard, S. Y., Murshid, A., Erman, A., Kizilay, O., Verbich, D., Lodge, R., Dejgaard, K., Ly-Hartig, T. B., Pepperkok, R., Simpson, J. C. and Presley, J. F. (2008). Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *J Cell Sci* 121, 2768-2781.
- Ducharme, N. A. and Bickel, P. E. (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149, 942-949.

Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M. and Bouloumie, A. (2009). Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 482-485.

Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K., Wek, S. A., Moos, M. C., Jr. and Londos, C. (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8537-8541.

Eehalt, R., Fullekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T. and Stremmel, W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* 284, 135-140.

Fain, J. N., Cheema, P. S., Bahouth, S. W. and Lloyd Hiler, M. (2003). Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 674-678.

Farese, R. V., Sajan, M. P. and Standaert, M. L. (2005). Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 593-605.

Festuccia, W. T., Blanchard, P. G., Turcotte, V., Laplante, M., Sariahmetoglu, M., Brindley, D. N. and Deshaies, Y. (2009). Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J Lipid Res* 50, 1185-1194.

Flint, D. J., Binart, N., Kopchick, J. and Kelly, P. (2003). Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. *Pituitary* 6, 97-102.

Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. and Lima, F. B. (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 83, S192-203.

Frayn, K. N., Karpe, F., Fielding, B. A., Macdonald, I. A. and Coppack, S. W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 875-888.

Fredrikson, G., Tornqvist, H. and Belfrage, P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876, 288-293.

Freemark, M., Fleenor, D., Driscoll, P., Binart, N. and Kelly, P. (2001). Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 142, 532-737.

Fricke, K., Heitland, A. and Maronde, E. (2004). Cooperative activation of lipolysis by protein kinase A and protein kinase C pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 145, 4940-4947.

Frühbeck, G. and Gómez-Ambrosi, J. (2005). Adipose tissue en Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition), (eds Caballero, B., Allen, L., Prentice, A.; Elsevier Ltd) pp 1-14

Fujimoto, T. and Ohsaki, Y. (2006). Cytoplasmic lipid droplets: rediscovery of an old structure as a unique platform. *Ann N Y Acad Sci* 1086, 104-115.

- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M. and Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 130, 263-279.
- Fukuda, M. (2006). Rab27 and its effectors in secretory granule exocytosis: a novel docking machinery composed of a Rab27.effector complex. *Biochem Soc Trans* 34, 691-695.
- Galitzky, J., Sengenès, C., Thalamas, C., Marques, M. A., Senard, J. M., Lafontan, M. and Berlan, M. (2001). The lipid-mobilizing effect of atrial natriuretic peptide is unrelated to sympathetic nervous system activation or obesity in young men. *J Lipid Res* 42, 536-44.
- Gao, T., Furnari, F. and Newton, A. C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18, 13-24.
- Gastaldelli, A., Toschi, E., Pettiti, M., Frascerra, S., Quinones-Galvan, A., Sironi, A. M., Natali, A. and Ferrannini, E. (2001). Effect of physiological hyperinsulinemia on gluconeogenesis in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50, 1807-1812.
- Gericke, M. T., Kosacka, J., Koch, D., Nowicki, M., Schroder, T., Ricken, A. M., Nieber, K. and Spaniel-Borowski, K. (2009). Receptors for NPY and PACAP differ in expression and activity during adipogenesis in the murine 3T3-L1 fibroblast cell line. *Br J Pharmacol* 157, 620-632.
- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A. W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C. and Kahn, C. R. (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6676-6681.
- Gnacinska, M., Malgorzewicz, S., Stojek, M., Lysiak-Szydłowska, W. and Sworczak, K. (2009). Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci* 54, 150-157.
- Goodman, J. M. (2008). The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem* 283, 28005-28009.
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Granneman, R. L., Greenberg, A. S., Obin, M. S. and Zhu, Z. (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* 282, 5726-5735.
- Green, H. and Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3, 127-133.
- Grosshans, B. L., Ortiz, D. and Novick, P. (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11821-11827.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. and Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 367-377.
- Guo, Y., Cordes, K. R., Farese, R. V., Jr. and Walther, T. C. (2009). Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci* 122, 749-752.

- Guo, Y., Walther, T. C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J. S., Vale, R. D., Walter, P. and Farese, R. V. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453, 657-661.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F. and Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277, 4806-4815.
- Hagen, J. H. (1961). Effect of glucagon on the metabolism of adipose tissue. *J Biol Chem* 236, 1023-1027.
- Hamdy, O., Porramatikul, S. and Al-Ozairi, E. (2006). Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2, 367-373.
- Harman-Boehm, I., Bluher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Kloting, N., Stumvoll, M., Bashan, N. and Rudich, A. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2240-2207.
- Harris, T. E. and Lawrence, J. C., Jr. (2003). TOR signaling. *Sci STKE*, re15.
- Heppner, K. M., Habegger, K. M., Day, J., Pfluger, P. T., Perez-Tilve, D., Ward, B., Gelfanov, V., Woods, S. C., Dimarchi, R. and Tschop, M. (2010). Glucagon regulation of energy metabolism. *Physiol Behav.* [Epub ahead of print]
- Herrera, E. and Amusquivar, E. (2000). Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev* 16, 202-210.
- Hresko, R. C. and Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280, 40406-40416.
- Huang, J. and Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 37, 217-222.
- Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B. and Smith, U. (2009). Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. *Diabetes* 58, 1550-1557.
- Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631-643.
- Janson, A., Rawet, H., Perbeck, L. and Marcus, C. (1998). Presence of thyrotropin receptor in infant adipocytes. *Pediatr Res* 43, 555-558.
- Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B. and Gross, R. W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279, 48968-48975.
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. and Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070-1077.
- Kanzaki, M. (2006). Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocr J* 53, 267-293.

- Kershaw, E. E. and Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556.
- Kim, S. and Moustaid-Moussa, N. (2000). Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr* 130, 3110S-3115S.
- Kimmel, A. R., Brasaemle, D. L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C. and Londos, C. (2010). Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res* 51, 468-471.
- Klaus, S. and Keijer, J. (2004). Gene expression profiling of adipose tissue: individual, depot-dependent, and sex-dependent variabilities. *Nutrition* 20, 115-20.
- Koh, E. H., Lee, W. J., Kim, M. S., Park, J. Y., Lee, I. K. and Lee, K. U. (2005). Intracellular fatty acid metabolism in skeletal muscle and insulin resistance. *Curr Diabetes Rev* 1, 331-336.
- Kreier, F., Fliers, E., Voshol, P. J., Van Eden, C. G., Havekes, L. M., Kalsbeek, A., Van Heijningen, C. L., Sluiter, A. A., Mettenleiter, T. C., Romijn, J. A., Sauerwein, H. P. and Buijs, R. M. (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest* 110, 1243-1250.
- Kreier, F., Kap, Y. S., Mettenleiter, T. C., van Heijningen, C., van der Vliet, J., Kalsbeek, A., Sauerwein, H. P., Fliers, E., Romijn, J. A. and Buijs, R. M. (2006). Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. *Endocrinology* 147, 1140-1147.
- Kuo, Y. C., Huang, K. Y., Yang, C. H., Yang, Y. S., Lee, W. Y. and Chiang, C. W. (2008). Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem* 283, 1882-1892.
- Lafontan, M. and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34, 1057-1091.
- Lafontan, M. and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48, 275-297.
- Lago F, G. R., Gómez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. (2009). Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 34, 500-510.
- Lefterova, M. I. and Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 20, 107-114.
- Lenard, N. R. and Berthoud, H. R. (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3, S11-22.
- Leung, K. F., Baron, R., Ali, B. R., Magee, A. I. and Seabra, M. C. (2007). Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. *J Biol Chem* 282, 1487-1497.

- Ling, C. and Billig, H. (2001). PRL receptor-mediated effects in female mouse adipocytes: PRL induces suppressors of cytokine signaling expression and suppresses insulin-induced leptin production in adipocytes in vitro. *Endocrinology* 142, 4880-4890.
- Ling, C., Svensson, L., Oden, B., Weijdegard, B., Eden, B., Eden, S. and Billig, H. (2003). Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1804-1808.
- Listenberger, L. L., Ostermeyer-Fay, A. G., Goldberg, E. B., Brown, W. J. and Brown, D. A. (2007). Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res* 48, 2751-2761.
- Liu, P., Bartz, R., Zehmer, J. K., Ying, Y. S., Zhu, M., Serrero, G. and Anderson, R. G. (2007). Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1773, 784-793.
- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D. I., Zhu, M. and Anderson, R. G. (2004). Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 279, 3787-3792.
- Liu, Y. Y., Schultz, J. J. and Brent, G. A. (2003). A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J Biol Chem* 278, 38913-38920.
- Londos, C., Sztalryd, C., Tansey, J. T. and Kimmel, A. R. (2005). Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie* 87, 45-49.
- Lonnqvist, F., Thome, A., Nilsell, K., Hoffstedt, J. and Arner, P. (1995). A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity. *J Clin Invest* 95, 1109-1116.
- Lopez, M., Seoane, L., Senaris, R.M., Dieguez, C., (2001). Prepro-orexin mRNA levels in the rat hypothalamus, and orexin receptors mRNA levels in the rat hypothalamus and adrenal gland are not influenced by the thyroid status. *Neurosci. Lett.* 300, 171-175.
- Luque, R. and Kineman, R. (2006). Impact of obesity on the growth hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology* 147, 2754-2763.
- Luque, R. M., Huang, Z. H., Shah, B., Mazzone, T. and Kineman, R. D. (2007). Effects of leptin replacement on hypothalamic-pituitary growth hormone axis function and circulating ghrelin levels in ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E891-899.
- Lutcke, A., Parton, R. G., Murphy, C., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Valencia, A., Simons, K. and Zerial, M. (1994). Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. *J Cell Sci* 107, 3437-3448.
- MacDougald, O. A. and Mandrup, S. (2002). Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 13, 5-11.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor,

- apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221, 286-289.
- Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A. and Brasaemle, D. L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem* 281, 11901-11909.
- Martin, S., Driessen, K., Nixon, S. J., Zerial, M. and Parton, R. G. (2005). Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem* 280, 42325-42335.
- Martin, S. and Parton, R. G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 373-378.
- Maury, E. and Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314, 1-16.
- Miura, S., Gan, J. W., Brzostowski, J., Parisi, M. J., Schultz, C. J., Londos, C., Oliver, B. and Kimmel, A. R. (2002). Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 277, 32253-32257.
- Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, Souza, S. C., Shen, W. J., Zhang, H. H., Stancheva, Z. S., Kraemer, F. B., Obin, M. S. and Greenberg, A. S. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 282, 996-1002.
- Montague, C. T., Prins, J. B., Sanders, L., Zhang, J., Sewter, C. P., Digby, J., Byrne, C. D. and O'Rahilly, S. (1998). Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47, 1384-13891.
- Moore, C. X. C., G. J. (1991). Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycemic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1-9.
- Moore, H. P., Silver, R. B., Mottillo, E. P., Bernlohr, D. A. and Granneman, J. G. (2005). Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 280, 43109-43120.
- Moro, C., Crampes, F., Sengenès, C., De Gliszinski, I., Galitzky, J., Thalamas, C., Lafontan, M. and Berlan, M. (2004). Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *Faseb J* 18, 908-910.
- Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40, 325-438.
- Murphy, S., Martin, S. and Parton, R. G. (2009). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* 1791, 441-447.
- Niesler, C. U., Siddle, K. and Prins, J. B. (1998). Human preadipocytes display a depot-specific susceptibility to apoptosis. *Diabetes* 47, 1365-1368.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T. and Nagai, R. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15, 914-920.

Nogueiras, R., Lopez, M. and Dieguez, C. (2010). Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. *Obes Rev* 11, 185-201.

Nordlie, R. C., Foster, J. D. and Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* 19, 379-406.

Novick, P. and Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* 9, 496-504.

Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., Rosen, O. M. and Rubin, C. S. (1980). Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol* 87, 180-196.

Ntambi, J. M. and Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130, 3122S-3126S.

Ohsaki, Y., Maeda, T., Maeda, M., Tauchi-Sato, K. and Fujimoto, T. (2006). Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 279-287.

O'Rourke, R. W., Metcalf, M. D., White, A. E., Madala, A., Winters, B. R., Maizlin, II, Jobe, B. A., Roberts, C. T., Jr., Slifka, M. K. and Marks, D. L. (2009). Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 33, 978-990.

Osawa, H., Onuma, H., Ochi, M., Murakami, A., Yamauchi, J., Takasuka, T., Tanabe, F., Shimizu, I., Kato, K., Nishida, W., Yamada, K., Tabara, Y., Yasukawa, M., Fujii, Y., Ohashi, J., Miki, T. and Makino, H. (2005). Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 596-602.

Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Walsh, K. (2003). Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 14, 561-566.

Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H. and Fujimoto, T. (2005). Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci* 118, 2601-2611.

Permana, P. A., Nair, S., Lee, Y. H., Luczy-Bachman, G., Vozarova De Courten, B. and Tataranni, P. A. (2004). Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E958-962.

Pessin, J. E. and Saltiel, A. R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 165-169.

Ploegh, H. L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-438.

Plum, L., Schubert, M. & Bruning, J. C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16, 59-65.

- Polonsky, K. S., Given, E. & Carter, V. (1988). Twenty-four hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest.* 81, 442–448.
- Porte, D. J., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W. (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr. Rev.* 60, S20–S29.
- Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97, 493-497.
- Redinger, R. N. (2009). Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl Res* 154, 52-60.
- Riordan, N. H., Ichim, T. E., Min, W. P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J. P., Harman, R. J., Patel, A. N., Murphy, M. P., Lee, R. R. and Mineev, B. (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med* 7, 29.
- Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M. J., Troyer, D. and Severs, N. J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci* 119, 4215-4224.
- Robenek, H., Robenek, M. J. and Troyer, D. (2005). PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res* 46, 1331-1338.
- Rodeheffer, M. S., Birsoy, K. and Friedman, J. M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240-249.
- Rodriguez, A., Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J. and Fruhbeck, G. (2007). Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome? *Curr Pharm Des* 13, 2169-2175.
- Ronti, T., Lupattelli, G. and Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64, 355-365.
- Rushing, P. A., Hagan, M. M., Seeley, R. J., Lutz, T. A., and D'Alessio, D. A., Air, E. L. & Woods, S. C. (2001). Inhibition of central amylin signaling increases food intake and body adiposity in rats. *Endocrinology* 142, 5035–5038.
- Sajan, M. P., Rivas, J., Li, P., Standaert, M. L. and Farese, R. V. (2006). Repletion of atypical protein kinase C following RNA interference-mediated depletion restores insulin-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 281, 17466-17473.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Sano, H., Eiguez, L., Teruel, M. N., Fukuda, M., Chuang, T. D., Chavez, J. A., Lienhard, G. E. and McGraw, T. E. (2007). Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. *Cell Metab* 5, 293-303.
- Schaffer, J. E. and Lodish, H. F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427-436.

- Schaffler, A., Binart, N., Scholmerich, J. and Buchler, C. (2005). Hypothesis paper Brain talks with fat--evidence for a hypothalamic-pituitary-adipose axis? *Neuropeptides* 39, 363-367.
- Schaffler, A., Scholmerich, J. and Buechler, C. (2006). The role of 'adipotropins' and the clinical importance of a potential hypothalamic-pituitary-adipose axis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2, 374-383.
- SchaVer, J. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14, 281-287.
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746-26749.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Seaquist, E., Damberg, GS, Tkac, I and Gruetter, R. (2001). The effect of insulin on in vivo cerebral glucose concentrations and rates of glucose transport/metabolism in humans. *Diabetes* 50, 2203-2209.
- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M. and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *Faseb J* 14, 1345-1351.
- Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M. and Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278, 48617-48626.
- Sengenès, C., Stich, V., Berlan, M., Hejnova, J., Lafontan, M., Pariskova, Z. and Galitzky, J. (2002). Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 24-32.
- Shen, W. J., Liang, Y., Hong, R., Patel, S., Natu, V., Sridhar, K., Jenkins, A., Bernlohr, D. A. and Kraemer, F. B. (2001). Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 276, 49443-49448.
- Shi, H. and Clegg, D. J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 97, 199-204.
- Shi, H., Seeley, R. J. and Clegg, D. J. (2009). Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol* 30, 396-404.
- Shoelson, S. E., Herrero, L. and Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180.
- Sjogren, M., Alkemade, A., Mittag, J., Nordstrom, K., Katz, A., Rozell, B., Westerblad, H., Arner, A. and Vennstrom, B. (2007). Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor alpha1. *Embo J* 26, 4535-4545.

- Smith, A. J., Thompson, B. R., Sanders, M. A. and Bernlohr, D. A. (2007). Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J Biol Chem* 282, 32424-32432.
- Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D., Kostense, P. J., Yudkin, J. S., Heine, R. J., Nijpels, G. and Seidell, J. C. (2003). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* 77, 1192-1197.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Ryden, M., Frisen, J. and Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.
- Stenmark, H. and Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2, REVIEWS 3007.
- Steppan, C. M. and Lazar, M. A. (2004). The current biology of resistin. *J Intern Med* 255, 439-447.
- Student, A. K., Hsu, R. Y. and Lane, M. D. (1980). Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 255, 4745-4750.
- Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A. W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M. P. and Brasaemle, D. L. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279, 42062-42071.
- Surmi BK, H. A. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 3, 545-556.
- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J. T., Contreras, J. A., Kimmel, A. R. and Londos, C. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* 161, 1093-1103.
- Tansey, J. T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D. L., Zee, J. V., Gavrilova, O., Reitman, M. L., Deng, C. X., Li, C., Kimmel, A. R. and Londos, C. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6494-6499.
- Tchkonia, T., Lenburg, M., Thomou, T., Giorgadze, N., Frampton, G., Pirtskhalava, T., Cartwright, A., Cartwright, M., Flanagan, J., Karagiannides, I., Gerry, N., Forse, R. A., Tchoukalova, Y., Jensen, M. D., Pothoulakis, C. and Kirkland, J. L. (2007). Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E298-307.
- Tchkonia, T., Tchoukalova, Y. D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R. A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M. D. and Kirkland, J. L. (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E267-77.

- Tsao, T. S., Tomas, E., Murrey, H. E., Hug, C., Lee, D. H., Ruderman, N. B., Heuser, J. E. and Lodish, H. F. (2003). Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 278, 50810-50817.
- Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2005). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* 280, 39253-39259.
- Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2006). The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1 syntaxin-1a complex. *Mol Biol Cell* 17, 2101-2112.
- Van Harmelen, V., Rohrig, K. and Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53, 632-637.
- van Harmelen, V., Skurk, T., Rohrig, K., Lee, Y. M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I. and Hauner, H. (2003). Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 889-895.
- Vazquez-Martinez, R., Cruz-Garcia, D., Duran-Prado, M., Peinado, J. R., Castano, J. P. and Malagon, M. M. (2007). Rab18 inhibits secretory activity in neuroendocrine cells by interacting with secretory granules. *Traffic* 8, 867-882.
- Vazquez-Vela, M. E., N. Torres, and A. R. Tovar. . (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 39, 715-728.
- Verma, S., Li, S. H., Wang, C. H., Fedak, P. W., Li, R. K., Weisel, R. D. and Mickle, D. A. (2003). Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 108, 736-740.
- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H. and Sul, H. S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279, 47066-47075.
- Virtue, S. and Vidal-Puig, A. (2008). It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 6, 1819-1823.
- Virtue, S. and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1801, 338-349.
- Vock, R., Weibel, E. R., Hoppeler, H., Ordway, G., Weber, J. M. and Taylor, C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. V. Structural basis of vascular substrate supply to muscle cells. *J Exp Biol* 199, 1675-1688.
- Vohl, M. C., Sladek, R., Robitaille, J., Gurd, S., Marceau, P., Richard, D., Hudson, T. J. and Tchernof, A. (2004). A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 12, 1217-1222.
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21, 697-738.

- Wajchenberg, B. L., Giannella-Neto, D., da Silva, M. E. and Santos, R. F. (2002). Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 34, 616-621.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2003). Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 278, 40352-40363.
- Walther, T. C. and Farese, R. V., Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791, 459-466.
- Weickert, M. O. and Pfeiffer, A. F. (2006). Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 49, 1732-1741.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- Welte, M. A. (2009). Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochem Soc Trans* 37, 991-996.
- White, M. F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710-1711.
- White, U. A. and Stephens, J. M. (2010). Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318, 10-14.
- Wolins, N. E., Brasaemle, D. L. and Bickel, P. E. (2006a). A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett* 580, 5484-5491.
- Wolins, N. E., Quaynor, B. K., Skinner, J. R., Tzekov, A., Croce, M. A., Gropler, M. C., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Kern, P. A., Finck, B. N. and Bickel, P. E. (2006b). OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 55, 3418-3428.
- Woods, S. C., Decker, E. & Vasselli, J. R. (1974). Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol. Rev.* 81, 26-43.
- Woods, S. C., Lutz, T. A., Geary, N. and Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1219-1235.
- Xu, C., He, J., Jiang, H., Zu, L., Zhai, W., Pu, S. and Xu, G. (2009). Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol Endocrinol* 23, 1161-1170.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A. and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.
- Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S. and Osumi, T. (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* 279, 30490-30497.
- Yamaguchi, T., Omatsu, N., Morimoto, E., Nakashima, H., Ueno, K., Tanaka, T., Satouchi, K., Hirose, F. and Osumi, T. (2007). CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets

but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res* 48, 1078-1089.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., Kadowaki, T., (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* . 423, 762-769.

Yang, L., Clinton, J. M., Blackburn, M. L., Zhang, Q., Zou, J., Zielinska-Kwiatkowska, A., Tang, B. L. and Chansky, H. A. (2008a). Rab23 regulates differentiation of ATDC5 chondroprogenitor cells. *J Biol Chem* 283, 10649-10657.

Yang, Y., Ju, D., Zhang, M. and Yang, G. (2008b). Interleukin-6 stimulates lipolysis in porcine adipocytes. *Endocrine* 33, 261-269.

Ying, H., Araki, O., Furuya, F., Kato, Y. and Cheng, S. Y. (2007). Impaired adipogenesis caused by a mutated thyroid hormone alpha1 receptor. *Mol Cell Biol* 27, 2359-2371.

Young, A. D., M. (1998). Roles of amylin in diabetes and in regulation of nutrient load. *Nutrition* 14, 524-527.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., Atcheson, B., White, M. F., Kraegen, E. W. and Shulman, G. I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277, 50230-50236.

Yu, J., Yu, H. C., Kim, K. A., Kwon, K. B., Park, J. W., Kim, S. Z., Kim, S. H. and Park, B. H. (2008). Differences in the amount of lipolysis induced by atrial natriuretic peptide in small and large adipocytes. *J Pept Sci* 14, 972-977.

Yu, Y. H. and Ginsberg, H. N. (2005). Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res* 96, 1042-52.

Zechner, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Lass, A. and Zimmermann, R. (2005). Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* 16, 333-340.

Zehmer, J. K., Bartz, R., Bisel, B., Liu, P., Seemann, J. and Anderson, R. G. (2009a). Targeting sequences of UBXD8 and AAM-B reveal that the ER has a direct role in the emergence and regression of lipid droplets. *J Cell Sci* 122, 3694-3702.

Zehmer, J. K., Huang, Y., Peng, G., Pu, J., Anderson, R. G. and Liu, P. (2009b). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics* 9, 914-921.

Zerial, M. and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-117.

Zhang, H. H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C. and Greenberg, A. S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 51, 2929-29235.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A. and Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.

Zweytick, D., Athenstaedt, K. and Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1469, 101-120.