

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**
Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES
DEL TEJIDO ADIPOSO EN RELACIÓN A
OBESIDAD Y RESISTENCIA A INSULINA**

Natalia Rocío Moreno Castellanos
Córdoba, 2015

TITULO: *Identificación de nuevos marcadores del tejido adiposo en relación a obesidad y resistencia a insulina.*

AUTOR: *Natalia Rocio Moreno Castellanos*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

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

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**
Programa de Doctorado en Biomedicina





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES
DEL TEJIDO ADIPOSO EN RELACIÓN A
OBESIDAD Y RESISTENCIA A INSULINA**

Memoria de tesis presentada por **Natalia Rocío Moreno Castellanos**, para optar
al grado de **Doctor en Ciencias**

Los Directores


Dra. María del Mar Malagón Poyato
Catedrática de Biología Celular de la
Universidad de Córdoba


Dr. Rafael Vázquez Martínez
Catedrática de Biología Celular de la
Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 14 de Octubre de 2015



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CELULAR, FISIOLÓGIA E INMUNOLOGÍA



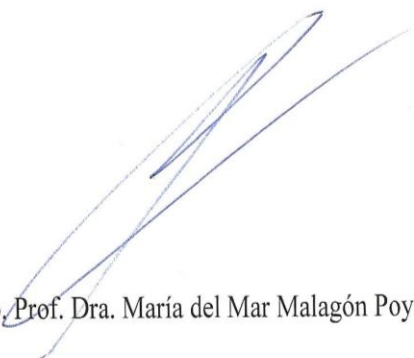
D^a María del Mar Malagón Poyato (Catedrática de Biología Celular), y **D. Rafael Vázquez Martínez** (Profesor Titular de Biología Celular), ambos pertenecientes al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN


Que **D. Natalia Rocío Moreno Castellanos**, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES DEL TEJIDO ADIPOSEO EN RELACIÓN A OBESIDAD Y RESISTENCIA A INSULINA”, que, bajo nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Córdoba, 14 de Octubre de 2015

Firma del/de los director/es



Fdo. Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato



Fdo. Prof. Dr. Rafael Vázquez Martínez



TÍTULO DE LA TESIS:

Identificación de nuevos marcadores del tejido adiposo en relación a obesidad y resistencia a insulina

DOCTORANDO/A:

Natalia Rocío Moreno Castellanos

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, la doctoranda Natalia Rocío Moreno Castellanos ha superado los objetivos planteados al comienzo de la misma, aplicando numerosas técnicas experimentales, que le han permitido obtener resultados originales y novedosos sobre los efectos de la cirugía bariátrica en la composición molecular del tejido adiposo e identificar y caracterizar, por primera vez, un nuevo elemento del citoesqueleto de los adipocitos, en relación a la regulación del metabolismo lipídico, obesidad y resistencia a insulina. Dichos resultados se han recogido en dos publicaciones que actualmente se encuentran en fase de revisión en las revistas "Obesity surgery" y "Diabetes". Además, como fruto de la colaboración de Natalia Moreno con otros miembros del grupo de investigación y de otros grupos con los que éste colabora, ha participado como co-autora en trabajos relacionados con su Tesis Doctoral que se han publicado en las revistas "Antioxidants Redox Signaling", "Scientific Reports", "Molecular and Cellular Endocrinology", "Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism" y "Current Vascular Pharmacology", así como en un trabajo Proteómico adicional que se someterá a revisión a corto plazo.

Por último, la Doctoranda ha presentado resultados en diferentes congresos de ámbito nacional (3 comunicaciones tipo Póster y 4 Orales) e internacional (2 comunicación tipo Póster).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 14 de Octubre de 2015

Firma del/de los director/es

Fdo. Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato

Fdo. Prof. Dr. Rafael Vázquez Martínez

A mi madre, a mi hermana

a Óscar

Abreviaturas y Acrónimos

2-DE	Electroforesis bidimensional
2D-DIGE	Gel diferencial de fluorescencia y 2-DE
γ -GT	γ - glutamiltransferasa
aa	Aminoácido
AC	Adenilato ciclasa
ACOT1	Acil-CoA tioesterasa 1
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ADNc	Ácido deoxirribonucleico copia
AG	Ácidos grasos
AKT	Proteína quinasa B
AL1A1	Aldehído dehidrogenasa 1 A 1
ALT	Alanina aminotransferasa
AMPc	5' -adenosina monofosfato cíclico
AMPL	<i>Cytosol aminopeptidase</i>
ANP	Péptido natriurético atrial
AQPs	Acuagliceroporinas
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	5' -adenosina trifosfato
ATGL	Triglicérido lipasa
BF	% de grasa corporal
BG	By-pass gástrico
BLVRB	<i>Flavin reductase</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
C/EBP α	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins alpha</i>
CAV-1	Caveolina-1
CB	Cirugía Bariátrica
CH60	<i>60 kDa heat shock protein</i>
CM	Quilomicrones
CRP	Proteína C-reactiva
CRYAB	<i>Alpha-crystallin B</i>
DAG	Diacilglicéridos
DLDH	Dihidrolipoamida dehidrogenasa
DMEM	<i>Dulbeco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	Deoxi-ribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad optica
DT2	Diabetes tipo 2
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
ERC	Compartimento de reciclaje endosomal
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
FABP5	<i>Fatty acid binding protein</i>
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FAT/CD36	Proteína translocasa de ácidos grasos
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FEV	Fracción de estroma vascular
FFA	Ácidos grasos libres
FIBB	Fibrinógeno beta
Gi	Proteína G inhibitoria
GK	Glicerol quinasa
GL	Gota lipídica
GMPc	5' -guanosina monofosfato cíclico
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPx	Glutación peroxidasa
GRP78	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>
Gs	Proteína G asociada
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
GT	Gastrectomía tubular

GTP	Guanosín trifosfato
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HGHI	Alta glucosa, alta insulina
HOMA	Índice de evaluación del modelo homeostático
HSL	Lipasa sensible a hormonas
i.e	Es decir
IEF	Isoelectroenfoque
IGT	Tolerancia a la glucosa alterada
IL-6	Interleukina-6
IMC	Índice de masa corporal
IMMT	Mitofilin
IP	Inmunoprecipitación
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
IR	Insulino resistente/cia/Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	cJun quinasa NH ₂ -terminal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacárido
MAG	Monoacilglicéridos
MCP1	<i>Macrophage chemoattractant protein</i>
MGL	Monoglicérido lipasa
MHO	<i>Metabolically healthy obese</i>
MINOS	Sistema de Organización de la Membrana Mitocondrial
MUO	<i>Metabolically unhealthy obese</i>
Mw	Peso molecular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NCS	Suero de ternero recién nacido
NG	Normoglucémico
OGTT	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
PAI-1	<i>Endothelial plasminogen activator inhibitor-1</i>
pAKT	Proteína quinasa B fosforilada
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationship</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCKGM	Carboxiquinasa fosfoenolpiruvato mitocondrial
PDE	Fosfodiesterasa
pERK	<i>Extracellular signal-related kinase phosphorylated</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α</i>
PGM1	Fosfoglucomutasa 1
pI	Punto isoeléctrico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PI(4,5)P2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
pINS	Sustrato del receptor de insulina fosforilado
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
pJNK	cJun quinasa NH ₂ -terminal fosforilada
PKA	Proteína kinasa A
PKG	Proteína kinasa G
PLIN1	Perilipina 1
PNS	<i>Postnuclear supernatant</i>
POST	Aproximadamente un año después de la cirugía bariátrica
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRDX6	Peroxiredoxin-6
PRE	Antes de la cirugía bariátrica
QUIKY	Índice cuantitativo para verificar sensibilidad a la insulina
R α	Receptor α 2-adrenérgico
R β	Receptor β -adrenérgico
RE	Retículo endoplásmico

Abreviaturas y Acrónimos

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SEM	Error estándar de la media
SEPT	Septin
siRNA	Ácido ribonucleico interferente
SOD	Superóxido dismutasa
SOS	<i>Swedish Obese Subjects</i>
SYWC	Aminoacil-tRNA sintetasa
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAG	Triacilglicéridos/Triglicéridos
TAM	Tejido adiposo marrón
TAO	Tejido adiposo omental
TASC	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
TBB5	Tubulina beta
TCP1	<i>T-Complex Protein 1</i>
TCPB	<i>T-complex 1 subunit beta</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TZD	Tiazolidineodionas
u.a.	Unidades arbitrarias
UCP1	Proteína desacoplante 1
UDP	Uridina difosfato
UGPA	Uridililtransferasa glucosa-1-fosfato
VAT-1	<i>Synaptic vesicle membrane</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIME	Vimentina
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
Y2H	Ensayo de doble híbrido de levadura

Índice

	Pág.
SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Tejido adiposo	15
1.1.1. <i>Distribución y organización del tejido adiposo</i>	15
1.1.2. <i>Componentes del tejido adiposo</i>	17
1.1.2.1. <i>Adipocitos y FEV</i>	17
1.1.3. <i>Adipogénesis</i>	18
1.1.4. <i>Citoesqueleto de los adipocitos</i>	18
1.1.5. <i>Septinas</i>	19
1.2. Tejido adiposo como órgano endocrino	24
1.2.1. <i>Leptina</i>	24
1.2.2. <i>Adiponectina</i>	25
1.2.3. <i>Citoquinas (TNFα e IL-6)</i>	26
1.3. Regulación del metabolismo glucídico y lipídico en adipocitos	27
1.3.1. <i>Insulina</i>	27
1.3.2. <i>Control de la lipogénesis en adipocitos</i>	29
1.3.2.1. <i>FAT/CD36</i>	30
1.3.2.2. <i>FATPs</i>	30
1.3.2.3. <i>FABPs</i>	31
1.4. Caveolas y caveolina 1 (CAV1)	32
1.4.1. <i>Papel de las caveolas/caveolinas en la transducción de señales</i>	33
1.4.2. <i>Papel de las caveolas/caveolinas en el transporte de lípidos</i>	34
1.5. Lipólisis	35
1.6. Obesidad	38
1.6.1. <i>Mecanismos patogénicos asociados al desarrollo de resistencia a insulina en obesidad</i>	38
1.6.2. <i>Tratamiento de la obesidad</i>	41
1.6.2.1. <i>Modificación del estilo de vida</i>	42
1.6.2.2. <i>Tratamiento farmacológico</i>	42
1.6.2.3. <i>Cirugía bariátrica (CB)</i>	42
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Pacientes incluidos en el estudio	51
3.1.1. <i>Cohorte 1.- Estudio proteómico del tejido adiposo humano antes y después de cirugía bariátrica</i>	51
3.1.2. <i>Cohorte 2.- Medidas de expresión génica y proteica en muestras de tejido adiposo humano</i>	52
3.2. Cultivos celulares	54
3.2.1. <i>Cultivo de preadipocitos humanos</i>	54
3.2.2. <i>Cultivo de la línea celular 3T3-L1</i>	55
3.2.3. <i>Cultivo de la línea celular HEK293T</i>	56
3.3. Estudio proteómico comparativo de tejido adiposo humano antes y después de cirugía bariátrica	56
3.3.1. <i>Extracción y purificación de proteínas para estudios de 2D-DIGE</i>	56
3.3.2. <i>Electroforesis bidimensional</i>	57
3.3.3. <i>Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF)</i>	58
3.4. Análisis bioinformático	59
3.4.1. <i>Análisis mediante Ingenuity Pathways Analysis (IPA) Y PANTHER</i>	59
3.4.2. <i>Diseño de oligonucleótidos para PCR</i>	59
3.4.3. <i>Secuenciación</i>	60

3.4.4. <i>Análisis general de secuencias</i>	60
3.4.5. <i>Análisis de secuencias aminoacídicas</i>	60
3.5. Ensayos de Biología Molecular	60
3.5.1. <i>Aislamiento de ARN</i>	60
3.5.2. <i>Retro-transcripción del ARN</i>	61
3.5.3. <i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>	61
3.5.4. <i>Clonación del gen SEPT11</i>	62
3.5.5. <i>Silenciamiento del gen SEPT11 mediante ARN interferente</i>	63
3.6. Estudios bioquímicos	64
3.6.1. <i>Obtención de extractos proteicos</i>	64
3.6.2. <i>Aislamiento de fracciones citosólica y de membrana de adipocitos</i>	64
3.6.3. <i>Extracción diferencial de proteínas de membrana</i>	65
3.6.4. <i>Aislamiento de gotas lipídicas</i>	65
3.6.5. <i>Aislamiento de caveolas mediante fraccionamiento proteico en gradiente discontinuo de sacarosa</i>	66
3.6.6. <i>Precipitación de proteínas con acetona</i>	66
3.6.7. <i>Precipitación de proteínas por el método Cloroformo/Metanol</i>	67
3.6.8. <i>Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia</i>	67
3.6.9. <i>Inmunodetección y análisis densitométrico</i>	67
3.7. Transfección y electroporación de líneas celulares	68
3.7.1. <i>Transfección</i>	68
3.7.2. <i>Electroporación</i>	70
3.8. Estudios de microscopía	70
3.8.1. <i>Tinción de Oil Red O</i>	70
3.8.2. <i>Estudios histológicos mediante inmunohistoquímica</i>	70
3.8.3. <i>Estudios ultraestructurales mediante microscopía electrónica</i>	71
3.8.4. <i>Estudios de fluorescencia y microscopía confocal</i>	72
3.9. Ensayos de interacción proteína-proteína	73
3.9.1. <i>Determinación de proteínas efectoras de SEPT11 mediante ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H)</i>	73
3.9.2. <i>Ensayos de pull-down mediante el uso de proteínas recombinantes fusionadas a glutation S-transferasa 4B (GST)</i>	77
3.9.3. <i>Ensayos de co-inmunoprecipitación</i>	79
3.10. Estudios funcionales	80
3.10.1. <i>Determinación de la actividad lipogénica en células 3T3-L1.</i>	80
3.10.2. <i>Determinación de la actividad lipolítica en células 3T3-L1</i>	81
3.10.3. <i>Análisis del efecto del silenciamiento de SEPT11 sobre la señalización mediada por insulina en adipocitos</i>	82
3.11. Análisis estadístico	82
4. RESULTADOS	83
4.1. Estudio proteómico de tejido adiposo de pacientes obesos antes y después de cirugía bariátrica	85
4.1.1. <i>Características clínicas y bioquímicas de los pacientes antes y después de CB</i>	85
4.1.2. <i>Marcadores moleculares del tejido adiposo antes y después de CB</i>	87
4.1.3. <i>Proteómica comparativa del TASC de los pacientes obesos NG e IR antes y después de CB</i>	89
4.1.4. <i>Efectos de la CB sobre el perfil metabólico del tejido adiposo en mujeres obesas</i>	97
4.1.5. <i>Efectos de la CB sobre la actividad mitocondrial de mujeres obesas</i>	98
4.1.6. <i>Efectos de la CB sobre la angiogénesis del TA de mujeres obesas</i>	99
4.1.7. <i>Efectos de la CB sobre proteínas del citoesqueleto en mujeres obesas</i>	100
4.2. Caracterización de nuevos biomarcadores: SEPT11	102

4.2.1. Análisis de dominios y motivos estructurales de SEPT11.	103
4.2.2. Estudio de SEPT11 durante la adipogénesis	104
4.2.3. Estudio de interacción de SEPT11 con otras septinas	105
4.2.4. Asociación de SEPT11 con F-Actina en células 3T3-L1	108
4.2.5. Estudio bioquímico de la distribución subcelular de la proteína SEPT11	109
4.3. SEPT11 y su asociación con caveolas	110
4.3.1. Análisis de localización de SEPT11 en caveolas	111
4.3.2. Estudio de la interacción entre SEPT11 y caveolina-1.	111
4.3.3. Estudios de subfraccionamiento celular en células 3T3-L1	112
4.4. Regulación de la expresión de SEPT11 en adipocitos. Modelos <i>in vitro</i> de resistencia a insulina	113
4.4.1. Efecto del TNF- α y HGHI sobre la expresión de SEPT11 en adipocitos 3T3-L1	113
4.4.2. Efecto de la exposición a ácidos grasos sobre la expresión de SEPT11 en adipocitos	114
4.5. Mecanismos moleculares de acción de SEPT11. Identificación y caracterización del interactoma de SEPT11 mediante ensayo de doble híbrido de levadura	117
4.6. Efecto del ácido oleico sobre la distribución y expresión de SEPT11, CAV-1 y FABP5	119
4.7. Silenciamiento de SEPTIN 11 mediado por siRNA de síntesis química en adipocitos 3T3-L1	121
4.7.1. Cambios en el contenido de FABP5 y CAV-1 tras el silenciamiento de SEPT11 mediado por siRNA	122
4.7.2. Análisis de las vías de señalización de la insulina en células silenciadas para SEPT11	123
4.8. Contribución de SEPT11 en los procesos de lipólisis y lipogénesis en adipocitos	125
4.9. Caracterización de SEPT11 en tejido adiposo humano	126
4.9.1. Regulación de la expresión de SEPT11 en adipocitos de tejido adiposo omental humano	129
4.9.2. Expresión de SEPT2 y SEPT9 en tejido adiposo humano bajo diferentes condiciones metabólicas	132
4.9.3. Septinas y su relación con caveolas en tejido adiposo humano	133
4.9.4. Efecto de la exposición a oleato sobre SEPT11 y CAV-1 en adipocitos humanos	134
4.9.5. Análisis de la expresión génica de FABP5 en tejido adiposo humano	135
4.10. Distribución de SEPT11 y su asociación con F-Actina y CAV-1 durante la diferenciación de los adipocitos humanos	136
5. DISCUSIÓN	139
5.1. Los efectos de la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica en el tejido adiposo de mujeres con obesidad mórbida depende del estado metabólico inicial.	141
5.2. Importancia de la proteína de citoesqueleto, SEPT11, en la regulación dinámica de la caveola y en el transporte de lípidos en los adipocitos.	146
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	153
7. BIBLIOGRAFÍA	157

Summary

IDENTIFICATION OF NEW MARKERS OF ADIPOSE TISSUE IN RELATION TO OBESITY AND INSULIN RESISTANCE

INTRODUCTION

The adipose tissue (AT) has been long considered to play a passive role as a fat storage depot. However, recent discoveries have significantly modified the classical view of adipose tissue as an inert energy storage site and uncovered the complex regulation of adipose tissue lipogenesis and lipolysis (Rodríguez et al., 2011; Ràfols, 2014; Frühbeck, 2014; Burcelin, 2013). Likewise, it is now accepted that adipose tissue constitutes a primary site for glucose uptake in response to insulin (Havel, 2004). In addition, it has been clearly established that the adipose tissue represents a true endocrine organ that produces a wide variety of signaling molecules, the adipokines, endowed with important endocrine, paracrine and autocrine activities (Lanthier and Leclercq, 2014; Maury and Brichard, 2010; Frühbeck and Gómez-Ambrosi, 2005). Adipocytes are the main cellular component of the AT. These cells are embedded in a collagen matrix in which mesenchymal stem cells, pre-adipocytes, nerve endings, blood cells and vascular tissue are embedded too, composing the so-called stromal-vascular fraction (SVF) (Malagón et al, 2013). Both adipocytes and the SVF are necessary for the maintenance of the different functions of the AT.

Mature adipocytes, which represent the main cellular component of AT, are responsible of triglyceride (TG) storage during periods of excess energy and mobilization of the stored lipids as free fatty acids (FFAs) to be used as an energy source by other tissues during times of negative energy balance. The lipid uptake and accumulation of FFA is positively regulated by insulin, which also promotes glucose uptake and is required as a substrate for glycerol synthesis and formation of TG (Bevan, 2001; Frühbeck, 2014). In contrast, catecholamines are major stimulators of the hydrolysis and mobilization of stored TG during fasting (Czech et al., 2013). Along with insulin and catecholamines, adipocyte lipid metabolism is regulated by other endocrine factors including natriuretic peptides, the gastrointestinal hormone ghrelin, or paracrine/autocrine factors released by adipocytes or the SVF such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), leptin, or IL-6 (Deng and Scherer, 2010; Halberg et al., 2008).

In lipogenesis, FFA released from circulating lipoproteins by the action of lipases is up-taken by the adipocytes. Transmembrane lipid transfer requires the participation of a number of adapter proteins including fatty acid carrier proteins (FATP), the fatty acid translocase FAT/CD36 and fatty acid binding proteins (FABPs), both membrane-bound and cytosolic (FABP_{pm} and FABP_c) (Hotamisligil and Bernlohr, 2015). It is now known that FABPs are involved in the esterification of long chain fatty acids, interact with phospholipid membranes and FAT/CD36 and their expression is induced by insulin and fatty acids in adipocytes (Hotamisligil and Bernlohr, 2015). In these cells, both FAT/CD36

Summary

and several FATPs localize to plasma membrane microdomains that are enriched in sphingolipids, cholesterol and the proteins caveolins, the caveolae (Frühbeck et al., 2007). In adipocytes, caveolae are also enriched in the glucose transporter, GLUT4, especially upon insulin stimulation (Karlsson et al., 2002). In fact, caveolae, and its major component in adipocytes, caveolin-1 (CAV1), have been proposed to play an important role in lipid uptake and metabolism in this cell type (Frühbeck et al., 2007; Parton and del Pozo, 2013). In addition, caveolae act as signaling platforms inasmuch as they help compartmentalize and concentrate signaling molecules, as it is the case for insulin signaling in adipocytes (Frühbeck et al., 2007; Parton and del Pozo, 2013).

In obesity, which is defined as an excess of adiposity, the AT undergoes important molecular changes affecting both its cellular components, mature adipocytes and stromal-vascular fraction cells, and the extracellular matrix, leading to AT dysfunction (Kim et al., 2007; Hotamisligil, 2008; Sun et al., 2011). IR in obesity has been causally linked to AT fibrosis and hypoxia (Trayhurn, 2013) and immune cell infiltration and inflammation (Gregor and Hotamisligil, 2011) which, together with adipocyte hypertrophy (cell size increase) and hyperplasia (cell number increase), trigger several cellular stress processes that impair adipocyte response to insulin and cause adipocyte death (Kim et al., 2007). Among these processes, endoplasmic reticulum (ER) stress, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, autophagy, mechanical stress, and, as recently shown by us, impaired proteostasis and proteasome malfunction have been reported to disrupt normal adipocyte function in obesity (Hotamisligil, 2008; Matsuda y Shimomura, 2013; Díaz-Ruiz et al., 2015).

Bariatric surgery (BS) has proven extremely effective for reducing weight and improving health in morbidly obese subjects (Malkani, 2015; Mendez-Gimenez et al., 2015; Yu et al., 2015). Mechanical changes, brain-mediated suppression of appetite, and changes in gut hormones, microbiome and bile acids have been documented to contribute to BS-associated improvement of glucose and lipid homeostasis and inflammation (Aron-Wisnewsky et al., 2012; Clement, 2011; Appachi et al., 2011; Bays et al., 2009). Although the resolution of obesity-related metabolic comorbidities occurs well in advance of significant fat mass reductions, it is accepted that BS causes profound changes in AT biology which, in turn, strongly impact on systemic glucose utilization and metabolic health (Klement, 2011; Appachi et al., 2011; Bays et al., 2009; Malkani et al., 2015; Mendez-Gimenez et al., 2015; Dankel et al., 2010; Canello et al., 2005). In this line, a number of studies have reported that BS modifies AT secretory profile (Appachi et al., 2011) and the expression of genes involved in the regulation of adipocyte metabolism, inflammation, and extracellular matrix organization (Dankel et al., 2010; Henegar et al., 2008; Canello et al., 2005; Moreno-Navarrete et al., 2014). Notably, it has been reported that the degree of improvement in insulin sensitivity after BS may depend on AT features at pre-surgery such as adipocyte size or AT fibrosis (Eriksson-Hogling et al., 2015; Cotillard et al., 2014; Divoux et al., 2010). Indeed, obese subjects are not all equal with regards to the development of metabolic comorbidities but there is a subset of these individuals, known as

“metabolically healthy obese” (MHO) subjects, who remain insulin sensitive and have a favorable metabolic profile, low systemic inflammation, and decreased risk for T2D and cardiovascular disease, as compared to “metabolically unhealthy obese” (MUO) individuals (Blüher and Schwarz, 2014; Denis and Obin, 2013; Primeau et al., 2011). However, whether BS-induced weight loss causes differential adaptive changes in the AT according to the individuals’ metabolic status remain largely unknown.

Moreover, during adipocyte differentiation (i.e., adipogenesis) and adipocyte hypertrophy, the main cytoskeletal components of adipocytes (actin, tubulin and vimentin) undergo important expression and distribution rearrangements (Yang et al., 2013; Verstraeten et al., 2011; Lieber et al., 1996; Spiegelman and Farmer, 1982). A marked down-regulation of both actin and tubulin and up-regulation of vimentin are observed during adipocyte differentiation (Teichert-Kuliszewska et al., 1996). In addition, whereas in non-differentiated adipocytes (i.e., preadipocytes), actin organizes as stress fibers that are distributed throughout the cytoplasm, during late adipocyte differentiation, actin filaments localize to the cell cortex (Yang et al., 2013; Verstraeten et al., 2011). Vimentin forms cage-like structures around the lipid droplets during adipogenesis (Lieber et al., 1996), with the disassembly of vimentin filament network reducing the lipid droplet-forming capacity of 3T3-L1 cells (Verstraeten et al., 2011; Lieber et al., 1996). In addition, a role of the cytoskeleton in insulin-induced glucose uptake and lipogenesis in adipocytes has been also proposed (Kanzaki, 2006). Finally, actin also plays a role in the maintenance and function of caveolae (Ritcher et al., 2007).

The existence of a fourth component of the cytoskeleton, the septins, has been recently proposed (Mostowy and Cossart, 2012). Septins are 30–65 kDa GTP-binding proteins that form homo- and hetero-oligomeric complexes which can assemble into highly ordered polymers (Mostowy and Cossart, 2012). Reportedly, septins interact with other components of the cytoskeleton, i.e. actin and tubulin, and can profoundly influence cytoskeletal dynamics (Hall and Russell, 2004). In addition, septins interact with membrane phospholipids, acting as scaffolding platforms for protein recruitment and as diffusion barriers (Weirich et al., 2008; Hall and Russell, 2004). Interestingly, some septins have been localized to lipid rafts (Spencer et al., 2007), and proposed to regulate cell stiffness and cortical elasticity as well as to help anchor the actin cytoskeleton (Mostowy and Cossart, 2012; Maimaitiyiming et al., 2008). Septins are involved in different physiological processes and can contribute to the development of a wide range of diseases, including neoplasia and neurodegenerative disorders (Peterson and Petty, 2010). To date, at least 13 human septin genes have been identified (Hall et al., 2005). However, the functional relevance of septins has not yet been described in human adipocytes.

The present study was focused on understanding the mechanisms and pathways that are modified in the AT in response to BS according to the individuals’ metabolic status using a proteomic approach. We then characterized the structure, expression, regulation and function of a new

cytoskeleton component of adipocytes, SEPT11, which was identified in the human adipose tissue proteome. Finally, we explored the relationship of SEPT11 with obesity and insulin resistance.

MATERIALS AND METHODS

To pursue these objectives, we carried out a multicomparative proteomic analysis of the AT of morbidly obese subjects with distinct degrees of insulin sensitivity (normoglycemic -NG- vs. insulin resistant -IR-) before (Pre) and approximately one year after (Post) BS. Additionally, we employed multiple biochemical, molecular and cellular approaches to characterize the regulation, distribution, interactors, and function of SEPT11 in adipocytes.

To investigate the molecular changes that are modified in the AT at Pre- and Post-BS, we collected abdominal subcutaneous adipose tissue (SAT) samples from morbidly obese women ($BMI \geq 35.0$ kg/m²) (n = 18) before and one year after BS. Obese women were matched by BMI and age and stratified into two groups based on their insulin sensitivity: normoglycemic (NG; Glu < 100 mg/dL, HbA1c < 5.7%) or insulin resistant (IR; Glu: 100-126 mg/dL, HbA1c: 5.7-6.4%) (n = 9/group). A multi-comparative proteomic analysis was employed to identify differentially regulated SAT proteins by BS-induced weight loss and/or the degree of insulin sensitivity. The proteins identified by 2D-DIGE were analyzed in silico and some of the proteins were confirmed by quantitative western blot. Serum levels of metabolic, inflammatory, and anti-oxidant markers were also determined.

To characterize the new AT marker, SEPT11, database search and bioinformatics tools were employed to identify structural and functional domains in the amino acid sequence of mouse and human SEPT11. The expression and intracellular distribution of SEPT11 was explored in the murine adipocyte cell line, 3T3-L1 cells, during adipocyte differentiation (adipogenesis; day 3: preadipocytes, day 8-10: differentiated adipocytes) using immunocytochemistry and immunoblotting. In addition, the subcellular distribution of SEPT11 was explored by subcellular fractionation techniques in 3T3-L1 using antibodies against SEPT11 and different markers of diverse intracellular compartments and/or components, including GM130 (peripheral membrane protein), caveolin-1 (CAV1) (integral membrane protein of the caveolae), and β -actin (cytosolic protein). Overexpression and co-expression experiments of SEPT11 and other members of the septin family, SEPT2 and SEPT9, were carried out in 3T3-L1 cells to examine the morphological conformation of septin complexes in these cells, which were further examined by protein-protein interaction assays (GST pull-down or immunoprecipitation).

The relationship of SEPT11 with caveolae was examined by electron microscopy using an antibody against SEPT11, double immunocytochemistry against SEPT11 and the specific marker of caveolae, CAV1, subcellular fractionation of caveolae, and protein-protein interaction assays (GST pull-down and immunoprecipitation) using different antibodies and specific expression vectors.

In addition, to identify and characterize the interactome of SEPT11 we used a yeast two-hybrid assay (Y2H). Briefly, a yeast strain was transformed with a bait plasmid coding for SEPT11 and mated

with other strain expressing a cDNA library obtained from rat subcutaneous adipose tissue. Positive colonies were recovered, checked by PCR and purified for subsequent identification by DNA sequencing. We confirmed this data using GST pull-down techniques with specific constructs for GST-SEPT11 and several proteins identified by Y2H (GFP-FABP5, GFP-ARHGAP21, and GFP-Kinectin).

To investigate the effect of adipocyte hypertrophy and insulin resistance on SEPT11 content and distribution, we developed different *in vitro* models. Specifically, 3T3-L1 were exposed to TNF- α (to mimic adipose tissue inflammation in obesity), high glucose high insulin (to mimic the hyperinsulinemia and hyperglycemia associated to insulin resistance), palmitate or oleate (to mimic excess lipid upload in obesity). Along with morphological measurements (adipocyte size, lipid content), we measured the protein content of SEPT11, CAV1, and FABP5 content in these cells, and examined the distribution of these proteins in 3T3-L1 cells before and after oleate treatment. Furthermore, we silenced SEPT11 in 3T3-L1 cells using a commercial siRNA specific for SEPT11, and we checked the effect of SEPT11 silencing on the protein content of CAV-1 and FABP5 by western blot. Likewise, 3T3-L1 cells, treated or non-treated with oleate, and silenced or non-silenced for SEPT11, were used to measure the response to insulin (AKT, pAKT, ERK, pERK, IRS and pIRS by immunoblotting) and identify the role of SEPT11 in insulin signaling. To investigate the role of SEPT11 in the regulation of lipid metabolism, we evaluated the lipogenic and lipolytic rates of 3T3-L1 cells, silenced or not for SEPT11, and exposed to insulin and/or oleate.

Finally, to characterize SEPT11 in the human adipose tissue, we measured SEPT11 mRNA and protein content in subcutaneous AT (SAT) and omental AT (OAT) from lean (n=10), and obese patients [NG (n=24) and T2D (n=30)], as well as the mRNA levels of SEPT2, SEPT9, CAV1 and FABP5 in the same samples. To identify the cell type responsible of SEPT11 expression in both fat depots we carried out immunohistochemistry and real time PCR in adipocytes and the SVF. We also measured SEPT11 mRNA and protein content in omental adipocytes isolated from obese patients and treated with lipogenic stimuli (insulin, ghrelin or desacyl-ghrelin), lipolytic stimuli (leptin, isoproterenol or ANP) and pro-inflammatory stimuli (TNF α , LPS or TGF- β). Likewise, we investigated the relationship of SEPT11 with caveolae in human adipocytes, using double immunostaining and antibodies against SEPT11 and CAV1 in freshly isolated mature adipocytes as well as *in vitro* differentiated human adipocytes from the SVF of human adipose tissue at different stages of differentiation. A similar strategy was employed to examine the interaction of SEPT11 and the actin cytoskeleton in these cells.

RESULTS AND DISCUSSION

In our study, we found that BS caused comparable weight reductions and improved glucose homeostasis and plasma concentrations of triglycerides, LDL, and C-reactive protein (CRP) in IR and NG obese morbidly women. Moreover, the proteomic study revealed 37 differentially expressed

Summary

proteins that were classified using PANTHER algorithms into different subcategories according to biological processes, including three major groups: metabolic processes, cellular processes and immune system processes. According to this classification and different comparisons made between groups of patients we found differences in AT proteins related to inflammation, metabolic processes, cytoskeleton, mitochondria and angiogenesis. Briefly, we observed that BS enhanced the expression of three enzymes related to glycolysis/gluconeogenesis (PGM1, PCKGM, and DLDH) in SAT of both NG and IR obese women, while UGPA content decreased, which unveils novel biochemical pathways that can help improve glucose utilization after surgery-induced weight loss. This finding, in turn, is consistent with previous studies demonstrating that glucose oxidation by insulin improved after BS, while lipolysis increased (Camastra et al., 2011). Our 2D-DIGE analysis also revealed that two antioxidant markers, transferrin and catalase, were up-regulated in the AT of obese after BS. Together, these findings are suggestive of improved antioxidant defenses in the AT after weight loss, which might be associated with the reduction in the plasma levels of oxidative stress indicators observed in severely obese subjects after BS (da Silva et al., 2012; Joao Cabrera et al., 2010). Additionally, we observed that serum CRP decreased and the anti-inflammatory adipokine, adiponectin, increased in NG and IR women Post-BS. This data highlights the beneficial effects of BS on obesity-related systemic inflammation. In line with this, we and others have recently shown increased levels of inflammatory markers in SAT (Naukkarinen et al., 2014) of MHO *vs.* MUO individuals. We have confirmed and extended these findings, by demonstrating that JNK activity was down-regulated in IR women Post-BS, thus indicating that JNK activation is reversible. MHO and MUO subjects exhibit marked differences in key processes such as oxidative stress, ER stress, cellular proteostasis, inflammation, or fibrosis (Díaz-Ruiz et al., 2015; Denis and Obin, 2013; Primeau et al., 2011). In this line, several markers of mitochondrial function were also regulated by BS in NG *vs.* IR. Thus, after BS, IR individuals exhibited increased levels of mitofilin and remarkably, the SAT of IR women Post-BS also exhibited a trend towards increased protein content of PGC-1 α , suggesting that BS may enhance mitochondrial biogenesis and activity in SAT of obese IR subjects. These changes were accompanied by the up-regulation of SOD, supporting the view that surgery evokes the activation of antioxidant defenses in this subgroup. In contrast, mitofilin and PGC-1 α were high in NG women at Pre-BS and decreased after BS. Interestingly, we have recently shown that mature adipocytes of morbidly obese NG subjects differ from their IR counterparts by their capacity to cope with the increased levels of oxidative stress associated with obesity (Díaz-Ruiz et al., 2015). In all, these and our present results suggest that surgery evokes selective changes in the SAT of obese IR subjects in a way that it acquires, at least in some aspects, the molecular features of the AT in the NG obese state at Pre-BS, while NG obese AT tends to acquire a lean-like phenotype. Our data demonstrates that morbidly obese subjects do not represent a homogeneous population and indicates that, despite BS induces molecular changes indicative of improved AT function in individuals at either low or high metabolic risk, the final outcomes in terms of AT molecular remodelling greatly depend on the initial

individual metabolic status. Notably, it has been reported that obese individuals with higher baseline fasting insulin levels benefit more from BS than those with lower baseline values with respect to reduced mortality and incidence of T2D (Sjostrom, 2013). Together, these and our present data support the notion that obese individuals might be stratified, at least in terms of insulin responsiveness, when defining BS intervention strategies.

Herein, we also showed that the proteomic signature of IR SAT was more similar to that of NG at Post-BS than at Pre-BS, yet there remained significant differences between the two groups of subjects at Post-BS, despite comparable weight reductions. Specifically, the decrease in body weight was accompanied by dissimilar changes in the expression of vimentin, TCPB, and a new component of the cytoskeleton, SEPT11, in NG *vs.* IR SAT. Given the important roles played by the cytoskeleton in adipogenesis and adipocyte hypertrophy and functional responses, we decided to characterize, for the first time, this protein in the AT.

Indeed, the presence of SEPT11 has not been yet described in human adipose tissue. Herein, we have shown that SEPT11 expression is higher in adipocytes than in the SVF, in spite of the fact that some septins are reportedly expressed by cell types of the SVF (Huang et al., 2008; Hanai et al., 2004). Moreover, a higher expression of SEPT11 was found in subcutaneous fat compared with omental adipose tissue. It is well-known that visceral fat shows higher inflammation and sensitivity to the action of catecholamines, while subcutaneous adipose tissue is more responsive to insulin (Rodríguez et al., 2007). Accordingly, we observed that SEPT11 is positively related to markers of adiposity in omental fat and with parameters of insulin resistance in subcutaneous adipose tissue. Additionally, SEPT11 mRNA and protein was higher in both subcutaneous and omental AT of obese subjects than in lean individuals, while no differences were found between insulin-sensitive and insulin-resistant obese subjects, suggesting that the regulation of SEPT11 is more related to the adipocyte size rather than to insulin resistance. In this line are our results showing that exposure of differentiated 3T3-L1 cells to oleate, which induced adipocyte hypertrophy without causing insulin resistance, or of *in vitro* differentiated human adipocytes to insulin increased SEPT11 protein content. In contrast, adipogenesis did not modify SEPT11 levels in 3T3-L1 cells though extensive reorganization of SEPT11, from long linear bundles resembling actin stress fibers to submembranous structures, was apparent during differentiation in both murine and human adipocytes. These changes are reminiscent of the actin cytoskeleton rearrangements occurring during adipogenesis (Yang et al., 2014) and support a functional interaction between SEPT11 and the actin cytoskeleton in adipocytes, as it has been established for both SEPT11 and other septins in other cell types (Saarikangas and Barral, 2011; Gladfelter, 2014; Mavrakis et al., 2014; Hanai et al., 2004).

Along with cytoskeletal components, all septins interact with each other to form hetero-oligomeric complexes (Nagata et al., 2004). Herein, we demonstrate, by immunoprecipitation, overexpression studies and gene expression measurements, the direct interaction of SEPT11 with

Summary

SEPT2 and SEPT9. Moreover, we also observed that the specific conformation of SEPT11-containing complexes depends on the composition of the complexes, so that, when transfected alone, SEPT11 forms short filaments, while it also assembles into rings when co-expressed with SEPT2 and forms large filaments when co-expressed with SEPT9. In all, these findings suggest that the filament and ring-like assemblies observed for endogenous SEPT11 in 3T3-L1 and human adipocytes may be composed of complexes of this protein with SEPT2 and/or SEPT9. Notably, SEPT2 and SEPT9 gene expression in the adipose tissue in relation to obesity and insulin resistance markedly differ from that observed for SEPT11. It is plausible that the dissimilar transcriptional changes of SEPT2, SEPT9 and SEPT11 might affect polymer structure and function. In fact, several studies support the association of changes in both the expression of septins and the resulting stoichiometry of septin complexes with a number of diseases (Peterson and Petty, 2010; Hall and Russell, 2012).

Additionally, our confocal microscopy, electron microscopy, GST pull-down and immunoprecipitation assays, and subcellular fractionation assays revealed that SEPT11 is located to the caveolae of mature adipocytes, likely as a peripherally bound protein, wherein it associates with the main component of caveolae, CAV1. We also found that the expression of CAV1 is up-regulated in the obese adipose tissue, which is in accordance with other studies (Catalán et al., 2008), and correlates with that of SEPT11 in both fat depots. It is known that the septins can be recruited by actin or PI(4,5)P2 (Zhang et al., 1999; Bertin et al., 2010; Huang et al., 2008), which are both present in caveolae (Fujita et al., 2009).

Our biochemical and microscopic studies suggest a functional role of SEPT11 in caveolae. Moreover, SEPT11 silencing decreased CAV1 protein content and the phosphorylation rate (i.e., activity) of the insulin signaling intermediate, AKT, upon insulin treatment, thus suggesting a relevant role for this protein in caveolae-associated insulin signaling. In this line, septins have been proposed to act as diffusion barriers that help compartmentalize cellular membranes (Hall et al., 2012; Fung et al., 2014; Cao et al., 2009; Mostowy y Cossart, 2012; Bridges and Gladfelter 2015). Accordingly, our data suggest that SEPT11 association with caveolae can help maintain the function of caveolae in the compartmentalization and regulation of signaling cascades (Parton and Simons, 2007). Septins also serve as subcellular scaffolds for protein recruitment (Mostowy and Cossard, 2012). We identified several SEPT11 interacting proteins by Y2H screening and immunoprecipitation, including Rho GTPases related to the actin cytoskeleton (ARHGAP21 and ARHGAP11A), and FABP5, among other proteins. FABP5 has been proposed to mediate fatty acid uptake and to facilitate the transport of lipids to specific compartments in the cell, such as to the lipid droplet for storage (Iso et al, 2013; Hotamisligil y Bernlohr, 2015; Furuhashi y Hotamisligil, 2008). In accordance with this view, we observed that exposure of cells to oleate, which binds with high affinity to FABP5 (Weirich et al., 2008) induced the accumulation of this protein at the surface of lipid droplets. Likewise, in agreement with previous reports (Parton and del Pozo, 2013), we observed that caveolin-1 and SEPT11

redistributed from the plasma membrane to lipid droplets in oleate-loaded 3T3-L1 cells. Moreover, our triple labeling microscopic studies showed that SEPT11 co-localized with both caveolin-1 and GFP-FABP5 at the lipid droplet surface in oleate-treated cells. When viewed together, these results indicate that the caveolin-1/SEPT11 interaction extends from caveolae to lipid droplets, wherein SEPT11 presumably also associates with FABP5. It has been proposed that caveolins modulate transmembrane fatty acid movement (Pilch et al., 2011) whereas the lipid droplet-caveolin pool might play a role on lipid droplet expandability (Blouin et al., 2009). Interestingly, our silencing experiments showed that loss of SEPT11 led to a decrease in lipid accumulation in response to insulin and decreased activation of insulin signaling (i.e. Akt phosphorylation). Our findings showing that the negative impact of SEPT11 down-regulation on lipid accumulation was more dramatic in cells challenged with oleate, together with the effects of this fatty acid on SEPT11 intracellular redistribution, suggest a link between SEPT11 and caveolae-to-lipid droplet transport of fatty acids. Once at the lipid droplet, SEPT11 might provide a platform to facilitate the compartmentalization of caveolin-1 and/or FABP5 at the lipid droplet surface. It is worthy to mention that caveolin-1 has been shown to modulate lipolysis by coupling protein kinase A activity to perilipin phosphorylation (Cohen et al., 2004), and FABPs (FABP4 and 5) bind to and activate hormone sensitive lipase (HSL) on the lipid droplet surface in the presence of oleate (Jenkins-Kruchten et al., 2003). In accordance with these findings, we observed that oleate-induced lipolysis, an effect that has been previously reported to occur in 3T3-L1 cells exposed to this fatty acid (Xie et al., 2006), was reduced in SEPT11-silenced adipocytes. When viewed together, our findings support a role for SEPT11 in the regulation of lipid uptake, traffic and storage in adipocytes, which is likely mediated through its interaction with both caveolin-1 and FABP5. Furthermore, our data suggest that SEPT11 serves different cellular functions at different cellular locations (i.e., caveolae and lipid droplets), which might act in concert to support SEPT11 actions on lipid metabolism.

In summary, the data presented in this work, together with those previously reported, indicate that BS evokes significant molecular rearrangements indicative of improved AT function in morbidly obese women at either low or high metabolic risk, though selective adaptive changes in key cellular processes occur depending on the initial individual's metabolic status. Herein, we have also identified SEPT11 as a novel component of the cytoskeleton in adipocytes, wherein this protein assembles into either filaments or rings depending on the stage of adipocyte differentiation and its selective interaction with other septins expressed by the cells. In this study, we also show that SEPT11 associates with CAV1 in adipocyte caveolae under unstimulated conditions and redistributes, together with CAV1 and FABP5, to the surface of lipid droplets upon fatty acid loading. These results, together with our functional and expression studies, support a regulatory role of SEPT11 in lipid traffic and metabolism. Together, these results broaden our understanding of the remodeling of the cytoskeleton during the onset of obesity and insulin resistance and open new avenues for research on the control of lipid storage and metabolism in adipocytes.

1. Introducción

1.1. Tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) ha sido considerado tradicionalmente como un almacén pasivo de lípidos. Sin embargo, actualmente se acepta que es un órgano altamente dinámico, encargado de almacenar el exceso de energía en forma de ácidos grasos esterificados a glicerol (triacilglicéridos-TAG) y gestionarlo en periodos de deficiencia nutricional de una forma regulada. Además, el TA constituye un sitio fundamental de captación de glucosa, necesaria para el funcionamiento celular y la síntesis de glicerol (Malagón et al., 2013).

Por otra parte, además de intervenir en la gestión de las reservas energéticas, el TA actúa como un órgano endocrino, que secreta moléculas señalizadoras, las adipocinas, que incluyen citoquinas, enzimas, proteínas de la matriz, hormonas y factores de crecimiento, que ayudan a sensar el estado nutricional y metabólico del organismo. Además, el TA también expresa receptores para la mayoría de estos factores. De esta manera, el TA es capaz de responder a diferentes estímulos metabólicos mediante una serie de mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos, encargándose de regular la homeostasis energética, la sensibilidad a la insulina, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, el crecimiento celular y la inflamación, o la reproducción, entre otros procesos biológicos (Havel, 2004; Bays et al., 2008) (Figura 1).

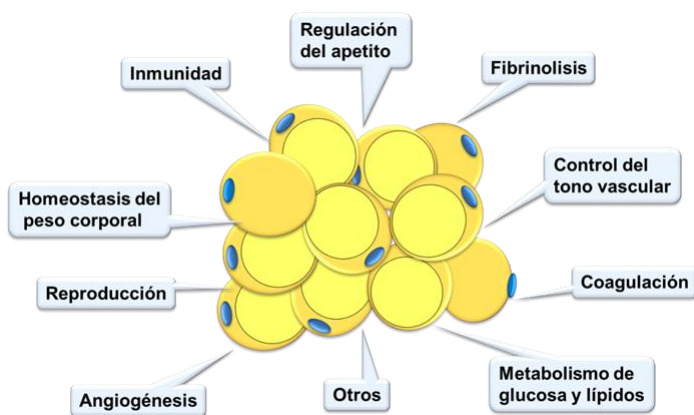


Figura1: Funciones del tejido adiposo. Tejido adiposo y sus efectos sobre diversas funciones fisiológicas (modificado de Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2005).

1.1.1. Distribución y organización del tejido adiposo

En mamíferos existen dos tipos principales de tejido adiposo que se diferencian por su distribución, color, vascularización y actividad metabólica: el tejido adiposo blanco (TAB), que está ampliamente distribuido y que constituye la mayor parte de la grasa corporal, y el tejido adiposo marrón (TAM), productor de calor. Ambos depósitos tienen la capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, si bien presentan claras diferencias en cuanto a su morfología, distribución, expresión génica, así como en su función (Wajchenberg, 2000).

El tejido adiposo blanco constituye el mayor reservorio de energía, de componentes de membranas y de moléculas señalizadoras de naturaleza lipídica del organismo. Bajo el control de los sistemas nervioso y endocrino, participa en la regulación de la homeostasis lipídica, almacenando la energía sobrante en forma de triacilglicéridos, liberando ácidos grasos (AG) y glicerol cuando el gasto energético excede la ingesta de energía. Dentro de los principales depósitos del TAB se incluye la grasa visceral intra-abdominal (TAV) y la subcutánea (TASC) situada bajo la piel y/o a lo largo de todo el cuerpo, respectivamente (Kelley et al., 2000). Estos depósitos presentan importantes diferencias en cuanto a su actividad metabólica: el TAV presenta una mayor sensibilidad a catecolaminas y glucocorticoides y por tanto, mayor actividad lipolítica comparado con TASC, mientras que este último se caracteriza por una mayor sensibilidad a insulina y a las drogas antidiabéticas tiazolidinedionas (TZD) (Wajchenberg, 2000). Además, los preadipocitos de TASC presentan una mayor capacidad de diferenciación y los adipocitos una menor tasa apoptótica en comparación con los de TAV (Tchkonina et al., 2005). Estas diferencias también se extienden a su perfil secretor; así TAV libera mayores cantidades de citoquinas (IL-6, TNF- α) y quimioquinas que TASC (Fain et al., 2004), mientras que TASC secreta mayores niveles de adiponectina (Phillips et al., 2008). En general, en este trabajo se hará referencia al tejido adiposo blanco, ya sea TASC o TAV, y por tanto nos referimos a él cuando hablamos de tejido adiposo.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, el tejido adiposo marrón se caracteriza por poseer funciones diferentes al TAB. Así, se encarga de mantener la temperatura corporal vía termogénesis mediante la disipación de la energía almacenada en forma de calor. Esta propiedad es debida a la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1), que desvincula la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP, resultando en la generación de calor. En neonatos, que presentan una gran capacidad termogénica (Clarke et al., 1997), se han detectado grandes cantidades de TAM, localizadas predominantemente alrededor de los órganos internos y en las regiones intercapsular y supraclavicular (Cinti, 2006), constituyendo en conjunto entre el 2-4% del peso al nacer (Alexander y Bell, 1975; Hull y Segall, 1965). Los adipocitos marrones, al igual que los blancos, puedan secretar localmente citoquinas, lo que pone de manifiesto la importante función endocrina de este tejido (Viengchareun et al., 2002). En este sentido en 2006, se ha confirmado la importancia fisiológica de la función secretora del TAM, al observar que una disminución del mismo, en combinación con una dieta alta en grasas, provocó el desarrollo de obesidad, diabetes, resistencia a insulina (IR) e hiperglucemia en ratones (Hamman et al., 2006).

Recientemente, un estudio demostró que los humanos adultos también poseen grasa marrón funcional, aunque en cantidades variables en relación con la edad, el género, la temperatura y el peso corporal (Virtanen et al., 2009). En relación con este descubrimiento, con posterioridad se ha descrito la existencia de un tercer tipo de grasa, la grasa “beige” o “brite” que, como el TAM, tiene capacidad termogénica, aunque la principal diferencia con el TAM es la presencia de adipocitos bifuncionales,

lo que le otorga la habilidad de ser reservorio energético y en presencia de señales termorreguladoras producir calor (Wu et al., 2012), a diferencia de los adipocitos marrones, que derivan de células de linaje muscular caracterizadas por la expresión del factor de transcripción mitogénico 5 (myf-5), los adipocitos beige y los adipocitos blancos compartirían un origen común (Wu et al., 2012).

Estos hallazgos han abierto una nueva vía en los posibles tratamientos contra la obesidad, ya que este tipo de tejido adiposo puede estimularse mediante frío a diferentes hormonas, como la irisina, que activan la expresión de la termogenina, con el consecuente aumento del gasto energético.

1.1.2. Componentes del tejido adiposo

Los adipocitos constituyen el principal componente celular del tejido adiposo. Estas células se encuentran inmersas en una matriz de colágeno en la que también residen células madre mesenquimales, preadipocitos, terminales nerviosos, células sanguíneas y tejido vascular que, en conjunto, constituyen la denominada fracción de estroma vascular (FEV) (Malagón et al, 2013). Todos estos componentes son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo y en consecuencia, participan en la regulación del metabolismo glucídico y lipídico y en la producción y liberación de adipoquinas.

1.1.2.1. Adipocitos y FEV

Los adipocitos constituyen el principal componente celular del TA. Son células esféricas de entre 20-200µm de diámetro que contienen una gota lipídica (GL) (unilocular-adipocitos del TASC) o varias gotas lipídicas (multilocular-adipocitos del TAV) que equivale a más del 95% de su peso y que desplaza al resto de los orgánulos celulares hacia la periferia. El adipocito es una célula que puede cambiar fácilmente debido a cambios externos, está programado para sintetizar, captar, almacenar o liberar energía en forma de ácidos grasos en función de las necesidades fisiológicas y las demandas del organismo. Además, el adipocito tiene la capacidad de ejercer una fuerte influencia sobre el resto de las células del organismo mediante la secreción de adipoquinas (Burcelin, 2013).

A su vez, el TA también contiene las proteínas estructurales [colágenos tipo I, IV (el más abundante), V, VI, VII, VIII y IX] y proteínas de adhesión (fibronectina, laminina, elastinas y proteoglicanos) que componen la matriz extracelular (Pasarica et al., 2009; Divoux y Clément, 2011) y que, con las terminaciones nerviosas, estroma vascular, células inmunes (leucocitos, macrófagos), fibroblastos, preadipocitos y células madre mesenquimales conforman, en conjunto, la fracción de estroma vascular (FEV) (Ahima y Flier, 2000). Este importante componente del TA presenta importantes modificaciones en relación a la adipogénesis y a estados fisiopatológicos, tales como la obesidad, insulino resistencia y diabetes tipo 2 (DT2).

1.1.3. Adipogénesis

El preadipocito es una célula de tipo mesenquimal derivada de células pluripotenciales llamadas a ser adipocitos mediante diferentes estímulos. El proceso de adipogénesis sigue una secuencia de pasos muy bien ordenados y caracterizados que incluyen, de forma sucesiva, las siguientes fases: determinación y parada del crecimiento celular, expansión clonal y diferenciación terminal (Otto y Lane, 2005). Concretamente, tras la parada del ciclo celular, y en respuesta a hormonas y factores de crecimiento, los preadipocitos llevan a cabo una o dos rondas de expansión clonal antes de iniciarse los procesos de activación transcripcional de genes marcadores del adipocito y la adquisición del fenotipo adipocitario (Farmer, 2006; Ràfols, 2014). En una primera fase, intervienen varios miembros de la familia de proteínas de unión a CCAAT/*enhancer* (C/EBP β y C/EBP δ) que, a su vez, son los responsables del inicio de la activación de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP α , responsables estos últimos de la expresión de los genes adipogénicos que inducen la diferenciación de los fibroblastos a adipocitos. Así, durante la primera fase, los preadipocitos se redondean y se induce la expresión de marcadores adipogénicos como la lipoproteína lipasa (LPL) (MacDougald y Lane, 1995; Tong et al., 2005). La inducción de PPAR γ y C/EBP α promueve la expresión de los principales genes que determinan el fenotipo adipocitario, como la sintasa de ácidos grasos (FAS), la glicerofosfato deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa, el transportador de glucosa GLUT 4, el receptor de insulina y la chaperona de lípidos aP2/FABP, entre otros (Tanaka et al., 1997; Spiegelman et al., 1993). En particular, PPAR γ es suficiente para inducir la expresión de la mayoría de los genes adipocitarios, aunque C/EBP α es necesario para conferir al adipocito sensibilidad a la insulina (Wu et al., 1999; Tchkonina et al., 2005). Gracias a la acción concertada de ambos factores, los adipocitos van acumulando gotas lipídicas, que aumentan de tamaño de forma progresiva y se fusionan hasta formar una o dos grandes gotas lipídicas que ocuparán gran parte del citoplasma.

En definitiva, además de importantes cambios en la expresión diferencial de genes que intervienen en la aparición del fenotipo adipocitario, la adipogénesis conlleva importantes cambios en la forma y el tamaño celular, que son dependientes de los diferentes componentes del citoesqueleto celular.

1.1.4. Citoesqueleto de los adipocitos

La adipogénesis se acompaña de marcados cambios morfológicos que, entre otros, incluyen el reordenamiento y la regulación de la biosíntesis de los componentes del citoesqueleto, incluida la red de actina, de microtúbulos y de los filamentos intermedios de vimentina (Spiegelman y Farmer, 1982; Yang et al., 2013). En particular, durante la adipogénesis la vimentina presenta inicialmente una estructura fibrilar, para posteriormente pasar a formar estructuras en forma de red (*cage-like*) alrededor de las gotas lipídicas (Franke et al., 1987; Lieber y Evans, 1996). De hecho, tanto el desensamblaje como la agregación de los filamentos de vimentina al inicio o en las primeras fases de la adipogénesis

reducen la capacidad de formación de las gotas lipídicas en células 3T3-L1 (Lieber y Evans, 1996; Verstraeten et al., 2011). La vimentina también puede ocupar una posición cortical, subyacente a la membrana plasmática, en adipocitos que contienen gotas lipídicas de gran tamaño (Verstraeten et al., 2011).

Los microtúbulos también tienen un rol importante durante la diferenciación, de hecho, estos componentes del citoesqueleto son sensibles a cambios externos, como morfología celular y grado de confluencia produciendo una disminución en la expresión de tubulina en adipocitos maduros (Spiegelman y Farmer, 1982). Adicionalmente, la adipogénesis es dependiente en gran medida de las señales que emiten los microtúbulos. Específicamente, la α -tubulina es acilada por MEC-17, SIRT2, y HDAC6, durante la diferenciación, esta isoforma acilada favorece el inicio de la remodelación del citoesqueleto al ser escindida por katanin lo que en conjunto ayuda a formar gotas lipídicas e iniciar la transición morfológica hacia adipocitos (Yang et al., 2013), así mismo, se ha visto que la rotura de microtúbulos con nocodazol se asocia con un aumento en la acumulación de triglicéridos intracelulares (Feng et al., 2010) lo que favorece considerablemente la adipogénesis.

Finalmente, la actina sufre un importante proceso de remodelado durante la diferenciación de los adipocitos. Concretamente, en estadios tempranos de la diferenciación, antes de que comiencen a acumularse gotas lipídicas, la actina se organiza en forma de fibras de estrés que se distribuyen por todo el citoplasma de las células. A medida que prosigue la diferenciación, se produce el desensamblaje de las fibras en la región central de las células, especialmente en las zonas de formación de gotas lipídicas y, posteriormente, los filamentos de actina desaparecen del centro celular para distribuirse en el córtex (Yang et al., 2013; Verstraeten et al., 2011). Se ha propuesto que el remodelado de actina es necesario para la formación de las gotas lipídicas durante la adipogénesis ya que controla la fusión y expansión de estos orgánulos (Yang et al., 2013). Concretamente, se ha propuesto que la proteína de interacción con la actina, cofilina-1, es reclutada por el complejo formado por la proteína de andamiaje, 14-3-3 β , y la proteína asociada al retículo endoplásmico, seipin, lo que provoca el desensamblaje de las fibras de estrés que rodean a las gotas lipídicas en formación (Yang et al., 2013). La idea de que el desensamblaje de la actina es necesario para que transcurra el proceso de adipogénesis está apoyada por la observación de que el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con latrunculina B, que secuestra los monómeros de actina impidiendo su polimerización, promueven la adipogénesis en estas células (Feng et al., 2010; Yang et al., 2013). Por su parte, en células diferenciadas, la actina cortical se distribuye en asociación a las caveolas (Ritcher et al., 2007), en las que se ha propuesto que este componente del citoesqueleto es importante para el mantenimiento y función de estas estructuras (Frühbeck et al., 2007). Adicionalmente, se ha descrito que la polimerización de la actina cortical está regulada por la insulina que, entre otros procesos, induce la despolimerización de la actina cortical, permitiendo con ello la exocitosis de las vesículas que

transportan GLUT4 y, con ello, la inserción de dicho transportador en la membrana plasmática (López et al., 2009).

1.1.5. Septinas

Recientemente se ha descrito unas GTPasas conservadas de 30-65 kDa, denominadas septinas (SEPT), que conforman estructuras en fibras cortas, anillos y filamentos (Mostowy y Cossart, 2012). Estas proteínas fueron descubiertas por primera vez en 1976 mediante estudios de microscopía electrónica de la reproducción de *Saccharomyces cerevisiae* (Byers y Goetsch, 1976). Así, Byers y Goetsch (1976) describieron que, durante la gemación de levaduras, se organizaba un anillo de filamentos de 10 nm en el cuello que marca la intersección entre la célula madre y la célula hija, similar al anillo de actina y miosina que se organiza en la citocinesis de células eucariotas.

Las septinas han sido catalogadas como el cuarto componente del citoesqueleto debido a su apariencia, así como por su asociación con las membranas celulares y con otros componentes del citoesqueleto, como la actina y la tubulina. Sin embargo, a diferencia de los filamentos de actina y microtúbulos, las septinas no son polares, lo cual se asemeja a los filamentos intermedios (Mostowy y Cossart, 2012). Desde el descubrimiento de las septinas en levaduras, se han ido identificado secuencias homólogas en hongos, protistas y en casi todos los organismos eucariotas, incluyendo los humanos (excepto en plantas) (Nishihama et al., 2011; Pan et al., 2007). El número de septinas presentes varía entre los organismos (Kinoshita, 2003; Nguyen et al., 2000). Por ejemplo, *Caenorhabditis elegans* tiene tan sólo 2 miembros de la familia de septinas, *Saccharomyces cerevisiae* tiene 7 miembros, *Drosophila melanogaster* tiene 5 miembros, mientras que ratones y humanos presentan 13 septinas diferentes (septinas 1-12 y 14) (SEPT13 es un pseudogen) (Kinoshita, 2003; Mostowy y Cossart, 2012). Por otra parte, Kinoshita y Cao et al (Kinoshita, 2003; Cao et al., 2009) clasificaron las septinas de mamíferos en 4 grupos atendiendo a sus secuencias aminoacídicas: el grupo de SEPT2 (que incluye a SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5), de SEPT3 (SEPT3 y SEPT12), de SEPT6 (SEPT6, SEPT8, SEPT9, SEPT10, SEPT11, SEPT14) y, finalmente, de SEPT7 (SEPT7).

Las septinas pertenecen a la familia de GTPasas, *P-loop* NTPasas, que incluye la superfamilia de GTPasas de bajo peso molecular Ras, factores de traducción, la superfamilia OBG/HflX y la de las ATPasas miosina-quinasina (Weirich et al., 2008). A nivel estructural, las septinas están conformadas por una región central bucle (*loop*), que contiene sitios de unión a GTP, y regiones variables N- y C-terminal, que pueden cambiar entre las diferentes septinas (Fung et al., 2014). En la región N-terminal, las septinas presentan una región polibásica que se puede unir a fosfoinosítidos de membrana, concretamente fosfatidilinositol 4,5-bifosfato y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (Casamayor y Snyder, 2003; Zhang et al, 1999). Por su parte, el dominio de unión a GTP central, que incluye varias secuencias conservadas entre septinas (G1-G4), puede unirse e hidrolizar con GTP (Field et al., 1996; Mendoza et al, 2002; Sheffield et al., 2003; Versele y Thorner, 2004). Se ha sugerido que la hidrólisis

del GTP contribuye a la conformación de complejos de septinas ya que formas mutadas de algunas septinas no pueden unir GTP, lo que cambia en algunos casos su distribución y/o función, además de la interacción entre ellas (Figura 2) (Casamayor y Snyder, 2003; Hanai et al., 2004; Kinoshita et al., 1997; Robertson et al., 2004; Vega y Hsu, 2003). A continuación del dominio de unión a GTP, se encuentra una secuencia de 53 aminoácidos altamente conservada y de función desconocida, denominada el elemento único de septinas (*septin unique element*; SUE), y la región variable C-terminal, que, salvo en el grupo de SEPT3, puede contener uno, dos o tres dominios de tipo *coiled coil*, (Mostowy y Cossart, 2012). Se ha sugerido que este último dominio ayuda a facilitar la interacción con otras septinas u otros sustratos, así como el ensamblaje de los filamentos y proporcionarles estabilidad (Casamayor y Snyder, 2003; Versele y Thorner, 2005; Mostowy y Cossart, 2012).

Las septinas conforman complejos hetero-oligoméricos, que se pueden asociar para formar desde dímeros hasta octámeros dependiendo del organismo. Como los mamíferos tienen 13 genes que codifican para diferentes septinas, existe la posibilidad de la conformación de estructuras grandes y complejas que van desde tres hasta ocho o quizá más septinas interaccionando entre sí y cuya combinación varía entre los 4 grupos de septinas (Kinoshita et al., 2002; Lukoyanova et al., 2008; Kim et al., 2011; Sellin et al., 2011). Un ejemplo de los complejos que pueden conformar es el complejo SEPT7- SEPT11-SEPT9, hallado en fibroblastos embrionarios de rata REF52 (Nagata et al., 2004), o el complejo SEP2-SEPT6-SEPT7, del cual se tiene ya su estructura cristalográfica, y en el que SEPT6 puede ser reemplazado por SEPT8, SEPT10 o SEPT11 (Kinoshita, 2003; Hall et al., 2005). Otros complejos identificados mediante técnicas bioquímicas incluyen SEPT4-SEPT5-SEPT8, SEPT5-SEPT7-SEPT11 y SEPT3-SEPT5-SEPT7, aunque se estima que debe haber más combinaciones (Nakahira et al., 2010).

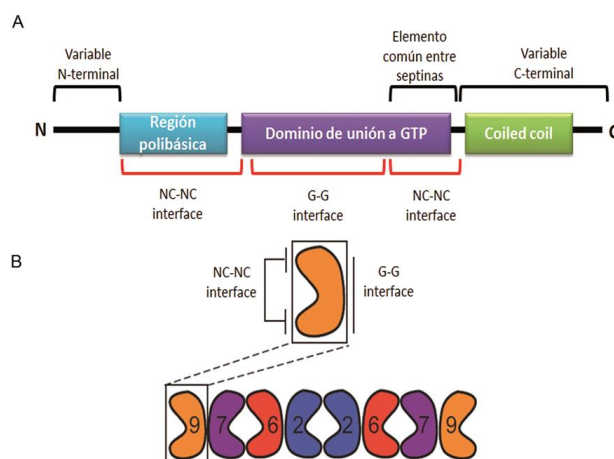


Figura 2: Ilustración de la estructura de las septinas y la conformación de complejos. (A) Ilustración de los diferentes dominios de las septinas, las interfases NC-NC y G-G indicadas en rojo están involucradas en la interacción septina-septina y con otras proteínas. (B) Ilustración de cómo puede ocurrir el enlace entre las diferentes septinas mediante sus interfases NC-NC (regiones amino-terminal, N, o carboxi-terminal, C, flanqueadas y conservadas por donde se enganchan las septinas) y G-G (sitio que permite la unión de nucleótidos en la región central de unión a GTP de las septinas) (Modificado de Weirich et al., 2008; Mostowy y Cossart, 2012; Pham et al., 2014).

Los polímeros de septina se conforman por la dimerización entre un sitio específico de unión a GTP llamado interfaz G (G-G) de una septina con la interfaz G-G de otra septina, o por la interacción de una región N-terminal y otra C-terminal (NC-NC) con la región NC-NC de otra septina (Figura 2) (Weirich et al., 2008; Mostowy y Cossart, 2012). Como ya se mencionó previamente, en los mamíferos, las septinas pueden llegar a unirse entre sí conformando estructuras complejas. Kim et al., (2011) demostraron que para mantener la estequiometría y estabilidad de dichos complejos de septinas es necesaria la hidrólisis de GTP. A su vez, si las septinas se encuentran en monocapas de lípidos ricas en fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, PI(4,5)P₂, tienen mayor facilidad para reclutar y polimerizar septinas entre sí (Zhang et al., 1999; Bertin et al., 2010; Huang et al., 2008). En este sentido, la unión de varias septinas entre sí, así como la presencia de diferentes factores ayudan a favorecer una morfología anillada o filamentosa. Específicamente, las proteínas que se unen a Rho GTPasas (Kinoshita, 2003; Sheffield et al., 2003), cdc42 (proteína importante en la organización de filamentos de actina) (Sadian et al., 2013) y la actina (unida a través de la miosina tipo II a las septinas) (Joo et al., 2007) pueden estar implicadas en el ensamblaje de las septinas para conformar filamentos (Joberty et al., 2001; Kinoshita et al., 2002; Xie et al., 1999), aun así es importante mencionar que las septinas también pueden conformar filamentos al unirse entre sí, como es el caso de SEPT2, esto depende del grado de estabilidad de las interfaces y los dominios *coiled-coil* presentes en su estructura (Mendoza et al., 2002). Por otra parte, la formación de anillos se ha atribuido como un resultado de la asociación de las septinas a membranas plasmáticas o por la formación de curvaturas intrínsecas en los complejos. Actualmente se considera que la conformación de anillos también es debida al reordenamiento de actina (Kinoshita et al., 2002) y la estabilidad de los microtúbulos (Sellin et al., 2011) adicionalmente, las septinas también pueden conformar estructuras anilladas por sí solas (Kinoshita et al., 2002).

Las septinas también interactúan con otras proteínas, como proteínas de membrana (Barral et al., 2000; Dobbelaere y Barral, 2004; Zhang et al, 1999) y con componentes del citoesqueleto tales como actina (Kinoshita et al, 2002; Kinoshita et al, 1997) y tubulina (Spiliotis et al, 2005; Surka et al, 2002). En la literatura está bien documentada la interacción existente entre septinas con actina y/o tubulina en células eucariotas y se ha dado gran importancia a esta interacción en el desarrollo de la función que puedan desempeñar las septinas (Fung et al., 2014; Kinoshita et al., 2002; Kremer et al., 2005). Se han identificado varias proteínas que median la interacción de las septinas con el citoesqueleto de actina, como la proteína de unión a actina, anillina, o la miosina II, que se sugiere que permiten el uso del citoesqueleto de actina como base para el ensamblaje de las septinas (Kinoshita, 2003; Mostowy y Cossard, 2012). Entre las proteínas que podrían mediar la interacción con la actina están varios efectores de la Rho GTPasa reguladora de la reorganización de la actina, cdc42 (Allen et al., 1997), como las proteínas BORG (*binders of RHO GTPases*), que se ha demostrado que interactúan con SEPT6 y SEPT7 (Mostowy y Cossart, 2012; Sadian et al., 2013). Más aún, dada la estrecha asociación de las septinas y el citoesqueleto de actina en funciones como la

formación de filamentos, fagocitosis y la motilidad bacteriana dependiente de actina, se ha sugerido que las septinas podrían asociarse con la maquinaria de polimerización de los filamentos de actina tales como el complejo ARP2/3, o la familia de proteínas WASP (*Wiskott–Aldrich syndrome protein*), controlando de esta forma la polimerización de la actina (Mostowy y Cossard, 2012). Por otra parte, en algunas células, las septinas interactúan con los microtúbulos, como SEPT9, que se une a éstos a través de su dominio de unión a GTP (Mostowy y Cossart, 2012). De hecho, el inhibidor de la polimerización de microtúbulos, nocodazol, provoca el desensamblaje de los filamentos de septinas, mientras que el taxol, que inhibe la despolimerización de los microtúbulos, aumenta el número de filamentos de septinas y estabiliza los anillos formados por estas proteínas (Mostowy y Cossart, 2012). En conjunto, estos datos sugieren que la red de actina y de microtúbulos sirve como molde para el ensamblaje de las septinas tal y como se ha mencionado previamente. No obstante, los mecanismos moleculares que rigen las interacciones entre septinas y otros elementos del citoesqueleto y las proteínas implicadas aún no se conocen en su totalidad. Recientemente, un estudio del interactoma de las septinas 1-10 mediante la técnica de doble híbrido de levadura ha permitido establecer que, además de con otros miembros de la familia de las septinas, las septinas pueden interactuar con otras proteínas involucradas en procesos tales como ubiquitinación/sumoilación, división celular y ciclo celular, motilidad celular, fosforilación de proteínas y señalización, reparación de ADN y procesos de splicing, transcripción, endocitosis o apoptosis (Nakahira et al., 2010).

Por otra parte, las septinas interactúan con fosfolípidos presentes en la membrana, lo cual les permite servir como barreras de andamiaje para reclutar proteínas y como barreras de difusión (Hall y Russell, 2004; Weirich et al., 2008; Field et al., 2005). Curiosamente, algunas septinas, como SEPT4 (Spencer et al., 2007) o SEPT11 (Maimaitiyiming et al., 2013), han sido localizadas en balsas lipídicas en las que se ha sugerido que las septinas regulan la rigidez y elasticidad celular cortical y ayudan a anclar al citoesqueleto de actina (Mostowy y Cossart, 2012; Maimaitiyiming et al., 2008). En particular, se ha observado que SEPT11 interactúa con la dinamina en balsas lipídicas en neuronas, lo que ha llevado a proponer que esta septina (y otras con las que colocaliza la dinamina, como SEPT5 y SEPT9) podría intervenir en la regulación de procesos asociados a estos dominios de membrana, como endocitosis o transporte vesicular (Maimaitiyiming et al., 2013).

A nivel fisiológico, las septinas sirven como barreras de difusión, sitios de andamiaje, compartimentalización, tráfico de vesículas, regulación de la rigidez celular, citoquinesis, polaridad celular y migración (Peterson y Petty, 2010; Cao et al., 2009; Barral et al., 2000; Bridges y Gladfelter, 2015). Específicamente, las septinas se han localizado en el centro de espinas dendríticas donde ayudan a compartimentar moléculas asociadas a membrana (Xie et al., 2007), así mismo, las estructuras anilladas de las septinas se localizan en la base de los cilios de células de mamíferos en donde sirven de barreras de difusión (Hu y Nelson, 2011), las septinas sirven también como barreras de andamiaje para proteínas como la miosina tipo II facilitando su activación por quinasas para la

formación de fibras de estrés de actinomiocina (Joo et al., 2007). Por otra parte, las septinas también se ven implicadas en el tráfico de membranas y de vesículas, por ejemplo, en el SNC de mamíferos las vesículas de exocitosis generadas en el Golgi son posteriormente llevadas a la membrana plasmática diana gracias a estímulos motores del complejo de septinas (Schmoranzler y Simon, 2003), adicionalmente las septinas regulan la rigidez de la membrana mediante su unión directa a fosfolípidos, esta función le otorga a las septinas la habilidad de alterar la membrana plasmática (Zhang et al., 1999). Debido a la gran variedad de funciones biológicas en las que están implicadas las septinas, actualmente se considera que pueden contribuir al desarrollo de una amplia gama de enfermedades, incluyendo neoplasia, enfermedades neurodegenerativas, e infecciones (Peterson y Petty, 2010). Finalmente, un estudio proteómico reciente de la membrana plasmática de adipocitos 3T3-L1 reveló la presencia en ésta, entre otras muchas proteínas asociadas, de diferentes septinas (SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT7, SEPT8, SEPT9, SEPT10, SEPT11 y SEPT14) (Prior et al., 2011). Sin embargo, aún no se ha descrito la expresión o posible relevancia de las septinas en adipocitos.

1.2. Tejido adiposo como órgano endocrino

Como se mencionaba en apartados anteriores, el tejido adiposo es considerado un órgano endocrino que secreta factores solubles denominados adipoquinas, que intervienen en funciones tan relevantes como la regulación de la homeostasis energética y vascular, en la respuesta inmune, regulación del metabolismo lipídico, sensibilidad a insulina, angiogénesis, control de la presión sanguínea o el control de la ingesta (Ahima y Flier, 2000; Deng y Scherer, 2010). En consecuencia, se requiere un control estricto de su secreción, ya que modificaciones de la concentración de las adipoquinas causan importantes alteraciones en la homeostasis corporal. De hecho, la producción de adipoquinas se encuentran alteradas en condiciones de obesidad, DT2 y síndrome metabólico (Lanthier y Leclercq, 2014).

Hasta el momento, se han identificado más de 100 factores secretados por el tejido adiposo, con diversas células diana y funciones biológicas (Deng y Scherer, 2010; Halberg et al. 2008). Así, hay adipoquinas relacionadas con la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos (adiponectina, resistina, omentina, visfatina), inflamación [TNF- α , interleukina-6 (IL-6), adiposina, apelina, *macrophage chemoattractant protein* (MCP1)], homeostasis vascular y sanguínea [angiotensina, *endothelial plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), adrenomedulina], o gasto energético (leptina) (Deng y Scherer, 2010; Hajer et al., 2008). A continuación, se detallan algunos aspectos estructurales y funcionales de varias adipoquinas relevantes en el contexto de este trabajo.

1.2.1. Leptina

La leptina es una proteína multifuncional de 16 kDa secretada principalmente por los adipocitos que juega un papel fundamental en la regulación del balance energético, ya que actúa

reprimiendo la ingesta de alimento y promoviendo el gasto de energía (Oswal y Yeo, 2009; Morris y Rui, 2009). La secreción de leptina es proporcional a la masa de tejido adiposo y al estado nutricional, (Mantzoros et al., 2011). Así, los niveles de leptina aumentan con la ingesta de energía y disminuyen rápidamente en condiciones de ayuno (Campfield et al., 1995). No obstante, en la secreción de leptina influyen toda una serie de factores como la insulina, los glucocorticoides, los estrógenos, los andrógenos, los ácidos grasos o los agonistas del receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- γ) (Balaskó et al., 2014).

Finalmente, la leptina al ser secretada en el TA tiene efectos ya sea directos sobre el mismo o indirectos sobre otros órganos. Específicamente, de forma directa la leptina puede autorregularse debido a la presencia de isoformas largas (huOb-R) e isoformas cortas (huB219.1 y huB219.3) del receptor de leptina (Kielar et al., 1998; Harris et al., 2014), esta autorregulación induce la lipólisis de forma autocrina/paracrina (Frühbeck et al., 1997), en donde el receptor de leptina activa al receptor de adenosina A1 que junto con la adenosina activa a la adenil ciclasa (AC), lo cual conlleva a un potente aumento de la lipólisis (Frühbeck et al., 1997), así mismo, la leptina además de favorecer la movilización de lípidos en los adipocitos, también tiene efectos inhibitorios sobre la acumulación de ellos (Harris et al., 2014), en conjunto esto conlleva a un desbalance del equilibrio lipólisis/lipogénesis que resulta en la alteración del metabolismo y a su vez en alteraciones en la señalización y sensibilidad a la insulina (Harris et al., 2014).

Por otro lado la leptina tiene numerosos efectos sobre órganos periféricos tales como el hígado, músculo, hueso, hipófisis o páncreas (Margetic et al., 2002). Mediante su acción sobre éstos, la leptina promueve la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y regula la función inmune (Margetic et al., 2002; Conde et al., 2010). Además, la leptina mejora la sensibilidad a la insulina en músculo e hígado (Morris y Rui, 2009; Margetic et al., 2002). En el páncreas, la leptina inhibe la secreción de insulina (Margetic et al., 2002). Finalmente, la leptina juega un importante papel en la regulación del eje hipofiso-gonadal y del sistema cardiovascular (Abel y Sweeney, 2012).

1.2.2. Adiponectina

La adiponectina fue descubierta simultáneamente por cuatro grupos a mediados de los años 90 (Scherer et al., 1995, Hu et al., 1996, Maeda et al., 1996, Nakano et al., 1996). Es una adipoquina altamente expresada por los adipocitos y, de hecho, constituye una de las hormonas circulantes más abundantes. La adiponectina es una proteína de 30 kDa que presenta un dominio globular carboxilo terminal y un dominio amino terminal similar al colágeno que hace que se formen multímeros de esta hormona, de manera que la hormona circulante puede estar constituida por trímeros, tetrámeros incluso multímeros de hasta 18 unidades (Tsao et al., 2003). También existe una forma de adiponectina circulante que sólo presenta el dominio globular y se origina como consecuencia de una rotura proteolítica de la proteína original. Se han descrito dos receptores de adiponectina, AdipoR1 y

AdipoR2, que son particularmente abundantes en músculo y en hígado (Yamauchi et al., 2003) aunque también se expresan en otros tejidos (Rodríguez et al., 2008; Almabouada et al., 2013). En estos tejidos la adiponectina favorece principalmente la sensibilidad a la insulina ya sea inhibiendo la gluconeogénesis en hepatocitos y miocitos, mejorando la captación de glucosa en los adipocitos o estimulando la oxidación de ácidos grasos en músculo (Malagón et al., 2013).

Por otra parte, está claramente establecido que existe una relación inversa entre los niveles de adiponectina en plasma y el índice de masa corporal así como la resistencia a insulina y el estado inflamatorio (Esfahani et al., 2015; Linscheid et al., 2008; Arita et al., 1999). Además se han descrito varios polimorfismos en el gen de la adiponectina que están asociados con obesidad y con resistencia a insulina (Chandran et al., 2003; Díez e Iglesias, 2003). La pérdida de peso o el tratamiento con estatinas provocan un aumento de la concentración de adiponectina circulante, lo que conlleva a una mejora en la sensibilidad a la insulina (Arita et al., 1999; Brichard et al., 2003).

1.2.3. Citoquinas (TNF α e IL-6)

Las citoquinas son polipeptidos producidas por células del sistema inmune y por el tejido adiposo, en donde juegan un papel importante en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos y participan en la regulación del balance energético del organismo (Grant y Stephens, 2015). Además, las citoquinas producidas en el tejido adiposo ejercen una acción paracrina o autocrina en el propio tejido (Waki y Tontonoz, 2007). Entre las citoquinas pro-inflamatorias producidas por el tejido adiposo se encuentran leptina, TNF- α , IL-6, resistina, *retinol-binding protein 4* (RBP4), lipocalina 2, IL-18, *angiopoietin-like protein 2* (ANGPTL2), *CC-chemokine ligand 2* (CCL2), *CXC-chemokine ligand 5* (CXCL5) y nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT) (Ouchi et al., 2011).

En particular, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citoquina que, además de ser producida normalmente por los macrófagos en estados de inflamación crónica y en procesos malignos, también es sintetizada por el tejido adiposo y muscular (Ronti et al., 2006). Los niveles de TNF α en plasma están elevados en condiciones de obesidad y resistencia a insulina (Ouchi et al., 2011). En esta línea, los niveles del TNF α en el tejido adiposo están correlacionados positivamente con el tamaño de los depósitos grasos (Cawthorn y Sethi., 2008). TNF α tiene un marcado efecto pro-inflamatorio e inmunomodulador, además de ser fundamental en la respuesta inmune innata, ejerce numerosos efectos biológicos, que incluyen desde la regulación del desarrollo al control de la ingesta (Wajant et al., 2003). En el caso particular del tejido adiposo, TNF α induce la reducción de este tejido mediante la estimulación de la lipólisis e inhibición de la expresión de la lipoproteína lipasa y el transportador de glucosa GLUT4, que constituyen elementos clave para la acumulación de lípidos (Chen et al., 2009). Además, atenúa la fosforilación del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina (IRS) inducida por la insulina, provocando con ello resistencia a insulina (Ouchi et al., 2011).

Por su parte, la interleuquina-6 (IL-6), además de ser producida por macrófagos y linfocitos activados y células endoteliales, es también producida por los adipocitos (Zhang et al., 2014). Sus concentraciones en plasma se correlacionan positivamente con la obesidad, intolerancia a la glucosa e insulino-resistencia así como con una disminución de la producción de adiponectina (Bastard et al., 2002; Engeli et al., 2003; Ouchi et al., 2011). Se ha demostrado que la producción de IL-6 por los adipocitos está estimulada en condiciones de inducción de lipólisis (Zhang et al., 2014).

1.3. Regulación del metabolismo glucídico y lipídico en adipocitos

Como tradicionalmente se ha descrito, una de las principales funciones del tejido adiposo es la acumulación de energía a través de la síntesis y acumulación de triglicéridos (TAG) (lipogénesis) y la conversión de TAG a glicerol y ácidos grasos que son movilizados al torrente sanguíneo en situaciones de balance energético negativo (lipólisis). La tasa relativa entre lipólisis y lipogénesis está determinada por el estado nutricional y regulado por factores endocrinos como catecolaminas, péptidos natiuréticos e insulina (Czech et al., 2013).

1.3.1. Insulina

La insulina es la hormona anabólica más potente del tejido adiposo. Participa en la promoción de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, estimula el transporte de glucosa, estimula la captación de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos (esterificación) e inhibe la lipólisis de los triglicéridos acumulados en las gotas lipídicas (Bevan et al., 2001).

A nivel intracelular, la unión de la insulina a su receptor (IR), perteneciente a la familia de receptores tirosina quinasa, provoca su autofosforilación y la fosforilación en residuos de tirosina (Tyr) de las proteínas denominadas sustratos del receptor de insulina (IRS), y de las proteínas Cbl y Shc (Pessin y Saltiel, 2000; White, 2003). Las proteínas IRS se unen directamente al motivo fosforilado del IR activado a través de un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), lo que conduce a su propia fosforilación en residuos de Tyr que, una vez fosforilados, constituyen sitios de unión para proteínas efectoras intracelulares con dominios SH2 (*Src homology 2*). Entre ellas se incluyen Grb2 y Nck, así como proteínas adaptadoras de la familia Src de Tyr quinasas citoplasmáticas (Fyn y Csk), la proteína Tyr fosfatasa SHP2 y la subunidad reguladora (p85) de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de tipo 1A. La interacción del IRS fosforilado y Shc con Grb2 activa la ruta Ras/MAPK (Bevan, 2001), que media los efectos mitogénicos de la insulina. Por su parte, la interacción entre la subunidad reguladora de la PI3K y los 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 (PIP3), que genera sitios de reconocimiento para proteínas que contienen un dominio de tipo pleckstrina (PH), como las quinasas de serina/treonina PDK1 y Akt/proteína quinasa B (PKB) (Kanzaki, 2006; Pessin y Saltiel, 2000). Además, facilita la interacción de Akt con sus quinasas reguladoras, PDK1 y el complejo mTOR-Rictor (Hresko y Mueckler, 2005; Kanzaki, 2006), provocando la fosforilación de

Akt en los residuos Thr-308 y Ser-473, respectivamente, y su activación. El principal mediador de las acciones metabólicas de la insulina es la proteína Akt, encargada de la fosforilación y la regulación de numerosos sustratos como ciertas proteínas reguladoras de las GTPasas de bajo peso molecular, las proteínas Rab, que intervienen en el tráfico de GLUT4 (Manning y Cantley, 2007; Kanzaki, 2006).

La proteína Akt también fosforila e inhibe a la proteína tuberina (TSC2), que forma un complejo con la hamartina (TSC1) que, a su vez, inhibe al regulador del crecimiento mTOR (Harris y Lawrence, 2003). Esto conlleva finalmente a la activación del complejo mTOR-Raptor (mTORC1) (Huang y Manning, 2009), que suprime la lipólisis, estimula la lipogénesis y promueve el almacenamiento de lípidos en adipocitos (Chakrabarti et al., 2010). Otros sustratos fosforilados por Akt/PKB son 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).

Por otra parte, y en concierto con la ruta IRS/PI3K, el IR pone en marcha otra ruta que funciona en paralelo con la ruta PI3K en adipocitos, la relacionada con Cbl (Chiang et al., 2001), para inducir la translocación de GLUT4 desde los compartimentos intracelulares en los que se almacena (compartimento de reciclaje endosomal; ERC) hasta la membrana plasmática (Zeigerer et al., 2002; Karylowski et al., 2004; Ishiki y Klip, 2005). Así, Cbl es fosforilado por el IR, en un proceso en el que intervienen proteínas adaptadoras, como la proteína CAP (Cbl-associated protein) (Kanzaki, 2006), lo que conduce al reclutamiento de un complejo de señalización en el que se incluye la proteína de la familia Rho, TC10 (Chiang et al., 2001). A su vez, la TC10 activada interacciona con varios efectores intracelulares, como el complejo del exocisto, que facilita el amarraje/anclaje a la membrana plasmática de las vesículas que transportan GLUT4 (Inoue et al., 2003). Adicionalmente, TC10 regula la reorganización de la actina en adipocitos, un proceso que se ha propuesto que es fundamental para la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa (Kanzaki, 2006).

Curiosamente, en adipocitos, el receptor de insulina (Kanzaki, 2006; Foti et al., 2007) y diferentes componentes del sistema de señalización de esta hormona, incluidos el complejo CAP-Cbl, la proteína TC10 y, tras la estimulación con insulina, también los componentes del complejo del exocisto (Kanzaki, 2006; Inoue et al., 2003), se localizan en dominios específicos de la membrana plasmática, las caveolas, que serán detalladas más adelante. Existe una cierta controversia respecto a la localización de GLUT4 en caveolas ya que algunos autores apoyan que la insulina provoca la translocación de GLUT4 a las caveolas de la membrana plasmática de los adipocitos (Karlsson et al., 2002; Ros-Baro et al., 2001), mientras que otros autores (Kandror et al., 1995; Malide et al., 2000) inmunoisolaron caveolas y hallaron que GLUT4 no se encuentra en ellas tras la estimulación por insulina. Un estudio posterior ha mostrado que la insulina induce la translocación de GLUT4 tanto a caveolas como a dominios no caveolares de la membrana plasmática, y la endocitosis de GLUT4 tras la estimulación de insulina se produce al menos parcialmente a través de las caveolas (Yuan et al., 2007).

1.3.2. Control de la lipogénesis en adipocitos

Los adipocitos incorporan los ácidos grasos que circulan asociados a lipoproteínas gracias a la acción de la lipoproteína lipasa (LPL). En particular, la LPL hidroliza las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones (CM) circulantes, dando lugar a ácidos grasos libres (FFA) y glicerol (Gonzales y Orlando, 2007). Posteriormente, los FFA son captados por los adipocitos en regiones especializadas de la membrana por proteínas adaptadoras como la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), la proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática (FABPpm) y la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) (Rodríguez et al., 2011), que se detallan a continuación. Una vez en el interior celular, y por la acción de la acetil-coA sintasa, los FFA son transformados en el correspondiente acil derivado, acil-coA. Los acil-coA son principalmente reesterificados con moléculas de glicerol-3-fosfato y almacenados como TAG en las gotas lipídicas (Maeda et al., 2008). En los adipocitos, el glicerol necesario para la síntesis de TAG procede bien de la glucosa, a partir de la glucólisis (Maeda et al., 2008), o a partir de la lipólisis y posterior fosforilación por la enzima glicerol quinasa (GK) (Guan et al., 2002). Además, los adipocitos pueden captar glicerol extracelular gracias a las acuagliceroporinas (AQP) presentes en la membrana, que son regulados por la insulina (Rodríguez et al., 2011). Por tanto, la esterificación de los ácidos grasos depende del suministro de glicerol-3-fosfato aportado a partir de las vías mencionadas y la captación de los FFA (Figura 3). La entrada de los FFA también depende de su concentración extracelular, de modo que cuando aumenta la velocidad de esterificación, aumenta la entrada de FFA a la célula facilitado por las proteínas de membrana (Stimp et al., 2001; Stahl et al., 2002) (Figura 3).

Como se ha mencionado anteriormente, la insulina activa la entrada de glucosa en los adipocitos por la translocación del transportador de glucosa GLUT4 de sus reservorios intracelulares (i.e., compartimento de reciclaje endosomal; ERC) a la membrana plasmática (Watson et al., 2004), y también favorece la activación de la LPL (Large et al., 2004), con el consiguiente efecto estimulador global sobre la síntesis de TAG.

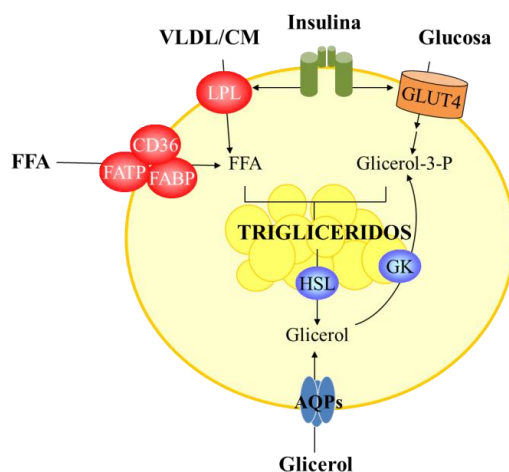


Figura 3: Lipogénesis en el tejido adiposo (modificado de Rodríguez et al., 2011).

1.3.2.1. FAT/CD36

La proteína translocasa de ácidos grasos (FAT), también conocida como CD36, es una glicoproteína transmembrana que contiene dos dominios transmembrana y un largo bucle extracelular glicosilado. FAT/CD36, al igual que las FABPs, está implicada en la captación de ácidos grasos de cadena larga (Glatz et al., 2010).

Mediante estudios bioquímicos se ha demostrado que, tras la exposición a ácidos grasos, se produce la translocación de FAT/CD36 a caveolas, donde también se ha localizado esta proteína por técnicas de microscopía confocal y electrónica (Ring et al., 2006; Souto et al., 2003). La evidencia que apoya la función de dicha glicoproteína en cuanto a absorción y transporte de ácidos grasos se apoya en estudios realizados en ratones transgénicos que sobreexpresan FAT/CD36, que presentaban mayor grasa corporal y niveles bajos de triglicéridos, ácidos grasos y colesterol en suero, mientras que ratones deficientes en FAT/CD36 presentaban una menor captación de ácidos grasos en los adipocitos y un aumento de los niveles de ácidos grasos y triglicéridos en plasma (Febbraio et al., 2002). De forma similar, en humanos se ha observado que la expresión de FAT/CD36 en tejido adiposo subcutáneo aumenta de forma progresiva en relación al aumento de peso y al desarrollo de resistencia a insulina, mientras que los niveles en el depósito visceral sólo aumenta en condiciones de obesidad y resistencia a insulina (Bonen et al., 2006). Otros estudios realizados en humanos con mutaciones en este transportador han permitido mostrar que FAT/CD36 facilita el transporte de los FFA de cadena larga en el tejido adiposo cuando las concentraciones extracelulares de FFA son reducidas (Hames et al., 2014). Sin embargo, el mecanismo por el que FAT/CD36 desempeña su papel en el transporte de ácidos grasos de cadena larga aun no es del todo conocido. Se ha propuesto que FAT/CD36 puede llegar a unirse e internalizar los ácidos grasos por endocitosis o, alternativamente, que colabora con las FABPs proporcionando un gradiente de concentración de ácidos grasos en la membrana plasmática, facilitando así el transporte por otros transportadores (Thompson et al., 2010; Stahl et al., 2001).

1.3.2.2. FATPs

Las proteínas transportadoras de ácidos grasos son proteínas de membrana implicadas de forma directa en la translocación de los ácidos grasos a través de la bicapa lipídica (Stahl et al., 2001) (Figura 4). La familia de las FATPs incluye 6 miembros que se expresan en diferentes tejidos (Stahl, 2004; Kazantzis y Stahl., 2013). En adipocitos, la FATP mayoritaria es FATP1 aunque estas células también expresan bajos niveles de FATP4 (Kazantzis y Stahl., 2013). Se ha demostrado que la expresión de FATP1 aumenta durante la adipogénesis y provoca un aumento del transporte de ácidos grasos cuando se sobreexpresa en fibroblastos (Stahl et al., 2002). En adipocitos, la insulina provoca la translocación de FATP1 desde compartimentos intracelulares (donde colocaliza con GLUT4) a la membrana plasmática y produce un aumento paralelo del transporte y esterificación de ácidos grasos (Hall et al., 2003). De hecho, se ha demostrado que FATP1 y la sintetasa-1 de ácidos grasos de

cadena larga, ACSL1, forman parte de un complejo común que se mantiene incluso en ausencia de estimulación, de manera que se propone que el transporte de ácidos grasos a través de la membrana está acoplado a su esterificación (Richards et al., 2006; Gimeno, 2007).

1.3.2.3. FABPs

Las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) son miembros de una familia multigénica que codifican para la expresión de proteínas citosólicas pequeñas (14-15 kD) o ancladas a membrana plasmática (FABPm), cuya función es la unión a ácidos grasos (Figura 4) (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). Desde su identificación en 1972 (Ockner et al., 1972) hasta la actualidad se han sumado numerosos representantes de esta familia cuyos nombres varían respecto a su localización en los diferentes tejidos. Específicamente, FABPm es una proteína de unión a ácidos grasos que se encuentra en la membrana plasmática de varios tipos celulares, incluidos los adipocitos (Thompson et al., 2010). Algunos estudios han revelado que la expresión de esta proteína en preadipocitos 3T3-L1 provoca un aumento en la captación de los ácidos grasos (Zhou et al., 1992). Además, su expresión se induce durante la adipogénesis en paralelo con el incremento del transporte de los ácidos grasos (Berk et al., 1997).

Por otra parte, en el adipocito también se expresan otras FABPs citosólicas (FABP4 y FABP5) que, junto con la caveolina-1 presente en las caveolas, pueden captar los ácidos grasos que han entrado por difusión simple (Stremmel et al., 2001; Fisher et al., 2002; Storch y McDermott, 2009) (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). FABP4 está más expresada en tejido adiposo que FABP5 (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). Además, el contenido de éstas dos proteínas de unión a ácidos grasos en el tejido adiposo subcutáneo varía según el estado de obesidad, el grado de pérdida de peso y el género (Fisher et al., 2002).

Actualmente se sabe que FABP4 y FABP5 están implicadas en la esterificación de los ácidos grasos de cadena larga, interaccionan con los fosfolípidos de las membranas y con CD36 y su expresión es inducida por la insulina y los ácidos grasos (Hotamisligil y Bernlohr, 2015). Estudios previos han sugerido un papel importante de las FABPc tanto en el almacenamiento de TAG como una función durante el proceso inflamatorio. Concretamente, en estudios realizados en ratones con deficiencia de FABP4 expuestos a una dieta alta en grasa se ha observado un aumento de la lipogénesis así como una reducción de la lipólisis (Hertzel et al., 2006). De hecho, se ha establecido que FABP4 regula la lipólisis mediante su interacción con la enzima lipasa sensible a hormonas (HSL) y su posterior unión a la perilipina asociada a la superficie de las gotas lipídicas (Hertzel et al., 2006). Curiosamente, los animales KO para FABP4 muestran niveles elevados de expresión de FABP5, lo que ha llevado a proponer un papel compensatorio para esta chaperona lipídica (Storch y Thumser, 2010, Ma et al, 2010). De hecho, la sobreexpresión de FABP5 en ratones provoca la disminución de la lipogénesis y un aumento de la lipólisis en estos animales (Hertzel et al., 2006). Los ratones con

deficiencia de las dos FABPs expuestos a una dieta alta en grasa muestran una disminución en las alteraciones metabólicas del tejido adiposo, incluyendo una mejora en la respuesta a insulina, así como una reducción en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los macrófagos, que, como los adipocitos, también expresan ambas proteínas (Furuhashi et al., 2008) De hecho, la supresión simultánea de FABP4 y FABP5 ha demostrado ser de gran importancia en el equilibrio energético sistémico, mejorando la señalización de la insulina y la absorción de glucosa en adipocitos, protegiendo el organismo frente al desarrollo de resistencia a insulina, síndrome metabólico y una gran variedad de enfermedades inflamatorias (Glatz et al., 2010; Saavedra et al., 2015). Otros estudios también han demostrado que las FABPs, específicamente FABP4, se secreta de forma activa por los adipocitos y sus niveles se incrementan en la obesidad (Bag et al., 2015). En humanos, los niveles circulantes de FABP4 aumentan en obesidad así como en relación a la disfunción cardíaca. Atendiendo a estos datos y a los resultados observados en ratones con deficiencia de las dos FABPs, se ha sugerido que estos transportadores podrían constituir una posible diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades metabólicas (Hotamisligil y Bernlohr, 2015; Saavedra et al., 2015).

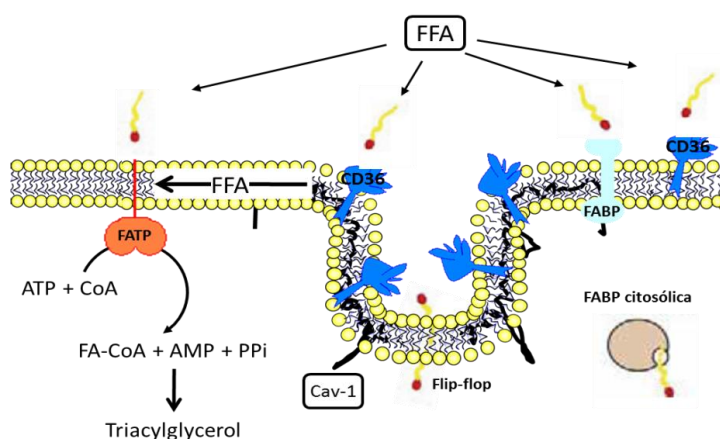


Figura 4: Modelo de captación/transporte de los ácidos grasos en los adipocitos (Modificado de Thompson et al., 2010).

1.4. Caveolas y caveolina 1 (CAV1)

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que se proyectan hacia el citoplasma, de 50-100 nm de diámetro, enriquecidas en esfingolípidos y colesterol (Thomas y Smart 2008). Están implicadas en una amplia gama de funciones celulares, incluyendo la endocitosis, la apoptosis, la homeostasis del colesterol, la captación de ácidos grasos la proliferación y la transducción de señales, incluidos procesos de mecanotransducción (Frühbeck et al., 2007; Parton y del Pozo, 2013). Las caveolas están presentes en muchos tipos celulares, aunque son especialmente abundantes en adipocitos, células musculares y endoteliales (Hansen y Nichols, 2010). Las caveolas pueden llegar a observarse como estructuras individuales o bien como racimos (Watson et al., 2001). Estudios recientes han mostrado una clara asociación de las caveolas con microtúbulos y microfilamentos en adipocitos y han considerado que la estabilidad de estas estructuras depende

principalmente del citoesqueleto de actina (Ritcher et al., 2007; van Deurs et al., 2003; Stahlhut y van Deurs, 2000).

El componente principal de las caveolas es la caveolina (CAV), una proteína integral de membrana de 20-23 kDa, palmitoilada, que está unida al colesterol y a los glicosfingolípidos presentes en las caveolas (Ogiso et al., 2015). Hay tres tipos de caveolina diferentes, con expresión diferencial específica de tejido: caveolina-1 (CAV1), presente en la mayoría de células aunque con una mayor expresión en adipocitos, fibroblastos, neumocitos, células epiteliales, endoteliales y neuronas, caveolina-2 (CAV2), que suele co-expresarse con CAV1 y puede formar complejos moleculares hetero-oligoméricos con ésta, y caveolina-3 (CAV3), que se expresa exclusivamente en células del linaje muscular (músculo esquelético y cardiomiocitos) (Cohen et al., 2004).

Las biogénesis de las CAV se inicia en el retículo endoplásmico (RE), donde se sintetizan las CAV, que son transportadas posteriormente al complejo de Golgi, donde son ensambladas para formar oligómeros que se acumulan en zonas de este orgánulo enriquecidas en esfingolípidos y colesterol (Monier et al., 1995). Desde allí, son transportadas vía vesicular a la membrana plasmática, donde se incorporan e interaccionan con el colesterol (Stremmel et al., 2001; Pohl et al., 2004). Además de CAV, las caveolas están asociadas a otras proteínas, las cavininas, que forman una capa asociada a la superficie citosólica de estas estructuras y las estabilizan (Pilch et al., 2011). En particular, se ha demostrado que cavinina1 es imprescindible para la formación de caveolas (Hansen y Nichols, 2010).

Además de en caveolas, se ha demostrado la presencia de CAV1 en la superficie de las gotas lipídicas, en particular cuando las células son expuestas a colesterol o ácidos grasos, a los que también se une (Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2004; Parton y del Pozo, 2013).

1.4.1. Papel de las caveolas/caveolinas en la transducción de señales

La función más estudiada de las caveolas es su implicación en la transducción de señales. Las caveolas han sido descritas como centros organizadores de membrana, debido a que representan sitios de concentración de receptores de membrana y de moléculas señalizadoras, generando un ambiente propicio para iniciar respuestas celulares frente a diferentes estímulos (Frühbeck et al., 2007). Así, entre los componentes de las caveolas se han identificado receptores de siete dominios transmembrana asociados a proteínas G, receptores de factores de crecimiento como EGF, VEGF o el receptor de insulina, el transportador de glucosa GLUT4, proteínas de unión a GDP/GTP como H-Ras o eNOS, enzimas tirosina quinasas como Fyn o Src, enzimas serina/treonina quinasas como Raf, MAPK, PKA, PI3K, o PKC, o proteínas adaptadoras como Shc o Grb2 (Williams y Lisanti 2004).

Se ha descrito que CAV1 puede mediar tanto la inhibición como la activación de rutas de señalización. En células endoteliales, CAV1 interacciona e inhibe la actividad de eNOS (Feron et al., 1998) cuyo resultado es la regulación negativa en la producción de óxido nítrico-(Bucci et al., 2000).

CAV1 también inhibe la actividad del supresor de la señalización de citoquinas (SOCS), lo que genera que se desregule la cascada de señalización del transductor de señal de Janus y el activador de la transcripción (JAK/STAT) con el consiguiente efecto sobre la señalización de citoquinas (Jasmin et al., 2006; Strålfors, 2012; Méndez-Giménez et al., 2014). Por el contrario, la interacción de CAV1 con el receptor de insulina provoca su activación (Cohen et al., 2003; Inokuchi, 2006). De hecho, el receptor de insulina y varios de los intermediarios de las rutas de transducción activadas a través de dicho receptor se localizan en caveolas y la disrupción de las caveolas o la eliminación del receptor en las mismas bloquea la señalización mediada por insulina (Frühbeck et al., 2007; Strålfors, 2012; Méndez-Giménez et al., 2014). Por su parte, la sobreexpresión de CAV1 ó 3 en células HEK29 provoca la estimulación de la actividad de IRS-1 sin afectar la autofosforilación del receptor de insulina (Yamamoto et al., 1998). En este sentido, la interacción de CAV1 y CAV3 (no CAV2) con el receptor de insulina provoca la estimulación de la actividad tirosina quinasa de dicho receptor (Yamamoto et al., 1998). Finalmente, se ha demostrado que tras el tratamiento con insulina, el receptor internaliza en caveolas (Fagerholm et al., 2009).

Las caveolas también juegan un papel importante en la captación de glucosa (Karlsson et al. 2002; Strålfors, 2012). Esta acción se ejerce a través tanto de la interacción de CAV1 con el receptor de insulina como indirectamente, por su acción sobre el transportador de glucosa GLUT4 (Cohen et al., 2004; Cohen et al., 2003; Inokuchi, 2006). En este sentido, se ha demostrado la localización de GLUT4 en las caveolas de los adipocitos (hasta el 88% de la concentración total de GLUT4 en adipocitos 3T3-L1), especialmente tras la estimulación con insulina (Karlsson et al., 2002). En ratones deficientes en CAV1 se observa una reducción casi total en la expresión proteica del receptor de insulina en el tejido adiposo (<90%) y de la captación de glucosa, además de un estado de insulino-resistencia, debida probablemente a la disminución en la expresión del receptor, y a su vez menor activación de Akt y una disminución en los niveles de GLUT4 (Inokuchi, 2006; Capozza et al., 2005; Razani et al., 2002; Cohen et al., 2003).

1.4.2. Papel de las caveolas/caveolinas en el transporte de lípidos

A partir de los trabajos pioneros del grupo de los Dres. Pol y Parton, se ha establecido claramente el importante papel de las caveolas en la incorporación de lípidos en adipocitos (Pol et al., 2001; Parton y del Pozo, 2013; Parton y Simons, 2007). Específicamente, las caveolas contienen proteínas que intervienen en la captación de ácidos grasos, incluyendo FATP1, FATP4 y FAT/CD36 (Trigatti et al., 1999; Pilch y Liu, 2011). De hecho, se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga se unen a FAT/CD36 en las caveolas (Pohl et al., 2004 y 2005), a las que esta translocasa se asocia gracias a CAV1 (Ring et al., 2006). Además, se ha propuesto un papel para FAT/CD36 en el transporte de colesterol al interior de los adipocitos (Pilch y Liu, 2011). En esta línea, la disrupción de la estructura de las caveolas mediante el tratamiento con ciclodextrina o mediante la expresión de un

dominante negativo de CAV reduce la captación de ácidos grasos (Pohl et al., 2004). Adicionalmente, los ratones deficientes en CAV1, que carecen de caveolas en los adipocitos, son hiperlipidémicos, presentan adipocitos de pequeño tamaño y son resistentes a obesidad inducida por una dieta alta en grasa, de manera que presentan rasgos de lipodistrofia (Razani et al., 2002). Además, muestran una reducción de la localización de FAT/CD36 en la membrana así como una disminución de la captación de FFA, del tamaño de las gotas lipídicas y de la acumulación de TAG en los adipocitos (Ring et al., 2006 ; Cohen et al., 2004). De la misma manera, los ratones deficientes de cavinal muestran exactamente el mismo fenotipo que los que carecen de CAV1 (Ding et al., 2014). Más aún, como los modelos murinos, los humanos con mutaciones en CAV1 o cavinal presentan un fenotipo lipodistrófico (Pilch y Liu, 2011).

Como se mencionaba en apartados anteriores, la exposición a colesterol o a ácidos grasos provoca la translocación de CAV1 a la superficie de las gotas lipídicas. Se ha propuesto que este transporte ocurre mediante un proceso dependiente de dinamina y del citoesqueleto de actina, probablemente vía endocitosis (Le Lay et al., 2006; Parton y del Pozo, 2013). Teniendo en cuenta éstas y otras observaciones funcionales, se ha sugerido un papel de CAV1 en el transporte intracelular de ácidos grasos y colesterol a las gotas lipídicas reforzando así la importancia de esta proteína en la regulación de la homeostasis lipídica (Parton y del Pozo, 2013; Bolsoni-Lopes y Alonso-Vale, 2015).

1.5. Lipólisis

La lipólisis conlleva la hidrólisis del triacilglicerol (TAG) almacenado en las gotas lipídicas de los adipocitos para generar 3 ácidos grasos libres (FFA) y glicerol, que posteriormente son liberados para que sean usados como sustrato energético por otros órganos. En los adipocitos, hay una tasa de lipólisis basal por lo cual los triglicéridos son hidrolizados continuamente. Sin embargo, este proceso tiene una mayor importancia en circunstancias de balance energético negativo, como el ayuno o el ejercicio (Frühbeck et al., 2014; Bolsoni-Lopes y Alonso-Vale, 2015).

La lipólisis consiste en una cascada de reacciones catalizadas por tres enzimas: la triglicérido lipasa (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la monoglicérido lipasa (MGL). Brevemente, ATGL hidroliza los TAG en diacilglicéridos (DAG), posteriormente, HSL hidroliza los DAG en monoacilglicéridos (MAG), los cuales a su vez son escindidos por la MGL en FFA y glicerol (Frühbeck et al., 2014; Bolsoni-Lopes y Alonso-Vale, 2015). Este último es liberado al torrente sanguíneo a través de los canales de AQP (Zechner et al., 2012, Rodríguez et al., 2007)

Los principales reguladores positivos de la lipólisis son las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y los péptidos natriuréticos (ANP), mientras que la insulina la inhibe (Nielsen et al., 2014; Sengenès et al., 2002; Coué y Moro, 2015). Específicamente, las catecolaminas se unen a los adipocitos mediante los receptores β -adrenérgicos ($R\beta 1$, $R\beta 2$ y $R\beta 3$) para inhibir la lipólisis, mientras que cuando se unen a los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos ($R\alpha 2$), la estimulan (Nielsen et al., 2014). En

condiciones de ayuno o gran demanda energética, la liberación de catecolaminas conlleva la activación de R β 1 y R β 2 y de sus proteínas G asociadas (Gs) (Figura 5). Esto provoca la activación de la enzima de membrana, adenilato ciclasa (AC), dando lugar a una elevación de los niveles intracelulares de AMPc, que, a su vez, activan la proteína kinasa A (PKA). Esta enzima es responsable de la fosforilación y activación de la HSL (Frühbeck et al., 2014; Bolsoni-Lopes y Alonso-Vale, 2015). Los efectos descritos se han demostrado igualmente tras el tratamiento con el agonista β -adrenérgico isoproterenol. Por su parte, la estimulación de Ra2, mediante su asociación a proteínas G inhibitorias (Gi), inhibe la acción de la enzima AC, lo que resulta en una disminución del AMPc cuyo efecto final es la inhibición de la lipólisis (Nielsen et al., 2014). (Figura 5).

La HSL fosforilada y activa se desplaza hacia la superficie de la gota lipídica del adipocito, en donde interacciona con la proteína constitutiva de estos orgánulos, la perilipina1 (PLIN1) (Lafontan y Langin, 2009). En condiciones basales, PLIN1 no fosforilada crea una barrera entre la HSL y los lípidos almacenados en las gotas lipídicas, lo cual evita la lipólisis. Sin embargo, su fosforilación mediada por la PKA provoca cambios conformacionales en la misma y la liberan de su interacción con CG1-58, un activador de la ATGL. La unión subsiguiente de CG1-58 a ATGL, junto con la activación de HSL mediada por PKA, ponen en marcha la lipólisis. (Figura 5) (Lafontan y Langin, 2009; Rodríguez et al., 2007; Bolsoni-Lopes y Alonso-Vale, 2015). Finalmente, una vez que los triglicéridos son hidrolizados a ácidos grasos y glicerol, los ácidos grasos libres pueden ser re-esterificados y almacenados de nuevo en gotas lipídicas, o ser liberados en la circulación para ser utilizados como sustratos por el músculo esquelético, el músculo cardíaco y el hígado (Rodríguez et al., 2007).

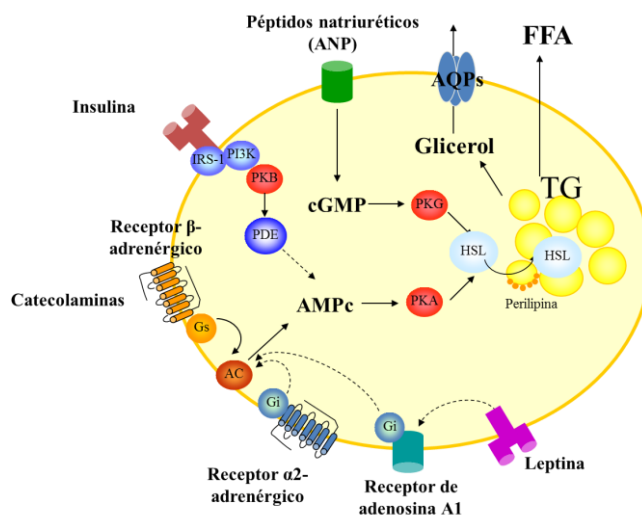


Figura 5: Lipólisis en el tejido adiposo (modificado de Rodríguez et al., 2007).

En relación con la vía descrita, la insulina ejerce su efecto inhibitor sobre la lipólisis mediante su acción, vía PI3K/Akt, sobre la fosfodiesterasa 3B, la cual parece estar asociada a caveolas en adipocitos, disminuyendo la concentración de AMPc intracelular y, por tanto, la actividad de la PKA (Lafontan y Langin, 2009). La insulina también regula negativamente la lipólisis al facilitar el

metabolismo de la glucosa a través de la ruta glucolítica. En la vía glucolítica la glucosa es oxidada a piruvato, el cual entra en el ciclo de Krebs, aunque una parte del piruvato es metabolizado a lactato gracias a la insulina. El lactato sale del adipocito para acoplarse con el receptor GRP81 que, mediante la acción inhibitoria de una proteína G_i , inhibe la AC, la formación del AMPc y, en consecuencia, la activación de PKA (Ahmed et al., 2010).

Por su parte, los péptidos natriuréticos (ANP) también son potentes agentes lipolíticos. Mediante su unión a receptores específicos en la superficie de los adipocitos, ANPs aumentan los niveles de GMPc y la activación de la proteína quinasa G (PKG), que induce la fosforilación y activación de HSL (Sengenès et al., 2002; Coué y Moro, 2015).

Adicionalmente, otros factores que regulan la lipólisis en adipocitos incluyen la leptina y otras citoquinas. Específicamente, el receptor de leptina activa al receptor de adenosina A1 que, en presencia de adenosina, activa a la AC, lo cual conlleva a un potente aumento de la lipólisis (Rodríguez et al., 2007) (Figura 5). Además de la leptina, otras citoquinas producidas por el tejido adiposo, como TNF α o IL-6, también regulan la lipólisis en los adipocitos (Frühbeck et al., 2007). En particular, TNF α regula la lipólisis de forma paracrina, actuando sobre diversas rutas en los adipocitos (Ronti et al., 2006; Large et al., 2004; Frühbeck et al., 2007). Por una parte, inhibe la señalización inducida por el receptor de adenosina a través de proteínas G_i , ya que disminuye la expresión de dichas proteínas (Grisouard et al., 2012). Por otra parte, bloquea la señalización inducida por la insulina, por lo que reduce el efecto anti-lipolítico inducido por esta hormona. Adicionalmente, TNF α induce la hiperfosforilación de la perilipina mediada por la PKA, con el subsiguiente efecto sobre la lipólisis (Zhang et al., 2002). Otras rutas activadas por TNF α que inducen lipólisis incluyen las vías de *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK), *extracellular signal-related kinase* (ERK), y la elevación de los niveles intracelulares de AMPc, en este último caso mediante la inhibición de la PDE (Zhang et al., 2002; Chen et al., 2009).

Notablemente, la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS), que induce la secreción de citoquinas por los adipocitos (Grisouard et al., 2012; Zu et al., 2009), incrementa también la lipólisis mediante la activación de la ruta PKA/HSL y la ruta proinflamatoria IKK β /NF- κ B (Grisouard et al., 2012). También se han implicado a las vías del receptor TLR4 y ERK1/2 en la acción estimuladora de la lipólisis de la endotoxina (Zu et al., 2009). Además, LPS reduce la expresión de perilipina y aumenta la de HSL y ATGL (Zu et al., 2009).

Finalmente, el péptido orexigénico gastrointestinal, ghrelina, tanto en su forma acilada como desacilada, inhiben la lipólisis inducida por isoproterenol, en un proceso que implica la activación de la PI3K y la PDE y la participación de un receptor no canónico (Frühbeck et al., 2014). Además, las dos formas de ghrelina aumentan la expresión de SREBP1 y PPAR γ en adipocitos en diferenciación, promoviendo con ello la acumulación de lípidos (Frühbeck et al., 2014). Todo el sistema de ghrelina,

incluida la enzima que octanoila el péptido, grelina-O-acil transferasa (GOAT), se expresan en el tejido adiposo (Frühbeck et al, 2014).

1.6. Obesidad

La obesidad es definida por la Organización mundial de la salud (OMS) como una enfermedad crónica, multi-factorial y recurrente, en donde hay una acumulación anormal o excesiva de grasa que resulta en un metabolismo alterado y en graves consecuencias para la salud (Frühbeck et al., 2013; Frühbeck et al., 2014), cuya causa fundamental es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las calorías gastadas (Seger et al., 2014).

En las últimas décadas se ha producido un progresivo aumento del sobrepeso y de la obesidad, llegando a constituir un grave problema a nivel mundial (Seger et al., 2014). De hecho, en el 2014 en el mundo había el doble de población adulta obesa de la que había en 1980. Los datos obtenidos por la OMS, indican que actualmente hay más de 1,9 millones de personas en el mundo con sobrepeso y más de 600 millones de personas con obesidad (OMS, <http://who.int/es/>). En la Unión Europea, la prevalencia de la obesidad se sitúa en un 34,9%, mientras que el sobrepeso se sitúa en el 33,6% (Ogden et al., 2014). En España, los valores son igualmente preocupantes, situándose la prevalencia de la obesidad en un 22,9% (24,4% en varones y 21,4% en mujeres) y obesidad abdominal en un 36% (39,4% en varones y 32,5% en mujeres) (Gutiérrez-Fisac et al., 2012). Asimismo, se ha observado que la prevalencia de la obesidad aumenta con la edad y disminuye a medida que aumenta el nivel educacional y socioeconómico (Valdés et al., 2014). La obesidad representa una seria amenaza para la salud pública, ya que se asocia con un aumento en la mortalidad y morbilidad debido a las comorbilidades que suelen acompañarla como DT2, enfermedades cardiovasculares, ictus cerebrovascular, hipertensión, dislipemia, diferentes tipos de cáncer, entre otras (Hotamisligil, 2006; Flegal et al., 2013).

Por otro lado, la distribución del tejido adiposo constituye un importante factor en el desarrollo de la obesidad y sus patologías asociadas. La obesidad puede ser clasificada en dos tipos según la distribución del tejido adiposo: obesidad androide o central (acumulación de grasa visceral) y obesidad ginoide o periférica (acumulación de grasa subcutánea glúteo-femoral). Se ha observado que la obesidad androide resulta más perjudicial que la ginoide; de hecho, la obesidad androide está asociada con mayor riesgo cardiovascular, mayor riesgo de alteraciones metabólicas y mayor mortalidad que la obesidad ginoide (Frühbeck, 2008).

1.6.1. Mecanismos patogénicos asociados al desarrollo de resistencia a insulina en obesidad

Hasta el momento, se han descrito varios procesos, que afectan tanto a los adipocitos como a los otros componentes celulares de los adipocitos y a la matriz extracelular, que contribuyen a la

disfunción del tejido adiposo y que se han demostrado como importantes en el desarrollo de enfermedad metabólica asociada a obesidad.

En particular, en el desarrollo de la obesidad los adipocitos se vuelven hipertróficos por acumulación de lípidos. Dicha hipertrofia se asocia con la alteración de la función de varios orgánulos subcelulares, tales como el retículo endoplásmico, conduciendo al desarrollo del proceso de estrés del retículo, o las mitocondrias y el subsiguiente estrés oxidativo (Malagón et al, 2013). Estos procesos, juntos con el estrés mecánico y la hipoxia generados por el crecimiento celular, contribuyen a la activación de rutas pro-inflamatorias en los adipocitos, incluidas las rutas de JNK y NF κ B (Malagón et al, 2013; Gregor y Hotamisligil, 2007), lo que conduce a la secreción, por parte de los adipocitos, de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-6, etc) y quimioquinas (MCP-1), así como moléculas de adhesión endoteliales (VCAM, ICAM), que promueven la infiltración del tejido por macrófagos y linfocitos (Malagón et al, 2013; Maury y Brichard, 2010). Además, en obesidad se produce un cambio fenotípico de los macrófagos del tejido, de anti-inflamatorios M2 (producen IL-10 e IL-1 α) a M1 (producen TNF- α , IL-6 e IL-1 β), los cuales contribuyen a aumentar el estado de inflamación crónica iniciado por los adipocitos (Figura 6) (Lumeng et al., 2007). En conjunto, los macrófagos, junto con los adipocitos, linfocitos B y T, células dendríticas, y mastocitos, entre otros, producen citoquinas pro-inflamatorias que dan lugar al estado de inflamación crónica de bajo grado característico de la obesidad, que se ha asociado a la disfunción del TA y deterioro la sensibilidad a la insulina (Hotamisligil, 2006; Rodríguez et al., 2015). En este contexto, se produce una alteración de la adipogénesis y de la capacidad de los adipocitos para almacenar lípidos (Permana et al., 2004; van Tienen et al., 2011). Adicionalmente, el aumento del volumen de la célula y la hipoxia conllevan al aumento de la autofagia (efecto para intentar compensar y prevenir la disfuncionalidad del TA) (Jansen et al., 2012; Kosacka et al., 2015) y a la muerte celular o apoptosis de los adipocitos (Cinti et al., 2005; Rodríguez et al., 2012). Los adipocitos muertos representan un estímulo adicional para que los macrófagos acudan a fagocitar restos celulares, formándose agregados de macrófagos alrededor de los adipocitos muertos denominados “estructuras de corona” (Cinti et al., 2005).

Por otra parte, en estadios avanzados de obesidad, se ha observado una remodelación anormal de la matriz extracelular que previene una expansión saludable del tejido adiposo (Gray y Vidal-Puig, 2007) y conduce a una disminución de la plasticidad del tejido y disfunción de los adipocitos (Khan et al., 2009). Concretamente, se ha descrito que en obesidad ocurre una síntesis excesiva y acumulación de componentes de la matriz extracelular (principalmente colágeno I, IV y V), como resultado de la hipoxia y la inflamación del TA, que resulta en el desarrollo de la fibrosis (Figura 6) (O'Hara et al., 2009; Catalán et al., 2012). De hecho, cuando el TA presenta hipertrofia y se exceden los límites de los depósitos grasos, el oxígeno no difunde correctamente por el tejido, lo que produce cierto grado de hipoxia (Trayhurn, 2013). Durante el desarrollo de la obesidad, la hiperplasia e hipoxia van

incrementando hasta un punto en que la vasculogénesis es incapaz de mantener los niveles suficientes de oxígeno en todo el TA (van Tienen et al., 2011; Trayhurn, 2013; Permana et al., 2004).

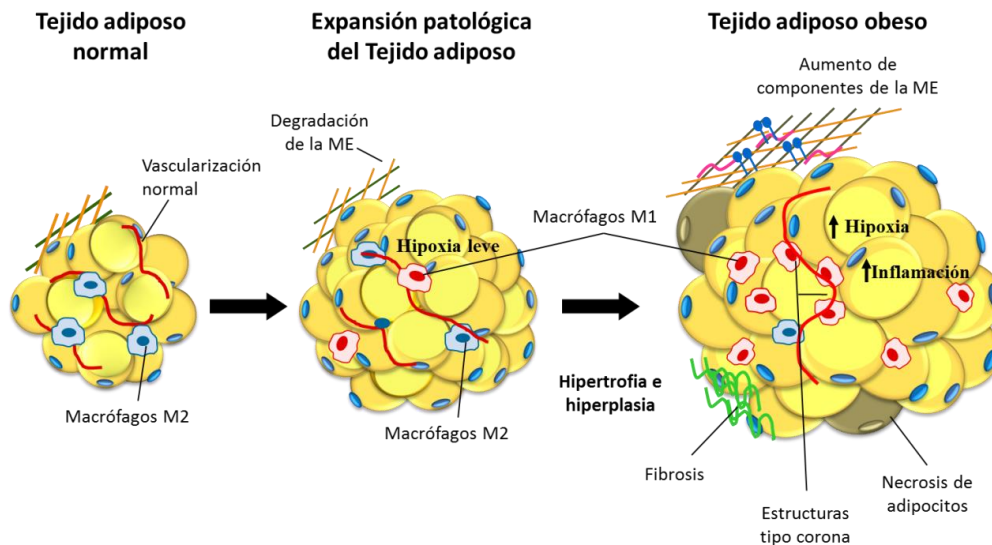


Figura 6: Tejido adiposo normal, en expansión y en estado de obesidad, infiltración de macrófagos asociada y remodelación de la matriz extracelular (modificada de Sun et al., 2011; Catalán et al., 2012).

En conjunto, por tanto, en obesidad se producen varios procesos, incluyendo adipogénesis y lipogénesis alteradas, así como muerte celular y fibrosis, que limita la capacidad de expansión de los adipocitos, lo que impide la correcta acumulación de lípidos en el tejido. Esto, a su vez, conduce a un aumento de los lípidos circulantes y a su acumulación en otros depósitos, tales como hígado o músculo, provocando en éstos el desarrollo de resistencia a insulina mediante un mecanismo de lipotoxicidad (Virtue y Vidal-Puig, 2010; Gray y Vidal-Puig, 2007). Estas condiciones, junto con las citoquinas liberadas por el tejido adiposo y la hiperinsulinemia resultante pueden conducir eventualmente al deterioro de la funcionalidad de la célula beta, induciendo el desarrollo de diabetes de tipo 2 (Ning, 2015).

Teniendo en cuenta la distribución de la grasa corporal y el IMC, se pueden distinguir 3 fenotipos principales de pacientes: individuos delgados con IMC y/o porcentaje de grasa corporal normal, que son sanos, individuos obesos no metabólicamente sanos (*metabolically unhealthy obese*; MUO), que suelen presentar con obesidad visceral y que desarrollan las comorbilidades asociadas a la obesidad como diabetes, dislipemia, mayor riesgo cardiovascular, entre otros; y finalmente, los individuos obesos “metabólicamente sanos” (*metabolically healthy obese*; MHO). Estos últimos presentan menos alteraciones metabólicas, ya que mantienen sensibilidad a la insulina normal y normoglucemia; es decir, parecen presentar cierta resistencia al desarrollo de las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. (Ahima y Lazar, 2013; Primeau et al., 2011).

Específicamente, los individuos MHO representan del 13-29% de la población obesa (Badoud et al., 2015). Se caracterizan por ser sensibles a la insulina, presentar un patrón de adipocinas

normalizado (incluyendo niveles de adiponectina normales), reducción de la fibrosis del tejido adiposo, un tamaño de adipocitos menor, disminución de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y bajo perfil inflamatorio así como un perfil lipídico y glucosa en ayunas dentro de rangos normales, en comparación con los individuos MUO (Denis y Obin, 2013; Muller et al., 2012; Dobson et al., 2015). Estas características fenotípicas reducen la probabilidad de desarrollar dislipidemia, hipertensión, resistencia a insulina, DT2 y enfermedades cardiovasculares en este grupo de individuos obesos y, en definitiva, evita el desarrollo del síndrome metabólico.

Curiosamente, en varios estudios han intentado dar una explicación en cuanto a los mecanismos que sustentan el mantenimiento del fenotipo MHO. Algunos estudios han fallado intentando atribuirlo a cambios en los hábitos de vida (dieta y actividad física), (Phillips et al., 2013; Camhi et al., 2013; Stefan et al., 2013), mientras que otros estudios han hallado que los individuos MHO, además de mantener la sensibilidad a la insulina, tienen mayor capacidad de adaptación a dietas calóricas que los individuos MUO (Badoud et al., 2015). Otros estudios se han centrado en explicar este fenotipo por modificaciones genéticas [modificación en genes como el receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) y la lipasa hepática (CFIG)] (Stefan et al., 2008) y otros estudios lo han atribuido a cambios moleculares en el TA.

A nivel molecular, se ha visto que la sobrecarga calórica en individuos MUO conlleva a la inflamación del TA y aumento de proteínas pro-inflamatorias, hipertrofia, hiperplasia, disfunción de dicho tejido, mientras que la sobrecarga calórica en individuos MHO promueve la hiperplasia pero no el aumento del tamaño de los adipocitos, lo que se asocia con el mantenimiento de la función normal del TA y la sensibilidad a la insulina conservada (Badoud et al., 2015). Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos demostrado que, respecto a lo observado en obesos MHO, los adipocitos de individuos obesos MUO presentan una menor capacidad para prevenir el daño oxidativo así como el exceso de actividad del retículo endoplásmico (i.e., estrés del RE) que ocurren en la obesidad, lo que, junto con una disfunción del proteasoma, llevan consigo una acumulación de proteínas oxidadas o mal plegadas en las células de dichos pacientes (Díaz-Ruiz et al., 2015). Este desequilibrio de la proteostasis celular, que ocurre también en modelos animales de resistencia a insulina y que puede ser inducida *in vitro* mediante la exposición a palmitato, está directamente asociado al desarrollo de resistencia a insulina (Díaz-Ruiz et al., 2015).

1.6.2. Tratamiento de la obesidad

Existen varias estrategias orientadas a promocionar la pérdida de peso, con el objetivo fundamentalmente de reducir las comorbilidades asociadas a la obesidad, como los que se comentan a continuación.

1.6.2.1. Modificación del estilo de vida

La modificación del estilo de vida puede ser recomendada para cualquier individuo con un $IMC \geq 25$ kg/m². Para ello, una de las aproximaciones aborda la reducción de la ingesta calórica, empleando estrategias dietéticas dirigidas a disminuir la glucosa y los triglicéridos en plasma y/o restringir las grasas saturadas e hidratos de carbono simples, en combinación con una mayor ingesta de fibra, grasas monoinsaturadas y omega-3. Por su parte, una mayor actividad física y reducir el consumo de alcohol pueden reducir el IMC y revertir algunas de las patologías asociadas a la obesidad (Ross y Bradshaw, 2009; Malagón et al., 2013).

1.6.2.2. Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico está recomendado especialmente para aquellos individuos que tienen un $IMC \geq 27$ kg/m² acompañado de comorbilidades asociadas (Yanovski y Yanovski, 2014). En la actualidad, los fármacos aprobados por la *Federal Drug Administration's* (FDA) desde el 2012 son: phentermine [(Qsymia), estimula los R β 2 suprimiendo el apetito], lorcaserin [(Belviq), aumenta la captación de glucosa mediada por la insulina y los niveles circulantes de adiponectina], naltrexone [(Contrave), reduce la absorción de grasas de la dieta por inhibición de la hidrólisis de los TAG en MAG, lo que lleva a aumento de la liberación de grasa fecal] y liraglutide [(Saxenda), suprime el apetito por estimulación de los R β 2] (Sweeting et al., 2015). Sólo los dos últimos han sido aceptados para tratamientos de obesidad por la *European Medicines Agency* (EMA). Por otra parte, en Europa está aceptado el uso del orlistat, que inhibe la absorción de grasa a nivel intestinal, al inhibir la lipasa pancreática (Padwal y Majumdar, 2007; Sweeting et al., 2015).

1.6.2.3. Cirugía bariátrica (CB)

La cirugía bariátrica (CB) es un procedimiento quirúrgico eficaz empleado para reducir el peso y mejorar la salud en pacientes con obesidad mórbida (Malkani, 2015; Yu et al., 2015). Estos procedimientos están indicados principalmente en pacientes obesos con $IMC \geq 35$ kg/m² y en los que el tratamiento farmacológico y la modificación del estilo de vida no han tenido éxito (Fried, 2013; Fried et al., 2014). Los procedimientos quirúrgicos de CB se clasifican en técnicas restrictivas, malabsortivas o mixtas. Los procedimientos restrictivos consisten en la reducción del tamaño o de la capacidad gástrica por lo que limitan el consumo de alimentos. Por su parte, los procedimientos malabsortivos conllevan la disminución de la absorción de nutrientes mediante la eliminación de partes del intestino delgado. Las técnicas mixtas combinan ambos métodos (DeMaria, 2007). Las cuatro técnicas más usadas en la actualidad en cirugía bariátrica son la banda gástrica ajustable (técnica restrictiva, se pone una banda alrededor de la parte superior del estómago) (Dixon, et al., 2012), la gastrectomía tubular (técnica restrictiva, se reduce el 25% el tamaño del estómago creando un tubo gástrico) (Katz, et al., 2011), el bypass gástrico en Y de Roux (RYGBP) (técnica mixta, se crea una bolsa estomacal pequeña que sólo puede albergar pequeñas cantidades de alimentos y a su vez se conecta parte del intestino delgado con el estómago, disminuyendo la absorción de nutrientes) (Dirksen, et al., 2012) y la

derivación biliopancreática (técnica mixta, se hace una reducción del estómago y se crea una bolsa estomacal) (Scott y Batterham, 2011). La CB conlleva normalmente una mejora de la glucemia y la reversión de la insulino-resistencia en pacientes con DT2, incluso antes de que se hayan producido reducciones significativas de peso (Panunzi et al., 2015; Lim et al., 2011). Dicha reversión se ha atribuido a cambios en hormonas intestinales, cambios mecánicos del sistema gastro-intestinal, la supresión del apetito mediada por cambios en el sistema nervioso central, y/o a cambios en la composición de ácidos biliares y microbiota (Seeley et al., 2015; Münzberg et al., 2015; Aron-Wisnewsky et al., 2012).

Se ha propuesto que la restricción calórica aguda que se produce inmediatamente después de la CB, junto con incrementos sostenidos en péptidos asociados con la saciedad (GLP-1, GIP, PYY, oxintomodulina, gastrina) y la reducción de factores asociados a la sensación de hambre (ghrelina) promueven la pérdida de peso (Meek et al., 2015). Notablemente, se ha establecido que la pérdida de peso asociada a la cirugía bariátrica provoca cambios en el TA que, a su vez, repercuten de manera importante en el uso de la glucosa a nivel periférico y, en general, sobre la salud metabólica (Clement, 2011; Méndez-Giménez et al., 2015; Appachi et al., 2011; Bays et al., 2009).

Cambios en el TA tras la CB

Se han publicado un gran número de estudios en los que se ha demostrado que la CB produce importantes cambios en el perfil secretor del TA (Appachi et al., 2011). Específicamente a nivel secretor, la adiponectina aumenta significativamente en relación con la pérdida de peso en pacientes sometidos a CB (Linscheid et al., 2008), mientras que los niveles de leptina se han visto reducidos (Löfgren et al., 2005). Estos cambios además se han correlacionado con la mejora de la resistencia a la insulina y la normalización del perfil lipídico en los pacientes tras la cirugía (Bays et al., 2009), e indican una recuperación de las alteraciones producidas en el desarrollo de la obesidad en el TA (ver apartado 1.6.1). Por su parte, se han publicado estudios que muestran aumento (Appachi et al., 2011) o disminución (Cottam et al., 2004) de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α tras CB, el aumento se atribuye a la persistencia de la inflamación después de una cirugía invasiva como el RYGBP, mientras que la disminución de TNF- α se explica por la reducción de peso y, por tanto, del perfil pro-inflamatorio (Yu et al., 2015; Netto et al., 2015).

Existen menos estudios sobre los cambios celulares y moleculares que acompañan a la pérdida de peso tras CB, especialmente a medio y largo plazo, por lo que aún no están del todo esclarecidos los mecanismos y rutas moleculares que acompañan a dicho proceso y, en particular, cuáles de ellos podrían contribuir con la mejora del perfil metabólico de los pacientes sometidos a CB. Concretamente, en un estudio transcriptómico realizado por Dankel et al, (2010), mostraron un aumento en la expresión de genes implicados en rutas asociadas a la regulación del metabolismo energético, además de cambios importantes en genes relacionados con la matriz extracelular tras la

CB. Otros estudios dirigidos han demostrado que la pérdida de peso tras CB conlleva un aumento en proteínas asociadas a las gotas lipídicas, como CIDEA/FSP27 o PLIN1, de genes lipogénicos y de genes mitocondriales (Moreno-Navarrete et al., 2014).

Por otra parte, tras la CB se han observado importantes cambios morfológicos, específicamente en el tamaño de los adipocitos y/o relacionados con el citoesqueleto, que afectan en gran medida la utilización de glucosa y/o la fibrosis (Eriksson-Hogling et al., 2015; Cotillard et al., 2014). Este cambio en el tamaño de los adipocitos después de la CB se acompaña de una remodelación celular que a su vez conlleva cambios en el citoesqueleto (Shen et al., 2010; Lieber et al., 1996). De hecho, aunque este campo no es ampliamente estudiado, se ha visto que la pérdida de peso favorece cambios en proteínas del citoesqueleto como vimentina, tubulina y actina, lo que a su vez ayuda a la normalización del metabolismo (Bouwman et al., 2009) y genera un cambio favorable hacia el aumento de la adipogénesis en el TA (Chen et al., 2012). Estos cambios, en conjunto, favorecen la normalización de la funcionalidad del adipocito.

Finalmente, hay que destacar que la mejora en las condiciones metabólicas de los pacientes tras CB depende en gran medida de las características del TA de los pacientes que se someten a cirugía. Así, se ha establecido que el tamaño de los adipocitos y el grado de fibrosis previos a la CB pueden condicionar la mejoría de la resistencia a la insulina y reversión de DT2 (Eriksson-Hogling et al., 2015; Cotillard et al., 2014). En este sentido, como se mencionaba en apartados anteriores, existen subtipos de individuos obesos en relación al desarrollo o no de enfermedad metabólica (MHO vs. MUO), aunque aún se desconoce el impacto específico que puede tener la CB sobre el TA de estos dos grupos de obesos.

2. Hipótesis y Objetivos

A pesar del conocimiento adquirido en los últimos años sobre las características celulares y moleculares del tejido adiposo y de la relación entre el incremento de este tejido y la resistencia a insulina en obesidad, los factores y mecanismos moleculares que subyacen en la asociación existente entre el exceso de TA y el desarrollo de enfermedades metabólicas no son del todo conocidos. Igualmente, aunque se han establecido claramente los efectos beneficiosos que conlleva la cirugía bariátrica (CB) a nivel central y periférico y que subyacen en la mejora de la respuesta a insulina observada en estos pacientes, aún no se conoce a profundidad los cambios adaptativos que tienen lugar a largo plazo en el TA tras la CB.

Teniendo en cuenta estos hechos, la hipótesis que planteamos es que la CB produce modificaciones moleculares en el TA que repercuten en la mejora del perfil metabólico de los pacientes. El hallazgo de nuevos biomarcadores que definan la transición funcional del TA en condiciones de ganancia y/o pérdida de peso, permitirá identificar posibles dianas terapéuticas para la prevención y tratamiento de las enfermedades asociadas a obesidad.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en la presente tesis Doctoral se plantea como **objetivo principal** la identificación de biomarcadores del TA que contribuyan a la mejora del perfil metabólico de los individuos obesos mórbidos. Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes **objetivos específicos:**

- 1) Analizar las diferencias del perfil proteico del tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos mórbidos antes y un año después de someterse a cirugía bariátrica.
- 2) Comparar los cambios inducidos por la cirugía bariátrica en el proteoma del tejido adiposo de pacientes con o sin resistencia inicial a insulina.
- 3) Caracterización celular y molecular de nuevos marcadores del tejido adiposo con expresión diferencial en condiciones de obesidad y/o resistencia a insulina (SEPT11).

3. Materiales y Métodos

3.1. Pacientes incluidos en el estudio

3.1.1. Cohorte 1.- Estudio proteómico del tejido adiposo humano antes y después de cirugía bariátrica

Este grupo de pacientes se incluyó en el estudio proteómico realizado en muestras de tejido adiposo subcutáneo (TASC) abdominal obtenido de 18 mujeres con obesidad mórbida antes (Pre) y después (Post) de la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica (CB). Esta subpoblación fue seleccionada de una cohorte de 106 pacientes con obesidad mórbida sometidos a CB que fueron diagnosticados en la Unidad de Cirugía del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España) desde noviembre de 2009 hasta marzo de 2011.

Todos los pacientes eran de origen caucásico, con edades comprendidas entre 26-57 años e índice de masa corporal (IMC) ≥ 35 kg/m² (calculado como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros). Para la selección de pacientes, se utilizaron los siguientes criterios de exclusión: pacientes con isquemia aguda de miocardio, diabetes dependiente de insulina, artritis, enfermedad inflamatoria aguda, enfermedad mental, enfermedades infecciosas o renales. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Los pacientes obesos se subclasificaron en dos grupos con IMC y edad equiparables: normoglucémicos (NG) [Glucosa <100 mg/dL y HbA1c <5,7%, n = 9 (4 pacientes para el estudio 2D-DIGE y 5 pacientes para los estudios de validación mediante *western blotting*)] y pacientes con niveles alterados de glucosa en ayuno (IGT) [Glucosa 100-126 mg/dL y HbA1c: 5.7 a 6.4%, n = 9 (4 pacientes para el estudio 2D-DIGE y 5 pacientes para los estudios de validación mediante *western blotting*)] siguiendo los criterios del Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes (American Diabetes A, 2012).

Los pacientes NG no recibían ninguna medicación que pudiera alterar el metabolismo de la glucosa o lipídico mientras que los pacientes IGT con hiperglicemia (n=5), hiperlipidemia (n=2), o hipertensión arterial (n=3) seguían tratamiento médico para dichas complicaciones antes de la intervención de CB.

Obtención de muestras de tejido adiposo

Las muestras de TASC (7-8 g) se obtuvieron durante la cirugía bariátrica [Pre-CB; by-pass gástrico (BG) en Y de Roux (3 NG y 4 ITG) o gastrectomía tubular (GT) laparoscópica (6 NG y 5 ITG)] y aproximadamente un año ($13,3 \pm 0,37$ meses) después de la cirugía bariátrica (Post-CB), durante la intervención de cirugía plástica de los pacientes. Inmediatamente después de la extracción, las muestras de TASC se lavaron en DMEM (Invitrogen, Barcelona, España) y se dividieron en 2-3

piezas que fueron congeladas en N₂ líquido y se almacenaron a -80 ° C hasta su posterior procesamiento.

Medidas bioquímicas

Se obtuvieron muestras de sangre dos semanas antes de la intervención de CB y de la cirugía plástica Post-bariátrica para la realización de los ensayos bioquímicos y hormonales. Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena antecubital después de un ayuno nocturno de 10 h. Para las mediciones de glucosa, colesterol total, lipoproteína de alta densidad y triglicéridos se utilizó un analizador químico Cobas C (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para calcular el LDL se empleó la ecuación de Friedewald [LDL = Colesterol total - (HDL + TriglicéridosG / 5)]. La insulina se midió por inmunoensayo de quimioluminiscencia utilizando un ElecsysE170 (Roche Diagnostics). El índice de resistencia a la insulina (HOMA) se calculó usando la fórmula: glucosa (mmol/L) × insulina (μU/mL) 22,5. La hemoglobina glucosilada (HbA1c) se determinó por cromatografía líquida empleando un analizador Variant II (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). La concentración plasmática de adiponectina se determinó mediante inmunoensayo enzimático (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Los niveles plasmáticos de glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) se midieron enzimáticamente utilizando kits comerciales (Randox Laboratories Ltd, Antrim, Reino Unido). La proteína C-reactiva (CRP) se midió con el kit hsCRPkit (Dade Behring, Marburg, Alemania). Estos protocolos fueron descritos por Martín-Rodríguez et al. (2014).

3.1.2. Cohorte 2.- Medidas de expresión génica y proteica en muestras de tejido adiposo humano

Se obtuvieron muestras pareadas de tejido adiposo omental (TAO) y subcutáneo (TASC) de la región abdominal de 64 pacientes sometidos a by-pass gástrico en Y de Roux (n = 54) o funduplicatura de Nissen (n = 10) en la Clínica Universidad de Navarra. Los pacientes fueron sometidos a una evaluación clínica consistente en la determinación de su historia clínica, examen físico, análisis de la composición corporal, evaluación de comorbilidades y entrevistas nutricionales. Todos los estudios fueron realizados por un equipo de consulta multidisciplinario del Hospital Clínico de la Universidad de Navarra. Los pacientes obesos se clasificaron de acuerdo al IMC (≥ 30 kg/m²) y % de grasa corporal (BF) (BF $\geq 25\%$ en varones y $\geq 35\%$ en mujeres). El %BF fue estimado mediante pletismografía por desplazamiento de aire) (Bod-Pod, Concord, CA, EE.UU.).

Los pacientes obesos se subclasificaron en dos grupos [normoglucémicos (NG) y pacientes con tolerancia a glucosa alterada (IGT)/diabetes tipo 2 (DT2)] siguiendo los criterios del Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes (American Diabetes Association, 2015). Los sujetos con DT2 no estaban en tratamiento con insulina o medicamentos que pudieran influir en los niveles de insulina endógena. Es importante mencionar que los pacientes obesos con DT2

incluidos en este grupo no tenían antecedentes de diabetes a largo plazo (menos de 2-3 años o incluso recién diagnosticados como se evidencia en su anamnesis y determinaciones bioquímicas).

Todos los estudios presentados se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki en su versión revisada de 2013. El diseño experimental fue aprobado, desde un punto de vista ético y científico, por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Navarra (073/2013). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético del Hospital.

Los ensayos bioquímicos y hormonales realizados en los sujetos de estudio se llevaron a cabo en muestras palmáticas obtenidas por punción venosa después de ayuno nocturno de 10 h. La glucosa basal y la prueba de tolerancia a la glucosa (OGTT) se midieron mediante espectrofotometría enzimática con un analizador automático (Hitachi Modular P800, Roche, Basel, Suiza), la insulina basal y OGTT se midieron mediante inmunoensayo de quimioluminiscencia (IMMULITE®, Diagnostic Products Corp, CA, EE.UU). Para la determinación de la sensibilidad a la insulina se tuvieron en cuenta los índices HOMA (ver apartado 3.1.1.) y QUIKY [$1/(\log \text{insulina basal } (\mu\text{U/mL}) + \log \text{glucosa basal } (\text{mg/dL}))$]. La concentración total de colesterol y triglicéridos se midieron mediante test inmunoenzimático (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). El colesterol HDL se midió por un método colorimétrico empleando un analizador Beckman SYNCHRON CX (Beckman Instruments Ltd, Bucks, Reino Unido). El LDL se calculó con la fórmula de Friedewald (ver apartado 3.1.1). El ácido úrico, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina y la γ -glutamilttransferasa (γ -GT) se midieron mediante reacciones enzimáticas empleando kits comerciales (Roche, Basel, Suiza) en un lector automático (Roche/Hitachi Modular P800). (Rodríguez et al., 2012).

Obtención de muestras de tejido adiposo

Las muestras de TAO y TASC (7-8 g) se obtuvieron durante la cirugía bariátrica laparoscópica o cirugía de funduplicación de Nissen. Inmediatamente después de la extracción, las muestras se dividieron en tres partes: una parte se introdujo en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* [DMEM, Lonza (Vervies, Bélgica)] (destinado a dispersión/estudios de cultivos celulares), otra parte se incluyó en formol 10% durante 24 h a temperatura ambiente (estudios histológicos) y el tejido restante se congeló en N₂ líquido y almacenó a -80 ° C hasta su posterior procesamiento (estudios de expresión génica y proteica).

Dispersión de tejido adiposo y obtención de adipocitos maduros y fracción de estroma vascular (FEV)

Las muestras frescas de tejido adiposo fueron recogidas en DMEM y posteriormente se lavaron dos veces con Krebs-Ringer HEPES (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 2,5 mM

CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, pH 7,4, suplementado con 2 mM glucosa y 2% BSA) para eliminar la sangre periférica. A continuación, las muestras se dispersaron de forma mecánica (cortando el tejido en pequeños trozos con una hoja de bisturí) y enzimática [incubando las muestras en Krebs-Ringer HEPES con 400 a.u./mL de colagenasa (tipo V, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) a 37°C 1 h en un baño de agitación]. El tejido no digerido se separó de las células utilizando un filtro de 100 mm (BD Falcon, CA, EE.UU.) y el filtrado se centrifugó a 600 x g durante 10 min. Se separó la fracción flotante conteniendo los adipocitos y posteriormente se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. La pella, que corresponde a la fracción de estroma vascular (FEV), fue suspendida en 5 mL de DMEM, se pasó por un filtro de 40 mm y se centrifugó a 400 x g durante 5 min. La FEV se resuspendió en 500 mL de tampón de lisis de eritrocitos (RBC Solución de Lisis, Puregene, MN, EE.UU.) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugación a 400 x g durante 10 min, una parte de la FEV se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80°C hasta la extracción de ARN y/o proteína, y otra parte fue resuspendida en 2 mL de DMEM para determinar la viabilidad celular mediante el test de azul tripán y posterior cultivo celular de las células.

3.2. Cultivos celulares

3.2.1. Cultivo de preadipocitos humanos

Las células obtenidas de la FEV se sembraron a una densidad de 2x10⁵ células/cm² y se cultivaron en medio I de adipocitos [DMEM/F-12 (1:1), 17.5 mmol/L de glucosa, 16 µmol/L de biotina, 18 µmol/L ácido pantoténico, 100 µmol/L ascorbato sódico y antibiótico-antimicótico (Gibco, Barcelona, España) suplementado con 10% de suero de neonato bovino (NCS) (v/v)]. Después de 4 días, el medio se cambió a medio II de adipocitos [medio I suplementado con 3% de NCS (v/v), 0,5 mmol/L 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0,1 µmol/L dexametasona, 1 µmol/L BRL49653 y 10 µg/mL de insulina]. Después de un periodo de inducción de 3 días, las células se suplementaron cada 2 días con el mismo medio pero sin IBMX y BRL49653 hasta llegar a 8-10 días de diferenciación. Los cultivos celulares se mantuvieron en incubador a 37°C manteniendo un 5% de CO₂.

El día de los experimentos, los preadipocitos diferenciados se privaron de suero durante 24 h y después se trataron con los siguientes compuestos: insulina (1, 10 y 100 nmol/L) (Sigma), ghrelina acilada (10, 100 y 1.000 pmol/L) (Tocris, Ellisville, MO, EE.UU.), desacil-ghrelina (10, 100 y 1.000 pmol/L) (Tocris), leptina (1, 10 y 100 nmol/L) (Pepr oTech CE, Inc., Rocky Hill, NJ, EE.UU.), isoproterenol (10 µmol/L) (Sigma), péptido natriurético atrial (ANP) (0,1 µmol/L) (Bachem, Bubendorf, Suiza), factor de necrosis tumoral α (TNF-α) (1, 10 y 100 ng/mL) (Pepr oTech), lipopolisacárido (LPS) (10, 100 y 1000 µg/mL) (Sigma) o factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) (0, 0,1, 1 y 10 ng/mL) (Pepr oTech) durante 24 h. También se realizaron tratamientos de adipocitos humanos diferenciados *in vitro* con oleato 500 µmol/l (Sigma) durante 18 h en medio

DMEM con BSA libre de ácidos grasos (Sigma) al 2%. Como controles, en cada experimento se utilizaron células que fueron incubadas en medio solo bajo las mismas condiciones que las tratadas con las sustancias indicadas.

3.2.2. Cultivo de la línea celular 3T3-L1

Se ha utilizado la línea celular 3T3-L1 de células de tipo fibroblástico que provienen de embriones de ratón. Esta línea se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection; LGC Standards S.L.U., Barcelona) y fue cultivada siguiendo las indicaciones del comerciante, considerando que las células no alcanzaran un grado de confluencia superior al 70-80%. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C, manteniendo un 5% de CO₂. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando células de los pases 4 a 15. A partir del 15° pase, los cultivos se desecharon para ser sustituidos por células nuevas mantenidas en N₂ líquido.

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio DMEM con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con L-glutamina 4 mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), 1,5 g/L de bicarbonato sódico y suero NCS al 10% (v/v). Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas de 75 ó 150 cm² a una densidad de 2.000 células/cm², refrescándose 2 veces a la semana mediante el uso de una solución comercial de 0,5 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA (Sigma). Las células obtenidas se sometieron a un test de viabilidad celular con azul tripán y posteriormente se sembraron en el soporte adecuado según la finalidad del experimento. De esta forma, las células dirigidas a estudios microscópicos fueron sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro, que fueron colocados sobre placas individuales de 35 mm de diámetro o placas de 6 pocillos. Las células utilizadas para la obtención de extractos proteicos se sembraron en placas individuales de 35 mm de diámetro o placas de 6 pocillos. En el caso de las células destinadas a experimentos de electroporación, la siembra se realizó sobre placas de 150 mm de diámetro. En todos los casos se mantuvo la misma densidad de siembra (3.000 células/cm²). Para su diferenciación, las células se dejaron crecer hasta alcanzar un 100% de confluencia y, en ese momento, se incubaron en DMEM con 4,5 g/L de glucosa suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/L), suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v) (PAA, Pasching, Austria), 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 tiempo, las células se incubaron y se mantuvieron en medio DMEM con glucosa (4,5 g/l) suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/L), FBS (10% v/v) e insulina (10 µg/mL) (Medio de diferenciación II), durante 72 h. El medio se renovó cada 48 h, hasta que las células fueron utilizadas para las distintas manipulaciones experimentales (día 3 para los experimentos de transfección días 6-8 para el resto de los estudios).

El día del experimento, las células 3T3-L1 diferenciadas *in vitro* se privaron de suero durante 2 h y después se sometieron a los siguientes tratamientos: oleato (250 y 500 µmol/L) (Sigma) o

palmítato (250 y 500 $\mu\text{mol/L}$) (Sigma) en medio DMEM con BSA libre de ácidos grasos (Sigma) al 2% durante 18 horas, TNF- α (2,5 ng/mL) (PeproTech) durante 24 h, o medio enriquecido en glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nmol/L) (alta glucosa/alta insulina, HGHI) durante 24 h. Como controles, se utilizaron cultivos paralelos de células 3T3-L1 que fueron incubadas en el medio solo correspondiente bajo las mismas condiciones que los cultivos tratados con las sustancias indicadas.

3.2.3. Cultivo de la línea celular HEK293T

La línea celular HEK293T procedente de riñón embrionario humano, utilizada para los estudios de interacción proteína-proteína (ensayos de *GST pull-down* o de inmuno-precipitación), fue amablemente proporcionada por el Dr. Marco Antonio Calzado (Universidad de Córdoba, España). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C manteniendo un 5% de CO₂. Las células fueron utilizadas entre los pases 2 y 20. A partir del 20º pase, los cultivos se desecharon para ser sustituidos por células nuevas mantenidas en N₂ líquido. La línea fue cultivada en medio DMEM conteniendo glucosa 1 g/L y suplementado con L-glutamina 2 mM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v) y FBS al 10% (v/v). Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas de cultivo de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suiza) y se levantaron dos veces por semana utilizando una solución comercial conteniendo tripsina 0,5 g/L y EDTA 0,2 g/L (Sigma). Las células así obtenidas se sembraron en placas de 6 cm de diámetro a una densidad de 6.000 células/cm².

3.3. Estudio proteómico comparativo de tejido adiposo humano antes y después de cirugía bariátrica

3.3.1. Extracción y purificación de proteínas para estudios de electroforesis bidimensional diferencial 2D-DIGE

Para el estudio proteómico 2D-DIGE se seleccionaron 4 mujeres obesas mórbidas NG y 4 IR de las que se disponía de muestras de TASC Pre- y Post-CB. Las muestras se descongelaron y homogeneizaron por acción mecánica en 0,3 mL de urea frío/tampón de tiourea [7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 45 mM Tris, pH 8,4, suplementado con inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics)]. El homogenado se incubó durante 30 min en hielo y se centrifugó a 16000 \times g durante 5 min. A continuación, la fracción soluble se limpió y precipitó con el Kit 2D-CleanUp siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare, Barcelona, España) con el fin de preparar las muestras para su posterior isoelectroenfoque (IEF; 1ª dimensión) y electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (2ª dimensión). La concentración de proteínas en las muestras se determinó utilizando el ensayo RC/DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Todas las muestras fueron ajustadas con tampón urea/tiourea a una concentración de 2.5 mg/mL, pH 8.5-9.

Con el fin de confirmar que todas las muestras eran homogéneas se hizo un gel preparativo de acrilamida al 10% en el que se cargaron 50 μg de cada muestra. La electroforesis se llevó a cabo

aplicando un voltaje constante de 200 V y 150 mA durante un tiempo aproximado de 45 min. Posteriormente, el gel fue teñido con Azul de Coomassie y escaneado para confirmar la calidad de las muestras.

3.3.2. Electroforesis bidimensional

Una vez precipitadas y cuantificadas, las muestras resultantes fueron utilizadas para la realización de electroforesis bidimensional (2-DE). Esta técnica es capaz de separar una mezcla compleja de proteínas utilizando dos tipos de electroforesis sucesivas sobre la misma muestra (Görg et al., 2004; Gygi et al., 2000). Para esto, en primer lugar se realizó una primera dimensión o isoelectroenfoque (IE) que permite la separación de proteínas en función de su punto isoeléctrico en un gradiente de pH inmovilizado. Posteriormente, se realiza una segunda dimensión que consiste en la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) atendiendo a su masa molecular. De esta forma, se obtiene un mapa de puntos (*spots*) que representan las proteínas distribuidas en dos dimensiones.

Isoelectroenfoque (IE)

Para el IE se emplearon 50 µg de cada muestra. Las muestras fueron marcadas al azar con 400 pmol de dos fluorocromos con diferentes espectros de excitación y emisión Cy3 (532/580 nm), y Cy5 (633/670) (CyDye DIGE Fluors; GE Healthcare). El estándar interno (mezcla de todas las muestras) se marcó con 400 pmol de Cy2 (488/520 nm). Posteriormente, se combinó el estándar interno con las muestras marcadas con Cy3 ó Cy5. La reacción de marcaje se realizó en oscuridad y en hielo durante 30 min y después fue inactivada mediante la adición de 1 µL de lisina (10 mM) en hielo durante 10 min.

La mezcla de muestras marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5 (150 µg) se diluyeron a un volumen final de 340 µL con tampón de rehidratación (GE Healthcare) que contenía 0,8% (v/v) de tampón IPG (Immobiline DryStrip, GE Healthcare). Las muestras se depositaron en sarcófagos (Ettan IPGphor Ceramic Strip Holders, GE Healthcare) en los que se introdujeron las tiras (18 cm, pH 3-10 NL) de IEF para su hidratación, manteniéndose durante aproximadamente 15 h a temperatura ambiente en presencia de aceite mineral (Mineral Oil Biotechnology, Bio-Rad). Tras la rehidratación, se eliminó el exceso de aceite y los sarcófagos se situaron sobre un sistema de enfoque eléctrico (Ettan IPGphor 3 System, GE Healthcare). El programa de enfoque constó de los siguientes pasos: 3 h a 300 V, gradiente de voltaje de 2 h hasta alcanzar 1000 V, gradiente de voltaje de 2 h hasta alcanzar 8000 V, y un paso final hasta alcanzar los 40000 V/h totales. Todo el proceso se llevó a cabo a 20°C y un máximo de 50 µA/tira. Una vez finalizado el IE, es necesario el equilibrado de las tiras antes de la separación de las proteínas en una segunda dimensión mediante SDS-PAGE. Las tiras se introdujeron en tampón de equilibrado (Tris 75 mM, pH 8,8, 6 M urea, 30% de glicerol, 2% SDS) que contenía

0,5% de DTT durante 15 min, seguido de un lavado de 15 min con tampón de equilibrado que contenía 4,5% de iodoacetamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y análisis de datos

Tras equilibrar las tiras, se pasó a realizar la segunda dimensión en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se separaron en geles al 12% de Tris-glicina utilizando un sistema Ettan Dalt Six (GE Healthcare). La electroforesis tuvo lugar a un voltaje constante de 20 V durante 35 min (las proteínas que se resolvieron estaban en un peso molecular superior a 20 kDa). Una vez finalizada la separación electroforética, los geles de poliacrilamida fueron fijados y teñidos para la visualización de las proteínas. Concretamente, los geles fueron fijados con 500 mL de 10% de metanol (v/v) y 7% de ácido acético (v/v) durante 30 min. A continuación, los geles se tiñeron con SYPRO Rubi Protein Stains (Bio-Rad) (24 h) y/o 0,1% azul brillante de Coomassie G-250 conteniendo 10% de sulfato de amonio, 2% de ácido fosfórico y 20% de metanol durante 24 horas. Los geles se destiñeron con 500 mL de una solución que contenía 10% de metanol (v/v) y 7% de ácido acético v/v durante 1 h, tras lo cual se mantuvieron en 500 mL de H₂O bidestilada hasta el día siguiente. Los geles se guardaron en 400 mL de 3% de ácido acético (v/v). Todos los pasos se llevaron a cabo preservando los geles de la luz.

Una vez teñidos los geles, las imágenes deben ser digitalizadas y guardadas en archivos de imagen informáticos para poder ser analizadas. Para ello, los geles fueron escaneados con un escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) a 100 micras de resolución utilizando longitudes de onda de excitación y emisión individuales apropiados. La cuantificación relativa de proteínas expresadas diferencialmente se realizó utilizando el software DeCyder versión 7.0 (GE Healthcare). Para compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción en cada gel, se aplicó un modelo de regresión. Este método calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos sus puntos y que sirve para calcular el factor de normalización para cada *spot*. Por último, se realizó un análisis cuantitativo y otro estadístico mediante una prueba de T de Student para comparar la expresión diferencial de los spots entre los diferentes grupos. Solo se consideraron significativas aquellos *spots* con valores $p < 0.05$.

3.3.3. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF)

Los *spots* con cambios significativos fueron extraídos y digeridos del gel de forma automática en una estación ProPic (Genomic Solutions, Huntingdon, Reino Unido) para su posterior análisis mediante espectrometría de masas (MS) utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF/TOF (Bruker Ultraflex III TOF/TOF), por mapeo peptídico. Los espectros obtenidos en la MS fueron adquiridos en modo de ion positivo con un reflector Nd: YAG a una longitud de onda de 355 nm, con un promedio de 1.000 disparos de láser y por lo menos tres picos de autolisis de tripsina que fueron usados como

calibración interna. Todos los espectros MS/MS fueron obtenidos seleccionando los precursores con una resolución relativa de 300 (FWHM).

La identificación de proteínas se realizó usando GPS Explorer Software v3.6, Mascot software v2.1 (Matrix Science, London, Reino Unido) y una base de datos humana SwissProt 56.0 como motores de búsqueda sobre la base de datos MSDB o NCBIInr. Estos programas proporcionan una lista priorizada que incluye aquellas proteínas que presentan mayor probabilidad de corresponderse con la proteína analizada en función de su huella peptídica. En el análisis se limitaron a péptidos de seis o más aminoácidos con carbamidometilación completa de los residuos de cisteína y oxidación parcial de los residuos de metionina. Todos los espectros y los análisis obtenidos en las bases de datos fueron evaluados manualmente y en detalle utilizando el software SwissProt 56.0. Se consideraron significativos ($p < 0.05$) aquellas proteínas con puntuaciones superiores a 56, considerando positiva la identificación cuando el porcentaje de intervalo de confianza (CI%) era superior a 98. En el caso de los espectros MS/MS, se consideraron significativos los valores por encima de 95 en el CI%.

3.4. Análisis bioinformático

3.4.1. Análisis mediante *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) Y PANTHER

Para el análisis bioinformático de las proteínas identificadas, se emplearon dos programas bioinformáticos: *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) y PANTHER. El IPA, genera redes de interacción directa e indirecta de rutas metabólicas en las que las proteínas del estudio se encuentran implicadas, el programa realiza las interacciones en base a la literatura científica y las jerarquiza mediante el Test de Fisher (*score* que indica que tan relevante es la red dentro del análisis). Por otra parte el programa bioinformático PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationship*, <http://www.pantherdb.org/>) nos permite clasificar las proteínas dentro de los grupos ontológicos del Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>) en función de: procesos biológicos, función celular o bien componente celular en donde está descrito que se localizan las proteínas.

3.4.2. Diseño de oligonucleótidos para PCR

Para el diseño de oligonucleótidos de PCR convencional se utilizaron los programas Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU) y el programa en red Primer3 (desarrollado por Steve Rozen y Helen Skaletsky y subvencionado por el Instituto Médico Howard Hughes y el Instituto Nacional de la Salud). Los oligonucleótidos fueron específicos para la secuencia de interés, evitando sitios de unión inespecíficos ni la formación de estructuras demasiado estables, los oligonucleótidos se eligieron con una temperatura de alineamiento alrededor de 60° C.

Por otro lado para el diseño de oligonucleótidos para PCR a tiempo real se utilizó el programa Primer Express® 1.0 (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EE.UU.). Los dos oligonucleótidos de una misma pareja se diseñaron flanqueando un intrón para evitar la amplificación del ADN genómico que

pudiera contaminar la muestra. Así mismo, se diseñaron teniendo en cuenta que la temperatura de la sonda fuera de 9-10° C superior a la de los primers.

3.4.3. Secuenciación

Todas las construcciones generadas en los diferentes vectores de expresión de células, así como los productos de PCR se secuenciaron con los oligonucleótidos adecuados en el laboratorio de genética STAB VIDA, Lisboa, Portugal.

3.4.4. Análisis general de secuencias

Los cromatogramas resultantes de las reacciones de secuenciación fueron analizados con la ayuda del programa Chromas 2.11 (Technelysium, Helensvale, Queensland, Australia) y las secuencias derivadas de ellos fueron exportadas a formato FASTA y editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias se compararon con la base de datos del NCBI utilizando las diferentes opciones de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.4.5. Análisis de secuencias aminoacídicas

El análisis de la estructura secundaria y terciaria, así como de los motivos y dominios estructurales y funcionales existentes en la secuencia aminoacídica de la proteína analizada en este trabajo (SEPT11) se realizó utilizando diferentes algoritmos bioinformáticos incluidos en el servidor Expasy (<http://www.expasy.net/>). En concreto, se empleó el algoritmo *Coils* para predecir la existencia de regiones aminoacídicas con probabilidad de formar estructuras *coiled-coil*, los algoritmos HMMTOP, SOSUI y TMHMM para determinar la existencia de dominios transmembrana y los algoritmos ScanProsite, MotifScan y Pfam para la búsqueda de motivos y dominios estructurales y funcionales.

3.5. Ensayos de Biología Molecular

3.5.1. Aislamiento de ARN

El aislamiento de ARNm total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo y omental así como las muestras de adipocitos humanos diferenciados *in vitro* se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Barcelona, España).

Las muestras de tejido adiposo (250 mg) y los extractos celulares provenientes de adipocitos diferenciados *in vitro* fueron homogeneizados en 1 mL de Trizol y posteriormente centrifugados 10 min a 12000 \times g a 4°C, separando la muestra en tres fases: una fase que contenía lípidos, otra fase que contenía el ARNm y finalmente una tercera fase con restos celulares. Las muestras conteniendo ARNm se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min, y posteriormente se añadieron 200 μ L de

cloroformo seguido de una agitación fuerte de las mismas durante 15 seg, incubación de 2-3 min a temperatura ambiente y centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4°C, llevándose a cabo una nueva separación de las muestras en dos fases: fase acuosa (ARN) y fase orgánica (ADN y proteínas). Se recogieron aproximadamente 500 μ L de la fase acuosa (ARN).

Tras la extracción, se llevó a cabo la precipitación del ARN en las muestras adicionando 500 μ L de isopropanol y posterior agitación fuerte, seguida de una incubación de 10 min a temperatura ambiente, centrifugación a 12000 x g durante 10 min a 4°C y un lavado con etanol frío al 75% (v/v). Finalmente, el ARN en las muestras fue purificado utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todo el proceso se realizó con guantes para evitar la acción de las RNasas. Se comprobó la concentración y calidad del ARN midiendo la absorbancia del extracto a 260 y 280 nm y mediante la electroforesis del mismo en geles de agarosa al 1,5%.

3.5.2. Retro-transcripción del ARN

En primer lugar, se incubó el extracto de ARN total durante 60 min a 37°C con 10 unidades de DNasa I libre de RNasas (Qiagen) para eliminar los restos de ADN genómico. A continuación, se utilizó 1 μ g de ARN total para su copia a ADNc, que se llevó a cabo a 37°C durante 60 min en un volumen de 20 μ L con Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotretol 10 mM, 100 ng de *random primers*, 1 mM de cada dNTP (Roche), 20 unidades de inhibidor de RNasas y 200 unidades de MMLV RT (Invitrogen). Transcurrido este tiempo, la enzima MMLV RT se inactivó calentando la muestra a 95°C durante 5 min.

3.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real

Los niveles de transcripción de SEPT2, SEPT9, SEPT11, CAV-1 y FABP5 fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems). Los cebadores así como las sondas utilizadas para amplificar el ADNc de SEPT2, SEPT9, SEPT11, CAV-1 y FABP5 de humano se muestran en la Tabla 1. Las sondas fueron diseñadas para que hibridaran entre dos exones, asegurando así la detección del transcrito correspondiente y evitando la amplificación de ADN genómico. El ADNc se amplificó en las siguientes condiciones: 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 59°C, utilizando la mezcla de Master Mix universal TaqMan (Applied Biosystems). Las concentraciones de cebadores y sonda para la amplificación de los genes fueron 300 nmol/L y 200 nmol/L, respectivamente. Todos los resultados fueron normalizados en relación a los niveles de ARN ribosómico 18S (Applied Biosystems), que se usó como control interno. Como control negativo, en cada reacción de RT-PCR se utilizó un triplicado en ausencia de muestra y presencia de H₂O DMPC.

La cuantificación relativa de expresión fue calculada teniendo en cuenta la formula $e^{-\Delta\Delta Ct}$, donde e , que es 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%). Todas las muestras se realizaron por triplicado y se calcularon los valores medios.

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en los estudios de PCR cuantitativa a tiempo real

Gen (Código GenBank)	Nombre	Secuencia (5'-3')
CAV-1 (NM_001753)	Forward	AACGATGACGTGGTCAAGATTG
	Reverse	TCCAAATGCCGTCAAACCTGT
	Sonda	FAM-TTGAAGATGTGATTGCAGAACCAGAAGGGA-TAMRA
SEPT2 (NM_001008491)	Forward	TGGCGTTTATGAAGGCAATACAC
	Reverse	GCTGAAGAAAAGGATTCTGGATGA
	Sonda	FAM-ACACTCTCACCTGAAGGAACGGGAGC-TAMRA
SEPT9 (NM_001113491.1)	Forward	CCACTTCAAACAGCGGATCAC
	Reverse	ATGATCCCATTGTGCTGTGGTG
	Sonda	FAM-CTGTCCAACGGCATCGACGTGTACC-TAMRA
SEPT11 (NM_018243.2)	Forward	GTGCAGGTTGAGAATGAAAATCATT
	Reverse	CACTATGAATTGTACCGACGCTGT
	Sonda	FAM-AACTTCGAGAGATGCTGATCCGCGTG-TAMRA
FABP5 (NM_001444.2)	Forward	GAGTGGGAATAGCTTTGCGAAA
	Reverse	AACACAGTTTTCTTGTACCCTGGG
	Sonda	FAM-CGCAATGGCCAAGCCAGATTGTATCA-TAMRA

3.5.4. Clonación del gen SEPT11

Obtención de la secuencia codificante completa del gen SEPT11 humano

La secuencia codificante completa del gen septin 11 (*SEPT11*) humano se amplificó mediante PCR a partir de ADNc de TASC humano. Para llevar a cabo esta amplificación, se utilizó un oligonucleótido sentido que se ancla previo a la región del codón ATG del inicio de la traducción y otro antisentido próximo al codón de fin de mensaje de dicha secuencia codificante (Tabla 2) y una ADN polimerasa de alta fidelidad (Pwo Superyield DNA Polymerase, Roche Diagnostics). Como referencia para realizar el diseño de estos oligonucleótidos, se utilizó la secuencia codificante del gen *SEPT11* humano existente en las bases de datos (número de acceso Genbank: NM_018243.2). Tras una primera ronda de amplificaciones, la mezcla de productos generados se clonaron en el vector pMBL-T. Tras la secuenciación de los productos obtenidos, se seleccionaron dos clones bacterianos conteniendo las formas moleculares de ADNc previamente identificadas para el gen *SEPT11* humano a partir de las bases de datos. Por otra parte, se comparó la homología e identidad de la secuencia de *SEPT11* de humano y la de ratón, hallando un 99% de homología y un 99% de identidad entre las dos secuencias.

Tabla 2: Oligonucleótidos empleados para la clonación de ADNc del gen SEPT11 humano

Nombre	Secuencia (5'-3')	Alin. (°C)
Forw-1A	GGAGTCGGCGTAAAGCAC	58
Rev-1B2B	CAACAACATTCAGCAAAACGAG	

Clonación de la secuencia codificante del gen SEPT11 en vectores eucariotas

La secuencia codificante del gen *SEPT11* humano se re-amplificó mediante PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (Pwo Superyield DNA Polymerase, Roche Diagnostics) y parejas de oligonucleótidos conteniendo sitios de restricción específicos para su clonación en los vectores phrGFP-N1 (Stratagene, Madrid, España), pDsRed-Monomer-C1 y pCMV-Myc (Clontech, Madrid, España) (Tabla 3). En estos vectores, la secuencia reportera (GFP o Myc) quedó fusionada al extremo amino-terminal de la proteína a estudiar, a excepción del vector pDsRed-C1, en el que la secuencia reportera quedó unida al extremo carboxilo-terminal.

Todos los plásmidos recombinantes fueron secuenciados para confirmar la secuencia del inserto y la existencia de una única fase abierta de lectura entre la proteína reportera y la proteína de interés.

Tabla 3: Oligonucleótidos empleados para la clonación de las secuencias codificantes de el gen *SEPT11* humano en vectores de expresión.

Nombre Primer	Secuencia (5'-3') <u>sitio de restricción</u>	Vector de expresión generado
<i>Forward</i> S11GFP- <i>XhoI</i>	<u>TCTCGAGATGCAGCTGCCATGGCCGT</u>	phrGFP-N1 mSEPT11 (CDS completa)
<i>Reverse</i> S11GFP- <i>Sall</i>	<u>GTCGACTGCCAGGCTTTATGTGAAGCT</u>	
<i>Forward</i> S11DSR- <i>XhoI</i>	<u>TCTCGAGATGCAGCTGCCATGGCC</u> GT	pDsRed-Monomer-C1 mSEPT11 (CDS completa)
<i>Reverse</i> S11DSR- <i>Sall</i>	<u>GTCGACTGCCAGGCTTTATGTGAAGCT</u>	
<i>Forward</i> S11Myc- <i>Sall</i>	<u>GTCGACATGGCCGTGGCC</u>	pCMV-Myc mSEPT11 (CDS completa)
<i>Reverse</i> S11	<u>GCGGCCGCTTATGTGAAGCTTG</u>	
<i>Myc-NotI</i>		

3.5.5. Silenciamiento del gen SEPT11 mediante ARN interferente

Para reducir la expresión de SEPT11, se hizo uso de la metodología de interferencia por ARN (RNAi). Su aplicación se llevó a cabo siguiendo dos procedimientos para introducir el mediador molecular del ARNi en las células. Concretamente, se utilizaron dos siRNA pequeños interferentes (siRNA) para *SEPT11* y un control (Qiagen) (Tabla 4), que se introdujeron en las células mediante transfección (para cultivos de células 3T3-L1 a día 3 de diferenciación) o electroporación (para cultivos de células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación).

Tabla 4: siRNA para reducir la expresión de SEPT11 empleado en este trabajo.

Identificación	Secuencia diana del siRNA (5'-3')
#1	CCCGACCAGCTGGTCAACAAA
#2	AAAGACATGCTCAGAAACAAA
Control negativo	AATTCTCCGAACGTGTCACGT

3.6. Estudios bioquímicos

3.6.1. Obtención de extractos proteicos

Para los estudios de *western blotting*, se obtuvieron extractos de tejidos y cultivos celulares. Las biopsias de tejido adiposo se descongelaron y homogeneizaron por acción mecánica en 0,3 mL de urea frío/tampón de tiourea [7M urea, 2M tiourea, 4% de CHAPS, 45 mM Tris, pH 8,4, suplementado con inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics)]. El homogeneizado se incubó durante 30 min en hielo y se centrifugó a $16000 \times g$ durante 5 min; la fracción soluble se recogió y se guardó a -80°C para su posterior uso. Todo el protocolo se llevó a cabo en hielo. La concentración de proteína total de los extractos se cuantificó utilizando el método Lowry.

En el caso de los cultivos celulares, las células se lavaron con PBS 0,01 M, pH 7,4, para eliminar restos de medio de cultivo y se trataron con tampón de extracción RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v), SDS 0,1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antipaina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatina A 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células se rasparon en un volumen adecuado de tampón de extracción (200 μL -500 μL) y los medios resultantes se homogeneizaron con ayuda de una jeringa de 1 mL y aguja de 25-G. Los extractos se incubaron durante 30 min en hielo y se sometieron a 3 pulsos de sonicación y posteriormente fueron centrifugados durante 5 min a $9.000 \times g$ a 4°C para eliminar restos celulares. Finalmente el sobrenadante conteniendo la fracción proteica se conservó a -80°C hasta su posterior análisis.

Todos los protocolos de extracción se llevaron a cabo en hielo. La concentración de proteína total de los extractos se cuantificó utilizando el método Lowry.

3.6.2. Aislamiento de fracciones citosólica y de membrana de adipocitos

Con el fin de identificar la localización celular de SEPT11, se procedió al aislamiento de fracciones celulares citosólica y de membrana de adipocitos 3T3-L1. Para ello, células 3T3-L1 sembradas a una densidad de $3000 \text{ c}/\text{cm}^2$ en placas de 15 cm de diámetro y mantenidas en cultivo hasta día 8 de diferenciación se lavaron con PBS 0,01 M pH 7,4, se recogieron en 1 mL de tampón de lisis HES (HEPES 20 mM, sacarosa 255 mM y EDTA 1 mM, pH 7,4) con inhibidores de proteasas [CLAP (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solución 0,1%) y PMSF (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solución 0,1%)] y se lisaron en un homogeneizador de vidrio-vidrio durante 30 seg. La homogeneización se completó haciendo pasar el lisado 20 veces a través de una aguja de 25-G. Los núcleos y las células no lisadas se eliminaron mediante centrifugación a $1.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante resultante (*postnuclear supernatant*, PNS), del que se guardaron 150 μL para su posterior análisis, se centrifugó a $200.000 \times g$ durante 2 horas a 4°C en un rotor SW60 (Beckman Coulter, España, Madrid), para obtener la fracción cruda de membrana en la pella (fracción M) y la fracción citosólica en el sobrenadante (fracción C). La fracción

cruda de membrana se resuspendió en 1 mL de tampón RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v), SDS 0,1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 µg/mL, leupeptina 5 µg/mL, antipaina 5 µg/mL, pepstatina A 5 µg/mL) mediante pipeteo, pasando el extracto 5 veces a través de una aguja 25-G y sonicando. A continuación, se añadió la cantidad de volumen necesaria para igualar el volumen de la fracción citosólica. Las fracciones obtenidas se precipitaron con acetona, se resuspendieron en tampón HES y se cuantificaron.

3.6.3. Extracción diferencial de proteínas de membrana

Para determinar el tipo de unión que SEPT11 mantiene con las membranas celulares, se adaptaron protocolos descritos previamente basados en la extracción diferencial de proteínas de membrana usando diferentes compuestos (Gillingham et al., 2002; Kim, 2003). Concretamente, la fracción cruda de membrana (M) de células 3T3-L1 obtenida como se ha descrito en el apartado anterior, se ajustó hasta un volumen final de 3 mL con tampón de lisis. A continuación, se extrajeron 600 µL de tampón de la fracción M (aproximadamente 500 µg de proteína) con 600 µL de tampón de lisis conteniendo NaCl 1M, Tritón X-100 2% (v/v) o SDS al 1% (m/v) o con 600 µL de Na₂CO₃ 200 mM, pH 11, durante una hora a 4°C. Tras la extracción, las muestras fueron centrifugadas a 200.000 x g durante 2 horas a 4°C en un rotor SW60 con el fin de separar las proteínas extraídas en el sobrenadante y las proteínas no extraídas en la pella. Posteriormente, las pellas se resuspendieron en 1,2 mL de tampón de lisis y las proteínas de cada fracción fueron precipitadas con acetona y resuspendidas en 150 µL de tampón de lisis y finalmente cuantificadas para su estudio mediante *western blotting*.

3.6.4. Aislamiento de gotas lipídicas

Para establecer si SEPT11 se encontraba en la fracción de gotas lipídicas de los adipocitos, se llevó a cabo el aislamiento de fracciones enriquecidas en gotas lipídicas. Para ello, se prepararon cultivos de células 3T3-L1 en placas de 15 cm de diámetro y a una densidad de 3000 c/cm², las células fueron mantenidas en cultivo hasta día 8 de diferenciación, se lavaron con D-PBS y se centrifugaron a 1.500 x g durante 10 min. La pella obtenida se resuspendió en 3 mL de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, pH 7,4, e inhibidores de proteasas), se pasó 30 veces por una aguja 25 G en hielo y se mezcló con un volumen igual de tampón de lisis que contenía 1,08 M de sacarosa. Las células se centrifugaron a 1.500 x g durante 10 min a 4°C. La pella obtenida incluye la fracción de núcleos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrifugación de 12 mL y se añadieron secuencialmente 2 mL de tampón de sacarosa 0,27 M, 2 mL de tampón de sacarosa 0,135 M y 2 mL de *Top Solution* (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, pH 7,4). La mezcla se centrifugó a 150.500 x g durante 2 h a 4°C. Se recogieron 8 fracciones, correspondientes a las gotas lipídicas (fracciones 1 y 2, que se unieron en una sola muestra para su posterior estudio), zona

intermedia entre gotas lipídicas y citosol (fracciones 3 y 4), y el citosol (fracciones 5-7, unidas en una sola muestra para posterior estudio). La fracción 8 y la pella constituyen la fracción total de membrana. Esta fracción de membrana así como la fracción de núcleos se solubilizaron en 1,5 mL de tampón *Top Solution* mediante sonicación. Para eliminar los lípidos de la fracción de gotas lipídicas se siguió el protocolo de precipitación con acetona (ver apartado 3.6.6), mientras que el resto de fracciones se precipitaron utilizando Cloroformo/Metanol (apartado 3.6.7).

3.6.5. Aislamiento de caveolas mediante fraccionamiento proteico en gradiente discontinuo de sacarosa

Para el aislamiento de caveolas se utilizó un protocolo basado en la centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa de extractos celulares obtenidos en un tampón libre de detergentes, adaptado para células 3T3-L1 a partir del método descrito por Díaz-Ruiz y colaboradores (Díaz-Ruiz et al., 2013). Así, las células 3T3-L1 crecidas a día 8 y en confluencia en placas de 15 cm de diámetro sembradas a una densidad de 3000 c/cm² se rasparon en 0,5 mL de tampón de lisis (500 mM, Na₂CO₃ pH 11,0) conteniendo inhibidores de proteasas. El extracto celular fue transferido a un tubo y se lisó haciéndolo pasar 20 veces a través de una aguja 25-G y sonicando. Posteriormente, el homogeneizado se ajustó a una concentración de 45% de sacarosa mediante la adición de 0,5 mL de una solución de sacarosa al 90% preparada en tampón MBS [25 mM MES, pH 6.5, 0.15 M NaCl]. El homogenado se situó en el fondo de un tubo de ultracentrífuga y sobre él se generó un gradiente discontinuo de sacarosa 5-35% mediante la adición de 2,4 mL de una solución de sacarosa al 35% y 0,6 mL de una solución de sacarosa al 5%, ambas preparadas en tampón MBS conteniendo 250 mM de Na₂CO₃. El gradiente discontinuo obtenido (5-35-45 %) se centrifugó a 200.00 x g durante 4 horas a 4° C en un rotor SW60, y se recogieron nueve fracciones de 450 µL desde la parte superior del gradiente. Las proteínas de cada fracción fueron precipitadas mediante el método cloroformo/metanol, y los precipitados fueron resuspendidos en 40 µL de tampón de carga 1,5x. La distribución de las distintas proteínas en las nueve fracciones (F1 a F9) obtenidas fue analizada mediante *western blotting*.

3.6.6. Precipitación de proteínas con acetona

Para el aislamiento de las proteínas de las distintas fracciones subcelulares, se añadieron 4 volúmenes de acetona fría por cada volumen de muestra, se mezcló con vórtex y se dejó a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1.400 x g durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 100 µL de metanol frío para eliminar la acetona y se centrifugó de nuevo a 1.400 x g durante 10 min a 4°C. Finalmente, se eliminó el metanol y se dejó secar la pella, que se resuspendió en el tampón adecuado.

3.6.7. Precipitación de proteínas por el método Cloroformo/Metanol

Para llevar a cabo este procedimiento, por cada 100 μL de muestra, se añadieron por orden sucesivo 400 μL de metanol, 100 μL de cloroformo y 300 μL de agua, mezclando siempre mediante vortex tras cada paso. La mezcla se centrifugó a 14.000 $\times g$ durante 1 min y se eliminó la capa acuosa superior. Se añadieron de nuevo 400 μL de metanol y la mezcla se centrifugó a 14.000 $\times g$ durante 2 min. Finalmente, se eliminaron los restos de metanol y se dejó secar la pella a temperatura ambiente, que se resuspendió en 40 μL de tampón de carga 1,5x para su posterior análisis por *western blotting*.

3.6.8. Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia

Tras la obtención de los diferentes extractos y fracciones proteicas, se determinó la concentración de proteína total en los mismos por el método Lowry. Tras determinar la concentración de proteína total de los diferentes extractos y fracciones proteicas, las muestras se prepararon para su separación electroforética mezclando 4 volúmenes del extracto proteico y 1 volumen de tampón de carga 5x [Tris-HCl 500 mM, SDS 7,5 % (m/v), EDTA 10 mM, sacarosa 50% (m/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), DTT 250 mM, azul de bromofenol 5 mg/mL, pH 6,8]. Las muestras se hirvieron durante 5-10 min a 95°C para desnaturizar las proteínas y se centrifugaron a 8.000 $\times g$ durante 5 min a 4°C para eliminar restos insolubles. Una vez preparados, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 20-50 μg de proteína, utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) con geles de un porcentaje de 7,5, 10 o 12,5% o usando el sistema Criterion (Bio-Rad) con geles SDS-PAGE Tris-HCl prefabricados con gradiente de 4-20% (Bio-Rad).

La migración con ambos sistemas se llevó a cabo a 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 membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corp., Pensacola, FL, EE.UU.) o para el sistema Criterion, en membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). La transferencia transcurrió aplicando un campo eléctrico con una intensidad de 400 mA, 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)]. En el caso del uso de geles prefabricados, la transferencia se llevó a cabo empleando el sistema de transferencia Turbo (Bio-Rad) que aplica una potencia de 1.3 A, 2.5 V durante 10 min. Tras la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con Rojo Ponceau [Ponceau S al 0.1% (m/v) en ácido acético al 1% (v/v)] durante 5 min para comprobar que la transferencia había sido correcta y la igualdad de carga entre muestras.

3.6.9. Inmunodetección y análisis densitométrico

Las membranas fueron lavadas con una solución de tampón Tris salino (TBS) (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) y posteriormente con solución TBS conteniendo 0.05% de Tween-20

(v/v) (TTBS). A continuación, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con solución TTBS y leche desnatada en polvo (Bio-Rad) al 5% (m/v). Después, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Las características de los diferentes anticuerpos primarios utilizados se resumen en la Tabla 5. A continuación, las membranas se lavaron tres veces durante 15 min con tampón de lavado TTBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-raton, conejo o cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma) diluido en tampón de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces durante 15 min con tampón de lavado TTBS y un último lavado con TBS. El revelado de la peroxidasa se llevó a cabo con el kit de detección de la peroxidasa basado en quimioluminiscencia (ECL-Plus GE Healthcare) y películas auto-radiográficas (BioMax XAR Kodak, Sigma).

Tras el revelado, las películas se escanearon y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa Adobe PhotoshopCS 8.0.1. En los casos en los que se llevó a cabo un análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas, se determinó la densidad óptica (DO) de las mismas utilizando el programa ImageJ 1.40g (NIH, EE.UU). Para normalizar la carga de proteína en las diferentes calles, se realizó la inmunotinción contra β -actina, y la DO para la proteína de interés se refirió a aquella de la β -actina en el mismo gel. En aquellos casos en los que la normalización con β -actina no se pudo realizar, ésta se llevó a cabo en relación con la DO resultante de la tinción con Rojo Ponceau en cada calle.

3.7. Transfección y electroporación de líneas celulares

3.7.1. Transfección

La introducción de vectores plasmídicos de expresión en células HEK293T se realizó mediante transfección con el reactivo *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron transfectadas 2 ó 3 días tras su siembra, cuando el cultivo alcanzó una densidad aproximada del 60%-70%. Así, se transfectaron 4 μ g de ADN plasmídico y 7,5 μ L de *Lipofectamine 2000* por cada placa de 3,5 cm de diámetro y 2 μ g de ADN plasmídico para estudios de inmunoprecipitación y 3 μ L de *Lipofectamine 2000* para las placas de 35 mm de diámetro para estudios de imagen celular. La transfección se realizó en medio OptiMEM I (Gibco) durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de transfección y se añadió medio de cultivo fresco. Tras la transfección, las células se cultivaron durante 2 ó 3 días adicionales antes de realizar los estudios correspondientes.

Tabla 5: Anticuerpos utilizados en estudios de western blotting

Nombre	Origen	Dilucion	Proporcionado por/referencia
Anti-adiponectina	Ratón	1:500	Chemi-Con (Billerica, EE.UU)/ MAB3608
Anti-AL1A1	Conejo	1:2000	Abcam (Abcam, Cambridge, Reino Unido)/ AB52492
Anti-VEGF	Cabra	1/1000	R&D Systems (Abingdon, Reino Unido)/ AB293-NA
Anti-JNK	Ratón	1/1000	R&D Systems/ AF1387
Anti-pJNK	Conejo	1/500	R&D Systems/ AF1205
Anti-TCP1- β	Conejo	1/5000	Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.)/ NBP1-40823
Anti-DLDH	Conejo	1:1500	Lifespan BioSciences (St. Louis, EE.UU.)/ LSC138850
Anti-JNK	Conejo	1:750	R&D Systems/ AF1387
Anti-p-JNK	Conejo	1:750	R&D Systems/ AF1205
Anti-mitofilina	Conejo	1:2500	Abcam/AB48139
Anti-perilipina	Cabra	1:500	Santa Cruz (Heidelberg, Alemania)/ SC-47320
Anti-PGC1- α	Conejo	1:400	Santa Cruz/ SC-13067
Anti-Septin-11	Conejo	1:5000	Abcam/ AB183537
Anti-SYWC	Ratón	1:1000	R&D Systems/ H00007453-M02
Anti-Vimentina	Conejo	1:1000	Biomedal (Sevilla, España)/ AB-5042
Anti-Calnexina	Cabra	1:100	Santa Cruz/ SC-6465
Anti-Akt	Conejo	1:1000	Cell Signaling (Massachusetts, EE.UU.)/ 9272
Anti-pAkt (Ser473)	Conejo	1:1000	Cell Signaling/ 4060
Anti-Caveolina-1	Conejo	1:1000	Sigma/ C4490
Anti-GFP	Conejo	1:2000	Abcam/ AB290
Anti-GM130	Ratón	1:750	BD Biosciences/ 610822
Anti-cMyc	Ratón	1:1000	AbD Serotec (Oxford, Reino Unido)/ MCA2200
Anti-cMyc	Conejo	1:750	Cell Signaling/ 2278
Anti- β -actina	Ratón	1:50000	Sigma/ A2066
Anti-IRS	Conejo	1:500	Santa Cruz/ SC-7200
Anti-pIRS	Conejo	1:500	Santa Cruz/ SC-33956
Anti-Glutation sintetasa	Conejo	1:500	Abcam/ ab133592
Anti-ERK	Conejo	1:1000	Abcam/ AB196883
Anti-pERK	Conejo	1:1000	Abcam/ AB24157
Anti-FABP5	Ratón	1:500	Santa Cruz/ SC365166

3.7.2. Electroporación

La introducción de vectores plasmídicos de expresión o de siRNAs sintéticos en células 3T3-L1 se llevó a cabo mediante electroporación, las células fueron sembradas en placas de 15 cm de diámetro y a una densidad de 3000 c/cm², cuando las células se encontraban a día 6 de diferenciación. Se utilizó el sistema Gene Pulse Xcell (BioRad) y cubetas de 2 mm de grosor (BioRad). Cada electroporación se realizó en un volumen final de 100 µL de medio D-PBS (Dulbecco-PBS sin Mg²⁺ ni Ca²⁺; GibcoBRL), conteniendo cada cubeta 10 µg de vector para estudios de imagen celular, 15 µg de vector (en los casos de electroporaciones de los diferentes vectores de clonación) y 2 nmol de siRNA para estudios de silenciamiento. Los parámetros de electroporación consistieron en un voltaje de 0,11 Kv y 500 µF de capacitancia. Terminada la electroporación, las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio completo y posteriormente sembradas en las placas correspondientes. Transcurridas 24 h, se cambió el medio a las placas y las células fueron utilizadas a las 48 h para los estudios de sobreexpresión e imagen celular o a las 72 h para los estudios de silenciamiento. Los cubreobjetos para imagen celular en los que se sembraron las células se trataron previamente con colágeno Tipo I de cola de rata (BD Biosciences) a una concentración de 0,77 mg/mL.

3.8 Estudios de microscopía

3.8.1. Tinción de Oil Red O

Los cultivos de células 3T3-L1 que fueron tratadas con oleato, palmitato o HGHI se procesaron para su tinción con esta técnica con el fin de realizar medidas de diámetro celular a partir de imágenes de microscopía óptica y de determinación del contenido de triglicéridos neutros acumulados por espectrofotometría. Para ello, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (m/v) a temperatura ambiente en tampón PBS [PBS 0,01 M, pH 7,4] durante 15 min. Posteriormente fueron rápidamente lavadas con isopropanol 60% (Sigma), secadas durante 30 min e incubadas 30 min con solución sobresaturada de Oil Red O (Sigma) preparada en isopropanol al 60% y previamente filtrada. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con agua bidestilada dos veces. Para los estudios de microscopía, las células se montaron en solución PBS:Glicerol (1:1) para su observación en un microscopio óptico Zeiss Axiovert 40 CFL (Zeiss, Göttingen, Alemania). Se añadió 1 mL de isopropanol 100% (Sigma) a los cultivos destinados a medidas de contenido de Oil Red O, que se midieron a una DO de 500 nm.

3.8.2. Estudios histológicos mediante inmunohistoquímica

La distribución de SEPT11 en tejido adiposo se estudió mediante tinción inmunohistoquímica de secciones histológicas de tejido adiposo omental y subcutáneo de los diferentes grupos de pacientes (ver apartado 3.1.2). Las secciones de tejido adiposo incluido en parafina (6 µm) se desparafinaron con

xileno y rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (2 lavados en etanol 100% seguido de 1 lavado con etanol al 96, 80 y 70% durante 5 min cada uno). A continuación, se bloqueó la actividad interna de la peroxidasa con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma) en metanol absoluto durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de bloqueo de las secciones con suero normal de ratón (Sigma) diluido al 5% en TBS. A continuación, las secciones se incubaron a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Septin11 (Abcam) a una dilución 1:100 en TBS. Después de lavar con TBS, los portaobjetos fueron incubados con Dako Real™ Envision™ conjugado con HRP anti-conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 1 h. La reacción se visualizó usando diaminobencidina (DAB, BD Biosciences) como cromógeno y hematoxilina de Harris (Sigma) como tinción de contraste. Las secciones se deshidrataron y finalmente se montaron con Entellan (Merk, Darmstadt, Alemania). Se empleó un microscopio óptico Zeiss Axiovert 40 CFL (Zeiss, Göttingen, Alemania) para observar las tinciones. Como control negativo se procesaron secciones siguiendo el mismo proceso, pero sin utilizar el anticuerpo primario.

3.8.3. Estudios ultraestructurales mediante microscopía electrónica

Se prepararon cultivos de células 3T3-L1 a día 12 de diferenciación, que se recogieron en eppendorfs a partir de las placas de cultivo y se centrifugaron a 800 x g durante 1 min. Las células en la pella se fijaron en los eppendorfs con una mezcla de glutaraldehído al 1% y paraformaldehído al 2% preparada en tampón cacodilato 0.1 M durante 2 h a 4° C. Posteriormente, se realizó una postfijación con tetróxido de osmio 1% preparada en tampón cacodilato 0.1 M durante 1 h a 4°C seguida de un lavado rápido en tampón cacodilato 0.1 M. Posteriormente, se deshidrató la muestra con etanol a concentraciones crecientes: 30 min en etanol 50%, seguido de etanol 70% 30 min, etanol 90% 1 h y finalmente 2 h en etanol 100%. A continuación, se infiltró la muestra en Araldita Luft 502 (Polysciences, Warrington, Reino Unido) mediante incubaciones en concentraciones crecientes de araldita (2 h en óxido de propileno: araldita 1:1, 2 h en óxido de propileno: araldita1:3, 2 h en aralditapura). Después se procedió a la polimerización de la resina durante 24 horas a 65° C. Una vez polimerizados, los bloques se tallaron y se obtuvieron secciones finas utilizando un ultramicrotomo (Leica, UCT) (Servicio de microscopía electrónica del SCAI de la Universidad de Córdoba), que se montaron en rejillas de níquel de 300 mesh.

Las rejillas se procesaron para su inmunotinción con oro coloidal siguiendo el protocolo de Vázquez-Martínez et al. 2008. Para ello, las rejillas se trataron con metaperyodato sódico durante 1 h, se lavaron 3 veces con H₂O DMPC y se incubaron con BSA 0.5% preparado en solución PBS durante 20 min. Posteriormente, las rejillas se incubaron con anticuerpo primario anti-SEPT11 (dilución 1:100, Abcam) durante 24 h a 4°C. Transcurrido ese tiempo, las rejillas se lavaron 5 veces con solución PBS-BSA 0.5% y se incubaron con IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado con oro coloidal de 20 nm diámetro, (Sigma) durante 1 h, seguido de 5 lavados con solución PBS-BSA 0.5% y 3 lavados con H₂O. Posteriormente, se dejaron secar las rejillas durante 3 minutos y se procedió a realizar su

contraste con acetato de uranilo al 2% durante 30 min seguido de un lavado con H₂O abundante y contraste con citrato de plomo durante 6 minutos en presencia de NaOH y en ausencia de CO₂. La observación de las muestras se llevó a cabo con un microscopio de transmisión JEOL JEM-2010 (Philips, Madrid, Spain). (SCAI, Universidad de Córdoba).

3.8.4. Estudios de fluorescencia y microscopía confocal

Los estudios de microscopía han sido utilizados para detectar tanto proteínas endógenas mediante el uso de anticuerpos como proteínas expresadas de forma exógena asociadas a reporteros en células 3T3-L1. Estos últimos estudios se realizaron en células electroporadas a día 6, observándose bien a las 48 h (para los estudios de sobreexpresión) o 72 h (para los estudios de silenciamiento) tras la electroporación y sembradas en placas de 3,5 cm de diámetro con cubreobjetos.

Para los estudios de distribución intracelular de SEPT11 endógena en células 3T3-L1 diferenciadas, éstas se fijaron en paraformaldehído al 4% (m/v) a temperatura ambiente en tampón PBS [PBS 0,01M pH 7,4] durante 10 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con tampón de bloqueo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 1% (m/v)] durante 1 h. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario (para inmunocitoquímicas sencillas) o mezclas de anticuerpos primarios (para dobles inmunocitoquímicas) diluidos en tampón de anticuerpo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 0,5% (m/v)] durante toda la noche a 4°C. En la Tabla 6 se indican los diferentes anticuerpos primarios utilizados para los estudios de inmunocitoquímica. El exceso de anticuerpo primario no unido fue eliminado mediante tres lavados con tampón PBS y las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con el fluorocromo Alexa 405, 488 ó 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU) a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, las células se lavaron tres veces con tampón PBS y los cubreobjetos conteniendo las células inmunotñidas se montaron sobre portaobjetos utilizando PBS: Glicerol (1:1) como medio de montaje.

Para los estudios de colocalización intracelular de proteínas exógenas mediante microscopía se emplearon diferentes vectores de expresión de SEPT11, que fueron construidos para esta Tesis en nuestro laboratorio (Myc-SEPT11, GFP-SEPT11, Dsred-SEPT11) o que fueron amablemente cedidos por otros investigadores [Myc-SEPT2, Myc-SEPT9, GFP-SEPT2, GFP-SEPT9 y GFP-A48SEPT11; Dr. K. Nagata, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, Aichi, Japón]. También se emplearon construcciones para FABP5 [EGFP-FABP5, cedido muy amablemente por el Dr. Dr. Martin Kaczocha (Universidad Stony Brook de New York, EE.UU.)]. En aquellos casos en que únicamente se analizó la distribución de una proteína expresada exógenamente y unida a un marcador fluorescente (GFP o DsRed), el protocolo de preparación de las muestras terminó tras la fijación de las células, que fue realizada como se ha descrito en el párrafo anterior. En otras ocasiones, se llevó a cabo el protocolo de inmunotinción de las células electroporadas para determinar la

colocalización de las combinaciones de proteínas, endógenas y exógenas, de interés, el montaje se realizó con medio de montaje y DAPI (como marcador nuclear) 1:1. Para la identificación de filamentos de actina, las células ya fijadas fueron incubadas con faloidina (Thermo Fisher, New York, EE.UU) a una concentración de 0,15 μ M durante 30 min.

Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía confocal utilizando un equipo LSM 5 Exciter (Carl Zeiss). Para la adquisición de la señal del fluorocromo Alexa 488 y la de GFP las muestras fueron excitadas a 488 nm y se adquirió la fluorescencia emitida entre 500 y 550 nm. En el caso del fluorocromo Alexa 594, la excitación se realizó a 543 nm y se recogió la emisión entre 610 y 700 nm, mientras que para el fluorocromo Alexa 405, la excitación de la muestra se realizó a 405 y la emisión fue recogida entre 420 y 480 nm. Dependiendo de la localización de la señal fluorescente y del tamaño celular, se adquirieron entre 10 y 20 planos focales por cada canal. El conjunto de todos los planos para cada célula y canal fueron sometidos a un proceso de deconvolución con el software Huygens Essential 2.4.4 (SVI, Hilversum, Holanda) y se procesaron y analizaron utilizando los programas ImageJ 1.40g e Imaris 7.0.0 (Bitplane, Zurich, Switzerland).

Tabla 6: Anticuerpos utilizados en estudios de inmunocitoquímica.

<i>Nombre</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilucion</i>	<i>Proporcionado por/referencia</i>
Anti-SEPT11	Conejo	1:100/1:5000	Dr. M. Kinoshita (Universidad de Nagoya, Japón) y Abcam/ AB183537
Anti-Perilipina1	Cobaya	1:1000	Progen (Heidelberg, Alemania)/ 651156
Anti-cMyc	Ratón	1:1000	AbD Serotec/ MCA2200
Anti-Cav1	Ratón	1:250	Sigma/ C4490
Anti-GFP	Conejo	1:1000	Abcam/ AB290

3.9. Ensayos de interacción proteína-proteína

En este trabajo se han desarrollado tres aproximaciones metodológicas para determinar la interacción entre dos o más proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*: ensayo de doble híbrido en levadura (*Yeast two-hybrid*, Y2H) para determinar el interactoma de SEPT11, y ensayos de GST *pull-down* y co-inmunoprecipitación para evaluar su interacción con proteínas concretas.

3.9.1. Determinación de proteínas efectoras de SEPT11 mediante ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H)

Con el fin de determinar la interacción de SEPT11 con otras proteínas, se utilizó el sistema de doble híbrido en levadura optimizado con el kit Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Y2H, Clontech), siguiendo el protocolo establecido por la Dra. Y. Rabanal en nuestro laboratorio.

EL Y2H es una técnica en la que se usan dos dominios independientes: dominio de unión al ADN (BD) de la proteína GAL4 de levadura (*bait*: híbrido del BD unido a SEPT11) y el dominio de activación transcripcional (AD) de GAL4 (librería del TASC de rata unido a AD). Para que se de la transcripción son necesarios los dos dominios ya mencionados, de tal manera que únicamente cuando

hay una interacción entre SEPT11 y una proteína de la librería, tanto el BD como el AD de GAL4 se localizan en la región reguladora y permiten la transcripción de genes reporteros (AURI 1 C, ADE2, HIS3 y ME11).

Clonación de la secuencia codificante del gen SEPT11 en el vector de expresión de levaduras

La secuencia codificante del gen SEPT11 fue re-amplificada a partir del ADNc de SEPT11 clonado en el vector pMBL-T, que fue a continuación clonado en el vector pGBKT7 (Clontech). Los oligonucleótidos empleados en la clonación de SEPT11 en pGBKT7 se incluyen en la Tabla 7 y fueron diseñados de manera que el dominio de activación GAL4 DNA-BD quedó fusionado al extremo N-terminal de SEPT11.

Tabla 7: Oligonucleótidos empleados en la clonación de SEPT11 en pGBKT7

Nombre Primer	Secuencia (5'-3') <u>sitio de restricción</u>	Vector de expresión generado
<i>Forward</i> S11KT7-NcoI	<u>GCCATGGCCGTGGCCGTGGGG</u>	pGBKT7 mSEPT11(CDS completa)
<i>Reverse</i> S11KT7-Sall	<u>GTCGACTGCCAGGCTTTATGTGAAGCT</u>	

Transformación de levaduras

Para la transformación de levaduras, se siguió el protocolo recomendado por Clontech. Concretamente, se inocularon colonias de las cepas de levadura Y2HGold o Y187 sobre 50 mL de medio completo YPDA en matraces de 250 ml de capacidad. Se dejaron crecer toda la noche a 30°C en agitación (250 rpm) durante 16-18 h. Posteriormente, se recogieron 2 mL de la suspensión y se centrifugaron durante 2 min a 2.300 x g. La pella resultante se resuspendió en 50 µL de 1.1 x TE/LiAc fresco. Para cada transformación, se utilizaron los 50 µL de la suspensión de levaduras en tubos de 1.5 mL y 500 µg del plásmido correspondiente. En la Tabla 8 se muestran las diferentes mezclas empleadas para obtener los controles apropiados. Concretamente, como controles del emparejamiento se utilizaron los vectores pGADT7-T, pGBKT7-53 y pGBKT7-Lam para transformar las cepas de levaduras. También se utilizó un control de transformación consistente en la transformación de la cepa Y2HGold con el vector pGBKT7 vacío.

Las mezclas de transformación se agitaron suavemente y se incubaron a 30°C durante 30 min agitando la mezcla mediante vórtex cada 10 min. Transcurrido este tiempo, a cada mezcla de transformación se le añadieron 20 µL de DMSO y se incubaron a 42°C durante 15 min agitándose mediante vórtex cada 5 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 16.000 x g durante 15 s para obtener la pella de levaduras, que se resuspendió en 1 mL de YPD *Plus Liquid Medium*, para a continuación incubarlas a 30°C durante 90 min en agitación. Finalmente, se centrifugó de nuevo y se resuspendió la pella de levaduras en 1 mL de NaCl al 0.9% (m/v). La mezcla de transformación se sembró en placas de 10 cm de diámetro (100 µL/placa), que se incubaron a 28-30°C durante 3-5 días.

Las levaduras Y2HGold transformada con los vectores pGBKT7, pGBKT7-SEPT11, pGBKT7-53 y pGBKT7-Lam se sembraron en placas con medio completo sin triptófano con y sin X- α -Gal (SD/-Trp/x- α -Gal; SD/-Trp), mientras que las levaduras Y187 que llevan el vector control pGADT7 T se sembraron en placas con medio completo sin leucina (SD/-Leu).

Tabla 8: Mezclas de transformación de levaduras con el vector SEPT11 y todos los vectores control del ensayo.

Vector (500 μ g)	Haring tester carrier DNA denatured*	Cepa Y187	Cepa Y2H Gold	PEG/LiAc
pGBKT7	5 μ g	-	50 μ l	500 μ L
pGBKT7-SEPT11	5 μ g	-	50 μ l	500 μ L
pGBKT7-T (C1)	5 μ g	50 μ l	-	500 μ L
pGBKT7-53 (C2)	5 μ g	-	50 μ l	500 μ L
pGBKT7-lam (C3)	5 μ g	-	50 μ l	500 μ L

*Previamente calentado 2 veces a 100°C durante 5 min antes de añadir la mezcla de transformación.

Control de toxicidad y autoactivación de SEPT11

Antes de comenzar con el emparejamiento de las dos cepas de levaduras es necesario hacer controles de toxicidad de la proteína de expresión y, a su vez, confirmar que la proteína cebo no es capaz de activar de forma autónoma los genes reporteros de la cepa Y2H-Gold. Así, se consideró que la proteína cebo no era tóxica para la cepa Y2HGold debido a que las cepas que crecieron en las placas SD/-Trp/X- α -Gal no formaron colonias azules de 2-3 mm de diámetro, y tuvieron una tasa de crecimiento menor a las levaduras transformadas con el vector *mock* (pGBKT7). Por otro lado, la autoactivación se determinó sembrando la cepa Y2HGold con pGBKT7-SEPT11 en placas SD/-Trp/X- α -Gal con y sin Aureobasidina A (AbA) de 3-5 días, encontrando que las levaduras transformadas con SEPT11 eran de color blanco en las placas SD/-Trp/X- α -Gal mientras que no crecieron en las placas SD/-Trp/X- α -Gal/AbA, lo que demuestra que SEPT11 no es capaz de activar por sí sola los genes reporteros de Y2HGold.

Análisis de la expresión de SEPT11

Se comprobó la expresión de SEPT11 en las levaduras Y2HGold mediante el análisis por *Western Blotting* del extracto proteico total de la cepa Y2HGold transformada, usando un anticuerpo anti-Myc para detectarla. Para el análisis, se picaron colonias azules de 2-3 mm de diámetro de las placas SD/-Trp/X- α -Gal, que se sembraron en 5 mL de medio completo sin Trp, con kanamicina 50 μ g/mL, y se dejaron en agitación a 220-250 rpm durante 14-16 h a 28-30°C. También se sembraron levaduras transformadas con el vector *mock* como control. Las levaduras se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 s en tubos de 1,5 mL y se resuspendieron en 1 mL de solución precalentada a 60°C de Urea/SDS (Urea 8 M, SDS 5% m/v, Tris-HCl pH 6,8 40 mM, EDTA 0,1 mM, azul bromofenol 0,4 mg/mL y β -mercaptoetanol 1%), suplementada con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 μ g/mL, leupeptina 5 μ g/mL, antipaina 5 μ g/mL, pepstatina A 5 μ g/mL). A la solución de levaduras se le añadió el equivalente en volumen de granos finos de arena de mar (Panreac,

Barcelona, España) y la mezcla se calentó durante 10 min a 70°C, agitándola vigorosamente durante 1 min. El extracto de proteínas se recogió por centrifugación a 16.000 x g durante 5 min. Se utilizaron 20 µL de cada muestra para su análisis mediante *Western Blotting* (ver apartado 3.6.8).

Emparejamiento de la cepa Y2HGold [pGBKT7-SEPT11] con la librería de ADNc de tejido adiposo

Se inoculó una colonia de levaduras Y2HGold [pGBKT7SEPT11] de unos 2-3 mm de diámetro en 50 mL de medio líquido SD/-Trp y se dejó crecer a 30°C durante 16-20 h hasta que la DO a 600 nm alcanzase un valor de 0,8. En este momento, se centrifugaron las levaduras a 1000 x g durante 5 min y se resuspendió la pella hasta una densidad superior a 1x10⁸ células en SD/-Trp (4-5 mL). A continuación, se combinó la cepa *bait* con 1 mL de la librería de tejido adiposo subcutáneo de rata en un matraz estéril de 2 L y se añadieron 45 mL de 2X YPDA (con 50 µg/mL de kanamicina). Esta mezcla se incubó a 30°C durante 20-24 h en agitación muy suave (30-50 rpm). Transcurridas 20 h, se chequeó al microscopio (40x) la presencia de zigotos, que pueden observarse como estructuras trilobuladas. Una vez que se observaron estas estructuras, la mezcla de emparejamiento se centrifugó a 100 x g durante 10 min. La pella resultante se resuspendió en 10 mL de medio líquido 0,5X YPDA/Kan y se sembró sobre placas SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA (DDO/X/A) (200 µL/placa), además de SD/-Trp, SD/-Leu y SD/-Leu/-Trp (DDO).

Las placas se dejaron crecer al menos durante 5 días y las colonias positivas azules resultantes se inocularon en nuevas placas con medio SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X-α-Gal/AbA (QDO/X/A), en las que se llevó a cabo la selección final. Los controles del emparejamiento (C1, C2 y C3), se combinaron en 500 µL de 2X YPDA durante 20-24 h a 30°C en agitación a 200 rpm. De esta forma, el control positivo contenía una colonia de C1 (procedente de una placa SD/-Leu) y otra de C2 (procedente de una placa SD/-Trp) y el control negativo contenía una colonia de C1 (procedente de una placa SD/-Leu) y otra de C3 (procedente de una placa SD/-Trp). Las colonias se sembraron en las placas correspondientes (Tabla 9), manteniéndose 4-5 días de incubación a 30°C.

Tabla 9: Emparejamiento de los controles C1, C2 y C3.

Control	Cruzamiento	Placa de Siembra	Fenotipo
Positivo	C1 x C2	SD/-Leu	Blancas
		SD/-Trp	Blancas
		SD/-Leu/-Trp	Blancas
		SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	Azules
Negativo	C1 x C3	SD/-Leu	Blancas
		SD/-Trp	Blancas
		SD/-Leu/-Trp	Blancas
		SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA	No crecimiento

Screening de las colonias positivas por PCR

El *screening* de la colonias positivas se hizo mediante PCR utilizando el kit comercial *Matchmaker™ Insert Check PCR Mix 2* (Clontech), que incluye los cebadores específicos que

permiten la amplificación de los genes de la librería clonada en el vector pGADT7-Rec. Para el chequeo, se cogió una pequeña fracción de cada colonia, que se diluyó en 25 μ L de agua estéril y se mezcló con 25 μ L del kit de PCR. Se incluyó un control negativo de PCR consistente en H₂O estéril sin levaduras. Para la amplificación se utilizó un ciclo de 1 min a 94°C, 30 ciclos de 10 s a 98°C y un ciclo de 3 min a 68°C. Se analizaron los fragmentos de ADN amplificados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio y las bandas obtenidas se purificaron y se secuenciaron usando el cebador T7.

3.9.2. Ensayos de *pull-down* mediante el uso de proteínas recombinantes fusionadas a glutathione S-transferasa 4B (GST)

En este trabajo se realizaron ensayos de *pull-down* empleando GST4T-3-SEPT11 como *cebo* y vectores de expresión de proteínas identificadas mediante el ensayo de Y2H (ARHGAP21, FABP5, Kinectin) así como de otras septinas (SEPT2, SEPT9) y de caveolina-1 (CAV-1) como *presa* en ensayos independientes.

Expresión de la proteína recombinante GST4T-3-SEPT11

Para la producción de la proteína SEPT11 recombinante se escogió el sistema pGEX (GE Healthcare). La proteína de fusión con GST fue construida por inserción de la secuencia codificante del gen *SEPT11* en la zona de clonaje múltiple del pGEX4T-3, usando los oligonucleótidos que se indican en la Tabla 10.

La expresión del vector está bajo el control del promotor *tac*, que es inducido por el análogo de la lactosa, isopropil- β -D tiogalactósido (IPTG). Además, contienen el gen *lacI^q*, cuyo producto de expresión es una proteína represora que se une a una región operadora del promotor *tac*, previniendo así la expresión del gen insertado hasta su inducción con IPTG.

Para producir la proteína recombinante GST4T-3-SEPT11, el vector GST4T-3 vacío (control) y GST4T-3-SEPT11 se transformaron en la cepa bacteriana competente BL21 descongelada a 4°C y permeabilizada con β -mercaptoetanol al 2% (Sigma) durante 10 min en un volumen 1/10 (v/v). A continuación, se incubaron 50 μ L de dichas bacterias con un volumen correspondiente a 10 ng de los vectores GST4T-3 y GST4T-3-SEPT11. Pasados 30 min, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 37°C durante 3 min y a un enfriamiento rápido en hielo (2 min), tras lo cual se añadieron 500 μ L de medio 2XYT (Sigma) sin antibiótico, incubándose la mezcla durante 30 min a 37°C en agitación (225 rpm). Tras este tiempo, se sembraron 200 μ L de cada transformación en 5 mL de medio 2XYT con ampicilina (Sigma) 100 μ g/mL a 37°C en agitación.

Tabla 10: Oligonucleótidos empleados para la clonación de la secuencia codificante del gen SEPT11 utilizada en estudios GST-pull down.

Nombre Primer	Secuencia (5'-3') <u>sitio de restricción</u>	Vector de expresión generado
Forward S11GX-Sall	GTCGACATGGCCGTGGCC	pEGX-4T-3 mSEPT11 (secuencia
Reverse S11GX-NotI	GCGGCCGCTTATGTGAAGCTTG	codificante completa)

Con el fin de obtener una mayor cantidad de proteína, se realizó un cultivo mayor mezclando 250 µL del cultivo ya crecido en 250 mL de medio con antibiótico y la mezcla se incubó a 37°C a 150 rpm hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,6-0,8. Posteriormente, se indujo la proteína recombinante añadiendo IPTG a cada cultivo a una concentración final de 0,2 mM manteniendo el cultivo a 16°C y 150 rpm durante 12 horas. Pasado éste tiempo, los cultivos fueron centrifugados a 7700 x g durante 10 min a 4°C. La pella fue resuspendida en 1 mL de tampón de extracción (NaCl 140 mM, KCL 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, 1,8 mM de KH₂PO₄, Tritón 1% (v/v) y DTT 4 mM, pH: 7,3) 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) y posteriormente, sonicada. Por último, las muestras se centrifugaron a 8000 x g durante 20 min a 4°C y se cuantificó la concentración de proteína total de los sobrenadantes por el método de Lowry.

Ensayo pull-down

El *pull-down* con GST-SEPT11 se llevó a cabo en extractos de células previamente transfectadas con los vectores de expresión para algunas de las proteínas obtenidas en el ensayo de Y2H (ARHGAP21, FABP5 y kinectina), SEPT2, SEPT9 y CAV-1. En la Tabla 11 se muestran los vectores empleados y el investigador y/o centro que amablemente los ha cedido para este estudio.

Los lisados bacterianos obtenidos como se describe en el apartado anterior (*cebo*) fueron preaclerados con 50 µL de glutatión sefarosa al 50% (previamente lavadas con tampón de extracción) y 25 µg de vector GST4T-3 vacío y/o GST4T-3-SEPT11, durante 2 h a 4°C en agitador orbital. Simultáneamente, las proteínas *presa* (ARHGAP21, FABP5, Kinectin, SEPT2, SEPT9, unidas a GFP, y CAV-1, unida a CFP), fueron sobreexpresadas en la línea celular HEK293T y extraídas como se menciona en el Apartado 3.7.1, empleando el tampón de extracción descrito anteriormente para la obtención de los vectores GST.

A continuación, se incubaron *cebo* y *presa* junto con los respectivos controles con 75 µL de glutatión sefarosa al 50% (previamente lavadas) durante toda la noche a 4°C en agitadocion. En todos los experimentos de *pull-down* se emplearon 3 controles para determinar la especificidad de la interacción *cebo/presa*. Los controles en cada experimento *pull-down* fueron: C1 (vector GFP vacío + GST4T-3), que confirma que los vectores no se unen de forma inespecífica a la glutatión sefarosa; C2 (GFP vacío + GST4T-3-SEPT11), que confirma que GFP/CFP no se une de forma inespecífica a SEPT11 o proteína *cebo*; y C3 (proteína *presa* unida a GFP + GST4T-3), que determina que la proteína *presa* empleada en cada caso no se une de forma inespecífica al vector GST4T-3. Finalmente,

se ponen en contacto *cebo y presa* (GST4T-3-SEPT11 + ARHGAP21-pEGFP-C1 o FABP5-pEGFP-C1 o Kinectina-pEGFP-C1 o SEPT2-pEGFP-C1 o SEPT9-pEGFP-C1 o CAV-1-pEGFP-C1) para detectar la interacción. En todos los casos se utilizaron 10 μg de GST4T-3 o GST4T-3-SEPT11 y 1600 mg de proteína *presa*. Tras una incubación de 12 h a 4°C, las muestras se lavaron con tampón de extracción 3 veces, centrifugando cada vez a 1000 \times g durante 2 min y resuspendiendo en 1 mL de tampón de extracción. A continuación, se eluyó la fracción unida a glutatión sefarosa añadiendo 50 μL de tampón de carga 5x [Tris-HCl 500 mM, SDS 7,5 % (m/v), EDTA 10 mM, sacarosa 50% (m/v), DTT 250 mM, azul de bromofenol 5 mg/mL, pH 6,8] y calentando a 95°C, finalizando el proceso con el análisis de las muestras mediante *western blotting* (ver apartado 3.6.8).

Tabla 11: Vectores empleados en la transformación de células HEK293T para estudios pull down.

Vector	Proporcionado por:
ARHGAP21-pEGFP-C1	Dr. Ji-Long Chen (Laboratorio de Microbiología e Inmunología Patológica, Beijing, China)
FABP5-pEGFP-C1	Dr. Martin Kaczocha (Universidad Stony Brook de New York, EE.UU.)
Kinectina-pEGFP-C1	Dr. Hanry Yu (Universidad Nacional de Singapur, Singapur)
SEPT2- pEGFP-C1	Dr. Koh-ichi Nagata (Institute for Developmental Research, Aichi, Japón).
SEPT9-pEGFP-C1	Dr. Koh-ichi Nagata
CAV-1-CFP	Dr. Alberto Díaz-Ruiz (Grupo de Adipobiología, IMIBIC/HURS/Univ de Córdoba, Córdoba, España)

3.9.3. Ensayos de co-inmunoprecipitación

Para llevar a cabo estos experimentos, se emplearon 4 placas de 15 cm de diámetro de células 3T3-L1 por cada experimento. Tres de ellas fueron electroporadas con el plásmido de expresión pCMV-cMyc-SEPT11, o con los vectores de expresión de SEPT9 y SEPT2 (pCMV-cMyc-SEPT9 y pCMV-cMyc-SEPT2, respectivamente; cedidos por el Dr. Koh-ichi Nagata. La placa restante se utilizó como placa control y fue electroporada con el vector pCMV-cMyc vacío (*mock*) bajo las mismas condiciones que el vector de expresión empleado en cada ensayo. Transcurridas 48 h tras la electroporación, las placas se lavaron 3 veces con PBS 1X y la pella resultante se resuspendió en 500 μL de tampón de inmunoprecipitación (IP; Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Tritón X-100 al 1%) conteniendo PMSF e inhibidores de proteasas. Las células se lisaron pasando la muestra 20 veces a través de una aguja 25 G en hielo y la mezcla se centrifugó a 9.300 \times g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante. Se obtuvieron entre 0,75 y 1 mg de proteína, que se resuspendieron en un volumen final de 1 mL de tampón IP conteniendo PMSF e inhibidores de proteasas. La muestra se trató con ADNasa durante 30 min a 4°C para eliminar las posibles contaminaciones de ADN. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se incubó durante 1 h a 4°C con proteína A acoplada a sefarosa (Invitrogen), que fueron lavadas previamente 3 veces con el tampón IP sin PMSF y sin inhibidores de proteasas y centrifugadas a 100 \times g durante 1 min. Tras la incubación del extracto proteico con la proteína A acoplada a sefarosa, la muestra se centrifugó durante 1 min a 4°C para eliminar la sefarosa y se guardó una alícuota de 75 μL de muestra (INPUT).

El resto de la muestra se incubó con 2 µg del anticuerpo anti-cMyc (AbD Serotec) durante toda la noche a 4°C en agitador orbital para permitir la unión del anticuerpo a la proteína cMyc-SEPT11, cMyc-SEPT9 o cMyc-SEPT2, según fuese el caso. Al día siguiente, el extracto proteico se incubó con 50 µL de proteína A acoplada a sefarosa previamente lavada, y la mezcla se dejó en agitación durante 2 h a 4°C para permitir la adsorción del anticuerpo a la proteína A debido a la gran afinidad de esta proteína por el fragmento Fc de la inmunoglobulina. Ésto provoca la sedimentación de los complejos que contienen sefarosa-proteína A/anticuerpo anti-cMyc-cMyc-SEPT11, o anti-cMyc-cMyc-SEPT2, o anti-cMyc-cMyc-SEPT9. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 100 x g durante 1 min, se guardó el sobrenadante (SN) y la sefarosa se lavó 4 veces en tampón de IP con inhibidores de proteasas conservando el último lavado (WASH). Finalmente, la pella se resuspendió en 100 µL de tampón de carga Laemmli a una concentración 2X. La mezcla se calentó durante 10 min a 95°C y se centrifugó a 100 x g durante 1 min para disociar la sefarosa del complejo formado y para su posterior análisis por *Western Blotting* (Ver apartado 3.6.8).

3.10. Estudios funcionales

3.10.1. Determinación de la actividad lipogénica en células 3T3-L1

Las células 3T3-L1 electroporadas con siRNA sintéticos contra SEPT11 o siRNA control se lavaron una vez con medio DMEM sin rojo fenol complementado con NaHCO₃ 20 mM, HEPES 1 mM, L-glutamina 4 mM y antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), pH 7,4, para eliminar restos celulares, y posteriormente se incubaron durante 2 h en medio de pretratamiento. A continuación, las células se incubaron durante 18 h con oleato 500 µM conteniendo BSA 2%. Transcurridas 12 h de tratamiento, se añadió al medio de tratamiento insulina a una concentración final 100 nM, manteniéndose durante las últimas 4 h de tratamiento. Tras este tiempo, se recogieron las células en tampón RIPA para determinar posteriormente los triglicéridos intracelulares, tomándose además una pequeña alícuota de extracto celular para la determinación de proteína en cada extracto mediante el método Lowry. Para valorar la lipogénesis, se midió la cantidad de triglicéridos intracelulares acumulados utilizando el método colorimétrico del kit comercial Serum Triglyceride Determination kit (TR0100; Sigma). Este kit contiene las enzimas y sustratos necesarios para el desarrollo de las reacciones indicadas en la Figura 7.

En este caso, se cargaron 50 µL de extracto proteico obtenido a partir de las células en cultivo (ó 10 µL de Glycerol Standard [en diluciones 1/10 1/100 y puro]) y 200 µL de Free Glycerol Reagent en cubetas de plástico. Se mezcló todo y la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para posteriormente medir la absorbancia a 540 nm. A continuación, se añadieron 50 µL de Triglyceride Reagent, se mezcló de nuevo la solución por inversión y se incubó la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se midió de nuevo la DO a 540 nm.

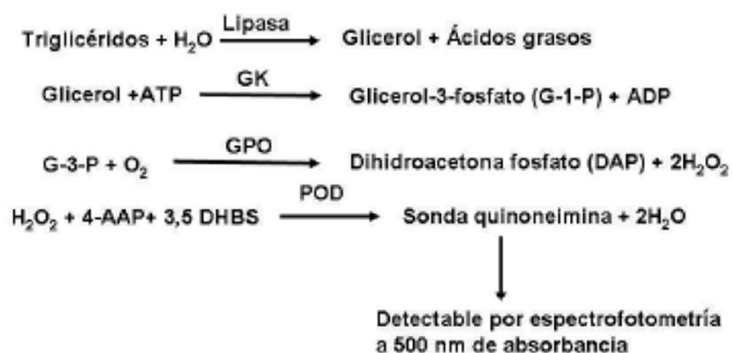


Figura 7: Reacciones que se llevan a cabo para la cuantificación de triglicéridos en las muestras celulares.

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

Las determinaciones de la actividad lipolítica en condiciones de silenciamiento de SEPT11, se llevaron a cabo sobre los mismos cultivos celulares que los empleados para la evaluación de la lipogénesis que se han descrito en el apartado anterior. Así, tras los tratamientos, se recogió el medio para la cuantificación de glicerol libre utilizando el método colorimétrico del kit comercial Free Glycerol Determination Kit (FG0100; Sigma). Este kit contiene las enzimas y sustratos necesarios para llevar a cabo las reacciones que se indican en la Figura 8.

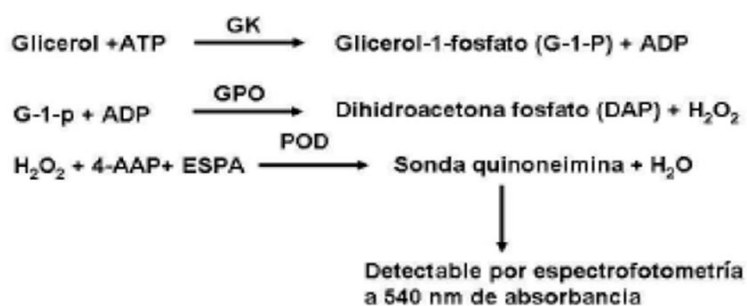


Figura 8: Reacciones que se llevan a cabo durante la cuantificación de glicerol libre en el medio de cultivo.

Tras recoger el medio, éste se centrifugó a $6.000 \times g$ durante 5 min para eliminar los restos celulares. Para la cuantificación del glicerol se utilizaron 50 μL de este medio [ó 10 μL de Glicerol Standard (en dilución 1/10, 1/100 y puro)], a los que se añadieron 200 μL de Free Glicerol Reagent. Se mezcló todo y la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para posteriormente medir la DO a 540 nm. Por otra parte, también se recogieron las células de cada pocillo en tampón RIPA para la cuantificación de proteína mediante el método Lowry.

3.10.3. Análisis del efecto del silenciamiento de SEPT11 sobre la señalización mediada por insulina en adipocitos

Para analizar la respuesta a insulina en adipocitos 3T3-L1 con expresión disminuida de SEPT11, se evaluaron los niveles de fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS) y de dos enzimas de la ruta de señalización asociada a insulina, Akt y ERK (Vigneri et al., 2010). Los cultivos de adipocitos 3T3-L1 electroporados con siRNA contra SEPT11 o siRNA control fueron sometidos a 2 h de pretratamiento con medio sin suero, tras lo cual se incubaron en presencia de insulina 100 nM durante 5 minutos. Se recogieron las proteínas intracelulares en tampón RIPA como se ha descrito previamente (apartado 3.6.1.), y se sometieron a inmunoblotting cuantitativo (apartado 3.6.8). Concretamente, se prepararon dos geles/blots a partir cada muestra, uno de los cuales se incubó con los anticuerpos anti-IRS, anti-ERK o anti-Akt (Tabla 5) para determinar la cantidad total de la proteína correspondiente en la muestra, mientras que el otro blot se incubó con los anticuerpos contra las formas fosforiladas correspondientes [anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-fosfo-IRS (Ser307) y anti-fosfo-ERK (Thr202/204, Thr185/187)] (Tabla 5). Aparte de la normalización de la carga mediante la valoración de la tinción de Ponceau, se calculó la proporción de forma fosforilada frente a la cantidad de proteína IRS, ERK o Akt total. Finalmente, para obtener una cinética normalizada en la respuesta de Akt, los valores de DO obtenidos se refirieron al valor de 5 min de estimulación con insulina de las células control (ya que no se observa fosforilación de Akt en ausencia del tratamiento).

3.11. Análisis estadístico

Los valores que se muestran en las figuras representan la media \pm SEM (error estándar de la media). En los estudios en los que se compararon únicamente dos grupos experimentales, se utilizó una prueba *t* de Student para datos paramétricos o la prueba de Mann-Whitney para datos no paramétricos. 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 por el test de Scheffé’s. Para determinar los coeficientes de correlación se empleó el coeficiente de Pearson. Las proteínas identificadas en el estudio proteómico fueron analizadas usando las bases de datos PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) y el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS/Windows version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los gráficos 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% ($P < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Estudio proteómico de tejido adiposo de pacientes obesos antes y después de cirugía bariátrica

4.1.1. Características clínicas y bioquímicas de los pacientes antes y después de CB

En la Tabla 12 se muestran los parámetros bioquímicos y antropométricos de las 18 mujeres con obesidad mórbida incluidas en el estudio, antes y después de la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica. Analizando las características de la Tabla 12, observamos que, previamente a la cirugía bariátrica (Pre-CB), los pacientes NG mostraron valores inferiores de perímetro de cintura, así como de niveles plasmáticos en ayunas de glucosa, insulina, HbA1c, y LDL, además de en el índice HOMA, en relación a los pacientes IR. Por otro lado, el colesterol en plasma era menor en los pacientes NG que IR, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Pre-CB, los pacientes obesos mostraron signos de inflamación de bajo grado, atendiendo a las concentraciones de proteína C-reactiva en plasma (CRP) ($13,9 \pm 4,7$ mg/L y $14,5 \pm 3,2$ mg/L en pacientes NG e IR, respectivamente).

Entre las 18 mujeres obesas incluidas en este estudio, 11 fueron sometidas a gastrectomía tubular laparoscópica (6 NG y 5 IR) y 7 fueron sometidas a bypass gástrico (3 NG y 4 IR). No se observaron diferencias en el IMC Pre-CB o después de la pérdida de peso (Post-CB) entre los diferentes tipos de cirugía bariátrica [$50,1 \pm 1,9$ vs. $50,7 \pm 0,8$ ($p = 0,538$) en Pre-CB y $30,8 \pm 1,9$ vs. $34,7 \pm 2,5$ ($p = 0,205$) en Post-CB para la gastrectomía tubular y el bypass gástrico, respectivamente]. Del mismo modo, los niveles de HbA1c, glucosa, insulina, así como los valores de HOMA fueron similares cuando los pacientes de cada grupo (NG o IR) fueron estratificados según el tipo de cirugía, tanto en Pre-CB como en Post-CB. No se encontraron diferencias en el IMC entre pacientes NG e IR en Pre-CB o en Post-CB. De hecho, la CB causó una pérdida de peso similar después de 1 año en ambos grupos de pacientes ($14,2$ y $17,5$ kg/m² en pacientes NG e IR, respectivamente). Asimismo, la cirugía bariátrica redujo la cintura, cadera, mejoró la homeostasis de la glucosa y las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, LDL y CRP en NG e IR, aunque la disminución absoluta del perímetro de cintura y de glucosa fue superior en el grupo IR. Sin embargo, los niveles de LDL en plasma se mantuvieron elevados en los pacientes IR en relación a lo observado en los pacientes NG en Post-CB (29,5%, $p < 0,01$).

No se observaron cambios en los niveles circulantes de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) un año después de la cirugía bariátrica (Tabla 12). Sin embargo, los niveles de SOD Post-CB fueron mayores en los pacientes obesos que presentaban un perfil metabólico menos favorable Pre-CB (i.e., IR). Por último, la pérdida de peso inducida por cirugía tendió a disminuir las concentraciones de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (32,0% y 52,8% en los pacientes NG e IR, respectivamente), aunque las diferencias sólo alcanzaron significación estadística en el grupo IR ($p < 0,01$).

Tabla 12: Características bioquímicas y antropométricas de los pacientes de la Cohorte 1.

	NG			<i>p</i>	IR		
	<i>Pre-CB</i>	<i>Post-CB</i>			<i>Pre-CB</i>	<i>Post-CB</i>	<i>p</i>
Edad (años)	38.2±2.8	39.2±2.8	-	44.1±3.5	45.1±3.4	-	
IMC (kg/m²)	47.8±2.4	33.6±3.6	0.0155	51.2±1.7	33.7±1.2	< 0.0001	
Cintura (cm)	125.8±2.7	96.4±2.2	< 0.0001	141.2±3.0 (a**)	102.1±3.5	< 0.0001	
Cadera (cm)	145.8±4.6	118.8±10.8	0.0066	146.8±5.0	118.7±3.2	0.0004	
Glucosa (mg/dL)	87.7±3.7	79.6±3.2	0.0663	122.2±1.6 (a***)	82.2±3.0	< 0.0001	
HbA_{1c} (%[mmol/mol])	5.2[33.9]± 0.1 [1.2]	4.9[32.1]±0.2 [1.4]	0.1765	6.3[46.57]±0.1 [1.2] (a***)	5.2[11.48]±0.1 [5.1] (b*)	0.0002	
Insulina (mIU/L)	11.3±0.7	5.6±0.6	< 0.0001	21.8±2.0 (a***)	7.7±1.4	0.0011	
HOMA	2.4±0.2	1.2±0.2	0.0030	6.5±0.5 (a**)	1.5±0.2	< 0.0001	
Colesterol (mg/dL)	188.0±5.8	173.3±6.7	0.0396	206.1±13.1	191.1±9.7	0.3179	
Triglicéridos (mg/dL)	121.4±10.2	78.3±4.9	0.011	122.2±9.3	86.1±11.3	0.0363	
HDLc (mg/dL)	45.78±2.6	60.67±3.3	0.0016	46.8±2.0	52.4±3.5	0.1706	
LDLc (mg/dL)	115.3±6.2	93.7±7.9	0.0018	152.8±7.5 (a**)	121.4±8.7 (b**)	0.0090	
Adiponectina (ng/ml)	99.9±19.1	189.6±23.5	0.0052	66.3±9.8	132.3±23.5	0.0137	
hsCRP (mg/L)	13.9±4.7	2.1±0.6	0.0293	14.5±3.2	3.0±1.0	0.0020	
GPx (U/g Hb)	78.1±18.8	52.9±6.8	0.2439	93.8±12.7	44.2±3.9	0.0024	
SOD (U/g Hb)	963.7±38.0	924.8±30.2	0.7202	970.8±41.4	1065±12.5 (b*)	0.0852	

IMC: índice de masa corporal; **HbA_{1c}:** hemoglobina glucosilada; **índice HOMA:** evaluación del modelo homeostático; **HDLc:** lipoproteínas de alta densidad; **LDLc:** lipoproteínas de baja densidad; **CRP:** proteína C reactiva; **GPx:** glutatión peroxidasa; **SOD:** superóxido dismutasa. Los datos representan la media ± SEM. Post-CB vs. Pre-CB (NG o IR) comparados por T-test. (a, *negrita*) IR vs. NG en PRE-CB. (b, *negrita*) IR vs. NG en POST-CB. * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,001, las diferencias entre los grupos fueron analizadas con T-test y/o ANOVA de una vía seguido por el test de Scheffé's.

4.1.2. Marcadores moleculares del tejido adiposo antes y después de CB

Además de los parámetros clínicos y bioquímicos ya mencionados, también se determinaron los valores en plasma y expresión proteica en tejido adiposo de la adipoquina adiponectina (Figura 9). La adiponectina fue seleccionada como marcador debido a que se asocia inversamente con la obesidad e IR (Esfahani et al., 2015). En relación a la adiponectina circulante, observamos que los niveles de esta adipoquina en mujeres obesas (incluyendo conjuntamente NG e IR) en Pre-CB correlacionaron positivamente con los de HDL ($r = 0,27$; $p = 0,001$), y negativamente con los de triglicéridos ($r = -0,46$; $p = 0,031$) y CRP ($r = -0,27$; $p = 0,027$).

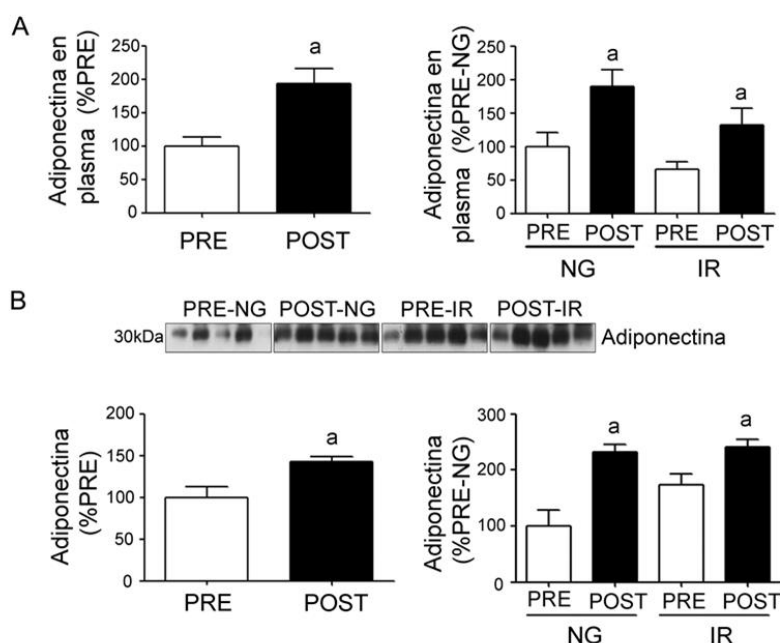


Figura 9: Efectos de la CB sobre los niveles circulantes de adiponectina (A) y el contenido proteico de esta adipoquina en TASC (B) de mujeres obesas mórbidas. En (B) se muestran imágenes de los inmunoblots y cuantificación del contenido de adiponectina en TASC de los pacientes antes (PRE) y 1 año después de la CB (POST) ($n = 9$ individuos/grupo para las mediciones plasmáticas y $n = 5-10$ individuos/grupo para los estudios de inmunoblotting). Se representan los datos obtenidos a partir de todos los sujetos obesos analizados (incluidos NG e IR conjuntamente) ($n = 10$ individuos/grupo; paneles de la izquierda) o separados en los grupos NG e IR ($n = 5$ individuos/grupo; paneles de la derecha). El análisis densitométrico de las bandas se llevó a cabo utilizando el software ImageJ. El contenido de proteína se normalizó respecto al Ponceau. Los niveles de proteína antes de la cirugía (PRE) se asumieron como un 100% y se usaron como referencia para la normalización de los datos. Los datos se expresan como media \pm SEM. *a*, $p < 0,05$ vs. PRE-CB; *b*, $p < 0,05$ vs. PRE-NG.

Por otro lado, la adiponectina en plasma de los pacientes NG fue numéricamente mayor que en los pacientes IR en Pre-CB, mientras que el contenido de adiponectina en tejido adiposo previamente a la CB fue menor en NG que en IR (Figuras 9A y 9B). Ambos parámetros se incrementaron en respuesta a la pérdida de peso inducida por la CB, tanto si se consideran los datos de adiponectina plasmática y adiponectina en tejido adiposo de pacientes obesos NG e IR juntos (la adiponectina en plasma tuvo un aumento de 94,5% y la adiponectina de tejido adiposo de 73,2%, Post-CB vs. Pre-CB) (Figuras 9A y 9B, paneles de la izquierda) como cuando se representaron los valores correspondientes de los grupos NG e IR por separado (la adiponectina plasmática aumentó en 89,8% y 99,5%, en el grupo NG y en el grupo IR tras la CB, respectivamente, y la adiponectina en tejido adiposo aumentó

en 132,5% y 38,8% en el grupo NG y en el grupo IR tras la CB, respectivamente) (Figuras 9A y 9B, paneles de la derecha).

Para evaluar el estado inflamatorio del tejido adiposo en pacientes NG e IR, en Pre- y Post-CB, se empleó como marcador la enzima cJun quinasa NH₂-terminal (JNK) y su forma fosforilada (pJNK), y se determinó el contenido de ambas mediante *western blotting*, como se muestra en la Figura 10. Los pacientes IR mostraron una mayor actividad de JNK (es decir, mayor ratio pJNK/JNK) que los pacientes NG en Pre-CB. Por su parte, cuando consideramos todos los pacientes obesos en conjunto (NG + IR), observamos que la CB redujo los niveles de JNK total, pJNK, y la relación pJNK/JNK (Figuras 10A-C; paneles de la izquierda). De hecho, estos parámetros disminuyeron numéricamente tanto en pacientes NG e IR después de la cirugía, aunque esta disminución no fue significativa en los pacientes NG, de manera que las diferencias entre Pre-CB y Post-CB se debieron principalmente a los cambios inducidos por la cirugía en mujeres obesas que inicialmente presentaban IR (Figuras 10A-C; paneles de la derecha).

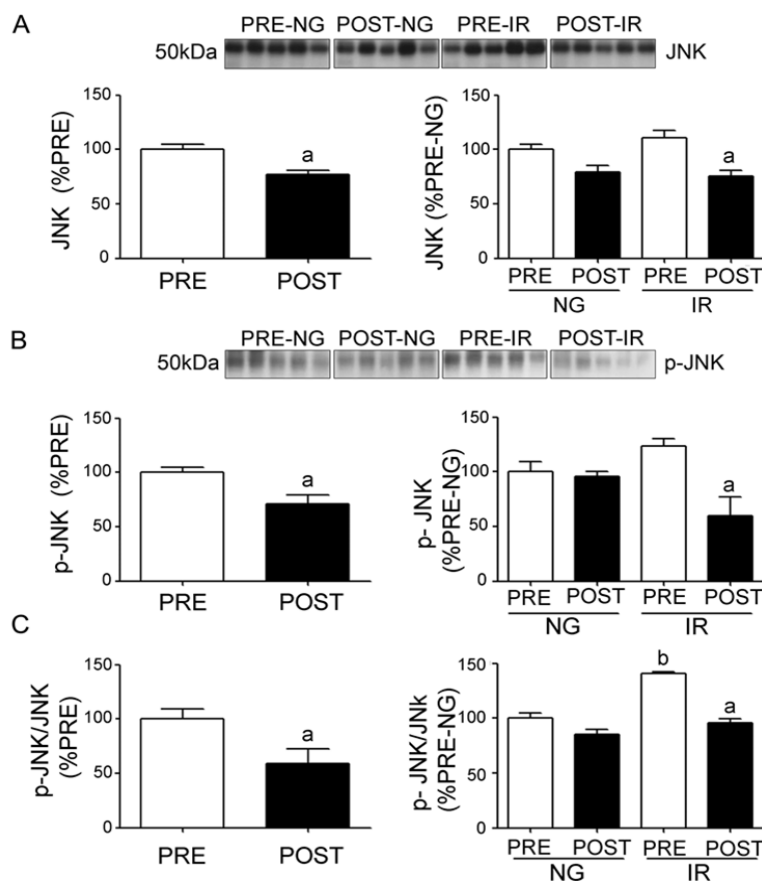


Figura 10: Efecto de la cirugía bariátrica sobre el contenido y actividad del marcador inflamatorio, JNK, en muestras de TASC de mujeres obesas mórbidas. (A) JNK total, (B) JNK fosforilada (pJNK), y (C) relación pJNK/JNK en muestras de TASC de pacientes obesos antes (PRE) y 1 año después de someterse a CB (POST). Se representan los datos obtenidos a partir de todos los sujetos obesos analizados (incluidos NG e IR conjuntamente) (n = 10 individuos/grupo; paneles de la izquierda) o separados en los grupos NG e IR (n = 5 individuos/grupo; paneles de la derecha). Los datos se expresan como porcentaje de los valores correspondientes antes de la CB (PRE; 100%). Ver la leyenda de la Figura 9 para obtener más detalles. *a*, $p < 0,05$ vs. PRE-CB; *b*, $p < 0,05$ vs. PRE-NG.

4.1.3. Proteómica comparativa del TASC de los pacientes obesos NG e IR antes y después de CB

Con el fin de identificar proteínas del tejido adiposo expresadas diferencialmente entre NG vs. IR Pre-CB y Post-CB, se realizó un análisis proteómico con comparaciones múltiples. Este análisis permitió la detección de 950 *spots* en el gel maestro (Figura 11A). Entre ellas, 61 *spots* mostraron niveles de expresión diferentes entre los grupos de pacientes ($p < 0,05$) y fueron seleccionados para su análisis por espectrometría de masas (Figura 11B); de éstos, sólo 49 *spots*, correspondientes a 37 proteínas diferentes, pudieron ser identificadas mediante MALDI-TOF-TOF (Tabla 13).

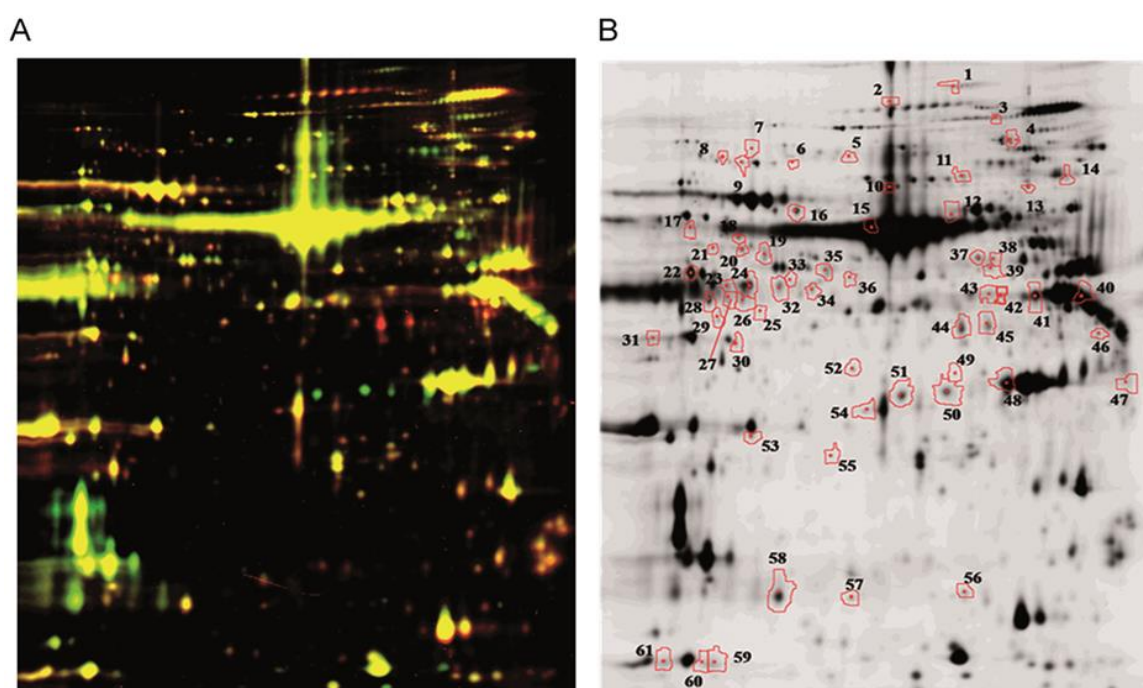


Figura 11: Imagen representativa de un mapa 2D-DIGE de extractos proteicos de TASC de mujeres obesas NG e IR en PRE- y POST-CB (N = 4 individuos/grupo). (A) Las proteínas marcadas con Cy3 (PRE-NG) se muestran en rojo y las proteínas marcadas con Cy5 (POST-NG) se muestran en verde. (B) Los puntos marcados con rojo y numerados indican los 61 *spots* correspondientes a las proteínas expresadas diferencialmente en las diferentes comparativas. Los números en el mapa se corresponden con aquellos de las proteínas que se recogen en la Tabla 13.

Posteriormente a la identificación de las diferentes proteínas, se realizaron análisis bioinformáticos con el fin de agrupar las proteínas por grupos según las diferentes características que presentaban. De esta manera, el análisis con el software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) 8.7, indicó que 23 de las 37 proteínas expresadas diferencialmente interactúan directa o indirectamente con la insulina (Figura 12A) y fueron mapeadas dentro de proteínas implicadas en redes de muerte celular y supervivencia, metabolismo de hidratos de carbono y enfermedad inflamatoria. Por otro lado, el sistema de clasificación PANTHER agrupó las proteínas en diferentes subcategorías de procesos biológicos (Figura 12B), incluyendo tres grupos principales: procesos metabólicos, procesos celulares

y procesos del sistema inmune. En la Figura 12C se muestra un diagrama de Venn en el que se definen las proteínas con expresión diferencial entre los cinco grupos de comparación analizados.

Las proteínas obtenidas se clasificaron mediante el programa PANTHER de acuerdo a su función biológica y ratio que presentaban en los diferentes grupos (Figura 12 y Tabla 13). Como puede observarse en la Tabla 13A y en la Figura 13, la proteómica comparativa del tejido adiposo de los dos grupos de pacientes (NG e IR) en Pre-CB reveló diferencias significativas en la expresión de 20 proteínas (12 aumentadas y 8 disminuidas en mujeres obesas IR *vs.* mujeres obesas NG). Entre las proteínas con mayor expresión en el grupo IR respecto al grupo NG se identificaron proteínas que participan en procesos metabólicos (PGM1, AL1A1, ACOT1), proteínas del citoesqueleto (SEPT11, TBB5) y la proteína asociada a gotas lipídicas, perilipina (PLIN1). Por su parte, en pacientes IR observamos niveles reducidos de chaperonas (CRYAB, TCPB) y de la proteína mitocondrial mitofilin (IMMT) en comparación con los pacientes NG en Pre-CB. También se observaron diferencias en proteínas plasmáticas, de manera que los niveles de fibrinógeno beta (FIBB) y de transferrina estaban disminuidos y aumentados, respectivamente, en el tejido adiposo de los pacientes IR respecto a los NG en Pre-CB (Tabla 13A; Figura 13).

Por otro lado, el análisis de los datos proteómicos conjuntos de todos los pacientes obesos (incluyendo NG e IR) antes y después de la CB reveló que la pérdida de peso inducida por la cirugía modificó la expresión de 15 proteínas en el tejido adiposo, incluyendo el aumento de varias enzimas metabólicas (PCKGM, PGM1, AMPL, DLDH, AL1A1) y la disminución de la proteína plasmática FIBB (Tabla 13B; Figura 13). Al realizar el análisis proteómico comparativo por cada grupo de pacientes, se encontró que 22 proteínas se expresaron diferencialmente en pacientes NG Pre- *vs.* Post-CB (Tabla 13C; Figura 13), mientras que sólo 8 proteínas mostraron diferencias significativas en los pacientes IR Pre- *vs.* Post-CB (Tabla 13D; Figura 13). En concreto, 14 proteínas aumentaron y 8 disminuyeron al comparar Post-CB *vs.* Pre-CB en el grupo de pacientes NG. Entre aquellas proteínas cuya expresión aumentó Post-CB, se encontraron enzimas metabólicas (PCKGM, DLDH, AL1A1), enzimas antioxidantes (PRDX6), así como chaperonas (CH60, TCPB), perilipina y proteínas relacionadas con el citoesqueleto (SEPT11, TBB5, VIME), mientras que los niveles de mitofilin disminuyeron en Post-BS (Tabla 13C; Figura 13). En el grupo IR, además de cambios en proteínas séricas, se observó una mayor expresión de la proteína sintetasa SYWC, así como disminución de la proteína HSPB1 en Post- *vs.* Pre-CB (Tabla 13D; Figura 13).

Finalmente, el análisis 2D-DIGE reveló la existencia de diferencias significativas en el proteoma de pacientes NG *vs.* IR en Post-CB (Tabla 13E; Figura 13). En particular, los niveles de expresión de VAT-1 y BLVRB (oxidorreductasas), SOD mitocondrial (enzima anti-oxidante), GRP78 (chaperona de retículo endoplásmico) y vimentina (proteína del citoesqueleto) eran más altos en el tejido adiposo de los pacientes IR que en los pacientes NG después de la pérdida de peso inducida por la cirugía (Tabla 13E; Figura 13).

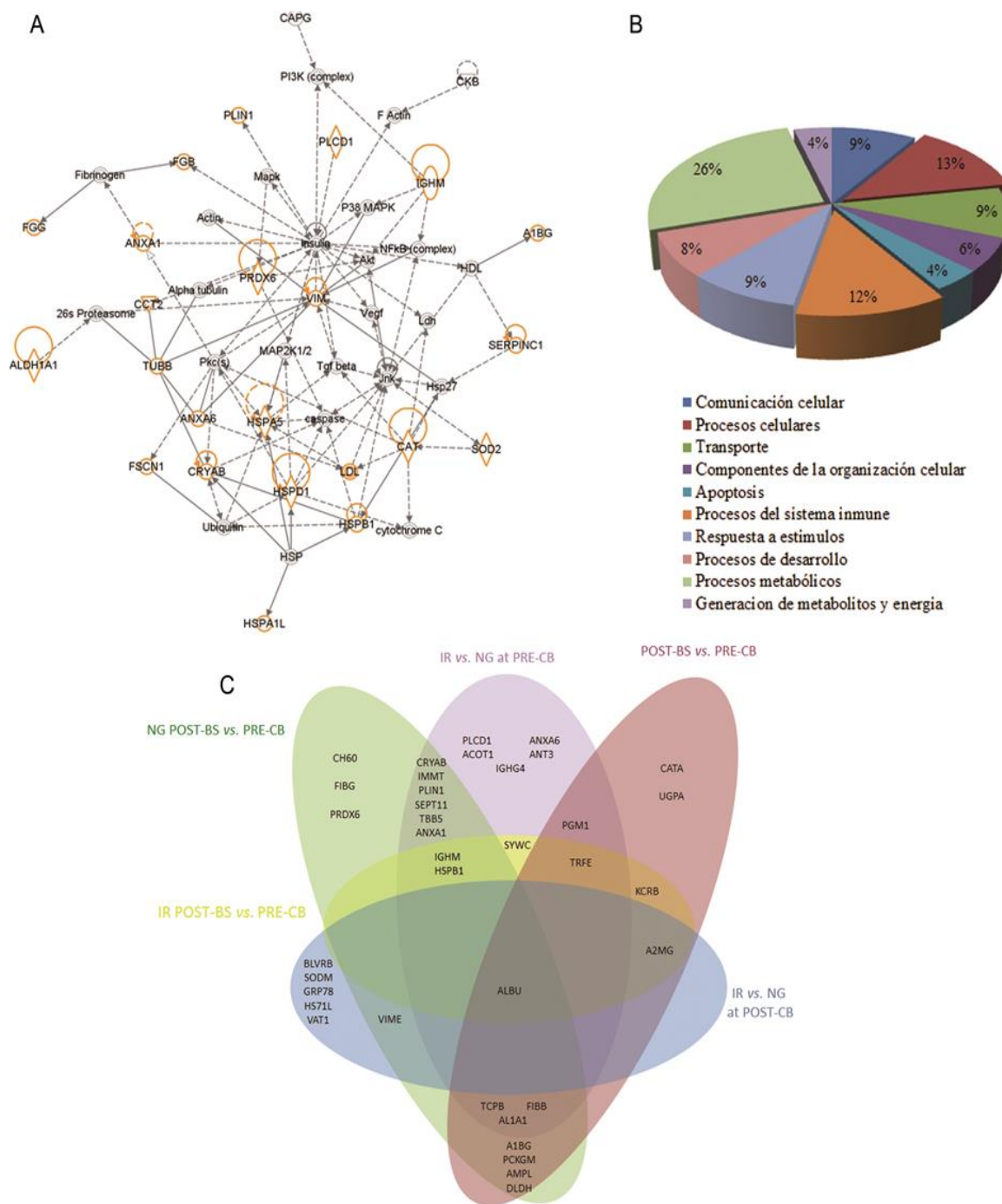


Figura 12: Análisis de las rutas metabólicas y procesos biológicos en los que participan las 37 proteínas identificadas mediante 2D-DIGE en TASC de mujeres obesas NG e IR PRE y POST CB. (A) El análisis de las proteínas identificadas mediante el software IPA permitió la identificación de una ruta con alteraciones significativas relacionada con muerte celular y supervivencia, metabolismo de los carbohidratos y enfermedad inflamatoria. Las proteínas identificadas por 2D-DIGE que participan en esta ruta están marcadas en naranja. (B) Clasificación de las proteínas por procesos biológicos de acuerdo al software PANTHER. Se identificaron diferencias significativas en proteínas relacionadas con procesos metabólicos, procesos celulares y procesos del sistema inmune (comparación de muestras con la corrección de Bonferroni; $p < 0,05$). (C) Diagrama de Venn indicando las proteínas identificadas cuya expresión es compartida entre los diferentes grupos de estudio. El color rosa representa las proteínas expresadas diferencialmente entre mujeres obesas Post-CB vs. mujeres obesas Pre-CB, mujeres obesas IR vs. NG en Pre-CB (morado), mujeres obesas NG Post-CB vs. Pre-CB (verde), mujeres obesas IR Post-CB vs. Pre-CB (amarillo) y mujeres obesas IR vs. NG en Post-CB (azul).

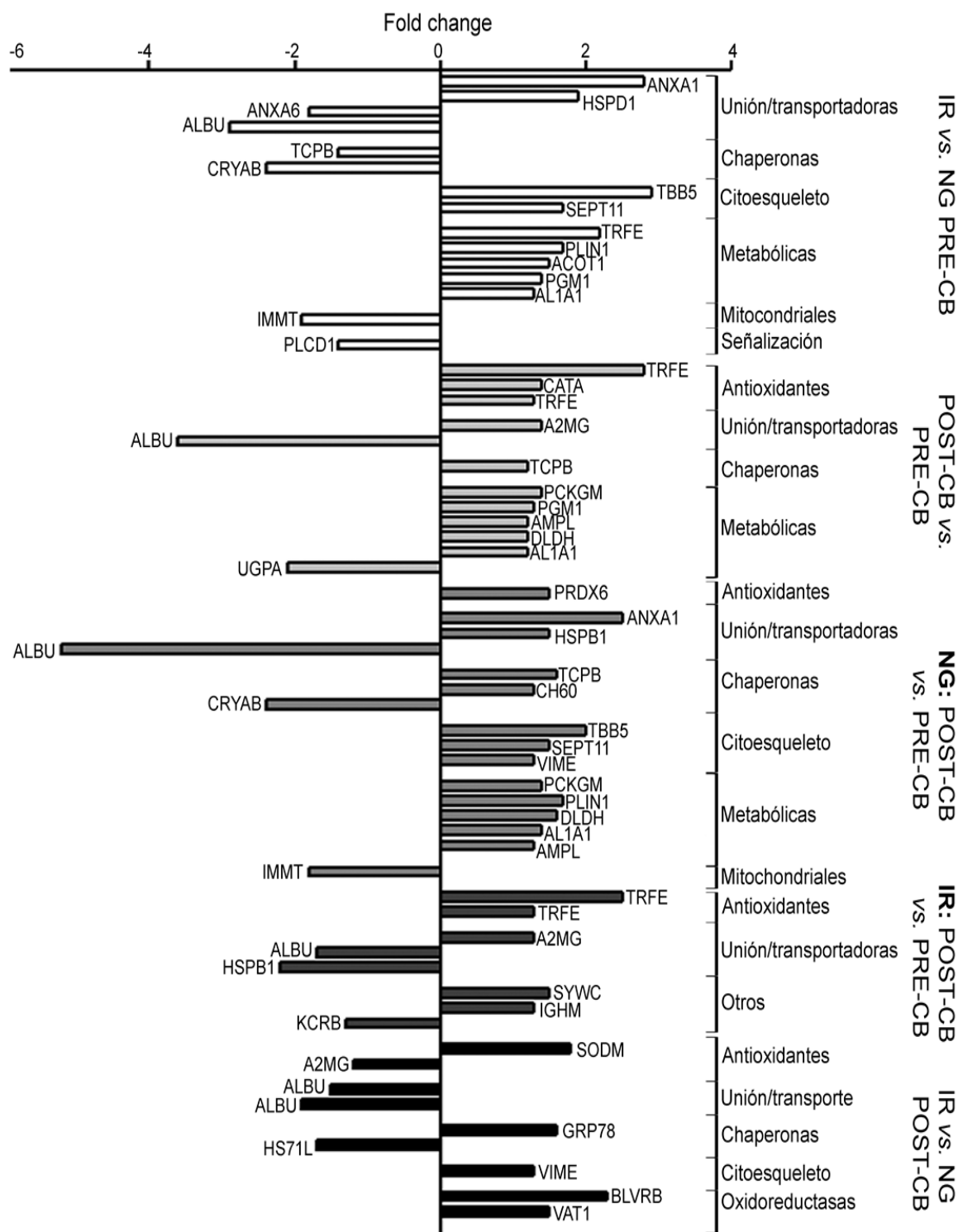


Figura 13: Perfil funcional de los resultados del análisis proteómico multicomparativo donde se ilustra el aumento o disminución de las proteínas identificadas en cada grupo de comparación. Se resaltan los procesos biológicos más relevantes dentro de cada comparativa realizada en el estudio.

Tabla 13: Proteínas identificadas mediante MALDI-TOF/TOF expresadas diferencialmente en el 2D-DIGE en pacientes NG e IR en el TASC Pre y Post CB.

Clasificación	Spot ^a	T-test ^b	Av ratio ^c	Numero de acceso ^d	Nombre de la proteína	Mw /pI ^e	Score ^f	Pep ^g	% Cover ^h	Expect ⁱ
<i>A) Proteómica comparativa de pacientes obesos IR vs. pacientes obesos NG Pre-CB</i>										
Unión/transporte	53	0.001	2.8	ANXA1_HUMAN	Annexin A1	38,9/6.6	299	14	36%	2.50E-26
	57	0.032	1.9	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22.8/5.9	259	11	40%	2.50E-22
	11	0.045	-1.8	ANXA6_HUMAN	Annexin A6	76.1/5.4	277	21	32%	4.00E-24
	35	0.045	-2.9	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71.3/5.9	518	22	30%	3.20E-48
Chaperonas	34	0.005	-1.4	TCPB_HUMAN	T-complex 1 subunit beta	57,7/6.0	457	19	34%	4.00E-42
	19	0.003	-2.4	CRYAB_HUMAN	Alpha-crystallin B	20.1/6.7	95	4	13%	0.01
Citoesqueleto	40	0.009	2.9	TBB5_HUMAN	Tubulin beta	50,2/4.8	172	14	30%	1.30E-13
	29	0.032	1.7	SEPT11_HUMAN	Septin-11	49.6/6.4	120	10	28%	0.043
Metabólicas	45	0.025	2.2	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79.2/6.8	240	27	32%	2.00E-20
	18	0.026	1.7	PLIN1_HUMAN	Perilipin-1	56.2/6.03	194	16	35%	8.10E-16
	31	0.031	1.5	ACOT1_HUMAN	Acyl-coenzyme A thioesterase	46.6/6.9	39	2	4%	0.051
	20	0.03	1.4	PGM1_HUMAN	Phosphoglucomutase-1	61.6/6.30	211	15	27%	1.60E-17
	24	0.039	1.3	AL1A1_HUMAN	Retinal dehydrogenase 1	55.4/6.30	437	17	27%	4,00E-40
Mitocondriales	5	0.014	-1.9	IMMT_HUMAN	Mitofilin	84,0/6.1	291	15	16%	1.60E-25
Plasmáticas	38	0.03	2	ANT3_HUMAN	Serpin C1	53.0/6.3	99	5	23%	3.50E-05
	30	0.019	-1.5	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta	56.5/8.5	120	10	16%	2.00E-08
Señalización	7	0.01	-1.4	PLCD1_HUMAN	Phosphodiesterase delta-1	86,3/6.23	98	14	17%	3.10E-06
Otras	22	0.002	1.8	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	49.9/6.3	91	9	22%	1.80E-05
	27	0.028	1.6	IGHG4_HUMAN	Ig gamma-4 chain C region	36.4/7.2	60	4	13%	0.021
	36	0.007	-2.4	SYWC_HUMAN	Tryptophan-tRNA ligase	53,4/5.83	142	11	20%	1.30E-10

Clasificación	Spot ^a	T-test ^b	Av ratio ^c	Numero de acceso ^d	Nombre de la proteína	Mw /pI ^e	Score ^f	Pep ^g	% Cover ^h	Expect ⁱ
<i>B) Proteómica comparativa de pacientes obesos Post-CB vs. Pre-CB</i>										
Antioxidantes	8	0.02	2.8	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79.2/6.8	51	9	11%	0.16
	21	0.027	1.4	CATA_HUMAN	Catalase	59.9/6.9	164	14	29%	8.10E-13
	9	0.045	1.3	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79.2/6.8	504	35	35%	8.10E-47
Unión/transporte	33	0.001	1.4	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	164.6/6.0	287	22	15%	4.00E-25
	35	0.001	-3.6	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71.3/5.9	518	22	30%	3.20E-48
Chaperonas	34	0.019	1.2	TCPB_HUMAN	T-complex 1 subunit beta	57.7/6.0	457	19	34%	4.00E-42
Metabólicas	17	0.014	1.4	PCKGM_HUMAN	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, mitochondrial	71.4/7.6	53	10	13%	0.11
	20	0.049	1.3	PGM1_HUMAN	Phosphoglucomutase-1	61.6/6.3	211	15	27%	1.60E-17
	26	0.028	1.2	AMPL_HUMAN	Cytosol aminopeptidase	56.5/8.0	161	17	32%	1.60E-12
	28	0.01	1.2	DLDH_HUMAN	Dihydrolipoyl dehydrogenase	54.7/7.9	103	11	21%	1.00E-06
	32	0.046	1.2	AL1A1_HUMAN	Retinal dehydrogenase	55.4/6.3	351	13	21%	1.60E-31
	39	0.046	-2.1	UGPA_HUMAN	Uridyltransferase	57.0/8.2	64	9	10%	2.80E-05
Plasmáticas	13	0.025	-1.8	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54.7/5.6	89	9	23%	2.70E-05
	25	0.017	-3.1	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta	56.5/8.5	132	4	12%	1.60E-05
Otras	48	0.001	-1.3	KCRB_HUMAN	Creatine kinase B-type	42.9/5.3	305	17	46%	6.40E-27
<i>C) Proteómica comparativa de pacientes obesos NG Post-CB vs. Pre-CB</i>										
Antioxidantes	58	0.023	1.5	PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	25.1/6.0	548	21	81%	3.20E-51
Unión/transporte	53	0.031	2.5	ANXA1_HUMAN	Annexin A1	38.9/6.6	299	14	36%	2.50E-26
	57	0.007	1.5	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22.8/5.9	259	11	40%	2.50E-22
	35	0.005	-5.2	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71.3/5.9	518	22	30%	3.20E-48
Chaperonas	34	0.005	1.6	TCPB_HUMAN	T-complex 1 subunit beta	57.7/6.1	457	19	34%	4.00E-42
	37	0.042	1.3	CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein	61.1/5.7	395	15	30%	6.40E-36

Clasificación	Spot ^a	T-test ^b	Av ratio ^c	Numero de acceso ^d	Nombre de la proteína	Mw /pI ^e	Score ^f	Pep ^g	% Cover ^h	Expect ⁱ
	60	0.003	-2.4	CRYAB_HUMAN	Alpha-crystallin B	20.1/6.7	95	4	13%	0.01
Citoesqueleto	40	0.023	2	TBB5_HUMAN	Tubulin beta	50.2/4.8	172	14	30%	1.30E-13
	29	0.03	1.5	SEPT11_HUMAN	Septin-11	49.6/6.4	120	10	28%	0.043
	41	0.035	1.3	VIME_HUMAN	Vimentin	53.6/5.1	655	34	67%	6.40E-62
	17	0.004	1.7	PCKGM_HUMAN	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	71.4/7.6	53	10	13%	0.11
Metabólicas	18	0.016	1.6	PLIN1_HUMAN	Perilipin-1	56.2/6.0	194	16	35%	8.10E-16
	28	0.006	1.4	DLDH_HUMAN	Dihydrolipoyl dehydrogenase	54.7/7.9	103	11	21%	1.00E-06
	32	0.009	1.4	AL1A1_HUMAN	Retinal dehydrogenase	55.4/6.3	351	13	21%	1.60E-31
	26	0.015	1.3	AMPL_HUMAN	Cytosol aminopeptidase	56.5/8.0	161	17	32%	1.60E-12
Mitocondriales	5	0.032	-1.8	IMMT_HUMAN	Mitofilin	84.2/6.1	291	15	16%	1.60E-25
Plasmáticas	44	0.013	-1.9	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	52.1/5.4	261	19	45%	1.60E-22
	46	0.042	-2	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	52.1/5.4	261	19	45%	1.60E-22
	13	0.037	-2.5	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54.7/5.6	89	9	23%	2.70E-05
	50	0.007	-4.8	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta	56.5/8.5	206	17	31%	5.10E-17
	51	0.008	-7.2	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta	56.5/8.5	266	17	28%	5.10E-19
	Otras	22	0.004	1.7	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	49.9/6.3	91	9	22%
D) Proteómica comparativa de los pacientes obesos IR Post-CB vs. Pre-CB										
Antioxidantes	8	0.035	2.5	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79,2/6.8	51	9	11%	0.16
	9	0.006	1.3	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79.2/6.8	504	35	35%	8.10E-47
Unión/transporte	33	0.003	1.3	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	164.6/6.0	287	22	15%	4.00E-25
	35	0.007	-1.7	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71,3/5.9	518	22	30%	3.20E-48
	56	0.044	-2.2	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22,8/5.9	70	6	22%	0.0018

Clasificación	Spot ^a	T-test ^b	Av ratio ^c	Numero de acceso ^d	Nombre de la proteína	Mw /pI ^e	Score ^f	Pep ^g	% Cover ^h	Expect ⁱ
Otras	36	0.026	1.5	SYWC_HUMAN	Tryptophanyl-tRNA ligase	53,4/5.8	142	11	20%	1.30E-10
	6	0.045	1.3	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	49,9/6.3	100	9	16%	2.00E-06
	48	0.001	-1.3	KCRB_HUMAN	Creatine kinase B-type	42,9/5.3	305	17	46%	6.40E-27
<i>E)Proteómica comparativa de pacientes obesos IR vs. pacientes obesos NG Post-CB</i>										
Antioxidantes	59	0.046	1.8	SODM_HUMAN	Superoxide dismutase, mitochondrial	24.8/8.3	57	4	4%	0.0049
	33	0.007	-1.2	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	164.6/6.1	287	22	15%	4.00E-25
Unión/transporte	10	0.006	-1.5	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71.3/5.9	705	30	39%	6.40E-67
	15	0.005	-1.9	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71.3/5.9	784	33	45%	8.10E-75
Chaperonas	14	0.04	1.6	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein	72.4/5.1	463	21	30%	1.00E-42
	12	0.042	-1.7	HS71L_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein	70.7/5.7	774	30	26%	2.00E-50
Citoesqueleto	41	0.026	1.3	VIME_HUMAN	Vimentin	53.6/5.1	655	34	67%	6.40E-62
Oxidorreductasas	61	0.04	2.3	BLVRB_HUMAN	Flavin reductase	22.2/7.1	243	17	83%	1.00E-20
	52	0.04	1.5	VAT1_HUMAN	Synaptic vesicle membrane	42.1/5.8	131	15	35%	1.60E-09

96

^a Número correspondiente al mapa 2D-DIGE (Figura 11B); ^b Valor de significación (p) obtenido con la prueba *t* de Student. Sólo se consideraron las proteínas con $p \leq 0.05$; ^c Relación promedio del volumen del *spot* (^{a,b,c} calculados con el análisis de *spots* realizado con el software DeCyder); ^d Código de acceso de la proteína en la base de datos Uniprot; ^e Peso molecular teórico (Mw) y punto isoelectrico (pI); ^f Puntuación de la proteína en el software mascot; ^g Número de péptidos identificados; ^h Cobertura de todas las secuencias de péptidos que coincidían con las proteínas identificadas (%), ⁱ Valor de significación esperado por Mascot para la secuencia (^{f,g,h,i} aportados por el software Mascot). Las proteínas se han clasificado según procesos biológicos atendiendo al análisis PANTHER.

4.1.4. Efectos de la CB sobre el perfil metabólico del tejido adiposo en mujeres obesas

Nuestro análisis proteómico y datos comparativos revelaron que la cirugía bariátrica indujo cambios significativos en un número considerable de proteínas asociadas a procesos metabólicos. Con el fin de confirmar y ampliar estos resultados, se examinó el contenido de proteína de DLDH y AL1A1, mediante *western blotting*, en muestras de TASC de pacientes NG e IR adicionales a las empleadas para 2D-DIGE (5 pacientes adicionales por cada grupo). La enzima DLDH forma parte de varios complejos que regulan el metabolismo energético, incluyendo el complejo piruvato deshidrogenasa (Vettakkorumakankav y Patel, 1996). Por su parte, la AL1A1 cataliza el paso final en la producción de ácido retinoico, actuando en la oxidación del retinaldehído, y se ha asociado con adipogénesis, formación de grasa abdominal, tolerancia a la glucosa y la termogénesis en los adipocitos (Petrosino et al., 2014).

La Figura 14 muestra los niveles de DLDH (Figura 14A) y AL1A1 (Figura 14B) en el tejido adiposo de los pacientes obesos incluidos en el estudio en Pre- y Post-CB, considerando ambos grupos de pacientes juntos (NG+IR; paneles de la izquierda) o cuando se estratificaron en subgrupos (NG o IR; paneles de la derecha). En consonancia con lo observado mediante 2D-DIGE, los pacientes IR exhibieron una mayor expresión de AL1A1 que los pacientes NG en Pre-CB (Tabla 13A y Figura 14B). Del mismo modo, la pérdida de peso inducida por la cirugía generó un aumento en el contenido de DLDH y AL1A1 en el tejido adiposo de los pacientes obesos (DLDH aumentó Post-CB 1,9 veces respecto a Pre-CB y AL1A1 aumentó 4,7 veces en Post-CB vs. Pre-CB) (Figuras 14A y 14B; paneles de la izquierda). No obstante, este incremento se debió principalmente a los cambios inducidos por la CB sobre los pacientes NG (Figuras 14A y 14B; paneles de la derecha).

Junto con los cambios en enzimas metabólicas, nuestros estudios proteómicos también mostraron que otras proteínas con papeles críticos en el metabolismo de los lípidos en los adipocitos también estaban regulados por el estado metabólico de los pacientes y por el IMC que presentaban (Tabla 12). Entre ellas, se encuentra la perilipina, un componente constitutivo de las gotas lipídicas en los adipocitos (Takahashi et al., 2013). Tanto los datos proteómicos como los de *western blotting* mostraron que el contenido de perilipina fue mayor en los pacientes obesos IR que en los NG en Pre-CB (Tabla 13A y Figura 14C; panel derecho).

Sorprendentemente, la CB aumentó los niveles de perilipina en el tejido adiposo de los pacientes NG mientras que en los pacientes IR ocurrió lo contrario, de manera que ambos grupos de pacientes finalmente mostraron niveles similares en Post-CB (Figura 14C; panel derecho). De hecho, cuando se consideran en conjunto ambos subgrupos, el contenido de perilipina fue numéricamente aunque no significativamente menor en Post-CB que en Pre-CB (Figura 14C, panel izquierdo).

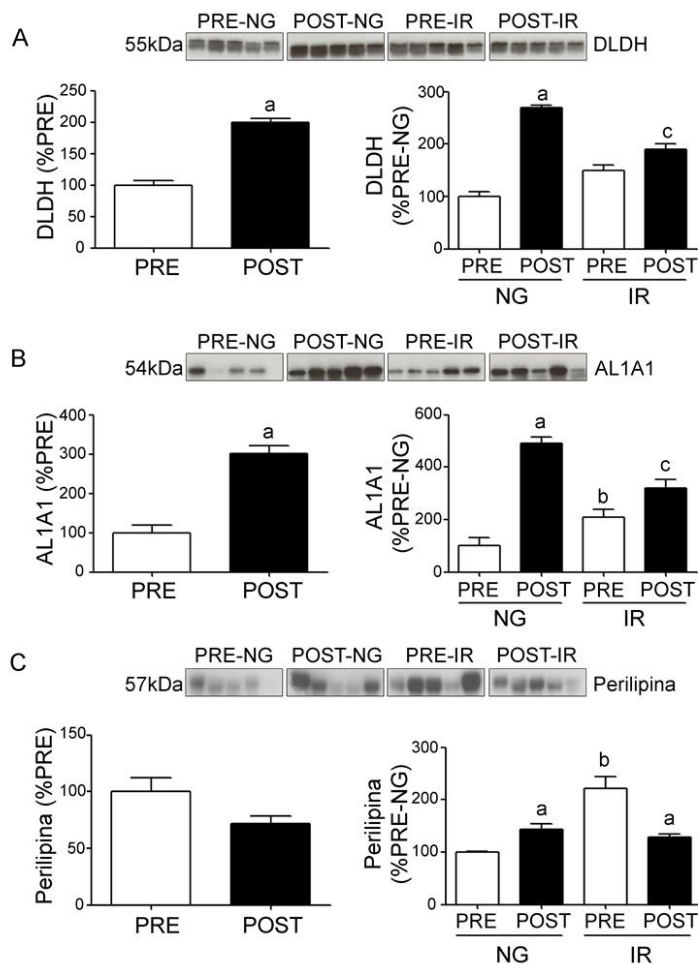


Figura 14: Abundancia de dihidrolipoil deshidrogenasa (DLDH; **(A)**), retinal deshidrogenasa 1 (AL1A1; **(B)**), y perilipina **(C)** en el TASC de pacientes obesos en PRE- y POST-CB. Imágenes de inmunoblot y cuantificación de los niveles de expresión de proteínas de todos los sujetos obesos analizados (incluidos NG e IR conjuntamente) ($n = 10$ individuos/grupo; paneles de la izquierda) o separados en los grupos NG e IR ($n = 5$ individuos/grupo; paneles de la derecha) en PRE- y POST-CB. Los datos se expresan como un porcentaje de los valores correspondientes a TASC antes de la cirugía (PRE; 100%). Ver leyenda de la Figura 9 para obtener más detalles. *a*, $p < 0,05$ vs. PRE-CB; *b*, $p < 0,05$ vs. PRE-NG; *c*, $p < 0,05$ vs. POST-NG.

4.1.5. Efectos de la CB sobre la actividad mitocondrial de mujeres obesas

El análisis 2D-DIGE reveló la expresión diferencial de mitofilin (IMMT), una proteína mitocondrial responsable de la formación de crestas mitocondriales y esencial para la función mitocondrial normal (Navet et al., 2007), en el tejido adiposo de pacientes NG vs. IR en Pre-CB (Tabla 13A) y en pacientes NG Post- vs. Pre-CB (Tabla 13C). Los estudios de *western blotting* cuantitativo confirmaron los resultados obtenidos en el estudio 2D-DIGE: los niveles de mitofilin fueron mayores en pacientes NG que en pacientes IR en Pre-CB y la CB disminuyó la expresión de esta proteína en el grupo de pacientes NG (Figura 15A; panel derecho). Además, estos estudios también revelaron que la pérdida de peso inducida por la cirugía evocó la respuesta opuesta en el grupo IR, cuyo contenido de mitofilin en Post-CB alcanzó niveles comparables a los observados en pacientes NG en Pre-CB (Figura 15A; panel derecho). Cuando se consideraron todos los pacientes de forma conjunta (NG+IR), no se observaron diferencias en el contenido de mitofilin en Pre-CB vs.

Post-CB (Figura 15A; panel izquierdo), lo que puede explicarse por el patrón de expresión distinta de esta proteína en pacientes NG vs. IR.

Para obtener más información sobre la actividad mitocondrial en el tejido adiposo de los diferentes grupos de estudio, se midió la expresión proteica de un regulador clave de la biogénesis y la función mitocondrial, el coactivador transcripcional PGC-1 α (Liang y Ward, 2006), en las mismas muestras que las empleadas para determinar mitofilin. Como se muestra en la Figura 15B, el contenido proteico de PGC-1 α mostró la misma tendencia que mitofilin en todos los grupos de comparación, lo que apoya la existencia de diferencias en la biogénesis mitocondrial entre los pacientes NG e IR, tanto en Pre-CB como en respuesta a la pérdida de peso inducida por la cirugía.

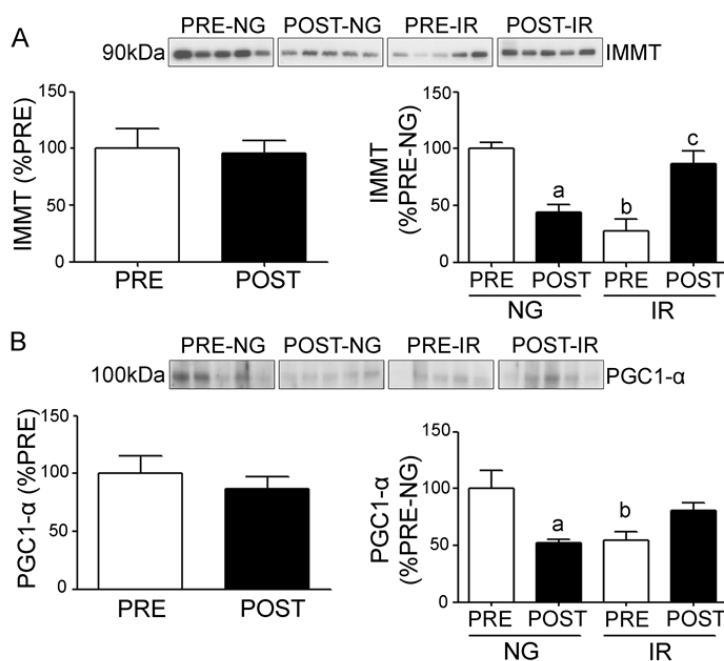


Figura 15: Efectos de la cirugía bariátrica en la expresión de proteínas mitocondriales (IMMT y PGC-1 α) en TASC de pacientes obesos mórbidos en PRE- y POST-CB. Imágenes de inmunoblot y cuantificación de los niveles de expresión de mitofilin (IMMT; **A**) y del coactivador-1 alpha de peroxisomas gamma (PGC-1 α ; **B**) en muestras de TASC de todos los sujetos obesos analizados (incluidos NG e IR conjuntamente) (n = 10 individuos/grupo; paneles de la izquierda) o separados en los grupos NG e IR (n = 5 individuos/grupo; paneles de la derecha) PRE- y POST-CB. Los datos se expresan como un porcentaje de los valores correspondientes a TASC antes de la CB (PRE; 100%). Ver leyenda de la Figura 9 para obtener más detalles. *a*, $p < 0,05$ vs. PRE-CB; *b*, $p < 0,05$ vs. PRE-NG; *c*, $p < 0,05$ vs. POST-NG.

4.1.6. Efectos de la CB sobre la angiogénesis del TA de mujeres obesas

Una de las proteínas cuya expresión fue modificada por la CB fue la enzima citosólica triptofanil ARNt ligasa (SYWC) que, como otras aminoacil-tRNA sintetetas, desempeña un papel necesario en la síntesis de proteínas (Tzima y Schimmel, 2006). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que estas proteínas desempeñan funciones adicionales, incluyendo actividad de tipo citoquina en procesos de angiogénesis (Tzima y Schimmel, 2006). Concretamente, SYWC puede ser procesada proteolíticamente o sufrir eventos de *splicing*, dando lugar a péptidos más cortos (T2-TrpRS y mini-TrpRS) que inhiben el desarrollo de nuevos vasos (Tzima y Schimmel, 2006). Nuestros

estudios proteómicos y de *western blotting* muestran que el contenido de SYWC fue inferior en IR que en los pacientes NG en Pre-CB (Tabla 13A y Figura 16A). Por otro lado, la expresión de SYWC aumentó tras la CB en el grupo IR, mientras que en el grupo NG se observó una tendencia a la disminución (Figura 16A). Curiosamente, cuando se cuantificó el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en estas muestras, observamos una tendencia similar a la exhibida por SYWC (Figura 16B).

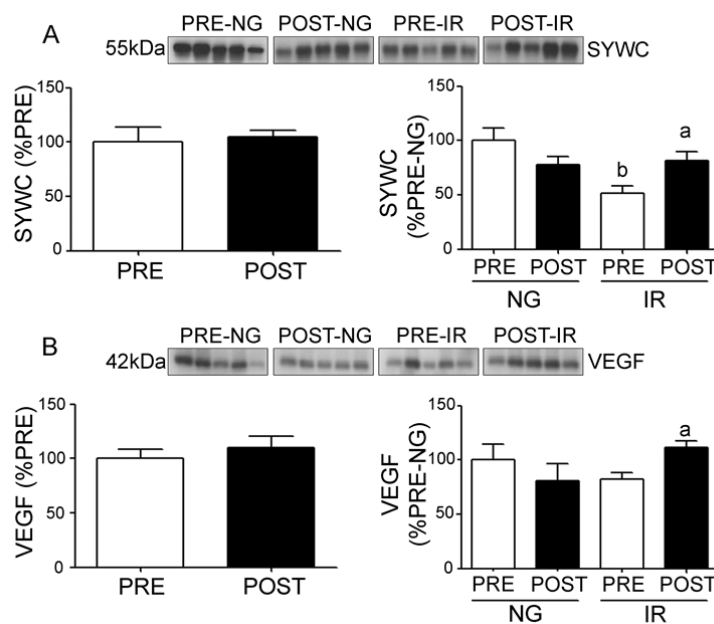


Figura 16: Niveles de expresión de la proteína triptófano-tRNA ligasa (SYWC; **A**) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, **B**) en TASC de mujeres obesas mórbidas en PRE- y POST-CB. Imágenes de inmunoblot y cuantificación de los niveles de expresión de proteínas de TASC de todos los sujetos obesos analizados (incluidos NG e IR conjuntamente) (n = 10 individuos/grupo; paneles de la izquierda) o separados en los grupos NG e IR (n = 5 individuos/grupo; paneles de la derecha) PRE- y POST-CB. Los datos se expresan como un porcentaje de los valores correspondientes a TASC antes de la CB (PRE; 100%). Ver la leyenda de la Figura 9 para obtener más detalles. *a*, $p < 0,05$ vs. PRE-CB; *b*, $p < 0,05$ vs. PRE-NG; *c*, $p < 0,05$ vs. POST-NG.

4.1.7. Efectos de la CB sobre proteínas del citoesqueleto en mujeres obesas

De acuerdo con nuestros datos proteómicos, la cirugía bariátrica provocó cambios significativos en niveles de expresión de varios componentes del citoesqueleto (vimentina, tubulina, septin11) y en proteínas relacionadas (TCPB), especialmente en el grupo de pacientes NG (Tablas 13A y 13C).

En particular, los estudios proteómicos previos de nuestro grupo han demostrado que la vimentina (proteína que forma red de filamentos intermedios en los adipocitos), en el tejido adiposo de roedores contiene varias variantes que son reguladas diferencialmente en respuesta a la pérdida de grasa (Peinado et al., 2011). En el estudio proteómico aquí presentado, el *western blot* de extractos de tejido adiposo humano con el suero anti-vimentina reveló la existencia de tres bandas: 53 kDa (correspondiente a la vimentina intacta), 49kDa y 43 kDa (correspondientes a la vimentina procesada)

(Figura 17A). Curiosamente, todas las isoformas de vimentina se expresaron más en el tejido adiposo de pacientes IR que en pacientes NG PRE-CB. Por otra parte, las isoformas más cortas estuvieron aumentadas en pacientes NG Post-CB, mientras que la variante más larga se redujo en pacientes IR después de la pérdida de peso inducida por la cirugía (Post-CB) (Figura 17A). A pesar de los cambios observados en la expresión de las isoformas de vimentina entre grupos de pacientes, el contenido total de vimentina en el tejido adiposo fue similar Pre- y Post-CB (Figura 17A, panel superior izquierdo).

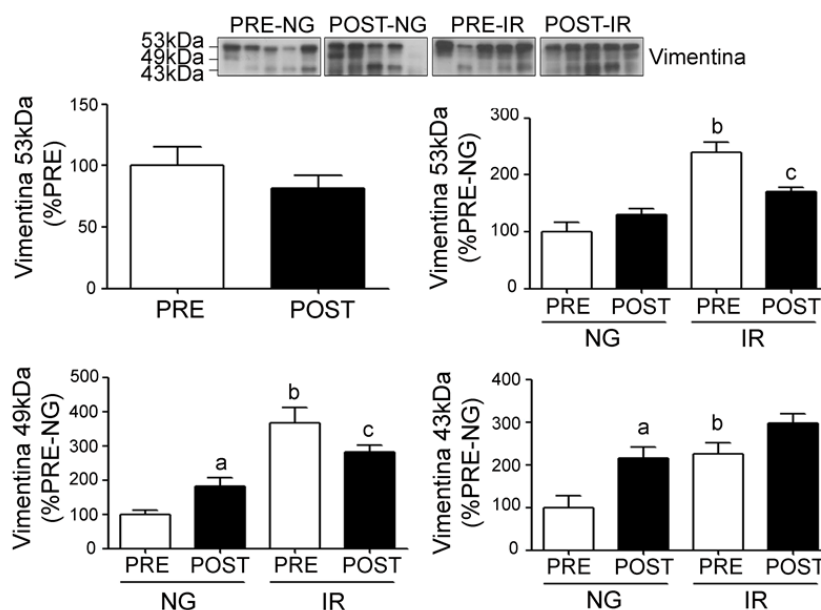


Figura 17: Imágenes de inmunoblot y cuantificación de los niveles de expresión de vimentina en muestras de TASC de todos los sujetos obesos analizados (incluidos NG e IR conjuntamente) ($n = 10$ individuos/grupo; paneles de la izquierda) o separados en los grupos NG e IR ($n = 5$ individuos/grupo; paneles de la derecha) PRE y POST CB. Las tres isoformas de vimentina se identificaron mediante transferencia de Western usando el anticuerpo vimentina (53, 49 y 43 kDa), todo se cuantificó usando ImageJ. Los datos se expresan como un porcentaje de los valores correspondientes a TASC antes de la cirugía (PRE; 100%). Ver leyenda de la Figura 9 para obtener más detalles. *a*, $p < 0,05$ vs. PRE-CB; *b*, $p < 0,05$ vs. PRE-NG; *c*, $p < 0,05$ vs. POST-NG.

También evaluamos TCPB, un miembro del complejo de chaperonas TCP1, que facilita el plegado de actina y tubulina (Brackley y Grantham, 2009), en el estudio 2D-DIGE, ésta proteína se expresó diferencialmente en diferentes comparativas (Tablas 13A, 13B, y 13C). La cuantificación de la banda de 50 kDa identificada con el anticuerpo anti-TCPB mediante inmunoblot reveló que el contenido de proteína de TCPB aumentó significativamente después de la pérdida de peso inducida por la cirugía en ambos grupos de pacientes NG e IR (Figura 18A, panel derecho) o cuando se consideraron los dos grupos juntos (NG + IR; Figura 18A, panel izquierdo). Sin embargo, los niveles de TCPB fueron más bajos en IR que en los pacientes NG en Post-CB (Figura 18A, panel derecho). Por otra parte, la pérdida de peso inducida por la cirugía generó un aumento en el contenido de proteína septin11 (SEPT11) en el tejido adiposo de los pacientes obesos NG e IR (Tabla 13C y Figura 18B), aunque este incremento se debió principalmente a los cambios inducidos por la CB sobre los pacientes IR (Tabla 13A, Figura 18B).

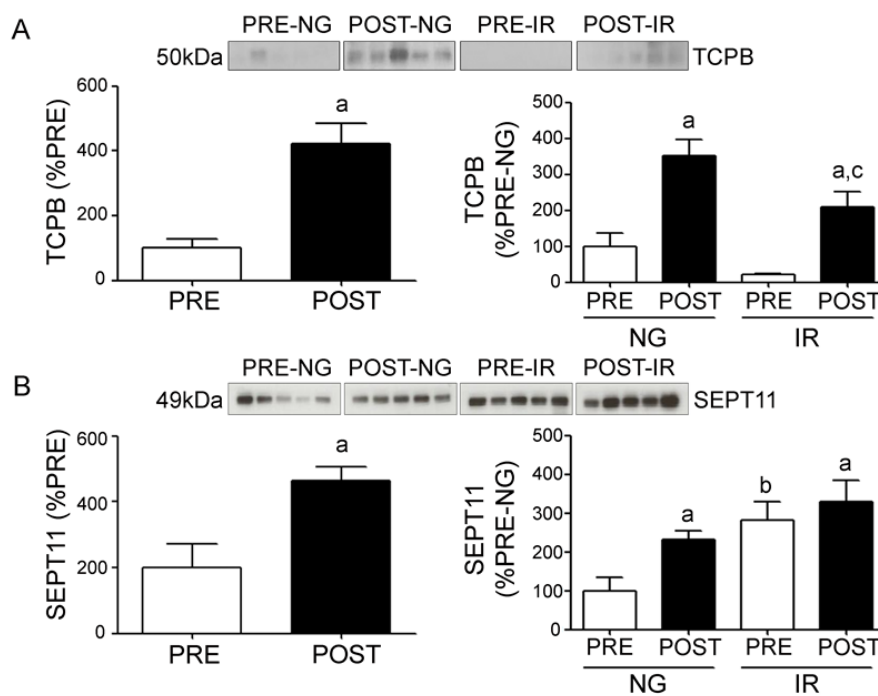


Figura 18: Efecto de la CB en la expresión de la proteína TCPB (**A**) y SEPT11 (**B**) en TASC de pacientes obesos mórbidos PRE y POST CB. Imágenes de inmunoblot y cuantificación de los niveles de expresión en muestras de TASC de todos los sujetos obesos analizados (incluidos NG e IR conjuntamente) ($n = 10$ individuos/grupo; paneles de la izquierda) o separados en los grupos NG e IR ($n = 5$ individuos/grupo; paneles de la derecha). PRE y POST CB. Todo se cuantificó usando ImageJ. Los datos se expresan como un porcentaje de los valores correspondientes a TASC antes de la cirugía (PRE; 100%). Ver leyenda de la Figura 9 para obtener más detalles. *a*, $p < 0,05$ vs. PRE-CB; *b*, $p < 0,05$ vs. PRE-NG; *c*, $p < 0,05$ vs. POST-NG.

4.2. Caracterización de nuevos biomarcadores: SEPT11

Entre las proteínas identificadas por el análisis 2D-DIGE multicomparativo de tejido adiposo humano encontramos algunas para las que no se disponía de información en dicho tejido. Entre ellas, identificamos un miembro de la familia de proteínas del citoesqueleto de septinas, SEPT11, que procedimos a caracterizar en este trabajo. La secuencia codificante completa del gen de SEPT11 fue originalmente identificada en un proyecto de aislamiento de ARNm realizado en muestras de cerebro porcino (número de acceso de GenBank AK001711) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A partir de esta secuencia, y utilizando el algoritmo BLAST en las bases de datos de ácidos nucleicos, observaron que dicha secuencia tenía similitud con la familia de septinas en el dominio GTPasa central, además de ser homóloga de otras septinas (Hanai et al., 2004). En el mismo trabajo, hallaron expresión de SEPT11 en una gran variedad de tejidos y líneas celulares, incluida la línea celular NIH3T3 de ratón. Más recientemente, un estudio proteómico de membrana plasmática aislada de adipocitos 3T3-L1 ha revelado que ésta contiene un número importante de septinas, entre ellas SEPT11 (Prior et al., 2011).

En nuestro estudio utilizando el algoritmo BLAST, hemos podido determinar que la secuencia del gen SEPT11 de humano (número de identificación de Ensembl Gene ENST00000264893) contiene 10 exones y 9 intrones que se extienden en la posición cromosómica 4q21.1, los cuales

codifican para una proteína de 429 aa con un peso molecular esperado de 49,39 kDa y un punto isoelectrónico de 6,36. Del mismo modo, hemos realizado un estudio de alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína SEPT11 de humano y ratón (número de identificación del gen Ensembl Gene ENSMUSG00000058013) y observamos que existe un alto grado de identidad entre las dos secuencias (99%).

4.2.1. Análisis de dominios y motivos estructurales de SEPT11.

El análisis de la estructura proteica de SEPT11 así como de los motivos y dominios estructurales y funcionales se realizó utilizando diferentes algoritmos bioinformáticos incluidos en el servidor ExPasy (Figura 19). Así, hallamos un dominio común entre la familia de septinas (residuos 38-304 en la secuencia de ratón y humano). Además, el uso del algoritmo *Coils* reveló la existencia de una región en α -hélice de longitud variable (residuos 320-415 en humano y en los residuos 320-413 en ratón) con una elevada probabilidad de formar estructuras *coiled-coil*, que constituyen dominios necesarios para las interacciones entre septinas u otros sustratos (Casamayor y Snyder, 2003; Versele y Thorner, 2005). Por otra parte, el análisis del perfil de hidrofobicidad de la secuencia, analizado mediante HMMTOP, mostró la presencia de una región hidrofóbica de 16 aminoácidos (residuos 224-240 de la secuencia de ratón y humano). Además, pudimos predecir la existencia de una secuencia consenso de unión a caveolina, secuencia determinada por la composición aminoacídica $\emptyset X \emptyset X X X X \emptyset$, $\emptyset X X X X \emptyset X X \emptyset$ o $\emptyset X \emptyset X X X X \emptyset X X \emptyset$, en la que \emptyset corresponde a cualquier aminoácido aromático (F,W,Y) y X corresponde a cualquier aminoácido (Okamoto et al., 1998; Gaillard et al., 2001). En concreto, la secuencia proteica de SEPT11 de ratón y de humano contiene una secuencia del tipo $\emptyset X X X X \emptyset X X \emptyset$ en los residuos 120 a 128.

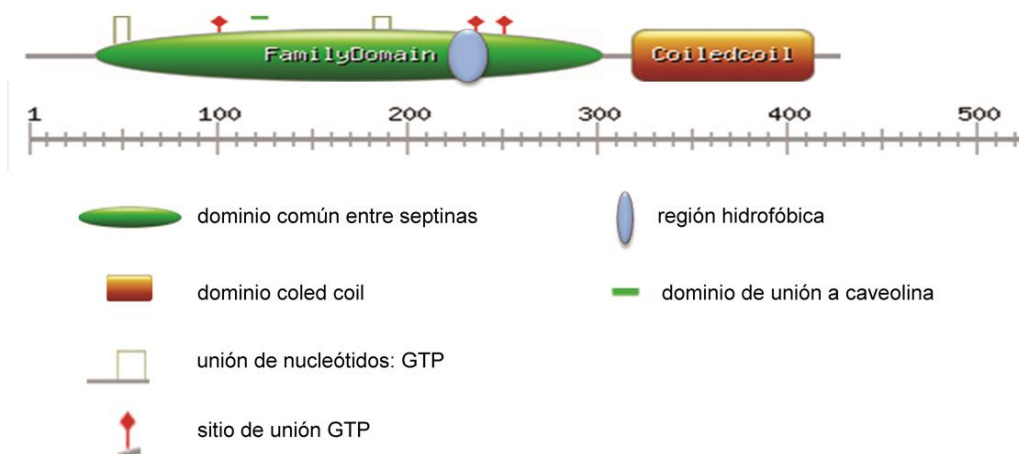


Figura 19: Motivos estructurales y funcionales predichos mediante el uso de diferentes algoritmos bioinformáticos incluidos en el servidor ExPasy, entre los que destacan una región *coiled-coil*, un dominio común de septinas, una región hidrofóbica, un dominio de unión a caveolina, dos sitios de unión de nucleótidos y tres sitios de unión a GTP.

Adicionalmente, la secuencia de SEPT11 contiene un dominio de cremallera de leucina (residuos 357-369 en la secuencia de ratón y humano), 11 sitios potenciales de fosforilación por

tirosina quinasas, incluidos 7 sitios específicos para Akt (residuos 17, 84, 202, 291, 239, 427, 429) (Manning y Cantley, 2007), 1 sitio de acetilación (residuo 2), 1 de N-glicosilación (residuo 40), 7 de O-glicosilación (posiciones 9, 68, 310, 318, 407, 412, 417) y 1 sitio de C-manosilación (residuo 257), descrito éste último como un motivo que puede tener un papel importante en condiciones de hiperglicemia y obesidad (Ihara et al., 2005).

4.2.2. Estudio de SEPT11 durante la adipogénesis

Todos los estudios *in vitro* mostrados en éste apartado se llevaron a cabo en la línea celular 3T3-L1, que se diferenciaron a adipocitos mediante el tratamiento con un cocktail hormonal (ver sección 3.2.2 de Materiales y Métodos). Por lo general, a día 0, las células presentan una morfología fibroblástica y una cantidad de gotas intracelulares reducida. A medida que progresa la diferenciación, las células aumentan de tamaño, adquiriendo una morfología más redondeada y un mayor contenido intracelular de lípidos.

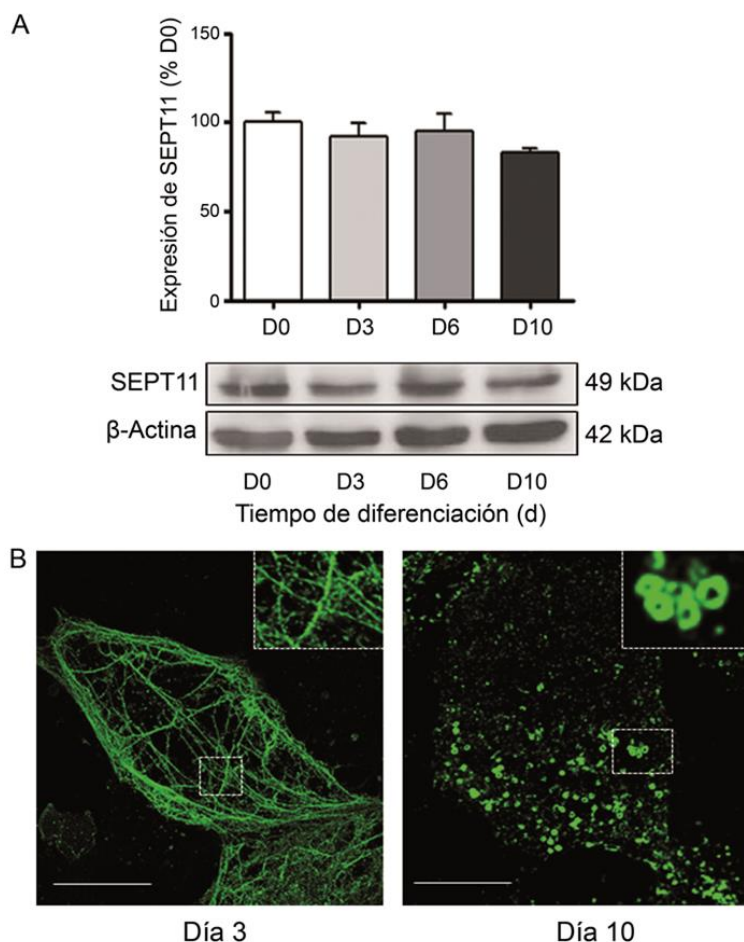


Figura 20: Expresión y localización de SEPT11 a lo largo de la diferenciación de células 3T3-L1. **(A)** Niveles proteicos de SEPT11 en células 3T3-L1 a días 0, 3, 6 y 10 de diferenciación. Los datos representan la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. **(B)** Localización intracelular de SEPT11 en células 3T3-L1 a días cortos (D3, panel izquierdo) y días largos (D10, panel derecho) de diferenciación. Imágenes representativas de microscopía confocal. Barra de escala, 5 μ m.

Teniendo en cuenta los cambios morfológicos que ocurren en la transición de fibroblastos a adipocitos durante la adipogénesis, en primer lugar cuantificamos la producción de SEPT11 en células 3T3-L1 a diferentes días de diferenciación (días 0, 3, 6 y 10) mediante *western blotting*. Como se muestra en la Figura 20A, la expresión proteica de SEPT11 se mantuvo a un nivel constante a lo largo de la diferenciación. Por el contrario, cuando evaluamos la distribución de SEPT11 en células 3T3-L1 observamos importantes cambios en ésta a lo largo de la diferenciación. Concretamente, la inmunoseñal de la proteína endógena se asoció a fibras de estrés al inicio de la diferenciación (día 3) (Figura 20B, panel izquierdo), mientras que en células diferenciadas (día 10) se distribuía formando anillos en la superficie celular (Figura 20B, panel derecho).

4.2.3. Estudio de interacción de SEPT11 con otras septinas

Como se mencionó en la Sección 1.1.5 de Introducción, la función de las septinas usualmente depende de su capacidad para formar complejos oligoméricos y polímeros altamente ordenados que suelen estar constituidos por al menos tres septinas diferentes en células eucariotas (Cao et al., 2009). Evaluamos por tanto la interacción de SEPT11 con otras septinas con las que se ha descrito previamente que interacciona y/o colocaliza en otros tipos celulares: SEPT2 y SEPT9 (Mostowy et al., 2009; Bartsch et al., 2010).

Distribución de SEPT11 expresada exógenamente en células 3T3-L1

Para poder llegar a comprender el tipo de complejos que pueden conformar las septinas, en primer lugar llevamos a cabo el análisis de la proteína SEPT11 expresada de forma exógena en células 3T3-L1. Para ello, generamos nuestras construcciones utilizando un ADNc que codifica para la proteína codificante de SEPT11 de ratón. En estas construcciones, se fusionó una secuencia reportera bien en el extremo amino-terminal (GFP, cMyc) o bien en el extremo carboxilo-terminal (DsRed) de la secuencia de SEPT11 (Figura 21), considerando que la unión de las secuencias reporteras podría afectar a la localización de SEPT11.

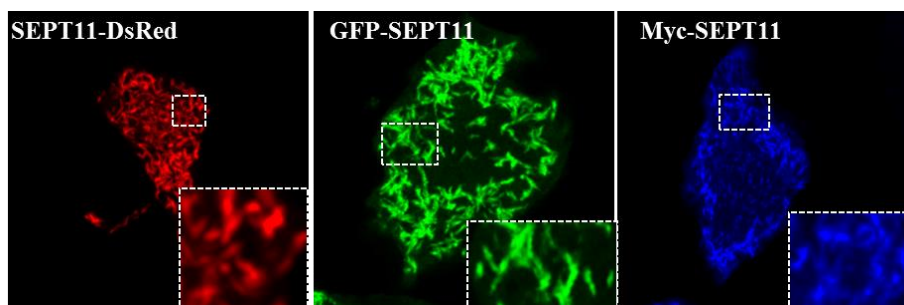


Figura 21: Distribución intracelular de la proteína SEPT11 exógena en células 3T3-L1. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 electroporadas con los vectores pDsRed- SEPT11 (panel izquierdo), phrGFP-N1-SEPT11 (panel central) o pcMyc-SEPT11 (panel derecho). Cuarenta y ocho horas después de la electroporación, las células se fijaron y montaron para su observación. En el caso de las células electroporadas con el vector pcMyc-SEPT11, éstas se procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Myc.

La distribución de la proteína exógena se analizó en células 3T3-L1 electroporadas con las construcciones citadas mediante microscopía confocal. Como se observa en la figura 21, la proteína SEPT11 exógena, marcada bien con GFP o con cMyc en el extremo amino-terminal, así como la proteína exógena SEPT11 marcada con DsRed en el extremo carboxilo-terminal adquirió una distribución diferente a la presentada por la proteína endógena, i.e., en filamentos cortos.

Distribución de SEPT2 y SEPT9 expresadas de forma exógena en células 3T3-L1. Colocalización con SEPT11.

Por otro lado, también analizamos la expresión de las proteínas exógenas SEPT2 y SEPT9 marcadas con una secuencia reportera (GFP) fusionada en el extremo amino-terminal de cada una de ellas. Como se observa en la figura 22, cuando se expresan solas en células 3T3-L1, la proteína phrGFP-N1-SEPT2 forma estructuras fibrilares largas y phrGFP-N1-SEPT9 forma fibras cortas curvadas.

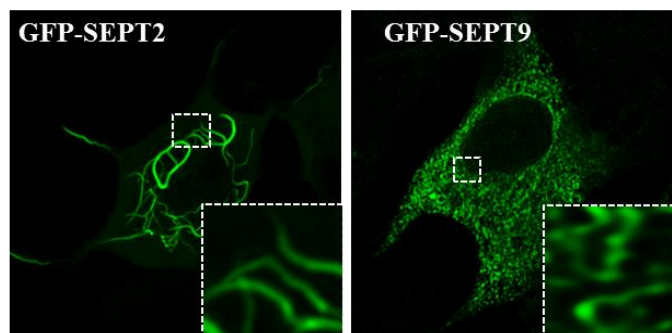


Figura 22: Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 electroporadas con los vectores phrGFP-N1-SEPT2 (panel izquierdo) o phrGFP-N1-SEPT9 (panel derecho). Cuarenta y ocho horas después de la electroporación, las células se fijaron y montaron para su observación.

A continuación, investigamos la distribución de la proteína exógena SEPT11-DsRed cuando se co-expresó con las otras septinas en células 3T3-L1 (Figura 23). Así, la co-expresión de SEPT11 y SEPT2 resultó en la formación de fibras cortas y anillos (Figura 23A, panel superior), mientras que la co-expresión de SEPT11-SEPT9 dio lugar a la formación de fibras largas (Figura 23B, panel inferior).

Ensayos de GST pull-down de SEPT11 con otras septinas: SEPT2 y SEPT9

Para completar los resultados de microscopía confocal, realizamos ensayos de GST *pull-down* con SEPT11 y las otras septinas. Concretamente, empleamos GST4T-3-SEPT11 como cebo y GFP-SEPT2 y GFP-SEPT9 como presa, utilizando además vectores GFP y GST vacíos como controles de especificidad. Como se muestra en la Figura 24, los ensayos de GST pull-down mostraron la existencia de una interacción directa entre SEPT2-SEPT11 y SEPT9-SEPT11.

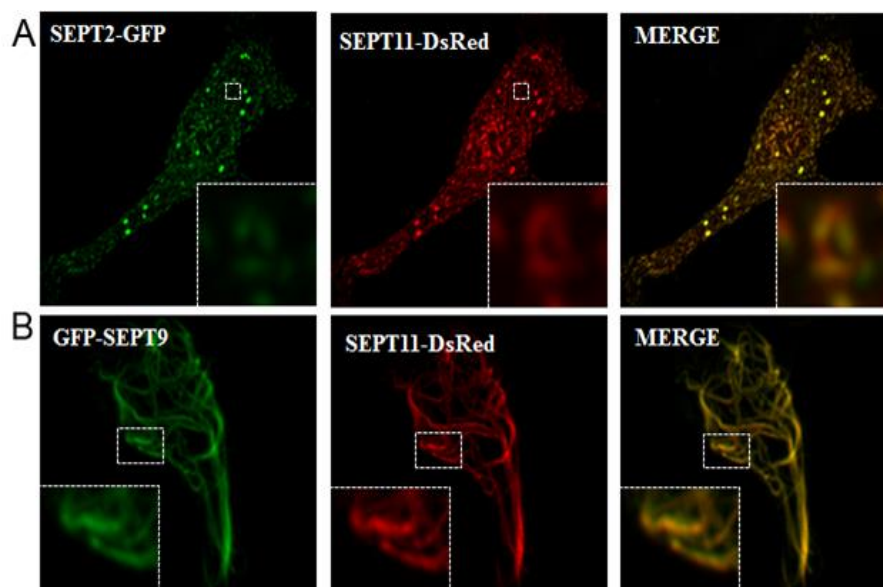


Figura 23: Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 diferenciados y co-electroporados con los vectores de expresión GFP-SEPT2 y SEPT11-DsRed (**A**), o GFP-SEPT9 y SEPT11-DsRed (**B**) durante 48 horas. La colocalización de las dos señales se puede ver en los paneles inferiores en color amarillo. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

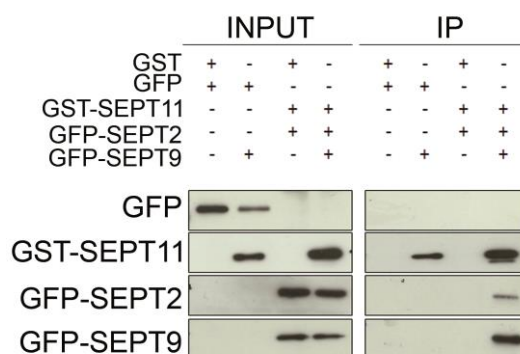


Figura 24: Interacción de SEPT11 con otras septinas. Análisis de la interacción directa entre SEPT11-SEPT2 y SEPT11-SEPT9 mediante ensayos de GST *pull-down*. Se analizaron las muestras de partida (INPUT) e inmunoprecipitados (IP) mediante *western blotting* con anticuerpos específicos anti-GFP y anti-SEPT11. Los INPUT representan el 10% de la muestra de partida empleada para el ensayo. Como control se emplearon proteínas precipitadas con GST y GFP (INPUT).

Estudio de interacción de SEPT2 y SEPT9 con la forma truncada de SEPT11

Como ya se ha mencionado en apartados previos, las septinas son GTPasas del citoesqueleto y, al menos para algunas de ellas, se ha descrito que la actividad GTPasa es importante para la formación de las estructuras que conforman estas proteínas (Hanai et al., 2004). Por ello, investigamos la interacción de SEPT2 y SEPT9 con una proteína SEPT11 con una mutación (Gly48 a Ala) en la caja G1 de la región GTPasa (A48Sept11; cedido amablemente por el Dr. K. Nagata), que permite la unión de GTP a la proteína pero no su hidrólisis y que se ha mostrado previamente que no puede ensamblarse en forma de filamentos (Hanai et al., 2004).

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en extractos celulares de adipocitos 3T3-L1 electroporados a día 6 de diferenciación con un vector de expresión que codifica para A48SEPT11 y GFP-SEPT2 (Figura 25A) o GFP-SEPT9 (Figura 25B), usando anticuerpos específicos anti-cMyc y anti-GFP, observamos que, a diferencia de lo encontrado con la forma SEPT11 salvaje, SEPT2 y SEPT9 no formaron complejos con la forma mutada de SEPT11. Estos resultados sugieren que la actividad GTPasa de SEPT11 es esencial para mantener la interacción de ésta proteína con las demás septinas en los adipocitos.

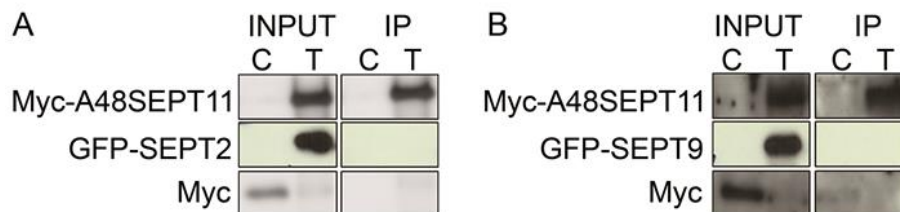


Figura 25: Estudio de co-inmunoprecipitación de la forma mutante de SEPT11 (A48SEPT11) con (A) GFP-SEPT2 y (B) GFP-SEPT9. Inmunoblots de extractos de células 3T3-L1 electroporados con cMyc (C) o co-electroporados a día 6 con cMyc-A48SEPT11 y GFP-SEPT2 o GFP-SEPT9 (T) e inmunoteñidos para cMyc y GFP.

4.2.4. Asociación de SEPT11 con F-Actina en células 3T3-L1

En estudios previos realizados en diferentes modelos celulares se ha demostrado que las septinas pueden asociarse con filamentos de actina, microtúbulos y con fosfolípidos de membrana (Bridges y Gladfelter, 2015). En particular, se ha descrito que SEPT11 co-localiza con filamentos de actina, típicamente en la región nuclear y a lo largo de la periferia de la célula, y rara vez co-localiza con microtúbulos en células REF52, COS7, HeLa y HUVECs (Hanai et al; 2004; Mostowy et al., 2009). Teniendo en cuenta estos resultados y la distribución específica de SEPT11 en adipocitos 3T3-L1 observada en nuestro estudio, analizamos la posible co-localización de SEPT11 y actina al inicio (día 3) y fin de diferenciación (día 10).

En la figura 26 se observa que SEPT11 se asocia a las fibras de estrés marcadas con el estabilizador de los filamentos de actina F, faloidina, en células 3T3-L1 a día 3 de diferenciación. Sin embargo, la actina, en adipocitos diferenciados a término tiene una distribución en el córtex celular, en donde al menos en una menor proporción SEPT11 se asocia a la actina, a pesar de cambiar su distribución de fibras a anillos.

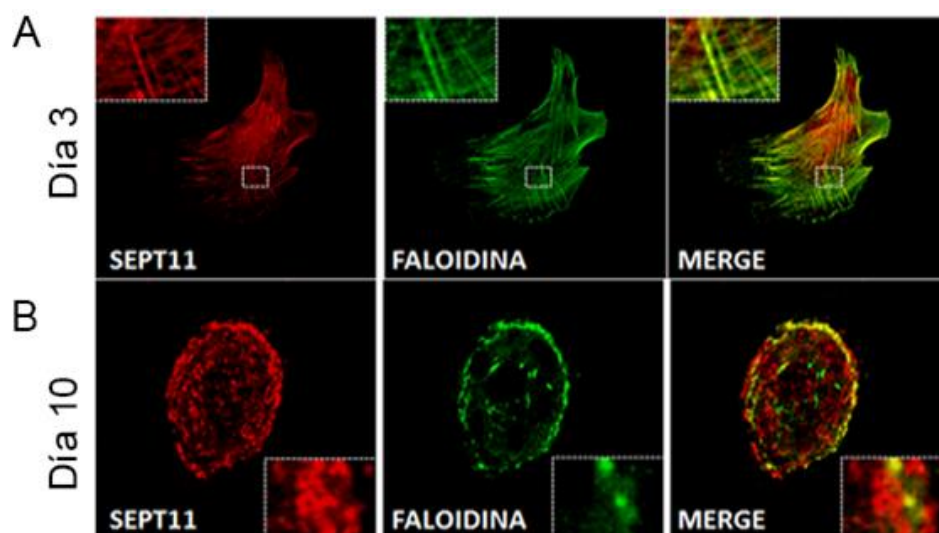


Figura 26: Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 inmunoteñidas con SEPT11 (rojo, paneles de la izquierda) y marcadas con faloidina (verde, paneles centrales) a día 3 (**A**) y día 10 (**B**) de diferenciación. La colocalización de las dos señales se puede ver en los paneles derechos en color amarillo. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

4.2.5. Estudio bioquímico de la distribución subcelular de la proteína SEPT11

De manera complementaria al estudio de distribución celular de SEPT11 a lo largo de la diferenciación realizado mediante inmunocitoquímica, se llevó a cabo un análisis utilizando técnicas bioquímicas de fraccionamiento subcelular seguido de inmunoblot en células 3T3-L1 diferenciadas. Así, la separación de las proteínas intracelulares totales (fracción PNS) de estas células en la fracción cruda de membrana (fracción M) y citosólica (fracción C) mediante centrifugación diferencial mostró que SEPT11 se encuentra mayoritariamente asociada a la fracción de membrana, aun cuando está presente en una cierta proporción en la fracción citosólica (Figura 27A). Sobre las mismas muestras se analizó la distribución de diferentes proteínas control, incluyendo GM130 como ejemplo de proteína periférica de membrana (Stanley y Howell, 1993; Nakamura et al., 1995), CAV-1 como proteína integral de membrana (Couet et al., 2001) y β -actina como proteína citosólica.

Por otra parte, para determinar el tipo de asociación que SEPT11 mantiene con las membranas en células 3T3-L1, utilizamos una metodología bioquímica basada en la extracción diferencial de las proteínas de membrana con distintos agentes químicos (Cruz-García et al., 2012). En concreto, la fracción cruda de membrana (M) de las células 3T3-L1 se trató con NaCl concentrado o con pH altamente básico para extraer las proteínas periféricas de membrana, mientras que se utilizó el detergente Tritón X-100 para extraer las proteínas integrales de membrana. Tras el tratamiento con estos compuestos, las membranas se ultra-centrifugaron para separar las proteínas extraídas en el sobrenadante y las proteínas que mantienen su unión con las membranas en la pella. Como control de la acción de los diferentes tratamientos utilizados, se analizó la presencia de CAV-1, como proteína integral de membrana, y de GM130, como proteína periférica de membrana, en el sobrenadante y en

la pella originada tras cada tratamiento. Como puede observarse en la figura 27B, CAV-1 se extrajo con el detergente Tritón X-100, mientras que esta proteína fue resistente a la extracción con NaCl y pH altamente básico (Figura 27B). Por su parte, GM130 fue extraída a pH básico y no con altas concentraciones de NaCl (Figura 27B), como era de esperarse. Como control de la extracción de GM130, se utilizó un tratamiento con el detergente iónico SDS, que extrae todos los tipos de proteínas independientemente de su unión con las membranas celulares. El análisis de la distribución de SEPT11 en estos extractos mostró que se comporta exactamente igual que la proteína periférica de membrana GM130 (Figura 27B). En conjunto, los estudios bioquímicos indican que SEPT11 se encuentra principalmente asociada a membranas celulares, a las que se une de forma periférica.

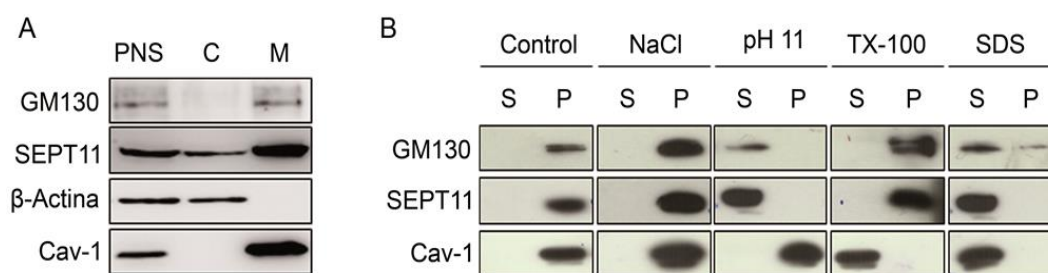


Figura 27: Análisis de la distribución subcelular y la asociación con las membranas de SEPT11 endógena mediante fraccionamiento subcelular. **(A)** El extracto post-nuclear de células 3T3-L1 (PNS) se ultracentrifugó a $165.000 \times g$ para obtener la fracción cruda de membrana (M) en la pella y la fracción citosólica (C) en el sobrenadante. **(B)** La fracción M se incubó con NaCl 1M, NaHCO_3 0.1M pH11, Tritón X-100 1%, SDS 1% o se dejó sin tratar (Control) durante 1 hora a 4°C . Posteriormente, las membranas se sometieron a ultracentrifugación a $165.000 \times g$ para separar las proteínas extraídas en el sobrenadante (S) y las proteínas remanentes en las membranas (P) en la pella. La distribución de la proteína SEPT11 y de varios marcadores de compartimientos en las diferentes fracciones generadas por los métodos se analizó mediante *western blotting*.

4.3. SEPT11 y su asociación con caveolas

Recientemente se ha mostrado que las septinas pueden interaccionar con fosfolípidos de membrana y actuar como factores de andamiaje para el reclutamiento de proteínas y/o como barreras de difusión para la compartimentación subcelular (Weirich et al., 2008; Mostowy y Cossart, 2012). En relación con esto, se ha descrito la presencia de septinas en balsas lipídicas, como SEPT4 (Maimaitiyiming et al., 2007), donde se ha propuesto que regulan la elasticidad de la membrana y el anclaje de receptores al citoesqueleto de actina (Mostowy et al., 2011). Nuestros estudios de SEPT11 en adipocitos 3T3-L1 diferenciados mostraron que esta proteína forma anillos en la superficie celular, lo que recuerda claramente a la distribución anular de las agrupaciones (*clusters*) de caveolas presentes en la superficie de estas células (Watson et al., 2001). Teniendo en cuenta estas observaciones, nos planteamos estudiar la posible localización de SEPT11 en caveolas y su relación con el principal componente de las caveolas, caveolina 1 (CAV-1), en adipocitos diferenciados.

4.3.1. Análisis de localización de SEPT11 en caveolas

Con el fin de analizar la presencia de SEPT11 en las membrana plasmática de los adipocitos, más específicamente en caveolas, llevamos a cabo estudios de inmunocitoquímica en células 3T3-L1 diferenciadas tanto para microscopía confocal como electrónica (Figura 28). En el primer caso, se realizó un marcaje doble usando anticuerpos anti-SEPT11 y anti-CAV-1 (Figura 28A), lo que permitió confirmar el alto grado de solapamiento entre las inmunoseñales de SEPT11 y CAV-1 en anillos localizados en la superficie celular. Estos resultados, que apoyaban la propuesta de la asociación de SEPT11 a caveolas, fueron confirmados mediante microscopía electrónica. Como se observa en la figura 28B, que corresponde a dos micrografías ampliadas de la membrana plasmática del adipocito, las caveolas se pueden distinguir como invaginaciones de 89 y 103 nm (Figura 28B, panel derecho e izquierdo, respectivamente) en forma de Ω . El inmunomarcado de los cortes con el anticuerpo anti-SEPT11 reveló la presencia de algunas partículas de oro coloidal en la cara citoplasmática de las caveolas, mientras que el resto de orgánulos celulares carecía de inmunomarcaje.

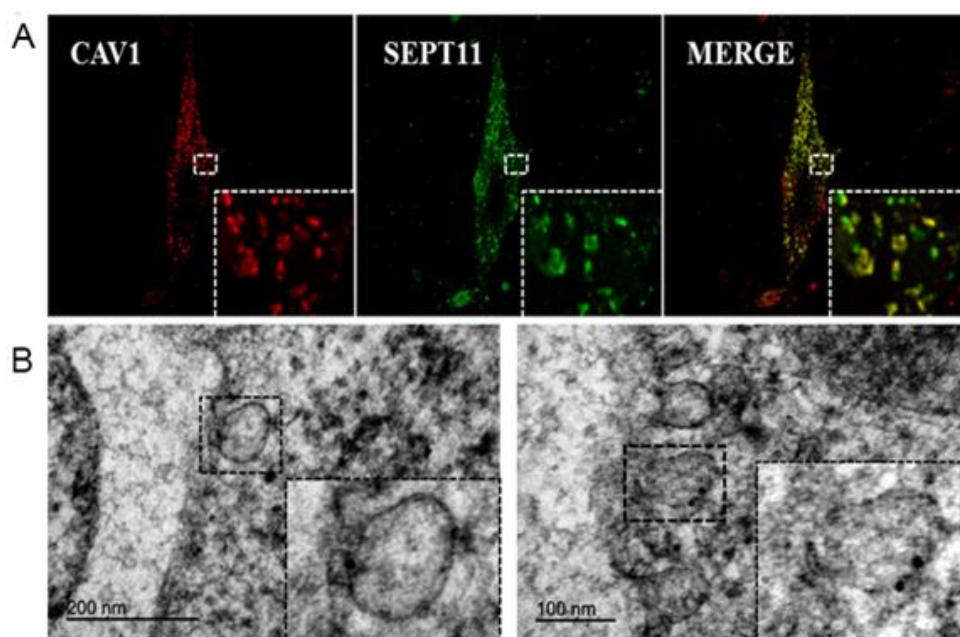


Figura 28: Localización de SEPT11 en caveolas en células 3T3-L1. (A) Imagen de microscopía confocal de células 3T3-L1 inmunoteñidas con anticuerpos específicos frente a SEPT11 (verde) y CAV-1 (rojo). La colocalización de las dos señales (figura de la derecha) se puede ver en amarillo (magnificación 1,000 X). Se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes. (B) Micrografía ampliada de la superficie de un adipocito 3T3-L1 inmunomarcado para SEPT11 usando oro coloidal de 20 nm de diámetro.

4.3.2. Estudio de la interacción entre SEPT11 y caveolina-1

Teniendo en cuenta la localización de SEPT11 en caveolas y la presencia de un dominio de unión potencial a CAV-1 en su secuencia, se evaluó la posible interacción de estas dos proteínas mediante estudios de GST *pull-down* y de inmunoprecipitación (Figura 29). La figura 29A muestra los resultados del ensayo de GST *pull-down* empleando GST4T-3-SEPT11 como cebo y CFP-CAV-1 como presa, que apoyan la interacción directa de ambas proteínas.

Con el fin de verificar dicha interacción, se realizó una co-inmunoprecipitación en extractos celulares de adipocitos 3T3-L1 electroporados con cMyc-SEPT11 y CFP-CAV-1 (Figura 29B), obteniéndose resultados concordantes con los observados mediante GST pull-down.

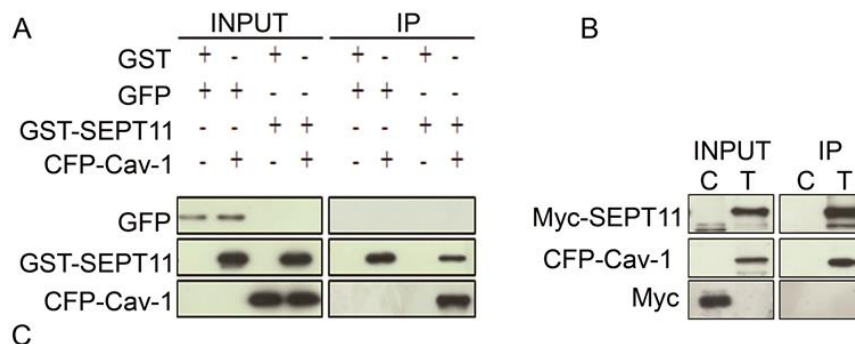


Figura 29: Análisis bioquímico de la interacción de SEPT11 y CAV-1. **(A)** Ensayo de GST pull-down. Las muestras de extracto total (INPUT) y el inmunoprecipitado (IP) se analizaron mediante *western blotting* con anticuerpos específicos anti-GFP y anti-SEPT11. El INPUT contenía el 10% de la muestra de partida empleada para el ensayo. Como control se utilizaron las proteínas precipitadas con GST y GFP (INPUT). **(B)** Co-inmunoprecipitación de los complejos SEPT11-CAV-1. Inmunoblots de extractos de células 3T3-L1 electroporadas con cMyc (C) o co-electroporadas con cMyc-SEPT11 y CFP-CAV-1 (T) e inmunoteñidos para Myc y GFP.

4.3.3. Estudios de subfraccionamiento celular en células 3T3-L1

Para estudiar el tipo de asociación que SEPT11 con las membranas caveolares en células 3T3-L1, específicamente con CAV-1, utilizamos una metodología bioquímica basada en el aislamiento de proteínas integrales de caveolas. Esta metodología se fundamenta en la centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa de un extracto celular obtenido en un tampón libre de detergentes (Yang et al., 2001). En concreto, para la obtención del extracto crudo de células 3T3-L1, se utilizó una solución de lisis que contiene carbonato sódico a pH 11, el cual extrae las proteínas periféricas de membrana. El homogenado resultante se ajustó a una concentración final de sacarosa del 45% y se situó en el fondo de un tubo de ultracentrífuga, sobre el cual se generó un gradiente discontinuo de sacarosa al 35 y 5%. Posteriormente, se ultracentrifugó el extracto celular para aislar las membranas caveolares, las cuales ascienden a las fracciones del gradiente con menor densidad (fracciones 1 y 2) debido a las características bioquímicas que le confieren su composición lipídica. Como control interno, se analizó la distribución en el gradiente de las proteínas CAV-1 y β -actina que ocuparon, respectivamente, las fracciones 1-2 y las fracciones más densas del gradiente (Figura 30). El análisis realizado con el anticuerpo anti-SEPT11 a partir de estas muestras reveló que la mayor parte de la proteína se separa en las fracciones citosólicas y sólo una porción residual se asocia a la fracción 2 del gradiente, indicando la asociación preferente de esta proteína a las caveolas como una proteína periférica (Figura 30).

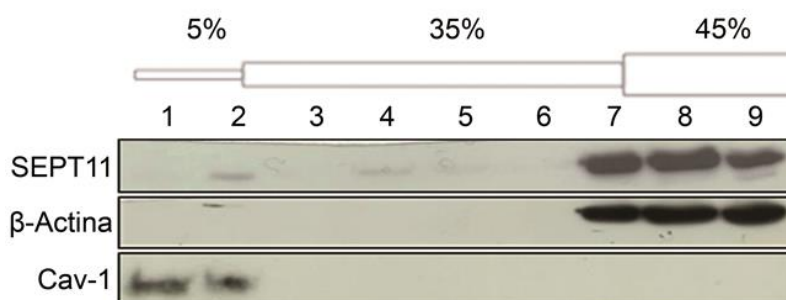


Figura 30: Análisis de la asociación de SEPT11 con caveolas en células 3T3-L1. Se obtuvo un extracto crudo de células 3T3-L1 en tampón carbonato sódico 0,5 M, pH 11,0. El extracto resultante fue ajustado a una concentración del 45% de sacarosa y sobre él se generó un gradiente discontinuo de sacarosa al 35 y 5%. La ultracentrifugación a 120.000 x g permitió la separación de las caveolas, aisladas en las fracciones menos densas del gradiente (fracciones 1 y 2). Se analizó la distribución de la proteína SEPT11 en las 9 fracciones mediante *western blotting*. Como control interno, se analizó la distribución de CAV-1 y β-actina en el gradiente.

4.4. Regulación de la expresión de SEPT11 en adipocitos. Modelos *in vitro* de resistencia a insulina

En este estudio empleamos varios modelos *in vitro* que hemos desarrollado en el laboratorio (Díaz-Ruiz et al., 2015) para simular las condiciones diferenciales de los subgrupos de pacientes incluidos en las cohortes en estudio y analizar en ellos la posible regulación de la expresión de SEPT11. Concretamente, evaluamos el impacto de la hiperglucemia/hiperinsulinemia y de inflamación que caracteriza a los individuos IR en células 3T3-L1 expuestas durante 24 h a concentraciones elevadas de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nmol/L) (alta glucosa-alta insulina; HGHI) o a TNF-α (2,5 ng/ml). Además, analizamos el efecto de la hipertrofia de los adipocitos asociada a obesidad, con o sin resistencia a insulina, mediante el tratamiento prolongado (18 h) de adipocitos 3T3-L1 con ácidos grasos saturados (palmitato) o insaturados (oleato), respectivamente.

4.4.1. Efecto del TNF-α y HGHI sobre la expresión de SEPT11 en adipocitos 3T3-L1

En primer lugar, evaluamos si los tratamientos provocaban resistencia a insulina en células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación mediante el análisis por *immunoblotting* cuantitativo del ratio pAKT/AKT tras la exposición a un pulso de 5 min de insulina (100 nmol/L) al final de dichos tratamientos. Tanto el tratamiento con TNF-α como la exposición a HGHI inhibieron de forma significativa el aumento en el ratio pAKT/AKT inducido por insulina (49,3% y 54,3%, respectivamente) respecto a lo observado en células 3T3-L1 que no habían sido previamente expuestas a estas condiciones (Figuras 31A y 31B).

Posteriormente, analizamos mediante *western blot* el contenido proteico de SEPT11 en los extractos proteicos obtenidos de los dos modelos (Figura 32A y 32B). El tratamiento con TNF-α disminuyó la expresión de SEPT11 respecto al control (12,6%), aunque dicho efecto no alcanzó significación estadística (Figura 32A). Por otro lado, el tratamiento con HGHI provocó un aumento

significativo de los niveles de SEPT11 respecto a lo observado en los adipocitos 3T3-L1 no tratados (Figura 32B).

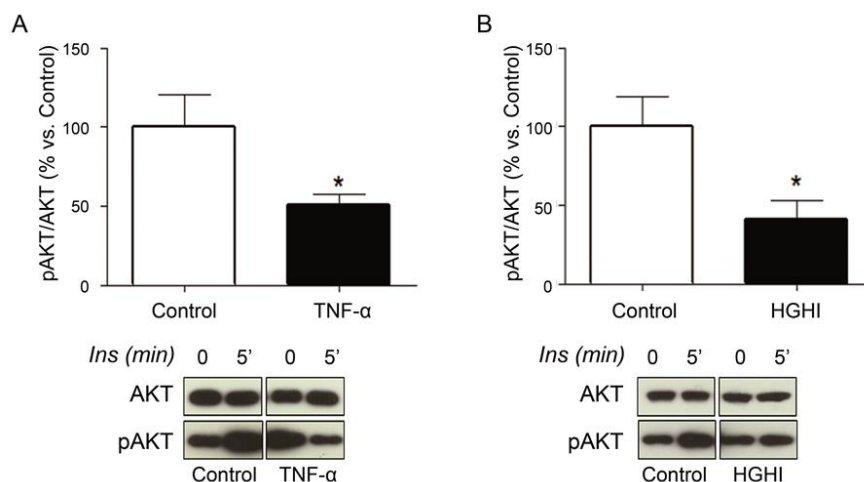


Figura 31: Respuesta a insulina (ratios pAKT/AKT) de adipocitos 3T3-L1 (día 6) expuestos a TNF- α (2,5 ng/ml) (A) o alta glucosa (4,5 g/L)/alta insulina (100 nmol/L) (HGHI) (B) durante 24 hr. Como controles, se utilizaron adipocitos 3T3-L1 que fueron cultivados en medio solo durante 24 h. Tras el tratamiento, los adipocitos fueron estimulados con insulina (100 nmol/L) durante 5 minutos. Los lisados celulares fueron analizados mediante *western blotting* con anticuerpos específicos para AKT y pAKT. Los datos se expresan como porcentaje vs. Control (100%). Media \pm SEM de seis experimentos, * $p < 0.05$.

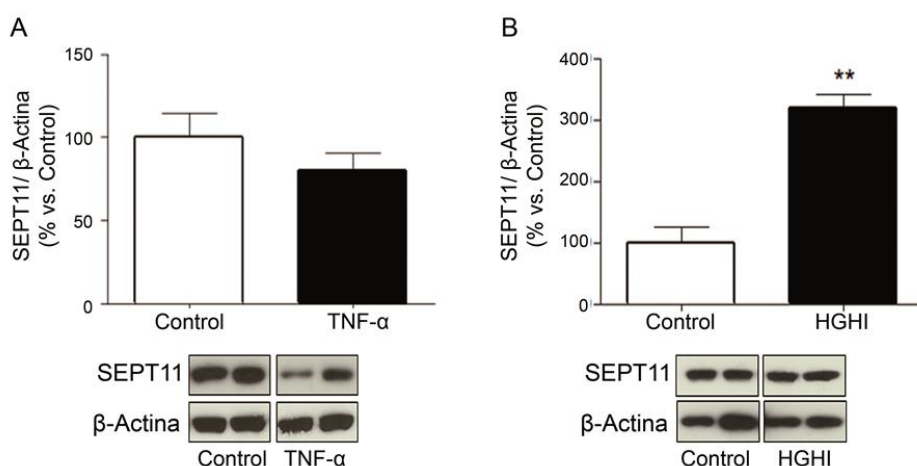


Figura 32: Efectos del tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con TNF- α (2,5 ng/ml) (A) o alta glucosa (4,5 g/L)/alta insulina (100 nmol/L) (HGHI) (B) durante 24 h sobre la expresión de SEPT11. Se muestran inmunoblots representativos de SEPT11 y cuantificación de los niveles de proteína expresados en porcentaje respecto al control (100%). Los datos fueron normalizados a β -Actina. Media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. ** $p < 0.01$.

4.4.2. Efecto de la exposición a ácidos grasos sobre la expresión de SEPT11 en adipocitos

Por otra parte, también analizamos el efecto de los tratamientos con dos ácidos grasos, oleato y palmitato, a dos concentraciones crecientes (250 μ mol/L y 500 μ mol/L) durante 18 horas en células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación. En este estudio, al igual que con los otros dos modelos, en primer lugar se cuantificó el ratio pAKT/AKT en células expuestas a insulina (100 nmol/L) durante 5 min tras los tratamientos de 18 horas con ácidos grasos. La exposición previa de células 3T3-L1 a la mayor concentración de ácidos grasos testada (500 μ M) de oleato (Figura 33A) indujo una reducción

numérica muy baja el ratio pAkt/Akt inducido por insulina, aunque sólo el efecto del palmitato alcanzó significación estadística a concentración 500 μM ((Figura 33B). Tampoco se observó un efecto significativo del palmitato o del oleato sobre la actividad de la Akt cuando estos ácidos grasos se administraron a una concentración de 250 μM .

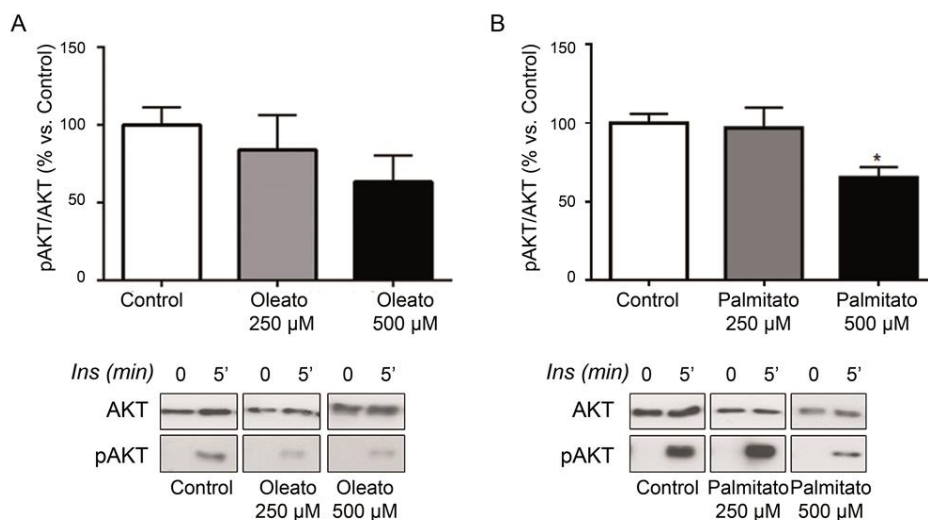


Figura 33: Respuesta a insulina (ratios pAKT/AKT) de adipocitos 3T3-L1 expuestos a concentraciones crecientes (250 μM y 500 μM) de oleato (A) o palmitato (B). Tras los tratamientos, los adipocitos fueron estimulados con insulina (100 nmol/L) durante 5 minutos. Los lisados celulares fueron analizados mediante *western blotting* con anticuerpos específicos para AKT y pAKT. Se muestran inmunoblots representativos de Akt total y pAkt y cuantificación de los ratios pAkt/Akt expresados en porcentaje respecto al control (100%). Media \pm SEM de seis experimentos, * $p < 0.05$.

De manera complementaria, tras los tratamientos con oleato y palmitato analizamos la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, el contenido intracelular de lípidos en células teñidas con Oil Red O y el diámetro celular por morfometría para microscopía óptica. El ensayo de viabilidad celular, indicó que el grado de viabilidad celular en muestras tratadas con oleato a 250 μM y 500 μM fue de un 107,9% y 97,7% mientras que en muestras tratadas con palmitato a 250 μM y 500 μM fue de 102,6% y 100,9%, respectivamente, estos datos indican que ninguno de los tratamientos provocó cambios en la viabilidad de los cultivos.

Por otra parte, observamos que el diámetro de las células expuestas a oleato y palmitato (Figuras 34A y 34B, respectivamente) incrementó progresivamente en relación a la concentración administrada. No obstante, el diámetro de las células fue superior en aquellas que fueron tratadas con oleato 500 μM en comparación con las tratadas con palmitato ($p < 0,0001$). En línea con los resultados de microscopía, la medida de lípidos acumulados mediante la cuantificación de la tinción de Oil Red O (triglicéridos neutros) por espectrometría mostró un aumento en respuesta a ambos ácidos grasos, aunque sólo se alcanzaron diferencias significativas respecto a los valores de los cultivos control a la concentración de 500 μM (Figuras 34C y 34D). En las figuras 34E y 34F se pueden observar imágenes representativas de células 3T3-L1 teñidas con Oil Red O que confirman los cambios observados en diámetro y contenido de triglicéridos neutros en los cultivos expuestos a los ácidos grasos.

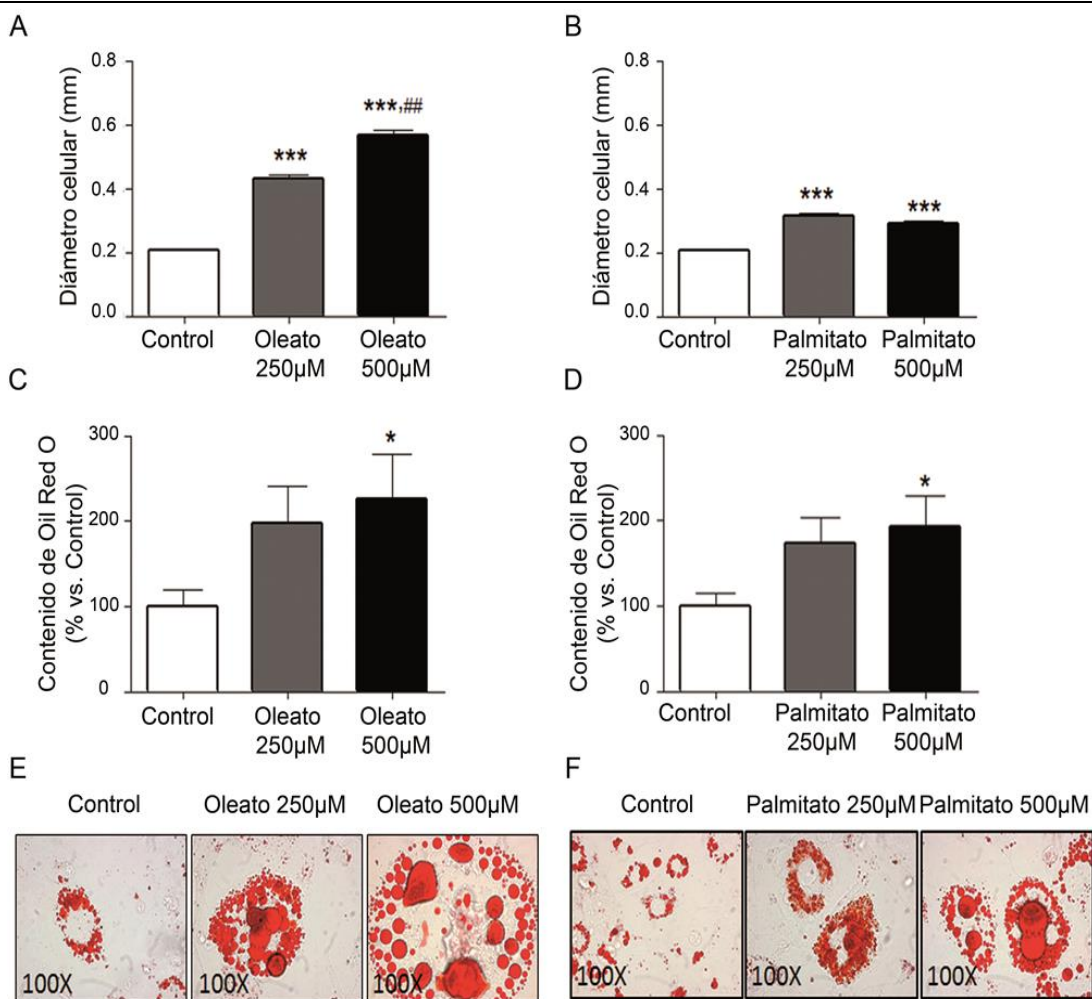


Figura 34: Efecto del tratamiento con oleato y palmitato sobre adipocitos 3T3-L1 diferenciados. Cuantificación del diámetro de células tratadas con oleato y palmitato (**A** y **B**, respectivamente). Cuantificación del contenido de Oil-Red O en células tratadas con oleato y palmitato (**C** y **D**, respectivamente). Se muestran imágenes representativas de microscopía óptica de adipocitos 3T3-L1 expuestos a diferentes concentraciones de oleato y palmitato (**E** y **F**, respectivamente). Los datos se expresan como porcentaje de los valores respecto de los cultivos control. Media \pm SEM de al menos 30 células por condición y de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control, y ## $p < 0.01$ vs. oleato 250 µM.

Posteriormente a la caracterización de los dos modelos de ácidos grasos, analizamos la expresión proteica de SEPT11 en extractos proteicos mediante *western blotting* (Figura 35A y 35B). El tratamiento con oleato 250 µM y 500 µM resulto en un aumento de 294,4% y 510,9% veces más de la expresión de SEPT11 respecto al control (Figura 35A). Así mismo, el tratamiento con palmitato también genero aumento (129,1% y 319,8%) de la expresión de SEPT11 a las dos concentraciones (Figura 35B). En términos absolutos, la expresión de SEPT11 fue mayor con el tratamiento con oleato que con palmitato, sin embargo tras los dos tratamientos hubo un aumento considerable de la expresión de SEPT11.

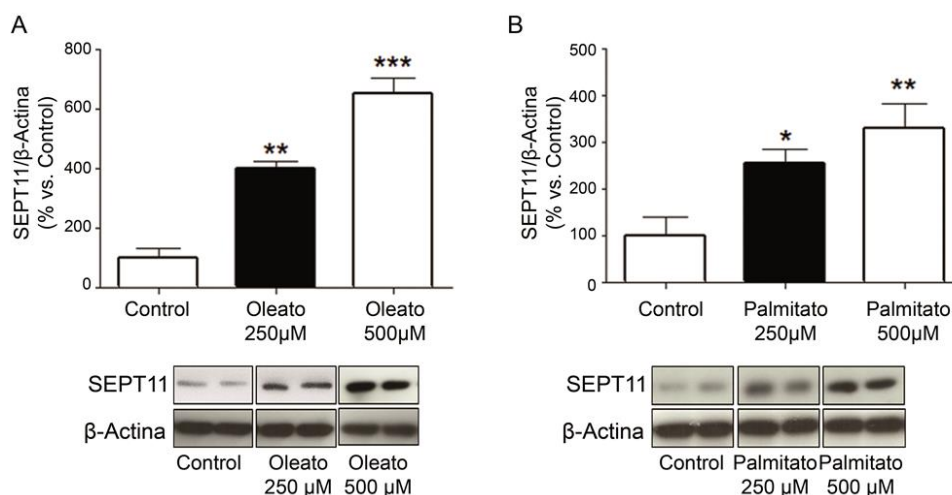


Figura 35: Efectos sobre la expresión proteica de SEPT11 tras tratamientos con Palmitato y Oleato. **(A)** Expresión de SEPT11 tras tratamiento con oleato a concentración 250 y 500 μM . **(B)** Expresión de SEPT11 tras tratamiento con palmitato a concentración 250 y 500 μM . Immunoblots representativos de SEPT11 y cuantificación de los niveles de proteína expresados en porcentaje respecto al control (100%). Los datos fueron normalizados a β -Actina. Media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.5. Mecanismos moleculares de acción de SEPT11. Identificación y caracterización del interactoma de SEPT11 mediante ensayo de doble híbrido de levadura

El ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H) nos ha permitido realizar una búsqueda más general de aquellas proteínas que interactúan con SEPT11. Para poder llevarla a cabo, se utilizó una librería de tejido adiposo subcutáneo de rata preparada en nuestro laboratorio para realizar el escrutinio de posibles efectores de SEPT11. Tras comprobar que la sobreexpresión de SEPT11 en levaduras fue eficaz y no resultó tóxica para las células, se procedió al emparejamiento de la cepa de levaduras transfectadas con SEPT11 con la que expresa distintos fragmentos de ADNc de la librería y se llevó a cabo la primera selección de clones positivos mediante el crecimiento de éstos en ausencia de Leu y Trp y en presencia de X- α -Gal y aureobasidina (selección de dobles transformantes). Posteriormente, se procedió al crecimiento de los clones positivos en ausencia de Leu, Trp, Ade e His y en presencia de X- α -Gal y aureobasidina (selección de dobles transformantes con capacidad de activación de GAL4). Los clones positivos resultantes de esta segunda selección fueron analizados por PCR para verificar la presencia de inserto en los vectores. En la Tabla 14 se muestra la lista de proteínas identificadas, incluyendo la función descrita para cada una de ellas (<http://www.genecards.org>).

Tabla 14. Proteínas identificadas mediante Y2H como posibles interactores de SEPT11.

<i>Proteína</i>	<i>Acrónimo</i>	<i># Acceso</i>	<i>Función</i>
Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	ST6GAL1	NP_001239435.1	Proteína que cataliza la transferencia de ácido siálico de CMP-ácido a sustratos que contienen galactosa.
Fatty acid-binding protein, 5	FABP5	CAA11069	Proteínas con un papel importante en la captación, transporte y metabolismo de ácidos grasos de cadena larga y otros ligandos hidrófobos.
Coiled-Coil Domain-Containing Protein 109A	CCDC109A	AAI39255	Transportador de calcio en la membrana mitocondrial.
Low density lipoprotein-related protein 1B	LRPB1	CAA45759	Proteína implicada en señalización intracelular y homeostasis de lípidos.
Collagen alpha-1(I)	COL1A1	AAH50014	Componente de la matriz extracelular
Rho GTPase activating protein 11A	ARHGAP11A	NP_852081	Proteína asociada a filamentos de actina
Tyrosine-protein kinase Fyn	FRK	NP_001153016	Proteína que estabiliza a fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN)
FERM domain-containing protein 8	FMRD8	NP_080445	Proteína módulo implicada en la localización de las proteínas FERM (B4.1/Ezrin/Radixin/Moesin), asociadas a citoesqueleto.
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor.	ATP1A1	NP_659149	Proteína responsable de establecer y mantener gradientes electroquímicos de Na ²⁺ y K ⁺ a través de la membrana plasmática.
Rho GTPase-activating protein 21	ARHGAP21	AAH76629	Proteína con actividad GTPasa para CDC42, que participa en la regulación de la F-actina a través de CDC42
Beclin 1-associated autophagy-related key regulator	BECN1	NP_766187	Determina la localización del complejo de PI3-quinasa específico de autofagia. Juega un papel en la formación de autofagosomas.
Kinectin	KTN1	NP_032503	Receptor para kinesina, facilita que la actina G de lugar a pequeños fragmentos inestables de actina F, participa en la señalización del citoesqueleto y facilita la movilidad vesicular
Myelin P2	PMP2	EDL05174	Puede jugar un papel en el transporte de lípidos.
Patatin-like phospholipase domain-containing protein 7	PNPLA7	NP_666363	Proteína implicada en la regulación de la diferenciación de los adipocitos.
Protocadherin-7 precursor	PCDH7	O60245	Proteína que participa en el reconocimiento célula-célula y adhesión celular.

Entre las proteínas identificadas, cabe destacar ARHGAP11A y ARHGAP21 como proteínas que participan en la polimerización de la actina (Ferreira et al., 2015), las chaperonas de lípidos, FABP5 y PMP2/FABP8, de gran importancia en la captación, transporte y metabolismo de ácidos grasos (Ma et al., 2010; Zenker et al., 2014), o LRPB1, que participa en la endocitosis de lípidos

(Masson et al., 2009). También hallamos proteínas como la kinectin, que está asociada a la nucleación de la actina y procesos de movilidad vesicular (Santama et al., 2004) y Beclin, una proteína que participa en procesos de autofagia (Levine et al., 2015). De todas estas proteínas, elegimos FABP5 para profundizar en su relación con SEPT11 en el contexto de la regulación del metabolismo lipídico.

Para validar los resultados de la técnica Y2H, seleccionamos tres proteínas (ARHGAP21, FABP5 y Kinectin) para el análisis de su interacción con SEPT11 mediante ensayos de GST *pull-down*, empleando los vectores GST4T-3-SEPT11 como cebo y GFP-ARHGAP21, GFP-FABP5, GFP-Kinectin como presa. Los resultados de estos análisis mostraron que las tres proteínas se unen directamente a SEPT11 (Figura 36).

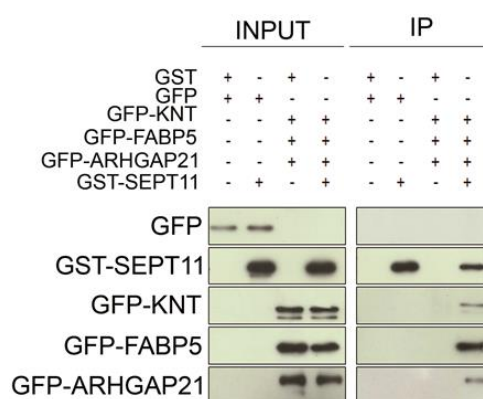


Figura 36: Confirmación de la interacción entre SEPT11 y Kinectin (KNT), FABP5, ARHGAP21 mediante ensayos de GST *pull-down*. Las muestras de partida (INPUT) y los inmunoprecipitados (IP) se evaluaron mediante *western blotting* con anticuerpos específicos anti-GFP y anti-SEPT11. Los INPUT representan el 10% de la muestra de partida empleada para el ensayo. Como controles se usaron proteínas precipitadas con GST y GFP (INPUT).

4.6. Efecto del ácido oleico sobre la distribución y expresión de SEPT11, CAV-1 y FABP5

Una vez establecida la interacción de SEPT11 con FABP5 mediante técnicas bioquímicas, investigamos la posible co-localización de ambas proteínas en adipocitos 3T3-L1. Para ello, en primer lugar analizamos la distribución de la proteína exógena GFP-FABP5 en células 3T3-L1 tratadas o no con oleato, ya que se ha demostrado que la exposición a ácidos grasos provoca cambios en la localización intracelular de las FABPs (Huang et al., 2002; Furuhashi y Hotamisligil, 2008). Como se muestra en la Figura 37A, en condiciones basales GFP-FABP5 muestra una localización citosólica difusa, aunque puede observarse una cierta acumulación en oposición a la membrana plasmática. La exposición de las células a oleato (500 μ M) a corto plazo (1 h) indujo una cierta concentración de la señal GFP-FABP5, especialmente en el núcleo (Figura 37A), mientras que el tratamiento prolongado con este ácido graso (18 h), además de incrementar aún más la señal nuclear, provocó la acumulación clara de GFP-FABP5 en la superficie de las gotas lipídicas (Figura 37A).

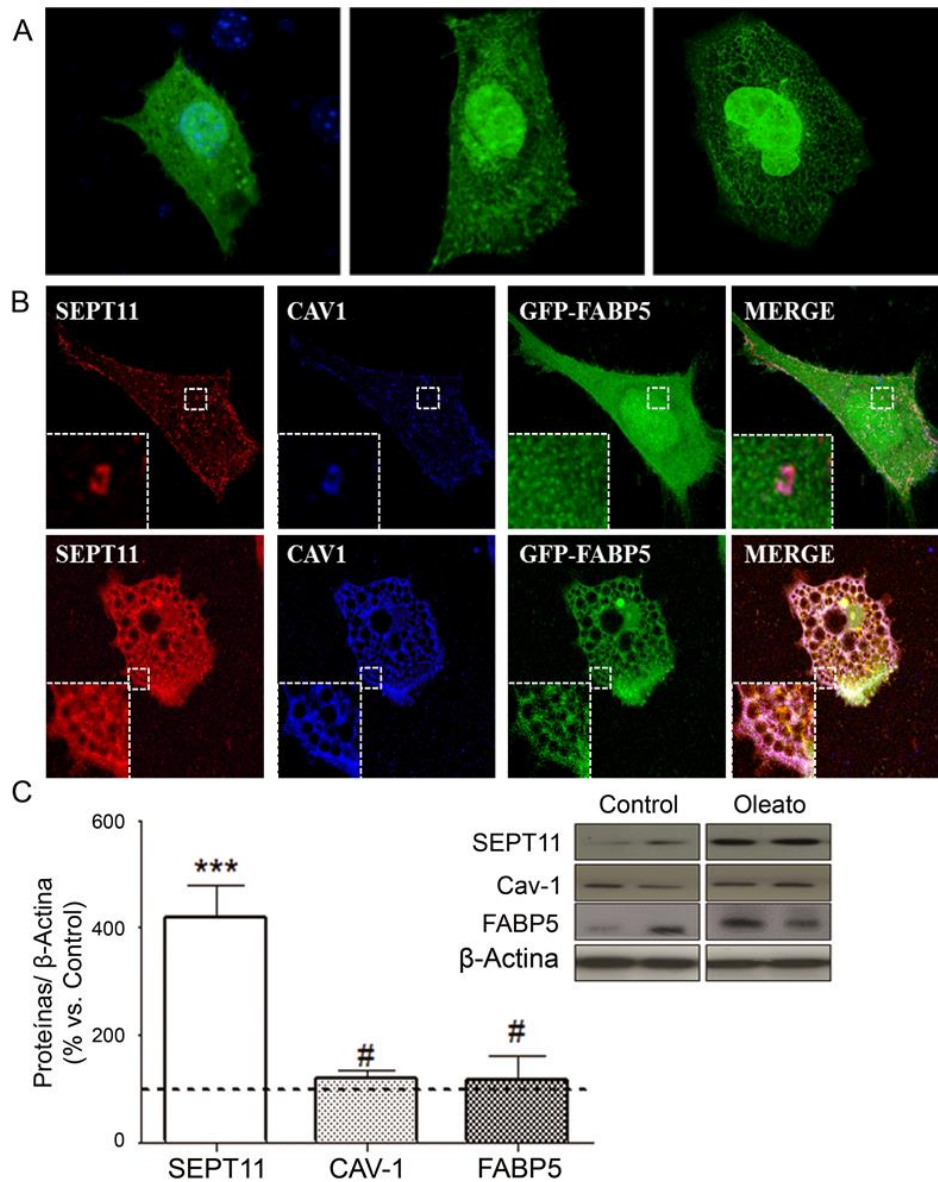


Figura 37: Regulación de la distribución y del contenido de SEPT11, CAV-1 y FABP5 en respuesta a oleato. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 electroporados con el vector GFP-FABP5 (verde) en condiciones basales (panel izquierdo) o expuestos a oleato 500 μ M durante 1 h ó 18 h (paneles central y derecho, respectivamente). (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 electroporados con el vector GFP-FABP5 (verde) e inmunoteñidos para SEPT11 (rojo) y CAV-1 (azul), en condiciones basales (paneles de la parte superior) o expuestos a oleato 500 μ M durante 18 h (paneles de la parte inferior); la colocalización de las tres proteínas se puede observar en el panel derecho. (C) Immunoblots de extractos proteicos de células 3T3-L1 control o expuestas a oleato 500 μ M durante 18 h usando anticuerpos específicos para SEPT11, CAV-1 y FABP5. Los datos se expresan como la media \pm SEM de las proteínas referidas (100%) a condiciones control. *** $p < 0.001$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. Oleato.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre la distribución intracelular de FABP5 y su interacción con SEPT11 en los ensayos Y2H y GST *pull-down*, junto con la demostración previa por otros autores de la redistribución de CAV-1 de la membrana plasmática a gotas lipídicas en adipocitos tratados con oleato (Pol et al., 2005), analizamos a continuación la localización de SEPT11 bajo dichas condiciones. Para ello, electroporamos células 3T3-L1 con el vector GFP-FABP5 y, tras 18 h de exposición a oleato 500 μ M, realizamos un inmunomarcaje doble para SEPT11 y CAV-1. Como se muestra en la Figura 37B, en condiciones basales, la señal de GFP-FABP5 no colocaliza básicamente

con los inmunomarcajes de SEPT11 y CAV-1 que, como se indicaba en apartados anteriores, coinciden en estructuras en forma de anillo en la superficie celular (paneles superiores). Sin embargo, el tratamiento con oleato indujo la translocación de SEPT11 a las gotas lipídicas, donde mostró un importante grado de co-localización con CAV-1 y GFP-FABP5 (Figura 37B).

Finalmente, evaluamos si, además de modificar la distribución intracelular de las tres proteínas en estudio, la exposición prolongada a oleato provocaba cambios en su contenido intracelular (Figura 37C). Así, mediante *immunoblotting* cuantitativo observamos que el tratamiento con oleato 500 μ M durante 18 aumentó el contenido de SEPT11 en 4.1 veces respecto a lo observado en condiciones control, mientras que no causó cambios en CAV-1 o FABP5.

4.7. Silenciamiento de SEPTIN 11 mediado por siRNA de síntesis química en adipocitos 3T3-L1

Con el fin de definir la función de SEPT11 en la actividad celular de los adipocitos, llevamos a cabo experimentos de silenciamiento génico. La reducción de la expresión de SEPT11 se llevó a cabo mediante una estrategia basada en ARN interferente que consiste en la introducción de un siRNA sintetizado químicamente. Concretamente, se utilizaron dos siRNAs específicos para SEPT11 que fueron adquiridos de una casa comercial (siRNA#1 y siRNA#2), que fueron administrados mediante transfección (células 3T3-L1 a día 3 de diferenciación) o electroporación (células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación), por separado o en combinación, a dos dosis diferentes (50 y 100 picomoles; Figuras 38A y 38B, respectivamente). El grado de silenciamiento se determinó a nivel proteico mediante *western blotting* cuantitativo utilizando β -actina como control de carga, estableciendo como control los valores observados en cultivos paralelos que fueron tratados con un siRNA control adquirido a la misma casa comercial. El análisis de los resultados demuestra que la transfección con el siRNA#1, a 50 ó 100 picomoles, provoca una disminución del nivel proteico de SEPT11 de 52,6% y 69,45%, respectivamente, respecto a los cultivos transfectados con siRNA control, mientras que ninguna de las concentraciones utilizadas de siRNA#2 o la mezcla de los siRNAs (#1 y #2) modificaron el contenido de SEPT11 (Figuras 38A y 38B). A partir de estos resultados, se determinó el grado de silenciamiento de SEPT11 en células 3T3-L1 tres días tras la electroporación con 2 nmoles de siRNA#1. Como se observa en la Figura 38C, las células 3T3-L1 electroporadas con siRNA#1 presentaban un 79,2% menos de SEPT11 que las células electroporadas con el siRNA control. De forma complementaria, se determinó el grado de viabilidad celular de los cultivos, obteniendo una viabilidad del 91% para las células electroporadas con el siRNA control y del 87% para las células electroporadas con el siRNA #1 específico para SEPT11.

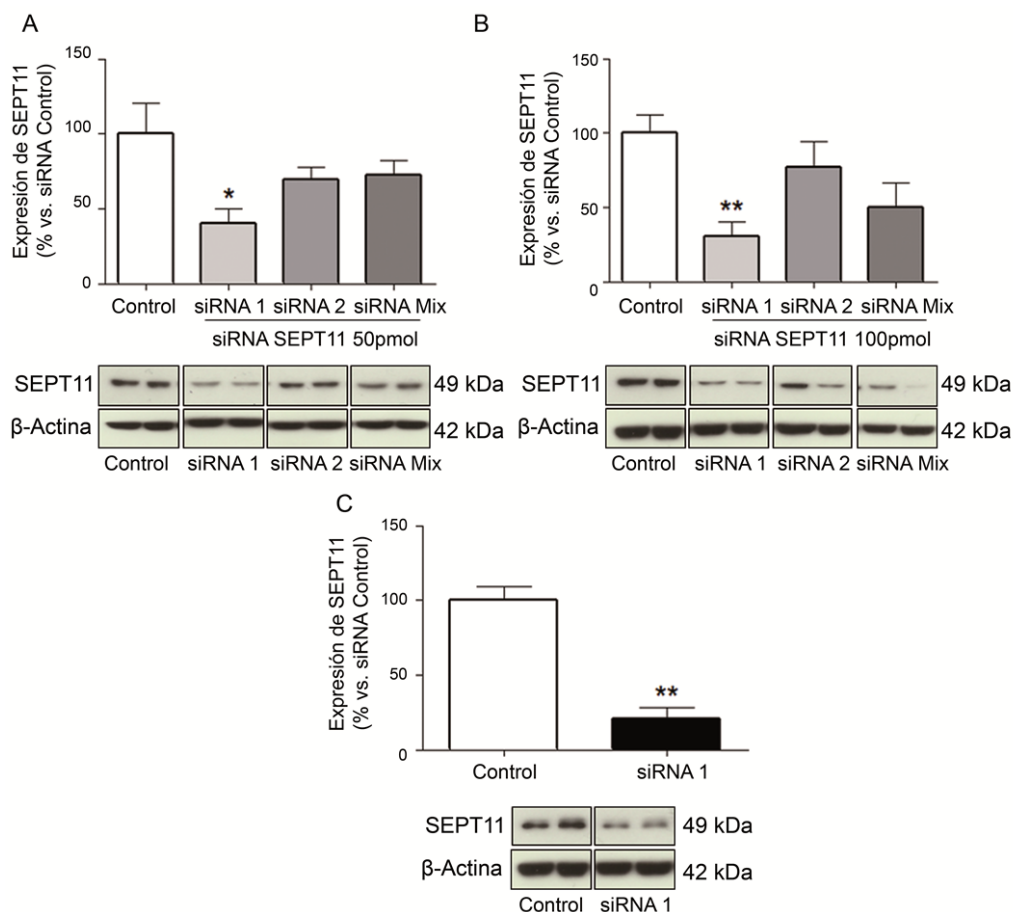


Figura 38: Reducción de la expresión proteica de SEPT11 en células 3T3-L1 mediante transfección o electroporación con siRNAs de síntesis química. (A) Se transfectaron células 3T3-L1 con 50 picomoles o (B) 100 picomoles de siRNA control, siRNAs específicos para SEPT11 (siRNA#1 y siRNA#2) o una mezcla de los dos siRNAs (siRNA Mix). (C) Se electroporaron células 3T3-L1 con 2 nmoles de siRNA#1. Como control se utilizaron células transfectadas o electroporadas con siRNA control. Tres días después de la transfección/electroporación, se cuantificó la expresión proteica mediante *western blotting* utilizando un anticuerpo anti-SEPT11. La tinción con el anticuerpo β -actina se utilizó como control de carga. Los resultados se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes y los datos fueron referidos al siRNA control (100%). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.7.1. Cambios en el contenido de FABP5 y CAV-1 tras el silenciamiento de SEPT11 mediado por siRNA

Una vez optimizados el tiempo y concentración de siRNA para obtener una disminución significativa de la proteína SEPT11, estudiamos el efecto del silenciamiento sobre el contenido de CAV-1 y FABP5 en las células electroporadas con 2 nmoles de siRNA#1. La Figura 39 muestra que el silenciamiento de SEPT11 conlleva una disminución en la expresión proteica de CAV-1 y FABP5 del 71,85% y 46,4%, respectivamente, en relación a lo observado en los cultivos electroporados con el siRNA control.

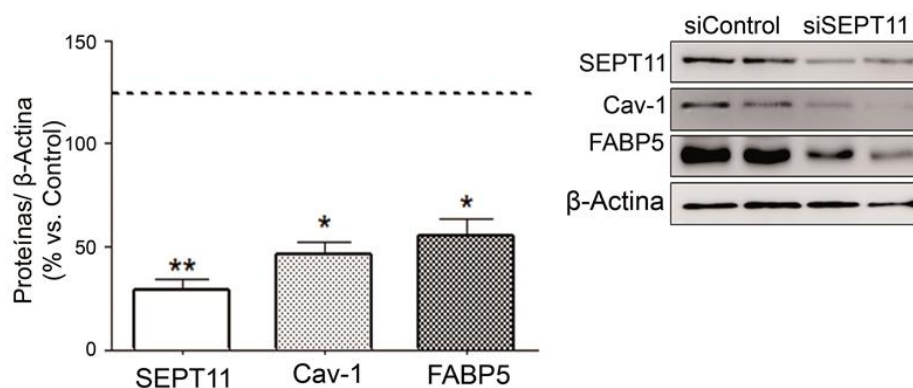


Figura 39: Efecto del silenciamiento de SEPT11 sobre la expresión proteica de CAV-1 y FABP5. Inmunoblots de extractos proteicos de células 3T3-L1 electroporadas con siRNA#1 específico para SEPT11 (siS11) o siRNA control (siC) utilizando un anticuerpo específico anti-SEPT11, anti-CAV-1 y anti-FAB5. Se utilizó la β -actina como control de carga. Los resultados se representan como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes y los datos fueron referidos al siRNA control (100%). $**p < 0.01$ vs. siRNA control.

4.7.2. Análisis de las vías de señalización de la insulina en células silenciadas para SEPT11

Teniendo en cuenta nuestros resultados sobre la localización de SEPT11 en caveolas y su interacción con CAV-1, investigamos la relación funcional de nuestra proteína en estudio con dichas estructuras analizando en primer lugar la repercusión del silenciamiento de SEPT11 sobre la activación de distintas vías de señalización de la insulina que se han asociado a caveolas (Pilch et al., 2011; Strålfors et al., 2012; Méndez-Giménez et al., 2015). Para ello, tres días después de la electroporación, los cultivos se expusieron a insulina 100 nmol/L durante 5 min tras lo cual se recogieron los extractos celulares. En éstos, se determinó la actividad de los mediadores intracelulares de la acción de la insulina, Akt, ERK e IRS, mediante la cuantificación del ratio de las correspondientes formas fosforiladas en relación a su proteína total. Como se puede observar en la Figura 40A, la única proteína cuyo contenido total varió en adipocitos silenciados para SEPT11 fue IRS. Al establecer el ratio entre la cantidad de proteína fosforilada y la cantidad de proteína total en respuesta a la insulina (Figura 40C), pudimos observar que el silenciamiento de SEPT11 redujo el ratio pAkt/Akt en un 83,61% ($p < 0,01$) respecto a los valores obtenidos en los cultivos control. Por su parte, no se observaron diferencias ni en la forma fosforilada de ERK ni en el ratio pERK/ERK, mientras que el ratio pIRS/IRS disminuyó aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (Figura 40C).

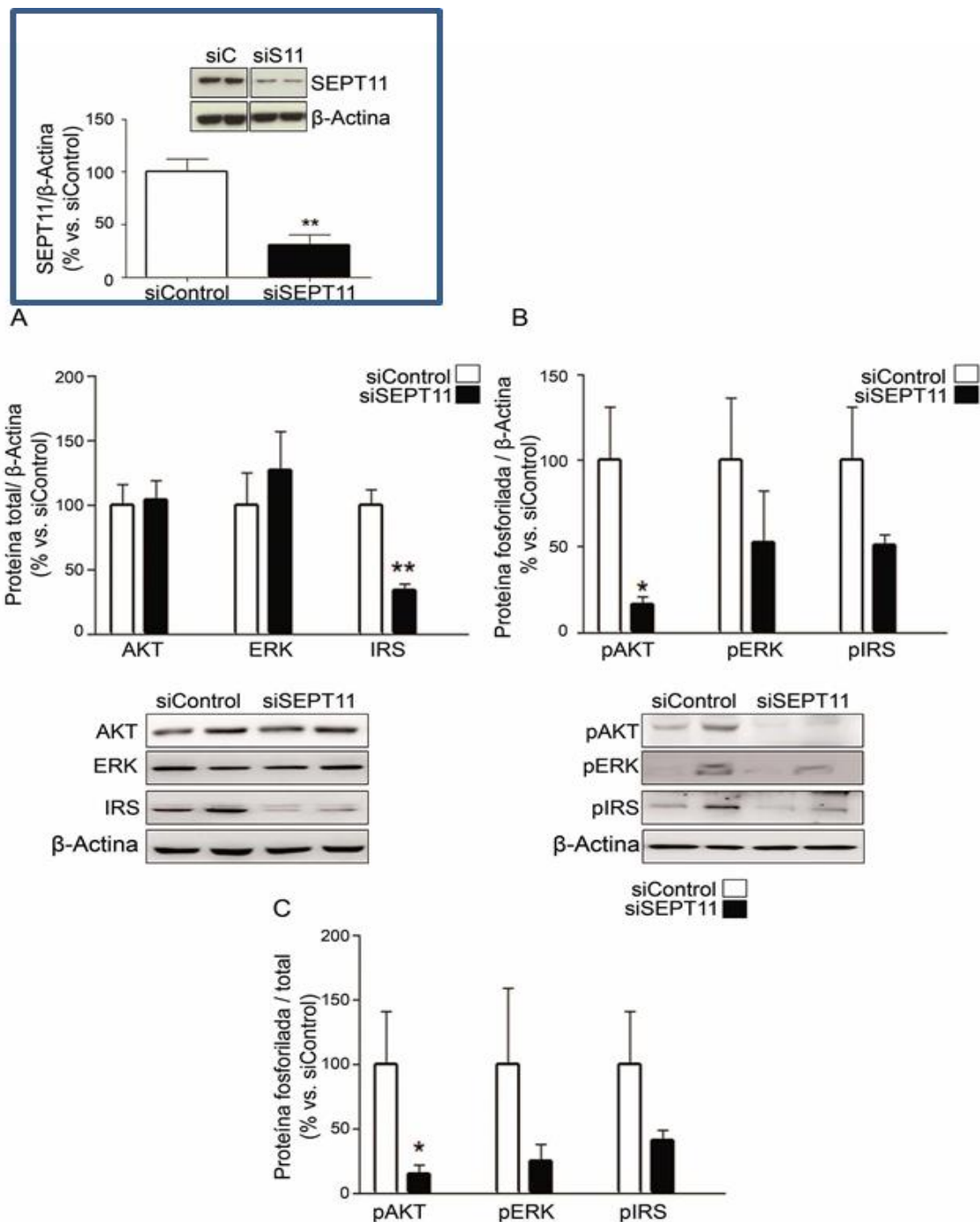


Figura 40: Cuantificación de vías de señalización de la insulina en células 3T3-L1 silenciadas para SEPT11. Se analizó la expresión proteica mediante *western blotting* y anticuerpos específicos para Akt, ERK e IRS (A) y sus correspondientes formas fosforiladas (B) y se calcularon los ratios forma fosforilada/proteína total (C) en células electroporadas con siRNA control o con siRNA#1 específico para SEPT11 (siSEPT11). A los 3 días tras la electroporación, las células fueron tratadas con insulina 100 nmol/L durante 5 min. En el recuadro superior se muestra la cuantificación de los niveles de SEPT11 en los extractos celulares y un inmunoblot representativo de los experimentos realizados. Los datos representan la media \pm SEM de los valores absolutos, y fueron referidos a los valores obtenidos con el siRNA control (100%). Los resultados se obtuvieron a partir de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.8. Contribución de SEPT11 en los procesos de lipólisis y lipogénesis en adipocitos 3T3-L1

En conjunto, nuestros resultados sugerían que SEPT11 podría participar en la regulación del metabolismo lipídico de los adipocitos. Para investigar esta posibilidad, a continuación evaluamos las actividades lipogénica y lipolítica en células 3T3-L1 silenciadas y no silenciadas y a su vez tratadas con insulina (100 nmol/L) sola o con oleato (500 μ M) durante 18 h; en el caso de los cultivos expuestos a oleato, se añadió insulina (100 nmol/L) durante las últimas 4 h del cultivo. Al final de los tratamientos, determinamos la actividad lipogénica cuantificando la concentración de triglicéridos intracelulares (Figura 41A) y la lipólisis, mediante la cuantificación de la concentración de glicerol liberado al medio (Figura 41B).

Como se muestra en la Figura 41A, el tratamiento con insulina aumentó la lipogénesis basal de células no silenciadas en un 40% respecto al control. Por su parte, el tratamiento con oleato e insulina provocó un efecto lipogénico aún mayor. En el caso de las células silenciadas para SEPT11, se observó una disminución de la lipogénesis basal respecto a lo observado en células no silenciadas (Figura 41A). Además, en las células tratadas con el siRNA específico para SEPT11, tanto la insulina sola como la combinación de oleato con insulina provocaron aumentos de la lipogénesis significativamente inferiores a los inducidos en las células electroporadas con el siRNA control. El efecto inhibitor del silenciamiento de SEPT11 fue especialmente notable en los cultivos tratados con oleato e insulina, en los que la actividad lipogénica se redujo en un 31% respecto a lo observado en los cultivos no silenciados.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 41B, mientras que la insulina sola no modificó la lipólisis basal en células no silenciadas, el tratamiento con oleato e insulina provocó un ligero aumento (16,9%) en la liberación de glicerol al medio de cultivo con respecto a lo observado en condiciones basales. Bajo condiciones de silenciamiento de SEPT11, los niveles de glicerol liberado al medio fueron inferiores en las tres condiciones experimentales testadas (control, insulina u oleato + insulina). Como en el caso de la lipogénesis, el efecto inhibitor del silenciamiento de SEPT11 sobre la lipólisis fue más importante desde el punto de vista cuantitativo en los cultivos tratados con la combinación de oleato e insulina (Figura 41B). Estos resultados sugieren que la ausencia de SEPT11 afecta el control de la lipogénesis y lipólisis en adipocitos 3T3-L1.

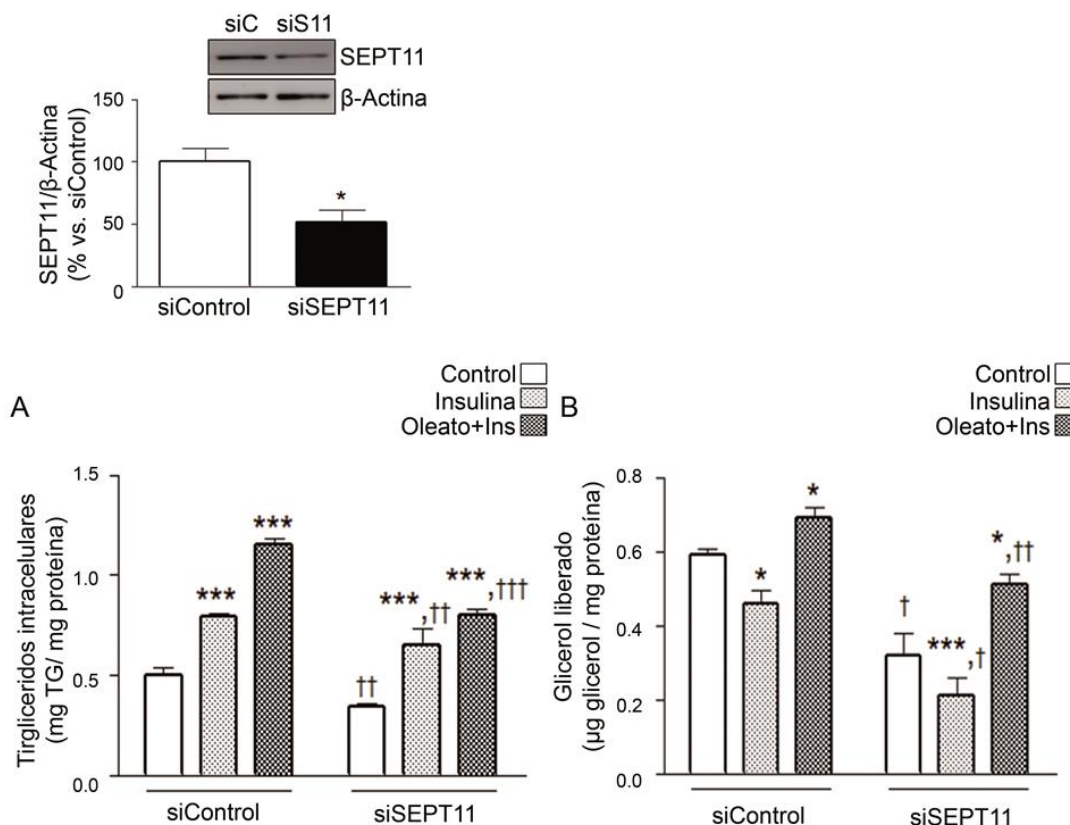


Figura 41: Efecto del silenciamiento de SEPT11 sobre lipogénesis (A) y lipólisis (B) en células 3T3-L1. El contenido intracelular de triglicéridos (A) y la cantidad de glicerol liberado al medio (B) se evaluaron en células electroporadas con siRNA control (siControl) o siRNA#1 específico para SEPT11 (siSEPT11) durante 72 horas y expuestas a continuación a insulina (100 nmol/L) sola o a oleato e insulina (500 μ M y 100 nmol/L, respectivamente). En el recuadro superior se muestra la cuantificación de los niveles de SEPT11 en los extractos celulares y un inmunoblot representativo de los experimentos realizados. Los datos representan la media \pm SEM de los valores absolutos referidos a la cantidad de proteína en los extractos celulares y corresponden a al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. siRNA control; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ vs. células siRNA control tratadas con el mismo estímulo.

4.9. Caracterización de SEPT11 en tejido adiposo humano

Además de los estudios realizados con la línea celular murina 3T3-L1, en esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo una caracterización de SEPT11 en tejido adiposo humano y en adipocitos maduros humanos, bien aislados directamente a partir de muestras de tejido adiposo o bien diferenciados *in vitro* a partir de la fracción de estroma vascular conseguida de dichas muestras. En primer lugar, analizamos la expresión de SEPT11 en muestras pareadas de tejido adiposo visceral (omental) y subcutáneo de individuos delgados así como de sujeto obesos normo-glucémicos (NG) u obesos con tolerancia a glucosa alterada (IGT) y/o diabetes tipo 2 (DT2). Las características clínicas de los sujetos incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 15.

En concreto, éste análisis reveló que SEPT11 se expresa en los dos depósitos grasos, omental y subcutáneo, teniendo éste último los niveles de transcripción general más altos ($1,0 \pm 0,0$ vs. $5,7 \pm 1,3$ u.a., $p < 0,0001$). Tanto el tejido adiposo omental (Figuras 42A y 42B) como el subcutáneo

(Figuras 42C y 42D) de individuos obesos contenían niveles de expresión génica y proteica de SEPT11 significativamente superiores a los observados en individuos delgados, no observándose diferencias estadísticas entre los dos subgrupos de obesos (NG vs. IGT+DT2) para ninguno de los dos depósitos.

Curiosamente, los niveles proteicos de SEPT11 en el tejido adiposo omental se correlacionaron positivamente con marcadores de adiposidad, incluyendo el IMC ($r = 0,45$; $p = 0,010$), % de grasa corporal ($r = 0,47$; $p = 0,010$) y leptina en plasma ($r = 0,38$; $p = 0,049$). Por su parte, la expresión proteica de SEPT11 en grasa subcutánea correlacionó positivamente con parámetros del metabolismo de la glucosa y la función hepática, como la glucemia ($r = 0,80$; $p < 0,001$), insulinemia ($r = 0,44$; $p = 0,030$), HOMA ($r = 0,69$; $p < 0,001$), QUICKI ($r = -0,47$, $p = 0,018$), triglicéridos ($r = 0,82$; $p < 0,001$) y la transaminasa γ -GT ($r = 0,71$; $p < 0,001$), después de realizar ajuste por edad y sexo.

Tabla 15: Características bioquímicas y antropométricas de los sujetos incluidos en la Cohorte2.

	<i>Delgados NG</i>	<i>Obesos NG</i>	<i>Obesos IGT+DT2</i>	<i>P</i>
N	10	24	30	-
Género (hombre/mujer)	3/7	12/12	14/16	0.554
Edad (años)	47 ± 5	40 ± 3	44 ± 1	0.247
Altura (m)	1.64 ± 0.01	1.69 ± 0.01	1.67 ± 0.01	0.323
Peso (kg)	62 ± 4	135 ± 5 ^a	132 ± 4 ^a	<0.0001
IMC (kg/m²)	22.3 ± 0.8	47.4 ± 1.4 ^a	47.6 ± 1.7 ^a	<0.001
Grasa corporal (%)	26.5 ± 2.8	51.6 ± 1.4 ^a	51.6 ± 1.3 ^a	<0.001
Cintura (cm)	63 ± 3	129 ± 5	128 ± 9	0.001
Glucosa (mmol/L)	4.82 ± 0.22	4.94 ± 0.01	6.55 ± 0.38 ^{a,b}	0.002
Glucosa 2-h OGTT (mmol/L)	-	6.49 ± 0.28	10.38 ± 0.83 ^b	<0.0001
Insulina (pmol/L)	49.2 ± 10.2	127.8 ± 19.2 ^a	111.0 ± 13.2 ^a	0.036
Insulina 2-h OGTT (pmol/L)	-	591.6 ± 109.2	516.6 ± 49.8	0.495
HOMA	1.75 ± 0.35	4.86 ± 0.83 ^a	5.79 ± 0.98 ^a	0.027
QUICKI	0.35 ± 0.01	0.31 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.06 ^a	0.030
Triglicéridos (mmol/L)	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.4	0.292
Colesterol (mmol/L)	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.2	0.912
LDLc (mmol/L)	3.1 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	0.771
HDLc (mmol/L)	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	0.027
CRP (mg/L)	1.8 ± 0.4	7.7 ± 1.4 ^a	11.2 ± 3.1	0.006
Ácido úrico (mmol/L)	1.48 ± 0.17	2.24 ± 0.13 ^a	2.41 ± 0.10 ^a	0.003
Leptina (ng/mL)	7.8 ± 1.5	46.1 ± 5.9 ^a	51.2 ± 6.8 ^a	0.018
AST (IU/L)	13 ± 3	16 ± 1	16 ± 1	0.254
ALT (IU/L)	13 ± 3	30 ± 5 ^a	29 ± 3 ^a	0.039
Fosfatasa alcalina (IU/L)	93 ± 12	113 ± 7	113 ± 7	0.576
γ-GT (IU/L)	9 ± 2	21 ± 2	27 ± 6	0.058

NG, normoglucemia; IGT, toletancia a la glucosa alterada; DT2, diabetes tipo 2; IMC, índice de masa corporal; HOMA, evaluación del modelo homeostático; QUICKI, índice cuantitativo para verificar sensibilidad a la insulina; HDLc, lipoproteínas de alta densidad; LDLc: lipoproteínas de baja densidad AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; γ -GT, γ -glutamilttransferasa; CRP, proteína C reactiva. Las diferencias entre grupos fueron analizadas con ANOVA de una vía, seguido por el test de Scheffé's o el test χ^2 , según fuese apropiado. ^a $p < 0.05$ vs. *delgados*; ^b $p < 0.05$ vs. *obesos NG*.

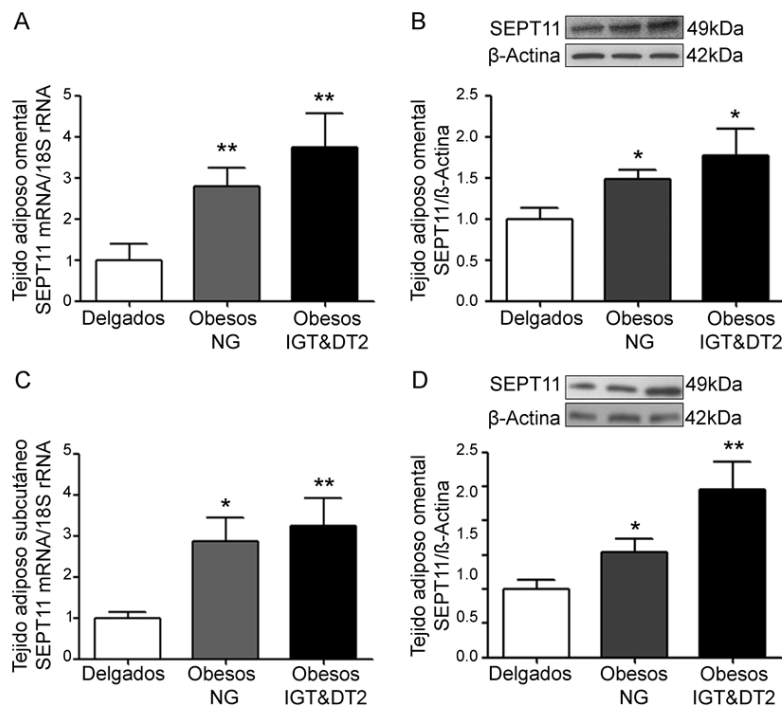


Figura 42: Expresión de SEPT11 en tejido adiposo omental y subcutáneo humano. Los gráficos de barras muestran los niveles de ARNm y proteína de SEPT11 en muestras pareadas de tejido adiposo omental (**A y B, respectivamente**) y en tejido adiposo subcutáneo (**C y D, respectivamente**) obtenidos a partir de individuos delgados, obesos normo-glucémicos (NG) y obesos con tolerancia a glucosa alterada y/o diabetes tipo 2 (IGT&DT2). Los valores en los individuos delgados se asumieron como 1 (valor de expresión relativa, 1). En la parte superior de las figuras se muestra un inmunoblot representativo de cada tejido (panel derecho). Los datos representan la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Scheffe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. individuos delgados NG.

Para identificar el tipo celular responsable de la producción de SEPT11, se evaluó la distribución de esta proteína en secciones de tejido adiposo omental y subcutáneo mediante inmunohistoquímica. Este estudio reveló que la inmunotinción para SEPT11 se asocia predominantemente a los adipocitos maduros, observándose un nivel de expresión significativamente menor en la fracción de estroma vascular de ambos depósitos de grasa (omental y subcutánea) (Figuras 43A y 43B).

Posteriormente, cuantificamos mediante PCR en tiempo real la expresión de SEPT11 en muestras de adipocitos maduros humanos aislados y en muestras de fracción de estroma vascular (FEV) aislados a partir de tejido adiposo omental de individuos obesos. En consonancia con los resultados de inmunohistoquímica, la cuantificación de ARNm de SEPT11 mostró que éste se expresa principalmente en los adipocitos, con un pequeño nivel de expresión en FEV (Figura 44A). Al realizar el análisis por grupos de sujetos, no encontramos diferencias en niveles de transcripción de SEPT11 en adipocitos y FEV de tejido adiposo omental entre individuos obesos NG y sujetos obesos insulino-resistentes (IGT&DT2) (Figura 44B).

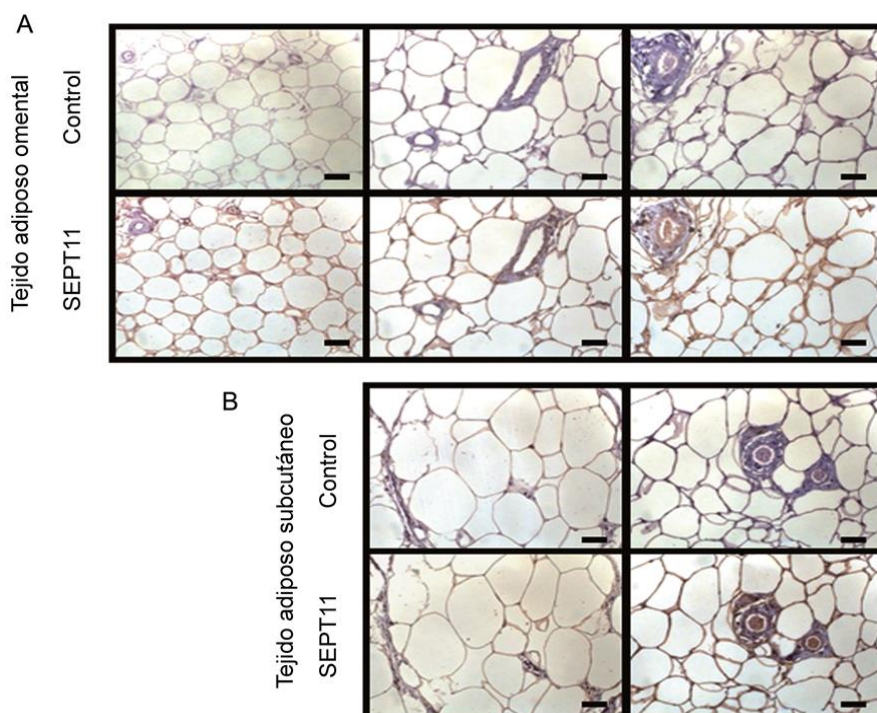


Figura 43: Detección inmunohistoquímica de SEPT11 en secciones de tejido adiposo omental (**A**) y subcutáneo (**B**) de sujetos delgados (paneles de la izquierda), obesos NG (paneles del medio) y obesos IGT&DT2 (paneles de la derecha) (magnificación 200X, barra de escala=50 μ m). A diferencia de los observados en las secciones incubadas en presencia de anticuerpo anti-SEPT11 (SEPT11), no se encontró inmunoreactividad en las no expuestas a dicho anticuerpo (control; paneles superiores). Se muestra una imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes por grupo de sujetos.

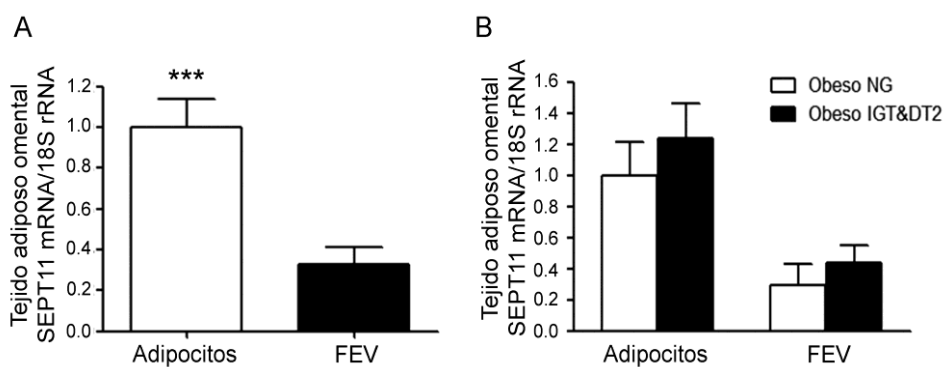


Figura 44: (A) Comparación de los niveles de transcripción de SEPT11 en adipocitos maduros ($n = 17$) y FEV ($n = 15$) aislados a partir de muestras frescas de tejido adiposo omental de individuos obesos. (B) Expresión diferencial de ARNm de SEPT11 en adipocitos y FEV de tejido adiposo omental en individuos obesos NG y obesos con intolerancia a glucosa y/o diabetes tipo 2 (IGT&DT2). Los datos se representan como la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por t-test o por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Scheffe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. sujetos NG o adipocitos maduros.

4.9.1. Regulación de la expresión de SEPT11 en adipocitos de tejido adiposo omental humano

Teniendo en cuenta el alto contenido de SEPT11 en el tejido adiposo omental y la relevancia metabólica de este depósito graso (Rodríguez et al., 2007), realizamos experimentos de regulación génica y proteica en cultivos de adipocitos diferenciados *in vitro* a partir de la FEV de grasa omental de individuos obesos NG. Concretamente, se analizó la posible regulación de esta septina en respuesta

a la exposición frente a factores extracelulares conocidos por su acción lipogénica, lipolítica o pro-inflamatoria mediante el uso de técnicas de PCR en tiempo real y *western blotting*.

Con respecto a los factores lipogénicos, observamos que la administración de insulina durante 24 h aumentó tanto el nivel de ARNm como de proteína de SEPT11 en los adipocitos omentales de forma dosis-dependiente (Figuras 45A y 45B). Por el contrario, la ghrelina acilada disminuyó la expresión génica de forma significativa, y el nivel de proteína de forma cuantitativa, aunque solamente a la mayor concentración testada (1,000 pmol/L), mientras que desacil-ghrelina (10, 100 y 1,000 pmol/L) no provocó ningún efecto sobre el nivel de transcritos o proteína de SEPT11 (Figuras 45A y 45B).

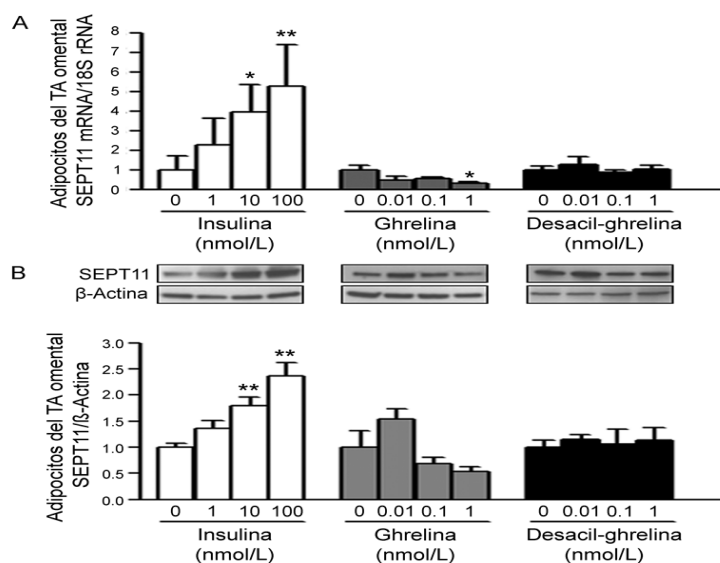


Figura 45: Efecto de la exposición de adipocitos humanos omentales diferenciados *in vitro* a los factores lipogénicos insulina (paneles de la izquierda), ghrelina (paneles centrales), y desacil-ghrelina (paneles de la derecha) sobre la expresión génica (A) y proteica (B) de SEPT11. En la parte superior de las figuras se muestra un inmunoblot representativo para cada factor. Los datos se representan como la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por t-test o por ANOVA de una vía seguido por el test de Dunnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. adipocitos no estimulados (valor de referencia 1).

Con respecto al efecto de factores lipolíticos, el agonista β -adrenérgico, isoproterenol, disminuyó el contenido de ARNm y proteína de SEPT11 en adipocitos de grasa omental, mientras que el tratamiento con ANP redujo ambos parámetros, aunque no de forma significativa ($p = 0,123$ y $p = 0,149$ para ARNm y proteína de SEPT11, respectivamente) (Figuras 46A y 46B). Por otra parte, la leptina no modificó la expresión de SEPT11 en adipocitos del depósito graso omental humano (Figuras 46A y 46B).

Finalmente, está claramente establecido que la iniciación de procesos de apoptosis por factores pro-inflamatorios se asocia con cambios y/o reducciones significativas en proteínas del citoesqueleto (Pellegrinelli et al., 2014; Fung et al., 2014). Por ello, determinamos el impacto del factor de necrosis tumoral (TNF- α ; 1, 10 y 100 ng/mL), lipopolisacárido (LPS; 10, 100 y 1,000 ng/mL) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β ; 0, 0.1, 1 y 10 ng/mL) sobre la expresión de SEPT11 en

adipocitos de tejido adiposo omental humano. Concretamente, observamos una disminución en los niveles de ARNm ($p = 0,031$; Figura 47A) y proteína ($p = 0,011$; Figura 47B) de SEPT11 tras el estímulo con TNF- α . Observamos un comportamiento similar en respuesta al tratamiento con LPS, mientras que la exposición a TGF- β no afectó los niveles de transcrito ($p = 0,080$) y proteína ($p = 0,607$) de SEPT11 (Figuras 47A y 47B).

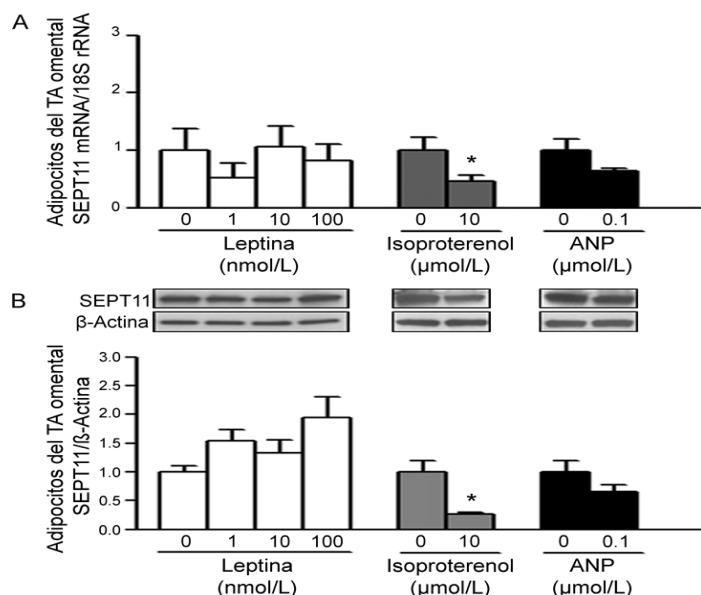


Figura 46: Efecto de la exposición de adipocitos humanos omentales diferenciados *in vitro* a los factores lipolíticos leptina (paneles de la izquierda), isoproterenol (paneles centrales), y péptido natriurético atrial (ANP) (paneles de la derecha) sobre la expresión génica (A) y proteica (B) de SEPT11. En la parte superior de las figuras se muestra un inmunoblot representativo para cada factor. Los datos se representan como la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por t-test o por ANOVA de una vía seguido por el test de Dunnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. adipocitos no estimulados (valor de referencia 1).

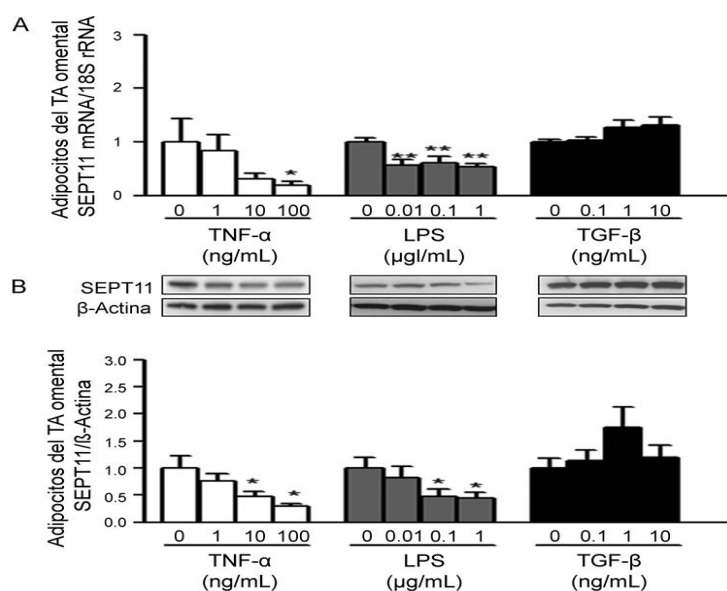


Figura 47: Efecto de la exposición de adipocitos humanos omentales diferenciados *in vitro* a los factores proinflamatorios TNF- α (paneles de la izquierda), LPS (paneles centrales), o TGF- β (paneles de la derecha) sobre la expresión génica (A) y proteica (B) de SEPT11. En la parte superior de las figuras se muestra un inmunoblot representativo para cada factor. Los datos se representan como la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por t-test o por ANOVA de una vía seguido por el test de Dunnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, vs. adipocitos no estimulados (valor de referencia 1).

4.9.2. Expresión de SEPT2 y SEPT9 en tejido adiposo humano bajo diferentes condiciones metabólicas

Además de evaluar SEPT11, y sobre la base de los resultados obtenidos sobre otros miembros de la familia de las septinas, SEPT2 y SEPT9, evaluamos la expresión génica de ambas septinas por PCR en tiempo real en las mismas muestras pareadas de tejido adiposo omental y subcutáneo en las que se midió previamente la expresión génica y proteica de SEPT11. De esta forma, observamos que SEPT2 mostró niveles de expresión similares tanto en tejido adiposo omental ($p=0,913$; Figura 48A) como tejido adiposo subcutáneo ($p=0,966$; Figura 48B) de los tres grupos de sujetos. Curiosamente, el ARNm de SEPT2 en el tejido adiposo omental se asoció positivamente con la insulinemia ($r=0,34$; $p=0,027$), correlación que se mantuvo después de hacer un ajuste por el porcentaje de grasa corporal, mientras que la expresión génica de SEPT2 en el tejido adiposo subcutáneo se correlacionó positivamente con las de SEPT11 ($r=0,39$; $p=0,005$) y SEPT9 ($r=0,61$, $p<0,0001$). Después del ajuste por porcentaje de grasa corporal, sólo se mantuvo la correlación positiva con SEPT9 ($r=0,42$; $p=0,005$).

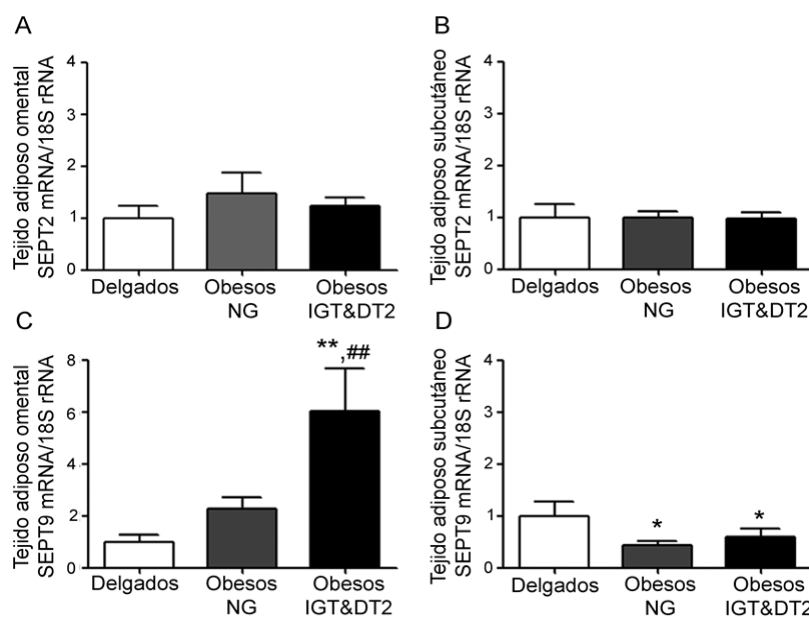


Figura 48: Expresión de SEPT2 y SEPT9 en tejido adiposo humano. Los gráficos representan la expresión génica de SEPT2 en tejido adiposo omental (A) y subcutáneo (B) (paneles de la parte superior) y la expresión génica de SEPT9 en tejido adiposo omental (C) y subcutáneo (D) (paneles de la parte inferior) de individuos delgados, obesos normo-glucémicos (NG) o de obesos con tolerancia a glucosa alterada y/o diabetes tipo 2 (IGT&DT2). Los valores en los individuos delgados se asumieron como 1 (valor de expresión relativa, 1). Los datos representan la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Scheffe. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs. individuos delgados NG. ##, $p<0,01$ vs. obesos NG.

Por otro lado, los niveles de expresión génica de SEPT9 en el tejido adiposo omental aumentaron en individuos obesos IGT&DT2 en comparación con los sujetos delgados NG y obesos NG (Figura 48C), mientras que los niveles de ARNm de SEPT9 en grasa subcutánea fueron menores en los dos grupos de obesos respecto a los individuos delgados (Figura 48D). Los transcritos de SEPT9 en el tejido omental correlacionaron positivamente con la expresión génica de SEPT11 ($r=$

0,50, $p = 0,005$) en este depósito graso, así como con la glucosa en plasma (2-h OGTT) ($r = 0,47$, $p = 0,004$). Estas correlaciones desaparecieron después del ajuste por porcentaje de grasa corporal.

4.9.3. Septinas y su relación con caveolas en tejido adiposo humano

Como en el caso de las células 3T3-L1, tuvimos la oportunidad de analizar la localización de SEPT11 en adipocitos maduros humanos, aislados a partir de muestras frescas de tejido adiposo subcutáneo, mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal. Como se muestra en la Figura 49, SEPT11 se distribuye en forma de anillos en la superficie celular de los adipocitos humanos. En estas localizaciones, la inmunoseñal para SEPT11 muestra un elevado grado de solapamiento con la generada por un anticuerpo anti-CAV-1, lo que demuestra la co-localización de ambas proteínas (Figura 49). No se detectó inmunorreacción en los ensayos cuando se omitieron los anticuerpos primarios o secundarios.

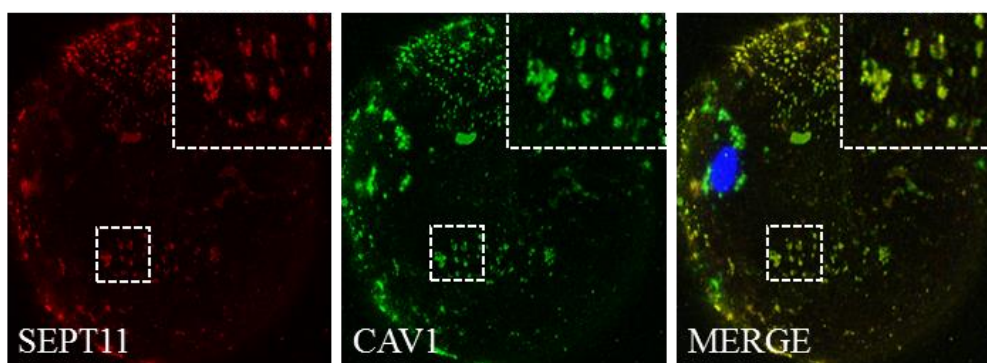


Figura 49: Imagen de microscopía confocal de un adipocito maduro humano inmunomarcado con anticuerpos específicos frente a SEPT11 (rojo) y CAV-1 (verde). La colocalización de las dos señales (figura de la derecha) se puede ver en amarillo (magnificación 1,000X). Se muestra una imagen representativa de los adipocitos maduros aislados a partir de al menos tres muestras diferentes de tejido adiposo subcutáneo.

Adicionalmente, evaluamos la correlación existente entre CAV-1 y las diferentes septinas en las muestras pareadas de tejido adiposo omental y subcutáneo procedentes de los tres grupos de sujetos (Tabla 15). Para ello, primero determinamos la expresión de CAV-1 mediante PCR en tiempo real. Como era de esperar (Catalán et al., 2008), los niveles de ARNm de CAV-1 en el depósito omental fueron superiores en individuos obesos que en individuos delgados, aunque no se encontraron diferencias entre obesos NG y obesos con IGT&DT2 (Figura 50A). Por su parte, en el tejido subcutáneo se observó una tendencia hacia un aumento en los niveles de transcripción de CAV-1 en el grupo de obesos (Figura 50B), aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,290$). Al determinar la correlación entre CAV-1 y las septinas observamos que la expresión de CAV-1 en el tejido adiposo omental correlacionó positivamente con las de SEPT11 ($r = 0,39$, $p = 0,006$) (Figura 51A) y SEPT 9 ($r = 0,48$, $p < 0,0001$) (Figura 51C), pero no con SEPT2 ($r = 0,08$, $p = 0,956$) (Figura 51B). En el depósito subcutáneo, la expresión de CAV-1 correlacionó positivamente con la de SEPT11 ($r = 0,41$, $p = 0,001$) (Figura 51D), SEPT2 ($r = 0,48$, $p < 0,0001$) (Figura 51E) y SEPT9 ($r = 0,39$, $p = 0,005$) (Figura 51F).

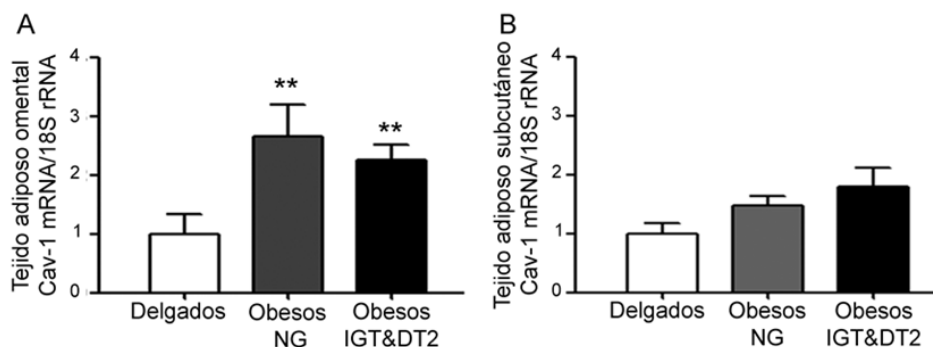


Figura 50: Expresión de CAV-1 en tejido adiposo omental (A) y subcutáneo (B) de individuos delgados, obesos normo-glucémicos (NG) o de obesos con tolerancia a glucosa alterada y/o diabetes tipo 2 (IGT&DT2). Los valores en los individuos delgados se asumieron como 1 (valor de expresión relativa, 1). Los datos representan la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Scheffe. ** $p < 0,01$ vs. individuos delgados NG.

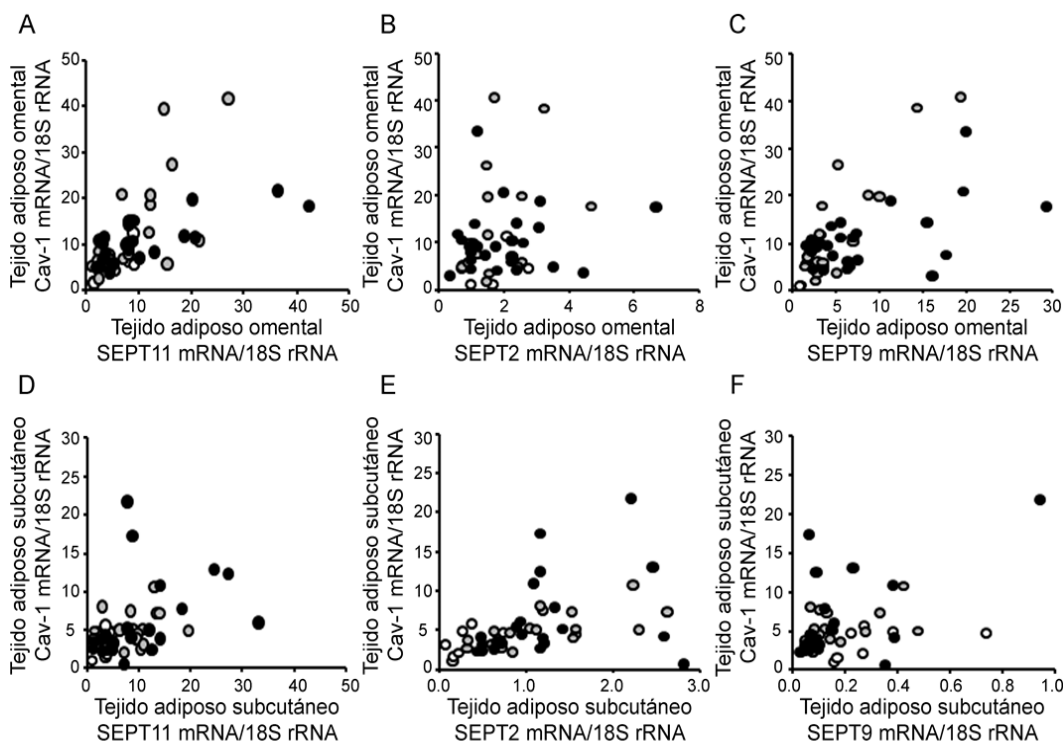


Figura 51: Correlación entre la expresión de CAV-1 (A) y SEPT11, (B) SEPT2 y (C) SEPT9 en tejido adiposo omental y subcutáneo (D, E y F, respectivamente) de individuos delgados NG (círculos en blanco), obesos NG (círculos en gris) y obesos IGT&DT2 (círculos en negro). El coeficiente de correlación se obtuvo con el test de Pearson. Los datos representan la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Scheffe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. individuos delgados NG.

4.9.4. Efecto de la exposición a oleato sobre SEPT11 y CAV-1 en adipocitos humanos

Teniendo en cuenta el cambio de distribución de SEPT11 tras el tratamiento con oleato en células 3T3-L1, evaluamos el efecto de este ácido graso sobre la distribución de SEPT11 y CAV-1 en adipocitos humanos diferenciados *in vitro* (día 6 de diferenciación) de los dos depósitos grasos (tejido adiposo subcutáneo y omental). Para ello, las células se expusieron a medio solo o conteniendo oleato 500 μ M durante 18h y, a continuación, se realizó inmunocitoquímica de tinción doble específica para

SEPT11 y CAV-1. En la Figura 52 se puede observar que, mientras que ambas señales se localizan fundamentalmente en la superficie de los adipocitos en los cultivos control, el tratamiento con oleato produjo la translocación de SEPT11 y CAV-1 hacia las gotas lipídicas.

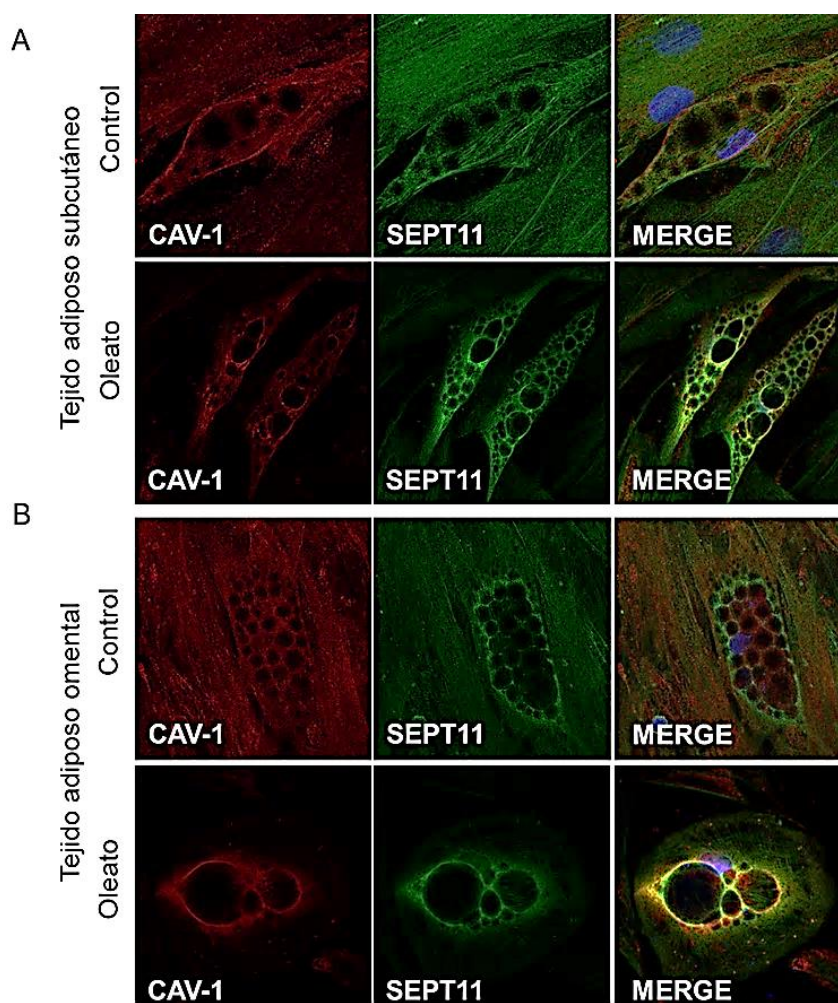


Figura 52: Efecto del oleato sobre la distribución de SEPT11 y CAV-1 en adipocitos diferenciados *in vitro* de tejido adiposo subcutáneo (A) y tejido adiposo omental (B) humano. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos humanos inmunoteñidos para CAV-1 (Rojo) y SEPT11 (Verde) cultivados en medio solo (Control) o conteniendo oleato (500 μ M). La co-localización de las dos proteínas se puede observar en el panel derecho (MERGE).

4.9.5. Análisis de la expresión génica de FABP5 en tejido adiposo humano

Por otra parte, teniendo en cuenta la interacción de SEPT11 con FABP5 y los cambios de distribución y expresión proteica tras el tratamiento de los adipocitos 3T3-L1 con oleato, estudiamos la expresión génica de FABP5 en tejido adiposo subcutáneo y omental de individuos delgados y obesos. En la Figura 53A se puede observar que los individuos obesos, bien NG o IGT&DT2, presentan una disminución significativa del nivel de transcritos de FABP5 en tejido adiposo omental ($p < 0.05$), pero no en tejido adiposo subcutáneo (Figura 53B), respecto a lo observado en individuos delgados.

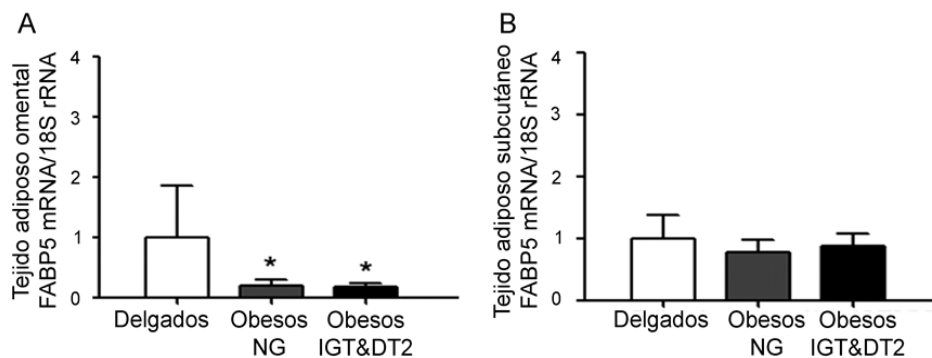


Figura 53: Niveles de expresión génica de FABP5 en tejido adiposo omental (**A**) y subcutáneo (**B**) obtenidos a partir de individuos delgados, obesos normo-glucémicos (NG) y de obesos con tolerancia a glucosa alterada y/o diabetes tipo 2 (IGT y DT2). Los valores en los individuos delgados se asumieron como 1 (valor de expresión relativa, 1). Los datos representan la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Scheffe. ** $p < 0,01$ vs. individuos delgados NG.

4.10. Distribución de SEPT11 y su asociación con F-Actina y CAV-1 durante la diferenciación de los adipocitos humanos

De manera complementaria a los estudios realizados en cuanto a colocalización de SEPT11 con F-actina en células 3T3-L1 (Ver apartado de resultado 4.2.4), decidimos evaluar la posible interacción entre estas proteínas en adipocitos humanos al inicio (día 3), en estadios avanzados (día 10) de diferenciación y en adipocitos maduros. Concretamente, realizamos inmunotinción doble de adipocitos humanos a día 3 con anti-SEPT11 y faloidina (Figura 54A), inmunotinción triple en adipocitos humanos a día 10 de diferenciación usando anticuerpos específicos para SEPT11, CAV-1 y faloidina (Figura 54B) e inmunotinción doble de adipocitos maduros usando anti-SEPT11 y faloidina (Figura 54C). Como se muestra en la Figura 54, SEPT11 muestra una distribución en forma de filamentos en adipocitos no diferenciados (día 3), mientras que, cuando contienen gotas lipídicas (día 10), adquiere en parte una distribución en forma de anillos, estructura que se mantiene en los adipocitos maduros. Se puede observar el alto grado de co-localización entre SEPT11 y faloidina a día 3 de diferenciación, mientras que, a día 10 de diferenciación, SEPT11 colocaliza con faloidina en las zonas donde aún se encuentra en forma fibrilar y con CAV-1 en donde presenta forma de anillo, en adipocitos maduros, SEPT11 continúa asociándose a la faloidina en algunas zonas.

Para profundizar en la relación de SEPT11 con el citoesqueleto de actina, realizamos experimentos de localización en células tratadas con latrunculina A (agente inhibidor de la polimerización de la actina) (Figura 55A y 55B). Como se puede observar en la Figura 55A, en adipocitos diferenciados a día 3 que fueron tratados con latrunculina, SEPT11 ya no se encuentra formando filamentos sino anillos que no colocalizan con faloidina. Por otro lado, a día 10 de diferenciación, SEPT11 mantiene su distribución en anillos en la superficie celular de los adipocitos de tejido adiposo subcutáneo y omental (Figura 55B). En conjunto, estos resultados indican que la conformación de SEPT11 en fibras a estadios tempranos de diferenciación es dependiente de la polimerización de la actina.

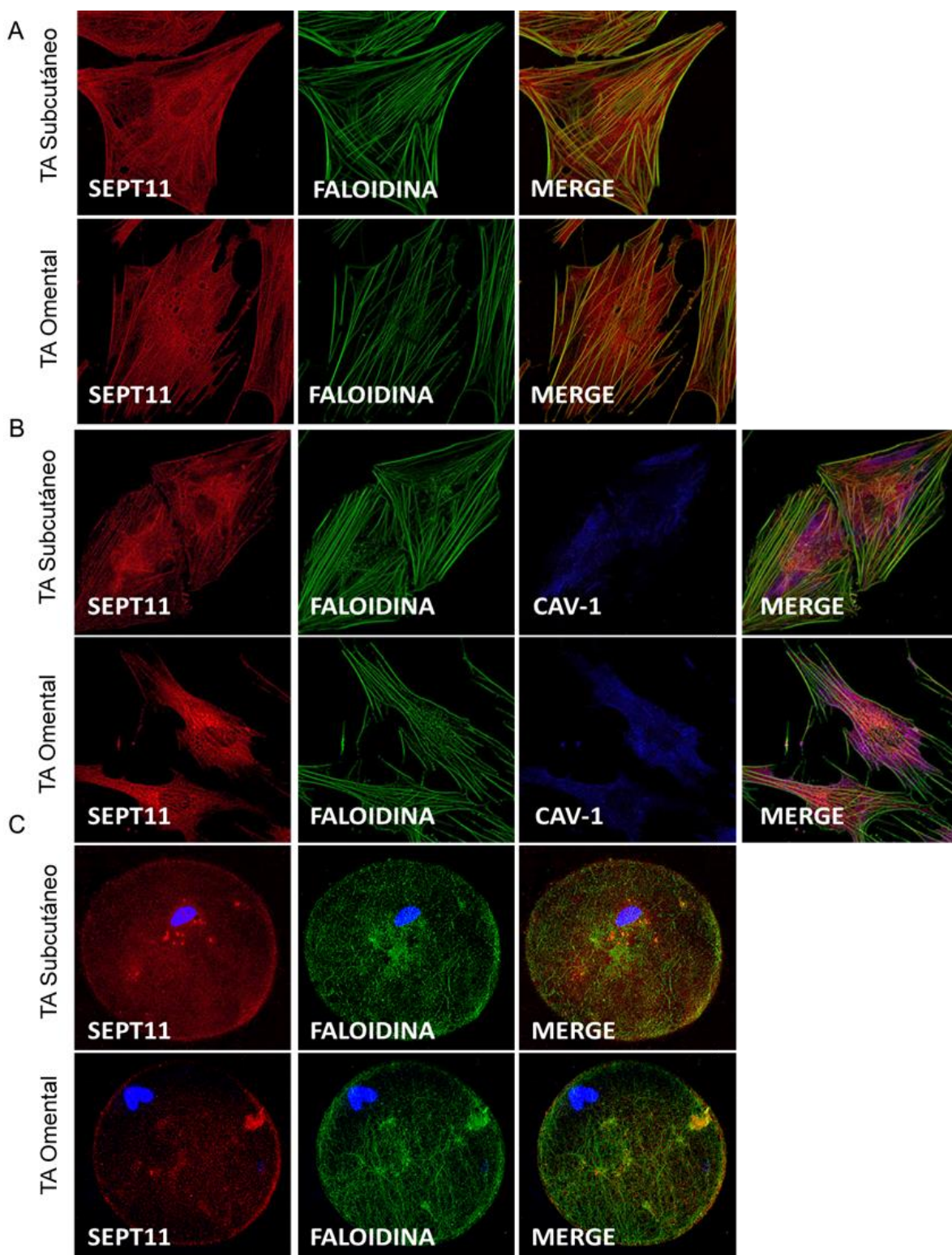


Figura 54: Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos humanos de tejido adiposo omental y subcutáneo inmunoteñidos para SEPT11 (rojo) y marcados con faloidina (verde) a día 3 de diferenciación (**A**), inmunoteñidos para SEPT11 (rojo) y CAV-1 (azul) y marcados con faloidina (verde) a día 10 de diferenciación (**B**) o adipocitos maduros marcados con faloidina (verde) y con SEPT11 (rojo) (**C**). La colocalización de las señales se puede ver en los paneles derechos (MERGE). Se muestran imágenes representativas de adipocitos aislados a partir de al menos tres muestras independientes de tejido adiposo subcutáneo y omental.

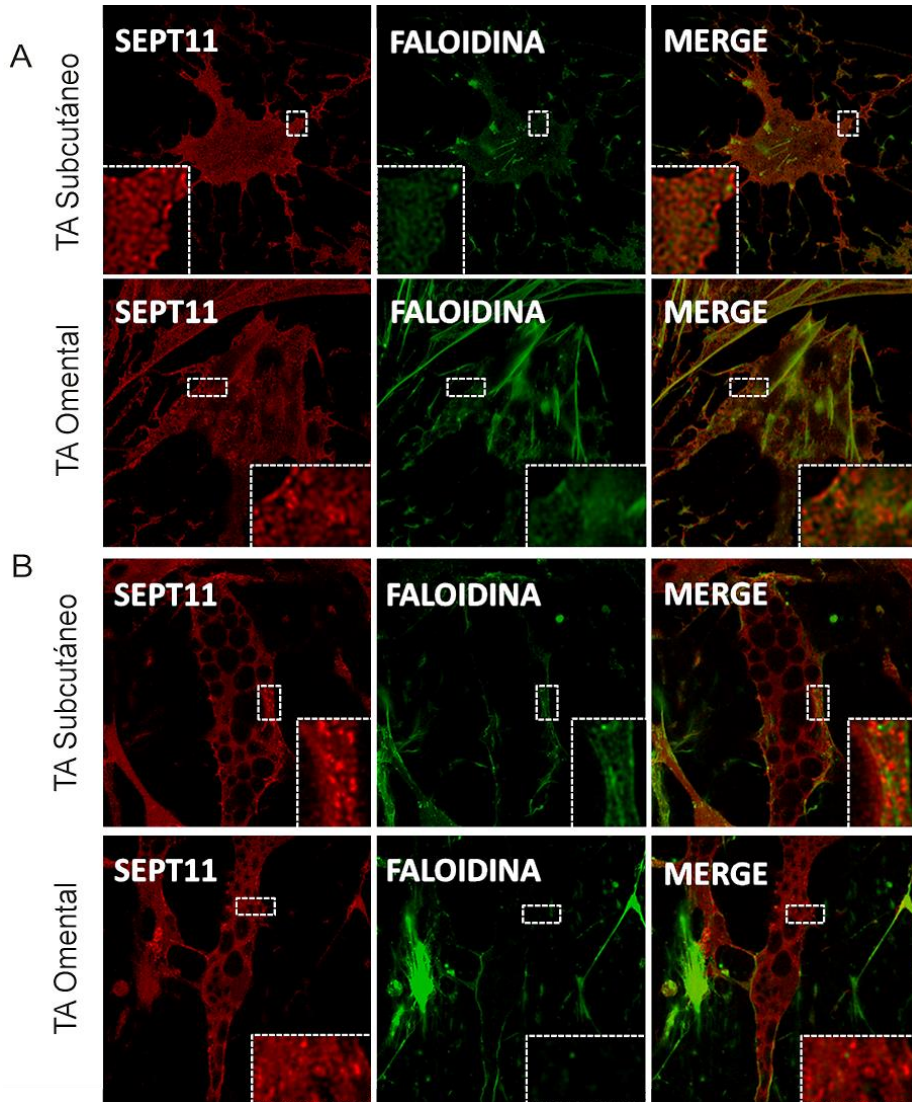


Figura 55: Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos de tejido adiposo omental y subcutáneo humano a día 3 de diferenciación (*A*) y a día 10 de diferenciación (*B*), tratados con latrunculina A, inmunoteñidos para SEPT11 (rojo) y marcados con faloidina (verde). Imagen representativa de células obtenidas a partir de al menos tres muestras de tejido adiposo independientes.

5. Discusión

5.1. Los efectos de la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica en el tejido adiposo de mujeres con obesidad mórbida depende del estado metabólico inicial.

En este trabajo se muestra el primer estudio de proteómica comparativa realizado en TASC obtenido de mujeres con obesidad mórbida durante la intervención de CB (Pre) y aproximadamente 1 año después (Post) de la misma. Este estudio prospectivo indica que, además de un perfil más favorable de adipocinas y la reducción del estado inflamatorio, la pérdida de peso producida por la cirugía produce importantes ajustes tanto en la actividad metabólica, como en la capacidad oxidativa, la actividad mitocondrial, la organización del citoesqueleto y la capacidad angiogénica del TASC. Nuestros resultados también sugieren que la remodelación del proteoma del TA en respuesta a la pérdida de peso depende en gran medida del estado metabólico (MUO o MHO) de los individuos antes de la CB.

Se han publicado varios estudios del TA, sobre todo de transcriptómica (Dankel et al., 2010; Henegar et al., 2008; Klimcakova et al., 2011; del Pozo et al., 2011) y, ocasionalmente, de proteómica (Perez-Perez et al., 2012) que demuestran que la obesidad mórbida conlleva a una reducción en la expresión de genes asociados a procesos metabólicos. A su vez, estudios de expresión génica global del TA han demostrado un aumento de la expresión de genes incluidos en vías relacionadas con el metabolismo energético después de la pérdida de peso inducida por la CB (Dharuri et al., 2014; Dankel et al., 2010; Henegar et al., 2008).

En nuestro estudio de TASC de pacientes NG e IR, observamos un aumento Post-CB en el contenido de tres proteínas relacionadas con la glucólisis/gluconeogénesis [fosfoglucomutasa 1 (PGM1), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial (PCKGM) y dihidrolipoamida dehidrogenasa (DLDH)], mientras que hubo una disminución de la uridililtransferasa glucosa-1-fosfato (UGPA). Estos resultados en conjunto sugieren que la glucosa-1-fosfato, en lugar de ser empleada para la conversión a UDP-glucosa para la síntesis de glucógeno (por UGPA), se convierte en glucosa-6-fosfato (por PGM1), que podría entrar así en la vía glucolítica y suministrar energía a través del ciclo de Krebs (por DLDH). La glucosa también puede proporcionar intermediarios para otras rutas, como por ejemplo NADPH para la síntesis de ácidos grasos (vía oxidación de la glucosa-6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato) o glicerol-3-fosfato para la esterificación de los ácidos grasos. Curiosamente, la enzima PCKGM, que se ha demostrado que contribuye hasta el 40% del *pool* de fosfoenolpiruvato citosólico (Stark et al., 2009), podría también proporcionar el glicerol-3-fosfato necesario para la síntesis de triglicéridos (Reshef et al., 2003).

En conjunto, estos resultados añaden nueva información sobre las rutas bioquímicas que pueden ayudar a mejorar la utilización de la glucosa y el flujo de los triglicéridos en el TA de sujetos obesos después de la CB. Nuestros resultados están además en línea con estudios previos en los que se demuestra que el metabolismo de la glucosa mediado por la insulina mejora en sujetos obesos un año

después de la CB, intervención que también aumenta la tasa de lipólisis (Camastra et al., 2011). Así mismo, se ha demostrado que el sobrepeso y la obesidad están asociados con una reducción en la movilización de los triglicéridos en el TASC de humanos (Ryden et al., 2013, Arner et al., 2011), lo que se ha propuesto que conduce a la acumulación de ácidos grasos en el hígado y al aumento de los niveles circulantes de triglicéridos (de Graaf et al., 2002). Nuestros hallazgos proteómicos, junto con la reducción de los triglicéridos plasmáticos observada tras la CB apoyan la idea de que la reorganización metabólica del TASC inducida por la CB, contribuye a mejorar el perfil de lípidos circulantes en los individuos obesos un año tras la intervención.

Además de estrés metabólico, el TA de los sujetos obesos sufre otros procesos de estrés celular, tales como estrés oxidativo, estrés del RE e inflamación (Matsuda y Shimomura, 2013). El estudio 2D-DIGE aquí presentado, reveló que la intervención de CB aumentó la expresión de dos marcadores de daño oxidativo y defensa antioxidante en el TASC de mujeres obesas, independientemente de su estado metabólico inicial (NG o IR): la transferrina, que previene la oxidación del hierro por H_2O_2 y la formación de radicales libres (MacKenzie et al., 2008) y la catalasa, una enzima fundamental en la protección celular frente a los efectos tóxicos del H_2O_2 (Goyal y Basak, 2010). Estos hallazgos se correlacionan con los resultados obtenidos por Moreno-Navarrete et al (2014), quienes también observaron un aumento de la expresión génica de la transferrina en el TASC de individuos obesos inducido por la pérdida de peso tras la CB. En conjunto, estos hallazgos indican que se produce una mejoría en las defensas antioxidantes del TA después de la pérdida de peso, lo que puede asociarse con la reducción de los niveles plasmáticos de varios indicadores de estrés oxidativo, tales como la glutatión sintetasa, observado en éste y otros estudios realizados en sujetos con obesidad mórbida después de la CB (da Silva et al., 2012; Joao et al., 2010). Los estudios de da Silva y colaboradores (2012) y Joao y colaboradores (2010) también mostraron que la CB provoca una disminución de los marcadores de inflamación circulantes. En esta línea, en nuestro estudio observamos que los niveles séricos de proteína C reactiva (CRP) disminuyeron y los de la adipocina anti-inflamatoria, adiponectina, aumentaron tanto en mujeres obesas NG como IR tras la pérdida de peso por CB. Estos resultados están en consonancia con estudios previos (Appachi et al., 2011) y, en conjunto, suman evidencia adicional sobre los efectos benéficos de la CB en la mejora de la inflamación sistémica crónica relacionada con la obesidad.

Curiosamente, la inflamación del TA, medida por la cuantificación de la expresión de JNK (JNK total) y su activación (relación JNK/pJNK) (Hotamisligil, 2008), disminuyó después de la cirugía considerando el conjunto de sujetos analizados en el estudio, incluyendo las mujeres obesas NG y las IR. Sin embargo, este efecto es debido principalmente a la disminución observada tanto en los niveles de JNK total como en el ratio pJNK/JNK en las mujeres IR tras la pérdida de peso inducida por la CB, mientras que en las mujeres NG no se observó ningún cambio en la actividad de JNK Post-CB. Estudios de nuestro grupo y de otros laboratorios han mostrado que el nivel de

inflamación, tanto si se cuantifica a nivel de adipocitos maduros separados (Díaz-Ruiz et al., 2015) como de tejido adiposo subcutáneo global (Naukkarinen et al., 2014; van Beek et al., 2014), es superior en individuos MUO que en individuos MHO. Estas observaciones están en consonancia con los resultados obtenidos en este estudio mostrando que los mujeres IR presentaron niveles de actividad de JNK en TASC superiores a las de las mujeres NG antes de la CB. Estos datos están además de acuerdo con estudios recientes que apoyan un papel relevante de la inflamación del TASC en el desarrollo de IR en obesidad (Bigornia et al., 2012). Es importante resaltar que la actividad de JNK en mujeres IR después de un año de la CB se redujo más que los niveles observados en las mujeres NG, ya sea antes o después de la cirugía, lo que indica que la activación de JNK puede ser reversible.

Por otro lado, el contenido de la proteína aminoacil-tRNA sintetasa, SYWC, aumentó tras la CB en mujeres obesas IR hasta los niveles observados en NG antes de CB y que se mantuvieron constantes tras la cirugía. Atendiendo a estas observaciones, se podría especular que la recuperación de la enfermedad metabólica coincide con la normalización en la transducción de proteínas en el TA, otorgando un posible papel a este proceso en el mantenimiento de la sensibilidad a insulina. Además del papel de esta proteína en el proceso de traducción proteica, se ha demostrado que SYWC participa en la regulación de la angiogénesis (Mirando et al., 2014). En este sentido, estudios previos han observado niveles bajos del factor pro-angiogénico, VEGF-A, en el TA omental y subcutáneo de sujetos obesos mórbidos con un alto grado de IR, respecto a los sujetos obesos mórbidos, con niveles bajos de IR, que presentan de hecho mayor contenido de VEGF-A que los sujetos delgados (Tinahones et al., 2012). Así mismo, también ha sido documentado una correlación positiva entre la sensibilidad a la insulina y la densidad de vasos sanguíneos, la oxigenación y la expresión de VEGF-A en TASC (Pasarica et al., 2010). Nuestro estudio amplía estas observaciones ya que hemos demostrado que la pérdida de peso inducida por la CB tiende a reducir el contenido de la proteína VEGF en los obesos mórbidos NG mientras que en los IR observamos una tendencia a aumentar. Es importante resaltar que aunque la cirugía redujo el IMC medio en un 33%, los sujetos seguían siendo obesos 1 año después de la intervención. Al observar todos estos datos en conjunto, es razonable proponer que es necesaria una mayor angiogénesis en el TASC para mantener la salud metabólica en obesidad, lo que estaría acorde con la propuesta de que una expansión adecuada del TASC tiene un efecto protector desde el punto de vista metabólico (Kim et al., 2007). A su vez, estos datos también apoyan la noción de que la CB podría ayudar a mejorar la función del TA en pacientes MUO, entre otras vías, mediante la promoción del crecimiento/ desarrollo de nuevos vasos en el TASC.

Como hemos mostrado en este trabajo y en trabajos previos, así como por otros autores, los sujetos MHO y MUO presentan grandes diferencias moleculares en el TA que afectan a procesos tan importantes como el estrés oxidativo, el estrés del RE, la proteostasis celular, la inflamación o la fibrosis (Díaz-Ruiz et al., 2015; Denis y Obin, 2013; Primeau et al., 2011). En este trabajo, mostramos que el patrón proteómico del TA de los sujetos IR era más similar al observado en sujetos NG tras CB

que antes de la intervención, se mantuvieron ciertas diferencias entre los dos grupos (NG e IR) tras la CB, a pesar de que ambos mostraron una reducción de peso similar. En concreto, la pérdida de peso provocó cambios diferenciales en proteínas del citoesqueleto, como la vimentina, o la chaperonina relacionada con la actina y tubulina (TCPB) en el TA de sujetos NG vs. IR. Teniendo en cuenta el importante papel que tiene el citoesqueleto en el mantenimiento de la estructura y función de los adipocitos, estas diferencias deben resultar en distintas consecuencias funcionales. Sin ir más lejos, la vimentina está implicada en la formación de gotas lipídicas durante la adipogénesis (Lieber y Evans, 1996), interactúa con la lipasa sensible a hormonas (HSL), regula la señalización β -adrenérgica y la lipólisis (Shen et al., 2010; Kumar et al., 2007), controla el tráfico de vesículas que contienen GLUT4 en los adipocitos (Guilherme et al., 2000) y favorece la movilidad y función de las mitocondrias en la célula (Chernoivanenko et al., 2015).

La CB también reguló de forma diferencial la expresión de varios marcadores de la función mitocondrial en el TASC de los sujetos NG o IR. Así, un año después de la CB, los sujetos IR tenían niveles aumentados de la proteína mitocondrial, mitofilina. La mitofilina es un componente central en el sistema de organización de la membrana interna mitocondrial (MINOS), que juega un importante papel en el mantenimiento de las crestas mitocondriales, la arquitectura mitocondrial y el transporte de proteínas al interior de la mitocondria (von der Malsburg et al., 2011). Sorprendentemente, el TA de las mujeres obesas IR después de la cirugía mostraron una tendencia hacia un mayor contenido de la proteína PGC-1 α , un co-activador transcripcional implicado en la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo que también es esencial para la síntesis de ATP a partir de la fosforilación oxidativa (Scarpulla, 2011; Liang y Ward, 2006). Estos resultados indican que la CB mejora la biogénesis y la actividad mitocondrial en el TASC de sujetos IR con obesidad mórbida. Es importante destacar que estos cambios fueron acompañados por un aumento de la SOD mitocondrial, lo que apoya nuestra propuesta expuesta anteriormente de que la CB induce la activación de mecanismos antioxidantes en obesos IR.

Por otra parte, tanto la mitofilina como PGC-1 α presentaron niveles elevados en los sujetos obesos NG antes de la CB, mientras que después de la pérdida de peso hubo una reducción de las dos proteínas en este grupo. Curiosamente, un análisis proteómico comparativo reciente de adipocitos maduros obtenidos a partir de TASC y TA omental, nos ha permitido demostrar que los sujetos NG con obesidad mórbida difieren de los IR por su capacidad de contrarrestar el aumento del estrés oxidativo que ocurre asociado a obesidad (es decir, los individuos obesos NG presentan niveles más elevados de enzimas antioxidantes y niveles más bajos de proteínas carboniladas en comparación a los sujetos IR) (Díaz-Ruiz et al., 2015). Estos resultados y nuestros resultados actuales sugieren que la CB produce cambios selectivos en el TA de obesos IR de manera que éste finalmente se asemeja, al menos en ciertos aspectos, al TA de los sujetos obesos NG, mientras que los obesos NG después de la CB tenderían a adquirir un fenotipo similar al de un individuo delgado.

Finalmente, aún no está claramente establecido si el estado MHO representa un fenotipo estable o, por el contrario, supone un fenotipo transitorio que se deteriora con el tiempo hasta convertirse en un fenotipo MUO (Bluher y Schwarz, 2014). Por otra parte, actualmente existe un debate en cuanto a si los sujetos MHO son realmente saludables o incluso si realmente pueden llegar a beneficiarse de las diferentes estrategias existentes para perder peso (Bluher y Schwarz, 2014). Nuestros datos añaden apoyo experimental adicional a la idea de que los sujetos con obesidad mórbida no constituyen una población homogénea e indican que, a pesar de que la CB induce cambios moleculares que generan una mejora en la función del TA en personas con cualquier tipo de riesgo metabólico, ya sea alto o bajo, los resultados de la remodelación molecular del TA dependerán en gran parte del estado metabólico inicial. En este contexto, un análisis post-hoc de los resultados del estudio *Swedish Obese Subjects* (SOS), ha permitido mostrar que los sujetos obesos con niveles más altos de insulina en ayunas se beneficiaban más de la CB que aquellos que tenían valores más bajos con respecto a la tasa de mortalidad y a la incidencia de DT2 (Sjostrom, 2013). Estos resultados y los resultados mostrados en este trabajo apoyan el concepto de que los sujetos obesos podrían ser estratificados, al menos en términos de respuesta a la insulina, en la definición de estrategias de intervención de la cirugía bariátrica.

5.2. Importancia de la proteína de citoesqueleto, SEPT11, en la regulación dinámica de la caveola y en el transporte de lípidos en los adipocitos.

La remodelación de componentes del citoesqueleto, incluyendo la actina, tubulina y vimentina es de gran importancia en el proceso de adipogénesis y en el mantenimiento de una adecuada sensibilidad a la insulina en los adipocitos (Yang et al., 2013; Pellegrinelli et al., 2014; Verstraeten et al., 2011; Stall et al., 2014; Bhonagiri et al., 2011). Las septinas se han catalogado recientemente como el cuarto componente del citoesqueleto (Mostowy y Cossart, 2012). Algunas de ellas (SEPT2, 5, 9, 11 y 12) se han identificado en el proteoma de la membrana plasmática de adipocitos 3T3-L1 (Prior et al., 2011). Sin embargo, aún no se ha descrito la caracterización de la septina, SEPT11, en el tejido adiposo humano y sus funciones en los adipocitos son desconocidas. En este sentido, en esta Tesis Doctoral se caracteriza por primera vez SEPT11 en adipocitos 3T3-L1 y en adipocitos humanos.

Así, basándonos en la expresión génica y proteica de SEPT11 y en los datos de inmunohistoquímica obtenidos, nuestros resultados indican que los adipocitos son el componente principal del tejido adiposo que contribuye a la expresión general de SEPT11 en el tejido adiposo humano. También se observó un bajo grado de transcripción de SEPT11 en la fracción de estroma vascular (FEV). En este sentido, algunos estudios en la literatura han descrito la expresión de algunas septinas en células de la FEV, tales como neutrófilos, monocitos/macrófagos y fibroblastos (Huang et al., 2008; Hanai et al., 2004). Por otra parte, nuestros datos reflejan una mayor expresión de SEPT11 en tejido adiposo subcutáneo en comparación con el tejido adiposo omental. Está claramente establecido que el tejido adiposo omental presenta mayor inflamación y mayor sensibilidad a la acción de las catecolaminas que el tejido adiposo subcutáneo, mientras que éste último es más sensible a la insulina (Rodríguez et al., 2008). En este trabajo, mostramos que la expresión de SEPT11 en adipocitos omentales está regulada negativamente por agonistas β -adrenérgicos como el isoproterenol y por factores pro-inflamatorios como TNF- α y LPS, mientras que la insulina regula positivamente la expresión, génica y proteica, de SEPT11. En conjunto, nuestros datos sugieren que las diferencias en cuanto a la expresión de SEPT11 entre los depósitos grasos están relacionadas a la mayor insulino-resistencia, lipólisis e inflamación del tejido adiposo omental (Hanai et al., 2004).

Por otra parte, se ha descrito que la hipertrofia de los adipocitos y la insulino-resistencia produce grandes cambios en el citoesqueleto de actina, vimentina y tubulina (Spiegelman y Farmer, 1982; Lieber y Evans, 1996; Kanzaki, 2006; Stall et al., 2014; Bhonagiri et al., 2011; Kumar et al., 2007). Así, se ha descrito que durante la adipogénesis se produce una disminución de la expresión de tubulina y actina en el tejido adiposo (Teichert-Kuliszewska et al., 1996), mientras que estas proteínas están reguladas de forma positiva por la restricción calórica y por drogas insulino-sensibilizantes (i.e. rosiglitazona) en adipocitos maduros (Ahmed et al., 2010; Bouwman et al., 2014). Por su parte, la expresión de vimentina aumenta durante la adipogénesis (Teichert-Kuliszewska et al., 1996), un

proceso que también provoca la reorganización del citoesqueleto de vimentina, lo que parece depender de la acción de la insulina (Blüher et al., 2004). En el presente trabajo, observamos que la expresión génica de la proteína de citoesqueleto, SEPT11, se correlacionó positivamente con marcadores de adiposidad en el tejido adiposo omental y con parámetros de insulino-resistencia en el tejido adiposo subcutáneo. Sin embargo, no hallamos diferencias en cuanto a la expresión de SEPT11 entre los dos grupos de individuos obesos estratificados en relación a su sensibilidad a insulina (normoglucémicos *vs.* insulino-resistentes y/o con DT2), lo que sugiere que la regulación de esta proteína en el tejido adiposo está más relacionada con el tamaño de los adipocitos que con la insulino-resistencia. En línea con esta propuesta están nuestros resultados de células 3T3-L1 expuestas a oleato, que indujo hipertrofia pero no insulino-resistencia o de adipocitos humanos diferenciados *in vitro* y estimulados con insulina, que provocaron un aumento significativo del contenido proteico de SEPT11.

Curiosamente, no observamos diferencias en los niveles de SEPT11 durante la diferenciación de las células 3T3-L1. Sin embargo, la adipogénesis sí estuvo asociada a una reorganización significativa de SEPT11, que pasó de distribuirse en asociación a estructuras filamentosas lineales parecidas a fibras de estrés de actina en células poco diferenciadas (i.e., sin gotas lipídicas), a estructuras en forma de anillo localizadas por debajo de la membrana plasmática en células diferenciadas. Estas observaciones se obtuvieron tanto en células 3T3-L1 como en adipocitos humanos. Estos cambios recuerdan a los cambios que ocurren en el citoesqueleto de actina durante la adipogénesis (Yang et al., 2014) y, en conjunto, sugieren una interacción funcional entre SEPT11 y el citoesqueleto de actina en los adipocitos, tal y como se ha establecido para las septinas en otros tipos celulares (Saarikangas y Barral, 2011; Gladfelter, 2014; Mavrakakis et al., 2014; Hanai et al., 2004).

En particular, las septinas tienen una amplia afinidad por otros componentes del citoesqueleto, incluyendo la actina y tubulina y/o proteínas reguladoras de éstas, como miosina tipo II, anillina, o MAP4, entre otros (Nagata et al., 2003; Kinoshita et al., 2002; Kinoshita et al., 2004; Kremer et al., 2005). Nuestros estudios de inmunocitoquímica demuestran una importante colocalización entre SEPT11 y el marcador de los filamentos de actina, faloidina, especialmente a días tempranos de la diferenciación tanto en células 3T3L-1 como en adipocitos humanos de tejido adiposo subcutáneo y visceral diferenciados *in vitro*. En células diferenciadas y, en especial en los adipocitos maduros aislados del depósito subcutáneo o del visceral, se observa también una cierta asociación de SEPT11 con la actina en el córtex. Estos datos están en concordancia con varios estudios en los que se ha demostrado la estrecha relación existente entre SEPT11 y F-actina en otros tipos celulares (Nagata et al., 2003; Surka et al., 2002; Hanai et al., 2004; Nagata et al., 2004; Huang et al., 2008).

Notablemente, en experimentos orientados a profundizar en la interacción SEPT11-actina mediante la despolimerización de la F-actina mediante el tratamiento con latrunculina A, observamos que esta droga favoreció la conformación de anillos en pre-adipocitos de humano, indicando que la desorganización de la actina, que ocurre en respuesta a latrunculina pero que también se observa

durante la adipogénesis, podría servir como una señal para favorecer la reorganización de SEPT11 desde filamentos a anillos. Estos resultados están en consonancia con otros estudios realizados en diferentes tipos celulares en los que se ha demostrado igualmente que la despolimerización de la actina favorece la pérdida de la morfología filamentosa y la conformación de estructuras anilladas de las septinas, y alteraciones en la dinámica y función del citoesqueleto de las septinas (Xie et al., 1999; Kinoshita et al., 2002; Gilden et al., 2012). Adicionalmente, se ha documentado que las interacciones de las septinas con la membrana y el citoesqueleto de actina se rigen por las proteínas Borg, una familia de proteínas efectoras de la Rho GTPasa Cdc42 (que regula la organización del citoesqueleto de actina) (Allen et al., 1997), y ambas regulan la polimerización de las septinas (Kinoshita, 2003; Sheffield et al., 2003). Notablemente, el estudio del interactoma de SEPT11 y la confirmación mediante *GST pull-down*, revelaron una interacción directa de SEPT11 con dos Rho GTPasas (ARHGAP11A y ARHGAP21) en adipocitos. En la literatura se ha documentado la co-localización y el importante efecto de ARHGAP21 sobre el reordenamiento de la F-actina (Ferreira et al., 2015; Ito et al., 2005) y un estudio reciente muestra que la expresión de ARHGAP11A suprime la formación de fibras de estrés (Kagawa et al., 2013). En conjunto, estos datos sugieren que ARHGAP21 y/o ARHGAP11A podrían intervenir en la interacción de SEPT11 con la actina y, a su vez, contribuir en la regulación de la polimerización y la distribución de SEPT11 y, por tanto, en su función.

Además de interactuar con componentes del citoesqueleto, todas las septinas interactúan entre sí para conformar estructuras complejas o complejos hetero-oligoméricos conformados por al menos tres septinas. Dichas interacciones septina-septina pueden alterar su conformación estructural (anillos o filamentos) y función (Nagata et al., 2004; Weirich et al., 2008; Cao et al., 2009; Kinoshita, 2003; Kinoshita et al., 2002). En este sentido, estudios previos han descrito la interacción y/o co-distribución de SEPT11 con SEPT2 o SEPT9 en células provenientes de fibroblastos de embriones de rata (REF52), líneas celulares de macrófagos (RAW264.7 y J774) o en podocitos humanos (Nagata et al., 2004; Huang et al., 2008; Wasik et al., 2012). En el presente estudio, demostramos la expresión de SEPT2 y SEPT9 en el tejido adiposo humano y en células 3T3-L1 y su interacción directa con SEPT11. En particular, se observó que al expresar exógenamente SEPT11 en los adipocitos 3T3-L1, SEPT11 sólo conforma estructuras filamentosas cortas. Sin embargo, al co-expresar SEPT11 con SEPT2, además de filamentos cortos, SEPT11 se distribuye en estructuras anilladas, mientras que la co-expresión de SEPT11 con SEPT9 da lugar a la formación de filamentos largos. En conjunto, estos datos sugieren que las estructuras de tipo filamentoso o anulares observadas para la proteína SEPT11 endógena en adipocitos humanos o murinos podrían estar compuestas por complejos de SEPT11 con SEPT2 y/o SEPT9. Notablemente, a diferencia de lo que sucede para SEPT11, cuya expresión en los dos depósitos de tejido adiposo aumenta con la obesidad, la expresión de SEPT9 sólo aumenta en el tejido adiposo omental de individuos obesos mientras que la obesidad se asocia con bajos niveles de expresión en tejido adiposo subcutáneo, y no se observan cambios en la expresión génica de SEPT2 en los dos depósitos grasos en relación a la obesidad. Estos datos sugieren que puede haber una

adaptación diferente de las septinas en respuesta a la hipertrofia y la insulino-resistencia que ocurren en obesidad. Es posible que la regulación diferencial de los transcritos de SEPT2, SEPT9 y SEPT11 en pacientes obesos, tanto NG como IGT+DT2, y, por tanto, en la relación de SEPT11 con respecto a SEPT2 y/o SEPT9, puedan afectar profundamente la estequiometría de los polímeros de SEPT11 con otras septinas (SEPT2 y/o SEPT9) y, en consecuencia, la funcionalidad de los complejos resultantes. De acuerdo con esta propuesta, se ha mostrado la asociación de cambios en la expresión de las septinas y, en particular, modificaciones en la composición cualitativa de los complejos de septinas, con diversas enfermedades, tales como cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) (Peterson y Petty, 2010; Hall y Russell, 2012).

Es importante resaltar que observamos anillos corticales de SEPT11 tanto en células 3T3-L1 diferenciadas como en adipocitos humanos diferenciados, ya sea recién aislados del tejido adiposo como diferenciados *in vitro* a partir de la FEV, lo que indica que este complejo oligomérico es la unidad funcional de los adipocitos maduros en el tejido adiposo.

Por otra parte, nuestros hallazgos sobre el alto grado de solapamiento de señal entre SEPT11 y caveolina-1 (CAV1) en la superficie de los adipocitos mediante microscopía confocal, junto con la significativa semejanza de los anillos de SEPT11 con los “clusters” de caveolas comunes en este tipo celular (Watson et al., 2001), demuestran que SEPT11 se asocia con caveolas en adipocitos. Esta propuesta está además apoyada por nuestros estudios de microscopía electrónica demostrando la presencia de señal inmunorreactiva para SEPT11 en caveolas. Las caveolas son invaginaciones presentes en la membrana plasmática implicadas en diferentes aspectos de la función celular, tales como tráfico de lípidos, transducción de señales, mecanotransducción, o endocitosis (Méndez-Giménez et al., 2014; Parton y del Pozo, 2013). La caveolina-1 (CAV1) es el componente de recubrimiento principal de las caveolas en los adipocitos. Esta proteína juega un importante papel en la señalización de insulina y en el metabolismo lipídico del tejido adiposo ya que facilita la captación y transporte de ácidos grasos libres y de colesterol en el adipocito (Méndez-Giménez et al., 2014; Parton y del Pozo, 2013). En este estudio, encontramos que la obesidad conlleva un aumento de CAV1 en el tejido adiposo subcutáneo y visceral, lo que se confirma con datos previos publicados (Catalán et al., 2008). Además, se observó una correlación positiva de la expresión de CAV1 con la de SEPT11, así como con SEPT2 y SEPT9, en el tejido adiposo humano. Adicionalmente, nuestros estudios de GST pull-down y co-inmunoprecipitación demostraron que SEPT11 interacciona directa y físicamente con CAV-1. Todos estos datos, en conjunto, apoyan de forma sólida la asociación de SEPT11 con CAV-1 en las caveolas del adipocito, donde SEPT11 se encuentra unida probablemente como una proteína periférica de membrana, tal y como lo indican nuestros estudios bioquímicos y de fraccionamiento subcelular. Además de CAV-1, otros componentes presentes en las caveolas podrían ayudar a enlazar SEPT11 a estos dominios de la membrana, incluyendo el citoesqueleto de actina que se ha descrito que se localiza en asociación a los “clusters” de caveolas en células 3T3-L1 (Kanzaki y Pessin, 2002)

y que, como ya hemos mencionado, se asocia con SEPT11 en preadipocitos y adipocitos 3T3-L1 y humanos. Del mismo modo, se ha demostrado que el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂), que está enriquecido en el borde de las caveolas (Fujita et al., 2009), es un candidato potencial para el reclutamiento de las septinas a la membrana plasmática (Zhang et al., 1999; Bertin et al., 2010; Huang et al., 2008).

En conjunto, nuestros estudios bioquímicos y de microscopía sugieren un papel funcional de SEPT11 en la regulación de la función de las caveolas. Existen otras evidencias experimentales obtenidas en nuestro estudio que permiten apoyar adicionalmente esta propuesta. En primer lugar, la disminución de la expresión de SEPT11 mediante silenciamiento con siRNA específicos redujo significativamente el contenido proteico de CAV1. Además, en células silenciadas para SEPT11, observamos una disminución de la fosforilación de AKT tras la estimulación con insulina, lo que indica una alteración en la señalización de insulina en condiciones de baja expresión de SEPT11 en adipocitos. En concordancia con estos resultados y los datos de disminución proteica de CAV1 tras el silenciamiento de SEPT11 están los resultados obtenidos por Cohen et al. (2003), quienes mostraron que los niveles de pAKT se reducen considerablemente en el tejido adiposo de animales KO para CAV1 en comparación con animales control (Cohen et al., 2003). Notablemente, nuestros resultados sugieren que SEPT11 podría modular de forma diferencial la señalización de la insulina mediada por quinasas en los adipocitos, ya que la reducción en la expresión de SEPT11 aparentemente no afectó a la señalización de la insulina mediada por ERK. Se han obtenido resultados similares de señalización diferencial frente a la estimulación con factores de crecimiento tras el silenciamiento de CAV1 en células endoteliales (Gonzalez et al., 2004). No obstante lo anterior, no podemos excluir la posibilidad de que la proteína SEPT11 que aún se mantiene en las células tratadas con siRNA para esta proteína, y/o los complejos habituales de otras septinas con SEPT11, aunque carezcan de esta proteína, puedan ser suficientes para mantener la señalización normal de ERK.

Existen numerosos estudios que apoyan el papel de las septinas como barreras de difusión que contribuyen a compartimentalizar las membranas celulares en dominios separados (Hall et al., 2012; Fung et al., 2014; Cao et al., 2009; Mostowy y Cossart, 2012; Bridges et al., 2015). En este contexto, la asociación de SEPT11 con las caveolas podría ayudar potencialmente a mantener la función de estos microdominios en la compartimentalización y la regulación de cascadas de señalización (Couet et al., 2001; Hansen et al., 2010; Parton y Simons, 2007; Strålfors, 2012). Además del papel de las septinas como reguladores en la difusión de proteínas en la membrana plasmática, las septinas también sirven como sitios de andamiaje para el reclutamiento de proteínas (Mostowy y Cossart, 2012). En este sentido, gracias al ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H) hemos identificado varias proteínas que podrían estar asociadas a SEPT11. Entre éstas, confirmamos la interacción de SEPT11 y la chaperona de lípidos, FABP5 (también llamada mal1/E-FABP) utilizando ensayos de GST *pull-down*. FABP5, junto con FABP4, son las principales proteínas de unión a ácidos grasos presentes en el tejido adiposo

(Hotamisligil y Bernlohr, 2015). Se ha propuesto que las FABPs ayudan a mediar la captación de ácidos grasos en los adipocitos y, además, facilitan el transporte de lípidos a diferentes compartimentos celulares, como las gotas lipídicas, para su almacenamiento (Iso et al, 2013; Hotamisligil y Brenlohr, 2015; Furuhashi y Hotamisligil, 2008). De acuerdo con este punto de vista, observamos que la señal fluorescente de GFP-FABP5 tiene principalmente una distribución difusa en adipocitos en condiciones basales, aunque la proteína se acumuló de forma más densa por debajo de la membrana plasmática. Sin embargo, la exposición de los adipocitos a oleato, que se une con alta afinidad a FABP5 (Weirich et al., 2008), induce la acumulación de FABP5 en la superficie de las gotas lipídicas. Del mismo modo, en concordancia con estudios previos (Parton y del Pozo, 2013), observamos que la CAV1 se redistribuye desde la membrana plasmática a las gotas lipídicas tras el tratamiento con oleato en células 3T3-L1. Nuestros estudios demuestran que SEPT11 sigue una ruta de tráfico similar a CAV-1 en respuesta al tratamiento con ácidos grasos. En esta línea, nuestros estudios de inmunotinción triple para microscopía confocal mostraron que SEPT11 colocaliza tanto con CAV1 como con GFP-FABP5 en la superficie de las gotas lipídicas en adipocitos tratados con oleato.

Todos estos datos, en conjunto, indican que la interacción de CAV1/SEPT11 se extiende desde las caveolas hasta las gotas lipídicas, donde SEPT11 probablemente también se asocia con FABP5. Se ha propuesto que las caveolinas en las caveolas modulan el movimiento de ácidos grasos a través de la membrana (Pilch et al., 2011), mientras que el *pool* de caveolinas en las gotas lipídicas podría regular la capacidad de expansión de las gotas lipídicas (Blouin et al, 2009; Cohen et al 2004). Para ser más específicos, los fibroblastos obtenidos de ratones deficientes en CAV1 y tratados con oleato almacenan menos lípidos en las gotas lipídicas y el tamaño de éstas es inferior respecto a las células control, lo que sugiere que CAV1 facilita la acumulación de lípidos en las gotas lipídicas (Cohen et al., 2004). Curiosamente, nuestros experimentos de silenciamiento en los adipocitos 3T3-L1 mostraron que la pérdida y/o reducción de SEPT11 conduce a una disminución en la acumulación de lípidos en respuesta a la insulina, lo cual es consistente con nuestras observaciones sobre la activación disminuida de la señalización de la insulina (es decir, la fosforilación de Akt) en las células silenciadas. Nuestros resultados sobre la observación de que el impacto negativo del silenciamiento de SEPT11 observado sobre la acumulación de lípidos fue más importante aún en células estimuladas con oleato, junto con el efecto de este ácido graso sobre la redistribución intracelular de SEPT11, sugieren un vínculo entre SEPT11 y el transporte de los ácidos grasos desde las caveolas hasta las gotas lipídicas. Una vez en las gotas lipídicas, SEPT11 podría proporcionar una plataforma para facilitar la compartimentalización de CAV1 y/o FABP5 en la superficie de estas estructuras.

Por otra parte, es importante mencionar que la caveolina-1 se ha demostrado que modula la lipólisis mediante el acoplamiento de la proteína quinasa A, la actividad de la fosforilación de la perilipina y FABPs (FABP4 y 5) que se unen y activan la lipasa sensible a hormonas (Cohen et al.,

2004) en la superficie de las gotas lipídicas en presencia de oleato (Jenkins-Kruchten et al., 2003). De acuerdo con estos resultados, se observó que la lipólisis inducida por oleato, efecto que se ha informado previamente en células 3T3-L1 expuestas a este ácido graso (Xie et al, 2006), se redujo en los adipocitos en los que se realizó silenciamiento de SEPT11.

Finalmente, al observar todos estos datos en conjunto, nuestros resultados apoyan el papel de SEPT11 en la regulación de la absorción, tráfico y almacenamiento de lípidos en los adipocitos, lo que probablemente es mediado a través de su interacción tanto con caveolina-1 como con FABP5. Además, nuestros datos sugieren que SEPT11 tiene diferentes funciones celulares de acuerdo a su localización celular (i.e., caveolas y gotas lipídicas), que podrían actuar en conjunto para apoyar las acciones de SEPT11 sobre el metabolismo lipídico.

En resumen, nuestro estudio identifica a SEPT11 como un nuevo componente del citoesqueleto de los adipocitos, en donde, SEPT11 se ensambla ya sea para conformar filamentos o anillos dependiendo del estado de diferenciación del adipocito y su interacción selectiva con otras septinas como SEPT2 y SEPT9 expresadas por las células adipocitarias. En este estudio, nosotros también demostramos que SEPT11 se asocia a caveolina-1 en las caveolas de los adipocitos no tratados y se redistribuye junto con caveolina-1 y la chaperona de lípidos FABP5, a la superficie de las gotitas lipídicas durante la sobrecarga de ácidos grasos en el adipocito (oleato). Estos resultados, junto con nuestros estudios funcionales y de expresión, apoyan un papel regulador de SEPT11 en el tráfico y metabolismo de los lípidos. Esta idea es a su vez, se confirma aun mas con nuestros hallazgos que demuestran que esta proteína se incrementa en estados de obesidad y se relaciona con el tamaño de los adipocitos de la grasa visceral y marcadores de resistencia a la insulina en el tejido adiposo subcutáneo. En conjunto, estos resultados amplían nuestra comprensión de la remodelación del citoesqueleto durante el inicio de la obesidad y la resistencia a insulina y abren nuevas vías para la investigación sobre el control de almacenamiento y metabolismo lipídico en los adipocitos.

6. Conclusiones/Conclusions

1. Los sujetos NG e IR difirieron en el perfil proteómico de su tejido adiposo tanto antes como, aunque en menor medida, después de la cirugía bariátrica.
2. La pérdida de peso inducida por la cirugía bariátrica provoca cambios importantes en la actividad metabólica, capacidad oxidativa, actividad mitocondrial, organización del citoesqueleto, y la capacidad angiogénica del tejido adiposo en mujeres obesas.
3. La remodelación del proteoma del tejido adiposo que ocurre en respuesta a la cirugía bariátrica depende en gran medida del estado metabólico pre-operatorio de los sujetos obesos. En conjunto, nuestros estudios sugieren que los individuos obesos podrían ser estratificadas al menos en lo que se refiere a su sensibilidad a insulina a la hora de definir estrategias de intervención en cirugía bariátrica.
4. Septin11 constituye un nuevo componente del citoesqueleto en adipocitos, en los que su expresión está regulada por estímulos lipogénicos (insulina), lipolíticos (isoproterenol, ANP) y pro-inflamatorios (TNF- α y LPS).
5. SEPT11 interacciona con SEPT2 y SEPT9 para formar anillos y filamentos largos, respectivamente, lo que recapitula la distribución de SEPT11 en adipocitos maduros y en preadipocitos, y apoya la importancia del repertorio de septinas expresado en los adipocitos en relación a la estructura y función del citoesqueleto de septinas.
6. La asociación de SEPT11 con caveolina-1 en las caveolas de los adipocitos en condiciones basales junto a la translocación de esta proteína, con caveolina-1 y la chaperona de lípidos, FABP5, a la superficie de las gotas lipídicas tras la exposición a ácidos grasos sugiere un papel para esta septina, en ambas localizaciones celulares, en el control del tráfico y metabolismo de lípidos en adipocitos. Esta propuesta está además apoyada por los datos funcionales obtenidos en adipocitos silenciados para SEPT11.
7. SEPT11 desempeña un papel regulador de la señalización de insulina en las caveolas que probablemente contribuye, al menos en parte, a la acción de SEPT11 sobre el metabolismo lipídico.
8. La expresión de SEPT11 aumenta en el tejido adiposo en obesidad y se relaciona con el tamaño de los adipocitos de la grasa visceral y con marcadores de resistencia a insulina en el tejido adiposo subcutáneo.

1. NG and IR patients differed in their adipose tissue proteomic profiles before BS and, although to a lesser extent, also after BS.
2. BS-induced weight loss evoked significant rearrangements in the metabolic activity, oxidative capacity, mitochondrial activity, cytoskeletal organization, and angiogenic capacity of the adipose tissue in obese women.
3. Proteome remodeling of the adipose tissue in response to BS is greatly dependent on the pre-operative metabolic status of obese subjects. In all, these studies suggest that obese individuals might be stratified, at least in terms of insulin responsiveness, when defining BS intervention strategies.
4. Septin11 constitutes a new component of the cytoskeleton in adipocytes, wherein it is regulated by both lipogenic (insulin), lipolytic (isoproterenol, ANP) and pro-inflammatory (TNF- α and LPS) stimuli.
5. SEPT11 interacts with SEPT2 and SEPT9 to form rings and large filaments, respectively, which recapitulates the distribution of SEPT11 in mature adipocytes and preadipocytes, and supports the relevance of the septin repertoire expressed in adipocytes in the structure and function of the septin cytoskeleton.
6. The association of SEPT11 with caveolin-1 in adipocyte caveolae under unstimulated conditions and translocation, together with caveolin-1 and the lipid chaperone FABP5, to the lipid droplets upon fatty acid loading suggests a role for this septin at both cellular compartments in the control of lipid traffic and metabolism in adipocytes. In support of this proposal are also our functional data obtained in adipocytes silenced for SEPT11.
7. SEPT11 plays a regulatory role in insulin signaling at the caveolae that likely contributes, at least in part, to SEPT11 function on lipid metabolism.
8. SEPT11 expression increased in the adipose tissue in obesity and relates to adipocyte size in visceral fat and to insulin resistance markers in subcutaneous adipose tissue.

7. Bibliografía

- Abel, E.D. y Sweeney, G.** (2012). "Modulation of the cardiovascular system by leptin". *Biochimie*. 94:2097-2103.
- Ahima, R.S. y Flier, J.S.** (2000). "Adipose tissue as an endocrine organ". *Trends Endocrinol Metab*. 11:327-332.
- Ahima, R.S. y Lazar, M.A.** (2013). "Physiology. The health risk of obesity--better metrics imperative". *Science*. 341:856-858.
- Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Müller, M., Gille, A., Sassmann, A., Hanson, J. y Offermanns, S.** (2010). "An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81". *Cell Metab*. 11:311-319.
- Ahmed, M., Neville, M.J., Edelmann, M.J., Kessler, B.M. y Karpe, F.** (2010). "Proteomic analysis of human adipose tissue after rosiglitazone treatment shows coordinated changes to promote glucose uptake". *Obesity (Silver Spring)*. 18:27-34.
- Allen, W.E., Jones, G.E., Pollard, J.W. y Ridley, A.J.** (1997). "Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages". *J Cell Sci*. 110:707-720.
- Alexander, G. y Bell, A.W.** (1975). "Maximum thermogenic response to cold in relation to the proportion of brown adipose tissue and skeletal muscle in the body and to other parameters in young lambs". *Biol Neonate*.;26:182-194.
- Almabouada, F., Díaz-Ruiz, A., Rabanal-Ruiz, Y., Peinado, J.R., Vazquez-Martinez, R. y Malagon, M.M.** (2013). "Adiponectin receptors form homomers and heteromers exhibiting distinct ligand binding and intracellular signaling properties". *J Biol Chem*. 288:3112-3125.
- American Diabetes Association.** (2012). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus". *Diabetes Care*. 35 Suppl 1:S64-71.
- American Diabetes Association.** (2015). "(2) Classification and diagnosis of diabetes". *Diabetes Care*. 38 suppl:S8-S16.
- Appachi, S., Kelly, K.R., Schauer, P.R., Kirwan, J.P., Hazen, S., Gupta, M. y Kashyap, S.R.** (2011). "Reduced cardiovascular risk following bariatric surgeries is related to a partial recovery from "adiposopathy"". *Obes Surg*. 21:1928-1936.
- 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. y Matsuzawa, Y.** (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity". *Biochem Biophys Res Commun*. 257:79-83.
- Arner, P., Bernard, S., Salehpour, M., Possnert, G., Liebl, J., Steier, P., Buchholz, B.A., Eriksson, M., Arner, E., Hauner, H., Skurk, T., Rydén, M., Frayn, K.N. y Spalding, K.L.** (2011). "Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease". *Nature*. 478:110-113.
- Aron-Wisnewsky, J., Doré, J. y Clement, K.** (2012). "The importance of the gut microbiota after bariatric surgery". *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 9:590-598.
- Badoud, F., Perreault, M., Zulyniak, M.A. y Mutch, D.M.** (2015). "Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals". *FASEB J*. 29:748-758.
- Badoud, F., Lam, K.P., Perreault, M., Zulyniak, M.A., Britz-McKibbin, P. y Mutch, D.M.** (2015). "Metabolomics Reveals Metabolically Healthy and Unhealthy Obese Individuals Differ in their Response to a Caloric Challenge". *PLoS One*. 10:e0134613.
- Bag, S., Ramaiah, S. y Anbarasu, A.** (2015). "FABP4 is central to eight obesity associated genes: a functional gene network-based polymorphic study". *J Theor Biol*. 364:344-354.
- Balaskó, M., Soós, S., Székely, M. y Pétervári, E.** (2014). "Leptin and aging: Review and questions with particular emphasis on its role in the central regulation of energy balance". *J Chem Neuroanat*. 62:248-255.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S. y Snyder, M.** (2000). "Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast". *Mol Cell*. 5:841-851.
- Bartsch, I., Bläser, S., Röseler, S., Sandrock, K., Busse, A., Huber, M., Rempp, H., Lieber, M., Horn, J., Brendle, C. y Zieger, B.** (2010). "Human endothelial and platelet septin SEPT11: cloning of novel variants and characterisation of interaction partners". *Thromb Haemost*. 104:1201-1210.
- Bastard, J.P., Maachi, M., van Nhieu, J.T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J.J., Capeau, J. y Hainque, B.** (2002). "Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro". *J Clin Endocrinol Metab*. 87:2084-9.
- Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E. y Saltiel, A.R.** (2000). "CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport". *Nature*. 407:202-207.

- Bays, H.E., Laferrere, B., Dixon, J., Aronne, L., Gonzalez-Campoy, J.M., Apovian, C., Wolfe, B.M. y Adiposopathy and Bariatric Surgery Working Group.** (2009). "Adiposopathy and bariatric surgery: is 'sick fat' a surgical disease?". *Int J Clin Pract.* 63:1285-1300.
- Bays, H.E., González-Campoy, J.M., Bray, G.A., Kitabchi, A.E., Bergman, D.A., Schorr, A.B., Rodbard, H.W. y 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.
- Berk, P.D., Zhou, S.L., Kiang, C.L., Stump, D., Bradbury, M. y Isola, L.M.** (1997). "Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus". *J Biol Chem.* 272:8830-8835.
- Berggreen, C., Gormand, A., Omar, B., Degerman, E. y Göransson, 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.
- Bertin, A., McMurray, M.A., Thai, L., Garcia, G., Votin, V., Grob, P., Allyn, T., Thorner, J. y Nogales, E.** (2010). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization". *J Mol Biol.* 404:711-731.
- Bevan, P.** (2001). "Insulin signaling". *J Cell Sci.* 114: 1429-1430.
- Bhonagiri, P., Pattar, G.R., Habegger, K.M., McCarthy, A.M., Tackett, L. y Elmendorf, J.S.** (2011). "Evidence coupling increased hexosamine biosynthesis pathway activity to membrane cholesterol toxicity and cortical filamentous actin derangement contributing to cellular insulin resistance". *Endocrinology.* 152:3373-3384.
- Bigornia, S.J., Farb, M.G., Mott, M.M., Hess, D.T., Carmine, B., Fiscale, A., Joseph, L., Apovian, C.M. y Gokce, N.** (2012). "Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity". *Nutr Diabetes.* 2:e30.
- Blouin, C.M., Le Lay, S., Eberl, A., Köfeler, H.C., Guerrera, I.C., Klein, C., Le Liepvre, X., Lasnier, F., Bourron, O., Gautier, J.F., Ferré, P., Hajdouch, E. y Dugail, I.** (2010). "Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects". *J Lipid Res.* 51:945-956.
- Blüher, M., Wilson-Fritch, L., Leszyk, J., Laustsen, P.G., Corvera, S. y Kahn, C.R.** (2004). "Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes". *J Biol Chem.* 279:31902-31909.
- Bluher, S. y Schwarz, P.** (2014). "Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood - Does weight status alone matter?". *Metabolism.* 63:1084-1092.
- Bolsoni-Lopes, A. y Alonso-Vale, M.I.** (2015). "Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update". *Arch Endocrinol Metab.* 59:335-342.
- Bonen, A., Tandon, N.N., Glatz, J.F., Luiken, J.J. y Heigenhauser, G.J.** (2006). "The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes". *Int J Obes (Lond).* 30:877-883.
- Bouwman, F.G., Claessens, M., van Baak, M.A., Noben, J.P., Wang, P., Saris, W.H. y Mariman, E.C.** (2009). "The physiologic effects of caloric restriction are reflected in the in vivo adipocyte-enriched proteome of overweight/obese subjects". *J Proteome Res.* 8:5532-5540.
- Bouwman, F.G., Wang, P., van Baak, M., Saris, W.H. y Mariman, E.C.** (2014). "Increased beta-oxidation with improved glucose uptake capacity in adipose tissue from obese after weight loss and maintenance". *Obesity (Silver Spring).* 22:819-827.
- Brichard, S.M., Delporte, M.L. y Lambert, M.** (2003). "Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin". *Horm Metab Res.* 35:337-342.
- Brackley, K.I. y Grantham, J.** (2009). "Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organization". *Cell Stress Chaperones.* 14:23-31.
- Briand, N., Prado, C., Mabilieu, G., Lasnier, F., Le Lièpvre, X., Covington, J.D., Ravussin, E., Le Lay, S. y Dugail, I.** (2014). Caveolin-1 expression and cavin stability regulate caveolae dynamics in adipocyte lipid store fluctuation". *Diabetes.* 63:4032-4044.
- Bridges, A.A. y Gladfelder, A.S.** (2015). "Septin Form and Function at the Cell Cortex". *J Biol Chem.* 290:17173-17180.
- Bucci, M., Gratton, J.P., Rudic, R.D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G. y Sessa, W.C.** (2000). "In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation". *Nat Med.* 6:1362-1367.
- Burcelin, R.** (2013). "New insights into adipose cell biology". *Bull Acad Natl Med.* 197:79-92.
- Byers, B. y Goetsch, L.** (1976). "A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast". *J Cell Biol.* 69:717-721.

- Camagra, S., Gastaldelli, A., Mari, A., Bonuccelli, S., Scartabelli, G., Frascerra, S., Baldi, S., Nannipieri, M., Rebelos, E., Anselmino, M., Muscelli, E. y Ferrannini, E.** (2011). "Early and longer term effects of gastric bypass surgery on tissue-specific insulin sensitivity and beta cell function in morbidly obese patients with and without type 2 diabetes". *Diabetologia*. 54:2093-2102.
- Camhi, S. M., Waring, M. E., Sisson, S. B., Hayman, L. L. y Must, A.** (2013). "Physical activity and screen time in metabolically healthy obese phenotypes in adolescents and adults". *J Obes*. 984613.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R. y Burn, P.** (1995). "Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks". *Science*. 269:546-549.
- Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P.A., Barsh, G.S., Zucker, J.D., Basdevant, A., Langin, D. y Clément, K.** (2005) "Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss". *Diabetes*. 54:2277-2286.
- Cao, L., Yu, W., Wu, Y. y Yu, L.** (2009). "The evolution, complex structures and function of septin proteins". *Cell Mol Life Sci*. 66: 3309-3323.
- Capozza, F., Combs, T.P., Cohen, A.W., Cho, Y.R., Park, S.Y., Schubert, W., Williams, T.M., Brasaemle, D.L., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., Kim, J.K. y Lisanti, M.P.** (2005). "Caveolin-3 knockout mice show increased adiposity and whole body insulin resistance, with ligand-induced insulin receptor instability in skeletal muscle". *Am J Physiol Cell Physiol*. 288:C1317-C1331.
- Casamayor, A.I. y Snyder, M.** (2003). "Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function". *Mol Cell Biol*. 23: 2762-2777.
- Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A. y Frühbeck, G.** (2012). "Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity". *Histol Histopathol*. 27:1515-1528.
- Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Silva, C., Rotellar, F., Gil, M.J., Cienfuegos, J.A., Salvador, J. y Frühbeck, G.** (2008). "Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation". *Clin Endocrinol*. 68:213-219.
- Cawthorn, W.P. y Sethi, J.K.** (2008). "TNF-alpha and adipocyte biology". *FEBS Lett*. 582:117-131.
- Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C.M. y Kandror, K.V.** (2010). "Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage". *Diabetes*. 59:775-781.
- Chandran, M., Phillips, S.A., Ciaraldi, T. y Henry, R.R.** (2003). "Adiponectin: more than just another fat cell hormone?". *Diabetes Care*. 26:2442-2450.
- Chen, J.G., Spagnoli, A. y Torquati, A.** (2012). "Adipogenic differentiation of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells: effect of gastric bypass surgery". *Surg Endosc*. 26:3449-5346.
- Chen, X., Xun, K., Chen, L. y Wang, Y.** (2009). "TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator". *Cell Biochem Funct*. 27:407-416.
- Chernoivanenko, I.S., Matveeva, E.A., Gelfand, V.I., Goldman, R.D. y Minin, A.A.** (2015). "Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments". *FASEB J*. 29:820-827.
- Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E. y Saltiel, A.R.** (2001). "Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10". *Nature*. 410:944-948.
- Cottam, D.R., Mattar, S.G., Barinas-Mitchell, E., Eid, G., Kuller, L., Kelley, D.E. y Schauer, P.R.** (2004). "The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss". *Obes Surg*. 14:589-600.
- Couet, J., Belanger, M.M., Roussel, E. y Drolet, M.C.** (2001). "Cell biology of caveolae and caveolin". *Adv Drug Deliv Rev*. 49:223-235.
- Cinti, S.** (2006). "The role of brown adipose tissue in human obesity". *Nutr Metab Cardiovasc*. 16:569-574.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S. y Obin, M.S.** (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans". *J Lipid Res*. 46:2347-2355.
- Clarke, L., Heasman, L., Firth, K. y Symonds, M.E.** (1997). "Influence of route of delivery and ambient temperature on thermoregulation in newborn lambs". *Am J Physiol*. 272:R1931-R1939.
- Clement, K.** (2011). "Bariatric surgery, adipose tissue and gut microbiota". *Int J Obes (Lond)*. 35 Suppl 3:S7-S15.
- Cohen, A.W., Combs, T.P., Scherer, P.E. y Lisanti, M.P.** (2003). "Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes". *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 285:E1151-E1160.

- Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W. y Lisanti, M.P.** (2004). "Role of caveolae and caveolins in health and disease". *Physiol Rev.* 84:1341-1379.
- Cohen, A.W., Razani, B., Wang, X.B., Combs, T.P., Williams, T.M., Scherer, P.E. y Lisanti, M.P.** (2003). "Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue". *Am J Physiol Cell Physiol.* 285:C222-235.
- Conde, J., Scotece, M., Gómez, R., Gómez-Reino, J.J., Lago, F. y Gualillo, O.** (2010). "At the crossroad between immunity and metabolism: focus on leptin". *Expert Rev Clin Immunol.* 6:801-808.
- Cotillard, A., Poitou, C., Torcivia, A., Bouillot, J.L., Dietrich, A., Kloting, N., Grégoire, C., Lolmede, K., Blüher, M. y Clément, K.** (2014). "Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass". *J Clin Endocrinol Metab.* 99:E1466-E1470.
- Coué, M. y Moro, C.** (2015). "Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis". *Biochimie.* 9084:00163-00167.
- Czech, M.P., Tencerova, M., Pedersen, D.J. y Aouadi, M.** (2013). "Insulin signaling mechanisms for triacylglycerol storage". *Diabetologia.* 56: 949-964.
- Cruz-García, D., Díaz-Ruiz, A., Rabanal-Ruiz, Y., Peinado, J.R., Gracia-Navarro, F., Castaño, J.P., Montero-Hadjadje, M., Tonon, M.C., Vaudry, H., Anouar, Y., Vázquez-Martínez, R. y Malagón, M.M.** (2012). "The Golgi-associated long coiled-coil protein NECC1 participates in the control of the regulated secretory pathway in PC12 cells". *Biochem J.* 15: 387-396.
- da Silva, V.R., Moreira, E.A., Wilhelm-Filho, D., de Miranda, J.X., Beninca, J.P., Vigil, S.V., Moratelli, A.M., Garlet, T.R., de Souza Meirelles, M.S., Vannucchi, H. y Fröde, T.S.** (2012). "Proinflammatory and oxidative stress markers in patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass after 1 year of follow-up". *Eur J Clin Nutr.* 66:891-899.
- Dankel, S.N., Fadnes, D.J., Stavrum, A.K., Stansberg, C., Holdhus, R., Hoang, T., Veum, V.L., Christensen, B.J., Våge, V., Sagen, J.V., Steen, V.M. y Mellgren, G.** (2010). "Switch from stress response to homeobox transcription factors in adipose tissue after profound fat loss". *PLoS One.* 5:e11033.
- de Graaf, J., Veerkamp, M.J. y Stalenhoef, A.F.** (2002). "Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids". *J R Soc Med.* 95 Suppl 42:46-53.
- Deng, Y. y Scherer, P.E.** (2010). "Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome". *Ann N Y Acad Sci.* 1212:E1-E19.
- del Pozo, C.H., Calvo, R.M., Vesperinas-García, G., Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G., Rubio, M.A. y Obregon, M.J.** (2011). "Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes". *Obes Surg.* 21:633-643.
- DeMaria, E.J.** (2007). "Bariatric surgery for morbid obesity". *N Engl J Med.* 356:2176-2183.
- Denis, G.V. y Obin, M.S.** (2013). "Metabolically healthy obesity": origins and implications". *Mol Aspects Med.* 34:59-70.
- Dharuri, H., Hoen, P.A., van Klinken, J.B., Henneman, P., Laros, J.F., Lips, M.A., El Bouazzaoui, F., van Ommen, G.J., Janssen, I., van Ramshorst, B., van Wagenveld, B.A., Pijl, H., Willems van Dijk, K. y van Harmelen, V.** (2014). "Down regulation of the acetyl-CoA metabolic network in adipose tissue of obese diabetic individuals and recovery after weight loss". *Diabetologia.* 57:2384-2392.
- Díaz-Ruiz, A., Rabanal-Ruiz, Y., Trávez, A., Gracia-Navarro, F., Cruz-García, D., Montero-Hadjadje, M., Anouar, Y., Gasman, S., Vitale, N., Vázquez-Martínez, R. y Malagón, M.M.** (2013). "The long coiled-coil protein NECC2 is associated to caveolae and modulates NGF/TrkA signaling in PC12 cells [corrected]". *PLoS One.* 8:e73668.
- Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Moreno, N.R., García-Rios, A., Delgado-Casado, N., Membrives, A., Túnez, I., Bekay, R., Fernández-Real, J.M., Tovar, S., Diéguez, C., Tinahones, F.J., Vázquez-Martínez, R., López-Miranda, J. y Malagón, M.M.** (2015). "Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity". *Antioxid Redox Signal.* 23:597-612.
- Díez, J.J. y Iglesias, P.** (2003). "The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease". *Eur J Endocrinol.* 148:293-300.
- Ding, S.Y., Lee, M.J., Summer, R., Liu, L., Fried, S.K. y Pilch, P.F.** (2014). "Pleiotropic effects of Cavin-1 deficiency on lipid metabolism". *J Biol Chem.* 289:8473-8483.
- Dirksen, C., Jorgensen, N.B., Bojsen-Moller, K.N., Jacobsen, S.H., Hansen, D.L., Worm, D., Holst, J.J. y Madsbad, S.** (2012). "Mechanisms of improved glycaemic control after Roux-en-Y gastric bypass". *Diabetologia.* 55:1890-1901.
- Divoux, A. y Clément, K.** (2011). "Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue". *Obes Rev.* 12:e494-e503.

- Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J.D., Bedossa, P. y Clément, K.** (2010). "Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss". *Diabetes* 59:2817-2825.
- Dixon, J.B., Straznicky, N.E., Lambert, E.A., Schlaich, M.P. y Lambert, G.W.** (2012). "Laparoscopic adjustable gastric banding and other devices for the management of obesity". *Circulation*. 126:774-785.
- Dobbelaere, J. y Barral, Y.** (2004). "Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex". *Science*. 305:393-396.
- Dobson, R., Burgess, M.I., Sprung, V.S., Irwin, A., Hamer, M., Jones, J., Daousi, C., Adams, V., Kemp, G.J., Shojaee-Moradie, F., Umpleby, M. y Cuthbertson, D.J.** (2015). "Metabolically healthy and unhealthy obesity: differential effects on myocardial function according to metabolic syndrome, rather than obesity". *Int J Obes*. En prensa.
- Engeli, S., Feldpausch, M., Gorzelnik, K., Hartwig, F., Heintze, U., Janke, J., Möhlig, M., Pfeiffer, A.F., Luft, F.C. y Sharma, A.M.** (2003). "Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women". *Diabetes*. 52:942-947.
- Eriksson-Hogling, D., Andersson, D.P., Bäckdahl, J., Hoffstedt, J., Rössner, S., Thorell, A., Arner, E., Arner, P. y Rydén, M.** (2015). "Adipose tissue morphology predicts improved insulin sensitivity following moderate or pronounced weight loss". *Int J Obes (Lond)*. 39:893-898.
- Esfahani, M., Movahedian, A., Baranchi, M. y Goodarzi, M.T.** (2015). "Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome". *Iran J Basic Med Sci*. 18:430-442.
- Fagerholm, S., Ortegren, U., Karlsson, M., Ruishalme, I. y Strålfors, P.** (2009). "Rapid insulin-dependent endocytosis of the insulin receptor by caveolae in primary adipocytes". *PLoS One*. 4:e5985.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P. y Bahouth, S.W.** (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans". *Endocrinology*. 145:2273-2282.
- Farmer, S.R.** (2006). "Transcriptional control of adipocyte formation". *Cell Metab*. 4:263-273.
- Febbraio, M., Guy, E., Coburn, C., Knapp, F.F., Beets, A.L., Abumrad, N.A., Silverstein, R.L.** (2002). "The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36". *Mol Cell Biochem*. 239:193-197.
- Feng, T., Szabo, E., Dziak, E. y Opas, M.** (2010). "Cytoskeletal disassembly and cell rounding promotes adipogenesis from ES cells". *Stem Cell Rev*. 6:74-85.
- Ferreira, S.M., Santos, G.J., Rezende, L.F., Gonçalves, L.M., Santos-Silva, J.C., Bigarella, C.L., Carneiro, E.M., Saad, S.T., Boschero, A.C. y Barbosa-Sampaio, H.C.** (2015). "ARHGAP21 prevents abnormal insulin release through actin rearrangement in pancreatic islets from neonatal mice". *Life Sci*. 127:53-58.
- Feron, O., Michel, J.B., Sase, K. y Michel, T.** (1998). "Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions". *Biochemistry*. 37:193-200.
- Ferreira, S.M., Santos, G.J., Rezende, L.F., Gonçalves, L.M., Santos-Silva, J.C., Bigarella, C.L., Carneiro, E.M., Saad, S.T., Boschero, A.C. y Barbosa-Sampaio, H.C.** (2015). "ARHGAP21 prevents abnormal insulin release through actin rearrangement in pancreatic islets from neonatal mice". *Life Sci*. 127:53-58.
- Field, C.M., al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M.L., Alberts, B. y Mitchison, T.J.** (1996). "A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity". *J Cell Biol*. 133:605-616.
- Field, C.M., Coughlin, M., Doberstein, S., Marty, T. y Sullivan, W.** (2005). "Characterization of anillin mutants reveals essential roles in septin localization and plasma membrane integrity". *Development*. 132:2849-2860.
- Fisher, R.M., Hoffstedt, J., Hotamisligil, G.S., Thörne, A. y Rydén, M.** (2002). "Effects of obesity and weight loss on the expression of proteins involved in fatty acid metabolism in human adipose tissue". *Int J Obes Relat Metab Disord*. 26:1379-1385.
- Flegal, K.M., Kit, B.K., Orpana, H. y Graubard, B.I.** (2013). "Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis". *JAMA*. 309:71-82.
- Foti, M., Porcheron, G., Fournier, M., Maeder, C. y Carpentier, J.L.** (2007). "The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes". *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:1242-1247.
- Franke, W.W., Hergt, M., y Grund, C.** (1987). "Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules". *Cell*. 49:131-141.
- Fried, M.** (2013). "Bariatric and metabolic surgery". *Minerva Endocrinol*. 38:237-244.
- Fried, M., Yumuk, V., Oppert, J.M., Scopinaro, N., Torres, A., Weiner, R., Yashkov, Y. y Frühbeck, G.** (2014). "Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery". *Rozhl Chir*. 93:366-378.

- Frühbeck, G.** (2015). "Bariatric and metabolic surgery: a shift in eligibility and success criteria". *Nat Rev Endocrinol.* 11:465-477.
- Frühbeck, G., Aguado, M. y Martínez, J.A.** (1997). "In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin". *Biochem Biophys Res Commun.* 240:590-594.
- Frühbeck, G. y Gómez-Ambrosi, J.** (2005). "Adipose tissue". *Encyclopedia of human Nutrition (Second Edition)*, (eds Caballero, B., Allen, L., Prentice, A.; Elsevier Ltd) pp 1.14.
- Frühbeck, G., López, M. y Diéguez, C.** (2007). "Role of caveolins in body weight and insulin resistance regulation". *Trends Endocrinol Metab.* 18:177-182.
- Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.A., Fernández, S. y Rodríguez, A.** (2014). "Regulation of adipocyte lipolysis". *Nutr Res Rev.* 27:63-93.
- Frühbeck, G., Toplak, H., Woodward, E., Yumuk, V., Maislos, M., Oppert, J.M. y Executive Committee of the European Association for the Study of Obesity.** (2013). "Obesity: the gateway to ill health - an EASO position statement on a rising public health, clinical and scientific challenge in Europe". *Obes Facts.* 6:117-120.
- Frühbeck, G., Toplak, H., Woodward, E., Halford, J.C., Yumuk, V. y European Association for the Study of Obesity.** (2014). "Need for a paradigm shift in adult overweight and obesity management - an EASO position statement on a pressing public health, clinical and scientific challenge in Europe". *Obes Facts.* 7:408-416.
- Fujita, A., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Takenawa, T. y Fujimoto, T.** (2009). "A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique". *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:9256-9261.
- Fung, K.Y., Dai, L. y Trimble, W.S.** (2014). "Cell and molecular biology of septinas". *Int Rev Cell Mol Biol.* 310:289-339.
- Furuhashi, M., Fucho, R., Gorgun, C.Z., Tuncman, G., Cao, H. y Hotamisligil, G.S.** (2008). "Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice". *J Clin Invest.* 118:2640-2650.
- Furuhashi, M. y Hotamisligil, G.S.** (2008). "Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets". *Nat Rev Drug Discov.* 7:489-503.
- Gaillard, S., Bartoli, M., Castets, F. y Monneron, A.** (2001). "Striatin, a calmodulin-dependent scaffolding protein, directly binds caveolin-1". *FEBS Lett.* 508:49-52.
- Gilden, J.K., Peck, S., Chen, Y.C., Krummel, M.F.** (2012). "The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing". *J Cell Biol.* 196:103-114.
- Gillingham, A.K., Pfeifer, A.C. y Munro, S.** (2002). "CASP, the alternatively spliced product of the gene encoding the CCAAT-displacement protein transcription factor, is a Golgi membrane protein related to giantin". *Mol Biol Cell.* 13:3761-74.
- Gimeno, R.E.** (2007). "Fatty acid transport proteins". *Curr Opin Lipidol.* 18:271-276.
- Gladfelter, A.S.** (2014). "Cytoskeleton: cirque du septinas". *Curr Biol.* 24:R526-R528.
- Glatz, J.F., Luiken, J.J. y Bonen, A.** (2010). "Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease". *Physiol Rev.* 90:367-417.
- Gonzales, A.M. y Orlando, R.** (2007). "A. Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy". *Nutr Metab.* 4:22.
- Gonzalez, E., Nagiel, A., Lin, A.J., Golan, D.E. y Michel, T.** (2004). "Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells". *J Biol Chem.* 279:40659-40669.
- Görg, A.L., Weiss, W. y Dunn, M.J.** (2004). "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics". *Proteomics.* 4:3665-2685.
- Goyal, M.M. y Basak, A.** (2010). "Human catalase: looking for complete identity". *Protein Cell.* 1:888-897.
- Gray, S.L. y Vidal-Puig, A.J.** (2007). "Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis". *Nutr Rev.* 65:S7-S12.
- Grant, R.W. y Stephens, J.M.** (2015). "Fat in flames: influence of cytokines and pattern recognition receptors on adipocyte lipolysis". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 309:E205-13.
- Gregor, M.F. y Hotamisligil, G.S.** (2007). "Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease". *J Lipid Res.* 48:1905-14.
- Grisouard, J., Bouillet, E., Timper, K., Radimerski, T., Dembinski, K., Frey, D.M., Peterli, R., Zulewski, H., Keller, U., Müller, B. y Christ-Crain, M.** (2012). "Both inflammatory and classical lipolytic pathways are involved in lipopolysaccharide-induced lipolysis in human adipocytes". *Innate Immun.* 18:25-34.
- Guilherme, A., Emoto, M., Buxton, J.M., Bose, S., Sabini, R., Theurkauf, W.E., Leszyk, J. y Czech, M.P.** (2000). "Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes". *J Biol Chem* 275:38151-38159.

- Gutiérrez-Fisac, J.L., Guallar-Castillón, P., León-Muñoz, L.M., Graciani, A., Banegas, J.R. y Rodríguez-Artalejo, F.** (2012). "Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study". *Obes Rev.* 13:388-392.
- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y. y Aebersold, R.** (2000). "Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology". *Proc Natl Acad Sci.* 97:9390-9395.
- Hajer, G.R., van Haeften, T.W. y Visseren, F.L.** (2008). "Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases". *Eur Heart J.* 29:2959-2971.
- Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I. y Scherer, P.E.** (2008). "The adipocyte as an endocrine cell". *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37:753-768.
- Hall, A.M., Smith, A.J. y Bernlohr, D.A.** (2003). "Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1". *J Biol Chem.* 278:43008-43013.
- Hall, P.A., Jung, K., Hillan, K.J. y Russell, S.E.** (2005). "Expression profiling the human septin gene family". *J Pathol.* 206:269-278.
- Hall, P.A. y Russell, S.E.** (2012). "Mammalian septins: dynamic heteromers with roles in cellular morphogenesis and compartmentalization". *J Pathol.* 226:287-299.
- Hall, P.A. y Russell, S.E.** (2004). "The pathobiology of the septin gene family". *J Pathol.* 204:489-505.
- Hames, K.C., Vella, A., Kemp, B.J. y Jensen, M.D.** (2014). "Free fatty acid uptake in humans with CD36 deficiency". *Diabetes.* 63:3606-3614.
- Hamman, R.F., Wing, R.R., Edelstein, S.L., Lachin, J.M., Bray, G.A., Delahanty, L., Hoskin, M., Kriska, A.M., Mayer-Davis, E.J., Pi-Sunyer, X., Regensteiner, J., Venditti, B. y Wylie-Rosett, J.** (2006). "Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes". *Diabetes Care.* 29:2102-2107.
- Hanai, N., Nagata, K., Kawajiri, A., Shiromizu, T., Saitoh, N., Hasegawa, Y., Murakami, S. y Inagaki, M.** (2004). "Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11". *FEBS Lett.* 18:83-88.
- Hansen, C.G. y Nichols, B.J.** (2010). "Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae". *Trends Cell Biol.* 20:177-186.
- Harris, R.B.** (2014). "Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism". *Biochim Biophys Acta.* 1842:414-423.
- Harris, T.E. y Lawrence, J.C.** (2003). "TOR signaling". *Sci STKE.* 2003:re15.
- Havel, P.J.** (2004). "Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism". *Diabetes.* 1:S143-S151.
- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Basdevant, A., Stich, V., Viguerie, N., Langin, D., Bedossa, P., Zucker, J.D. y Clement, K.** (2008). "Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity". *Genome Biol.* 9:R14.
- Hertzel, A.V., Smith, L.A., Berg, A.H., Cline, G.W., Shulman, G.I., Scherer, P.E. y Bernlohr, D.A.** (2006). "Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290:E814-E823.
- Hotamisligil, G.S.** (2006). "Inflammation and metabolic disorders". *Nature.* 444:860-867.
- Hotamisligil, G.S.** (2008). "Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes". *Int J Obes (Lond).* 7:S52-S54.
- Hotamisligil, G.S. y Bernlohr, D.A.** (2015). "Metabolic functions of FABPs-mechanisms and therapeutic implications". *Nat Rev Endocrinol.* 11:592-605.
- Hresko, R.C. y Mueckler, M.** (2005). "mTOR-RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes". *J Biol Chem.* 280:40406-40416.
- Hu, E., Liang, P. y Spiegelman, B.M.** (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity". *J Biol Chem.* 271:10697-10703.
- Hu, Q. y Nelson, W.J.** (2011). "Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment". *Cytoskeleton.* 68:313-324.
- Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Kier, A.B. y Schroeder, F.** (2002). "Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells". *J Biol Chem.* 277:29139-29151.
- Huang, J. y Manning, B.D.** (2009). "A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes". *Biochem Soc Trans.* 37:217-222.
- Huang, Y.W., Yan, M., Collins, R.F., Diccio, J.E., Grinstein, S. y Trimble, W.S.** (2008). "Mammalian septins are required for phagosome formation". *Mol Biol Cell.* 19:1717-1726.
- Hull, D. y Segall, M.M.** (1965). "Heat production in the new-born rabbit and the fat content of the brown adipose tissue". *J Physiol.* 181:468-477.

- Ihara, Y., Manabe, S., Kanda, M., Kawano, H., Nakayama, T., Sekine, I., Kondo, T. y Ito, Y. (2005). "Increased expression of protein C-mannosylation in the aortic vessels of diabetic Zucker rats". *Glycobiology*. 15:383-392.
- Inokuchi, J. (2006). "Insulin resistance as a membrane microdomain disorder". *Biol Pharm Bull*. 29: 1532-1537.
- Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S.H. y Saltiel, A.R. (2003). "The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin". *Nature*. 422:629-633.
- Ishiki, M. y Klip, A. (2005). "Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners". *Endocrinology*. 146:5071-5078.
- Iso, T., Maeda, K., Hanaoka, H., Suga, T., Goto, K., Syamsunarno, M.R., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsui, H., Arai, M., Yamaguchi, A., Abumrad, N.A., Sano, M., Suematsu, M., Endo, K., Hotamisligil, G.S. y Kurabayashi, M. (2013). "Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33:2549-2557.
- Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., Nozawa, Y., Narumiya, S., Asano, T. y Nagata, K. (2005). "Possible role of Rho/Rhotekin signaling in mammalian septin organization". *Oncogene*. 24:7064-7072.
- Jansen, H.J., van Essen, P., Koenen, T., Joosten, L.A., Netea, M.G., Tack, C.J. y Stienstra, R. (2012). "Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression". *Endocrinology*. 153:5866-5874.
- Jasmin, J.F., Mercier, I., Sotgia, F. y Lisanti, M.P. (2006). "SOCS proteins and caveolin-1 as negative regulators of endocrine signaling". *Trends Endocrinol Metab*. 17:150-158.
- Jenkins-Kruchten, A.E., Bennaars-Eiden, A., Ross, J.R., Shen, W.J., Kraemer, F.B. y Bernlohr, D.A. (2003). "Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding". *J Biol Chem*. 278:47636-47643.
- Joao Cabrera, E., Valezi, A.C., Delfino, V.D., Lavado, E.L. y Barbosa, D.S. (2010). "Reduction in plasma levels of inflammatory and oxidative stress indicators after Roux-en-Y gastric bypass". *Obes Surg*. 20:42-49.
- Joberty, G., Perlungher, R.R., Sheffield, P.J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T. y Macara, I.G. (2001). "Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42". *Nat Cell Biol*. 3:861-866.
- Joo, E., Surka, M.C. y Trimble, W.S. (2007). "Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases". *Dev Cell*. 13:677-690.
- Kagawa, Y., Matsumoto, S., Kamioka, Y., Mimori, K., Naito, Y., Ishii, T., Okuzaki, D., Nishida, N., Maeda, S., Naito, A., Kikuta, J., Nishikawa, K., Nishimura, J., Haraguchi, N., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Ishii, H., Doki, Y., Matsuda, M., Kikuchi, A., Mori, M. y Ishii, M. (2013). "Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo". *PLoS One*. 8:e83629.
- Kandror, K.V., Stephens, J.M. y Pilch, P.F. (1995). "Expression and compartmentalization of caveolin in adipose cells: coordinate regulation with and structural segregation from GLUT4". *J Cell Biol*. 129:999-1006.
- Kanzaki, M. (2006). "Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics". *Endocr J*. 53:267-293.
- Kanzaki, M. y Pessin, J.E. (2002). "Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes". *J Biol Chem*. 277:25867-25869.
- Kanzaki, M., Watson, R.T., Hou, J.C., Stamnes, M., Saltiel, A.R. y Pessin, J.E. (2002). "Small GTP-binding protein TC10 differentially regulates two distinct populations of filamentous actin in 3T3L1 adipocytes". *Mol Biol Cell*. 13:2334-2346.
- Karylowski, O., Zeigerer, A., Cohen, A. y McGraw, T.E. (2004). "GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes". *Mol Biol Cell*. 15:870-882.
- Karlsson, M., Thorn, H., Parpal, S., Strålfors, P. y Gustavsson, J. (2002). "Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes". *FASEB J*. 16:249-251.
- Katz, D.P., Lee, S.R., Nachiappan, A.C., Willis, M.H., Bray, C.D., Farinas, C.A., Whigham, C.J. y Spiegel, F. (2011). "Laparoscopic sleeve gastrectomy: a guide to postoperative anatomy and complications". *Abdom Imaging*. 36:363-371.
- Kazantzis, M. y Stahl, A. (2013). "Fatty Acid transport Proteins, implications in physiology and disease". *Biochim Biophys Acta*. 1821:852-857.
- Kelley, D.E., Thaete, F.L., Troost, F., Huwe, T. y Goodpaster, B.H. (2000). "Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance". *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278:E941-948.
- Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S. y Scherer, P.E. (2009). "Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI". *Mol Cell Biol*. 29:1575-1591.

- Kielar, D., Clark, J.S., Ciechanowicz, A., Kurzawski, G., Sulikowski, T. y Naruszewicz, M.** (1998). "Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue". *Metabolism*. 47:844-847.
- Kim, D.W.** (2003). "Characterization of Grp1p, a novel cis-Golgi matrix protein". *Biochem Biophys Res Commun*. 303:370-378.
- Kim, J.Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M.E., Hofmann, S.M., Schraw, T., Durand, J.L., Li, H., Li, G., Jelicks, L.A., Mehler, M.F., Hui, D.Y., Deshaies, Y., Shulman, G.I., Schwartz, G.J. y Scherer, P.E.** (2007). "Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue". *J Clin Invest*. 117:2621-2637.
- Kim, M.S., Froese, C.D., Estey, M.P. y Trimble, W.S.** (2011). "SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission". *J Cell Biol*. 195:815-826.
- Kinoshita, M.** (2003). "Assembly of mammalian septinas". *J Biochem*. 134:491-496.
- Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F. y Mitchison, T.J.** (2002). "Self- and actin-templated assembly of Mammalian septinas". *Dev Cell*. 3:791-802.
- Kinoshita, N., Kimura, K., Matsumoto, N., Watanabe, M., Fukaya, M. y Ide, C.** (2004). "Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes". *Genes Cells*. 9:1-14.
- Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. y Noda, M.** (1997). "Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures". *Genes Dev*. 11:1535-1547.
- Klimcakova, E., Roussel, B., Marquez-Quinones, A., Kovacova, Z., Kovacikova, M., Combes, M., Siklová-Vítková, M., Hejnová, J., Srámková, P., Bouloumié, A., Viguerie, N., Stich, V. y Langin, D.** (2011). "Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: decreased metabolism and increased immune response". *J Clin Endocrinol Metab*. 96:E73-82.
- Kosacka, J., Kern, M., Klötting, N., Paeschke, S., Rudich, A., Haim, Y., Gericke, M., Serke, H., Stumvoll, M., Bechmann, I., Nowicki, M. y Blüher, M.** (2015). "Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes". *Mol Cell Endocrinol*. 409:21-32.
- Kremer, B.E., Haystead, T. y Macara, I.G.** (2005). "Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4". *Mol Biol Cell*. 16:4648-4659.
- Kumar, N., Robidoux, J., Daniel, K.W., Guzman, G., Floering, L.M. y Collins, S.** (2007). "Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis". *J Biol Chem*. 282:9244-9250.
- Lafontan, M. y Langin, D.** (2009). "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue". *Prog Lipid Res*. 48:275-97.
- Lanthier, N. y Leclercq, I.A.** (2014). "Adipose tissues as endocrine target organs". *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 28:545-558.
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H. y Beylot, M.** (2004). "Metabolism of lipids in human white adipocyte". *Diabetes Metab*. 30:294-309.
- Le Lay, S., Hajduch, E., Lindsay, M.R., Le Lièvre, X., Thiele, C., Ferré, P., Parton, R.G., Kurzchalia, T., Simons, K. y Dugail, I.** (2006). "Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis". *Traffic*. 7:549-561.
- Levine, B., Liu, R., Dong, X. y Zhong, Q.** (2015). "Beclin orthologs: integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology". *Trends Cell Biol*. 25:533-544.
- Liang, H. y Ward, W.F.** (2006). "PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism". *Adv Physiol Educ*. 30:145-151.
- Lieber, J.G. y Evans, R.M.** (1996). "Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation". *J Cell Sci*. 109:3047-3058.
- Lim, E.L., Hollingsworth, K.G., Aribisala, B.S., Chen, M.J., Mathers, J.C. y Taylor, R.** (2011). "Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol". *Diabetologia*. 54:2506-2514.
- Linscheid, P., Christ-Crain, M., Stoeckli, R., Reusch, C.E., Lutz, T.A., Müller, B. y Keller, U.** (2008). "Increase in high molecular weight adiponectin by bariatric surgery-induced weight loss". *Diabetes Obes Metab*. 10:1266-1270.
- Löfgren, P., Andersson, I., Adolfsson, B., Leijonhufvud, B.M., Hertel, K., Hoffstedt, J. y Arner, P.** (2005). "Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in the postobese state". *J Clin Endocrinol Metab*. 90:6207-6213.
- López, J.A., Burchfield, J.G., Blair, D.H., Mele, K., Ng, Y., Vallotton, P., James, D.E. y Hughes, W.E.** (2009). "Identification of a distal GLUT4 trafficking event controlled by actin polymerization". *Mol Biol Cell*. 20:3918-3929.

- Lukoyanova, N., Baldwin, S.A. y Trinick, J.** (2008). "3D reconstruction of mammalian septin filaments". *J Mol Biol.* 376:1-7.
- Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L. y Saltiel, A.R.** (2007). "Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity". *Diabetes.* 56:16-23.
- Ma, X., Ren, X., Han, P., Hu, S., Wang, J. y Yin, J.** (2010). "SiRNA against Fabp5 induces 3T3-L1 cells apoptosis during adipocytic induction". *Mol Biol Rep.* 37:4003-4011.
- MacDougald, O.A. y Lane, M.D.** (1995). "Adipocyte differentiation. When precursors are also regulators". *Curr Biol.* 5:618-621.
- MacKenzie, E.L., Iwasaki, K. y Tsuji, Y.** (2008). "Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications". *Antioxid Redox Signal.* 10:997-1030.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. y Matsubara, K.** (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)". *Biochem Biophys Res Commun.* 221:286-289
- Maeda, N., Funahashi, T. y Shimomura, I.** (2008). "Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9". *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4:627-34.
- Maimaitiyiming, M., Kobayashi, Y., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Morita, M. y Maekawa, S.** (2013). "Identification of dynamin as a septin-binding protein". *Neurosci Lett.* 534:322-326.
- Maimaitiyiming, M., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Nagata, K., Suzaki, T. y Maekawa, S.** (2008). "Biochemical characterization of membrane-associated septin from rat brain". *J Neurochem.* 106:1175-1183.
- Malagón, M.M., Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Jiménez-Gómez, Y., Moreno, N.R., García-Navarro, S., Vázquez-Martínez, R. y Peinado, J.R.** (2013). "Adipobiology for novel therapeutic approaches in metabolic syndrome". *Curr Vasc Pharmacol.* 11:954-967.
- Malide, D., Ramm, G., Cushman, S.W. y Slot, J.W.** (2000). "Immunoelectron microscopic evidence that GLUT4 translocation explains the stimulation of glucose transport in isolated rat white adipose cells". *J Cell Sci.* 23:4203-4210.
- Malkani, S.** (2015). "An update on the role of bariatric surgery in diabetes management". *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 22:98-105.
- Manning, B.D. y Cantley, L.C.** (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream". *Cell.* 29:1261-1274.
- Mantzoros, C.S., Magkos, F., Brinkoetter, M., Sienkiewicz, E., Dardeno, T.A., Kim, S.Y., Hamnvik, O.P. y Koniaris, A.** (2011). "Leptin in human physiology and pathophysiology". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301:E567-E584.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G. y Hill, R.A.** (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions". *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26:1407-1433.
- Martin-Rodríguez, J.F., Cervera-Barajas, A., Madrazo-Atutxa, A., Garcia-Luna, P.P., Pereira, J.L., Castro-Luque, J., Leon-Justel, A., Morales-Conde, S., Castillo, J.R., Leal-Cerro, A. y Cano, D.A.** (2014). "Effect of bariatric surgery on microvascular dysfunction associated to metabolic syndrome: a 12-month prospective study". *Int J Obes (Lond).* 38:1410-1415.
- Masson, O., Chavey, C., Dray, C., Meulle, A., Daviaud, D., Quilliot, D., Muller, C., Valet, P. y Liaudet-Coopman, E.** (2009). "LRP1 receptor controls adipogenesis and is up-regulated in human and mouse obese adipose tissue". *PLoS One.* 4:e7422.
- Matsuda, M. y Shimomura, I.** (2013). "Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer". *Obes Res Clin Pract.* 7:e330-341.
- Maury, E. y Brichard, S.M.** (2010). "Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome". *Mol Cell Endocrinol.* 314:1-16.
- Mavrikakis, M., Azou-Gros, Y., Tsai, F.C., Alvarado, J., Bertin, A., Iv, F., Kress, A., Brasselet, S., Koenderink, G.H. y Lecuit, T.** (2014). "Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles". *Nat Cell Biol.* 16:322-334.
- Meek, C.L., Lewis, H.B., Reimann, F., Gribble, F.M. y Park, A.J.** (2015). "The effect of bariatric surgery on gastrointestinal and pancreatic peptide hormones". *Peptides.* 978100245-00244.
- Méndez-Giménez, L., Rodríguez, A., Balaguer, I. y Frühbeck, G.** (2014). "Role of aquaglyceroporins and caveolins in energy and metabolic homeostasis". *Mol Cell Endocrinol.* 397:78-92.
- Méndez-Giménez, L., Becerril, S., Moncada, R., Valentí, V., Ramírez, B., Lancha, A., Gurbindo, J., Balaguer, I., Cienfuegos, J.A., Catalán, V., Fernández, S., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A. y Frühbeck, G.** (2015). "Sleeve Gastrectomy Reduces Hepatic Steatosis by Improving the Coordinated Regulation of Aquaglyceroporins in Adipose Tissue and Liver in Obese Rats". *Obes Surg.* 397:78-92.
- Mendoza, M., Hyman, A.A. y Glotzer, M.** (2002). "GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin". *Curr Biol.* 12:1858-1863.

- Mirando, A.C., Francklyn, C.S. y Lounsbury, K.M.** (2014). "Regulation of angiogenesis by aminoacyl-tRNA synthetases". *Int J Mol Sci.* 15:23725-23748.
- Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A. y Kurzchalia, T.V.** (1995). "VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro". *Mol Biol Cell.* 6:911-927.
- Moreno-Navarrete, J.M., Novelle, M.G., Catalán, V., Ortega, F., Moreno, M., Gomez-Ambrosi, J., Xifra, G., Serrano, M., Guerra, E., Ricart, W., Frühbeck, G., Diéguez, C. y Fernández-Real, J.M.** (2014). "Insulin resistance modulates iron-related proteins in adipose tissue". *Diabetes Care.* 37:1092-1100.
- Morris, D.L. y Rui, L.** (2009). "Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E1247-E1259.
- Mostowy, S. y Cossart, P.** (2012). "Septins: the fourth component of the cytoskeleton". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:183-194.
- Mostowy, S., Danckaert, A., Tham, T.N., Machu, C., Guadagnini, S., Pizarro-Cerdá, J. y Cossart, P.** (2009). "Septin 11 restricts InlB-mediated invasion by *Listeria*". *J Biol Chem.* 284:11613-11621.
- Mostowy, S., Janel, S., Forestier, C., Roduit, C., Kasas, S., Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P. y Lafont, F.** (2011). "A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB and the Met receptor". *Biophys J.* 100:1949-1959.
- Mostowy, S., Tham, T.N., Danckaert, A., Guadagnini, A., Boisson-Dupuis, A., Pizarro-Cerdá, J. y Cossart, P.** (2009). "Septins Regulate Bacterial Entry into Host Cells". *PLoS ONE.* 4(1):e4196.
- Muller, M.J., Lagerpusch, M., Enderle, J., Schautz, B., Heller, M. y Bosy-Westphal, A.** (2012). "Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome". *Obes Rev.* 2:6-13.
- Münzberg, H., Laque, A., Yu, S., Rezai-Zadeh, K. y Berthoud, H.R.** (2015). "Appetite and body weight regulation after bariatric surgery". *Obes Rev.* 1:77-90.
- Nagata, K., Asano, T., Nozawa, Y. y Inagaki, M.** (2004). "Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11". *J Biol Chem.* 279:55895-55904.
- Nagata, K., Kawajiri, A., Matsui, S., Takagishi, M., Shiromizu, T., Saitoh, N., Izawa, I., Kiyono, T., Itoh, T.J., Hotani, H. y Inagaki, M.** (2003). "Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules". *J Biol Chem.* 278:18538-18543.
- Nakahira, M., Macedo, J.N., Seraphim, T.V., Cavalcante, N., Souza, T.A., Damalio, J.C., Reyes, L.F., Assmann, E.M., Alborghetti, M.R., Garratt, R.C., Araujo, A.P., Zanchin, N.I., Barbosa, J.A. y Kobarg, J.** (2010). "A draft of the human septin interactome". *PLoS One.* 5:e13799.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T.E. y Warren, G.** (1995). "Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130". *J Cell Biol.* 131:1715-1726.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T. y Tomita, M.** (1996). "Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma". *J Biochem.* 120:803-812.
- Naukkarinen, J., Heinonen, S., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Vuolteenaho, K., Saarinen, L., Hautaniemi, S., Rodríguez, A., Frühbeck, G., Pajunen, P., Hyötyläinen, T., Orešič, M., Moilanen, E., Suomalainen, A., Lundbom, N., Kaprio, J., Rissanen, A. y Pietiläinen, K.H.** (2014). "Characterising metabolically healthy obesity in weight-discordant monozygotic twins". *Diabetologia.* 57:167-176.
- Navet, R., Mathy, G., Douette, P., Dobson, R.L., Leprince, P., De Pauw, E., Sluse-Goffart, C. y Sluse, F.E.** (2007). "Mitoproteome plasticity of rat brown adipocytes in response to cold acclimation". *J Proteome Res.* 6:25-33.
- Netto, B.D., Bettini, S.C., Clemente, A.P., Ferreira, J.P., Boritza, K., Souza, S.F., Von der Heyde, M.E., Earthman, C.P. y Dâmaso, A.R.** (2015). "Roux-en-Y gastric bypass decreases pro-inflammatory and thrombotic biomarkers in individuals with extreme obesity". *Obes Surg.* 25:1010-1018.
- Nielsen, T.S., Jessen, N., Jørgensen, J.O., Møller, N. y Lund, S.** (2014). "Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease". *J Mol Endocrinol.* 52:R199-222.
- Nguyen, T.Q., Sawa, H., Okano, H. y White, J.G.** (2000). "The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis". *J Cell Sci.* 113:3825-3837.
- Ning, G.** (2015). "Decade in review-type 2 diabetes mellitus: At the centre of things". *Nat Rev Endocrinol.* En prensa.
- Nishihama, R., Onishi, M. y Pringle, J.R.** (2011). "New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septinas". *Biol Chem.* 392:681-687.
- Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. y Ho, W.K.** (1972). "A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues". *Science.* 177:56-58.
- Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K. y Flegal, K.M.** (2014). "Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012". *JAMA.* 311:806-814.

- Ogiso, H., Taniguchi, M. y Okazaki, T.** (2015). "Analysis of lipid-composition changes in plasma membrane microdomains". *J Lipid Res.* 56:1594-1605.
- O'Hara, A., Lim, F.L., Mazzatti, D.J. y Trayhurn, P.** (2009). "Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium". *Pflugers Arch.* 458:1103-1114.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E. y Lisanti, M.P.** (1998). "Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane". *J Biol Chem.* 273:5419-5422.
- Ostermeyer, A. G., Paci, J. M., Zeng, Y., Lublin, D. M., Munro, S. y Brown, D. A.** (2001). "Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets". *J Cell Biol.* 152:1071-1078.
- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J. y Walsh, K.** (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease". *Nat Rev Immunol.* 11:85-97.
- Oswal, A. y Yeo, G.** (2009). "Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity". *Obesity (Silver Spring).* 18(2):221-9.
- Otto, T.C. y Lane, M.D.** (2005). "Adipose development: from stem cell to adipocyte". *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40:229-242.
- Padwal, R.S. y Majumdar, S.R.** (2007). "Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant". *Lancet.* 369:71-77.
- Pan, F., Malmberg, R.L. y Momany, M.** (2007). "Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs". *BMC Evol Biol.* 1:103.
- Panunzi, S., De Gaetano, A., Carnicelli, A. y Mingrone, G.** (2015). "Predictors of remission of diabetes mellitus in severely obese individuals undergoing bariatric surgery: do BMI or procedure choice matter? A meta-analysis". *Ann Surg.* 261:459-467.
- Parton, R.G. y del Pozo, M.A.** (2013). "Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14:98-112.
- Parton, R.G. y Simons, K.** (2007). "The multiple faces of caveolae". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:185-194.
- Pasarica, M., Gowronska-Kozak, B., Burk, D., Remedios, I., Hymel, D., Gimble, J., Ravussin, E., Bray, G.A. y Smith, S.R.** (2009). "Adipose tissue collagen VI in obesity". *J Clin Endocrinol Metab.* 94:5155-5162.
- Pasarica, M., Rood, J., Ravussin, E., Schwarz, J.M., Smith, S.R. y Redman, L.M.** (2010). "Reduced oxygenation in human obese adipose tissue is associated with impaired insulin suppression of lipolysis". *J Clin Endocrinol Metab.* 95:4052-4055.
- Peinado, J.R., Quirós, P.M., Pulido, M.R., Mariño, G., Martínez-Chantar, M.L., Vázquez-Martínez, R., Freije, J.M., López-Otín, C. y Malagón, M.M.** (2011). "Proteomic profiling of adipose tissue from *Zmpste24*^{-/-} mice, a model of lipodystrophy and premature aging, reveals major changes in mitochondrial function and vimentin processing". *Mol Cell Proteomics.* 10:M111.008094.
- Peiró, S., Comella, J.X., Enrich, C., Martín-Zanca, D. y Rocamora, N.** (2000). "PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation". *J Biol Chem.* 275:37846-37852.
- Pellegrinelli, V., Heuvingh, J., du Roure, O., Rouault, C., Devulder, A., Klein, C., Lacasa, M., Clément, E., Lacasa, D. y Clément, K.** (2014). "Human adipocyte function is impacted by mechanical cues". *J Pathol.* 233:183-195.
- Perez-Perez, R., Garcia-Santos, E., Ortega-Delgado, F.J., Lopez, J.A., Camafeita, E., Ricart, W., Fernández-Real, J.M. y Peral, B.** (2012). "Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue". *J Proteomics.* 75:783-795.
- Permana, P.A., Nair, S., Lee, Y.H., Luczy-Bachman, G., Vozarova De Courten, B. y Tataranni, P.A.** (2004). "Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286:E958-E962.
- Pessin, J.E. y Saltiel, A.R.** (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance". *J Clin Invest* 106:165-169.
- Peterson, E.A. y Petty, E.M.** (2010). "Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease". *Clin Genet.* 77:511-524.
- Petrosino, J.M., Disilvestro, D. y Ziouzenkova, O.** (2014). "Aldehyde dehydrogenase 1A1: friend or foe to female metabolism?". *Nutrients.* 6:950-973.
- Pham, T., DiCiccio, J.E. y Trimble, W.S.** (2014). "Cytoskeleton: septins do the horizontal tango". *Curr Biol.* 24:R324-R327.
- Phillips, C. M., Dillon, C., Harrington, J. M., McCarthy, V. J., Kearney, P. M., Fitzgerald, A. P. y Perry, I. J.** (2013). "Defining metabolically healthy obesity: role of dietary and lifestyle factors". *PLoS ONE.* 8:e76188.

- Phillips, S.A., Ciaraldi, T.P., Oh, D.K., Savu, M.K. y Henry, R.R.** (2008). "Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue" *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E842-E850.
- Pilch, P.F., Meshulam, T., Ding, S. y Liu, L.** (2011). "Caveolae and lipid trafficking in adipocytes". *Clin Lipidol.* 6:49-58.
- Pilch, P.F. y Liu, L.** (2011). "Fat caves: caveolae, lipid trafficking and lipid metabolism in adipocytes". *Trends Endocrinol Metab.* 22:318-324.
- Pohl, J., Ring, A., Eehalt, R., Schulze-Bergkamen, H., Schad, A., Verkade, P. y Stremmel, W.** (2004). "Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function". *Biochemistry.* 43:4179-4187.
- Pohl, J., Ring, A., Korkmaz, U., Eehalt, R. y Stremmel, W.** (2005). "FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts". *Mol Biol Cell.* 16:24-31.
- Pol, A., Martin, S., Fernández, M.A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C. y Parton, R.G.** (2005). "Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies". *Mol Biol Cell.* 16:2091-2105.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E. y Parton, R.G.** (2001). "A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance". *J Cell Biol.* 152:1057-1070.
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ferguson, C., Carozzi, A., Luetterforst, R., Enrich, C. y Parton, R.G.** (2004). "Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant". *Mol Biol Cell.* 15:99-110.
- Primeau, V., Coderre, L., Karelis, A.D., Brochu, M., Lavoie, M.E., Messier, V., Sladek, R. y Rabasa-Lhoret, R.** (2011). "Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy". *Int J Obes (Lond).* 35:971-981.
- Prior, M.J., Larance, M., Lawrence, R.T., Soul, J., Humphrey, S., Burchfield, J., Kistler, C., Davey, J.R., La-Borde, P.J., Buckley, M., Kanazawa, H., Parton, R.G., Guilhaus, M. y James, D.E.** (2011). "Quantitative proteomic analysis of the adipocyte plasma membrane". *J Proteome Res.* 10:4970-4982.
- Råfols, E.M.** (2014). "Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity". *Endocrinol Nutr.* 61:100-112.
- Razani, B., Combs, T.P., Wang, X.B., Frank, P.G., Park, D.S., Russell, R.G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L.A., Scherer, P.E. y Lisanti, M.P.** (2002). "Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities". *J Biol Chem.* 277:8635-8647.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M. y Hanson, R.W.** (2003). "Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle". *J Biol Chem.* 278:30413-30416.
- Richards, M.R., Harp, J.D., Ory, D.S. y Schaffer, J.E.** (2006). "Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes". *J Lipid Res.* 47:665-672.
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P. y Stremmel, W.** (2006). "Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts". *Biochim Biophys Acta.* 1761:416-423.
- Ritcher, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M.R., Morgan, G.P., Marsh, B.J. y Parton, R.G.** (2007). "High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveolacytoskeleton interactions". *Traffic.* 9:893-909.
- Robertson, C., Church, S.W., Nagar, H.A., Price, J., Hall, P.A. y Russell, S.E.** (2004). "Properties of SEPT9 isoforms and the requirement for GTP binding". *J Pathol.* 203:519-527.
- Rodríguez, A., Catalán, V., Becerril, S., Gil, M.J., Mugueta, C., Gómez-Ambrosi, J. y Frühbeck, G.** (2008). "Impaired adiponectin-AMPK signalling in insulin-sensitive tissues of hypertensive rats". *Life Sci.* 83:540-549.
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J. y Frühbeck, G.** (2007). "Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome?". *Curr Pharm Des.* 13:2169-2175.
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J. y Frühbeck, G.** (2011). "Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control". *Cell Cycle.* 10:1548-1556.
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., García-Navarro, S., Rotellar, F., Valentí, V., Silva, C., Gil, M.J., Salvador, J., Burrell, M.A., Calamita, G., Malagón, M.M. y Frühbeck, G.** (2011). "Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade". *J Clin Endocrinol Metab.* 96:E586-E597.
- Rodríguez, A., Ezquerro, S., Méndez-Giménez, L., Becerril, S. y Frühbeck, G.** (2015). "Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* En prensa.
- Rodríguez, A., Gomez-Ambrosi, J., Catalan, V., Rotellar, F., Valenti, V., Silva, C., Mugueta, C., Pulido, M.R., Vazquez, R., Salvador, J., Malagón, M.M., Colina, I. y Frühbeck, G.** (2012). "The ghrelin O-

acyltransferase-ghrelin system reduces TNF-alpha-induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes". *Diabetologia*. 55:3038-3050.

Ronti, T., Lupattelli, G. y Mannarino, E. (2006). "The endocrine function of adipose tissue: an update". *Clin Endocrinol*. 64:355-65.

Ros-Baro, A., Lopez-Iglesias, C., Peiro, S., Bellido, D., Palacin, M., Zorzano, A. y Camps, M. (2001). "Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells". *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:12050-12055.

Ross, R. y Bradshaw, A.J. (2009). "The future of obesity reduction: beyond weight loss". *Nat Rev Endocrinol*. 5:319-325.

Ryden, M., Andersson, D.P., Bernard, S., Spalding, K. y Arner, P. (2013). "Adipocyte triglyceride turnover and lipolysis in lean and overweight subjects". *J Lipid Res*. 54:2909-2913.

Saarikangas, J. y Barral, Y. (2011). "The emerging functions of septins in metazoans". *EMBO Rep*. 12:1118-1126.

Saavedra, P., Girona, J., Bosquet, A., Guaita, S., Canela, N., Aragonès, G., Heras, M. y Masana, L. (2015). "New insights into circulating FABP4: Interaction with cytokeratin 1 endothelial cells membranes". *Biochim Biophys Acta*. 1853:2966-2974.

Sadian, Y., Gatsogiannis, C., Patasi, C., Hofnagel, O., Goody, R.S., Farkasovský, M. y Raunser, S. (2013). "The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation". *Elife*. 2:e01085.

Santama, N., Er, C.P., Ong, L.L. y Yu, H. (2004). "Distribution and functions of kinectin isoforms". *J Cell Sci*. 117:4537-4549.

Scarpulla, R.C. (2011). "Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network". *Biochim Biophys Acta*. 1813:1269-1278.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. y Lodish, H.F. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes". *J Biol Chem*. 270:26746-26749.

Seeley, R.J., Chambers, A.P. y Sandoval, D.A. (2015). "The role of gut adaptation in the potent effects of multiple bariatric surgeries on obesity and diabetes". *Cell Metab Mar*. 21:369-378.

Seger, J.C., Horn, D.B., Westman, E.C., Lindquist, R., Scinta, W., Richardson, L.A., Primack, C., Bryman, D.A., McCarty, W., Hendricks, E., Sadowitz, B.N., Schmidt, S.L. y Bays, H.E. (2014). "Obesity Algorithm". American Society of Bariatric Physicians website: American Society of Bariatric Physicians.

Scott, W.R. y Batterham, R.L. (2011). "Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: understanding weight loss and improvements in type 2 diabetes after bariatric surgery". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 301:R15-R27.

Sellin, M.E., Sandblad, L., Stenmark, S. y Gullberg, M. (2011). "Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes". *Mol Biol Cell*. 22:3152-3164.

Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M. y Galitzky, J. (2002). "Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes". *J Biol Chem*. 278:48617-48626.

Sheffield, P.J., Oliver, C.J., Kremer, B.E., Sheng, S., Shao, Z. y Macara, I.G. (2003). "Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments". *J Biol Chem*. 278:3483-3488.

Schmoranzner, J. y Simon, S.M. (2003). "Role of microtubules in fusion of post-Golgi vesicles to the plasma membrane". *Mol Biol Cell*. 14:1558-1569.

Shen, W.J., Patel, S., Eriksson, J.E. y Kraemer, F.B. (2010). "Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis". *J Proteome Res*. 9:1786-1794.

Sjostrom, L. (2013). "Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery". *J Intern Med*. 273:219-234.

Souto, R.P., Vallega, G., Wharton, J., Vinten, J., Trantum-Jensen, J. y Pilch, P.F. (2003). "Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling". *J Biol Chem*. 278:18321-18329.

Spencer, B., Crews, L. y Masliah, E. (2007). "Climbing the scaffolds of Parkinson's disease pathogenesis". *Neuron*. 53:469-470.

Spiegelman, B.M., Choy, L., Hotamisligil, G.S., Graves, R.A. y Tontonoz, P. (1993). "Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes". *J Biol Chem*. 268:6823-6826.

Spiegelman, B.M. y Farmer, S.R. (1982). "Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes". *Cell*. 29:53-60.

Spiliotis, E.T., Kinoshita, M. y Nelson, W.J. (2005). "A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation". *Science*. 307:1781-1785.

Stahl, A. (2004). "A current review of fatty acid transport proteins (SLC27)". *Pflugers Arch*. 447:722-727.

- Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D. y Lodish, H.F.** (2002). "Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes". *Dev Cell*. 2:477-488.
- Stahl, A., Gimeno, R.E., Tartaglia, L.A. y Lodish, H.F.** (2001). "Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family". *Trends Endocrinol Metab*. 12:266-273.
- Stahlhut, M. y van Deurs, B.** (2000). "Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton". *Mol Biol Cell*. 11:325-337.
- Stall, R., Ramos, J., Kent Fulcher, F. y Patel, Y.M.** (2014). "Regulation of myosin IIA and filamentous actin during insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes". *Exp Cell Res*. 322:81-88.
- Stanley, K.K. y Howell, K.E.** (1993). "TGN38/41: a molecule on the move". *Trends Cell Biol*. 3:252-255.
- Stark, R., Pasquel, F., Turcu, A., Pongratz, R.L., Roden, M., Cline, G.W., Shulman, G.I. y Kibbey, R.G.** (2009). "Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion". *J Biol Chem*. 284:26578-26590.
- Stefan, N., Haring, H.-U., Hu, F. B. y Schulze, M. B.** (2013). "Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications". *Lancet Diabetes Endocrinol*. 1:152-162.
- Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A. y Haring, H. U.** (2008). "Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans". *Arch Intern Med*. 168:1609-1616.
- Storch, J. y McDermott, L.** (2009). "Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins". *J Lipid Res*. 50:S126-S131.
- Storch, J. y Thumser, A.E.** (2010). "Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family". *J Biol Chem*. 285:32679-32683.
- Strålfors, P.** (2012). "Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes". *Adv Exp Med Biol*. 729:111-126.
- Stremmel, W., Pohl, L., Ring, A. y Herrmann, T.** (2001). "A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids". *Lipids*. 36:981-989.
- Sun, K., Kusminski, C.M. y Scherer, P.E.** (2011). "Adipose tissue remodeling and obesity". *J Clin Invest*. 121:2094-2101.
- Surka, M.C., Tsang, C.W. y Trimble, W.S.** (2002). "The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis". *Mol Biol Cell*. 13:3532-3545.
- Sweeting, A.N., Hocking, S.L. y Markovic, T.P.** (2015). "Pharmacotherapy for the Treatment of Obesity". *Mol Cell Endocrinol*. 7207:30071-X.
- Takahashi, Y., Shinoda, A., Furuya, N., Harada, E., Arimura, N., Ichi, I., Fujiwara, Y., Inoue, J. y Sato, R.** (2013). "Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation". *PLoS One*. 8:e64605.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. y Akira, S.** (1997). "Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene". *EMBO J*. 16:7432-7443.
- Tchkonina, T., Tchoukalova, Y.D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R.A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M.D. y 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:E267-277.
- Teichert-Kuliszewska, K., Hamilton, B.S., Roncari, D.A., Kirkland, J.L., Gillon, W.S., Deitel, M. y Hollenberg, C.H.** (1996). "Increasing vimentin expression associated with differentiation of human and rat preadipocytes". *Int J Obes Relat Metab Disord*. 3:S108-S113.
- Thomas, C.M. y Smart, E.J.** (2008). "Caveolae structure and function". *J Cell Mol Med*. 12:796-809.
- Thompson, B.R., Lobo, S. y Bernlohr, D.A.** (2010). "Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking". *Mol Cell Endocrinol*. 318:24-33.
- Tinahones, F.J., Coin-Araguez, L., Mayas, M.D., Garcia-Fuentes, E., Hurtado-Del-Pozo, C., Vendrell, J., Cardona, F., Calvo, R.M., Obregon, M.J. y El Bekay, R.** (2012). "Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels". *BMC Physiol*. 12:4.
- Tong, Q., Tsai, J., Tan, G., Dalgin, G. y Hotamisligil, G.S.** (2005). "Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation". *Mol Cell Biol*. 25:706-15.
- Trayhurn, P.** (2013). "Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity". *Physiol Rev*. 93:1-21.
- Trigatti, B.L., Anderson, R.G. y Gerber, G.E.** (1999). "Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein". *Biochem Biophys Res Commun*. 255:34-39.

- Tsao, T.S., Tomas, E., Murrey, H.E., Hug, C., Lee, D.H., Ruderman, N.B., Heuser, J.E. y 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.
- Tzima, E. y Schimmel, P.** (2006). "Inhibition of tumor angiogenesis by a natural fragment of a tRNA synthetase". *Trends Biochem Sci.* 31:7-10.
- van Beek, L., Lips, M.A., Visser, A., Pijl, H., Ioan-Facsinay, A., Toes, R., Berends, F.J., Willems, van Dijk, K., Koning, F. y van Harmelen, V.** (2014). "Increased systemic and adipose tissue inflammation differentiates obese women with T2DM from obese women with normal glucose tolerance". *Metabolism.* 63:492-501.
- van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A.M. y Sandvig, K.** (2003). "Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean". *Trends Cell Biol.* 13:92-100.
- Van Tienen, F.H., van der Kallen, C.J., Lindsey, P.J., Wanders, R.J., van Greevenbroek, M.M. y Smeets, H.J.** (2011). "Preadipocytes of type 2 diabetes subjects display an intrinsic gene expression profile of decreased differentiation capacity". *Int J Obes (Lond).* 35:1154-1164.
- Vazquez-Martinez, R., Martinez-Fuentes, A.J., Pulido, M.R., Jimenez-Reina, L., Quintero, A., Leal-Cerro, A., Soto, A., Webb, S.M., Sucunza, N., Bartumeus, F., Benito-Lopez, P., Galvez-Moreno, M.A., Castaño, J.P. y Malagon, M.M.** (2008). "Rab18 is reduced in pituitary tumors causing acromegaly and its overexpression reverts growth hormone hypersecretion". *J Clin Endocrinol Metab.* 93:2269-2276.
- Vega, I.E. y Hsu, S.C.** (2003). "The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells". *Neuroreport.* 14:31-37.
- Versele, M. y Thorner, J.** (2004). "Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4". *J Cell Biol.* 164:701-715.
- Versele, M.L. y Thorner, J.** (2005). "Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual". *Trends Cell Biol.* 15:414-424.
- Verstraeten, V.L., Renes, J., Ramaekers, F.C., Kamps, M., Kuijpers, H.J., Verheyen, F., Wabitsch, M., Steijlen, P.M., van Steensel, M.A. y Broers, J.L.** (2011). "Reorganization of the nuclear lamina and cytoskeleton in adipogenesis". *Histochem Cell Biol.* 135:251-261.
- Vettakkorumakankav, N. y Patel, M.S.** (1996). "Dihydrolipoamide dehydrogenase: structural and mechanistic aspects". *Indian J Biochem Biophys.* 33:168-176.
- Viengchareun, S., Zennaro, M.C., Pascual-Le Tallec, L. y Lombe, M.** (2002). "Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin". *FEBS Lett.* 532:345-350.
- Vigneri, R., Squatrito, S. y Sciacca, L.** (2010). "Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors". *Acta Diabetol.* 47:271-278.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerbäck, S. y Nuutila, P.** (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults". *N Engl J Med.* 360:1518-1525.
- Virtue, S. y Vidal-Puig, A.** (2010). "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective". *Biochim Biophys Acta.* 1801:338-349.
- von der Malsburg, K., Muller, J.M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D., Hutu, D.P., Zerbes, R.M., Schulze-Specking, A., Meyer, H.E., Martinou, J.C., Rospert, S., Rehling, P., Meisinger, C., Veenhuis, M., Warscheid, B., van der Klei, I.J., Pfanner, N., Chacinska, A. y van der Laan, M.** (2011). "Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis". *Dev Cell.* 21:694-707.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. y Scheurich, P.** (2003). "Tumor necrosis factor signaling". *Cell Death Differ.* 10:45-65.
- Wajchenberg, B.L.** (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome". *Endocr Rev.* 21:697-738.
- Waki, H. y Tontonoz, P.** (2007). "Endocrine functions of adipose tissue". *Annu Rev Pathol.* 2:31-56.
- Wasik, A.A., Polianskyte-Prause, Z., Dong, M.Q., Shaw, A.S., Yates, J.R. 3rd, Farquhar, M.G. y Lehtonen, S.** (2012). "Septin 7 forms a complex with CD2AP and nephrin and regulates glucose transporter trafficking". *Mol Biol Cell.* 23:3370-3379.
- Watson, R.T., Kanzaki, M. y Pessin, J.E.** (2004). "Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes". *Endocr Rev.* 25:177-204.
- Watson, R.T., Shigematsu, S., Chiang, S.H., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I.G., Saltiel, A.R. y Pessin, J.E.** (2001). "Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation". *J Cell Biol.* 154:829-840.
- Weirich, C.S., Erzberger, J.P. y Barral, Y.** (2008). "The septin family of GTPases: architecture and dynamics". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:478-489.

- White, M.F.** (2003). "Insulin signaling in health and disease". *Science*. 302:1710-1711.
- Williams, T.M. y Lisanti, M.P.** (2004). "The caveolin proteins". *Genome Biol.* 5:214.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P. y Spiegelman, B.M.** (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human". *Cell*. 150:366-376.
- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J. y Spiegelman, B.M.** (1999). "Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity". *Mol Cell*. 3:151-158.
- Xie, H., Surka, M., Howard, J. y Trimble, W.S.** (1999). "Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins". *Cell Motil Cytoskeleton*. 43:52-62.
- Xie, W., Hamilton, J.A., Kirkland, J.L., Corkey, B.E. y Guo, W.** (2006). "Oleate-induced formation of fat cells with impaired insulin sensitivity". *Lipids*. 41:267-271.
- Xie, Y., Vessey, J.P., Konecna, A., Dahm, R., Macchi, P. y Kiebler, M.A.** (2007). "The GTPbinding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology". *Curr Biol*. 17:1746-1751.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M.P., Myers, M.G. y Ishikawa, Y.** (1998). "Caveolin is an activator of insulin receptor signaling". *J Biol Chem*. 273:26962-26968.
- 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. y Kadowaki, T.** (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects". *Nature*. 423:762-769.
- Yang, W., Guo, X., Thein, S., Xu, F., Sugii, S., Baas, P.W., Radda, G.K. y Han, W.** (2013). "Regulation of adipogenesis by cytoskeleton remodelling is facilitated by acetyltransferase MEC-17-dependent acetylation of alpha-tubulin". *Biochem J*. 449:605-612.
- Yang, W., Thein, S., Wang, X., Bi, X., Ericksen, R.E., Xu, F. y Han, W.** (2014). "BSCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodeling". *Hum Mol Genet*. 23:502-513.
- Yang, Z., Li, H., Chai, Z., Fullerton, M.J., Cao, Y., Toh, B.H., Funder, J.W. y Liu, J.P.** (2001). "Dynamin II regulates hormone secretion in neuroendocrine cells." *J Biol Chem*. 276:4251-4260.
- Yanovski, S.Z. y Yanovski, J.A.** (2014). "Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review". *JAMA*. 311:74-86.
- Yu, J., Zhou, X., Li, L., Li, S., Tan, J., Li, Y. y Sun, X.** (2015). "The long-term effects of bariatric surgery for type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of randomized and non-randomized evidence". *Obes Surg*. 25:143-158.
- Yuan, T., Hong, S., Yao, Y. y Liao, K.** (2007). "Glut-4 is translocated to both caveolae and non-caveolar lipid rafts, but is partially internalized through caveolae in insulin-stimulated adipocytes". *Cell Res*. 17:772-782.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A. y Madeo, F.** (2012). "FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling". *Cell Metab*. 15:279-291.
- Zeigerer, A., Lampson, M.A., Karylowski, O., Sabatini, D.D., Adesnik, M., Ren, M. y McGraw, T.E.** (2002). "GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps". *Mol Biol Cell*. 13:2421-2435.
- Zenker, J., Stettner, M., Ruskamo, S., Domènech-Estévez, E., Baloui, H., Médard, J.J., Verheijen, M.H., Brouwers, J.F., Kursula, P., Kieseier, B.C. y Chrast, R.** (2014). "A role of peripheral myelin protein 2 in lipid homeostasis of myelinating Schwann cells". *Glia*. 62:1502-1512.
- Zhang, H.H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C. y 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*. 51:2929-2935.
- Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P.S., Grinstein, S. y Trimble, W.S.** (1999). "Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP". *Curr Biol*. 9:1458-1467.
- Zhang, W., Mottillo, E.P., Zhao, J., Gartung, A., VanHecke, G.C., Lee, J.F., Maddipati, K.R., Xu, H., Ahn, Y.H., Proia, R.L., Granneman, J.G. y Lee, M.J.** (2014). "Adipocyte lipolysis-stimulated interleukin-6 production requires sphingosine kinase 1 activity". *J Biol Chem*. 289:32178-32185.
- Zhou, S.L., Stump, D., Sorrentino, D., Potter, B.J. y Berk, P.D.** (1992). "Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein". *J Biol Chem*. 267:14456-14461.
- Zu, L., He, J., Jiang, H., Xu, C., Pu, S. y Xu, G.** (2009). "Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway". *J Biol Chem*. 284:5915-5926.