

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

**PAPEL DE LAS CAVEOLAS/CAVEOLINA-1
EN LA FISIOLÓGÍA DEL ADIPOCITO**

Elena González Muñoz
Tesis Doctoral
Barcelona, 2007

INTRODUCCIÓN

1 Definición y características de los *rafts* lipídicos

El modelo de organización de la membrana plasmática de Singer-Nicholson llamado “mosaico fluido” propone que la bicapa lipídica funciona como un solvente bidimensional neutral, que tiene poca influencia sobre la función de las proteínas de membrana. Sin embargo, hoy sabemos que las membranas celulares contienen gran variedad de lípidos que difieren en sus propiedades físico-químicas y que las interacciones entre lípidos dan lugar a organizaciones laterales heterogéneas en el plano de la membrana plasmática. Un tipo de estas organizaciones es lo que se denominan *rafts* lipídicos (*lipid rafts*) (Sankaram and Thompson, 1990; Simons and Ikonen, 1997a).

Simons e Ikonen (Simons *et al.*, 1997a), propusieron un modelo de membrana plasmática donde la organización lateral de colesterol y esfingolípidos (esfingomiolina y glicosfingolípidos) en la cara exoplasmática de la bicapa crea plataformas flotantes denominadas *rafts* (balsas) en un entorno rico en glicerofosfolípidos (Figura 1).

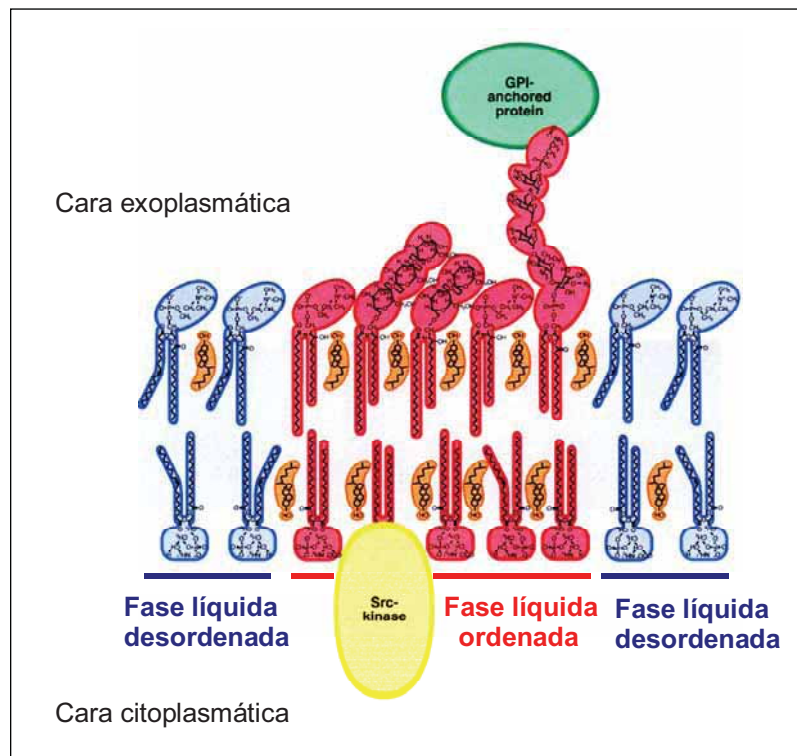


Figura 1 Modelo de organización lipídica en los microdominios *rafts* según Simons e Ikonen. La cara exoplasmática está enriquecida en glicosfingolípidos y esfingomiolina. (Adaptado de (Simons and Toomre, 2000b).

La formación de los microdominios *rafts* depende principalmente de las propiedades biofísicas de los glicerofosfolípidos y esfingolípidos (Harder and Simons, 1997). En la bicapa lipídica, las diferentes especies de lípidos están distribuidas de forma asimétrica entre la cara exoplasmática y la citoplasmática (figura 1). En la cara exoplasmática, los esfingolípidos se asocian lateralmente, mediante interacciones débiles, a través de las cabezas de carbohidratos de los glicoesfingolípidos. Las agrupaciones de estos carbohidratos de los esfingolípidos ocupan áreas más grandes que sus cadenas de hidrocarbonadas lipídicas predominantemente saturadas. Los espacios vacíos entre los esfingolípidos asociados lateralmente son ocupados por moléculas de colesterol que funcionan como espaciadores (Simons *et al.*, 1997a; Simons and Vaz, 2004).

La cara citoplasmática de los *rafts* está probablemente enriquecida en fosfolípidos con ácidos grasos saturados y colesterol, aunque su caracterización todavía es incompleta (Parton and Richards, 2003). Consideraciones teóricas predicen que un empaquetamiento en forma de fase líquida ordenada en la cara exoplasmática lleva a un empaquetamiento más ordenado también en la cara citoplasmática (Israelachvili, 1973).

No está del todo claro cómo interaccionan la cara exoplasmática y la citoplasmática. Una posibilidad es que los ácidos grasos largos de los esfingolípidos (generalmente una amida unida a la base de la esfingosina) penetren en la otra cara y acoplen la cara citoplasmática y la exoplasmática mediante interdigitaciones. Las proteínas transmembrana podrían estabilizar este acoplamiento (Simons *et al.*, 2000b).

La membrana que rodea a los *rafts* lipídicos es más fluida, porque contiene fosfolípidos con ácidos grasos insaturados; es decir, los *rafts* lipídicos forman una fase líquida ordenada en la bicapa lipídica, dispersos en una matriz líquida desordenada de glicerolípidos insaturados (Schroeder *et al.*, 1994; Brown and London, 1998a; Simons *et al.*, 2000b). El colesterol se distribuye preferentemente en la fase líquida ordenada, en comparación con la matriz de fase líquida desordenada de la membrana, y es esencial para el mantenimiento de las dos fases. (Simons and Ikonen, 2000a).

Los métodos usados para determinar la medida, la forma y la localización de los *rafts* lipídicos han dado resultados diferentes. Así, por ejemplo, el estudio de los *rafts* mediante la técnica convencional del FRET (*fluorescence resonant energy transfer*) no permite establecer la medida del *raft* lipídico, probablemente porque la densidad de la proteína marcada es tan baja que no puede soportar el FRET intermolecular (Kenworthy *et al.*, 2000). Mediante la técnica del *laser trap* la medida de los *rafts* lipídicos es de unos 50nm y mediante el entrecruzamiento molecular (*molecular cross-linking*) la medida es de unos 70nm (Pralle *et al.*, 2000) (resumen tabla 1).

Tampoco se han podido aislar *rafts* lipídicos en estado nativo. Para aislar y caracterizar los *rafts* se ha utilizado la característica de que son insolubles en Tritón-X-100 al 1% a 4°C y en otros detergentes no iónicos, como CHAPS (3-[(3-cholamido propyl)-dimethylammonio]-l-propane sulfonate) también a 4°C (Brown and Rose, 1992; Parton and Simons, 1995).

TÉCNICA	INFORMACIÓN	COMENTARIOS
Densidad de flotación de las membranas resistentes a detergentes (DRMs)	Identifica posibles elementos (proteínas, lípidos...) asociados a <i>rafts</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Fácil de hacer •La técnica más común usada para identificar posibles proteínas involucradas en señalización •Posibles resultados artefactuales •Asociaciones débiles con los <i>rafts</i> son difícilmente detectables
<i>Antibody patching</i> y microscopía de inmunofluorescencia	Identifica posibles asociaciones a <i>rafts</i> .	<ul style="list-style-type: none"> •Fácil de hacer •Uso habitual •Mejor que la densidad de flotación para detectar interacciones débiles •La variabilidad entre células hace que sea difícil la cuantificación
Microscopía electrónica	Determina la localización de componentes de los <i>rafts</i> .	<ul style="list-style-type: none"> •Resultados prometedores •Requiere experiencia en la técnica
<i>Crosslinking</i> químico	Identifica complejos proteicos en <i>raft</i> nativos	<ul style="list-style-type: none"> •Comienza su uso •La elección de las condiciones y reactivos adecuados es semiempírica
<i>Single fluorophore tracking microscopy</i>	Monitoriza la difusión y el movimiento de proteínas o lípidos individuales de los <i>rafts</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Requiere un equipamiento y personal altamente especializado
Microscopía de fuerza fotónica	Determina la constante de difusión, tamaño y movimiento de <i>rafts</i> individuales	<ul style="list-style-type: none"> •Técnica muy informativa •Requiere un equipamiento y personal altamente especializado •Adquisición y análisis muy lento
FRET (<i>fluorescence resonant energy transfer</i>)	Detecta si dos componentes del <i>raft</i> están espacialmente juntos (por ejemplo, < 10nm)	<ul style="list-style-type: none"> •Técnica informativa •La elección de las sondas donante y aceptora es muy importante
<i>Laser trap</i>	Determina el tamaño y movimiento de los <i>rafts</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un equipamiento y personal altamente especializado

Tabla 1. Resumen de algunas técnicas para identificar *rafts* lipídicos. Adaptada de (Simons *et al.*, 2000b). La alteración de los *rafts* mediante la eliminación o secuestro del colesterol ha sido muy útil como control para cada una de estas técnicas (tabla2)

En función de la metodología utilizada en el proceso de extracción y del tipo celular usado, la composición de los *rafts* lipídicos es muy variable y este hecho ha llevado a una variada y confusa nomenclatura a la hora de designar a estos microdominios: DRMs (*detergent resistant membranes*), DIGs (*detergent insoluble glycolipid rich domain*), DIC (*detergent insoluble complex*), TIFF (*Tritón-X-100 insoluble floating fraction*), LDM (*low density membranes*).

Actualmente, la definición más aceptada para designar a los *rafts* es la propuesta por Toomre *et al.* (2000). Según estos autores, los *rafts* lipídicos se caracterizan por:

- Su composición: glicoesfingolípidos, colesterol, proteínas con grupos acil, proteínas transmembrana
- Sus propiedades: 50-100nm de diámetro, movilidad ($-10^{-8} \text{ cm}^2\text{seg}^{-1}$), es una fase líquida ordenada
- Los *rafts* nativos sólo se observan en células vivas
- Son membranas resistentes a detergentes no iónicos (DRMs)

Así, en el reciente congreso “*Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*” (March 23-28, 2006 in Steamboat Springs, CO) se definió a los *rafts* lipídicos como dominios de membrana pequeños (10-200nm), heterogéneos, altamente dinámicos, y altamente enriquecidos en esterol y esfingolípidos. Estos dominios especializados de la membrana

plasmática compartimentalizan procesos celulares. Pequeños *rafts* en ocasiones pueden estabilizarse y formar plataformas mayores mediante interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (Pike, 2006).

Una aproximación muy usada para la investigación de los *rafts* ha sido la manipulación de sus constituyentes lipídicos (tabla2). Estos tratamientos llevan a la disociación de proteínas de los *rafts*, lo cual puede ser detectado mediante las técnicas usadas para analizar la asociación a *rafts* (tabla1).

Secuestro del colesterol	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos: Filipina, Nistatina, Amphotericina • Agentes formadores de poros: Saponina, Digitonina, Streptolisina O
Eliminación del colesterol	<ul style="list-style-type: none"> • β-ciclodextrina, metil-β-ciclodextrina
Inhibición de la síntesis de colesterol	<ul style="list-style-type: none"> • Lovastina
Perturbación de la estabilidad de los <i>rafts</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Colesterol exógeno • Gangliósidos exógenos • Ácidos grasos poliinsaturados exógenos

Tabla 2. Herramientas comunes usadas para alterar los *rafts* lipídicos. Adaptada de (Simons *et al.*, 2000b).

1.1 Proteínas asociadas a los *rafts* lipídicos

Una de las propiedades más importantes de los *rafts* lipídicos es que pueden incluir o excluir diferentes clases de proteínas (Brown *et al.*, 1998a). Dentro de las proteínas con afinidad por los *rafts* encontramos:

- Proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) de la cara externa de la membrana. Se localizan en los *rafts* a través de las interacciones con la cadena acil (Brown *et al.*, 1992; Rodgers *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1998a; Hooper, 1999; Chatterjee and Mayor, 2001).
- Proteínas de membrana doblemente aciladas como las quinasas de la familia Src y las subunidades α de las proteínas G heterotriméricas. Estas proteínas presentan el motivo Met-Gly-Cys en el dominio N-terminal donde el residuo Gly está miristoilado y el residuo Cys está palmitoilado, y mediante estas modificaciones lipídicas se anclan a la membrana (Resh, 1999).
 - Proteínas asociadas a colesterol, como las caveolinas (Kurzchalia and Parton, 1999).
 - Proteínas palmitoiladas y/o miristoiladas como las flotilinas (Rajendran *et al.*, 2003).
 - Proteínas transmembrana que a menudo están palmitoiladas (Brown and London, 1998c).
 - Proteínas unidas a fosfolípidos, como las anexinas (Babiychuk *et al.*, 2002).

Las proteínas unidas a GPI o que presentan alguna modificación hidrofóbica (como palmitoilaciones), se anclan a los *rafts* de la membrana mediante estas moléculas o modificaciones. Todavía no está claro como se asocian a los *rafts* las proteínas transmembrana, aunque parece ser que los aminoácidos de estos dominios transmembrana próximos a la cara exoplasmática tienen un papel clave (Scheiffele *et al.*, 1997), en cualquier caso, los dominios transmembrana de las proteínas tienen que estar intercalados de tal manera que se mantenga la estructura rígida de la fase líquida ordenada (Simons *et al.*, 2000a).

Como hemos visto, muchas de las proteínas ancladas a los *rafts* lipídicos, lo hacen mediante modificaciones lipídicas (palmitoilaciones y/o miristoilaciones) que comparten el hecho de tener dos cadenas acil muy próximas espacialmente. Este hecho sugiere que la acilación, y especialmente la acilación múltiple, podría ser un mecanismo general que permite la localización de las proteínas en los *rafts* lipídicos. Aunque hay que destacar que no todas las modificaciones lipídicas permiten la localización en caveolas, el grupo prenil por ejemplo es demasiado voluminoso para permitir el anclaje en los *rafts* aunque presenta la misma hidrofobicidad que los grupos acil (Melkonian et al., 1999). De la misma manera, aunque las modificaciones post-traduccionales como la palmitoilación, incrementa la afinidad de las proteínas por los *rafts*, no es suficiente para una asociación estable, y hay proteínas palmitoiladas que no se localizan en los *rafts* lipídicos. La afinidad por los *rafts* de membrana también se incrementa con la oligomerización o entrecruzamiento (*crosslinking*) de algunas proteínas como caveolina-1 o *src-like Tyrosine Kinase fyn* (Harder et al., 1998).

1.2 Formación y distribución de los *rafts* lipídicos

El colesterol se sintetiza en el retículo endoplasmático, mientras que la síntesis de esfingolípidos y las posteriores modificaciones de sus cabezas polares ocurren en el complejo de Golgi (van Meer, 1989). La asociación del colesterol con los esfingolípidos para formar los *rafts* lipídicos también ocurre en el complejo de Golgi (Brown and London, 1998b).

Desde el complejo de Golgi, los *rafts* se distribuyen en la superficie celular donde se enriquecen con colesterol y esfingolípidos (van Meer, 1989).

Los *rafts* no son estructuras estáticas en la membrana plasmática, sino que continuamente se internalizan hacia endosomas tempranos. Desde estos endosomas regresan otra vez a la membrana plasmática o bien, pueden dirigirse al complejo de Golgi (Mukherjee and Maxfield, 2000). Los *rafts* son abundantes en la membrana plasmática, pero también se encuentran en la vía biosintética y endocítica (Simons and Gruenberg, 2000).

La distribución de los *rafts* en la membrana plasmática depende del tipo celular. En las células polarizadas como las células epiteliales o las neuronas los *rafts* lipídicos se acumulan en la membrana apical y axonal respectivamente. La membrana basolateral y somatodendrítica también contiene *rafts* pero en menor proporción (Fridriksson et al., 1999). En cambio, en las células no polarizadas como los fibroblastos o los adipocitos, los *rafts* están distribuidos por toda la superficie celular.

1.3 Función de los *rafts* lipídicos

Los *rafts* no sólo sirven para la distribución de los lípidos y proteínas en la superficie celular y en otros orgánulos celulares, sino que también actúan como plataformas para el transporte a través de membrana o como estaciones en la señalización intracelular (Simons and Ikonen, 1997b).

Los *rafts* lipídicos se han involucrado en el mecanismo de transducción de señales hormonales ya que aseguran la especificidad y la fidelidad de la interacción de los ligandos con sus receptores durante la transducción de la señal (Toomre et al., 2000). La localización de ciertos receptores en los *rafts* permite generar un microambiente donde el estado de fosforilación del receptor se puede modificar mediante quinasas y fosfatasas locales, sin afectar otras cascadas de señalización. Los *rafts* también permiten el reclutamiento de receptores activados de manera que se amplifica la señal generada, como es el caso del receptor de IgE

(FcεRI) y el receptor activado por antígeno en las células T (TCR)(Simons *et al.*, 2000b; Li *et al.*, 2006).

Los *rafts* también se han implicado en la activación de respuestas inmunes (Langlet *et al.*, 2000; Pavon *et al.*, 2006), en segregar y concentrar proteínas (Brown *et al.*, 1998a; Michel and Bakovic, 2007) y en generar y mantener la polaridad celular (Simons *et al.*, 2000b).

Finalmente, los *rafts* también se han involucrado en la entrada de virus sin cápsula, como el SV40 (Parton *et al.*, 2003) y en el ensamblaje y salida de nuevos viriones (Takeda *et al.*, 2003).

1.4 Rafts lipídicos y caveolas

Las caveolas son un subtipo de *raft* lipídico identificado por Palade y Yamada (Yamada E, 1955) en los años 50 en base a su morfología. Son invaginaciones uniformes de la membrana plasmática en forma de flascón o de letra omega (Ω) con un diámetro de 50-100nm que se caracterizan por la presencia de caveolina, una proteína integral de membrana palmitoilada que está unida a colesterol y glicoesfingolípidos, cuya oligomerización da lugar a la formación de estas estructuras, las caveolas (Kurzchalia *et al.*, 1999) (Figura 2).

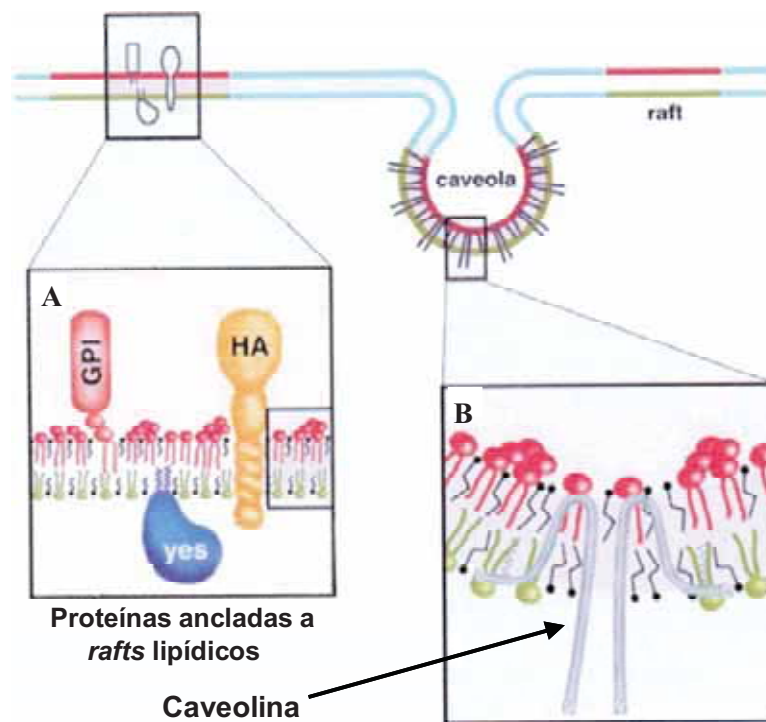


Figura 2 Modelo de organización de los rafts lipídicos y las caveolas en la membrana plasmática. A. Proteínas ancladas a los rafts, mediante la unión a GPI, mediante las colas acil (proteína YES), o mediante el dominio transmembrana (HA). B. Caveola originada por la oligomerización de la caveolina que se ancla a los rafts mediante la unión a colesterol y por la acilación de cisternas C-terminales. Adaptada de (Simons *et al.*, 1997a).

La sobreexpresión de caveolina-1 en células que carecen de caveolina/caveolas, como los linfocitos o las neuronas, induce la formación de caveolas (Fra et al., 1995b) en varios sistemas celulares diferentes como las células Caco-2, las células FRT (*Fischer rat thyroid cells*) o los MEFs de ratones *cav1*^{-/-} (Lipardi et al., 1998; Vogel et al., 1998; Breuza et al., 2002; Kirkham and Parton, 2005b). En cambio, la eliminación de caveolina-1 en los ratones KO de caveolina-1 lleva a la desaparición de estas estructuras morfológicamente reconocibles en la membrana plasmática (Drab et al., 2001; Razani et al., 2002a).

2 Caveolas y caveolina

Como acabamos de definir, las caveolas son un subtipo de *raft* lipídico, que se identifican morfológicamente en la membrana plasmática como invaginaciones de 50-100nm de diámetro con un cubierta estriada característica observada mediante la técnica de *freeze drying*, que le confieren los oligómeros de caveolina que la constituyen (Rothberg et al., 1992). Por microscopía electrónica se ha observado que las caveolas se pueden presentar como estructuras individuales o bien formando racimos. En algunas células, como en los adipocitos, es frecuente observar caveolas rodeando vacuolas conectadas con la superficie plasmática (Figura 3).

Se ha estimado que aproximadamente 144 moléculas de caveolina-1 están presentes en una caveola individual, mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de una construcción caveolina-1-GFP (*green fluorescence protein*) sobreexpresada en fibroblastos (Pelkmans and Zerial, 2005b). La cantidad relativa de colesterol que se ha descrito en caveolas inmunoaisladas es de unas 20.000 moléculas (Ortegren et al., 2004).

Las caveolas están normalmente estabilizadas en la membrana plasmática mediante el citoesqueleto de actina. A partir de estudios fundamentados en la técnica del doble híbrido en levaduras, se detectó que la filamina era un ligando de la caveolina-1 (Stahlhut and van Deurs, 2000; van Deurs et al., 2003)

Las caveolas son especialmente abundantes en ciertos tipos celulares diferenciados como son los adipocitos, las células endoteliales, las células del músculo liso y estriado, pneumocitos y fibroblastos (Scherer et al., 1994; Scherer et al., 1996; Tang et al., 1996; Scherer et al., 1997). También se han descrito, aunque en menor cantidad, en células del sistema inmunitario y del sistema nervioso (Gargalovic and Dory, 2001; Gargalovic and Dory, 2003; Bu et al., 2003)

El número de caveolas es muy reducido o están completamente ausentes en muchas líneas celulares transformadas oncogénica o víricamente (Koleske et al., 1995) y en muchas células cancerosas humanas (Lee et al., 1998).

En los adipocitos, las caveolas representan el 30% de la superficie de la membrana plasmática (Fan et al., 1983). Además, en la línea 3T3L1, un modelo ampliamente empleado para estudiar la adipogénesis, el número de caveolas y los niveles de caveolina-1 aumentan 10 y 20 veces, respectivamente, durante el proceso de diferenciación adipocitaria (Fan et al., 1983; Scherer et al., 1994).

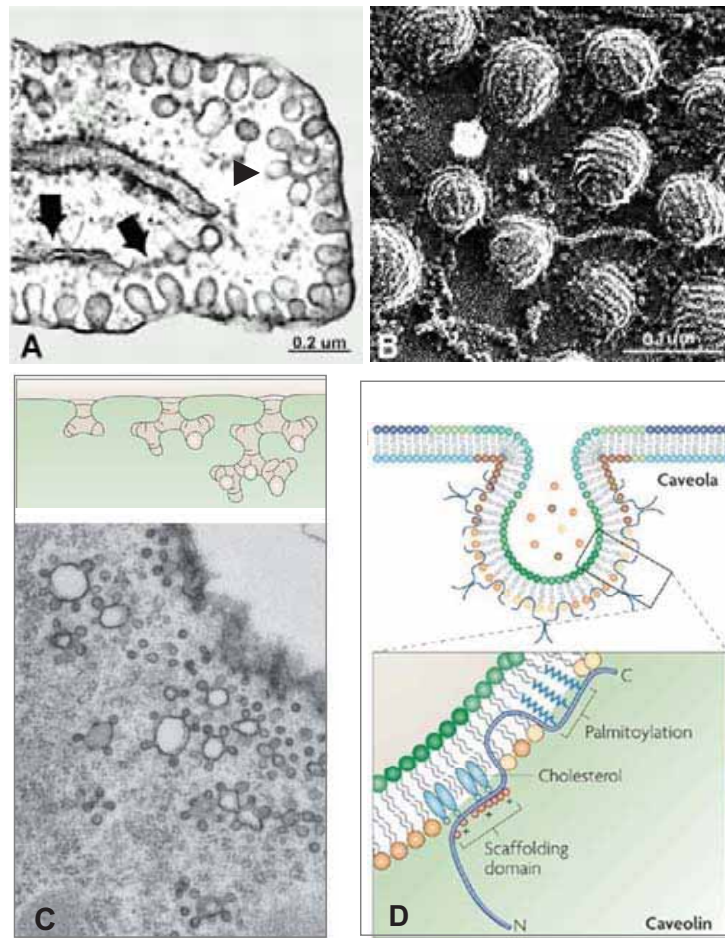


Figura 3 Morfología de las caveolas en fibroblastos mediante técnicas de microscopía electrónica. A. Micrografía electrónica de un corte ultrafino de un fibroblasto. Las flechas señalan las caveolas individuales. La punta de flecha señala un racimo de caveolas. B. Cara citoplasmática de la membrana de fibroblastos sometida a la técnica de *freeze-drying*. Se puede comprobar la cubierta estriada característica de las caveolas. C sección de la superficie de un fibroblasto donde se observa la abundancia de caveolas rodeando vacuolas en conexión con la membrana plasmática. (D) Disposición de caveolina-1 en las caveolas y topología de caveolina-1. Imágenes adaptadas de (Anderson, 1998) y esquemas adaptados de (Parton and Simons, 2007).

2.1 La familia de las caveolinas

Las caveolinas son proteínas pequeñas (20-23 kDa) con una secuencia altamente conservada en la evolución. Existen, hasta el momento, tres miembros de esta familia descritos y reconocidos en mamíferos: caveolina-1, caveolina-2 y caveolina-3 codificadas por genes diferentes.

Caveolina-1 tiene dos isoformas (α y β) resultado de la presencia de dos inicios de transcripción en el gen. La isoforma β carece de los primeros 30 aminoácidos (Scherer et al., 1995).

Caveolina-2 tiene tres isoformas (α , β y γ). Las isoformas α y β proceden de un mismo MRNA que posee dos inicios de traducción, aunque existen evidencias de que existen como en el caso de caveolina-1, dos mRNA para caveolina-2 (Scherer et al., 1996). La isoforma γ es más corta y no se conoce su formación (Galbiati et al., 1998b). La expresión, estabilidad y localización en las caveolas de caveolina-2 depende de la presencia de caveolina-1 (Parton, 1996; Okamoto et al., 1998) (figura4).

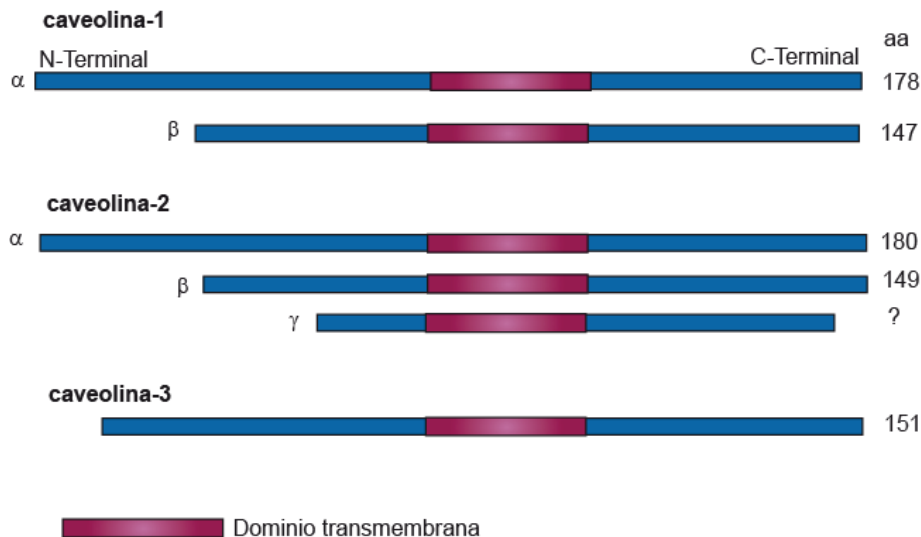


Figura 4 Esquema de las distintas isoformas de caveolina. Adaptado de (Couet et al., 2001).

Los genes de caveolina-1 y 2 están localizados en el cromosoma 7 humano, en una zona que frecuentemente se encuentra delecionada en los tumores malignos. El gen de caveolina-3 se encuentra en el cromosoma 3 humano (Couet *et al.*, 2001).

Tanto caveolina-1 como caveolina-2 tienen una distribución amplia y similar en los tejidos. En cambio, caveolina-3 tiene una distribución más restringida, siendo muy abundante en células del músculo esquelético y cardíaco (Parton, 1996; Tang *et al.*, 1996) aunque también se ha descrito su expresión en astrocitos y condrocitos (Ikezu et al., 1998; Schwab et al., 1999). En los tejidos donde se expresa, caveolina-3 es responsable de la formación de caveolas en la membrana plasmática (Parton et al., 1997; Hagiwara et al., 2000; Galbiati et al., 2001).

2.2 Estructura de las caveolinas

Las caveolinas tienen alta homología entre ellas y en consecuencia comparten propiedades estructurales, funcionales y de topología de membrana.

Las caveolinas son proteínas integrales de membrana de unos 20kDa, que presentan los dominios amino y carboxi terminales hidrofílicos dirigidos hacia el citosol (ver figura 5). El dominio hidrofóbico de 33 aminoácidos (residuos 110-132 de caveolina-1) es el que se introduce en la membrana plasmática (**dominio transmembrana hidrofóbico**).

Tanto caveolina-1 como caveolina-3, presentan palmitoilaciones en tres residuos de cisteína en la región carboxi Terminal (residuos 132-158 en caveolina-1)(**residuos de cisteína palmitoilados**). Estas modificaciones lipídicas son necesarias para la unión al colesterol y el transporte de la caveolina a la membrana pero no para su localización en caveolas (Uittenbogaard and Smart, 2000).

En la región N-terminal existen dos dominios que son los responsables de la mayoría de las funciones estructurales y reguladoras de la caveolina:

- **Dominio de oligomerización** (residuos 61-101 de caveolina-1) se localiza muy cerca del dominio transmembrana y es esencial para las interacciones homotípicas de los monómeros de caveolina-1 (Sargiacomo et al., 1995).

• Dentro del dominio de oligomerización, existe otro dominio funcional llamado **dominio scaffolding de la caveolina** (CSD, residuos 82-101 de caveolina-1) que está implicado en la interacción de la caveolina con otras proteínas, como por ejemplo proteínas implicadas en mecanismos de transducción de señales o la propia caveolina (Couet et al., 1997b; Engelman et al., 1998a; Li et al., 1996a; Galbiati et al., 2000). Este dominio reconoce los motivos $\Psi X \Psi X X X X Y$, $\Psi X X X X \Psi X X \Psi$ o $\Psi X \Psi X X X X \Psi X X \Psi$ (*caveolin binding domain*, CBD) entre otros, de las proteínas con las que interacciona, donde Ψ es un residuo aromático (Trp, Phe o Tyr), y la interacción es muy específica (Couet et al., 1997a). Se ha propuesto que la unión de este dominio CSD de la caveolina a proteínas de señalización, regula negativamente su acción, como en el caso de H-Ras (Song et al., 1996), c-SRC (quinasa de la familia Src) (Li et al., 1996a), varias subunidades G_{α} (de las proteínas G heterotriméricas) (Li et al., 1995b), eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) (Feron et al., 1998). En otros casos, el efecto de la interacción es activador, como en la actividad quinasa de receptor de la insulina (Yamamoto et al., 1998) o el receptor β_2 -adrenérgico (Czarny et al., 1999).

También se ha localizado en la región amino terminal el **dominio signature** (residuos 66-77 de caveolina-1) que está implicado en la salida de la caveolina de retículo endoplasmático hacia el complejo de Golgi (Machleidt et al., 2000).

Se sabe que caveolina-1 puede ser fosforilada en el **residuo tirosina 14** por las quinasas Src y por el receptor de insulina (Kimura et al., 2002), aunque parece que tiene más residuos fosforilables (Aoki et al., 1999; Nomura and Fujimoto, 1999).

Las regiones entre los residuos 27-55 y 55-75 de caveolina-1 contienen **dominios ricos en residuos cargados** que podrían generar regiones antipáticas que podrían interaccionar con la cara citoplasmática de la membrana (Fielding and Fielding, 2000).

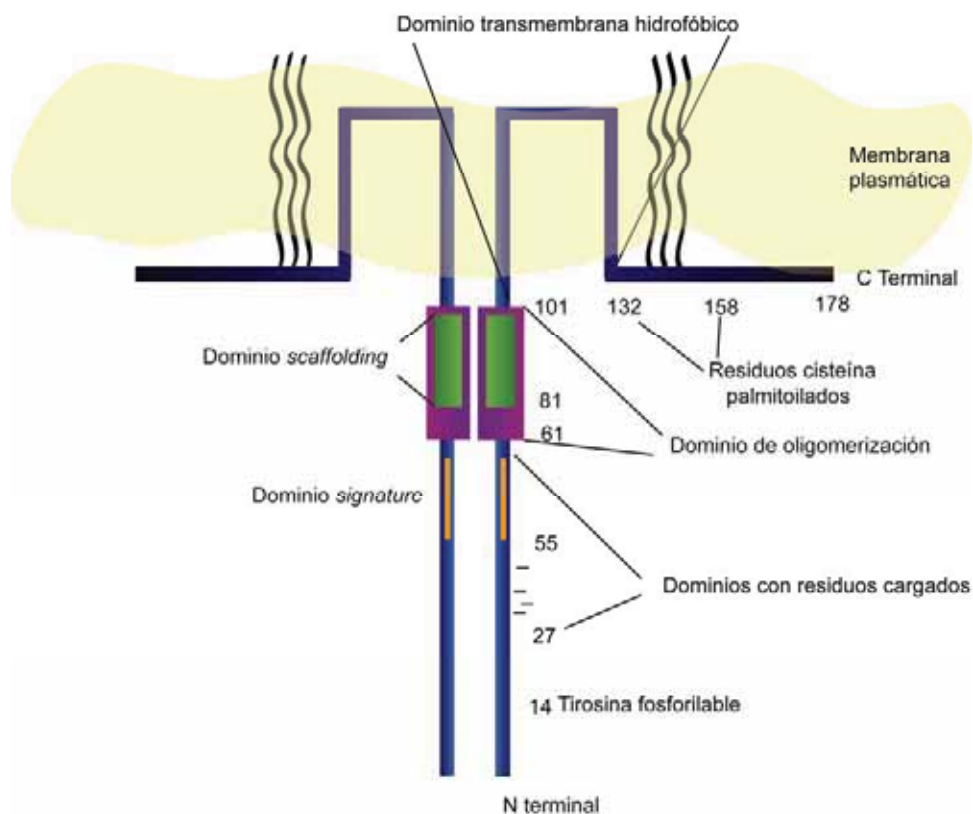


Figura 5 Dominios funcionales de la caveolina. Adaptado de (Fielding et al., 2000).

Caveolina-1 se puede encontrar en forma de monómeros o de oligómeros. En la membrana plasmática se encuentra en forma de oligómeros altamente estables de 14-16 monómeros de caveolina-1 con un peso molecular aproximado de 350-400 kDa (Sargiacomo *et al.*, 1995; Monier *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996b). Además, análisis de pulso y caza mostraron que estos complejos se forman relativamente rápido tras la síntesis de caveolina-1 en el retículo endoplasmático y antes de completar su tránsito por el complejo de Golgi (Monier *et al.*, 1995). También aparece en la membrana plasmática formando heterooligómeros de caveolina-2 y caveolina-1 (Sargiacomo *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1997; Couet *et al.*, 1997a). Caveolina-3 también forma homooligómeros en la membrana plasmática gracias al dominio de oligomerización.

Caveolina-2 no puede formar homooligómeros de alto peso molecular y no puede migrar sola a la membrana plasmática desde el complejo de Golgi. Por tanto, caveolina-2 no puede formar caveolas por sí misma. Sin embargo, en presencia de caveolina-1, caveolina-2 puede formar complejos heterooligoméricos y entonces sí puede localizarse en la membrana plasmática (Scheiffele *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 1999; Schlegel *et al.*, 1999; Schlegel and Lisanti, 2000). La interacción de caveolina-2 con caveolina-1 es específica ya que no forma heterooligómeros con caveolina-3, y ocurre a nivel del dominio transmembrana, aunque el dominio de oligomerización también participa (Scheiffele *et al.*, 1998).

2.3 Formación de las caveolas

La caveolina se sintetiza como una proteína integral de membrana en el retículo endoplasmático (RE) de manera dependiente de SRP (*signal recognition particle*) (aunque también se ha descrito caveolina citosólica y secretada al espacio extracelular (Liu *et al.*, 1999; Uittenbogaard *et al.*, 1998). La proteína sintetizada sufre un primer paso de oligomerización, que al menos *in vitro*, puede ocurrir en el RE (Monier *et al.*, 1995).

La caveolina es entonces transportada al complejo de Golgi. El paso a través del complejo de Golgi es relativamente lento comparado con otras proteínas de membrana (Ren *et al.*, 2004; Pol *et al.*, 2005), así en la mayoría de células puede visualizarse el nuevo *pool* de caveolina en el complejo de Golgi, que no está asociado con membranas resistentes a detergentes (DRM) (Pol *et al.*, 2005). Sin embargo, durante la vía biosintética en el complejo de Golgi, las caveolinas se asocian con los *raft* lipídicos, se hacen resistentes a detergentes y se organizan en oligómeros de gran tamaño característicos de la caveolina de membrana (figura 6).

Existen diversas pruebas que apoyan que es necesaria la incorporación de la caveolina a dominios de *rafts* lipídicos en el complejo de Golgi (antes de llegar a la membrana) para la formación de las caveolas. Así, la salida de caveolina-1 del complejo de Golgi se acelera al añadir colesterol (Pol *et al.*, 2005) y se inhibe al eliminar los glicoesfingolípidos (Cheng *et al.*, 2006). Mutantes de caveolina que interrumpen su llegada a membrana provocan una acumulación de caveolina soluble en detergente en el complejo de Golgi (Machleidt *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2004). Además, en un estudio de Ren *et al.* (2004) se comprobó que el transporte de distintos mutantes de caveolina a la membrana correlacionaba con su capacidad para asociarse a membranas resistentes a detergentes.

El modelo más aceptado de la formación de las caveolas postula que el ensamblaje y formación de las caveolas ocurre en el complejo de Golgi. Desde allí son transportadas a la membrana plasmática mediante un proceso de exocitosis (Tagawa *et al.*, 2005; Parton *et al.*, 2006; Parton *et al.*, 2007). Así los autores Tagawa *et al.* (2005) mostraron mediante microscopía a tiempo real usando caveolina-1-GFP y cuantificando la intensidad de emisión

fluorescente, que en el complejo de Golgi se sintetiza un determinado número de moléculas caveolina-1 que denominan *quantum* y que estos *quantums* de caveolina-1 son transportados directamente a la membrana plasmática. De tal forma que las caveolas de la membrana plasmática están formados por *quantums* de caveolina-1. Estos autores afirman que la salida de la caveolina del complejo de Golgi está asociada con el ensamblaje de la caveolina (oligomerización y asociación con dominios de *raft* lipídicos ricos en colesterol y glicosfingolípidos) para formar una estructura semejante a una caveola de exocitosis o transportador de caveolas (*exocytic caveolar carrier*) que se dirige directamente a la membrana plasmática y se fusiona con ella en un proceso en el que participan la proteína SNARE *Syntaxin-6*. Además, Parton *et al.* (2007) proponen que la caveolina puede alcanzar la membrana plasmática por otras vías de transporte no caveolares en la que no participan transportadores de caveolas (figura 6).

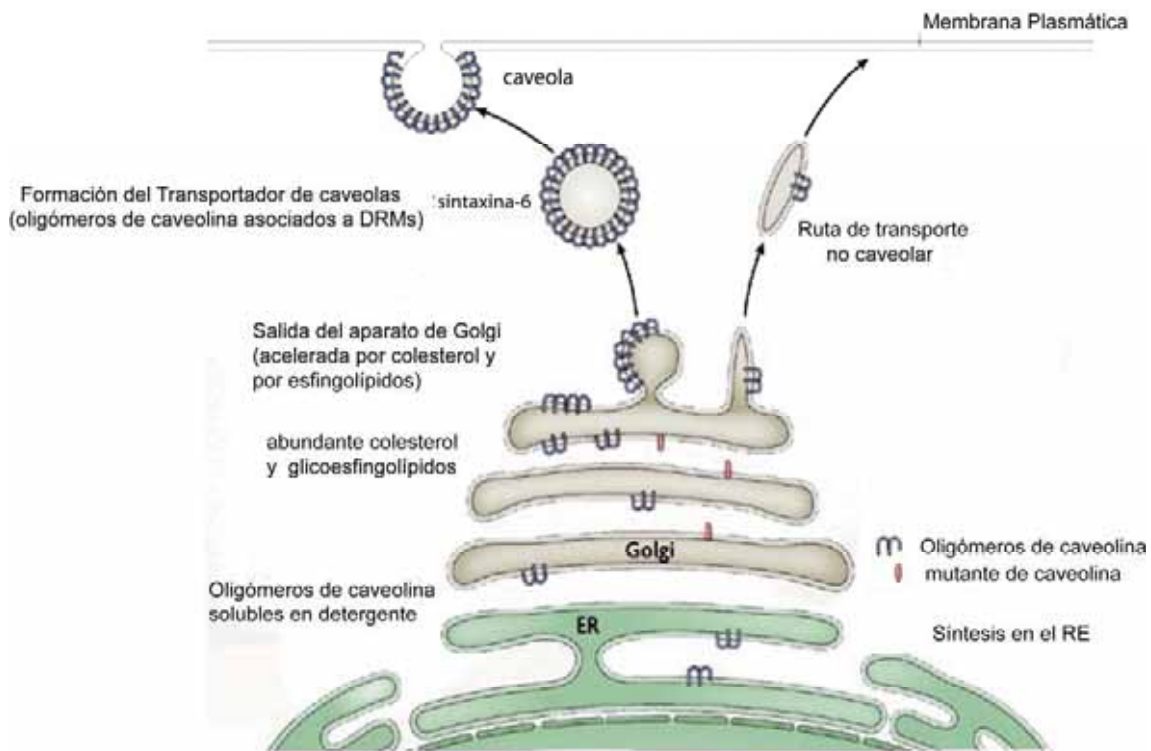


Figura 6 Biosíntesis de caveolina y tráfico a la membrana plasmática. La caveolina se sintetiza en el RE y se transporta al complejo de Golgi como oligómeros solubles en detergente. Cuando la caveolina sale del Complejo de Golgi, los oligómeros se asocian con los dominios *rafts* lipídicos enriquecidos en colesterol y glicosfingolípidos, pasando a ser estructuras resistentes a detergentes (DRMs). Los portadores de caveolina (*exocytic caveolar carrier*) que contienen una cantidad concreta de caveolina se escinden y se funden directamente con la membrana plasmática en un proceso que requiere a la proteína SNARE *syntaxin-6*. Además, la caveolina puede transportarse a la membrana por otras vesículas, pero no formarán caveolas. En el esquema se indica en rojo, un mutante de caveolina que no es capaz de salir del complejo de Golgi. Adaptado de (Parton *et al.*, 2007)

Muchas formas mutantes de caveolina que se han asociado con enfermedades se acumulan en el complejo de Golgi y no llegan a la membrana eficientemente (Galbiati *et al.*, 1999). La expresión de estos mutantes parece que bloquea completamente la salida de la caveolina del complejo de Golgi, y son más dañinos que la carencia de caveolina (Ohsawa *et*

al., 2004; Nixon et al., 2005; Hernandez-Deviez et al., 2006). La explicación que proponen Parton *et al.* (2007) es que en ausencia de caveolina-1 no se modifica la ruta de síntesis no caveolar, sin embargo los mutantes que quedan retenidos en el complejo de Golgi, alteran ambas rutas de transporte a la membrana plasmática ya que retienen los componentes de ambas vías.

2.4 Función de las caveolas y caveolinas

La función de las caveolas ha sido un gran punto de debate. Se les ha implicado en numerosos procesos celulares como el tráfico de membranas, la transducción de señales, el transporte de sustratos y la homeostasis lipídica.

A partir de estudios realizados con ratones KO de caveolina-1, se ha observado que estos ratones tienen afectados el sistema cardiovascular y pulmonar, y presentan algunas alteraciones metabólicas (Razani et al., 2001a; Razani and Lisanti, 2001b; Razani *et al.*, 2002a; Razani et al., 2002c), aunque son totalmente viables. Así, algunos autores afirman que las caveolas no son esenciales, y más que tener una función específica, podrían ser consideradas como orgánulos multifuncionales con un papel fisiológico que varía según el tipo celular y de los requerimientos celulares (van Deurs *et al.*, 2003).

2.4.1 Papel de las caveolas en el tráfico de membranas

2.4.1.1 Endocitosis mediada por caveolas

Las caveolas de la superficie celular forman unidades funcionales altamente estables generadas por la oligomerización de caveolina y su asociación con proteínas y lípidos. Estudios de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) muestran que caveolina y las caveolas son relativamente inmóviles (Tagawa *et al.*, 2005), aunque esta movilidad aumenta considerablemente tras la oxidación o la reducción de colesterol de las membranas (Smart et al., 1994; Carozzi et al., 2000; Thomsen et al., 2002; Pelkmans et al., 2004).

Sin embargo, a las caveolas se les ha asignado un papel en la endocitosis (Parton *et al.*, 2003). Así, se ha visto que proteínas unidas a GPI cuando son tratadas con anticuerpos multivalentes (*crosslinking*) se translocan a caveolas y desde allí son endocitadas (Mayor et al., 1994; Fujimoto, 1996; Sabharanjak et al., 2002; Sharma et al., 2004b). Además, algunos virus sin envoltura como el SV40, usan las caveolas para entrar en las células, utilizando como receptor los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI) (Anderson et al., 1996; Stang et al., 1997). Vía caveola también se internalizan esfingolípidos, toxinas unidas a esfingolípidos o glucolípidos (toxina cólica o la enterotoxina tipo I (LTI)), el ácido fólico, el factor de movilidad autocrino (AMF), la albúmina, la hormona del crecimiento y el receptor de interleuquina-2 (IL2R) entre otros (Pelkmans and Helenius, 2002a; Pietiainen et al., 2004).

La dinamina, una GTPasa reguladora implicada en la endocitosis, es reclutada transitoriamente en las caveolas cargadas con el virus SV40 y participan en la internalización de estas estructuras (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998; Pelkmans *et al.*, 2002a). Este proceso de internalización requiere el reclutamiento de citoesqueleto de actina en la región que se va a internalizar, así como de la activación de tirosina quinasas Src, y la activación de PKC (Minshall et al., 2000; Pelkmans *et al.*, 2002a; Pelkmans et al., 2002b; Sharma et al., 2004a).

Una vez internalizadas, las vesículas caveolares, que mantienen su estructura tras la endocitosis (Pietiainen *et al.*, 2004), pueden dirigirse a unos orgánulos llamados caveosomas (Pelkmans *et al.*, 2002a) y fusionarse a ellos de una manera Rab5 independiente o bien dirigirse a los endosomas tempranos de manera dependiente de Rab5. Los caveosomas son

unas estructuras citoplasmáticas preexistentes que tienen pH neutro a diferencia de los endosomas tempranos, tardíos y los lisosomas que tienen pH ácido, están enriquecidos en caveolina-1, y carecen de marcadores de otros orgánulos endocíticos (EEA1 o el receptor de transferrina, característicos de la endocitosis mediada por clatrina) o biosintéticos.

Desde los caveosomas las partículas endocitadas se dirigen al retículo endoplasmático (SV40) o al complejo de Golgi (toxina colérica), o bien pueden pasar a los endosomas y seguir la ruta de degradación de los lisosomas, mientras que las vesículas caveolares portadoras se reciclan y vuelven a la membrana plasmática. Estas vesículas caveolares también pueden reciclarse y fusionarse de nuevo con la membrana plasmática sin pasar por ningún orgánulo intermediario en un proceso altamente regulado (Pelkmans *et al.*, 2005b) (figura7).

Además, se han descrito otras rutas de endocitosis independientes de clatrina y de caveolina que se han asociado a *rafts* lipídicos y que difieren de la ruta caveolar en sus características, ya que: no existe relación entre las vesículas endocíticas y la caveolina-1, en algunos casos no participa dinaminall en el proceso (GPI-proteínas, dextrano, CTB), dependen de las GTPasas RhoA (Receptor de la interleukina-2, IL-2R) o cdc42 (GPI-proteínas) y no existen evidencias de que dependan de la actividad de PKC. (Sabharanjak *et al.*, 2002;vDamm *et al.*, 2005;vKirkham *et al.*, 2005a;vKirkham *et al.*, 2005b;vCheng *et al.*, 2006). Esto complica la interpretación de los estudios de endocitosis no mediada por clatrina. En ocasiones, una misma molécula, se ha descrito que se internaliza bien vía caveola, o bien vía *raft* lipídicos no caveolares, en función del tipo celular empleado y de su expresión de caveolina-1 (Orlandi and Fishman, 1998;vTorgersen *et al.*, 2001;vSharma *et al.*, 2004a;vCheng *et al.*, 2006).

Aunque, como hemos visto, hay muchos agentes que pueden causar la internalización de las caveolas, hay mecanismos comunes implicados en este proceso donde participan la dinamina (Yao *et al.*, 2005), Src quinasas, la proteína quinasa C (PKC) y el reclutamiento de actina (Minshall *et al.*, 2000; Pelkmans *et al.*, 2001; Pelkmans *et al.*, 2002b; Sharma *et al.*, 2004a).

Así, la internalización de las caveolas está facilitada por la desestructuración del citoesqueleto de actina, inhibida por inhibidores de PKC y tirosina quinasas como la estaurosporina y genisteína, y activada por inhibidores de fosfatasa como el ácido ocaidaico y el vanadato (Parton *et al.*, 1994; Pelkmans *et al.*, 2001; Mundy *et al.*, 2002; Thomsen *et al.*, 2002; Pelkmans *et al.*, 2002b).

Como hemos mencionado anteriormente las caveolas son altamente inmóviles y aunque se puede inducir su endocitosis, no están implicadas en la endocitosis constitutiva de la célula (Thomsen *et al.*, 2002). Algunos estudios proponen que la caveolina-1 podría estabilizar las caveolas en la membrana plasmática mediante su interacción con la filamina, y funcionaria así como regulador negativo de la internalización de caveolas (Le *et al.*, 2002; Le and Nabi, 2003; Sharma *et al.*, 2004a).

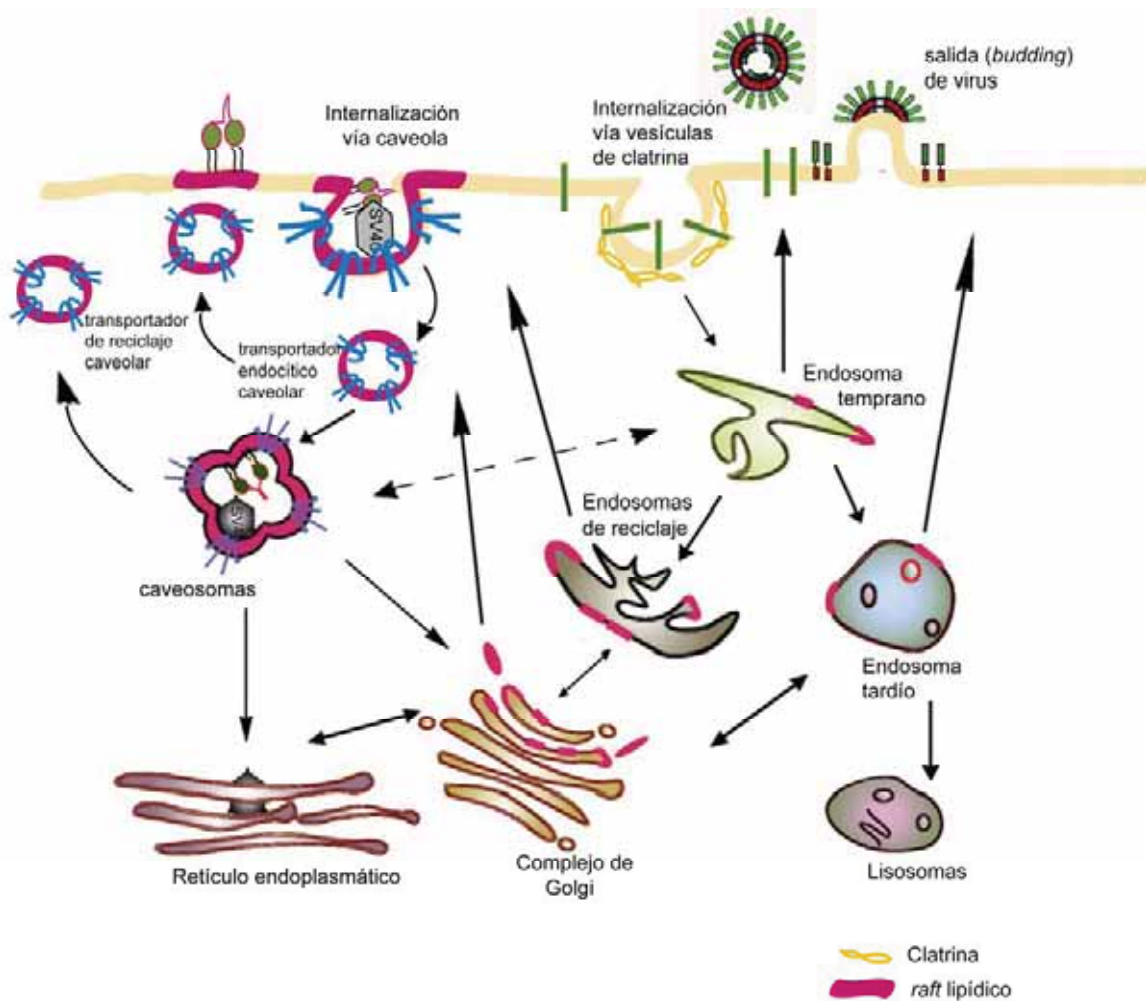


Figura 7 Modelo de tráfico intracelular. Endocitosis dependiente de vesículas de clatrina y endocitosis dependiente de caveolas. Adaptado de (Rajendran and Simons, 2005) y (Parton *et al.*, 2007).

2.4.1.2 Papel de las caveolas en la salida (*budding*) de los virus

Cuando los virus salen de las células huésped adquieren su membrana. Hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) son dos proteínas *spike* fundamentales de la envuelta de los virus influenza A que están asociadas a caveolas (Scheiffele *et al.*, 1997). Además, el análisis lipídico de los virus ha mostrado un enriquecimiento en *rafts* lipídicos, indicando que estos virus podrían salir de las células desde los dominios *rafts*. Otra proteína vírica, la proteína-M, es necesaria para dirigir la salida del virus, esta proteína se une a las proteínas *spike*, se oligomeriza, provoca un cambio en la curvatura de la membrana y además agrupa los *rafts* lipídicos a través de las proteínas *spike* permitiendo la salida de las partículas víricas (Zhang *et al.*, 2000).

La envoltura de otros virus como el HIV está también enriquecida en *raft* lipídicos, y tanto la entrada como la salida de este virus depende de ellos (Aloia *et al.*, 1988; Aloia *et al.*, 1993).

2.4.1.3 Caveolas y adhesión celular

Existen estudios que vinculan la endocitosis vía caveolas y la adhesión celular. Así, los glicosíngolípidos que estimulan la endocitosis vía caveola (como lactosilceramida o globoside), provocan la agrupación e internalización de integrinas mediante una ruta que involucra a las caveolas; esta ruta es inhibida por la eliminación de colesterol, de caveolina-1 y por dominantes negativos de la dinamina y es dependiente de las quinasas Src y PKC (Sharma et al., 2005). La internalización de fibronectina y su degradación también se inhiben cuando se elimina caveolina-1 (KO de caveolina-1) (Sottile and Chandler, 2005).

La endocitosis vía caveola también parece ser importante en condiciones en que las células pierden la adhesión al sustrato (del Pozo et al., 2005). La separación del sustrato de los fibroblastos dispara la internalización del gangliósido GM1 (característico de caveolas) de la membrana plasmática de manera dependiente de caveolina. Su internalización provoca la pérdida de Rac1 de la membrana. Durante este proceso de separación del sustrato, caveolina-1 se fosforila en el residuo tirosina-14, condición necesaria para que ocurra la endocitosis (del Pozo *et al.*, 2005; Parton *et al.*, 2007). Se ha propuesto que caveolina-1 es necesaria para coordinar el estímulo de separación del sustrato, que induce un proceso de agrupamiento de los *rafts* lipídicos masivo, y lleva a la internalización de proteínas y componentes de los *rafts*. Sin embargo, la importancia de la relación entre la endocitosis a través de caveolas y la adhesión celular es aún objeto de estudio ya que los ratones KO de caveolina-1 no parecen mostrar ningún defecto en este sentido (Parton *et al.*, 2007).

2.4.1.4 Otros procesos de tráfico de membranas: transcitosis y potocitosis

La endocitosis a través de caveolas ha sido ampliamente estudiada en células endoteliales. Se conoce como transcitosis el transporte de solutos a través de las células endoteliales. Se ha implicado en este proceso a las caveolas, en concreto, en el transporte transcelular de la albúmina (Simionescu et al., 2002). Para que ocurra este transporte es necesaria la interacción de caveolina-1 con el receptor de la albúmina (pg60). Fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones KO de caveolina-1 fracasan en la internalización de albúmina unida a un fluoróforo, y este efecto se revierte mediante la transfección del cDNA de caveolina-1 (Razani *et al.*, 2001a). Sin embargo, estudios realizados en ratones deficientes en caveolina-1 muestran un transporte de albúmina transendotelial normal (Drab *et al.*, 2001). Este hecho sugiere que las caveolas no deben ser esenciales en el proceso de transcitosis *in vivo* (Parton *et al.*, 2007).

La potocitosis es un mecanismo de captación de pequeñas moléculas (<1kDa) o solutos independiente de un proceso endocítico. Durante este proceso, una molécula se une a un receptor localizado en una caveola, la cual entonces se ocluye y forma transitoriamente un compartimento sellado aislado del espacio extracelular pero aún contiguo a la membrana plasmática. Seguidamente la caveola se abre, y el ciclo se repite. La potocitosis vía caveola se ha descrito en la captación de vitaminas, concretamente en el caso del ácido fólico (Anderson et al., 1992), y ésteres de colesterol a partir de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Babitt et al., 1997).

2.4.2 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, como subtipo de *raft* lipídico, se han descrito como centros organizadores de membrana, juegan un papel importante a la hora de concentrar moléculas de señalización y por tanto, de iniciar respuestas celulares frente a diferentes estímulos, ya que generan un ambiente determinado en la membrana plasmática que, en ocasiones, es crítico para las moléculas de señalización y los receptores de membrana.

Como ya hemos mencionado anteriormente, existen numerosos trabajos que aportan evidencias de que caveolina-1 puede interactuar, mediante su dominio conservado SCD (*scaffolding*) (revisión Liu et al., 2002), directamente con muchas moléculas de transducción de señales descritas en caveolas, como las quinasas de la familia Src, las proteínas G heterotriméricas o la proteína H-Ras (Li et al., 1996a; Couet et al., 1997b). Sin embargo, muchas de estas interacciones se han demostrado mediante una sola técnica (en la mayoría de los casos por inmunoprecipitación o mediante la técnica del doble híbrido en levaduras) o usando sólo el dominio SCD de la caveolina para comprobar dicha interacción. Al carecer de otros estudios funcionales, se han de tomar con precaución las listas de proteínas que podrían interactuar con caveolina-1 (Liu et al., 2002).

Se ha descrito que la interacción de caveolina-1 con moléculas de transducción de señales puede causar una inhibición de la ruta de señalización o una activación según la proteína y el tipo celular. Un ejemplo bien caracterizado de caveolina como inhibidor de la transducción de señales es la interacción de caveolina-1 con eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) (Feron et al., 1998). eNOS controla importantes procesos como la angiogénesis, la vasodilatación y la permeabilidad. Existen estudios que demuestran que el péptido sintético derivado del dominio SCD de caveolina-1 inhibe la actividad de eNOS después de introducirlo en células vivas (Bucci et al., 2000). El resultado de esta interacción es la regulación negativa en la producción de óxido nítrico, que actúa inhibiendo la adenilato ciclasa productora de AMPc. En los ratones KO de caveolina-1, existe una activación constitutiva del enzima eNOS y aumentando los niveles de óxido nítrico. Estos ratones presentan problemas para inducir la vasoconstricción en respuesta a un estímulo adrenérgico así como una relajación vascular potenciada ante estimulación por acetilcolina (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001a).

En cambio, la interacción de caveolina-1 con el receptor de insulina provoca su activación. La primera evidencia de esta interacción positiva surgió de la sobreexpresión de caveolina-3 en células Hek293, que presentaban entonces una estimulación de la actividad del receptor de insulina, y un aumento de la fosforilación de uno de sus sustratos en la cascada de señalización, IRS-1 (Yamamoto et al., 1998). Estos autores comprobaron que era el dominio SCD de caveolina-1 o caveolina-3 (no el de caveolina-2) el que provocaba esta estimulación de la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina. También demostraron la unión del receptor de insulina purificado a péptidos del dominio SCD de caveolina-1 y 3 inmovilizados. Una interacción similar fue descrita por Nystrom et al. (1999) mediante inmunoprecipitación, cuando sobreexpresaban el receptor de insulina en células COS.

Se han descrito muchas moléculas de transducción de señales que se localizan en las caveolas, bien mediante una interacción directa con la caveolina, o bien porque contienen modificaciones que permiten su localización en estos dominios. Entre estas moléculas aparecen, las proteínas G heterotriméricas, PKC α , los receptores de EGF y de PDGF, quinasas IP₃, FAT/CD36, receptor de insulina, receptores asociados a proteínas G o eNOS (Liu et al., 2002). Sin embargo, la localización de ciertas proteínas en las caveolas ha sido motivo de controversia, ya que según el método usado para el aislamiento (eliminación de colesterol y

observación de efectos funcionales, fraccionamiento usando métodos con detergentes o con carbonato a pH11 y separación en gradientes de sacarosa, inmunofluorescencia, inmunolocalización) pueden localizarse o no en caveolas. La tendencia hoy en día es a tomar los resultados de localización de las proteínas en caveolas con escepticismo, hasta que no se confirmen los resultados por varias técnicas y se complementen con inmunolocalización y microscopía electrónica o con inmunoaislamiento de caveolas usando un anticuerpo anti-caveolina.

2.4.3 Papel de las caveolas/caveolina en la homeostasis y el transporte de colesterol

Como ya hemos descrito, las caveolas tienen una composición diferente al resto de la membrana, estando especialmente enriquecidas en colesterol. Además, su estructura y función es muy sensible a los niveles de colesterol (Rothberg et al., 1990; Rothberg et al., 1992).

Caveolina-1 interacciona directamente con el colesterol libre (*free cholesterol*, FC), en una estequiometría 1:1 o 1:2, y esta interacción resiste el tratamiento con el detergente SDS (Murata et al., 1995; Thiele et al., 2000). Se ha sugerido que aunque la palmitoilación de caveolina-1 no es necesaria para su localización en caveolas, sí lo es, en la posición 143 y 156, para que una colesterol (Dietzen et al., 1995; Uittenbogaard et al., 2000).

Además se ha visto que la expresión de caveolina-1 está regulada a nivel transcripcional por el FC en el retículo endoplasmático a través de elementos de respuesta a colesterol en los promotores (SRPE, *sterol-responsive promoter elements*) (Fielding and Fielding, 1997b; Hailstones et al., 1998; Ikonen and Parton, 2000), de tal forma que, una disminución en los niveles de FC provocan una disminución de la transcripción de caveolina-1 (Hailstones et al., 1998), mientras que un incremento de FC (incubando las células con lipoproteínas de baja densidad) lleva al aumento de los niveles de mRNA de caveolina-1 (Fielding et al., 1997a).

Los niveles de la proteína caveolina-1 (Fielding et al., 1999) y el tráfico de caveolina-1 a través del complejo de Golgi también responden a cambios en los niveles de FC (Smart et al., 1994; Conrad et al., 1995; Pol et al., 2005). El colesterol es necesario para la correcta síntesis y salida de la caveolina-1 del complejo de Golgi y su llegada a membrana en forma de caveolas.

Las caveolas y las caveolinas se han involucrado en el tráfico de colesterol intracelular. Por un lado se les implicó en la llegada a membrana del colesterol y/o su posterior salida de la célula. Así, la transfección de caveolina-1 en fibroblastos humanos lleva a la acumulación del colesterol en caveolas (Smart et al., 1996), y al aumento de los niveles de FC (Fielding and Fielding, 2001) y de la salida de colesterol al exterior celular en fibroblastos (Fielding et al., 1999) y en hepatocitos (Fu et al., 2004), este transporte requiere la formación de un complejo chaperona-colesterol, donde la caveolina-1 citosólica es un miembro importante (Uittenbogaard et al., 1998; Uittenbogaard et al., 2000). De la misma manera, cuando se incuban los fibroblastos con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) donantes de colesterol, el exceso de colesterol se localiza mayoritariamente en las caveolas (Fielding and Fielding, 1995; Fielding et al., 1997b). En el mismo sentido, se ha localizado en caveolas uno de los componentes mas importantes para la transferencia del colesterol mediada por HDL (lipoproteína de alta densidad), el receptor SR-BI (*the class B, type I scavenger receptor*) (Babitt et al., 1997; raf et al., 1999). En sentido contrario, el colesterol libre y los ésteres de colesterol que constituyen las HDL pueden ser también internalizados después de la interacción de la proteína apoA-1 de las HDL con el receptor SR-BI, localizado en caveolas. Se ha descrito que los ésteres de colesterol internalizados a través de las caveolas se asocian con la caveolina-1 citosólica (Uittenbogaard et al., 2000), que forman parte de unas partículas

lipídicas que contienen caveolina-1, colesterol, fosfolípidos, ciclofilinas A y 40, y *heat-shock proteins*-56 implicadas tanto en la internalización del colesterol como en el transporte del colesterol recién sintetizado a la membrana plasmática (Ito et al., 2002).

Estudios con el mutante de caveolina-3, Cav3^{DGV}, o su equivalente de caveolina-1, que es incapaz de llegar a la membrana y queda acumulado en la superficie de las gotas lipídicas, provoca una disminución del colesterol en la membrana y en su salida al exterior celular pero aumenta la acumulación de lípidos neutros en las gotas lipídicas (Pol et al., 2001; Pol et al., 2004).

Sin embargo, cuando se analiza el balance de colesterol libre en las células de ratones KO de caveolina-1 (Drab et al., 2001; Razani et al., 2002a) o en células que carecen de caveolina-1 muestran una correcta llegada del colesterol a la membrana plasmática. Algunos autores interpretan que, en vista del papel tan importante del transporte de colesterol en el correcto funcionamiento celular, podría ocurrir que las caveolinas no sean esenciales para el transporte del colesterol libre en todos los tipos celulares pero pueden aportar una ruta de transporte especializada o un mayor nivel de regulación del transporte en respuesta a señales específicas (Martin and Parton, 2005).

2.4.4 Caveolina y gotas lipídicas

Las gotas lipídicas (*lipid droplets*, LDs) se definen como orgánulos intracelulares de almacén de lípidos neutros (diacilglicerol, triacilglicéridos, ésteres de colesterol, ésteres de retinol y colesterol libre), complejos y dinámicos. Se componen de un núcleo de lípidos neutros rodeados por una monocapa de fosfolípidos, colesterol y proteínas. Aparecen en la mayoría de organismos eucariotas, aunque su tamaño, composición, regulación y localización depende del tipo celular. Así, en mamíferos, los LDs pueden aparecer en el citosol, secretados como lipoproteínas o sufrir secreción apocrina en las células epiteliales de la glándula mamaria. En este trabajo nos referiremos a los LDs citosólicos, en concreto a los de células en que el almacenamiento de lípidos neutros está directamente unido con su función celular, como los adipocitos y las células esteroideogénicas. Aunque, casi todas las células que se han examinado, tienen el potencial de generar LDs bajo condiciones de elevados niveles de ácidos grasos.

La función primaria de los LDs es almacenar y proveer de ácidos grasos y colesterol, aunque también están implicados en la producción de lipoproteínas y la señalización intracelular.

La composición concreta de los LDs depende del tipo celular y está en relación con su función. Así, en los adipocitos, la proporción de colesterol libre representa hasta un 30% del total, que además se libera rápidamente cuando eliminamos el colesterol de membrana, sugiriendo un papel en el control de la homeostasis de colesterol en la célula (Prattes et al., 2000).

Se ha descrito que los LDs se forman en el retículo endoplasmático (RE), donde también se sintetizan los triglicéridos (TGA) y el colesterol (Murphy and Vance, 1999; Londos et al., 1999; Murphy, 2001; Brown, 2001a). En el RE se han localizado enzimas relacionados con la síntesis de TGA y de colesterol, como la diacilglicerol transferasa y el coenzima A colesterol aciltransferasa (Chang et al., 1995; Khelef et al., 1998). El proceso de biogénesis de los LDs se inicia con la acumulación de lípidos neutros en el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica del retículo endoplasmático. Esta acumulación de lípidos origina una protuberancia que acaba escindiéndose del RE dando lugar a un cuerpo lipídico libre en el citosol que contiene la monocapa de fosfolípidos citosólica del RE (Ostermeyer et al., 2001; Brown, 2001b; Tauchi-Sato et al., 2002). El grosor de la bicapa lipídica del RE, originado por la acumulación de lípidos

neutros, no permite acomodar proteínas transmembrana que tienen dominios hidrofílicos a cada lado de la membrana y como consecuencia, estas proteínas quedan excluidas del LD. Sin embargo, aquellas proteínas que contienen los dominios hidrofílicos dirigidos hacia el citosol, como oleosinas y caveolinas, pueden difundir lateralmente por la bicapa lipídica y concentrarse en el LD naciente (Ostermeyer *et al.*, 2001; Brown, 2001b) (figura 8).

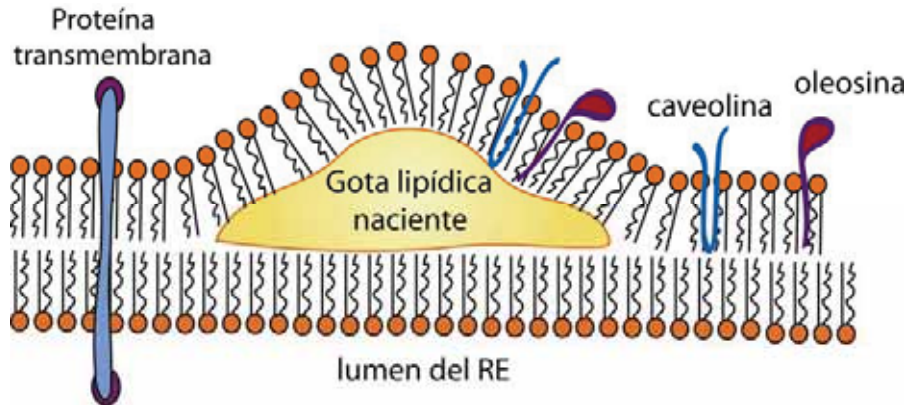


Figura 8 Biogénesis del LD a partir del Retículo endoplasmático (RE). Adaptado de (Brown, 2001a).

Los estudios basados en las observaciones realizadas por microscopía crioelectrónica y por espectrometría de masas han demostrado que la membrana que envuelve la gota lipídica es una monocapa de fosfolípidos con una composición lipídica diferente de la membrana del RE (Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Este resultado sugiere que bien la formación de los LDs ocurre en dominios especializados del RE (Pol *et al.*, 2004; Tauchi-Sato *et al.*, 2002), o bien, existe un mecanismo posterior a la formación del LD que permite especializar y diferenciar la membrana del LD de la membrana del RE (Martin *et al.*, 2005).

Respecto a la composición proteica de los LDs, hasta el momento no se han descrito proteínas transmembrana, ya que sería poco probable termodinámicamente teniendo en cuenta la naturaleza de monocapa lipídica de la cubierta. Las proteínas mejor caracterizadas de los LDs en células de mamífero, son las de la familia PAT: Perilipina, adipofilina/ADRP y TIP47, y una cuarta proteína relacionada pero estructuralmente divergente, S3-12 (Londos *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2005).

La proteína perilipina se expresa exclusivamente en adipocitos y células esteroidogénicas. Se han descrito 3 isoformas de perilipina (A, B y C) resultantes del *splicing* alternativo de un único mRNA (Servetnick *et al.*, 1995). La perilipina B es exclusiva de adipocitos, mientras que la C es de células esteroidogénica, la isoforma A se expresa en ambos tipos celulares. En adipocitos representa el 0,25-0,5% del total de proteínas (Londos *et al.*, 1999). Se ha descrito que la expresión de perilipina A incrementa el contenido celular de triacilglicéridos y actúa como barrera que dificulta el acceso de las lipasas solubles a la superficie de la gota lipídica en estado basal (Brasaemle *et al.*, 2000a; Brasaemle *et al.*, 2000b).

La proteína adipofilina/ADRP y TIP47, en cambio, presentan una expresión ubicua, y su regulación y función están menos estudiadas que las de perilipina. ADRP se ha involucrado en la conversión de pequeños LDs en otros de mayor tamaño y se sabe que une ácidos grasos (Brasaemle *et al.*, 1997; Londos *et al.*, 1999). TIP47 está relacionada con la formación de las gotas lipídicas partir del retículo endoplasmático (Ganley *et al.*, 2004).

S3-12 se expresa únicamente en adipocitos y se asocia a LDs “nacientes” en condiciones en las que se promueve la síntesis de triacilglicéridos (Wolins *et al.*, 2003).

La composición completa de los LDs depende del tipo celular y de su estado metabólico. Podemos encontrar proteínas implicadas en la síntesis y activación de ácidos grasos y esteroides, proteínas implicadas en el metabolismo lipídico o en el transporte de lípidos, proteínas del retículo endoplasmático, o proteínas de tráfico de membranas y señalización (miembros de la familia rab: rab18, rab7, rab5c), entre otras (Martin *et al.*, 2005).

Los LDs se han descrito como un importante orgánulo regulador de los lípidos celulares. Las primeras evidencias de una posible relación entre caveolina y gotas lipídicas surgieron de los estudios con el mutante deleciónado de caveolina-3, *cav3^{DGV}*, que se localizaba en la superficie de los LDs (Pol *et al.*, 2001) y su expresión impide la activación de Raf por H-Ras (Roy *et al.*, 1999). Esta asociación entre caveolina y gotas lipídicas sólo se ha observado en condiciones específicas en cultivos celulares como la adición de ácidos grasos o brefeldina A (inhibe el transporte de vesículas desde el RE) a las células (Ostermeyer *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004), la sobreexpresión de caveolina-1 o 2 en células HepG2, NRK (células de riñón de rata) o en fibroblastos humanos (Fujimoto *et al.*, 2001) o el tratamiento con colesterol (Le Lay *et al.*, 2006). Curiosamente la asociación de caveolina-1 con los LDs en presencia de colesterol se inhibe por agentes que impiden la internalización de las caveolas (Le Lay *et al.*, 2006). Así, la primera y única evidencia de la asociación de caveolina-1 con los LDs de adipocitos se observó en adipocitos estimulados lipolíticamente (Brasaemle *et al.*, 2004).

La relación entre caveolina-1 y LDs también se puso de manifiesto por Fernandez *et al.* (2006) que observaron una dramática reducción de la formación de LDs durante el proceso de regeneración hepática en ratones deficientes en caveolina-1 y una disminución en la supervivencia de los ratones, tras una hepatectomía parcial. Estos autores observaron que, durante la regeneración hepática, se acumulan masivamente LDs en los hepatocitos, y en estas condiciones caveolina-1 y 2 se redistribuyen desde la membrana plasmática a los LDs (Fernandez *et al.*, 2006).

2.4.5 Caveolina y transformación celular y tumorigénesis

La primera relación entre caveolina-1 y cáncer surgió del descubrimiento de la caveolina-1 como sustrato de v-Src en los fibroblastos transformados con el virus *sarcoma de Rous* (Glenney, Jr., 1989; Rothberg *et al.*, 1992; Glenney, Jr. and Soppet, 1992) que lleva a la disminución de la expresión de caveolina-1 con la consecuente desaparición de caveolas en las células transformadas (Ko *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 1999). A partir de entonces varias evidencias, apuntan a caveolina-1 como gen supresor de tumores. En primer lugar, los genes que codifican caveolina-1 y 2 están localizados en una región del genoma que está deleciónada en una gran variedad de tumores malignos (Smart *et al.*, 1999). En segundo lugar, la expresión de caveolina-1 se ve disminuida en células transformadas y en diferentes cánceres humanos (Koleske *et al.*, 1995; Engelman *et al.*, 1998b; Racine *et al.*, 1999; Bender *et al.*, 2000; Wiechen *et al.*, 2001; Bouras *et al.*, 2004). En tercer lugar, la disminución de la expresión de caveolina-1 es suficiente en muchos casos para inducir transformación celular (Galbiati *et al.*, 1998a). En cuarto lugar, muchos estudios indican que la sobreexpresión de caveolina-1 en fibroblastos transformados o en líneas celulares procedentes de tumores humanos, suprime la transformación celular, la tumorigénesis, la señalización de MAPK, sensibiliza a las células a la apoptosis y estimula el arresto del ciclo celular y la inhibición del

crecimiento por contacto (Engelman et al., 1997; Lee et al., 1998; Engelman et al., 1998b; Zhang et al., 2000; Razani et al., 2000; Liu et al., 2001; Fiucci et al., 2002). En quinto lugar, los estudios en MEFs (*mouse embryonic fibroblast*) de ratones *cav1*^{-/-}, muestran que estas células presentan una tasa de proliferación aumentada, con un incremento en la fracción de células en fase S del ciclo celular y una disminución de la fracción en fase G₀/G₁ (Razani et al., 2001a). Además, estas células tienen alterada la expresión de varias proteínas relacionadas con el control del ciclo celular: disminución de la expresión de p21^{Cip1}, sobreexpresión de PCNA y de ciclina D1, e hiperactivación de la cascada Ras- MAPK p42/44. Finalmente, se ha encontrado una mutación específica de caveolina-1 (P132L) en el 16% de los casos de cáncer de mama humanos (Hayashi et al., 2001).

Sin embargo, la idea de que el gen de caveolina-1 es un gen supresor de tumores ha sido muy discutida, ya que se han encontrado varios casos de tumores (algunos cánceres de mama, cáncer de próstata, algunos cánceres de colon, carcinomas de vejiga o esófago) en que la expresión de caveolina-1 está aumentada (Yang et al., 1998; Yang et al., 1999; Kato et al., 2002; Fong et al., 2003; Patlolla et al., 2004; Kim et al., 2006).

Además, también se ha observado que en los ratones deficientes en caveolina-1 no hay un incremento en la incidencia de tumores (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001a; Zhao et al., 2002). Aunque análisis más específicos en estos ratones muestran que la expresión del receptor de estrógenos Er α en las células epiteliales mamarias está aumentada y que estas células del epitelio mamario presentan un estado premaligno, con un crecimiento activado (Sotgia et al., 2006). Estos resultados concuerdan con los anteriormente publicados por Capozza et al. (2003) y Williams et al. (2004). Estos autores demuestran que los ratones *cav1*^{-/-} son más susceptibles a la formación de tumores epidérmicos y mamarios, inducidos por tratamientos carcinogénicos (DMBA) o mediante la transformación con oncogenes (H-Ras, v-Src).

Existen estudios que han demostrado que en determinados casos, un incremento en los niveles de caveolina-1 está asociado con resistencia a multidroga, metástasis, tumores altamente agresivos y supresión de la apoptosis (Timme et al., 2000; Tahir et al., 2001; Rajjayabun et al., 2001; Mouraviev et al., 2002; Belanger et al., 2004). Finalmente, se ha descrito que en diferentes células tumorales humanas donde se produce un aumento de la expresión de caveolina-1, se observa una resistencia a las drogas y a la quimioterapia (Lavie et al., 1998). Estos estudios demuestran que la disminución de la expresión de caveolina-1 no es suficiente para inducir la formación de un tumor, el proceso es mucho más complejo, requiere la cooperación con otros factores y depende del contexto celular.

Una posible explicación a estos resultados contradictorios la ofrecieron Carver and Schnitzer (2003) sugiriendo que caveolina-1 podría actuar como un supresor de tumores en las células en cultivo, pero podría ser necesaria para los últimos estados de desarrollo del tumor *in vivo*, favoreciendo la supervivencia del tumor, la metástasis y la quimioresistencia. Así, durante la primera fase del tumor, se produce la disminución de la expresión de caveolina-1 que promovería la proliferación y el crecimiento agudo del tumor. Posteriormente, cuando el tumor ha crecido se promueve la progresión maligna, en estas circunstancias las células tumorales incrementan la expresión de caveolina-1 que les puede ayudar a sobrevivir en un ambiente más competitivo, se disminuye la apoptosis y se adquiere la multiresistencia a fármacos (Figura 9).

Este concepto de dos funciones opuestas para una misma proteína, dependiendo del estado de desarrollo del tumor, no es único. TGF β (transforming growth factor- β) se comporta como gen supresor de tumores en fases tempranas del tumor, mientras que en etapas tardías, el tumor y las células del estroma secretan TGF β para provocar la invasión del tumor, angiogénesis y metástasis (Siegel et al., 2003; Roberts and Wakefield, 2003).

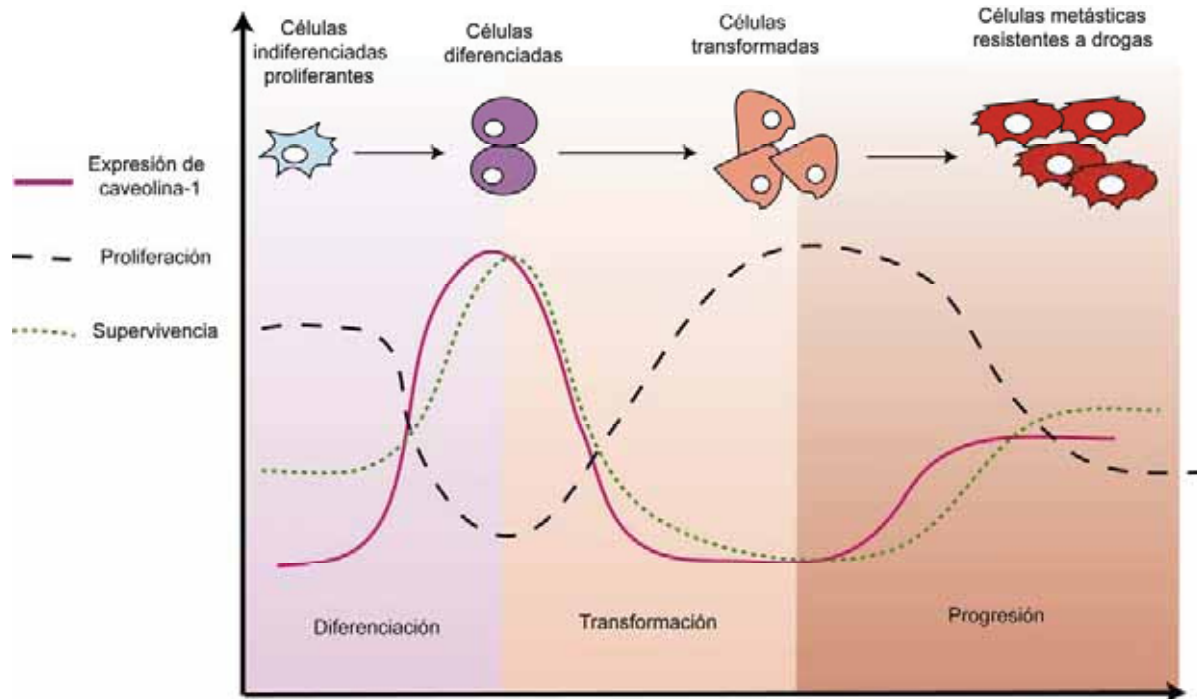


Figura 9 Esquema de la expresión de caveolina-1 durante el desarrollo de tumores. Adaptado de (del Pozo *et al.*, 2005) y (Williams and Lisanti, 2005).

2.4.6 Funciones fisiológicas de las caveolas/caveolina a partir del fenotipo de los ratones deficientes en caveolina-1

La generación de ratones deficientes en las diferentes isoformas de la caveolina ha proporcionado una buena herramienta para investigar el papel de las caveolas en procesos fisiológicos.

Los ratones KO (*knock out*) de caveolina-1 (*cav1^{-/-}*) fueron desarrollados en paralelo por dos grupos en el año 2001 (Drab *et al.*, 2001; Razani *et al.*, 2001a). Estos autores mostraron que la carencia de caveolina-1 llevaba a la pérdida de caveolas identificables morfológicamente, implicando definitivamente a las caveolas como un factor necesario para su biogénesis. Sin embargo, aunque se les han asignado muchas funciones a las caveolas/caveolina-1, estos ratones (así como los KO de caveolina-2 y -3) son perfectamente viables y fértiles.

Los efectos fenotípicos más evidentes en estos ratones se observaron en el sistema cardiovascular y en los pulmones. Así, estos ratones presentaban defectos en la contracción y relajación vascular y en el tono muscular debido a alteraciones en la vía de señalización del óxido nítrico y del calcio. Además sus pulmones desarrollaban fibrosis (crecimiento anormal de las células epiteliales) y presentaban hipertensión pulmonar.

Los ratones deficientes en caveolina-1 presentan una reducción de alrededor del 95% de los niveles de caveolina-2, ya que la expresión de caveolina-1 es necesaria para estabilizar caveolina-2 (Razani *et al.*, 2001a; Razani *et al.*, 2001b). Por tanto, los ratones deficientes en caveolina-1 también lo son en caveolina-2.

Estudios posteriores mostraron que estos ratones presentan alteraciones en la homeostasis lipídica (Razani *et al.*, 2002a). Los ratones *cav1*^{-/-} de un año de edad se caracterizan por tener un peso corporal inferior al de los ratones control. Esta diferencia de peso se debe a una disminución en el tejido adiposo blanco que presenta adipocitos de menor tamaño y peor diferenciados. Estos ratones tienen menor capacidad para almacenar triglicéridos, resistencia a la obesidad inducida por una dieta rica en lípidos, elevados niveles de ácidos grasos libres y triglicéridos circulantes y disminución de la concentración de las adipocitoquinas Acrp30 y leptina en plasma. En contraposición, los niveles de glucosa, insulina y colesterol en sangre son normales. En estado post-absortivo y después de una dieta rica en lípidos presentan hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.

Aunque no directamente relacionado con el peso corporal ni la resistencia a insulina, recientemente se ha comunicado que los ratones *cav1*^{-/-} tienen problemas neurológicos y neuromusculares, ya que presentan una disminución en el peso del cerebro y desarrollan anomalías motoras y de comportamiento (Trushina *et al.*, 2006). Estos autores sugieren que caveolina-1 participa en el mantenimiento de las rutas estriado-palido-tálamo-corticales asociadas con el control motor.

Los autores Cohen *et al.* (2003b) mostraron que los ratones *cav1*^{-/-}, presentan una disminución de la fosforilación del receptor de insulina (IR), inducida por insulina, en el tejido adiposo blanco. Este efecto era debido a una disminución del 90% en la expresión de IR que no se explicaba por una reducción en los niveles del mRNA, que eran normales. Esta disminución de la expresión de IR era específica del tejido adiposo y no se observaba ni en músculo, ni en hígado. La transfección transitoria de caveolina-1 en fibroblastos embrionarios (MEFs) procedentes de estos ratones, conseguía recuperar los niveles normales de IR. Además, estos autores comprobaron que la ausencia de caveolina-1 favorece la degradación de IR vía proteosomas. Estos autores sugieren que la caveolina-1 estabiliza a IR evitando su degradación gracias a su interacción mediante el dominio SCD.

El fenotipo de los ratones KO de caveolina-2 es más leve que el de caveolina-1, y sus células presentan caveolas. Se ha descrito que el órgano más afectado es el pulmón que presenta un elevado crecimiento de las células epiteliales (fibrosis) (Razani *et al.*, 2002b).

Los ratones deficientes en caveolina-3 presentan un fenotipo más severo a nivel muscular, presentan una desorganización del complejo distrofina (Galbiati *et al.*, 2001), que en condiciones normales se localiza en caveolas/ *rafts* lipídicos y en los túbulos T.

3 Fisiología y metabolismo de los adipocitos

La función principal del tejido adiposo blanco es el control de las reservas energéticas que contiene almacenadas en forma de triglicéridos y colesterol en las gotas lipídicas de los adipocitos.

Durante periodos de exceso calórico en el organismo, el tejido adiposo almacena los lípidos y azúcares en forma de triglicéridos (lipogénesis) y durante estados de necesidad energética libera las reservas en forma de ácidos grasos libres o no esterificados (FFA o NEFA) y glicerol (lipólisis)(figura 10).

Estos procesos metabólicos responden a distintos estímulos exteriores o generados por el propio adipocito, entre los que destacan la insulina, el cortisol, las catecolaminas, la hormona del crecimiento, la testosterona, los ácidos grasos libres y diferentes citoquinas.

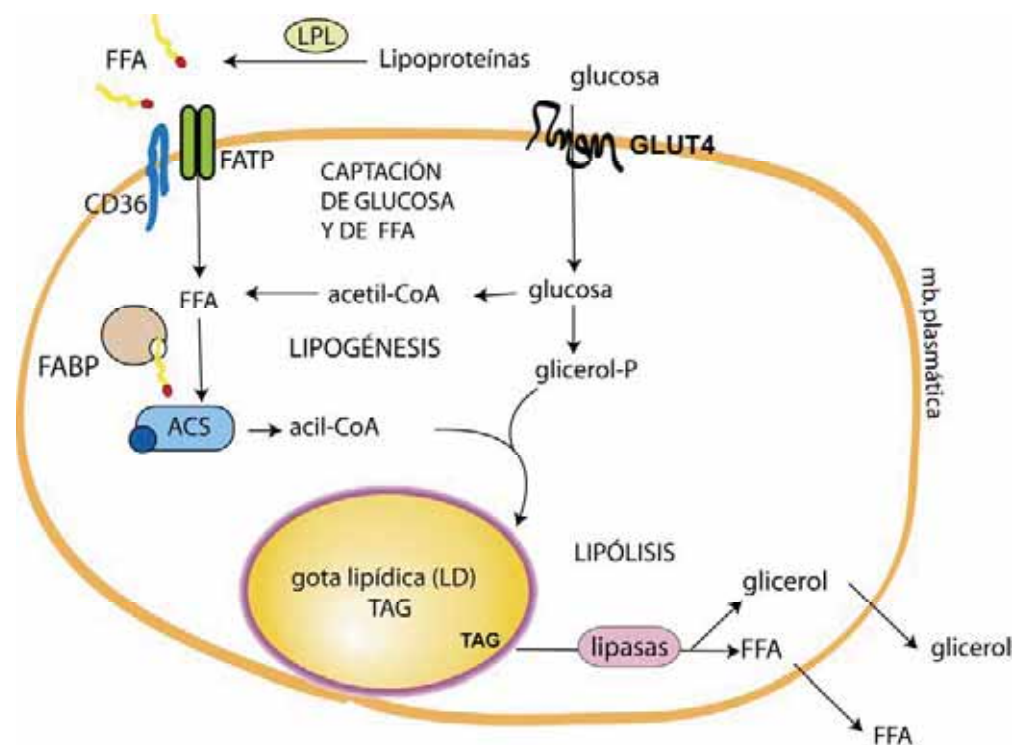


Figura 10 Vías bioquímicas implicadas en la regulación del balance energético en el adipocito. FFA: ácidos grasos libres., FATP: proteína transportadora de ácidos grasos; CD36: translocasa de ácidos grasos; FABP: proteína de unión a ácidos grasos citosólica; ACS: acil-CoA sintetasa; LPL: lipoproteína lipasa. Adaptado de (Sethi and Hotamisligil, 1999)

El tejido adiposo no sólo funciona controlando la homeostasis energética sino que también actúa como un órgano endocrino que secreta una gran variedad de péptidos bioactivos y proteínas conocidas con el nombre de adipocinas, implicadas en mecanismos de señalización intercelular y en la regulación de procesos fisiológicos como la sensibilidad periférica a la insulina. En este sentido, se ha implicado al tejido adiposo en el mantenimiento de la homeostasis energética mediante la regulación de la secreción de insulina, la acción de la insulina y el metabolismo glucídico y lipídico, el sistema inmunitario y la reproducción. En los últimos cinco años se han descrito más cien productos de secreción incluyendo ácidos grasos (FFA), enzimas (lipoproteína lipasa (LPL) o la adiposina), factores de crecimiento (VEGF

(*vascular endothelial growth factor*), citoquinas (TNF α (factor de necrosis tumoral) o interleuquina 6) o diferentes hormonas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y de glucosa (leptina, Acrp30, resistina, proteína de estimulación de la acilación) (Mora and Pessin, 2002; Fischer-Posovszky et al., 2007; Trayhurn, 2007)

La importancia del tejido adiposo se ha hecho muy evidente en los últimos años ya que tanto su exceso (en situaciones de obesidad) como su defecto (en situaciones de lipodistrofia) dan lugar a alteraciones metabólicas que pueden resultar en estados graves de resistencia a la insulina y a diabetes tipo II (revisiones Fischer-Posovszky *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2002; Moreno and Martinez, 2002; Faraj et al., 2004).

En situaciones de resistencia a insulina los niveles de ácidos grasos liberados por el tejido adiposo son muy elevados e inhiben la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno y la oxidación de la glucosa en músculo, e incrementan la producción de glucosa hepática (Schulman and ., 2000).

En este sentido metabólico, se ha implicado a caveolina-1, ya que como hemos comentado anteriormente, los ratones *cav1*^{-/-} presentan un tejido adiposo disminuido, con pocos triglicéridos, los adipocitos son de menor tamaño, secretan niveles bajos de adipocitoquinas como la leptina y el Acrp30, y presentan alteraciones en la homeostasis lipídica, glucídica y en balance energético (Razani *et al.*, 2002a; Razani *et al.*, 2002c).

3.1 Proceso de diferenciación adipocitaria

Los modelos *in vivo* para estudiar los mecanismos moleculares que ocurren durante la adipogénesis son todavía limitados. Sin embargo, en los últimos años, los modelos *in vitro* se han utilizado ampliamente para estudiar la diferenciación a adipocito. Así, varias líneas celulares de preadipocitos (ES cells, CH3 10T1/2, 3T3L1, 3T3-F442A, Ob17) y preadipocitos primarios aislados de distintos tejidos adiposos (subcutáneo, epididimal, perirrenal) se han usado (Gregoire et al., 1998). Las líneas celulares de preadipocitos más utilizadas son 3T3-F442A y 3T3L1, que se aislaron de células *Swiss 3T3* derivadas de embriones de ratón de 17-19 días. En esta tesis hemos trabajado con la línea celular de preadipocitos 3T3L1. Durante la fase de crecimiento, estas células (así como los preadipocitos primarios) son morfológicamente similares a fibroblastos. Cuando llegan a confluencia, la inducción de la diferenciación mediante los tratamientos adecuados, lleva a cambios drásticos en la forma celular, los preadipocitos adquieren forma redondeada, acumulan gotas lipídicas y adquieren características bioquímicas de adipocitos maduros blancos. La naturaleza del tratamiento de inducción de este proceso depende de las células empleadas, en el caso de los preadipocitos 3T3L1 consiste en un cóctel de insulina, dexametasona e IBMX (isobutilmetilxantina) en un medio que contiene 10% de FBS, tal y como se explica en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos.

El proceso de adipogénesis implica dos eventos fundamentales que son la proliferación de los preadipocitos y la diferenciación a adipocitos. Ambos procesos están altamente regulados e interrelacionados y originan la fenotipo final del adipocito (Fajas, 2003):

1. Los preadipocitos proliferan hasta alcanzar la confluencia, entonces entran en una fase de “arresto de crecimiento” mediante inhibición por contacto.

2. Tras la estimulación hormonal con el cóctel descrito, estas células vuelven a entrar en el ciclo celular, es lo que se llama expansión clonal. Tanto la insulina como niveles elevados de AMP cíclico (AMPc) son sustancias mitogénicas. En concreto la insulina activa al receptor de IGF-1 (*insulin-like growth factor receptor*) que es uno de los más potentes inductores de la expansión clonal (Smith et al., 1988; Schmidt et al., 1990) mediante la activación entre otros de Ras, ERK1/2 y de Akt (Gregoire *et al.*, 1998).

3. Tras varios ciclos de división, las células sufren de nuevo el secuestro proliferativo.
4. Diferenciación terminal a adipocito. Este último paso está caracterizado por la expresión coordinada de genes específicos que determinan el fenotipo de adipocito.

Durante este proceso se activan coordinadamente una serie de factores de transcripción que permiten que se lleve a cabo todo el programa de diferenciación. Los factores de transcripción más estudiados y a los que se da más importancia son los PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) y dos grupos de factores: los c/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*) y ADD-1/SREBP-1.

Como se resume en el esquema de la figura 11, c/EBP β y δ se inducen como respuesta a hormonas específicas (insulina y glucocorticoides) provocando por un lado la activación de la transcripción de PPAR γ (que también se estimula por IBMX) y la producción de sus ligandos, que son necesarios para su actividad transcripcional. ADD1/SREBP1 también participa en este proceso. Finalmente, la diferenciación terminal requiere la acción conjunta de PPAR γ , c/EBP α y ADD1/SREBP1 que inducen la expresión de los genes específicos de adipocitos maduros.

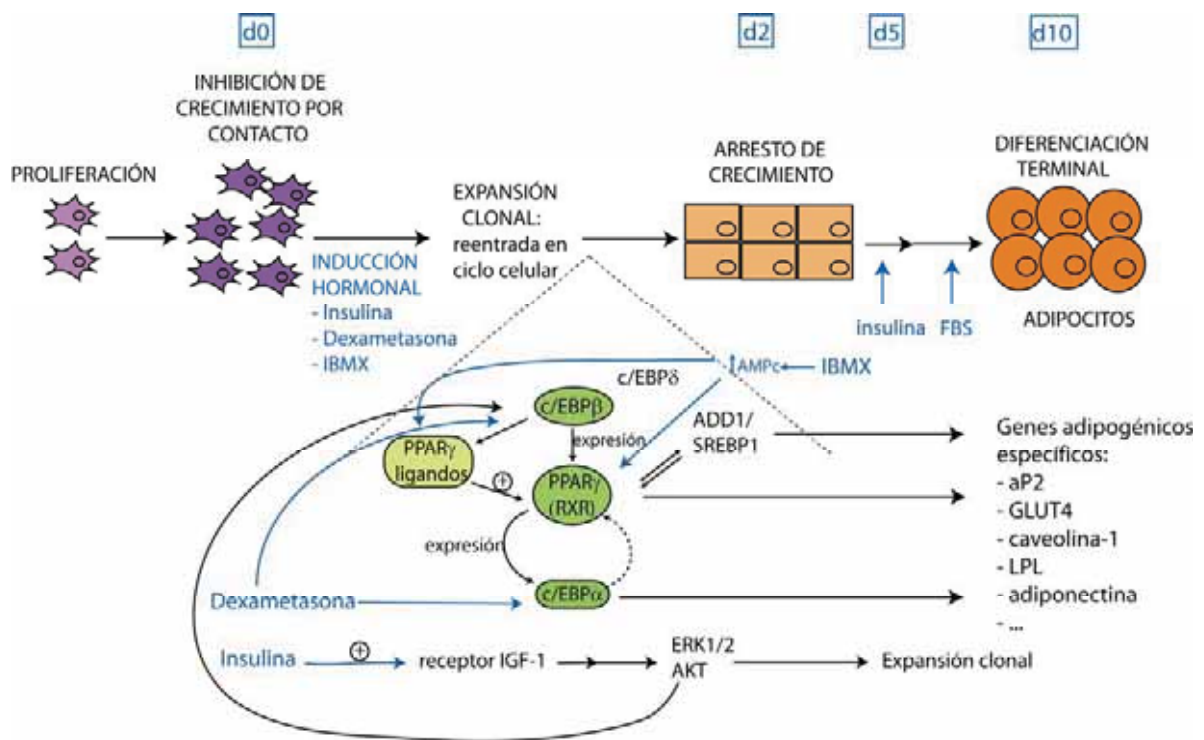


Figura 11 Esquema de los distintos factores implicados en la diferenciación de preadipocitos 3T3L1. Adaptado de (Fajas, 2003; Farmer, 2005; Liu *et al.*, 2001; Farmer, 2006).

Los PPARs pertenecen a la familia de receptores nucleares de hormonas de tipo II implicados en la regulación de la expresión de genes que regulan metabolismo, diferenciación, apoptosis e inflamación. Son factores de transcripción activados por ligando (esteroides, ácidos grasos, hormonas y vitamina A, entre otros) y forman heterodímeros con RXR (*retinoid X receptor*) (Juge-Aubry et al., 1995; Schoonjans et al., 1996), para activar la expresión de sus genes diana a través de su unión a los elementos PPRE (*PPAR responsive elements*) de los promotores de estos genes. PPAR γ es el miembro de la familia que se expresa mayoritariamente durante la adipogénesis. Se han identificado tanto ligandos naturales de PPAR γ como los ácidos grasos poliinsaturados, esteroides o las prostaglandinas de la serie J, como ligandos sintéticos, entre estos destacan las Tiazolidinediona, una clase de drogas usadas como agentes antidiabéticos con alta afinidad para unirse y activar a PPAR γ . A esta familia pertenecen la rosiglitazona, o la pioglitazona, que se han usado habitualmente para activar eficientemente el programa de diferenciación a adipocito mediante la activación de PPAR γ . La naturaleza, momento y proceso de producción del ligando biológico de PPAR γ durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3L1 aún no se conoce exactamente, aunque se ha sugerido que este ligando de naturaleza lipídica es generado por los preadipocitos en fases tempranas del proceso de diferenciación (Tzamei et al., 2004) en respuesta al aumento en los niveles de AMPc y a la actividad de c/EBP β (Hamm et al., 2001; Farmer, 2005) y de SREBP-1c/ADD1 (Kim et al., 1998).

La familia de factores de transcripción c/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*) tiene un papel fundamental durante la adipogénesis (Gregoire et al., 1998; Farmer, 2005; Zuo et al., 2006; Farmer, 2006). Estos factores de transcripción tienen un dominio básico de activación transcripcional y un dominio de cremallera de leucinas que permite la homo y heterooligomerización para su correcto funcionamiento. Las distintas isoformas α , β y δ , muestran un patrón de expresión temporal diferente durante la diferenciación adipocitaria (Cao et al., 1991) (figura 12). Así, mientras la activación de c/EBP α ocurre tardíamente y activa la transcripción de genes característicos de adipocitos maduros (aP2, GLUT4, PEPCK, leptina o el receptor de insulina) las isoformas β y δ de c/EBP están presentes en los preadipocitos, y sus niveles aumentan transitoriamente durante la diferenciación gracias a la acción del IBMX (que aumenta los niveles de AMPc) y la dexametasona respectivamente (Wu et al., 1996; Gregoire et al., 1998), aunque la fosforilación de c/EBP β (posiblemente mediada por proteínas ERK/GSK3) también es necesaria para su correcto funcionamiento (Farmer, 2005).

La proteína SREBP-1c/ADD1 (*Adipocyte determination and differentiation factor 1*) pertenece a la familia de factores de transcripción SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*). Se caracteriza por su estructura de doble hélice alfa y por tener un dominio de cremalleras de leucina. Este factor de transcripción incrementa la síntesis de ácidos grasos y otros lípidos, y también se ha implicado en la activación de la síntesis de los ligandos endógenos de PPAR γ (Kim et al., 1998).

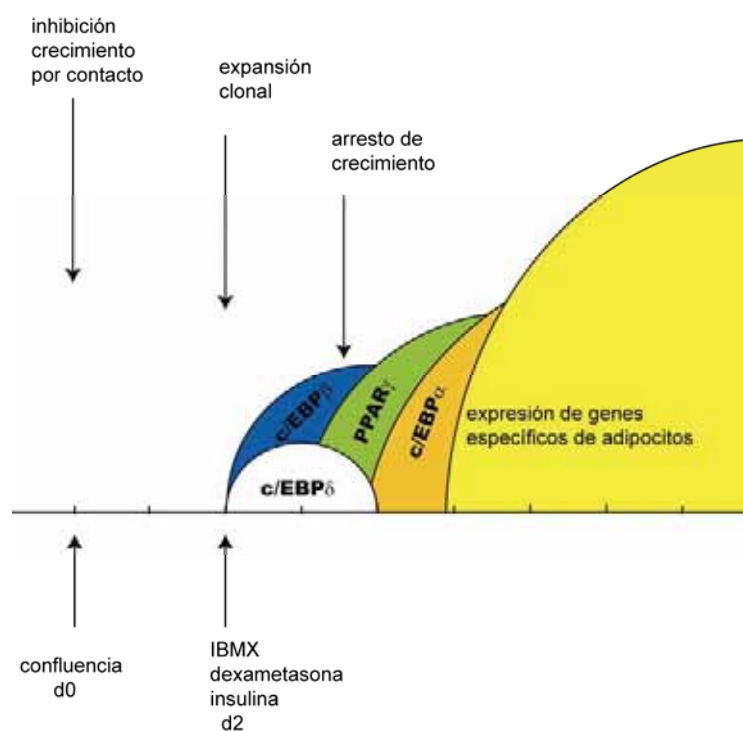


Figura 12 Expresión de los factores de transcripción durante la diferenciación a adipocitos.
Adaptado de (Ntambi and Young-Cheul, 2000)

3.2 Metabolismo glucídico en el adipocito: acción de la insulina sobre el transporte de glucosa

La insulina es la hormona anabólica más potente conocida en mamíferos. Realiza funciones pleiotrópicas esenciales para el crecimiento, para el desarrollo de los tejidos, para el control del metabolismo y regula la concentración de glucosa en la sangre. Las células β del páncreas secretan insulina a la circulación como respuesta al aumento de los niveles circulantes de glucosa y aminoácidos. La insulina estimula la captación de glucosa por el tejido adiposo y por el músculo e inhibe la producción de glucosa por el hígado (inhibiendo tanto la gluconeogénesis como la glicogenólisis)

En el tejido adiposo, la insulina participa en diversos procesos celulares y es fundamental en el control de metabolismo celular. Así, estimula el almacenamiento de triglicéridos por diferentes vías:

- Promueve la diferenciación de preadipocitos a adipocitos.
- Estimula el transporte de glucosa y la síntesis de triglicéridos a partir de ella (lipogénesis).
- Estimula la captación de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos (esterificación).
- Inhibe la lipólisis de los triacilglicéridos acumulados en las gotas lipídicas.

Aunque el 75% de la captación de glucosa estimulada por insulina ocurre en el músculo esquelético (Klip and Paquet, 1990), la eliminación específica del transportador de glucosa GLUT4 en el tejido adiposo de ratones provoca resistencia a la insulina en el músculo esquelético y en el hígado (Abel et al., 2001). Estos resultados, entre otros, ponen de manifiesto la implicación del tejido adiposo en el control del metabolismo glucídico global del organismo.

3.2.1 Los transportadores de glucosa (GLUTs): GLUT4

El transporte facilitado de glucosa está mediado por la familia de transportadores de glucosa llamados GLUTs que se diferencian por su distribución tisular, por sus propiedades cinéticas y por su especificidad de sustrato. Actualmente se conocen 13 miembros de esta familia (GLUT1-12) y el transportador HMIT1 (transportador de mioinositol).

Estos transportadores presentan 12 dominios transmembrana con los extremos amino y carboxi terminales citosólicos. En función de la homología de la secuencia y de la similitud estructural se han definido tres subclases de transportadores: clase I (GLUT1-4) que son transportadores de glucosa, clase II (GLUT5, 7, 9 y 11) son transportadores de fructosa y clase III (GLUT6, 8, 10, 12 y HMIT1) son miembros estructuralmente atípicos.

Los adipocitos expresan GLUT1 y GLUT4. GLUT1 presenta una expresión ubicua y es el responsable del transporte basal en estas células mientras que GLUT4 es responsable del transporte de glucosa estimulado por insulina en el tejido adiposo y en el músculo esquelético y cardíaco.

A diferencia del resto de transportadores de glucosa GLUT, los transportadores GLUT4 en estado basal se reciclan entre la membrana plasmática y compartimentos intracelulares de almacenamiento donde reside mayoritariamente (aproximadamente el 95%). La insulina provoca la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Este efecto de la insulina se consigue por un lado, aumentando la tasa de exocitosis de GLUT4 y por otro, disminuyendo la tasa de endocitosis, de tal forma que se produce un incremento neto de GLUT4 en la membrana plasmática (aproximadamente el 50% está en la membrana tras la estimulación con insulina)(Rudich and Klip, 2003; Watson et al., 2004; Karylowski et al., 2004) (figura 13).

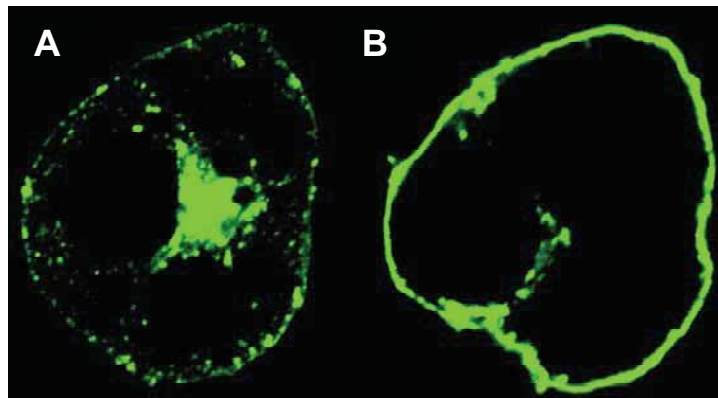


Figura 13 Estimulación de la translocación de GLUT4 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática. Imagen de (Watson *et al.*, 2004). Adipocitos 3T3L1 fueron transfectados con una proteína fusión de GLUT4-GFP(*green fluorescent protein*) e incubados en ausencia (A) o presencia (B) de insulina 100nM durante 30 minutos. Las células se fijaron y sometieron a microscopía confocal.

3.2.1.1 Localización intracelular de GLUT4

Mediante diversas técnicas microscópicas se ha localizado al transportador GLUT4 en estructuras túbulo-vesiculares perinucleares y en distintas vesículas citosólicas (Slot et al., 1991; Malide et al., 2000). El marcaje de GLUT4 perinuclear parcialmente colocaliza con marcadores del compartimento de reciclaje endosomal (ERC) y de la red *trans*-Golgi (TGN) (Bryant et al., 2002; Ploug and Ralston, 2002). Se han identificado dos poblaciones de GLUT4, una que colocaliza con el receptor de transferrina (TfR), marcador del ERC, y otra independiente de TfR que se ha llamado “compartimento especializado (SC)” o “vesículas de almacenamiento de GLUT4 (GSV)” (Dugani and Klip, 2005). La insulina moviliza a GLUT4 fundamentalmente desde este último compartimento. Aunque se ha descrito que GLUT4 también se moviliza desde el compartimento de reciclaje endosomal y desde el complejo de Golgi (Ishiki and Klip, 2005).

La proteína IRAP (*insulin responsive aminopeptidase*) comparte algunas características del tráfico de GLUT4 y puede regular la retención de las vesículas de GLUT4 (Hosaka et al., 2005). Otro marcador de los compartimentos SC/GSV es la proteína v-SNARE, VAMP2, implicada en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por la acción de la insulina (Bryant et al., 2002; Watson et al., 2004), pero que no está implicada en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en condición basal (Ishiki et al., 2005). Sintaxina-4 y SNAP23 son proteínas t-SNARE localizadas en la membrana plasmática que forman complejos estables con VAMP2 como respuesta a la acción de la insulina (Tellam et al., 1997; Rea et al., 1998).

La proteína GGA (*γ-ear-containing Arf-binding protein*) es necesaria para la salida de GLUT4 desde TGN hacia el compartimento SC/GSV. GGA interacciona con sortilina, que es una proteína de las membranas del TGN y de endosomas, necesaria para la formación de las vesículas de almacenamiento de GLUT4 (Shi and Kandror, 2005).

3.2.1.2 Tráfico de GLUT4

Como ya hemos mencionado, el transportador de glucosa GLUT4 sufre un ciclo de endocitosis y exocitosis que, en condición basal se encuentra desplazado hacia la endocitosis, manteniendo la mayoría del GLUT4 en los compartimentos intracelulares. Así, en condición basal parte de GLUT4 se recicla continuamente con la membrana plasmática desde el compartimento de reciclaje endosomal (ERC) donde colocaliza con TfR. En cambio la insulina provoca el aumento de la exocitosis de GLUT4, fundamentalmente desde los compartimentos especializados (SC). La insulina estimula tanto la salida de GLUT4 desde los compartimentos de reciclaje endosomal hacia los compartimentos especializados, como desde estos últimos a la membrana plasmática, permitiendo así la localización de GLUT4 en la membrana plasmática (Zeigerer et al., 2002; Karylowski et al., 2004; Ishiki et al., 2005) (figura 14). Sin embargo, hay autores que afirman que la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por acción de la insulina ocurre desde el compartimento endosomal de reciclaje, y que las moléculas de GLUT4 almacenadas en la red del trans-golgi son estimuladas por la insulina a pasar a estos compartimentos endosomales. (Shewan et al., 2003; Govers et al., 2004).

Para que ocurra la exocitosis de las vesículas que contienen GLUT4 se ha descrito que es necesaria la activación por un lado de una proteína GAP (*Rab-GTPasa-activating protein*) sustrato de Akt llamada AS160 (Sano et al., 2003; Larance et al., 2005), cuya activación depende de PI3K y de Akt, y que provoca la activación de Rab4. También se ha descrito que la actividad de la GTPasa TC10, independiente de PI3K, regula la exocitosis de GLUT4. (Watson et al., 2001; Kanzaki et al., 2002; Kanzaki et al., 2004).

En la fusión de las vesículas que contienen GLUT4 con la membrana plasmática, como hemos dicho antes participa VAMP2, proteína v-SNARE de estas vesículas, y las proteínas t-SNARE de la membrana plasmática entre las que destacan SNAP23 y sintaxina4, así como synip, tomosyn y munc18 que se unen a sintaxina4 y modulan su capacidad de interacción con VAMP2 como respuesta al estímulo de la insulina, probablemente vía activación de PKC ζ (Widberg et al., 2003; Lizunov et al., 2005; Hodgkinson et al., 2005a; Hodgkinson et al., 2005b) (figura 14).

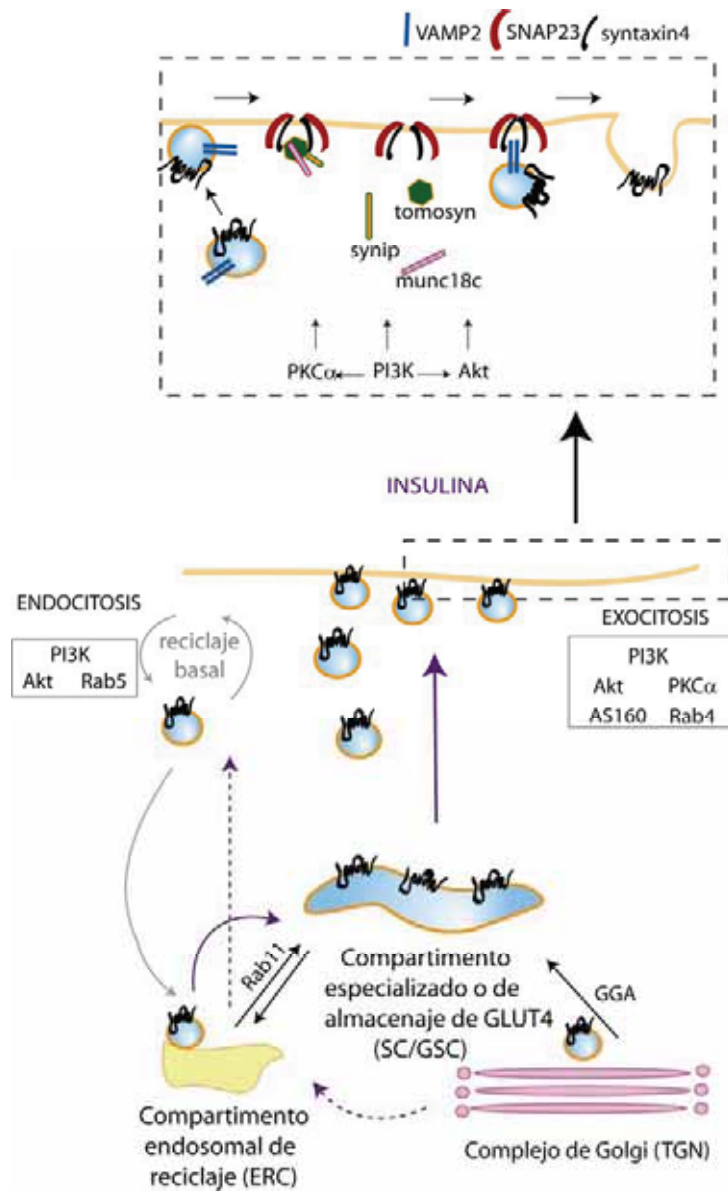


Figura 14 Esquema del tráfico de GLUT4 intracelular. Adaptado de (Ishiki *et al.*, 2005).

La primera evidencia de que las caveolas/ caveolina-1 estaban involucrados en la eficiente translocación de GLUT4 a la membrana plasmática la aportaron Scherer *et al.* (1994) que demostraron (usando centrifugación en gradiente de densidad) que la activación por insulina incrementaba la presencia de vesículas de baja densidad que contenían GLUT4 y caveolina-1. Los autores Karlsson *et al.* (2002) apoyaron estos resultados afirmando que la insulina provoca la translocación de GLUT4 a las caveolas de la membrana plasmática de los adipocitos mediante técnicas de microscopía electrónica y confocal sobre fragmentos de membrana plasmática. Otros autores como Gustavsson *et al.* (1996) o Ros-Baro *et al.* (2001) también han encontrado evidencias similares. La Dra. Anna Ros de nuestro grupo demostró la localización de GLUT4 en caveolas de adipocitos 3T3L1 y aislados de rata mediante inmunolocalización sobre fragmentos de membrana plasmática empleando técnicas de microscopía electrónica y confocal, y también mediante métodos bioquímicos: extracción celular en presencia o ausencia de Tritón-X-100, recuperación de las fracciones ligeras en un gradiente de sacarosa y análisis por western blot o microscopía electrónica de las fracciones enriquecidas en caveolina-1. Sin embargo, la localización de GLUT4 en caveolas ha sido discutida por otros autores como Kandror *et al.* (1995) que inmunoaislaron caveolas y encontraron que GLUT4 no se encuentra en ellas tras la estimulación por insulina, o Malide *et al.* (2000) que mediante técnicas de microscopía electrónica sobre criosecciones de adipocitos tampoco asociaron GLUT4 a caveolas. Parte de esta controversia puede deberse a las diferencias en los protocolos y metodologías empleados.

Se ha sugerido que en la internalización de GLUT4 desde la membrana plasmática participan dos vías: una dependiente de vesículas recubierta de clatrina (Robinson *et al.*, 1992; Kao *et al.*, 1998; Ceresa *et al.*, 1998) y otra dependiente de caveolas (Ros-Baro *et al.*, 2001; Shigematsu *et al.*, 2003; Blot and McGraw, 2006), incluso se apoya la existencia de una tercera vía de naturaleza aún desconocida (Conner and Schmid, 2003). La vía dependiente de clatrina seguiría la misma vía constitutiva de reciclaje de proteínas como el receptor de transferrina o GLUT1, donde son necesarias la proteína adaptadora de vesículas de clatrina $\alpha 2$ y la proteína GTPasa dinamina (implicada en la fisión de la vesícula) y la activación de Rab5 (que pertenece a la familia de *small GTP-binding protein* Rab implicadas en el transporte de membranas entre orgánulos). Todavía no se ha resuelto si GLUT4 se internaliza también mediante la fisión de caveolas con la participación de la dinamina en este proceso o si las caveolas actúan como una estación obligatoria antes de que ocurra la endocitosis.

3.2.1.3 Vía de señalización de la insulina

La vía de señalización de la insulina que lleva a la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática más aceptada y ampliamente descrita es la que se llama vía dependiente de PI3K (Farese, 2002; Welsh *et al.*, 2005).

El receptor de insulina (IR) es una proteína heterodimérica de membrana formada por dos subunidades α y dos subunidades β . Cuando la insulina se une a la subunidad α del receptor se activa su actividad quinasa intrínseca de la subunidad β y se produce la autofosforilación cruzada de las dos subunidades β . La familia de proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS) interacciona con el IR fosforilado a través de un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB) de manera que el IR fosforila diversas tirosinas de IRS.

A las tirosinas fosforiladas de IRS se unen proteínas con dominios SH2 como la subunidad p85, que es el dominio regulador de la proteína fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), que está formada por la subunidad reguladora p85 y por la subunidad catalítica p110.

En condición basal, PI3K se encuentra en el citosol, en presencia de insulina, el dominio p85 se une a IRS, y acerca la subunidad p110 a la membrana permitiendo que fosforile el fosfatidil-inositol, el fosfatidil-insositol-4-fosfato o el fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato de manera que se forman los derivados fosforilados en la posición 3 del anillo de inositol. Entre éstos, el fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PI3P) activa a proteínas con dominios pleckstrina (PH) como la proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositol (PDK-1) y la proteína quinasa B (PKB/Akt) (figura 15).

PKB/Akt es activada en la membrana plasmática. Parece ser que la isoforma activada en las células sensibles a la insulina es Akt2/PKB β (Hill et al., 1999). La unión de PKB/Akt a los productos de la PI3K tiene una doble acción: por un lado la transloca del citosol a la membrana plasmática acercándola a la PDK-1 y PDK-2 y por otro lado provoca un cambio conformacional que permite que PDK-1 la fosforile en la treonina de la posición 308. PDK-1 fosforila a la vez PKB/Akt y PKC ζ/λ (isoformas atípicas de la proteína quinasa C, aPKC). PKC ζ es activada en endosomas y actúa sobre la exocitosis de las vesículas de GLUT4 y facilitando la fusión con la membrana plasmática (Ishiki et al., 2005). Se ha descrito que PKC ζ regula negativamente a Akt (Dandekar et al., 1998; Doornbos et al., 1999). No se conoce exactamente el significado de esta interacción, pero es posible que PKC ζ enmascare los sitios de unión a PI3P en el dominio PH de la proteína Akt/PKB. La activación de PKC ζ por PDK-1 podría liberar PKC ζ , facilitando la activación de Akt. No se conocen exactamente los sustratos de PKC ζ implicados directamente en esta vía, pero se ha propuesto que PKC ζ fosforila en una serina a IRS-1 que disminuye la fosforilación en tirosinas y ya no activa a PI3K (Ravichandran et al., 2001), sugiriendo la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa para controlar la sensibilidad a la insulina a nivel de IRS-1.

La activación de Akt y de PKC ζ/λ es necesaria para que ocurra la correcta translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Las dianas exactas de estas proteínas no se conocen pero implican la activación de proteínas Rab (se han descrito Rab4, Rab11) y la participación del citoesqueleto de actina y tubulina (Tanti et al., 1996; Cong et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 2002).

La segunda vía de señalización fue propuesta por los grupos de los Drs. Pessin y Saltiel, estos autores defienden que en la acción de insulina sobre la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, son indispensables dos vías de señalización: una dependiente de PI3K (que acabamos de explicar) y otra independiente, asociada a caveolas, y que llamamos Cbl/TC10 (Baumann et al., 2000; Chiang et al., 2001).

En la segunda vía, la activación del receptor de insulina provoca la fosforilación de otro sustrato del receptor, la proteína c-Cbl. Para ello, la proteína CAP (*Cbl associated protein*) interacciona mediante su dominio SoHo (*sorbyn homology*) con la flotilina de los rafts lipídicos/caveolas y mediante su dominio SH3 (dominio de homología a SCR3) con c-Cbl, permitiendo así el acercamiento de c-Cbl a la membrana. La proteína APS (*associated protein substrate*) que está unida y fosforilada por el receptor de insulina, recluta a c-Cbl y funciona como adaptador para que c-Cbl sea fosforilado por el receptor de insulina. Tras la fosforilación de c-Cbl, los complejos CAP-Cbl se separan del receptor y se acumulan en las caveolas a través de su asociación con flotilina. Aquí, c-Cbl recluta a CrkII y C3G. CrkII es un adaptador entre c-Cbl y C3G, que es un intercambiador de nucleótidos (GEF) de la GTPasa TC10 (de la familia de las GTPasas Rho, altamente relacionada con la proteína Cdc42), que una vez activado por Cbl, activa a TC10 provocando cambios en la remodelación del citoesqueleto de actina implicados en la translocación de GLUT4 (Baumann et al., 2000; Watson et al., 2001; Chiang et al., 2001; Kanzaki et al., 2002; Saltiel and Pessin, 2003) (figura 15).

Se ha descrito que esta vía es específica de adipocitos y no aparece en células musculares (Bickel, 2002; Jebailey et al., 2004).

Sin embargo, la importancia de esta vía en la acción de la insulina sobre la estimulación del transporte de glucosa está siendo motivo de discusión. Así, estudios realizados por (Mitra et al., 2004), mediante el uso de siRNA para bloquear la expresión en adipocitos 3T3L1, de componentes claves de la vía Cbl/TC10, encontraron que los siRNA contra las proteínas CAP, c-Cbl, o CrKII (intercambiador de nucleótidos de TC10) no afectaban la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática ni al transporte de glucosa estimulados por insulina. Además, los adipocitos epididimales procedentes de los ratones KO de c-Cbl, tampoco mostraban ninguna alteración en el transporte de glucosa estimulado por distintas dosis de insulina.

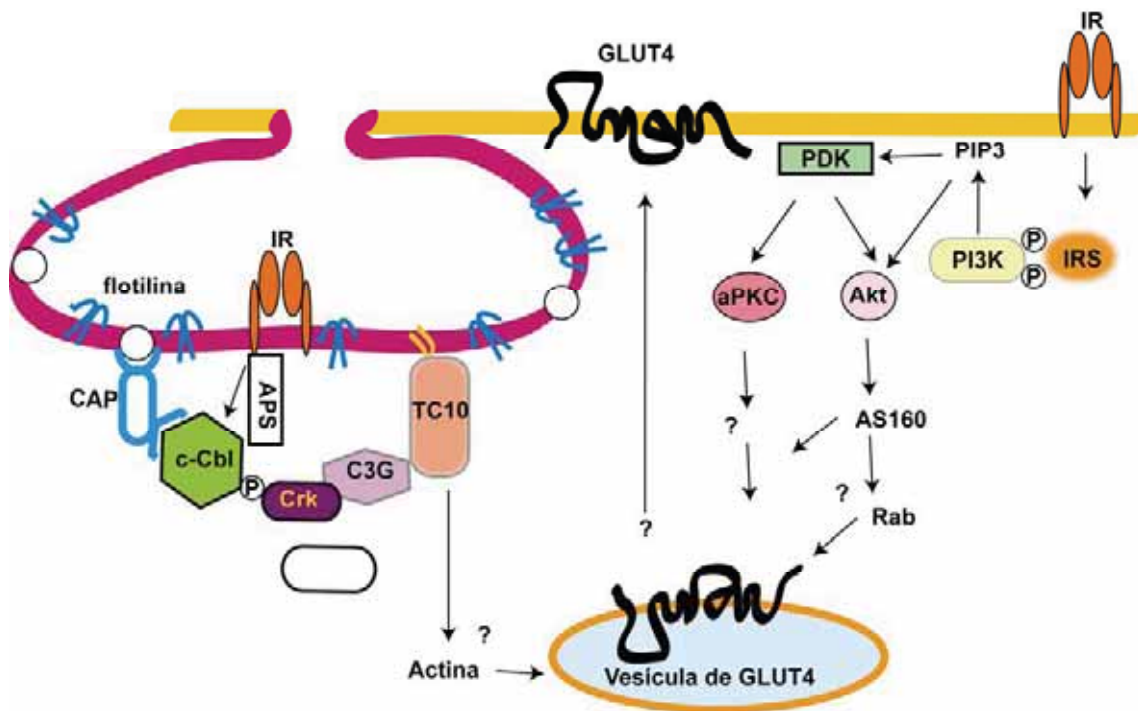


Figura 15 Modelo esquemático de las vías de señalización de la insulina que llevan a la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Adaptado de (Watson et al., 2004).

3.3 Metabolismo lipídico del adipocito: transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana plasmática.

Los adipocitos humanos no tienen gran capacidad para sintetizar ácidos grasos *de novo*, de manera que, gran parte de los triacilglicéridos (TAGs) se sintetizan a partir de los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) mediada por la proteína lipasa LPL. Los ácidos grasos circulantes liberados por acción de las lipasas se ligan a la albúmina y son captados por los adipocitos donde se esterifican con glicerol formando los TAGs y se almacenan en las gotas lipídicas. Este proceso debe ser muy eficiente ya que los ácidos grasos libres actúan como detergentes y su

acumulación puede disolver la membrana plasmática provocando la lisis celular (Stralfors, 1990).

Durante la diferenciación desde preadipocitos a adipocitos 3T3L1, la captación de ácidos grasos pasa de ser un proceso de difusión simple que muestra una dependencia lineal con la concentración de ácido oleico en el exterior celular, a ser un proceso de transporte mucho más eficiente, facilitado por proteínas de membrana que ocurre de forma saturable en un 90% del transporte (Stump et al., 2001; Stahl et al., 2002).

Se ha sugerido que varias proteínas de la membrana plasmática median el transporte de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) en adipocitos, incluyendo FABPpm (*plasma membrane fatty acid binding protein*) (Stremmel and Theilmann, 1986), FAT/CD36 (*fatty acid translocase*) (Abumrad et al., 1993) y FATP1 (*fatty acid transport protein*) (Schaffer and Lodish, 1994).

La proteína de unión a ácidos grasos de membrana (FABPpm) fue purificada mediante cromatografía de afinidad oleato-agarosa de adipocitos (también de hepatocitos, enterocitos yeyunales", miocitos cardíacos) (Stremmel *et al.*, 1986). Esta proteína comparte identidad de la secuencia de aminoácidos con la aminopeptidasa de aspartato mitocondrial (mAspAT) (Berk et al., 1990). La expresión de FABPpm en preadipocitos 3T3L1 provoca un aumento en la captación de LCFA que además refleja un componente saturable de gran afinidad que es inhibido usando anticuerpos anti FABPpm (Zhou et al., 1992). Su expresión se induce durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3L1, en paralelo con el incremento en el transporte de ácidos grasos, y está alterada en las ratas Zucker obesas y diabéticas, donde los niveles de mRNA correlacionan con las tasas de captación de LCFA (Berk et al., 1997). Se ha sugerido que FATPmb (así como CD36) son proteínas asociadas a la membrana que unen LCFA y que facilitan su transporte acumulando los ácidos grasos en la membrana plasmática (Abumrad et al., 1999).

CD36/FAT (*fatty acid translocase*) se identificó como proteína transmembrana (presenta dos dominios transmembrana y un largo *loop* extracelular glicosilado) implicada en la captación de ácidos grasos en base a su capacidad para unir reversiblemente ácidos grasos (Baillie et al., 1996) y para unir un derivado de LCFA, SSO (*sulfo-N-succinimidyl oleate*) que inhibe el transporte de LCFA (Harmon and Abumrad, 1993). Su sobreexpresión en fibroblastos provoca el aumento de la captación saturable y de alta afinidad de los ácidos grasos (Ibrahimi et al., 1996). Su expresión se induce durante la diferenciación de fibroblastos a adipocitos (Abumrad et al., 1991; Schaffer *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 2002). Además, los ratones KO de CD36 presentan aumentados los niveles séricos de ácidos grasos no esterificados tras el ayuno y sus adipocitos presentan disminuido el transporte de oleato (Febbraio et al., 1999; Coburn et al., 2000). La relación entre la estructura de los *rafts* lipídicos y el transporte de ácidos grasos se ha vinculado a la localización de CD36 en estos dominios (Pohl et al., 2002; Pohl et al., 2004b; Pohl et al., 2005; Ring et al., 2006; Eehalt et al., 2006). Así, se ha localizado a CD36 en las membranas resistentes a detergentes (DRMs) (Pohl *et al.*, 2004b), de hecho la eliminación de colesterol de las membranas provoca una disminución reversible del transporte de LCFA similar al provocado por el inhibidor de CD36, el SSO, sin que exista un efecto sinérgico cuando se añaden ambos tratamientos (Pohl *et al.*, 2005). La proteína CD36 se ha localizado en caveolas también usando técnicas de microscopía confocal y electrónica sobre fragmentos de membrana plasmática (Ring *et al.*, 2006) y mediante inmunoadsorción de caveolas (Souto et al., 2003). Así, a la proteína caveolina-1 también se le ha dado una función en la captación de ácidos grasos, por un lado, por su capacidad de unir ácidos grasos (Trigatti et al., 1999), y por otro lado como formador y estabilizador de las caveolas. Así, los ratones KO de caveolina-1, presentan resistencia a la obesidad inducida por la dieta (Razani *et al.*, 2002a). La expresión de un dominante negativo de caveolina-1 (Cav^{DGV}) que carece de la señal de

salida del retículo endoplasmático a la membrana plasmática, provoca la disminución del transporte de ácidos grasos, y este efecto se recupera cuando añadimos colesterol (Pohl *et al.*, 2004b).

Mientras que a FAT/CD36 y FABPpm se las asociado con el transporte de LCFA por su por su función acumulando los ácidos grasos en la membrana plasmática (Abumrad *et al.*, 1999; Ibrahim and Abumrad, 2002), se ha sugerido que las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs) son transportadores reales implicadas directamente en la translocación a través de la bicapa lipídica (Schaffer *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 2001).

La familia de los FATPs/Slc27 en mamíferos tiene 6 miembros, que se expresan en diferentes tejidos (Stahl, 2004). En adipocitos la isoforma mayoritaria es FATP1 (igual que en corazón) aunque también se expresa ligeramente FATP4, que es la isoforma que se expresa en enterocitos y se ha sugerido que es el principal transportador de ácidos grasos intestinal (Stahl *et al.*, 1999).

FATP1 presenta un dominio transmembrana y varios dominios aminotermiales asociados a la cara interna de la membrana. Dos grandes secuencias de aminoácidos no tienen contacto con la membrana y son citosólicos. Una de ellas contiene un dominio de unión e hidrólisis de ATP.

La expresión de FATP1 aumenta durante la diferenciación adipocitaria, y provoca un aumento del transporte de LCFA cuando se sobreexpresa en fibroblastos (Abumrad *et al.*, 1991; 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 un incremento paralelo del transporte de LCFA. En la membrana, FATP1 no se asocia con membranas resistentes a detergentes (DRMs) como ocurría con CD36 (Pohl *et al.*, 2005).

La oligomerización de FATP1 es necesaria para su correcto funcionamiento en el transporte de ácidos grasos (Richards *et al.*, 2003).

La acción precisa de FATP1 en el transporte de ácidos grasos no se conoce del todo pero se ha sugerido que facilita el transporte mediante acilación vectorial, es decir, el transporte de ácidos grasos a través de la membrana está acoplado a la esterificación. Este proceso permite a la célula un medio eficiente para el rápido metabolismo de los ácidos grasos que se captan y contribuye a disminuir la concentración intracelular de ácidos grasos libres lo cual favorece el transporte. Así se ha descrito que FATP1 presenta una actividad intracelular acil-CoA-sintetasa asociada (Coe *et al.*, 1999b; Zou *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2003). Además se ha descrito la interacción entre FATP1 y la sintetasa-1 de ácidos grasos de cadena larga ACSL1 (*long-chain acyl-CoA-synthetase 1*) en condiciones fisiológicas en adipocitos (Richards *et al.*, 2006).

ACSL1, como FATP1, también se descubrió durante una búsqueda funcional de proteínas que facilitaran el transporte de ácidos grasos en adipocitos (Schaffer *et al.*, 1994), y cataliza la esterificación de los LCFA (de 14 a 18 carbonos) en la posición C-1 con CoenzimaA, que es un paso de activación necesario para las rutas catabólicas y anabólicas en que intervienen los ácidos grasos. Es una proteína integral de membrana que aparece en distintas membranas del adipocito, incluida la membrana plasmática, donde colocaliza con FATP1 (Schaffer, 2002). Se ha de tener en cuenta que las ACSLs se consideran una familia de proteínas independiente de las FATPs y no están implicadas en el transporte de ácidos grasos sino en la esterificación, aunque este acoplamiento entre ambas proteínas lleva al transporte por acilación vectorial. De hecho, la sobreexpresión de ACSL1 lleva al aumento del transporte de ácidos grasos en adipocitos, igual que ocurría con FATP1, y la coexpresión de ambas proteínas provoca un efecto sinérgico en el transporte (Gargiulo *et al.*, 1999). Algunos autores como Richards *et al.* (2006) proponen un modelo en que los homodímeros de FATP1 interaccionan con ACSL1 formando un complejo oligomérico específico de adipocitos.

Así, algunos autores como Eehalt *et al.* (2006) proponen que los ácidos grasos LCFAs se liberan de las proteínas extracelulares (como la albúmina) mediante proteínas adaptadoras como FAT/CD36 o FABPpm en la membrana plasmática. Tras la unión de los ácidos grasos, la mayoría de CD36 se desplaza a las regiones de *raft* lipídicos, donde el proceso de translocación a través de la membrana puede ocurrir. Todavía no se sabe que importancia tiene en este proceso la difusión de los ácidos grasos por flip-flop, o la presencia de otras proteínas en estos dominios que pudieran estar implicadas en este transporte. Tras atravesar la membrana los LCFAs son transferidos a otras proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) para transportarlas a otros orgánulos o son activados por ACSL1. Además, postulan que CD36 y FABPpm podrían facilitar la unión de los ácidos grasos a FATP1, que provoca la translocación de los LCFAs y su activación mediante su actividad acil-CoA-sintetasa, permitiendo un transporte vectorial. Aunque existen autores que afirman que estos mecanismos son secundarios y que todavía no se conoce la proteína que media el transporte de LCFAs a través de la membrana de adipocitos (Kampf and Kleinfeld, 2007) (figura 16).

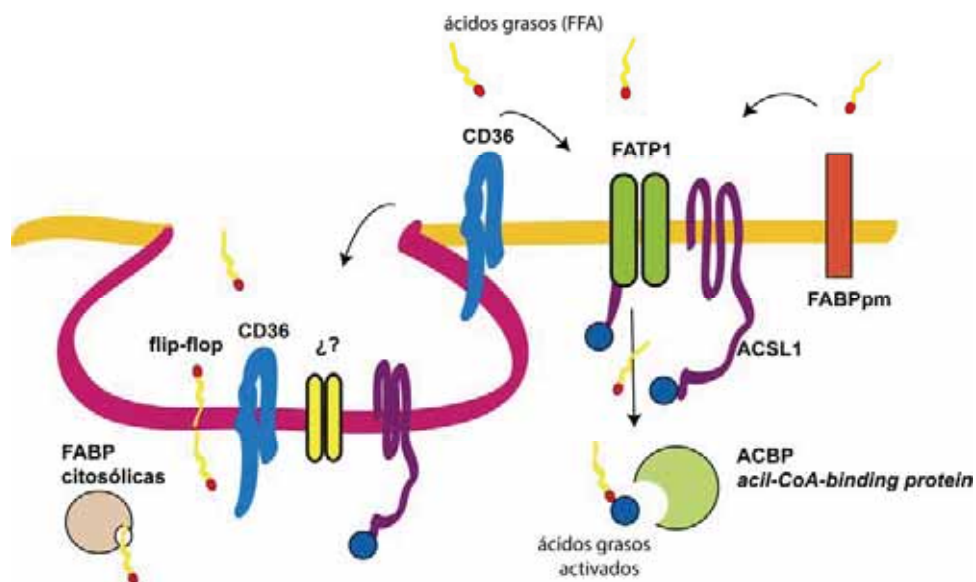


Figura 16 Modelo de la captación de ácidos grasos en los adipocitos. Adaptado de (Kampf *et al.*, 2007; Stahl, 2004).

3.4 Regulación de la lipólisis en los adipocitos.

Los adipocitos juegan un papel fundamental en la homeostasis energética mediante la hidrólisis de los triacilglicéridos (TAG), es la denominada lipólisis, que se define como la hidrólisis de TAG para generar ácidos grasos y glicerol, que son liberados para que sean usados como sustratos energéticos por otros órganos. Es un proceso que ocurre de manera ordenada y muy regulada, con diferentes enzimas que participan en cada paso. Los TAG se hidrolizan secuencialmente para formar diacilglicerol (DAG) y luego monoacilglicerol (MAG), con la liberación de un ácido graso en cada paso. El MAG se hidroliza finalmente para originar ácido graso y glicerol.

3.4.1 Principales enzimas implicadas en la hidrólisis de los triacilglicéridos

• Lipasa sensible a hormonas (HSL):

Hasta hace poco se consideraba que la iniciación de la hidrólisis de los TAG en los adipocitos era controlada por este enzima, sin embargo la generación de los ratones KO de HSL demostró la existencia de otras actividades lipasa que participaban en este proceso (Osuga et al., 2000; Haemmerle et al., 2002; Holm, 2003).

HSL es una proteína citoplasmática de 84KDa con actividad lipasa contra una gran variedad de sustratos: TAG, DAG, ésteres de colesterol (CE) y ésteres de retinol (Holm, 2003). Sin embargo, la actividad relativa de HSL *in vitro* es 11 veces superior contra los DAG que contra los TAG (Holm, 2003). Un elevado número de estudios (Osuga et al., 2000; Wang et al., 2001; Fortier et al., 2004; Okazaki et al., 2006) muestran que HSL no es estrictamente necesaria para la iniciación de la hidrólisis de los TAG, sino que es fundamental en la hidrólisis de DAG a MAG. Este hecho se puso de manifiesto por primera vez *in vivo*, al comprobar que los ratones HSL *-/-* acumulaban DAG y no TAG (Haemmerle et al., 2002).

La hidrólisis de DAG ocurre entre 10 y 30 veces más rápido, *in vitro*, que la de TAG, que es el paso limitante de la lipólisis (Giudicelli et al., 1974). Hasta el momento, HSL es la única lipasa identificada que lleva a cabo esta reacción en adipocitos, sin embargo, los resultados extraídos del análisis de los ratones KO de HSL sugieren la existencia de otras lipasas de DAG (Osuga et al., 2000).

• Lipasa de triglicéridos de adipocitos (ATGL/Desnutrin)

En el año 2004, dos grupos caracterizaron una nueva lipasa de TAG en los adipocitos llamada ATGL/desnutrina (Zimmermann et al., 2004; Villena et al., 2004). Es una proteína de 54kDa que contiene un dominio *patatin-like* en su extremo amino terminal característico de muchas acil-hidrolasas de plantas y se caracteriza por una serina conservada en el dominio GX SXG, un motivo His-Gly dipéptido y un pliegue alfa/beta hidrolasa.

ATGL se expresa predominantemente en el tejido adiposo, aunque también se encuentra en mucha menos cantidad en otros tejidos como músculo esquelético y cardíaco y testículos. En células que contienen gotas lipídicas (LDs), como los adipocitos, ATGL aparece parte en el citosol y parte asociada a los LDs (Zimmermann et al., 2004; Villena et al., 2004; Smirnova et al., 2006).

Existen distintas evidencias que muestran que ATGL es una lipasa específica de TAG (Zimmermann et al., 2003; Villena et al., 2004; Jenkins et al., 2004; Lake et al., 2005), y que es la lipasa más importante descrita hasta el momento, que controla la degradación de TAGs en los adipocitos (Zimmermann et al., 2004) mediante el uso de siRNA o anticuerpos contra ATGL. Sin embargo, los resultados obtenidos del ratón KO para ATGL muestran que existen otras lipasas de TAG en los adipocitos (Haemmerle et al., 2006).

La expresión de ATGL se induce por el ayuno y se inhibe tras la ingesta en ratones (Villena et al., 2004). De hecho, los glucocorticoides como la dexametasona activan la expresión de ATGL. Su expresión está en cambio, disminuida en los ratones *ob/ob* y *db/db*.

• Triacilglicerol hidrolasa (TGH)

TGH fue descrita por primera vez por Soni et al. (2004) como una lipasa que contribuye a la hidrólisis de TAG en adipocitos.

TGH es una lipasa de 60KDa microsomal con un dominio catalítico que contiene la serina activa en un motivo GX SXG. Es capaz de hidrolizar TAG de cadena larga, corta o media y ésteres de colesterol, pero no tiene actividad fosfolipasa ni acil-CoA-tioesterasa.

Este enzima se expresa mayoritariamente en el hígado, aunque también se expresa en riñón, corazón, intestino y tejido adiposo (Dolinsky et al., 2001). En las células 3T3L1, su

expresión aumenta 10 veces durante la diferenciación a adipocitos (Dolinsky et al., 2003; Wei et al., 2005) y participa en la lipólisis de TAG de los adipocitos (Soni *et al.*, 2004), aunque todavía no se ha determinado su contribución relativa en este proceso (Jaworski et al., 2007).

- **Monoglicérido lipasa (MGL)**

Es una lipasa de 33KDa, purificada del tejido adiposo de rata en 1976 por Tornqvist and Belfrage, (1976).

MGL hidroliza los ésteres en posición 1 o 2 de los monoacilgliceroles (MAG), y no muestra ninguna actividad catalítica contra DAG, TAG o ésteres de colesterol (Karlsson et al., 1997). MGL contiene un pliegue alfa/beta hidrolasa, característico de las lipasas conocidas, y dos motivos también característicos de lipasas, la serina del sitio activo del motivo GX SXG y el dipéptido HG.

3.4.2 Papel de las proteínas asociadas a la gota lipídica en la lipólisis

La lipólisis requiere que las lipasas solubles accedan al sustrato altamente hidrofóbico, los TAG, y que los productos hidrofóbicos de la reacción salgan de la gota lipídica (LD). Se han descrito algunas proteínas citosólicas y asociadas al LD que modulan la tasa de lipólisis basal y estimulada.

- **Perilipina**

Es la proteína más abundante encontrada asociada a los LDs de adipocitos (Greenberg et al., 1991), tiene dos isoformas, A y B, procedentes de *splicing* alternativo (Greenberg et al., 1993). La perilipina A es la forma predominante en los adipocitos maduros, fue la primera proteína descubierta que se asocia a los LDs y juega un papel importante en la regulación de la lipólisis basal y estimulada en los adipocitos.

En condición basal, de no estimulación, estudios de fraccionamiento subcelular y de microscopía confocal, muestran que tanto ATGL (Zimmermann *et al.*, 2004) y una parte de HSL se localizan en la superficie de las gotas lipídicas (Miyoshi et al., 2006). Se ha descrito que la presencia de perilipina en la superficie del LD funciona como barrera protectora que restringe el acceso de las lipasas de TAG a núcleo de lípidos neutros de los LDs y evita así una incontrollada lipólisis basal (Brasaemle *et al.*, 2000b). Estudios con ratones KO de perilipina apoyan esta idea (Martinez-Botas et al., 2000; Tansey et al., 2001; Saha et al., 2004), ya que estos ratones presentan una elevada lipólisis basal, resultando en una reducción de la masa del tejido adiposo y resistencia a la obesidad inducida por dieta rica en lípidos, que se explica en parte, por el aumento de la oxidación de ácidos grasos procedentes de la lipólisis.

La eliminación de perilipina no sólo provoca un incremento de la lipólisis basal, sino que también afecta a la lipólisis estimulada por efectores β -adrenérgicos, disminuyéndola dramáticamente (Martinez-Botas *et al.*, 2000; Tansey *et al.*, 2001).

La perilipina se regula por los estímulos lipolíticos que cursan a través de los receptores β -adrenérgicos/AMPC, así es diana de la proteína quinasa A (PKA; *cAMP-dependent protein kinase*) (Souza et al., 2002; Sztalryd et al., 2003; Tansey et al., 2004; Yamaguchi et al., 2006), resultando en cambios que aumentan la lipólisis, incluyendo el cambio conformacional de la perilipina, que deja de actuar como barrera (Clifford et al., 2000), el remodelamiento de los LDs que aumenta la superficie para el ataque lipolítico (Marcinkiewicz et al., 2006; Moore et al., 2005) y la activación de la actividad de HSL en la superficie del LD (Sztalryd *et al.*, 2003; Miyoshi *et al.*, 2006).

- **CGI-58**

En los adipocitos 3T3L1, CGI-58 se localiza en los LDs y se ha visto que colocaliza e interacciona con perilipina A (Yamaguchi et al., 2004; Subramanian et al., 2004). Recientemente Lass et al. (2006) demostraron que CGI-58 estimulan la lipólisis *in vitro*, y que es un activador de ATGL pero no de HSL. Aunque, parece que tiene algún papel en la regulación de la lipólisis, son necesarios más estudios para aclarar los mecanismos moleculares de la activación de ATGL y su función fisiológica.

- **TIP47**

Es una proteína de la familia PAT asociada a gotas lipídicas cuya función en los adipocitos aún no se conoce bien, aunque parece que inhibe la hidrólisis de ésteres de retinol de la lipasa GS2 y de HSL en queratinocitos humanos. Esto sugiere que en adipocitos podría tener también una acción antilipolítica (Gao and Simon, 2006).

- **Caveolina-1**

En un estudio proteómico realizado por Brasaemle *et al.* (2004) demostraron la presencia de caveolina-1 en los LDs de adipocitos estimulados lipolíticamente.

Los ratones KO de caveolina-1 presenta la actividad lipolítica disminuida en el tejido adiposo blanco y no muestran el incremento normal de ácidos grasos libres en el suero tras la alimentación (Cohen et al., 2004a).

Caveolina-1 interacciona directamente con la subunidad catalítica de PKA, inhibiendo su actividad *in vivo* (Razani et al., 1999). Sin embargo, en los ratones *cav1-/-*, la actividad PKA está aumentada, y la fosforilación de perilipina está muy disminuida (Cohen *et al.*, 2004a). Estos autores describen que la activación de los receptores β_3 -adrenérgicos resulta en la formación de un complejo inducido por ligando, entre la caveolina-1, la perilipina y la subunidad catalítica de PKA, de tal manera que la caveolina-1 facilitaría la fosforilación de la perilipina por PKA, contribuyendo así a la estimulación de la lipólisis.

- **Proteína de unión a ácidos grasos de adipocitos (aFABP/ALBP/aP2)**

aFABP/ALBP/aP2 es un miembro de las proteínas citosólicas de unión a lípidos que transporta, tanto ácidos grasos como ácido retinoico en adipocitos (Matarese and Bernlohr, 1988). Las tasas máximas de lipólisis requieren la eliminación de los ácidos grasos libres para evitar la acumulación de estos productos reactivos que además pueden inhibir las lipasas. Se ha postulado que aFABP/ALBP/aP2 actúa como una chaperona, facilitando el movimiento de los ácidos grasos al exterior de los adipocitos después de su liberación de los LDs (Coe et al., 1999a). Sin embargo, la importancia relativa de la expresión de esta proteína en los adipocitos para la regulación de la lipólisis está en discusión debido a los resultados de los ratones KO para aFABP/ALBP/aP2, por un lado los autores (Coe *et al.*, 1999a; Hertz et al., 2006), describen que los adipocitos de estos ratones muestran una actividad lipolítica disminuida, mientras que los autores (Shaughnessy et al., 2000) muestran que la actividad de aP2 se compensa por otras proteínas de unión a lípidos.

3.4.3 Mecanismos de regulación hormonal de la lipólisis en los adipocitos

La regulación de la lipólisis en los adipocitos responde a las distintas demandas energéticas del organismo que están controladas en su mayor parte por cambios hormonales en el individuo.

3.4.3.1 Estimulación de la lipólisis

• **Catecolaminas:** las catecolaminas son los activadores más importantes de la lipólisis. La ruta metabólica mediante la cual, estas moléculas actúan estimulando la hidrólisis de TAG y la liberación de ácidos grasos se ha estudiado ampliamente (Carey, 1998; Large et al., 2004; Arner, 2005; Carmen and Victor, 2006; Langin, 2006a; Jaworski *et al.*, 2007).

Las catecolaminas (como la norepinefrina) se unen a los receptores β -adrenérgicos de la membrana plasmática de los adipocitos. Estos receptores están acoplados con proteínas G heterotriméricas que transmiten el estímulo a la adenilato ciclasa, que genera AMP cíclico (AMPc). El AMPc se une y activa la proteína quinasa A (PKA; *cAMP-dependent protein kinase*). PKA cataliza la fosforilación en tres sitios de la lipasa HSL (Ser-563, Ser-659y Ser-660), activándola y provocando su translocación del citosol a la superficie del LD. Como hemos visto antes, PKA también fosforila a la perilipina, que deja de actuar como barrera protectora del LD, aumenta la superficie expuesta al ataque de las lipasas y también activa a la HSL (figura 17).

Los autores Zimmermann *et al.* (2004) muestran que desnutrina/ATGL también se fosforila en respuesta al estímulo por catecolaminas, aunque esta proteína no es sustrato de PKA. Además, los estudios realizados en ratones KO de HSL muestran que la lipólisis estimulada por catecolaminas debe involucrar a otras lipasas de TAG (Okazaki et al., 2002) (figura 17).

• **Cafeína y otros derivados de metilxantinas:** Estos compuestos estimulan la lipólisis aumentando los niveles celulares de AMPc mediante dos mecanismos. Por un lado, actuando como antagonistas de los receptores de A1-adenosina, estos receptores son abundantes en los adipocitos, donde inhiben la actividad de la adenilato ciclasa. Los antagonistas como la cafeína, evitan la activación de estos receptores y permiten por tanto la lipólisis mediada por PKA. Las metilxantinas, también inhiben la actividad fosfodiesterasa, manteniéndose así, más altos los niveles de AMPc (Londos et al., 1978; Borglum et al., 1996; Acheson et al., 2004).

3.4.3.2 Inhibición de la lipólisis

• **Insulina:** durante la ingestión de alimentos, disminuye la lipólisis en los adipocitos, fundamentalmente mediante la acción antilipolítica de la insulina (Campbell et al., 1992; Carey, 1998; Arner, 2005; Langin, 2006b).

La regulación de la lipólisis por la insulina implica, tanto mecanismos AMPc dependientes, como independientes. Los mecanismo AMPc dependientes implican la activación que la insulina provoca sobre la fosfodiesterasa3B (Langin, 2006b), mediante la vía de señalización del receptor de insulina que incluye la activación de la quinasa PI3K y de Akt, que activa la fosfodiesterasa 3P que degrada el AMPc. La regulación AMPc independiente implica la activación de la fosfatasa-1 por la insulina, que rápidamente defosforila e inactiva a HSL (Ragolia and Begum, 1998; Zhang et al., 2005).

La insulina también puede regular la lipólisis mediante la regulación génica, ya que provoca la disminución de la expresión del MRNA de ATGL/desnutrina (Kershaw et al., 2006).

Además del efecto inhibitorio sobre las lipasas de los adipocitos, la insulina disminuye la tasa de lipólisis promoviendo la reesterificación de los ácidos grasos (Campbell *et al.*, 1992) (figura 17).

• **Calcio:** Tras la ingestión, los niveles altos de calcio activan la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) que provoca la activación de la formación de 1,25 dihidroxicalciferol (vitamina D₃, VD₃) a partir de 1 hidroxicalciferol. Los adipocitos son dianas de estas hormonas. Así, PTH y VD₃ estimula el aumento de calcio intracelular aumentando la captación y la liberación de compartimentos celulares. Los niveles altos de calcio en los adipocitos, inhiben la lipólisis estimulada por los receptores β-adrenérgicos, fundamentalmente mediante la activación de la fosfodiesterasa 3B (Shi et al., 2001; Xue et al., 2001) que degrada el AMPc.

• **Etanol:** La ingestión de etanol tiene efectos antilipolíticos que causan la caída de los niveles de ácidos grasos en el suero y el aumento en la oxidación en el organismo. Los niveles elevados de acetato en el plasma pueden contribuir a este efecto (Abramson and Arky, 1968; Siler et al., 1999). La administración crónica de etanol a ratas se ha descrito que suprime la lipólisis activada por receptores β-adrenérgicos, probablemente mediante la activación de la fosfodiesterasa 4 (Kang and Nagy, 2006). Además, también se ha asociado con una disminución en la secreción de PTH, afectando así a los niveles de calcio en los adipocitos (McCarty and Thomas, 2003).

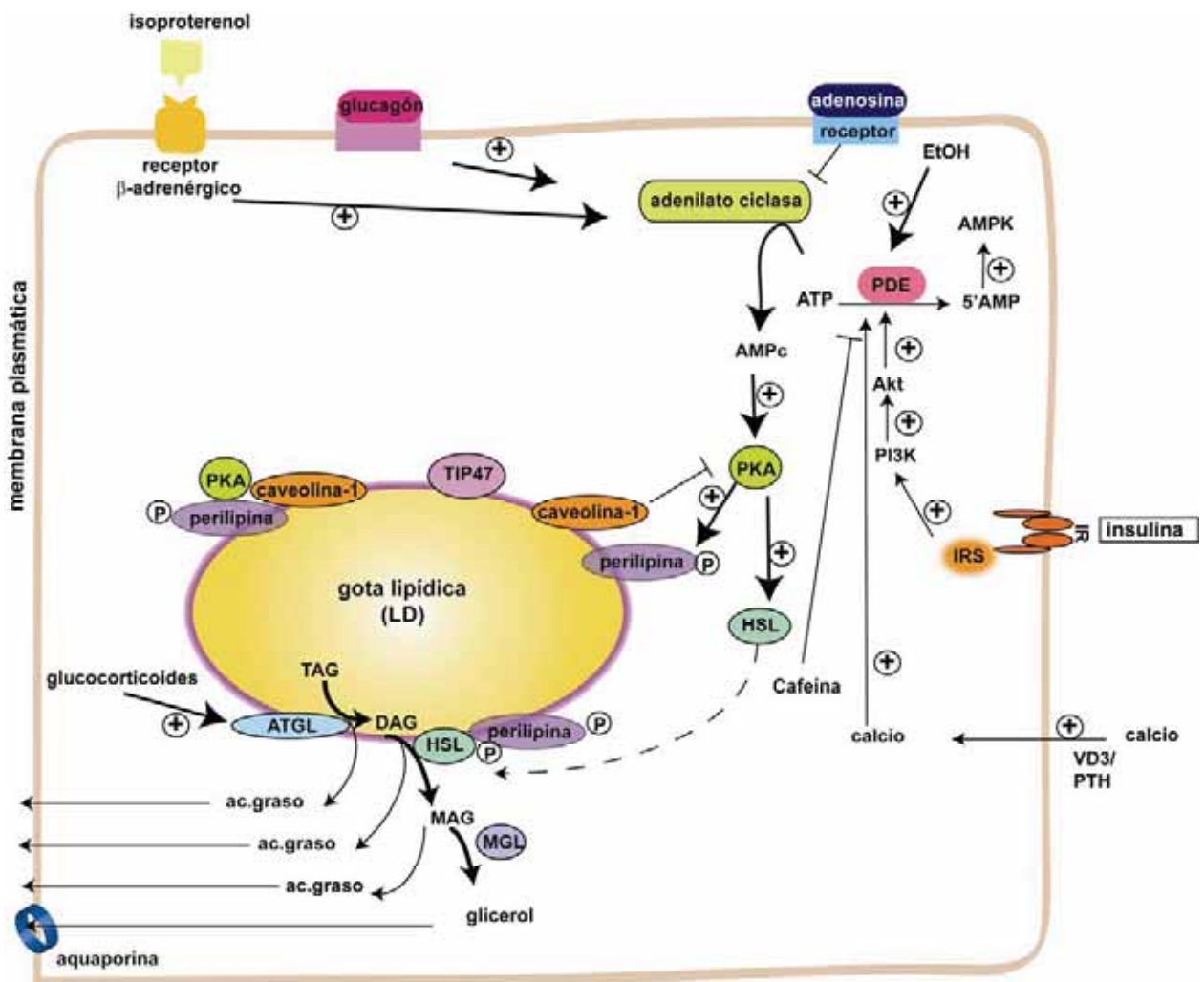


Figura 17 Esquema de la regulación de la lipólisis en los adipocitos. Adaptado de (Jaworski et al., 2007).