



Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias Médicas

Desbalance en los niveles de colesterol y esfingolípidos y su efecto en la pérdida de caveolas, señalización insulínica y diferenciación en adipocitos *Agpat2*^{-/-}.

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Médicas

Por

Lila Alejandra González Hódar

Tutor: Dr. Víctor Cortés Mora

Comisión de tesis:

Dra. Dolores Busso

Dra. Eugenia Morselli

Enero 2020

Santiago, Chile

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quisiera agradecer a mi tutor Dr. Víctor Cortés, por aceptarme en su laboratorio y confiar en mí para llevar a cabo esta tesis doctoral. Le agradezco su apoyo y guía de estos años, y por ayudarme a crecer como científica y profesional.

Quisiera agradecer a cada uno de los miembros del laboratorio, a Pablo Tapia por siempre contestar mis preguntas, a Fermín Robledo por su ayuda con la tecnología y su cariño, a Ana María Figueroa por su compañía tanto dentro y fuera del laboratorio, y también a los que ya no están en el laboratorio pero que fueron parte de mi proceso como Marcela Fuentes y Marta Fernández. También agradecer a la Verónica Quiñones que se integró hace poco al laboratorio, y que ha sido de gran ayuda, siempre tratando de solucionar los problemas.

Agradecer al Dr. Jay Horton por haberme acogido en su laboratorio en Dallas, donde hice gran parte de los experimentos de esta tesis. Y a los miembros de su laboratorio, los cuales me ayudaron a realizar mis experimentos y a sentirme contenta y acogida en un país extranjero.

También agradezco a mi ex tutora, la Dra. Silvana Zanlungo, quien fue mi primer guía como científica, y me enseñó muchas de las cosas que ahora aplico en mi vida profesional. También quisiera agradecer a los miembros de su laboratorio, en especial a Juan Castro, porque siempre estuvo dispuesto a ayudarme todos estos años, con una buena voluntad que es difícil de encontrar.

Agradezco de manera especial a Ludwig Amigo, quien también todos estos años me apoyó mucho, siempre respondiendo a todas mis preguntas y ayudándome en muchos protocolos.

También quisiera agradecer a las autoridades anteriores y actuales del doctorado, Dr. Jaime Pereira, Dra. Claudia Sáez, Dra. Andrea Leiva y Dr. Jorge Carvajal, por su apoyo en este proceso. A mi comisión de tesis, la Dra. Dolores Busso y Dra. Eugenia Morselli, por sus críticas y consejos para seguir adelante. Quisiera hacer una mención especial a la Dra. Claudia Sáez, que sin ella mi formación de doctora no hubiese estado completa. Ella me empujó a realizar actividades más allá del laboratorio, y darme cuenta que como científicos podemos lograr impactar a la sociedad.

Agradecer a mis amigos de la universidad, Rodrigo Lagos, Karla Ojeda, Macarena Bastías, Macarena Palma, Daniela Araya y María Cecilia Grandi, por su apoyo estos años, el cual fue muy importante. En especial a Karla, por su compañía en nuestros entretenidos almuerzos, los cuales extrañaré mucho.

También quisiera agradecer a mis compañeros de generación Tamara Marín, Valeria Olgúin, Alejandra Hernández, Mauricio Castro, Luis Silva y Alejandra Alarcón, quienes los primeros años del doctorado hicieron más ameno los cursos y las diferentes etapas del doctorado.

Agradezco a mis amigas de la vida, Paula Sabando, Andrea Sabando, Ana María Pereira, Marcela Vera y Nicole Montegu, quienes si bien no conocen este mundo de la ciencia, me apoyaron y entendieron.

Agradecer a mi familia, especialmente a mis papás, Francisco y Lila, que si no fuera por ellos en este momento no habría logrado llegar hasta aquí, ya que gracias a ellos pude estudiar Bioquímica y luego seguir este camino. A mis hermanos Francisco, Felipe, Pablo, Carlos, Paulina,

Daniel y Jaime, por su compañía y camaradería siempre. Y por supuesto a mis cuñados Alexis, María José, Estefi y Constanza, por su cariño.

Agradecer a mi nueva familia, Erica Soto, Carmen Alvarez y Francisca Contreras, por aceptarme y quererme, y siempre estar preocupadas de cómo me está yendo.

Y finalmente quiero agradecer a la persona más importante para llevar a cabo este proyecto, que me apoyó y empujó a emprender esta aventura, mi esposo Pablo Contreras, quien cree en mí más que yo, y me apoyó incondicionalmente siempre. Gracias por todo y te dedico esta tesis con todo mi amor y cariño.

Y por supuesto agradecer a las fuentes de financiamiento para realizar la tesis: a Fondecyt 1181214; a la Dirección de Investigación y Doctorados de la Escuela de Medicina UC (DIDEMUC) por el Concurso de apoyo para desarrollo de tesis de post-grado (DIDEMUC PMD-02/18) y por la Beca apoyo a la participación de alumnos de post-grado en congresos internacionales; a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por la Beca Doctorado Nacional CONICYT 21171491, por Gastos operacionales y por la Beca de pasantía Doctorado Nacional; a la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile (VRI), por la beca VRI-CPD categoría Ayudante Becario 2015 y 2016, por el Concurso de apoyo a la organización de seminarios por doctorandos 2017 y 2019, y el Beneficio de residencia para alumnos de doctorado en vías de graduación.

También agradezco a la Unidad de Microscopía Avanzada UC (UMA UC), no solo por el uso de microscopios, sino también porque siempre estuvieron dispuestos a resolver mis dudas con muy buena disposición.

Tabla de contenidos

ABREVIACIONES	11
RESUMEN	14
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Conceptos generales del tejido adiposo	19
1.2. Lipodistrofia congénita generalizada (LCG) y AGPAT2	21
1.2.2. El ratón <i>Agpat2</i> ^{-/-} : un modelo para el estudio de la lipodistrofia congénita generalizada.	25
1.3. Conceptos generales de la biología de las caveolas.....	29
1.3.1. Principales componentes proteicos de las caveolas: caveolinas y cavininas.....	31
1.3.2. Composición lipídica de la caveola: alto contenido de colesterol y esfingolípidos	32
1.3.3. Biogénesis de la caveola.....	36
1.3.4. Dinámica caveolar	38
1.3.5. La importancia de caveolas en el tejido adiposo	39
1.4. Resumen de antecedentes.....	42
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	44
2.1. Hipótesis.....	44
2.2. Objetivo general.....	44
2.3. Objetivos específicos.....	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1. MATERIALES	46
3.1.1. Reactivos de genotipificación.....	46
3.1.2. Reactivos de cultivo celular.....	46
3.1.3. Reactivos para la obtención de cultivo primario de preadipocitos y diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	46
3.1.4. Reactivos para microscopía.....	47
3.1.5. Reactivos para <i>western blot</i>	47
3.1.6. Reactivos para RT-qPCR	48
3.1.7. Anticuerpos	48
3.1.8. Reactivos para estudios de lipidómica	49
3.1.9. Reactivos para la purificación de membrana plasmática.....	49
3.2. MÉTODOS.....	50
3.2.1. Mantenimiento y genotipificación de ratones.	50

3.2.2. Obtención de cultivo primario de preadipocitos	51
3.2.3. Diferenciación adipogénica <i>in vitro</i> de cultivo primario de preadipocitos	51
3.2.4. Obtención del tejido adiposo interescapular y subcutáneo de ratones	52
3.2.5. Microscopía electrónica de transmisión	52
3.2.6. Tinción con Oil Red O	54
3.2.7. Inmunofluorescencia en preadipocitos.....	54
3.2.8. Inmunofluorescencia en tejido	55
3.2.9. Western blot.....	56
3.2.10. Visualización de depósitos de colesterol mediante sonda PFO-GST	56
3.2.11. Cuantificación de los niveles de colesterol	57
3.2.12. Aislamiento de la membrana plasmática.....	58
3.2.13. Estudios de lipidómica para la medición de los niveles de esteroides	63
3.2.14. Estudios de lipidómica para la cuantificación fosfolípidos y esfingolípidos	64
3.2.15. RT-qPCR.....	66
3.2.16. Análisis estadístico	67
4. RESULTADOS	69
4.1. Adipocitos del tejido adiposo de ratones <i>Agpat2^{-/-}</i> y adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> diferenciados <i>in vitro</i> presentan un bajo número de caveolas.	69
4.2. Los niveles basales de activación de la vía de señalización de insulina son equivalentes entre adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>wild type</i> diferenciados <i>in vitro</i>	74
4.3. La localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> está alterada, pero sus niveles no cambian.	76
4.4. Análisis lipídico en homogenizado total de adipocitos <i>wild type</i> y <i>Agpat2^{-/-}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	81
4.4.1. Adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> presentan acúmulos intracelulares de colesterol y mayores niveles de 7-dehidrodesmosterol.....	81
4.4.2. Adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> presentan mayores niveles celulares totales de esfingomielina y menores de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina.	90
4.5. Análisis lipídico en homogenizado total de tejido adiposo de ratones <i>wild type</i> y <i>Agpat2^{-/-}</i> .99	
4.5.1. Tejido adiposo blanco y pardo de ratones <i>Agpat2^{-/-}</i> presentan acúmulos intracelulares de colesterol.....	99
4.5.2. Tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2^{-/-}</i> tiene niveles aumentados de ceramidas y disminuidos de diversos fosfolípidos.	104
4.6. Análisis lipídico de la membrana plasmática de adipocitos <i>wild type</i> y <i>Agpat2^{-/-}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	111

4.6.1. La membrana plasmática de los adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} tiene abundancia normal de colesterol y mayores niveles de 8(9)-dehidrocolesterol.	111
4.6.2. La membrana plasmática de los adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} tiene abundancia normal de esfingolípidos, pero mayor contenido de fosfatidilglicerol en el día 0 post diferenciación y fosfatidilserina en el día 10 post diferenciación.	115
4.7. La membrana plasmática aislada de tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-} tiene abundancia normal de colesterol y mayor abundancia de zimosterol y FFMAS.....	122
4.8. Adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} presentan mayor abundancia del mRNA de genes reguladores del metabolismo de colesterol y de esfingolípidos.....	124
5. DISCUSIÓN.....	131
5.1. Señalización dependiente de insulina y su relación con las caveolas.....	133
5.2. Alteración en localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 y sus posibles determinantes moleculares en adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-}	134
5.3. La composición lipídica celular total de adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y su potencial importancia en la abundancia de caveolas, adipogénesis y muerte lipotóxica.	138
5.4. La composición lipídica de la membrana plasmática de adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y su potencial importancia en la abundancia de caveolas y adipogénesis.	145
6. CONCLUSIONES	151
7. BIBLIOGRAFÍA	152

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vía de la biosíntesis de glicerolípidos (vía del glicerol-3-fosfato y vía del monoacilglicerol).	24
Figura 2: La pérdida del tejido adiposo en ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-} está asociada a muerte celular y a inflamación.....	26
Figura 3: Microscopía electrónica de transmisión revela anomalías ultraestructurales en tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-}	28
Figura 4: Estructura y composición de las caveolas.....	30
Figura 5: Biogénesis de la caveola.....	37
Figura 6: Tinción de gotas lipídicas de adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>wild type</i> diferenciados <i>in vitro</i>	53
Figura 7: Desarrollo de un protocolo para el aislamiento de la fracción de membrana plasmática.....	61
Figura 8: Microscopía electrónica de transmisión en tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+}	70
Figura 9: Microscopía electrónica de transmisión de preadipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	72
Figura 10: Microscopía electrónica de transmisión en células endoteliales del tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+}	73
Figura 11: Activación basal de la vía de señalización inducida por insulina en adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	75
Figura 12: Niveles de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	77
Figura 13: Localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	78
Figura 14: Localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} de edad postnatal P0.5.	79
Figura 15: Tinción de colesterol libre en preadipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	82
Figura 16: Cuantificación del colesterol total y colesterol esterificado en preadipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	84
Figura 17: Estructura de los esteroides analizados en preadipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	87
Figura 18: Niveles de esteroides en preadipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica <i>in vitro</i>	89
Figura 19: Niveles de triglicéridos y diacilglicerol en homogenizado total de adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	91
Figura 20: Niveles de esfingolípidos en homogenizado total de adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	93
Figura 21: Niveles y composición de ácidos grasos de fosfolípidos en homogenizado total de adipocitos <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+} diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	96
Figura 22: Tinción de colesterol libre, gotas lipídicas y núcleos en tejido adiposo blanco subcutáneo y tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+}	100
Figura 23: Tinción de colesterol libre, macrófagos y núcleos en tejido adiposo blanco subcutáneo y tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-}	102
Figura 24: Cuantificación del colesterol total, libre y esterificado en tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2</i> ^{-/-} y <i>Agpat2</i> ^{+/+}	103

Figura 25: Niveles de triglicéridos y diacilglicerol en tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i>	105
Figura 26: Niveles de esfingolípidos en tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i>	107
Figura 27: Niveles y composición de ácidos grasos de fosfolípidos en tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i>	109
Figura 28: Purificación de fracción de membrana plasmática de preadipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	112
Figura 29: Niveles de esteroides en la fracción de membrana plasmática de adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	113
Figura 30: Niveles de esfingolípidos en la fracción de membrana plasmática de adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	117
Figura 31: Niveles de fosfolípidos y composición de ácidos grasos de fosfolípidos en la fracción de membrana plasmática de adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	119
Figura 32: Niveles de esteroides en la fracción de membrana plasmática de tejido adiposo pardo interescapular de ratones <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i>	123
Figura 33: Niveles de mRNA de reguladores del metabolismo de colesterol en adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	125
Figura 34: Niveles de mRNA de genes implicados en la síntesis de esfingolípidos en adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i> y <i>Agpat2^{+/+}</i> diferenciados adipogénicamente <i>in vitro</i>	129
Figura 35: Alteraciones lipídicas inducidas por la deficiencia de AGPAT2 y posibles causas y efectos del número reducido de caveolas en adipocitos <i>Agpat2^{-/-}</i>	150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de primarios utilizados para la cuantificación de mRNA por RT-qPCR.....68

ABREVIACIONES

36B4: *Acidic ribosomal phosphoprotein P0*

Abca1: *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1*

AGPAT2: 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa 2

Asah1: *Acid ceramidase*

ATP: Adenosín trifosfato

BODIPY: 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno

BSA: Albúmina de suero bovino

C/EBP α : *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*

C/EBP δ : *CCAAT/enhancer binding protein delta*

CAV1: Caveolina-1

COPII: *Coat complex protein II*

DAG: Diacilglicerol

DE: Desviación estándar

DGATs: Diacilglicerol aciltransferasas

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

EGTA: Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético

FAPP: *Four-phosphate-adaptor protein*

FEV: Fracción estromal vascular

FFMAS: *Follicular-fluid meiosis-activating sterol*

Fsp27: *Fat-specific protein 27*

GFP: *Green fluorescent protein*

GlcT: *Ceramide glucosyltransferase*

GPATs: Glicerol-3-fosfato aciltransferasas

HEPES: Ácido 4- (2-hidroxiethyl) -1-piperazina-metanosulfónico

HmgCoaR: *3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase*

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

LCG: Lipodistrofia congénita generalizada

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas

LDH: Lactato deshidrogenasa

Ldlr: *Low density lipoprotein receptor*

LPA: Acido lisofosfatídico

LPE: Lisofosfatidiletanolamina

Lrp: *Lipoprotein receptor-related protein*

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón

MGATs: Monoacilglicerol-aciltransferasas

MP: Membrana plasmática

MS: espectrometría de masas

MTT: Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio

OCT: *Optimal Cutting Temperature*

PA: ácido fosfatídico

PAPs: Fosfatasas de ácido fosfatídico

PBS: Tampón fosfato salino

PE: Fosfatidiletanolamina

PFA: Paraformaldehído

PFO-GST: *Perfringolysin O - Glutathione S-transferase*

PPAR α : *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*

PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PS: Fosfatidilserina

PTRF: *Polymerase I and transcript release factor*

PVDF: *Polyvinylidene fluoride*

RE: Retículo endoplásmico

RI: Receptor de insulina

Smpd1: *Sphingomyelinase*

Sptlc2: *Serine palmitoyltransferase*

Srbl: *Scavenger receptor class B type I*

Srebp-2: *Sterol regulatory element-binding protein 2*

T3: Triyodotironina

TBS: Solución salina tamponada con Tris

TG: Triglicérido

RESUMEN

El tejido adiposo es un regulador del balance energético y de la homeostasis glucídica y lipídica en mamíferos. La lipodistrofia congénita generalizada (LCG) es un síndrome caracterizado por reducción severa de la masa de tejido adiposo corporal total y complicaciones metabólicas. Mutaciones en el gen *AGPAT2* son la causa más frecuente de LCG. *AGPAT2* codifica para la enzima 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa 2, que cataliza la síntesis de ácido fosfatídico a partir de ácido lisofosfatídico en la vía de síntesis de los glicerolípidos. Los mecanismos que determinan la LCG dependiente de mutaciones en *AGPAT2* no están dilucidados. Los ratones deficientes en *AGPAT2* (*Agpat2*^{-/-}) nacen con tejido adiposo blanco y pardo, pero este degenera durante la primera semana de vida postnatal, como resultado de muerte selectiva de adipocitos e infiltración inflamatoria del tejido adiposo. Por otro lado, fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y preadipocitos aislados a partir del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} presentan adipogénesis deteriorada *in vitro*, caracterizada por menor abundancia de gotas lipídicas y menor expresión génica de reguladores de la adipogénesis. El análisis ultraestructural de adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} y MEFs *Agpat2*^{-/-} diferenciados adipogénicamente *in vitro* mostró una cantidad significativamente disminuida de caveolas.

Las caveolas son microdominios de la membrana plasmática de 50 a 100 nm de diámetro, muy abundantes en adipocitos y células endoteliales. Están involucradas en funciones importantes del adipocito: unión, transporte intracelular y almacenamiento de ácidos grasos y colesterol, activación de vías de señalización adipogénicas y protección contra los efectos lipotóxicos de niveles elevados de ácidos grasos. La formación de caveolas requiere la presencia de las proteínas caveolina-1 y cavina-1, y una adecuada composición lipídica de la membrana plasmática (MP), caracterizada por enriquecimiento de colesterol y esfingolípidos.

El objetivo general de esta tesis fue determinar el mecanismo por el cual adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan un bajo número de caveolas y el rol potencial de las caveolas en la patogenia de la lipodistrofia en ratones *Agpat2*^{-/-}. Para esto, combinamos experimentación *in vitro* usando un modelo de diferenciación adipogénica a partir de preadipocitos obtenidos de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo pardo interescapular de estos animales, e *in vivo*, analizando el tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} durante sus primeros días de vida postnatal, en etapas anteriores a su degeneración inflamatoria.

Primero, confirmamos que tanto el tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} como adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* presentan un bajo número de caveolas en comparación con animales y adipocitos en cultivo *Agpat2*^{+/+} (*wild type*). Sin embargo, y contrario a lo esperado, la vía de insulina, que ha sido reportada como dependiente de caveolas, se encuentra preservada en adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro*, y su nivel de activación no se modifica a lo largo de todos los días de diferenciación evaluados.

No encontramos diferencias en la abundancia de proteínas caveolina-1 y cavina-1 pero sí en su localización subcelular a día 5 y 10 de diferenciación. Así, mientras en adipocitos *wild type* ambas proteínas presentan localización en la periferia de las células, compatible con una destinación en la MP, en adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan una localización intracelular, con formación de agregados o acúmulos de tamaño heterogéneo.

El análisis de composición lipídica celular total mostró que en el día 0 de diferenciación adipogénica no hay diferencias en los niveles de las diferentes especies de lípidos evaluados entre preadipocitos de ambos genotipos. Por el contrario, en el día 10 de diferenciación, los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentaron agregaciones o acúmulos de colesterol intracelular, junto con mayores niveles de 7-dehidrodesmoterol y esfingomiolina, y menores niveles de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina. Los acúmulos de colesterol intracelular también fueron detectados en el

tejido adiposo blanco subcutáneo (día postnatal P0.5 y P2.5) y en el tejido adiposo pardo interescapular (día postnatal P4.5) de ratones *Agpat2*^{-/-} pero no *wild type*. Además, el tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} posee mayor abundancia de ceramidas en combinación con menores niveles de los fosfolípidos fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina en el día postnatal P4.5.

Para evaluar posibles mecanismos involucrados en los desbalances lipídicos de los adipocitos *Agpat2*^{-/-}, cuantificamos los niveles de mRNA de algunos genes clave del metabolismo de colesterol y esfingolípidos en tres tiempos de diferenciación adipogénica *in vitro*. No observamos diferencias entre genotipos en el perfil de expresión génica en los días 0 y 5 de diferenciación, sin embargo, en el día 10, los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan niveles aumentados tanto de los genes *Abca1*, *Ldlr*, *Lrp*, *Srbi*, *Srebp2* y *Hmg-CoAR*, implicados en la homeostasis del colesterol así como de *Sptlc2*, *Asah1*, *GlcT* y *Smpd1*, los que están involucrados en la síntesis de esfingolípidos.

Para estudiar de forma directa la participación de lípidos de la MP en la deficiencia de caveolas en los adipocitos deficientes en AGPAT2, determinamos la composición lipídica de preparaciones purificadas de MP de adipocitos diferenciados adipogénicamente *in vitro* y del tejido adiposo interescapular de ratones recién nacidos. No encontramos diferencias en los niveles de colesterol, esteroides y esfingolípidos entre células *Agpat2*^{-/-} y *wild type* en el día 0 de diferenciación (cuando las células corresponden a preadipocitos), pero sí mayores niveles de fosfatidilglicerol en preadipocitos *Agpat2*^{-/-}. En el día 10 de diferenciación, la MP de los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentó mayor abundancia de fosfatidilserina y 8(9)-dehidrocolesterol. En la MP del tejido adiposo pardo interescapular de ratones recién nacidos, no encontramos diferencias en los niveles de colesterol entre genotipos, pero sí mayores niveles de zimosterol y FFMAS en ratones *Agpat2*^{-/-}.

Por lo tanto, con nuestros resultados podemos concluir que el número reducido de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} se asocia a niveles elevados de fosfatidilglicerol en el estado de preadipocito

(día 0 post inducción adipogénica) y niveles elevados de fosfatidilserina en el estado de adipocito (día 10 post inducción adipogénica). Además, es posible que alteraciones en la distribución celular de caveolina-1 y cavina-1 contribuyan al déficit en el número de caveolas. Estas alteraciones podrían conducir a un tráfico anormal de colesterol, que determina la presencia de acúmulos intracelulares de este lípido y mayor actividad biosintética de colesterol, producto de su retención en compartimentos que previenen su destinación normal a la membrana del RE. Por otro lado, la deficiencia de caveolas podría promover o facilitar la muerte celular lipotóxica de los adipocitos *Agpat2*^{-/-}, producto de su mayor sensibilidad a ácidos grasos y también por la acumulación excesiva de depósitos intracelulares de colesterol.

1. INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo es un regulador del balance energético y de la homeostasis glucídica y lipídica en mamíferos. La lipodistrofia congénita generalizada (LCG) es un grupo de enfermedades caracterizadas por reducción marcada de la masa de tejido adiposo corporal total, resistencia insulínica, diabetes, dislipidemia, esteatosis hepática y síndrome de ovario poliquístico [1]. Mutaciones en el gen *AGPAT2* son la causa más frecuente de lipodistrofia congénita generalizada. *AGPAT2* codifica para la enzima 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa 2 (AGPAT2) que cataliza la síntesis de ácido fosfatídico a partir de ácido lisofosfatídico en la vía de síntesis de los glicerolípidos (Figura 1). Los ratones deficientes en *AGPAT2* (*Agpat2*^{-/-}) recapitulan completamente la LCG humana [2]. De manera relevante para esta tesis, la causa de la LCG dependiente de mutaciones en *AGPAT2* no está dilucidada pero, en ratones *Agpat2*^{-/-}, involucra defectos en la diferenciación adipogénica, muerte acelerada de adipocitos e infiltración inflamatoria del tejido adiposo [3].

Los ratones *Agpat2*^{-/-} nacen con tejido adiposo blanco y pardo, de abundancia y distribución anatómica normal. Sin embargo, durante la primera semana de vida postnatal, estos tejidos degeneran totalmente, en asociación con una mortalidad de aproximadamente 80% en estos ratones. Por otro lado, fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y preadipocitos aislados a partir del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} neonatos presentan adipogénesis deteriorada *in vitro*, caracterizada por menor número de células cargadas con lípidos, menor expresión génica de reguladores de la adipogénesis y menor abundancia de gotas lipídicas, las que además presentan volúmenes anormalmente heterogéneos [3]. El análisis ultraestructural, por microscopía electrónica, de adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} y de MEFs *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* en adipocitos, muestra una marcada reducción en el número de caveolas en la membrana plasmática de estas células, además de alteraciones en la estructura interna de las mitocondrias.

Las caveolas son microdominios de la membrana plasmática de 50 a 100 nm de diámetro, muy abundantes en adipocitos, células endoteliales y algunas células epiteliales. Aun cuando la función de las caveolas es solo parcialmente entendida, se acepta que son estructuras subcelulares involucradas en la unión, transporte intracelular y almacenamiento de ácidos grasos y colesterol. Además, estarían implicadas en la activación de diferentes vías de señalización intracelular [4] y en conferir resistencia a los adipocitos de los efectos lipotóxicos de niveles elevados de ácidos grasos extracelulares [5]. Todas estas funciones son importantes para el desarrollo y mantención de los adipocitos y su funcionamiento normal.

Estudios de ganancia y pérdida de función han mostrado que la formación de caveolas requiere las proteínas caveolina-1 y cavina-1, y una adecuada composición lipídica, caracterizada por un marcado enriquecimiento relativo de colesterol y esfingolípidos.

El objetivo general de esta tesis fue determinar el rol potencial de las caveolas en la patogenia de la lipodistrofia en ratones *Agpat2*^{-/-}. Para esto, combinamos experimentación *in vitro* usando un modelo de diferenciación adipogénica a partir de preadipocitos obtenidos de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo pardo interescapular de estos animales, y experimentación *in vivo*, en ratones *Agpat2*^{-/-} durante sus primeros días de vida postnatal.

Para contextualizar la fundamentación de esta tesis se discutirán aspectos generales del tejido adiposo, de la lipodistrofia congénita generalizada, de la formación y composición de las caveolas y del papel de las caveolas en el tejido adiposo.

1.1. Conceptos generales del tejido adiposo

El tejido adiposo es un regulador del balance energético y de la homeostasis glucídica y lipídica en mamíferos. Hay dos tipos clásicos de tejido adiposo: el blanco y el pardo. El primero es el más importante reservorio de energía corporal, siendo también crítico en la homeostasis energética

y sensibilidad a la insulina. La energía es almacenada en forma de triglicéridos en gotas lipídicas, los cuales se liberan al torrente sanguíneo como ácidos grasos durante estados de ayuno, el cual es utilizado por otros tejidos del organismo como fuente de energía [6]. Además, el tejido adiposo blanco funciona como un órgano endocrino, produciendo un gran número de moléculas con importante acción biológica llamadas adipocinas, las cuales comunican distintos órganos y modulan una serie de vías metabólicas [7]. El tejido adiposo pardo, por otro lado, posee un papel importante en la regulación de la energía a través de la termogénesis, oxidando ácidos grasos, y en menor medida glucosa, para producir calor. Esta acción es mediada por la proteína UCP1 (*“uncoupling protein 1”*), que disipa la gradiente electroquímica de protones en la membrana mitocondrial interna, previniendo la síntesis de ATP y liberando calor [8].

Los adipocitos maduros se forman a partir de un proceso denominado adipogénesis, en el cual células precursoras se diferencian a adipocitos cargados de gotas lipídicas y capaces de secretar adipocinas. La adipogénesis es regulada por un programa génico, que determina el fenotipo característico del adipocito maduro [8]. El receptor nuclear PPAR γ (*“peroxisome proliferator-activated receptor gamma”*) ha sido conceptualizado como el regulador maestro de la adipogénesis [9]. De manera relevante para esta tesis, este proceso se puede modelar en cultivo celular, a través del uso de líneas celulares de fenotipo similar a los preadipocitos (como la línea celular 3T3-L1) o a partir de preadipocitos obtenidos de la fracción estromal vascular (FEV) del tejido adiposo [10]. En esta tesis, los preadipocitos fueron obtenidos de la FEV del tejido adiposo pardo interescapular de ratones y fueron sujetos a diferenciación adipogénica en cultivo, determinando la transformación de preadipocitos en células con fenotipo equivalente a adipocitos maduros, cargado de gotas lipídicas y secretores de adipocinas.

Debido al papel clave del tejido adiposo en la homeostasis glucídica y lipídica, alteraciones en la fisiología de este tejido se asocian a enfermedades metabólicas. La enfermedad relacionada al

tejido adiposo más prevalente a nivel mundial es la obesidad. Ésta consiste en exceso de tejido adiposo, el cual, además, suele presentar alteraciones funcionales y morfológicas que dan cuenta de las complicaciones metabólicas de la obesidad, tales como resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia y esteatosis hepática. Interesantemente, las lipodistrofias, que corresponden a la pérdida de tejido adiposo, se asocian a las mismas complicaciones metabólicas observadas en la obesidad [11].

1.2. Lipodistrofia congénita generalizada (LCG) y AGPAT2.

Las lipodistrofias son enfermedades heterogéneas que tienen en común la reducción marcada del tejido adiposo, y que comúnmente están asociadas a complicaciones metabólicas tales como resistencia insulina, diabetes, hiperglicemia, dislipidemia, hígado graso, ovario poliquístico e infertilidad femenina [12]. Las lipodistrofias se clasifican, según criterios anatómicos, en generalizadas o parciales, y según su etiología, en congénitas o adquiridas. Existe una relación directa entre la magnitud de la reducción de la masa de tejido adiposo y la severidad de las complicaciones anatómicas de estas enfermedades. La prevalencia de las lipodistrofias es formalmente desconocida, pero se estima que a nivel global la frecuencia específicamente de LCG es de 1:10.000.000 en la población general. La LCG fue descrita por primera vez por Berardinelli en Brasil [13] y por Seip en Escandinavia [14], por lo que es conocida como síndrome de Berardinelli–Seip.

La LCG se transmite con un patrón autosómico recesivo, y se caracteriza por carencia del tejido adiposo desde el nacimiento y resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia e hígado graso clínicamente manifiesto durante la infancia. Otras alteraciones, como diabetes y síndrome de ovario poliquístico suelen aparecer durante la pubertad [1]. Adicionalmente, los pacientes con LCG presentan deficiencia de leptina, que determina apetito incrementado e hiperfagia y, posiblemente,

mayor gasto energético [1]. Existen cuatro variantes de LCG, definidas según su etiología genética subyacente: LCG-1, es la forma más frecuente de LCG y es causada por mutaciones en el gen *AGPAT2* [15] (Figura 1) [16]; LCG-2, es la forma más severa y es causada por mutaciones en el gen *BSCL2* [17], que codifica para Seipin, un proteína de alto peso molecular que se encuentra en la interfase entre la membrana del retículo endoplásmico y la gota lipídica en adipocitos [18]. De manera relevante para esta tesis, el hecho que tanto LCG-3, causada por mutaciones en el gen *CAV1*, codificante para caveolina-1, la proteína más abundante de las caveolas y esencial para su formación [19], como LCG-4, causada por mutaciones en *PTRF*, que codifica para la proteína cavina-1, también necesaria para la formación de caveolas, sugiere un rol importante de estos microdominios de membrana en el desarrollo y/o crecimiento del tejido adiposo y en la patogenia de la lipodistrofia [20].

Actualmente, no existe cura para la LCG y el tratamiento de estos pacientes está mayormente enfocado a aminorar sus complicaciones metabólicas, que pueden ser muy graves. Habitualmente, esto implica el uso combinado de múltiples de fármacos insulinosensibilizantes, hipoglicemiantes, hipolipemiantes y antihipertensivos, los que suelen tener baja eficacia en estos pacientes [4]. Por el contrario, la metreleptina, una forma modificada de leptina recombinante y que está aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos para tratar las anomalías metabólicas de LCG, tiene gran eficacia terapéutica [21]. Sin embargo, el acceso a este fármaco es limitado, debido a falta de disponibilidad comercial y elevado costo económico.

Como se indicó, *AGPAT2* cataliza la síntesis de ácido fosfatídico a partir de ácido lisofosfatídico en la vía de síntesis de los glicerolípidos, también llamada vía del glicerol-3-fosfato (Figura 1). En esta vía, el sustrato inicial, glicerol-3-fosfato, es acilado por las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasas (GPATs), para formar 1-acilglicerol-3-fosfato (ácido lisofosfatídico, LPA), el cual es acilado, a su vez, por las enzimas 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas (AGPATs) para formar ácido fosfatídico (PA). En el siguiente paso, el grupo fosfato del PA es removido para producir

diacilglicerol (DAG). Este paso es catalizado por enzimas colectivamente denominadas fosfatasa de ácido fosfatídico (PAPs), dentro de las cuales se encuentran las Lipinas. Finalmente, el DAG es acilado por las enzimas diacilglicerol aciltransferasas (DGATs) para producir una molécula de triglicérido (TG) [1] (Figura 1). Por esta vía, se generan sustratos necesarios para la síntesis de glicerofosfolípidos: el PA es sustrato para la síntesis de fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y cardiolipina, mientras que el DAG es sustrato para la síntesis de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Además, LPA es ligando para receptores de superficie celular acoplados a proteína G, los que han sido involucrados en diversos efectos celulares [1].

Todas las enzimas mencionadas (GPATs, AGPATs, PAPs, DGATs y MGATs) poseen varias isoformas, las cuales están codificadas por genes individuales y poseen una expresión diferenciada por tejido [22]. Se han reportado 11 isoformas de AGPATs, todas presentes en el retículo endoplásmico en donde catalizan la conversión de LPA a PA, a través de la esterificación del carbono sn-2 del LPA.

Algunas isoformas de AGPAT (AGPAT6, AGPAT8, AGPAT10) también poseen actividad GPAT, es decir catalizan la conversión de glicerol-3-fosfato a LPA, mientras que otras (AGPAT3, AGPAT7, AGPAT8, AGPAT9, AGPAT11) también esterifican lisofosfolípidos con cabezas polares, tales como lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidiletanolamina y lisofosfatidilglicerol. También, las diferentes AGPATs difieren en su preferencia por sustratos específicos [23]. Interesantemente, pese a la amplia superposición de actividades enzimáticas y patrones de expresión de las distintas AGPATs, solo mutaciones en *AGPAT2* causan LCG en humanos y ratones, indicando una relevancia única de esta enzima en la biología del tejido adiposo.

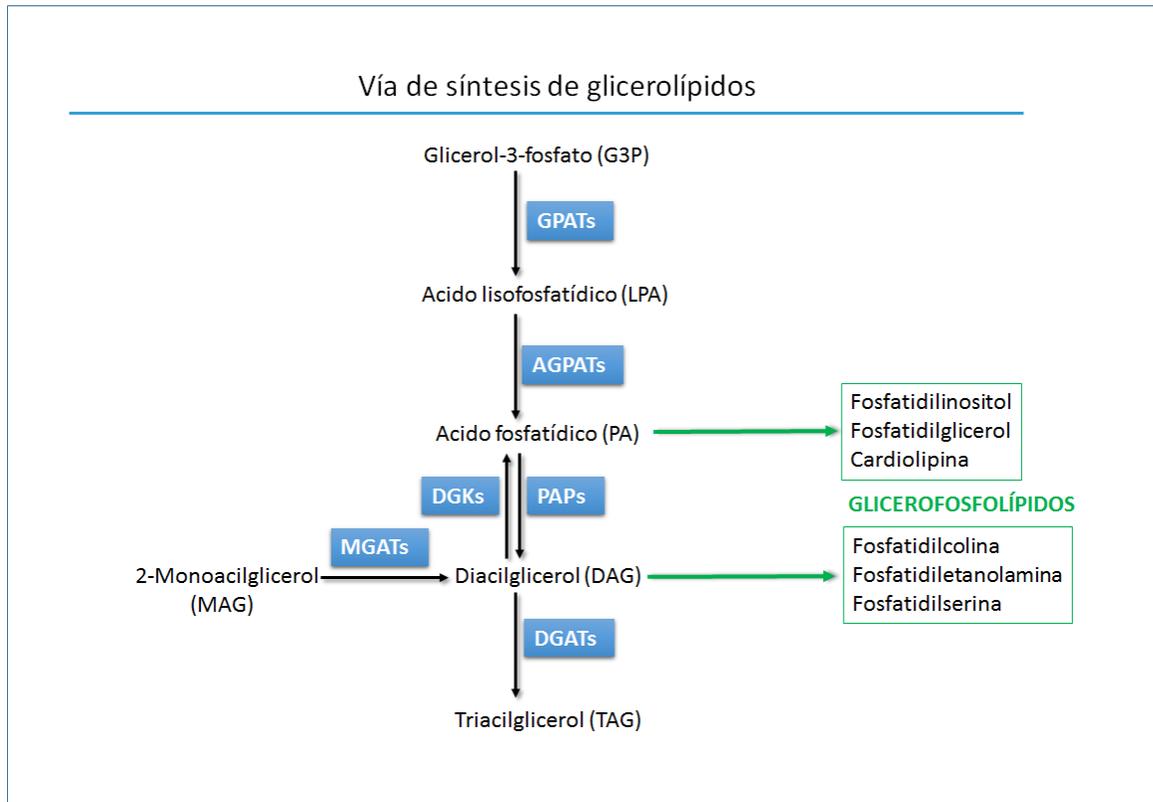


Figura 1: Vía de la biosíntesis de glicerolípidos (vía del glicerol-3-fosfato y vía del monoacilglicerol). Glicerol-3-fosfato es el sustrato inicial para la acilación en la posición sn-1 por las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasas (GPATs), para formar 1-acilglicerol-3-fosfato o ácido lisofosfatídico (LPA). LPA es acilado en la posición sn-2 por las enzimas 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas (AGPATs) para formar ácido fosfatídico (PA). En el siguiente paso, el grupo fosfato es removido por las enzimas fosfatasa de ácido fosfatídico (PAPs) para producir diacilglicerol (DAG). DAG es acilado en la posición sn-3 por las enzimas diacilglicerol aciltransferasas (DGATs) para producir triglicéridos (TG). Además, las enzimas DAG quinasas (DGKs) pueden fosforilar a DAG para sintetizar PA. Aunque la principal vía para la síntesis de glicerolípidos es la acilación secuencial del glicerol-3-fosfato, también pueden formarse a partir de la acilación del 2-monoacilglicerol (MAG) por las enzimas monoacilglicerol-aciltransferasas (MGATs). PA y DAG son sustratos para la síntesis de glicerofosfolípidos. PA es el sustrato para la síntesis de fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y cardiolipina. DAG es el sustrato para fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Figura adaptada de [1].

1.2.2. El ratón *Agpat2*^{-/-}: un modelo para el estudio de la lipodistrofia congénita generalizada.

Los ratones *Agpat2*^{-/-} adultos recapitulan gran parte de las características de la LCG humana. Sin embargo, estos animales, al contrario de los pacientes con LCG, nacen con tejido adiposo blanco y pardo, los cuales degeneran rápidamente durante la primera semana de vida de estos animales [3], lo cual se ha visto asociado a muerte masiva de adipocitos e inflamación (Figura 2). En estudios previos de nuestro laboratorio hemos determinado que la diferenciación adipogénica *in vitro* de MEFs y preadipocitos provenientes de ratones *Agpat2*^{-/-}, presentan adipogénesis deteriorada caracterizada por un número menor de células cargadas con gotas lipídicas, gotas lipídicas de volumen más heterogéneo y defectos en la expresión génica de reguladores de la adipogénesis, que incluyen reguladores tempranos de la diferenciación adipogénica (factores de transcripción C/EBP δ , C/EBP α , PPAR α y PPAR γ) y marcadores tardíos de diferenciación adipogénica (Fsp27, Perilipina, Leptina y Adiponectina) [3], [24].

MEFs *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* hacia adipocitos presentan una composición de fosfolípidos alterada en comparación con las células provenientes de ratones *Agpat2*^{+/+}, con niveles elevados de ácido fosfatídico y fosfatidilcolina, y reducidos de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y fosfatidilinositol [3]. En hígado y plasma de ratones *Agpat2*^{-/-} adultos, hay aumento en los niveles de esfingolípidos, particularmente de intermediarios de la vía de síntesis de la esfingomielina, incluida varias especies de ceramidas [25]. En el hígado del ratón *Agpat2*^{-/-} se encontraron niveles elevados de fosfolípidos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina) probablemente como consecuencia del aumento en la actividad de la vía del monoacilglicerol [2].

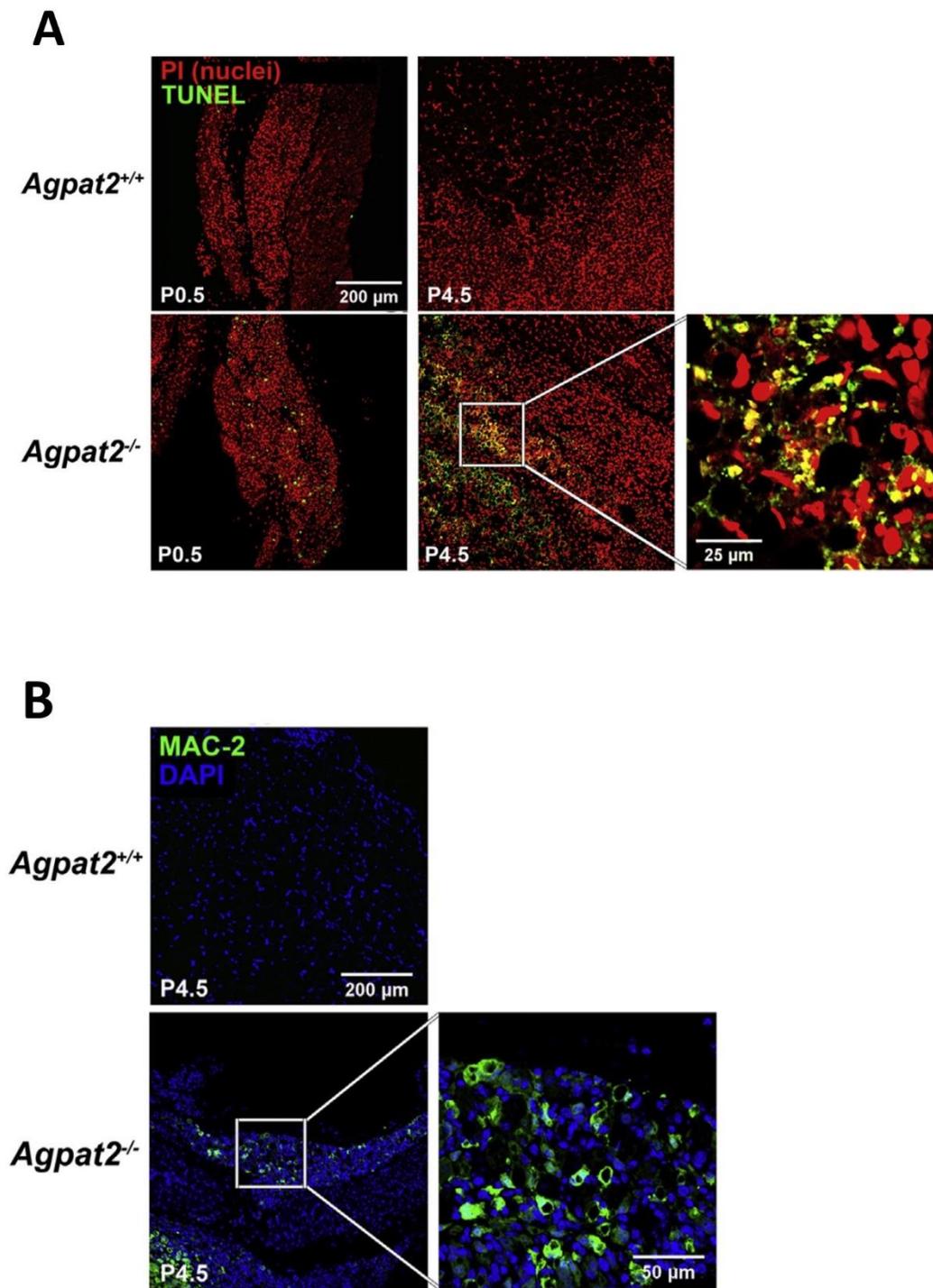


Figura 2: La pérdida del tejido adiposo en ratones *Agpat2*^{-/-} está asociada a muerte celular y a inflamación.
 A) Imágenes representativas de tinción de TUNEL en secciones incluidas en parafina del tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *wild type* y *Agpat2*^{-/-}. B) Secciones incluidas en parafina del tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *wild type* y *Agpat2*^{-/-} fueron incubadas con el anticuerpo MAC-2 (marcador de macrófagos) y detectado por inmunofluorescencia. Imagen modificada de [3].

Estudios de microscopía electrónica de transmisión en secciones de tejido adiposo blanco subcutáneo proveniente de ratones *Agpat2*^{-/-} recién nacidos muestran anomalías estructurales en gotas lipídicas, mitocondrias y membrana plasmática [3] (Figura 3). Específicamente, en comparación con adipocitos de ratones normales (*Agpat2*^{+/+}) que muestran 2 o 3 gotas lipídicas de gran tamaño por célula, los adipocitos de ratones *Agpat2*^{-/-} presentan gotas lipídicas más numerosas y de tamaño más heterogéneo, aunque con predominio de gotas pequeñas. También se observa que las mitocondrias de adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan mayor heterogeneidad de tamaño y forma, en conjunto con desorganización de sus crestas.

Interesantemente, el análisis de microscopía electrónica revela que adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} y MEFs *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* muestran un número reducido de caveolas en la membrana plasmática. Aun cuando los niveles de caveolina-1 cuantificados por *western blot*, no están alterados en adipocitos y MEFs diferenciados *Agpat2*^{-/-}, su distribución subcelular es anormal, permaneciendo en compartimentos intracelulares [3].

Considerando que mutaciones en *CAV1* y *PTRF* causan lipodistrofia en seres humanos [19], [20], en esta tesis estudiamos el fenómeno de la reducción del número de caveolas en adipocitos en la lipodistrofia de los ratones *Agpat2*^{-/-}.

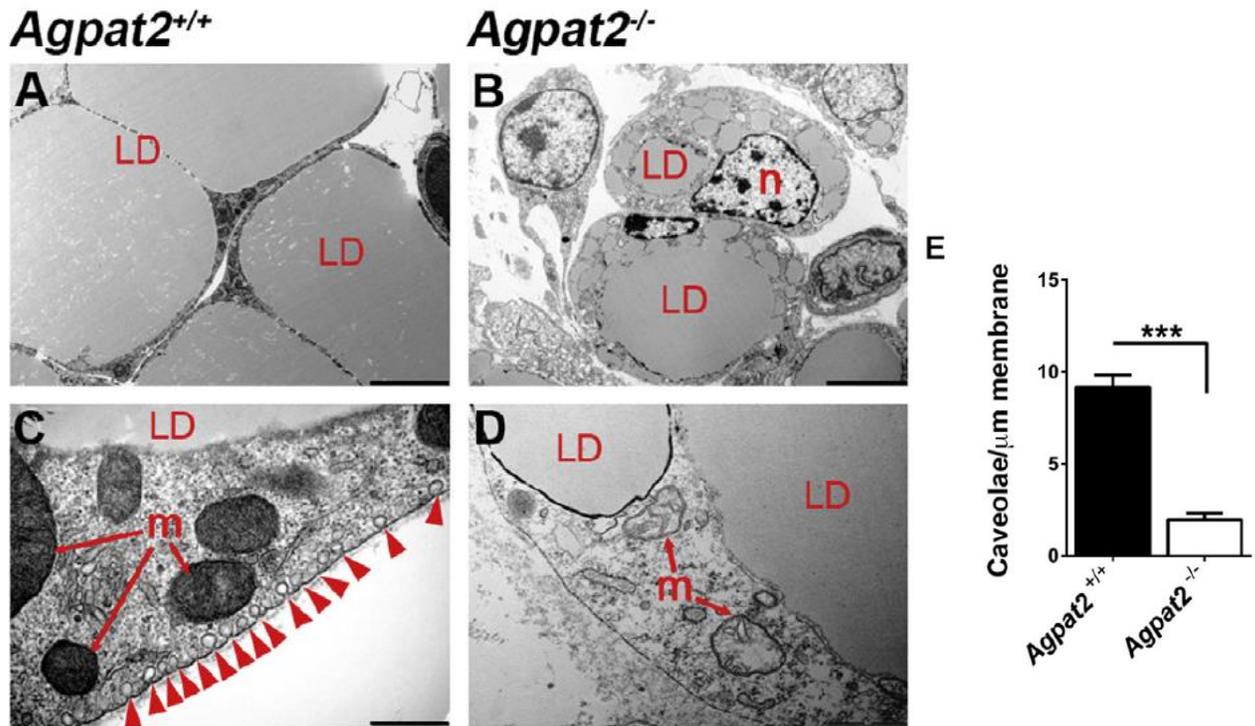


Figura 3: Microscopía electrónica de transmisión revela anomalías ultraestructurales en tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-}. (A-D) Imágenes representativas de tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} recién nacidos (P0.5). Tejido adiposo de *Agpat2*^{-/-} muestra mayor número de gotas lipídicas pero más pequeñas, mitocondrias anormales, y ausencia de caveolas. Las caveolas se muestran con una punta de flecha roja. LD: gota lipídica; n: núcleo; m: mitocondria. E) Cuantificación de caveolas normalizadas por largo de membrana. Imagen modificada de [3].

1.3. Conceptos generales de la biología de las caveolas.

Las caveolas son microdominios de la membrana plasmática que conforman invaginaciones en forma de omega, de 50 a 100 nm de diámetro (Figura 4). Fueron descritas por primera vez en 1953 en endotelio del corazón por G.E. Palade, quien las llamó “vesículas plasmalemales” [26]. Dos años después, E. Yamada describió estructuras análogas en el epitelio de la vesícula biliar, llamándolas “caveolas intracelulares”, debido a su semejanza con cuevas pequeñas [27]. Interesantemente, las caveolas son capaces de agruparse (“*clusters*”) generando caveolas interconectadas de gran tamaño y altamente organizadas [28] (Figura 4), cuya relevancia biológica y mecanismos por los que se forman permanecen desconocidos.

En términos generales, las caveolas son un subtipo de balsas lipídicas (*lipid rafts*) [29] y su abundancia es muy variable entre tipos celulares. Así, mientras son casi indetectables en neuronas o hepatocitos, son muy abundantes en adipocitos, células musculares, fibroblastos o células endoteliales, donde pueden llegar a constituir hasta el 50% de la superficie celular total [30].

Se han postulado tres funciones principales para las caveolas: 1) endocitosis: las caveolas son susceptibles de endocitosis, formando vesículas llamadas “caveosomas” [31], [32], participando así en transporte y comunicación intracelular; 2) mecano o quimioprotección: pueden desarmarse en respuesta a estímulos físicos para ejercer un mecanismo mecanoprotector [30] y por su elevado contenido de colesterol y esfingomielina conferir resistencia a los efectos detergentes de los ácidos grasos libres extracelulares [5]; y 3) señalización celular: las caveolas son microdominios de membrana enriquecidos en diversos receptores que activan cascadas de señalización [33].

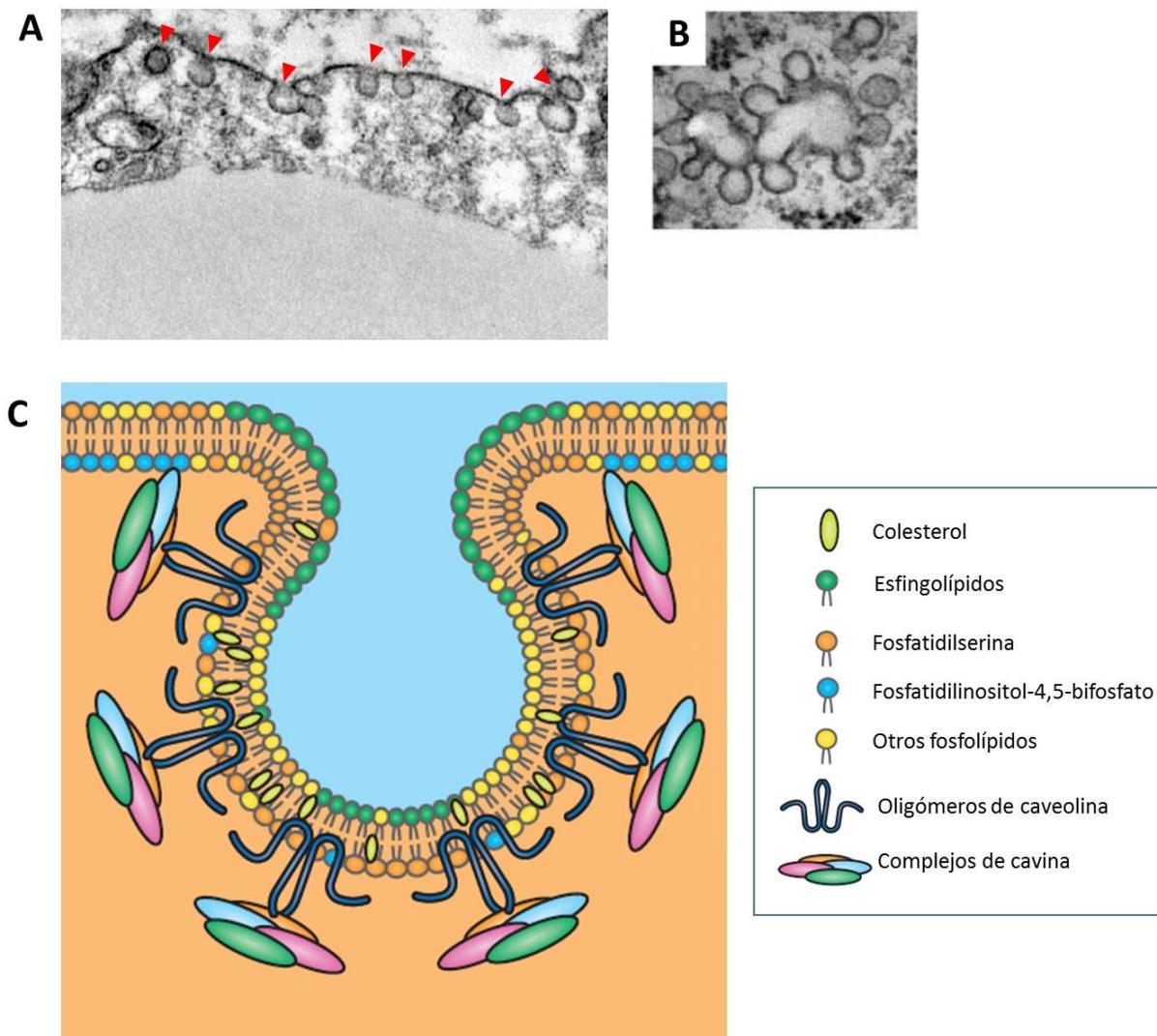


Figura 4: Estructura y composición de las caveolas. A) Imagen de microscopía electrónica que muestra la presencia de caveolas (indicadas con una punta de flecha roja) en la membrana plasmática de adipocito de ratón. Imagen obtenida de [34]. B) Imagen de microscopía electrónica que muestra una agrupación de caveolas en células endoteliales de ratón. A estas estructuras también se les conoce como “rosetas”. Imagen obtenida de [35]. C) Esquema de la caveola y sus componentes principales. La caveola presenta una forma de omega y está enriquecida en colesterol, esfingolípidos y fosfatidilserina. Complejos de cavina se unen a oligómeros de caveolina, los cuales están unidos a la membrana mediante su interacción con colesterol, fosfatidilserina y fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. Figura adaptada de [36].

1.3.1. Principales componentes proteicos de las caveolas: caveolinas y cavininas.

Las caveolinas son proteínas integrales de membrana, existen 3 isoformas conocidas y forman homo y heterodímeros en las caveolas. Caveolina-1 es una proteína que une colesterol, fosfatidilserina y fosfatidilinositol 4,5 bifosfato y es esencial para la formación de caveolas en células no musculares [37]. Caveolina-2 ha sido menos estudiada, pero se ha sugerido que es un importante contribuyente de la señalización mediada por caveolas, ya que en su forma fosforilada interactúa con varias proteínas involucradas en la transducción de señales [38], [39]. Además, se ha demostrado que oligómeros de caveolinas-1 y -2 pueden servir como andamiaje para muchas proteínas que interactúan con caveolinas, incluyendo H-Ras, c-Src, proteínas G y receptores de factores de crecimiento, pudiendo ser concentradas en la membrana dentro de las caveolas. Esto sugiere que las caveolas, por medio de las caveolinas, pueden actuar como estructuras de membranas especializadas capaces de ensamblar y coordinar las funciones de complejos multiproteicos involucrados en la transducción de señales, tráfico celular, homeostasis lipídica y adhesión celular [40]. Finalmente, caveolina-3 se encuentra presente solo en células musculares, y es esencial para la formación de caveolas en ese tipo celular [41], [42].

Las cavininas son proteínas periféricas de membrana que forman parte de la capa estriada de las caveolas, la cual está constituida por una matriz de filamentos que cubre la superficie citoplasmática de la caveola [43]. Cavina-1 es esencial para la formación de caveolas, y es capaz de unirse a fosfatidilserina y fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [30]. Cavina-2 se une a fosfatidilserina y promueve la curvatura de la membrana caveolar [44]. Cavina-3 también se une a fosfatidilserina y regula la endocitosis y tráfico de las caveolas [45]. Cavina-4 es específica de las células musculares y se une a fosfatidilserina y fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [30].

Como se mencionó, mutaciones en el gen *CAV1*, que codifica para caveolina-1, determinan lipodistrofia congénita generalizada en humanos [4]. En ratones jóvenes (12 semanas de edad) la

delección génica de *Cav1* (*Cav1*^{-/-}) no determina lipodistrofia manifiesta pero sí resulta en resistencia a la ganancia de peso inducida por dieta, resistencia a la insulina y defectos vasculares [46]. Por el contrario, los ratones *Cav1*^{-/-} envejecidos (36 semanas de vida) muestran disminución espontánea del tejido adiposo, menor volumen de los adipocitos, y niveles plasmáticos elevados de triglicéridos y ácidos grasos libres [47].

Por su parte, los ratones deficientes en cavina-1 presentan un fenotipo lipodistrófico espontáneo, con niveles elevados de triglicéridos circulantes, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia [48], de manera similar a lo observado en pacientes con LCG-4 con mutaciones en el gen *PTRF* [4].

Considerados en conjunto, estos antecedentes sugieren que las caveolas y sus proteínas determinantes caveolina-1 y cavina-1 son necesarias para la diferenciación adipogénica y el desarrollo de tejido adiposo *in vivo*, tanto en humanos como ratones.

Es importante destacar que los ratones carentes de caveolina-1 y cavina-1 no presentan caveolas en la membrana plasmática en ningún tejido, lo cual no ocurre con la delección de las otras isoformas de caveolinas y cavinas [49]–[51], lo que indica que caveolina-1 y cavina-1 son esenciales para la formación de caveolas, tal como lo avalan diversos estudios *in vitro* de pérdida y ganancia de función [52]–[54].

1.3.2. Composición lipídica de la caveola: alto contenido de colesterol y esfingolípidos

Los principales lípidos de las membranas celulares en mamíferos corresponden a: 1) glicerofosfolípidos, en los cuales una molécula de glicerol-fosfato es esterificada con dos ácidos grasos; 2) esfingolípidos, que contienen un ácido graso saturado o monoinsaturado largo o muy largo (de 16 a 32 número de carbonos) unido a una molécula de esfingosina mediante un enlace

amida [55]; y 3) esteroides, que son compuestos derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, los que poseen un grupo hidroxilo en el carbono 3 y una cadena lateral en el carbono 17 [56].

La membrana plasmática de las células animales está compuesta principalmente de colesterol (34%), fosfatidilcolina (23%), esfingomielina (17%), fosfatidiletanolamina (11%), fosfatidilserina (8%), fosfatidilinositol (6%) y 1% de otros fosfolípidos [57].

La composición lipídica de las caveolas difiere del resto de la membrana plasmática. Las caveolas se caracterizan por tener un alto contenido de colesterol y esfingolípidos. En adipocitos de rata, los niveles de colesterol y esfingolípidos son 3 y 2 veces mayor, respectivamente, en caveolas que en el resto de la membrana plasmática, mientras que los niveles totales de fosfolípidos se mantienen [58].

Diversos estudios muestran que el colesterol es esencial para la formación, estabilidad y funcionalidad de las caveolas tanto en adipocitos como en otros tipos celulares [59]. En células 3T3-L1, una línea celular capaz de adquirir fenotipo adipocítico *in vitro*, la disminución de los niveles de colesterol por medio del tratamiento con β -ciclodextrina, resulta en pérdida de la estructura de las caveolas, las que adquieren una forma más alargada y plana, y disminuyen considerablemente su número; incluso concentraciones elevadas de β -ciclodextrina determinan desaparición completa de caveolas. Interesantemente, en estas células se observó que la reposición progresiva de los niveles de colesterol determinó reaparición de caveolas, revelando así la importancia del colesterol en la biogénesis de estas estructuras de membrana [59]. Además, el tratamiento con β -ciclodextrina modificó la composición proteica de las caveolas, causando degradación de cavina-2 y redistribución de cavina-1 al citosol e inhibición de diversas vías de señalización celular [59][60].

En un estudio se trataron células 3T3-L1 con inhibidores de la síntesis de colesterol, lo que también produjo una disminución significativa en el número de caveolas, observándose además una reducción en la señalización de insulina [61], apoyando la hipótesis de la participación de las

caveolas en la transducción de señales intracelulares dependientes de receptores de superficie celular.

Caveolina-1 se une a colesterol libre con elevada afinidad y su asociación a liposomas de fosfolípidos solo ocurre si existe colesterol en el sistema [62], [63]. Además, se ha encontrado que el colesterol es necesario para estabilizar los oligómeros de caveolina-1, lo cual es esencial para la formación y mantención de la caveola [64].

La composición de esfingolípidos de las caveolas varía según el tipo celular. Por ejemplo, caveolas preparadas a partir del endotelio pulmonar de rata están enriquecidas en el gangliósido GM1 [65], mientras que en fibroblastos humanos, están enriquecidas en esfingomielina y ceramida [66]. En adipocitos de rata, la fracción caveolar es rica en esfingomielina y el gangliósido GD3, y los gangliósidos GM3 y GM1 poseen concentraciones similares al resto de la membrana [58].

El rol funcional de los esfingolípidos en las caveolas es poco conocido. Hay evidencia que sugiere que la localización y función de caveolina-1 dentro de la membrana depende de la composición de esfingolípidos de la membrana plasmática [40]. Por ejemplo, en una línea celular de queratinocitos, el aumento en los niveles de GM3 indujo la translocación de caveolina-1 desde las caveolas a regiones de la membrana solubles en detergente, permitiendo su interacción funcional con el receptor EGFR [67]. En células 3T3-L1, la inducción de resistencia a la insulina por tratamiento con TNF- α fue acompañado por aumento en los niveles de la sintasa de GM3 y mayor contenido de GM3 celular, específicamente en membranas resistentes a detergente. Este exceso de GM3 llevó a disociación del complejo entre el receptor de insulina y caveolina-1, sugiriendo que estos cambios en el complejo receptor insulina/caveolina-1 podrían ser responsable de la resistencia a la acción de insulina en células tratadas con TNF- α [68]. Además, la asociación de caveolina-1 con balsas lipídicas y la señalización dependiente de caveolina-1 parecen ser sensibles a los niveles celulares de ceramidas, ya que un exceso de ceramidas es capaz de desplazar caveolina-1 de las caveolas [69].

En adipocitos de ratones deficientes en serina palmitoiltransferasa (la enzima limitante para la síntesis *de novo* de esfingolípidos), se encontró que la síntesis *de novo* de esfingolípidos es necesaria para mantener la viabilidad de estas células y para su normal función metabólica [70]. Además, estos ratones sufrieron reducción progresiva de la adiposidad corporal, aumento de la infiltración de macrófagos y fibrosis del tejido adiposo, niveles elevados de glicemia, resistencia a la insulina e hígado graso [70]. Aun cuando en este estudio no hubo una reducción significativa en el número de caveolas en los adipocitos, es posible que un menor contenido de esfingolípidos determine un funcionamiento anormal de estos microdominios de membrana. No obstante, es importante destacar que no hay evidencia directa que muestre que los esfingolípidos de la membrana plasmática son necesarios, como sí lo es el colesterol, para la formación y mantención de las caveolas.

Respecto al rol de los fosfolípidos en la caveola, se ha sugerido que los niveles totales no son distintos a los del resto de la membrana plasmática [58], pero sí varían en su composición específica [71]. En efecto, en caveolas aisladas de células KBC, una línea celular humana de carcinoma epidermal, se encontró que las caveolas estaban enriquecidas en fosfatidilserina y que tenían muy bajos niveles de fosfatidilinositol respecto al resto de la membrana [71]. Otro estudio comparó la composición fosfolipídica de las caveolas y de la membrana plasmática total en mucosa de colon de ratón, encontrándose que las caveolas poseen un contenido relativamente mayor de fosfatidilserina y menor de fosfatidilcolina [72].

Concordantemente, experimentos *in vitro* muestran que fosfatidilserina es un fosfolípido clave para la formación y estabilidad de la caveola [73]. En estos estudios se realizó un rastreo microscópico de caveolina-1-GFP en células PSB-2, una línea celular de ovario de hámster chino portadoras de una mutación en el gen codificante para fosfatidilserina sintasa, que resulta en una reducción del 80% de los niveles de fosfatidilserina celular. En este sistema se encontró que la

reducción de los niveles de fosfatidilserina determina disminución en el número de caveolas visualizadas por microscopía electrónica, menor co-localización de caveolina-1 con cavina-1 y aumento en la degradación de cavina-1. En este mismo trabajo, se reportó que la depleción aguda de fosfatidilinositol 4 fosfato y fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, por medio de fosfatasas reclutables por rapamicina, tenía un mínimo impacto en la formación de la caveola, apoyando un rol específico de fosfatidilserina en la formación de caveolas.

1.3.3. Biogénesis de la caveola

La formación de caveolas involucra la acción coordinada de proteínas integrales de membrana y proteínas de membrana periférica en un proceso dependiente de sus interacciones con lípidos de la membrana plasmática. La estructura resultante es estabilizada por complejos proteicos en el cuello de la caveola [30].

A través del trabajo de varios grupos de investigación, se ha propuesto un modelo de la biogénesis de la caveola [30], [74], ilustrado en la Figura 5. Caveolina-1 y caveolina-2 se sintetizan en el retículo endoplásmico, donde forman homo o hetero-oligómeros compuestos por 7 a 14 monómeros, altamente resistentes a detergentes. Estos oligómeros son transportados al aparato de Golgi por medio de transporte dependiente de COPII. En este organelo, el colesterol de la membrana cristaliza asistiendo a la formación de oligómeros más grandes de caveolina, formando complejos 70S. Estos oligómeros son luego transportados a la membrana plasmática por vesículas secretoras dependientes de las proteínas FAPP-1 y FAPP-2. En esta ubicación, los oligómeros se asocian a colesterol y son palmitoilados por la enzima palmitoil aciltransferasa, formando una plataforma que permite la formación de oligómeros de cavina. Para facilitar la interacción entre caveolina-1 y la membrana plasmática, caveolina-1 posee un dominio de andamiaje que contiene 3

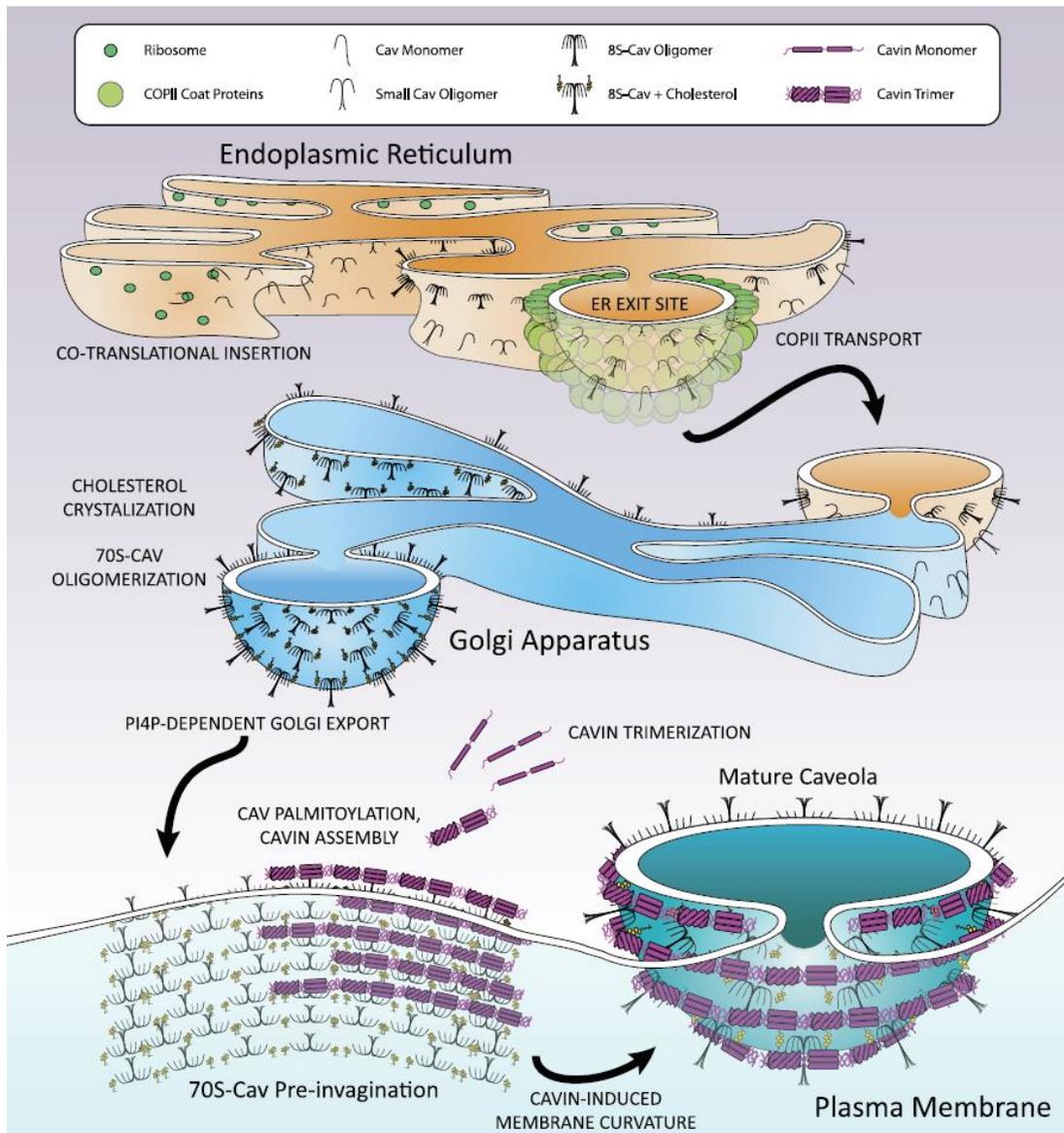


Figura 5: Biogénesis de la caveola. Caveolina-1 y caveolina-2 son sintetizados en el retículo endoplásmico (ER) y oligomerizados en complejos 8S (8S-Cav) de 7 a 14 monómeros. Estos oligómeros son transportados desde sitios de salida del retículo endoplásmico (ERES) por un transporte dependiente de COPII al Aparato de Golgi. En el Aparato de Golgi, el colesterol cristaliza en la membrana y asiste la formación de complejos de 70S (70S-Cav) compuestos de 18 a 25 subunidades de 8S-Cav. Luego, estos complejos son transportados a la membrana plasmática por vesículas secretoras dependientes de FAPP-1 y FAPP-2. Cerca o en la membrana plasmática, palmitoil aciltransferasas palmitoila a oligómeros 70S-Cav. Además, en la membrana plasmática, proteínas cavinicas que trimerizaron en el citosol, gradualmente se agregan a los complejos 70S-Cav de la membrana, y estos oligómeros de cavinica asisten en la curvatura de la membrana. La caveola madura consta de tres capas: una membrana rica en lípidos aniónicos y en colesterol, cubierta de una capa de complejos 70S-Cav palmitoilado, la cual a su vez está rodeada de una capa estriada formada por complejos 60S-Cavina. Figura obtenida de [74].

residuos catiónicos que se unen a los grupos cargados negativamente de los fosfolípidos de membrana fosfatidilserina y a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato a través de interacciones electrostáticas. En el citosol, las cavininas forman trímeros (complejos hetero-oligoméricos) a través de sus dominios de hélice superenrollada amino-terminal, los cuales se asocian con los dominios enriquecidos en caveolina-1 de la membrana plasmática. Para que la unión de caveolina-1 con las cavininas ocurra es necesario que las cavininas se unan a fosfatidilserina y fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, de manera que la composición lipídica de la membrana es crucial para la formación de la caveola. Esta unión de los trímeros de cavinina a los dominios de caveolina-1 induce la curvatura de la caveola, por un proceso aún desconocido.

Trabajos recientes han sugerido además la participación del receptor tirosina quinasa ROR1 en la biogénesis caveolar a través de su unión directa a caveolina-1 y cavinina-1, pero no existe evidencia que apoye que ROR1 es un componente esencial en la formación de las caveolas [75].

En resumen, las caveolas son estructuras de la membrana plasmática estabilizadas por cavininas a través de múltiples interacciones de baja afinidad con lípidos de membrana y proteínas.

1.3.4. Dinámica caveolar

Las caveolas pueden tener dos destinos: 1) ser endocitadas para el transporte de moléculas y luego sufrir fusión con los endosomas y reciclaje a la superficie celular; o 2) ser desensambladas en respuesta a un aumento en la tensión de membrana [30].

En el ciclo de reciclaje, las caveolas se endocitan desde la membrana generando una vesícula caveolar que se fusiona con endosomas tempranos. Este proceso de endocitosis caveolar es dependiente de dinamina [76], inhibido por la ATPasa EHD2 [77] y estimulada por cavinina-3 [78]. En estudios realizados en fibroblastos, la caveola endocitada retiene la cubierta de cavinina durante la endocitosis, se fusiona con el endosoma temprano, y luego se recicla a la membrana plasmática. En

este ciclo constitutivo, la caveola no se desensambla, y los componentes claves (caveolinas y cavinas) no se degradan [79].

En la vía alternativa, las caveolas son desensambladas, pudiendo representar un aspecto crucial de su función, particularmente en la mecanoprotección celular [30]. En respuesta a un aumento de la tensión de la membrana, la caveola se “aplana” (“*flattening*”), para mantener la integridad de la membrana plasmática en respuesta a desafíos físicos. En este proceso, la asociación caveolina/cavina se pierde y hay liberación de subcomplejos de cavina-1/cavina-2 y cavina-1/cavina-3 al citosol. Estos complejos pueden ser degradados vía proteosoma, interactuar con blancos intracelulares o re-asociarse con oligómeros de caveolina-1 de la superficie para volver a formar caveolas. Los complejos de caveolina liberados de la caveola son internalizados y degradados en el sistema endo-lisosomal. Además, cambios en la arquitectura de la caveola pueden alterar los contactos cavina/lípidos, ayudando así al desensamble. Consistente con esto, la deficiencia de caveolas produce un aumento de la tensión de la membrana cuando se induce edema celular, lo que no se observa en células que poseen un abundante número de caveolas, las que se aplanan a medida que las células aumentan su volumen [80].

1.3.5. La importancia de caveolas en el tejido adiposo

Como se mencionó en la sección 1.2, los adipocitos poseen abundantes caveolas, dando cuenta del 20-50% del total de la superficie celular [81]. Los adipocitos expresan las caveolinas-1 y -2, y las cavinas-1, -2 y -3 [45]. Las funciones que se han propuesto para las caveolas en adipocitos incluyen [82]: 1) facilitación del flujo de ácidos grasos extracelulares; 2) regulación de vías de señalización involucradas en el metabolismo de lípidos; 3) tráfico vesicular y/o endocitosis; 4) protección contra la lipotoxicidad y 5) diferenciación adipogénica. Importantemente, defectos en cada una de estas funciones pueden estar involucrados en la relación de caveolas y lipodistrofia.

En cuanto al flujo de ácidos grasos, se ha encontrado que la presencia de caveolas aumenta la captación de ácidos grasos y su acumulación en adipocitos [83]. Se ha postulado que la estructura oligomérica de caveolina-1 presente en la caveola permitiría la concentración y estabilización de ácidos grasos en la cara citoplasmática de la caveola, donde pueden ser metabolizados. En estudios en que se induce pérdida de caveolas en células 3T3-L1, ya sea por depleción de colesterol con β -ciclodextrina o por delección génica de cavina-1, se produce disminución de la captación de ácidos grasos [83], [84]. Además, proteínas de unión y transporte de ácidos grasos, como CD36, residen en las caveolas [34].

Respecto a la señalización celular en caveolas, se ha demostrado que múltiples receptores y proteínas involucradas en la transducción de señales y que son importantes para la función del adipocito residen en las caveolas, incluyendo el receptor de insulina [85], proteínas de unión y transporte de ácidos grasos, como CD36 [34], receptores β -adrenérgicos y receptores de adiponectina, entre otros [34], [86]. Diversos estudios han demostrado que la caveola es importante para la activación de las vías de señalización inducidas por estos receptores. Por ejemplo, se ha destacado la importancia de estos microdominios en la vía de señalización activada por la insulina [48], [87]. En el ratón *knock out* para caveolina-1, que carece de caveolas, se observó que el tejido adiposo mostraba una reducción del 90% en los niveles proteicos del receptor de insulina, sin cambio en sus niveles de mRNA [46]. Las caveolas también participan en la activación de los receptores β -adrenérgicos, promoviendo la hidrólisis de los triglicéridos de las gotas lipídicas (lipólisis). Concordantemente, el *knock-down* de cavina-1, y por lo tanto, la depleción de caveolas en adipocitos en cultivo, se asoció a menor activación de la lipólisis en respuesta a estímulos adrenérgicos [88]. En otros estudios, la pérdida de caveolas en células 3T3-L1, por depleción de colesterol con β -ciclodextrina o por delección de cavina-1, determinó disminución de la lipólisis [52], [84].

En cuanto a la función de las caveolas en endocitosis, en cultivos primarios de adipocitos, el receptor de insulina autofosforilado en respuesta a la estimulación por insulina es rápidamente endocitado mediante un proceso de endocitosis mediada por caveola, involucrando fosforilación en tirosina de caveolina-1 [89]. Además, mediante el uso de un RNA de interferencia para caveolina-1 en células 3T3, se encontró que el transportador de glucosa GLUT-4 se internaliza mediante endocitosis mediada por caveola [90]. Similarmente, Le Lay y cols. sugirieron que la internalización de colesterol en adipocitos requiere endocitosis caveolar [91], destinando este colesterol hasta la gota lipídica para ser almacenado como colesterol libre. Por otro lado, se ha postulado que la caveola también participaría en el eflujo de colesterol [92], [93]. Finalmente, un trabajo reciente demostró que la adipoquina TRAP5a ingresa a la célula mediante endocitosis mediada por caveolas en células progenitoras de adipocitos, promoviendo la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales, preadipocitos y osteoblastos [94].

Los adipocitos presentan un elevado flujo de ácidos grasos desde y hacia el medio extracelular. Los ácidos grasos son detergentes débiles a pH fisiológico y las caveolas son dominios resistentes a detergentes. Por lo tanto, se ha propuesto que las caveolas confieren protección a los adipocitos frente a la lipotoxicidad de niveles elevados de ácidos grasos libres. Experimentos en preadipocitos sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro* en los cuales se depletó caveolina-1, demostraron que la falta de caveolas aumenta significativamente la susceptibilidad a la lipotoxicidad mediada por ácidos grasos en comparación con células en las cuales sí se expresa caveolina-1 y poseen caveolas [5]. Los mismos resultados se obtuvieron en experimentos usando células HEK293 en que se les indujo la expresión de caveolina-1 [95]. Interesantemente, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, se encontró que al someter a preadipocitos en cultivo a cantidades elevadas de ácido palmítico, el cual es un estímulo lipotóxico, preadipocitos *Agpat2*^{-/-} son más susceptibles a la muerte celular que adipocitos *wild type* (*Agpat2*^{+/+}), lo cual fue evaluado por diferentes ensayos

de muerte celular: caspasa-3 activada, localización subcelular de citocromo c, ensayo LDH y ensayo MTT [96].

Es posible que esta lipotoxicidad aumentada en adipocitos *Agpat2*^{-/-} se relacione a la disminución de caveolas, las cuales protegen de la toxicidad que produce una concentración elevada de ácidos grasos. Otra causa para esta lipotoxicidad podría deberse a una alteración lipídica de la membrana, ya que algunos estudios han sugerido que cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática induce muerte celular, ya sea por lípidos que inducen directamente muerte, o por lípidos que cambian la fluidez y las propiedades biofísicas de la membrana, lo cual también aumenta la susceptibilidad a muerte celular [97], [98].

Finalmente, se ha sugerido que las caveolas están involucradas en el proceso de diferenciación adipogénica. Tal como se mencionó anteriormente, las caveolas participan en la activación de diversas vías de señalización, muchas de las cuales son cruciales para la diferenciación adipogénica, entre las que destacan las vías dependientes del receptor de insulina. De esta forma, diversos estudios *in vitro* han evaluado la importancia de las caveolas en adipogénesis. Se ha observado que durante la diferenciación adipogénica de células 3T3-L1, el número de caveolas [99], [100] y la abundancia de caveolina-1 [101] y cavina-1 [102] aumenta conforme la diferenciación progresa, sugiriendo que las caveolas participan en la regulación de la adipogénesis. Además, se ha demostrado que caveolina-1 es importante para la formación eficiente de gotas lipídicas, ya que MEFs deficientes en caveolina-1 acumulan ~5 veces menos gotas lipídicas que MEFs *wild type* [52].

1.4. Resumen de antecedentes

Mutaciones en *Agpat2* son la causa más frecuente de lipodistrofia congénita generalizada en humanos [1]. El ratón *Agpat2*^{-/-} presenta un fenotipo lipodistrófico, caracterizado por la carencia de tejido adiposo, resistencia a la insulina, esteatosis hepática e hiperglicemia [2]. Fibroblastos

embrionarios murinos (MEFs) y preadipocitos provenientes de ratones *Agpat2*^{-/-} presentan adipogénesis deteriorada *in vitro*. MEFs diferenciados y adipocitos del tejido adiposo de ratón *Agpat2*^{-/-} recién nacido (P0.5) presentan una marcada reducción en el número de caveolas en la membrana plasmática. A raíz de estas observaciones, en esta tesis evaluamos si defectos en la composición lipídica de la membrana plasmática o en los niveles o localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 podrían explicar el por qué poseen bajo número de caveolas y, esto a su vez, podría explicar defectos moleculares que determinan adipogénesis fallida y mayor susceptibilidad a muerte de los adipocitos *Agpat2*^{-/-}. Además, estudiamos la vía de señalización dependiente de insulina, que es esencial para la formación de gotas lipídicas y de la adquisición de un fenotipo de adipocito maduro, y que ha sido relacionada directamente a la abundancia de caveolas en los adipocitos [46].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La deficiencia de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} se asocia a alteraciones en la composición lipídica de la membrana plasmática, en la abundancia o distribución subcelular de caveolina-1 y cavina-1 y/o a menor activación de la vía de señalización de insulina.

OBJETIVOS

2.2. Objetivo general

Determinar si la deficiencia de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} se asocia a alteraciones en la composición lipídica de la membrana plasmática, en la abundancia o distribución subcelular de caveolina-1 y cavina-1 y/o a menor activación de la vía de señalización de insulina.

2.3. Objetivos específicos

1. Determinar la abundancia de caveolas en la membrana plasmática de preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro* y en adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}.
2. Evaluar los niveles basales de la vía de señalización inducida por insulina en preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro*.
3. Determinar la abundancia y localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro* y en adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}.

4. Determinar los niveles de colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos celulares totales y de membrana plasmática de preadipocitos *Agpat2^{-/-}* y *Agpat2^{+/+}* sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro* y en adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2^{-/-}* y *Agpat2^{+/+}*.
5. Cuantificar la abundancia, a nivel de mRNA, de reguladores del metabolismo de lípidos en preadipocitos *Agpat2^{-/-}* y *Agpat2^{+/+}* sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Reactivos de genotipificación

Tampón de lisis para PCR (*Direct PCR Lysis Reagent*, Viagen), proteinasa K (Merck), polimerasa para la reacción de PCR (*Phire Hot Start II DNA Polymerase*, Thermo Scientific), dNTPs Mix 10 mM (Thermo Scientific), marcador de peso molecular de DNA (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder*, Thermo Scientific), tampón de carga para DNA (*Gel Loading Dye 6X*, Thermo Scientific), agarosa (*SeaKem LE Agarose*, Lonza), tinción para visualizar el DNA (*SYBR™ Safe DNA Gel Stain*, Thermo Scientific).

3.1.2. Reactivos de cultivo celular

Medio DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, Gibco), antibiotico-antimicótico (Gibco), suero fetal bovino (Gibco), tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), azul de tripán (Gibco).

3.1.3. Reactivos para la obtención de cultivo primario de preadipocitos y diferenciación adipogénica

in vitro

Colagenasa tipo II (Thermo Scientific), bicarbonato de potasio (KHCO₃) (Sigma), fosfato monopotásico (KH₂PO₄) (Calbiochem), sulfato de magnesio (MgSO₄) (Sigma), cloruro de potasio (KCl) (Calbiochem), cloruro de sodio (NaCl) (Calbiochem), cloruro de calcio (CaCl₂) (Calbiochem), D-glucosa (Gibco), albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (Sigma), filtro celular de 40 y 100 μm (Falcon), tampón de lisis ACK (Thermo Scientific), dexametasona (Sigma), indometacina

(Sigma), isobutilmetilxantina (Sigma), rosiglitazona (Merck), triiodotironina (T3) (Sigma), insulina (Sigma).

3.1.4. Reactivos para microscopía

Glutaraldehído (*Glutaraldehyde 25% Solution, EM Grade, Distillation Purified*, Electron Microscopy Sciences), tampón cacodilato de sodio (*Sodium Cacodylate Trihydrate*, Electron Microscopy Sciences), paraformaldehído (Merck), glicina (Merck), Triton™ X-100 (Sigma), gelatina de pescado (*Gelatin from cold water fish skin*, Sigma), 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) 493/503 (Invitrogen), Hoechst 33258 (Life Technologies), Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences), medio de montaje para cortes en crióstato (*Optimal Cutting Temperature Compound*, Tissue-Tek), Oil Red O (Sigma), portaobjetos cargados positivamente (*Super frost Plus*, Thermo Scientific), tampón PBS 10X (Merck).

3.1.5. Reactivos para western blot

Tampón RIPA (*Lysis and Extraction Buffer*, Thermo Scientific), inhibidor de proteasas (*Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X*, Thermo Scientific), inhibidor de fosfatasas (*Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X*, Thermo Scientific), kit del ácido bicinconínico (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific), acrilamida (*40% Acrylamide/Bis Solution 37,5:1*, Biorad), persulfato de amonio (Biorad), dodecil sulfato de sodio (Biorad), TEMED (Biorad), tampón de carga de proteínas (*Lane Marker Reducing Sample Buffer*, Thermo Scientific), marcador de peso molecular de proteínas (*AccuRuler RGB Plus Pre-stained Protein Ladder*, Maestrogen), membrana de polifluoruro de vinilideno (*Immun-Blot® PVDF Membrane*, Biorad), reactivos de quimioluminiscencia Westar Sun (Cyanagen) y Westar Supernova (Cyanagen), Tween 20 (Promega), Ponceau S (Sigma), tampón de

Stripping (Restore WB Stripping Buffer, Thermo Scientific), tampón TBS 10X (Winkler), tampón tris-glicina 10x (Biorad).

3.1.6. Reactivos para RT-qPCR

Agua libre de nucleasas (*UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen*), Trizol (Thermo Scientific), kit para el tratamiento con DNasa (*TURBO DNA-free™ Kit, Invitrogen*), kit para transcripción reversa (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*), *Master mix* para la reacción de qPCR (*Fast SYBR™ Green Master Mix, Applied Biosystems*), tampón de carga para RNA (*2X RNA Loading Dye, Thermo Scientific*), placas para qPCR (*MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL, Thermo Scientific*), film adhesivos para placas de qPCR (*MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Thermo Scientific*).

3.1.7. Anticuerpos

- Para *western blot*:

Anti- β Tubulina 1:5.000 (Abcam, ab6046), Anti-PTRF/cavina-1 1:1.000 (Abcam, ab48824), Anti-Caveolina-1 1:1.000 (Cell signaling, 3267), Anti-ATPasa sodio potasio 1:20.000 (Abcam, ab76020), Anti-EEA1 1:1.000 (Sigma, E7659), Anti-GM130 1:1.000 (BD Bioscience, 610822), Anti-LAMP1 1:1.000 (Cell Signaling, 3243), Anti-Calnexina 1:1.000 (Enzo, ADI-SPA-860-F), Anti-PMP70 1:1.000 (Millipore Sigma, SAB4200181), Anti- β -Actina 1:1.000 (Cell Signaling, 4967), Anti-GPAT1 1:1.000 (anticuerpo donado por el Dr. Jay Horton), Anti-fosfo Akt 1:1.000 (Ser473) (Cell Signaling, 4060), Anti-Akt 1:1.000 (Cell Signaling 4685), Anti-fosfo Erk 1:1.000 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, 9106), Anti-ERK 1:1.000 (Cell Signaling, 4695), Anti-Receptor de insulina β 1:1.000 (Cell Signaling, 3025), Anti-Vinculina 1:1.000 (Santa Cruz, sc-73614), Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody 1:5.000 (Cell Signaling, 7076), Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 1:5.000 (Cell Signaling, 7074).

- Para inmunofluorescencia:

Anti-PTRF/cavina-1 1:100 (Abcam, ab48824), Anti-Caveolina-1 1:100 (Cell signaling, 3267), Anti-GST 1:500 (Rockland, R.600-101-200), Anti-Mac2 1:200 (Cedarlane, CL8942AP), Anti-Lamp1 1:200 (Abcam, ab25245), Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 1:1.000 (Invitrogen, A21432), Donkey anti-Rat IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 1:1.000 (Invitrogen, A21208), Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 1:1.000 (Invitrogen, A21206).

3.1.8. Reactivos para estudios de lipidómica

Los solventes orgánicos hexano, metil acetato, acetonitrilo, diclorometano, metanol, metil ter-butil éter, isopropanol y acetonitrilo son grado HPLC o LC/MS y fueron obtenidos en Sigma. Los estándares SPLASH™ LipidoMix™ de la mayoría de los lípidos fueron obtenidos en Avanti Polar Lipids. Los estándares de ácidos grasos (16:0^{²H₃₁}, 18:1^{ω9}^{²H₅}, y 20:4 ^{ω6}^{²H₈}) fueron obtenidos de Cayman Chemical.

3.1.9. Reactivos para la purificación de membrana plasmática

Tampón HEPES (Sigma), sacarosa (Sigma), EGTA (Merck), azida de sodio (NaN₃) (Merck), inhibidor de proteasas (*cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Mantenición y genotipificación de ratones.

Ratones *Agpat2*^{+/+} (*wild type*) y *Agpat2*^{-/-} fueron generados a partir de cruces entre machos y hembras *Agpat2*^{+/-}. Estos ratones fueron desarrollados en *University of Texas Southwestern Medical Center* (UTSW) y transferidos a la Pontificia Universidad Católica de Chile a través de un acuerdo de transferencia de material (ATM). Los ratones se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, alimentados con dieta estándar (*Prolab RMH 3000 5P00*, LabDiet) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos y procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité Ético Científico Para El Cuidado De Animales y Ambiente de la Pontificia Universidad Católica de Chile (ID del proyecto: 170822007). En el caso de los experimentos realizados en la UTSW durante la pasantía doctoral en el extranjero, fueron aprobados por el *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) de UTSW (ID del proyecto: 2015-100938).

Para la genotipificación, un trozo de cola de los neonatos o de oreja en el caso de los adultos, fue digerido con proteinasa K 0,4 mg/mL en 100 µl de tampón de lisis para PCR por 12 h a 55°C y 2 h a 85°C. El producto de digestión fue centrifugado 5 min a 3.000 g, y el DNA obtenido fue usado como templado para el PCR de genotipificación. Los partidores del PCR son los siguientes: partidor A8: 5'-AAA GCT GTG CCA GGG TGG GT-3'; partidor A15: 5'-CGG CTA GGT AAG CAG TTT GA-3'; partidor SI75: 5'-GAT TGG GAA GAC AAT AGC AGG CAT GC-3'. El programa consiste en: a) 30 s a 98°C (denaturación inicial); b) 8 ciclos de 5 s a 98°C de denaturación, 5 s a 70°C de alineamiento, 10 s a 72°C de extensión y 25 ciclos de 5 s a 98°C de denaturación, 5 s de 62°C de alineamiento, 10 s a 72°C de extensión, y c) 1 min a 72°C de extensión final. Las bandas obtenidas son de 782 pb para *wild type* y de 614 pb para *Agpat2*^{-/-}.

3.2.2. Obtención de cultivo primario de preadipocitos

Ratones recién nacidos fueron eutanasiados mediante decapitación y el tejido adiposo de la región interescapular fue extraído quirúrgicamente. Estos tejidos fueron incubados con tampón de digestión (colagenasa tipo II al 0,2%, KHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 12 mM, MgSO_4 1,2 mM, KCl 4,8 mM, NaCl 120 mM, CaCl_2 1,2 mM, glucosa 5 mM, BSA 2,5% y antibiótico/antimicótico 1%, pH 7,4) a 37 °C por 45 min a 800 rpm en un agitador de tubos (Thermoshaker Biobase), para luego ser homogenizados con micropipeta P1000. La suspensión celular generada se filtró por un filtro celular de 100 μm para eliminar los restos tisulares y agregados celulares. Luego, cada muestra se incubó con tampón de lisis ACK por 4 min a temperatura ambiente para eliminar células sanguíneas. Posteriormente, se centrifugó a 300 g por 5 min, y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo completo (DMEM-F12, antibiótico-antimicótico 1%, suero fetal bovino 10%) y se filtró por un filtro celular de 40 μm . Luego, se centrifugó a 300 g por 5 min. El pellet obtenido es la fracción estromal vascular, la cual contiene los preadipocitos. El pellet fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo completo, y se sembró en 6 pocillos de una placa de 24 pocillos. Una vez que las células llegaron a confluencia, se disgregaron con Tripsina-EDTA y cada muestra fue expandida a una placa de 12 pocillos completa. Cuando llegaron a confluencia, las células se disgregaron con tripsina-EDTA, se contaron con cámara de Neubauer y azul de tripán, y se sembraron de 15.000-20.000 células/ cm^2 de área de crecimiento. Una vez confluentes, los preadipocitos fueron sometidos a diferenciación adipogénica.

3.2.3. Diferenciación adipogénica *in vitro* de cultivo primario de preadipocitos

Preadipocitos fueron incubados con medio de inducción adipogénica (medio de cultivo completo suplementado con dexametasona 0,5 μM , indometacina 125 nM, isobutilmetilxantina 0,5 mM, rosiglitazona 1 nM, triiodotironina (T3) 1 nM, e insulina 20 nM). Al día 2 de diferenciación, el

medio fue reemplazado por medio de mantención (medio de cultivo completo suplementado con T3 1 nM e insulina 20 nM). En los siguientes días, el medio fue reemplazado cada 2 días con medio de mantención. En la figura 6 se puede observar la tinción de gotas lipídicas con Oil red O, compuesto que tiñe lípidos neutros, de preadipocitos a día 0 y 7 post inducción adipogénica. Podemos observar que preadipocitos *wild type* son capaces de adquirir un fenotipo de adipocito maduro, con un número elevado de células cargadas de gotas lipídicas, a diferencia de los adipocitos *Agpat2^{-/-}*, los cuales poseen pocas células cargadas con gotas lipídicas, y estas gotas son de menor tamaño que las gotas lipídicas de los adipocitos *wild type*.

3.2.4. Obtención del tejido adiposo interescapular y subcutáneo de ratones

Ratones *Agpat2^{-/-}* y *wild type* fueron eutanasiados mediante decapitación a edades postnatal P0.5, P2.5, P4.5 y P6.5. La sección torácica del ratón fue fijada con paraformaldehído 4%/PBS durante 48 h a temperatura ambiente, luego fueron transferidos a un tampón sacarosa 30%/PBS por 48 horas a 4°C, y luego incluidos en medio de montaje *Optimal Cutting Temperature* (OCT) para cortar el tejido y obtener secciones torácicas transversales de 20 µm de grosor por medio de un criostato (Leica CM 1850). Además, a los tiempos ya mencionados, el tejido se extrajo quirúrgicamente y rápidamente fue congelado en nitrógeno líquido, y luego guardado a -80°C para su posterior uso.

3.2.5. Microscopía electrónica de transmisión

Tejido adiposo interescapular de ratones P2.5 y preadipocitos *Agpat2^{-/-}* y *wild type* sembrados en placas Mattek de 35 mm de diámetro (con cubreobjetos de vidrio N°1,5 y 14 mm de diámetro incorporado en el fondo de la placa) a días 7 y 10 post inducción adipogénica fueron fijados en 2,5% de glutaraldehído/0,1 M cacodilato de sodio a pH 7, y procesadas en *UTSW Electron*

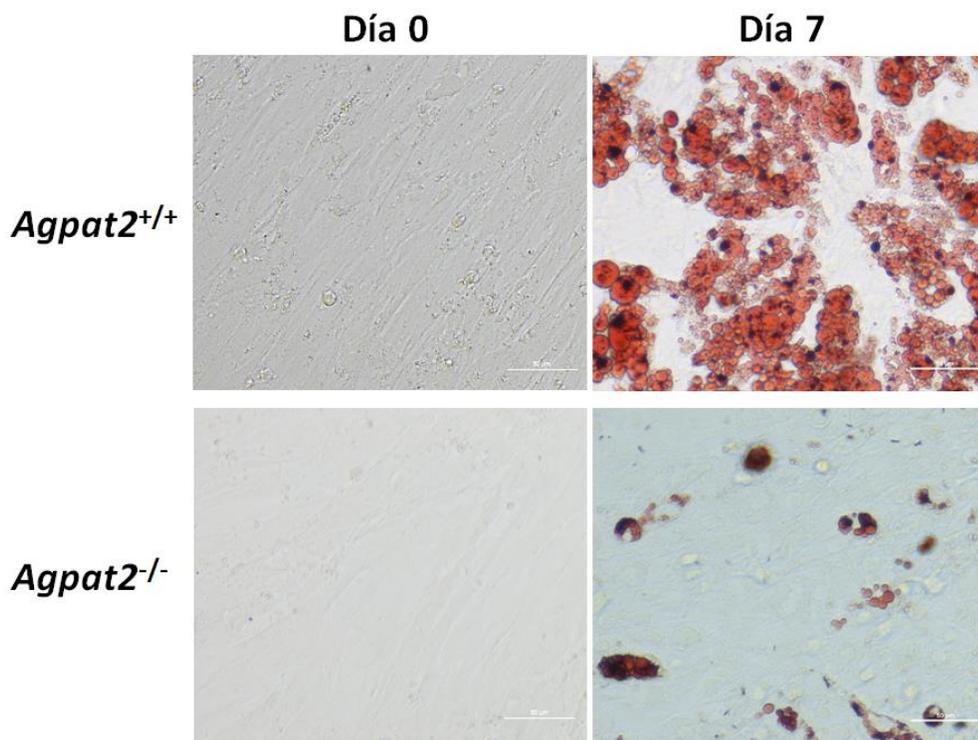


Figura 6: Tinción de gotas lipídicas de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *wild type* diferenciados *in vitro*. Tinción con Oil red O de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *wild type* a día 0 y 7 post inducción adipogénica. Barra de escala: 50 μ m.

Microscopy Core Facility. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1400.

Tejido adiposo interescapular de ratones P0.5 y preadipocitos *Agpat2^{-/-}* y *wild type* sembrados en cubreobjetos de plástico *Thermanox* a día 7 post inducción adipogénica fueron fijados en 2,5% de glutaraldehído/ 0,1 M cacodilato, y procesados en la Unidad de Microscopía Avanzada UC de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12.

3.2.6. Tinción con Oil Red O

Primero, se preparó la solución madre de Oil red O, disolviendo 0,5 g de Oil red O en 100 mL de isopropanol. Luego, se preparó la solución de trabajo de Oil red O, utilizando 6 partes de la solución madre y 4 partes de agua milli Q. Esta solución fue filtrada por filtro de jeringa de 0,22 µm.

Preadipocitos sembrados en placas de 24 pocillos fueron fijados en PFA 4%/PBS por 30 min, y luego lavados 3 veces con PBS. Luego, las muestras se incubaron con solución de trabajo de Oil Red O durante 15 min, se lavaron 1 vez con etanol 60%, y finalmente 1 lavado con PBS. Las muestras fueron visualizadas bajo campo claro en el microscopio Eclipse TS2R.

3.2.7. Inmunofluorescencia en preadipocitos

Preadipocitos sembrados en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro y 0,13-0,17 mm de grosor a diferentes días de diferenciación fueron fijados en PFA 4%/PBS por 30 min y luego fueron lavados 3 veces con PBS, incubados con glicina 0,1 M/PBS por 5 min, permeabilizados con 0,05% de Tritón X-100/PBS por 10 min y bloqueados con 3% de gelatina de pescado 1 h a temperatura ambiente. Luego, se lavaron 1 vez con 0,2% de gelatina de pescado/PBS y se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en 0,2% de gelatina de pescado/PBS toda la noche a 4°C en cámara

húmeda. Después de 4 lavados con 0,2% de gelatina de pescado/PBS, fueron incubadas con anticuerpo secundario acoplado a un marcador fluorescente disuelto en 0,2% de gelatina de pescado/PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Las gotas lipídicas se tiñeron con BODIPY 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 15 min y los núcleos con Hoechst (dilución 1:5.000) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 3 veces con PBS y se montó con fluoromont-G.

Las células fueron visualizadas en microscopio confocal Nikon espectral o microscopio Zeiss Airyscan, en la Unidad de Microscopía Avanzada UC de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron procesadas mediante el software ImageJ.

3.2.8. Inmunofluorescencia en tejido

Cortes transversales de la sección torácica de ratones ya fijados y montados en un portaobjeto cargado positivamente fueron lavados 3 veces con PBS, incubados con glicina 0,1 M/PBS por 10 min, permeabilizados con 0,05% de Tritón X-100/PBS por 30 min y bloqueados con 3% de gelatina de pescado 1 h a temperatura ambiente. Luego, se lavaron 1 vez con 0,2% de gelatina de pescado/PBS y se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en 0,2% de gelatina de pescado/PBS toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, después de 4 lavados con 0,2% de gelatina de pescado/PBS, las muestras fueron incubadas con anticuerpo secundario acoplado a un marcador fluorescente disuelto en 0,2% de gelatina de pescado/PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Las gotas lipídicas se tiñeron con BODIPY 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 15 min y los núcleos con Hoechst (dilución 1:5.000) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 3 veces con PBS y se montó con fluoromont-G.

Los cortes fueron visualizados en microscopio confocal espectral Nikon o microscopio Zeiss Airyscan, en la Unidad de Microscopía Avanzada UC de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron procesadas mediante el software ImageJ.

3.2.9. Western blot

Cultivos primarios de preadipocitos *Agpat2^{-/-}* y *wild type* en diferentes días de diferenciación fueron despegados de la placa con raspador de células. Las células se centrifugaron por 5 min a 5.000 rpm a 4°C. El pellet celular fue resuspendido en tampón RIPA suplementado con antiproteasas y/o antifosfatasa. Se incubó durante 30 min en hielo, y luego se centrifugó por 15 min a 14.000 rpm a 4°C, obteniéndose el extracto proteico el cual corresponde al sobrenadante. Se cuantificaron proteínas con el kit del ácido bicinonínico (BCA). 25 µg del extracto proteico fueron incubado con tampón de carga de proteínas y resueltos en electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS). El gel fue electrotransferido a membranas de PVDF, en las cuales se visualizaron las proteínas con solución de rojo Ponceau. Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (leche descremada 5%/0,1% Tween en TBS) por 1 h. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario disuelto en leche descremada 5%/0,1% Tween en TBS toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 min con 0,1% Tween en TBS y luego incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano por 2 h a temperatura ambiente en agitación. Las membranas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando los equipos C-DiGit Blot Scanner (Licor) or G:Box (Syngene). Los análisis de cuantificación de bandas obtenidas en las membranas fue realizada con el software ImageJ.

3.2.10. Visualización de depósitos de colesterol mediante sonda PFO-GST

El colesterol libre presente en secciones torácicas transversales y en los adipocitos en cultivo se detectó mediante la sonda recombinante *perfringolysin O* (PFO) fusionada a la proteína glutation-S-transferasa (GST) [103], donada gentilmente por la Dra. Katarzyna Kwiatkowska

(Departamento de Biología Celular, *Nencki Institute of Experimental Biology*, Polonia). PFO es una toxina proteica que pertenece a la familia de citolisinas de unión a colesterol, producida por la bacteria *Clostridium perfringens*. La sonda utilizada en esta tesis, PFO-GST, se une específicamente a depósitos intracelulares de colesterol y no detecta el colesterol integrado en membranas celulares.

Las células o tejidos fijados fueron lavados 3 veces con PBS, 1 vez incubados con glicina 0,1 M durante 5 min en el caso de las células y 10 min en el caso del tejido, 1 vez lavados con PBS, permeabilizados con Tritón X-100 0,05%/PBS por 10 min en el caso de las células y 30 min para el tejido. Después, se lavaron 1 vez con PBS y se bloqueó con gelatina de pescado 3%/PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las células o tejidos fueron tratados con 5 µg/mL de PFO-GST por 45 min a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con gelatina de pescado 0,2%/PBS, las muestras se incubaron con anticuerpo anti-GST preparado en gelatina de pescado 0,2%/PBS toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas 5 veces con gelatina de pescado 0,2%/PBS e incubadas con anticuerpo secundario anti-goat por 1 h a temperatura ambiente. Además, las células se incubaron con BODIPY 1 µg/mL durante 15 min para marcar gotas lipídicas y Hoechst (dilución 1:5.000) para marcar núcleos. Finalmente, se lavó 3 veces con PBS y se montó con fluoromont-G. Las células y tejidos fueron visualizadas bajo microscopio confocal espectral Nikon o microscopio Zeiss Airyscan, en la Unidad de Microscopía Avanzada UC de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron procesadas mediante el software Image J.

3.2.11. Cuantificación de los niveles de colesterol

La concentración del colesterol total en tejido adiposo interescapular y en adipocitos en cultivo fue cuantificada mediante el kit *Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit*, siguiendo las

instrucciones del proveedor. Esta técnica se basa en el ensayo enzimático de Allain [104], y consiste en que los ésteres de colesterol son hidrolizados por la enzima colesterol esterasa formándose colesterol libre, el cual es luego oxidado por la colesterol oxidasa generando peróxido de hidrógeno y un producto cetónico. El peróxido de hidrógeno es luego detectado usando 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (reactivo Amplex® Red). En la presencia de la peroxidasa de rábano, el reactivo Amplex® Red reacciona con el peróxido de hidrógeno con una estequiometría 1:1, produciendo resorufina, un producto altamente fluorescente, el cual es detectado en un lector de fluorescencia. Previo a la medición de colesterol se realizó una extracción de lípidos en cada muestra, mediante el método de Folch [105]. Para eso, 50 µg de extracto proteico fue secado bajo corriente de nitrógeno. A este extracto seco, se añadió 3 mL de metanol, se mezcló en agitador tipo vortex por 10 s y luego se sometió a sonicador por 30 min. Después, se agregaron 6 mL de cloroformo, se agitó durante 1 min y se incubó 30 min a 50°C. Se agregó 2 mL de agua, se agitó durante 2 min y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 700 rpm por 20 min a 4°C. Luego de la centrifugación, se generaron 2 fases: una fase acuosa superior (agua/metanol) y la fase orgánica inferior (cloroformo). Se colectó la fase cloroformo (que contiene el colesterol), la cual se traspasó a un tubo de vidrio la cual se había ambientado previamente con 10 µL de Tritón X-100 al 1% en cloroformo. Se secó la fase cloroformo bajo corriente de nitrógeno, y luego se procedió a la medición de colesterol con el kit *Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit* siguiendo las instrucciones del proveedor.

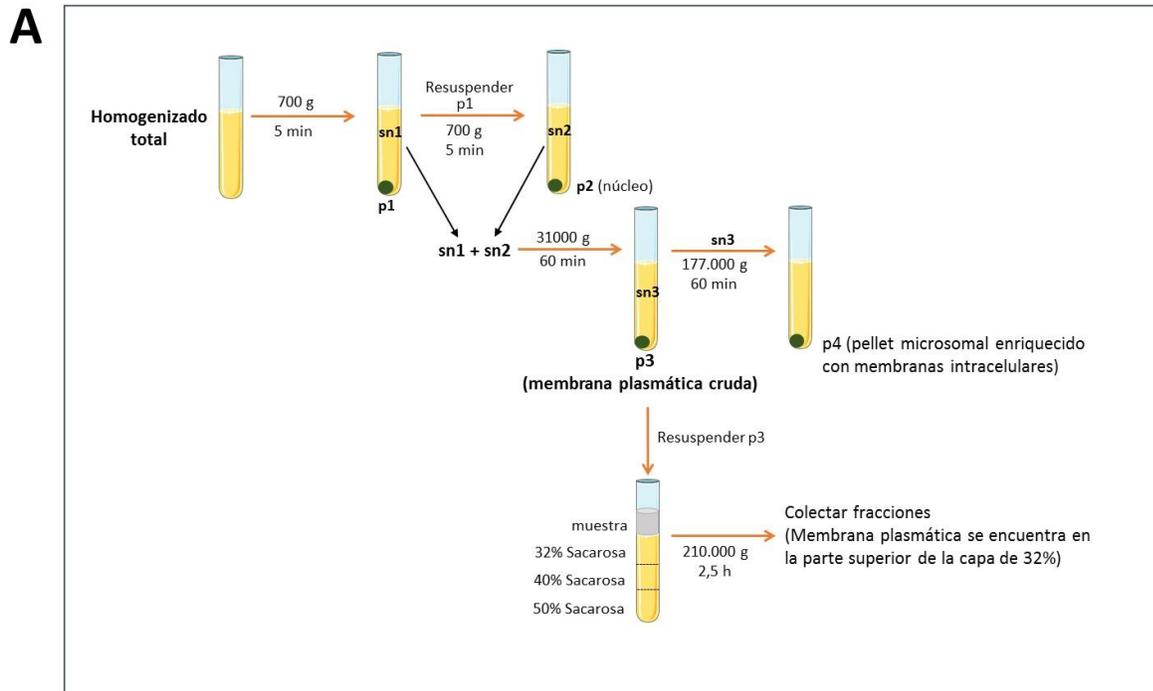
3.2.12. Aislamiento de la membrana plasmática

El protocolo para aislar la fracción de membrana plasmática en tejido adiposo y adipocitos en cultivo se basó en el protocolo de Bilan *et al.* [106]. Preadipocitos en cultivo a día 0 y 10 post inducción adipogénica se lavaron 2 veces con tampón PBS frío, y fueron despegadas de la placa con

un raspador celular. Las células se centrifugaron a 700 g por 10 min a 4°C. El pellet celular fue resuspendido (1,3 mL por cada placa de 100 mm utilizada) en tampón de homogenización frío (sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM pH 7,4, EGTA 2 mM, NaN₃ 3 mM, inhibidores de proteasas). Las células resuspendidas fueron homogenizadas con un Dounce de vidrio tipo A (20 hits).

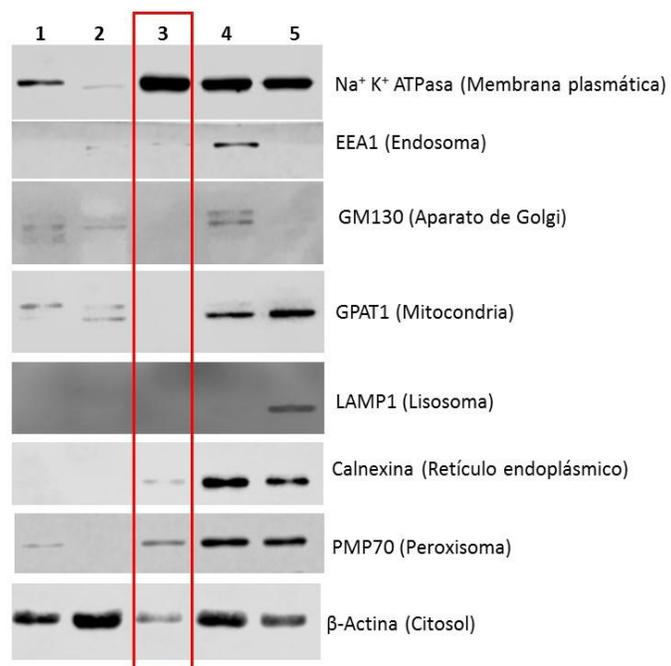
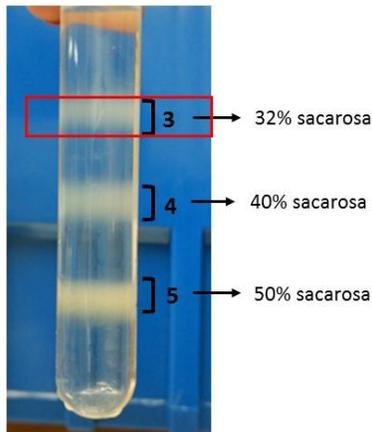
En el caso del tejido adiposo, ratones recién nacidos fueron eutanasiados mediante decapitación, y el tejido adiposo pardo interescapular se extrajo quirúrgicamente y se homogenizó inmediatamente después de su extracción con un homogenizador de tejidos Polytron con 1 mL de tampón de homogenización frío.

Tejido adiposo o preadipocitos en cultivo ya homogenizados se centrifugaron a 700 g, por 5 min a 4°C, para eliminar núcleos y restos celulares, y se colectó el sobrenadante (sobrenadante 1). Luego, se resuspendió el pellet en tampón de homogenización frío, en la mitad del volumen utilizado en la homogenización de las células o de tejido. Se centrifugó a 700 g, por 5 min a 4°C, y se colectó el sobrenadante (sobrenadante 2). Posteriormente, los sobrenadantes 1 y 2 fueron combinados y centrifugados a 31.000 g por 1 h a 4°C, obteniendo un pellet que es la fracción de membrana cruda. El pellet fue resuspendido en 1 mL de tampón de homogenización frío, y se sometió a una gradiente discontinua de sacarosa de 32% p/v, 40% p/v y 50% p/v. Cada solución de sacarosa fue preparada en tampón HEPES 20 mM a pH 7,4, y se utilizó 1 mL de cada una para la gradiente. La gradiente se ultracentrifugó durante 2,5 h a 210.000 g a 4°C. La fracción de membrana plasmática corresponde a la banda que queda sobre la gradiente de 32%, la cual se colectó con una pipeta pasteur de vidrio. Esta fracción se diluyó 5 veces con tampón HEPES 5 mM, pH 7,4 (para eliminar el exceso de sacarosa) y fue centrifugada a 31.000 g por 1 h a 4°C. El pellet obtenido corresponde a la fracción de membrana plasmática pura, la cual se resuspendió en 30-50 µl de tampón HEPES 20 mM pH 7,4 suplementado con antiproteasas. En la figura 7 se muestra un esquema del método desarrollado (Figura 7A) y el nivel de purificación obtenido con esta técnica mediante la detección de marcadores



B MEFs a día 10 post diferenciación adipogénica

1: Homogenizado total
2: Membranas intracelulares



C

Tejido adiposo pardo interescapular

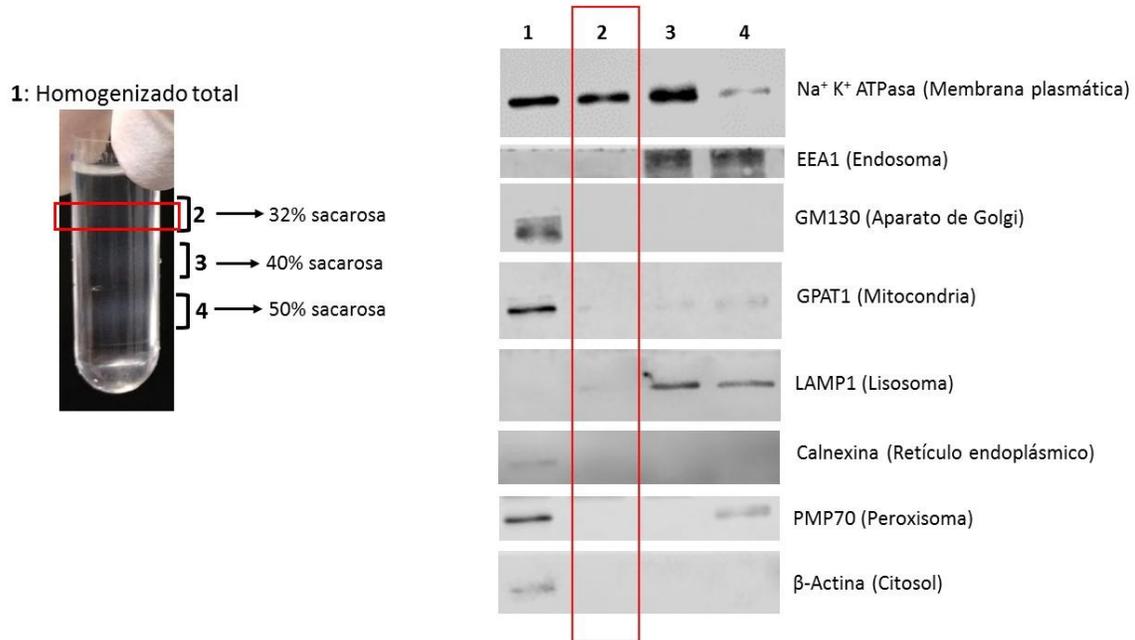


Figura 7: Desarrollo de un protocolo para el aislamiento de la fracción de membrana plasmática. A) Esquema de la metodología utilizada para aislar fracción de membrana plasmática, tanto para células como para tejido. sn: sobrenadante; p: pellet. B) Evaluación de la purificación de fracción de membrana plasmática de MEFs *Agpat2^{+/+}* día 10 post inducción adipogénica mediante *western blot* de marcadores de diferentes organelos. 25 μ g de extracto proteico de cada fracción fueron separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, y luego incubadas con anticuerpos específicos. Carril 1: homogenizado total; carril 2: membranas intracelulares; carril 3: fracción de membrana plasmática, correspondiente a la capa de 32% de sacarosa obtenida después de la centrifugación en gradiente de sacarosa; carril 4: capa de 40% de sacarosa obtenida después de centrifugación en gradiente de sacarosa; carril 5: capa de 50% obtenida después de la centrifugación en gradiente de sacarosa. C) Evaluación de la purificación de membrana plasmática de tejido adiposo pardo interescapular proveniente de un ratón *Agpat2^{+/-}* recién nacido (P0.5) mediante *western blot* de marcadores de diferentes organelos. 25 μ g de extracto proteico de cada fracción fueron separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Carril 1: homogenizado total; carril 2: fracción de membrana plasmática, correspondiente a la capa de 32% de sacarosa obtenida después de centrifugación en gradiente de sacarosa; carril 3: capa de 40% sacarosa obtenida después de la centrifugación en gradiente de sacarosa; carril 4: capa de 50% obtenida después de la centrifugación en gradiente de sacarosa.

de diferentes organelos en las distintas fracciones obtenidas. Esta técnica fue montada en MEFs *Agpat2^{+/+}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* (Figura 7B) y en tejido adiposo interescapular de un ratón *Agpat2^{+/-}* recién nacido (Figura 7C). Como se puede observar, en células en cultivo logramos obtener una fracción altamente enriquecida en el marcador de membrana plasmática (la enzima bomba sodio potasio ATPasa) y libre de marcadores de endosomas, aparato de Golgi, mitocondria, lisosomas y retículo endoplásmico. Se encontró una pequeña marca de peroxisomas y citosol. Para el tejido adiposo pardo interescapular, la fracción de membrana plasmática obtenida fue pura, sin presencia de ningún otro marcador de organelos.

Cabe mencionar que en la fracción de membrana plasmática proveniente del tejido adiposo pardo interescapular de ratones recién nacidos solo se midieron los niveles de colesterol y sus intermediarios y no de esfingolípidos y fosfolípidos debido a que el tejido adiposo interescapular de un ratón recién nacido es muy pequeño (pesa alrededor de 10 mg) y con esa cantidad de material para realizar aislamiento de membrana plasmática se obtienen cantidades diminutas, por lo que lo obtenido alcanzaba para la medición solamente de un tipo de lípido (esteroles y fosfolípidos/esfingolípidos poseen un método de extracción distinta por lo que no se puede utilizar la misma muestra para medir ambos tipos de lípidos). Y dado que el colesterol es el lípido determinante en la formación de la caveola, elegimos medir colesterol y sus intermediarios. Por esta misma razón, tampoco fue posible realizar el análisis de pureza de la fracción de membrana a través de *western blot* de diferentes marcadores de organelos de las muestras en que se midieron los niveles de esteroles.

3.2.13. Estudios de lipidómica para la medición de los niveles de esteroides

Los niveles de esteroides fueron evaluados mediante cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el laboratorio del Dr. Jeffrey McDonald (*Center for Human Nutrition*, UTSW, Estados Unidos), basado en una metodología desarrollada en este laboratorio, la cual se encuentra detallada en [107].

Para el homogenizado total de preadipocitos, se sembraron 200.000 células en 1 pocillo de una placa de 6 pocillos. A día 0 y 10 post inducción adipogénica, las células fueron recolectadas y lavadas 2 veces con tampón PBS frío, se centrifugaron a 5.000 rpm por 5 min a 4°C, y el pellet celular se utilizó para la extracción de lípidos. Para la fracción de membrana plasmática, se utilizaron 20-50 µg de proteínas para la extracción de lípidos.

Las muestras fueron sometidas a hidrólisis y extracción líquida-líquida. Para eso, a cada muestra se le añadió 1 mL de tampón de hidrólisis (hidróxido de potasio (KOH) 0,5 M en metanol), se taparon, mezclaron en agitador tipo vortex, y fueron incubadas a 80°C por 1 h. Luego, se esperó que las muestras estuvieran a temperatura ambiente, y se agregó 1 mL de diclorometano y 1 mL de PBS. Las muestras se taparon, mezclaron en agitador tipo vortex, y se centrifugaron a 3.500 rpm por 5 min. Después, se removió la fase orgánica (fase orgánica 1) a un tubo de vidrio de 2 mL. A la fase acuosa, se añadió 1 mL de diclorometano, se tapó y se mezcló en agitador tipo vortex. Se removió la fase orgánica, la cual se mezcló con la fase orgánica 1. La fase orgánica, la cual contiene los esteroides, se secó bajo corriente de nitrógeno a 45°C.

Luego, las muestras fueron purificadas para eliminar cualquier compuesto interferente para los análisis en el espectrómetro de masas. Para la purificación de las muestras, éstas se sometieron a extracción de fase sólida (SPE), utilizando una columna Biotage NH2.

A las muestras ya puras y secas, se agregaron 20 µl de estándar interno y 300 µl de 90% metanol precalentado a 37°C, y se incubaron en un baño ultrasónico por 5 min a 30°C. De estas

muestras se tomó una alícuota de 50 µl para el posterior análisis en el espectrómetro de masas. Los esteroides fueron analizados utilizando un sistema binario Shimadzu LC-10ADvp con un horno de columna y un automuestreador CTC LC PAL (LeapTechnologies) acoplado a un espectrómetro de masas AB Sciex 4000 QTrap equipado con una fuente Turbo V APCI. Los esteroides fueron resueltos con una elución isocrática de 2 pasos, usando una columna de HPLC Poroshell 120 SB-C18 (150 × 2,1 mm, 2,7 µm de tamaño de partícula) (Agilent Technologies). Las fases móviles consistían en (A) 96% de metanol con 0,1% de ácido acético y (B) metanol con 0,1% de ácido acético. La elución comenzó con 100% de A por 7,5 min, aumentando a 100% de B en 8 min, el cual fue mantenido en 100% de B por 6 min, y volvió a 100% de A por 6 min. La tasa de flujo fue de 0,4 mL/min, y la columna fue mantenida a 30°C.

3.2.14. Estudios de lipidómica para la cuantificación fosfolípidos y esfingolípidos

La concentración de fosfolípidos y esfingolípidos fue determinada mediante cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el laboratorio del Dr. Jeffrey McDonald (*Center for Human Nutrition, UTSW, Estados Unidos*).

Para generar preparaciones de homogenizados totales de preadipocitos, se sembraron 200.000 células en placas de 60 mm. A día 0 y 10 post inducción adipogénica, las células se colectaron y se lavaron 2 veces con PBS frío, y se despegaron de la placa con raspador celular. Luego, se realizó una extracción líquida de 3 fases [108], técnica en la que usando una extracción líquida-líquida de 1 paso permite la extracción y el fraccionamiento de los lípidos por polaridad. La extracción líquida de 3 fases está compuesta por una fase acuosa y dos fases orgánicas. Con este procedimiento, la fase orgánica superior resulta enriquecida con lípidos neutros (triglicéridos y ésteres de colesterol), mientras que la fase orgánica media contiene la mayoría de los glicerofosfolípidos. Brevemente, a la muestra se añadió 1 mL de hexano, 1 mL de metil acetato,

0,75 mL de acetonitrilo, y 1 mL de agua. La muestra se mezcló en agitador tipo vortex por 5 s y luego centrifugada a 2.671 g por 5 min, resultando en la separación de 3 fases líquidas. Las fases orgánicas superior y media se colectaron en tubos de vidrio separados, y se secaron bajo corriente de nitrógeno. La fase orgánica media, que contiene los fosfolípidos, fue purificada a través de una re-extracción de la fase. Para eso, se le añadió 1 mL de hexano. Luego, se mezcló en agitador tipo vortex por 5 s y luego centrifugada a 2.671 por 5 min, resultando en la separación de 2 fases líquidas. La fase de más abajo corresponde a la fase orgánica media purificada, la cual fue colectada en un tubo de vidrio y secada bajo corriente de nitrógeno.

Para la fracción de membrana plasmática, se utilizaron 20-50 µg de proteínas y se realizó la extracción lipídica con la técnica *Blight/Dyer* modificada [108], [109]. Esta técnica se basa en un sistema de solventes que contiene diclorometano, metanol y agua en diferentes proporciones. Los lípidos se extraen en la fase de diclorometano, mientras que la mayoría de las proteínas, azúcares, sales y algunos lípidos hidrofílicos permanecen en la fase metanol/agua. Brevemente, a la muestra se añadió 1 mL de metanol, 1 mL de diclorometano y 1 mL de agua. La muestra se mezcló en agitador tipo vortex por 5 s y centrifugada a 2.671 g por 5 min, resultando en dos fases líquidas. La fase orgánica (fase inferior) fue colectada a un tubo de vidrio y secada bajo corriente de nitrógeno..

Para el tejido adiposo pardo interescapular, se utilizó 0,5 mg del tejido homogenizado y se extrajeron los lípidos mediante la técnica *Blight/Dyer* modificada ya descrita anteriormente.

Luego, los lípidos extraídos fueron analizados a través de LC-MS/MS usando un SCIEX QTRAP 6500+ equipado con un sistema de HPLC Shimadzu LC-30AD y una columna de sílica Supelco Ascentis de 150 x 2,1 mm, 5 µm. Las muestras se inyectaron con una tasa de flujo de 0,3 mL/min en 2,5% del solvente B (metil ter-butil éter) y 97,5% de solvente A (hexano). El solvente B es incrementado a 5% durante 3 min y luego a 60% durante 6 min. Solvente B es disminuido a 0% durante 30 s mientras que el solvente C (90:10 v/v isopropanol-agua) es fijado a 20% y aumentado a 40% durante los

siguientes 11 minutos. El solvente C es aumentado a 50% durante 6 min. El sistema fue mantenido en 50% de solvente C durante 5 min previo a un re-equilibrio a 2,5% de solvente B por 15 min. El solvente D (95:5 (v/v) acetonitrilo-agua con 10 mM de acetato de amonio) fue infundido post-columna a 0,03 mL/min. La temperatura de la columna fue fijada en 25°C. Los datos fueron adquiridos en modo de ión positivo o negativo a través de monitoreo de reacción múltiple (MRM).

Los datos obtenidos para cada especie lipídica fue normalizada por su estándar correspondiente, con excepción de las hexosil ceramidas que fueron normalizadas con el estándar de ceramida.

3.2.15. RT-qPCR

El RNA total fue extraído mediante el método de Trizol según instrucciones sugeridas por el proveedor. La concentración de RNA fue determinada por un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Luego se evaluó la integridad del RNA a través de la visualización de 2 µg de RNA en un gel denaturante de agarosa/formaldehído. Después de verificar la integridad del RNA, se trataron 2 µg de RNA con la enzima DNasa I, utilizando el kit *Turbo DNA-free kit* para la eliminación de DNA contaminante. Después, se realizó la transcripción reversa con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. A partir de los cDNA, se realizó el análisis de niveles de transcritos de diferentes genes, con el sistema de PCR tiempo real *Applied Biosystems StepOnePlus*, usando el master mix de *Fast SYBR® Green Master Mix* con 100 ng de cDNA por muestra. El programa de PCR utilizado es el siguiente: paso inicial a 95°C por 20 s y luego 40 ciclos de 95°C por 3 s y 60°C por 30 s. La tabla de partidores utilizados se muestra en la tabla 1. Los niveles relativos de expresión fueron calculados utilizando el método del $\Delta\Delta C_t$ usando 36B4 como gen de referencia.

3.2.16. Análisis estadístico

Para la confección de gráficos y análisis estadístico se utilizó el programa *GraphPad Prism* (GraphPad) versión 6.01 para Windows. Para el análisis de la significancia estadística entre 2 grupos experimentales, se utilizó un test de t no pareado. Para el análisis de la significancia estadística entre 3 grupos experimentales o más, se utilizó test de ANOVA de 2 vías, y un test *post hoc* de Tukey's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ indica diferencias estadísticamente significativas en comparación a día 0 en el mismo genotipo.

Tabla 1: Secuencia de partidores utilizados para la cuantificación de mRNA por RT-qPCR.

Nombre del gen	Abreviación gen	Secuencia partidores (5' → 3')	
<i>Sterol regulatory element-binding protein 2</i>	<i>Srebp-2</i>	<i>Forward</i>	GCGTTCTGGAGACCATGGA
		<i>Reverse</i>	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA
<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase</i>	<i>Hmgcoar</i>	<i>Forward</i>	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG
		<i>Reverse</i>	AGCCGAAGCAGCACATGAT
<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1</i>	<i>Abca1</i>	<i>Forward</i>	CGTTTCCGGGAAGTGCCTA
		<i>Reverse</i>	GCTAGAGATGACAAGGAGGATGGA
<i>Low density lipoprotein receptor</i>	<i>Ldlr</i>	<i>Forward</i>	AGGCTGTGGGCTCCATAGG
		<i>Reverse</i>	TGCGGTCCAGGGTCATCT
<i>Lipoprotein receptor-related protein</i>	<i>Lrp</i>	<i>Forward</i>	TGGGTCTCCCGAAATCTGTT
		<i>Reverse</i>	ACCACCGCATTCTTGAAGGA
<i>Scavenger receptor class B type I</i>	<i>Srbl</i>	<i>Forward</i>	TCCCCATGAACTGTTCTGTGAA
		<i>Reverse</i>	TGCCCGATGCCCTTGA
<i>Serine palmitoyltransferase</i>	<i>Sptlc2</i>	<i>Forward</i>	CTGCCGGCCAGATTCATCAT
		<i>Reverse</i>	CAAAGAGGGTGAGTACGCCA
<i>Acid ceramidase</i>	<i>Asah1</i>	<i>Forward</i>	CAAAAGGCACCAGCGTTGAG
		<i>Reverse</i>	TCCAAAAGGGTCAGGAAGGC
<i>Ceramide glucosyltransferase</i>	<i>GlcT</i>	<i>Forward</i>	ACCGAGGTTGGAGGTTTTCA
		<i>Reverse</i>	TTTGGTCCACCTGATCATTCTG
<i>Sphingomyelinase</i>	<i>Smpd1</i>	<i>Forward</i>	CATAGCCAGGTATGAAAACAC
		<i>Reverse</i>	CAGAGTTTCCTCATCATAGAAG
<i>Acidic ribosomal phosphoprotein P0</i>	<i>36B4</i>	<i>Forward</i>	CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
		<i>Reverse</i>	GGTGCCTCTGGAGATTTTCG

4. RESULTADOS

4.1. Adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} y adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* presentan un bajo número de caveolas.

En estudios previos de nuestro laboratorio, encontramos que los adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-} recién nacidos presentan un número menor de caveolas en la membrana plasmática (MP) en comparación a adipocitos *Agpat2*^{+/+} [3]. A raíz de esta observación, en esta tesis evaluamos si este fenómeno se replica en el tejido adiposo pardo interescapular, dado que este depósito adiposo también se pierde durante la primera semana de vida en los ratones *Agpat2*^{-/-}. En la Figura 8 mostramos imágenes representativas del análisis de microscopía electrónica de tejido adiposo pardo interescapular de ratones recién nacidos (P0.5) (Figura 8A) y de dos días de vida postnatal (P2.5) (Figura 8B). Como podemos observar, la MP de los adipocitos pardos de ratones *Agpat2*^{+/+} (*wild type*) presenta abundantes invaginaciones correspondientes a caveolas, con 3,5 caveolas/ μm de MP a P0.5, y 2,2 caveolas/ μm de MP a P2.5 (Figura 8). Por el contrario, adipocitos de tejido adiposo pardo de ratones *Agpat2*^{-/-} poseen solo 0,4 caveolas/ μm de MP a P0.5 y 0,6 caveolas/ μm de MP a P2.5. Por tanto, los adipocitos pardos de ratones *Agpat2*^{-/-} recién nacidos (P0.5) presentan 8,8 veces menos caveolas en su MP que los adipocitos *wild type*. Para el caso del tejido adiposo a edad P2.5, esta cantidad es 3,7 veces menor.

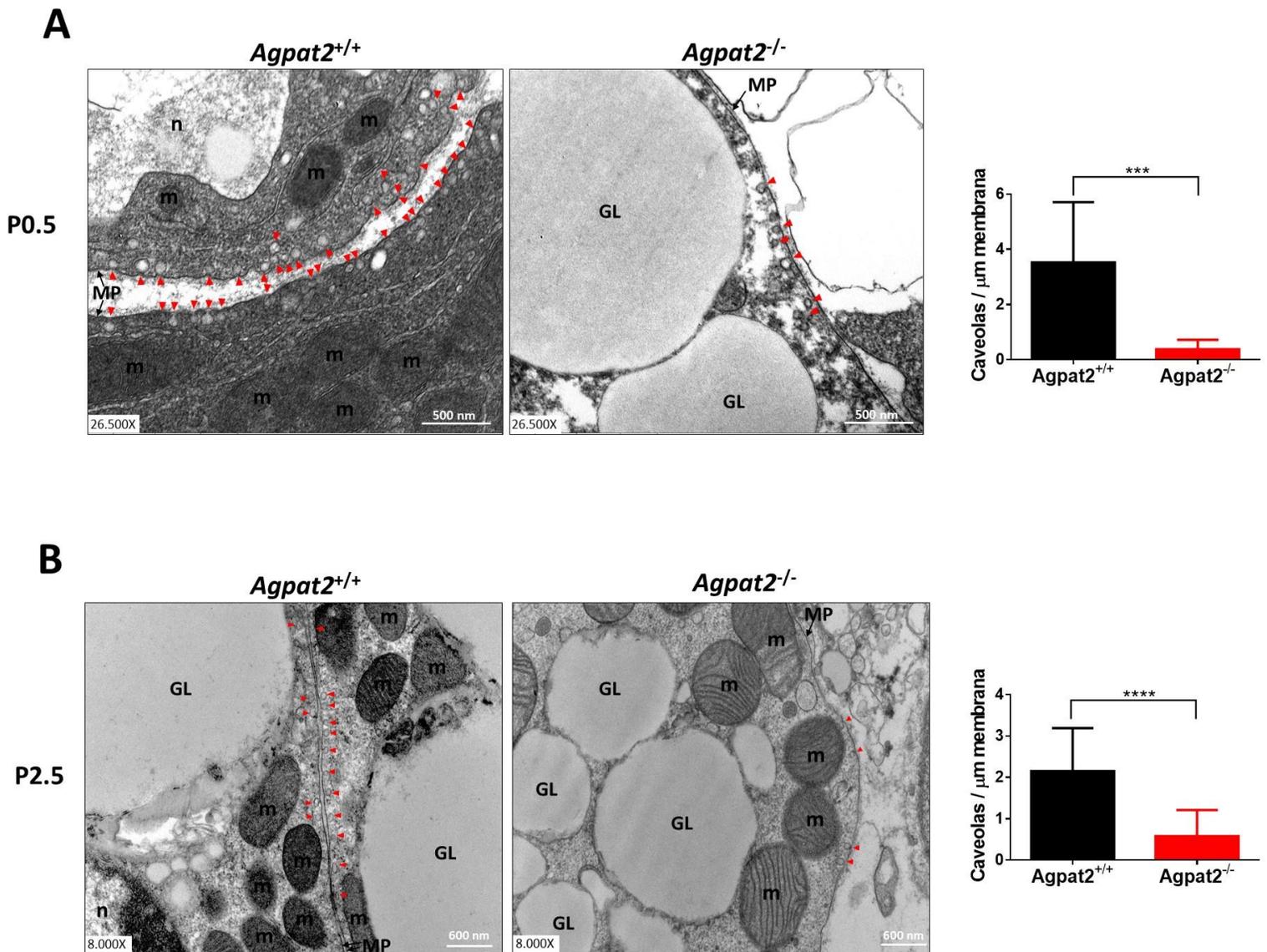


Figura 8: Microscopía electrónica de transmisión en tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}. A) Imágenes representativas de tejido adiposo pardo interescapular a edad P0.5 y cuantificación del número de caveolas expresado como número de caveolas por μm de membrana ($n = 1$ por genotipo, se cuantificaron entre 10-16 células). B) Imágenes representativas de tejido adiposo pardo interescapular a edad P2.5 y cuantificación del número de caveolas expresado como número de caveolas por μm de membrana ($n = 2$ para *Agpat2*^{+/+}, $n = 3$ para *Agpat2*^{-/-}, se cuantificaron entre 10-15 células). Los resultados de las cuantificaciones se expresan como promedio \pm DE. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indican diferencias significativas entre los diferentes grupos. Los valores de p fueron calculados mediante t de student no pareado. Las caveolas se indican con una punta de flecha roja. Barra de escala para P0.5: 500 nm y para P2.5: 600 nm. GL: gota lipídica; MP: membrana plasmática; m: mitocondria; n: núcleo.

Similarmente, en estudios previos hemos descrito que MEFs *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* hacia adipocitos presentan un número significativamente menor de caveolas en comparación a MEFs *wild type* [3]. En esta tesis evaluamos si este fenómeno se observa también en preadipocitos obtenidos de la fracción estromal del tejido adiposo interescapular de ratones y que son diferenciados adipogénicamente *in vitro* (Figura 6 en sección Métodos). Como podemos observar en la Figura 9, adipocitos *Agpat2*^{-/-} en el día 7 de diferenciación presentan un número significativamente menor en la cantidad de caveolas (0,1 caveolas/ μ m de MP) en comparación con adipocitos *wild type* (3,3 caveolas/ μ m de MP). Es decir, en el caso de adipocitos diferenciados *in vitro*, la delección de *Agpat2* produce un número de caveolas 33 veces menor que en adipocitos *wild type*.

Para evaluar si la deficiencia en el número de caveolas ocurre en otros tipos celulares en el ratón *Agpat2*^{-/-}, analizamos la presencia de caveolas en células endoteliales del tejido adiposo pardo interescapular. Las células endoteliales normalmente presentan una gran abundancia de caveolas en su membrana al igual que los adipocitos. Como se observa en la Figura 10, células endoteliales provenientes de ratones *Agpat2*^{+/+} y *Agpat2*^{-/-} no presentan diferencias en el número de caveolas en su membrana (4,9 caveolas/ μ m de MP en células *Agpat2*^{+/+} y 5,9 caveolas/ μ m de MP en células *Agpat2*^{-/-}), sugiriendo que la deficiencia de AGPTA2 no induce menor abundancia de caveolas en la membrana plasmática de células endoteliales.

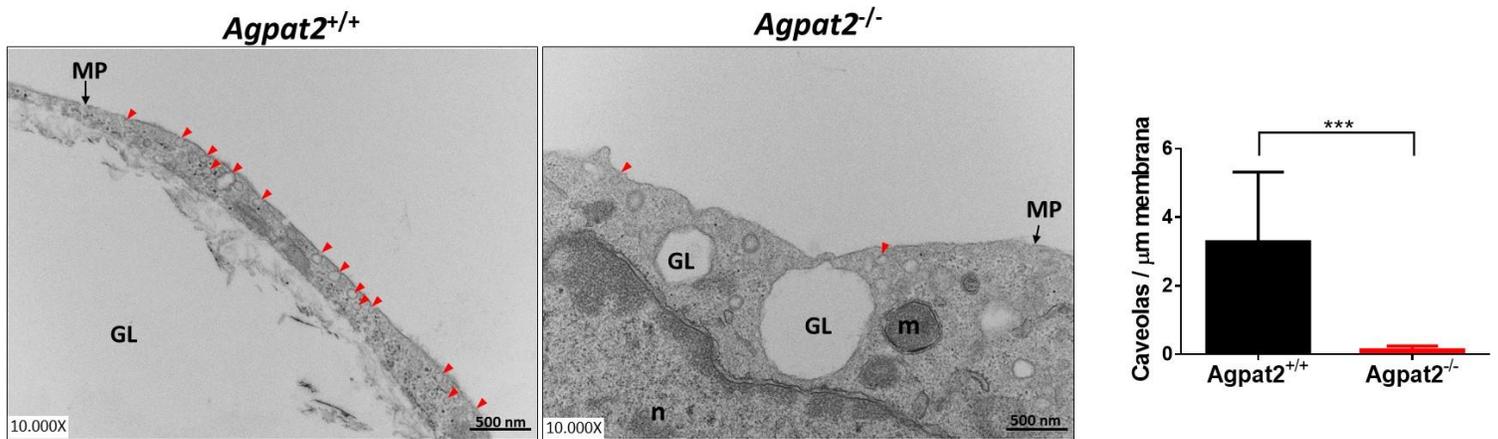


Figura 9: Microscopía electrónica de transmisión de preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro*. Imágenes representativas de adipocitos *Agpat2*^{+/+} (*wild type*) y *Agpat2*^{-/-} en el día 7 de diferenciación y cuantificación del número de caveolas expresado como número de caveolas por μm de membrana (n = 2 por genotipo, se cuantificaron entre 5-9 células). Los resultados de la cuantificación se expresan como promedio ± DE. *** p<0,001 indica diferencias significativas entre los diferentes grupos. Los valores de p fueron calculados mediante t de student no pareado. Las caveolas se indican con una punta de flecha roja. Barra de escala: 500 nm. GL: gota lipídica; MP: membrana plasmática; m: mitocondria; n: núcleo.

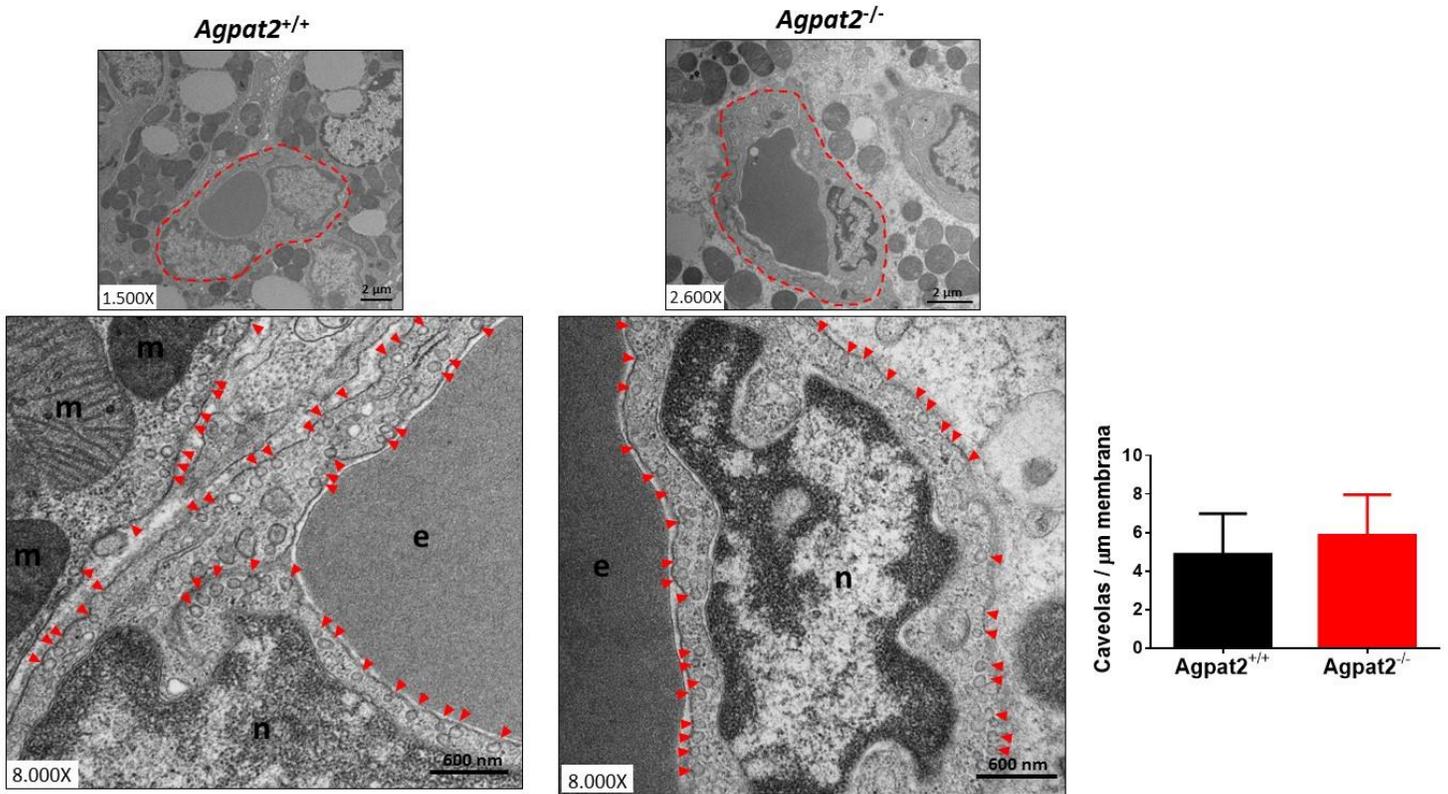


Figura 10: Microscopía electrónica de transmisión en células endoteliales del tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}. Imágenes representativas de células endoteliales del tejido adiposo pardo interescapular de ratones de edad P2.5. En las imágenes superiores se muestra la célula endotelial completa encerrada con una línea punteada roja. En las imágenes inferiores se muestra un zoom de la célula endotelial. El gráfico corresponde a la cuantificación del número de caveolas expresado como número de caveolas por μm de membrana (n = 1 por genotipo, se cuantificaron entre 5-6 células). Los resultados de las cuantificaciones se expresan como promedio ± DE. Los valores de p fueron calculados mediante t de student no pareado. Las caveolas se indican con una punta de flecha roja. Barra de escala: 600 nm. m: mitocondria; n: núcleo; e: eritrocito.

4.2. Los niveles basales de activación de la vía de señalización de insulina son equivalentes entre adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *wild type* diferenciados *in vitro*.

Se ha propuesto que una de las funciones de la caveola en adipocitos es la regulación de vías de señalización involucradas en diferentes funciones del adipocito, como por ejemplo la vía de insulina, cuya actividad es esencial para la adipogénesis [82]. Debido a que preadipocitos diferenciados *Agpat2*^{-/-} presentan un número reducido de caveolas y una adipogénesis deteriorada, evaluamos la activación de la vía de señalización inducida por la insulina. Como se indicó, el receptor de insulina (RI) se encuentra localizado en caveolas, y su activación por la unión de insulina determina que un segmento intracelular se autofosforile en residuos de tirosina, induciendo así la actividad quinasa del receptor. Una vez que ocurre esto, se activan dos vías de señalización: 1) la involucrada en los efectos metabólicos y adipogénicos de la insulina, a través de la unión de IRS-1 y IRS-2 (*insulin receptor substrate 1 y 2*) al RI y subsecuente reclutamiento y activación de PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), que determina fosforilación y activación de blancos río abajo tales como las proteínas Akt, mTOR, GSK3 β y p70s6K ; y 2) la responsable de los efectos mitogénicos y de supervivencia celular, iniciada por la unión y activación de Grb2/Sos y Ras, que determina la fosforilación y activación de las MAP quinasas Erk1 y Erk2 [110].

Como se muestra en la Figura 11, no encontramos diferencias en la abundancia del RI (subunidad β), Akt y Erk1/2, como tampoco en los niveles de fosforilación de Akt en serina 473 y de Erk en treonina 202 y tirosina 204 entre adipocitos de ambos genotipos, en ninguno de los días de diferenciación evaluados (día 0, 2, 3, 5, 7 y 10), sugiriendo que la menor abundancia de caveolas entre adipocitos *Agpat2*^{-/-} no determina defectos funcionales en la activación basal de la señalización dependiente del RI.

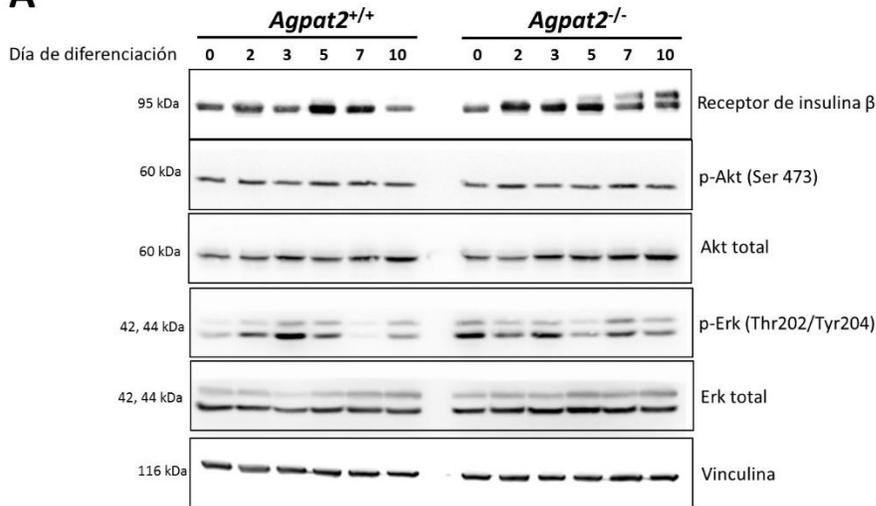
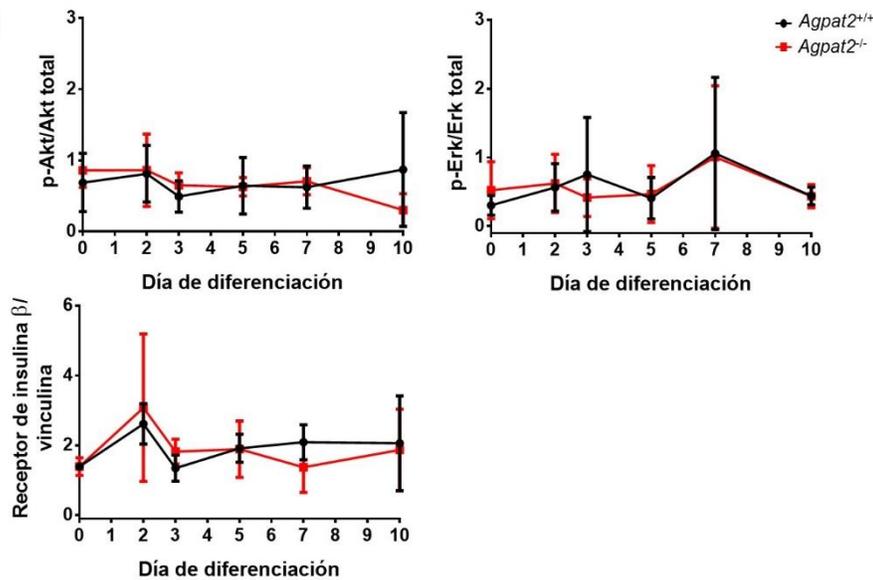
A**B**

Figura 11: Activación basal de la vía de señalización inducida por insulina en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. A) *Western blot* representativo de proteínas involucradas en la vía de señalización de insulina en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a día 0, 2, 3, 5, 7 y 10 post-diferenciación adipogénica. A estos tiempos las células fueron homogenizadas y lisadas, y 25 μ g de extracto proteico total fueron separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de PVDF, y luego incubadas con los anticuerpos específicos para el receptor de insulina y para las formas fosforiladas y totales de proteínas activadas por acción de la insulina. B) Cuantificación de las proteínas involucradas en la vía de señalización de insulina. Cada valor corresponde al promedio \pm DE de preadipocitos provenientes de 4 ratones independientes por genotipo (n = 4).

4.3. La localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos *Agpat2*^{-/-} está alterada, pero sus niveles no cambian.

Las proteínas caveolina-1 y cavina-1 son esenciales para la formación de caveolas. Dado el menor contenido de caveolas en la MP de adipocitos *Agpat2*^{-/-}, decidimos evaluar los niveles de estas proteínas en preadipocitos diferenciados adipogénicamente *in vitro*. Como se observa en la Figura 12, la abundancia de ambas proteínas no se modifica en función de los distintos tiempos de diferenciación y es equivalente entre adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}.

No obstante lo anterior, es posible que aun cuando la masa total de caveolina-1 y cavina-1 no sea diferente entre adipocitos *wild type* y *Agpat2*^{-/-}, defectos en la distribución subcelular de estas proteínas resulten en menor contenido de caveolas en los adipocitos de ratones *Agpat2*^{-/-} [53].

Concordantemente con esta hipótesis, nuestros análisis de inmunofluorescencia confocal mostraron que la localización subcelular de ambas proteínas en el día 0 de diferenciación no es distinta entre preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *wild type*, presentando una distribución tanto periférica como intracelular (Figura 13). Por el contrario, en los días 5 y 10 post diferenciación, caveolina-1 y cavina-1 fueron detectadas en la periferia celular de los adipocitos *wild type*, mientras que en adipocitos *Agpat2*^{-/-} ambas proteínas presentaron una distribución anómala, con aparición de abundantes agregados intracelulares, sugiriendo que la ausencia de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} podría ser causada por una localización anormal de caveolina-1 y/o cavina-1 (Figura 13).

Adicionalmente, analizamos la localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-} y *wild type* recién nacidos (Figura 14). Encontramos que ambas proteínas son detectadas con una señal celular periférica bien definida en las células de ratones *wild type*, mientras que adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} esta marca periférica que poseen es difusa y heterogénea en intensidad. Sin embargo, la

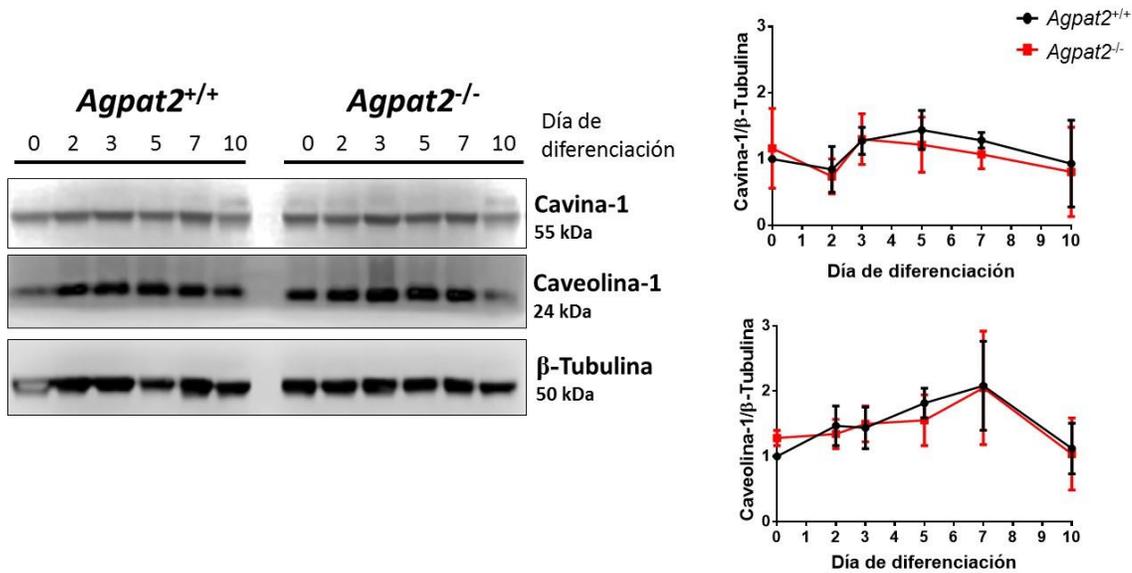


Figura 12: Niveles de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. Western blot representativo en los días 0, 2, 3, 5, 7 y 10 post-diferenciación adipogénica. A estos tiempos las células fueron homogenizadas y lisadas, y 25 μ g de extracto proteico total fueron separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de PVDF, y luego incubadas con los anticuerpos específicos para las proteínas caveolina-1, cavina-1 y β -tubulina (control de carga). Se muestra la cuantificación de los niveles de caveolina-1 y cavina-1. Cada valor corresponde al promedio \pm DE de preadipocitos provenientes de 3 ratones independientes por genotipo (n = 3).

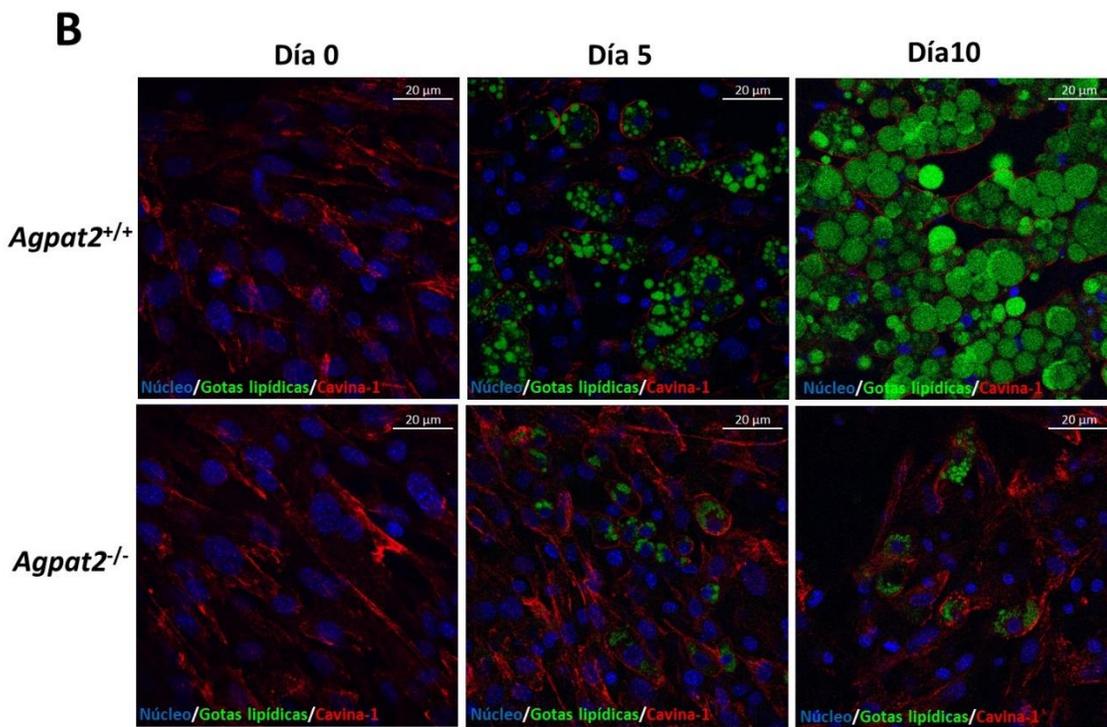
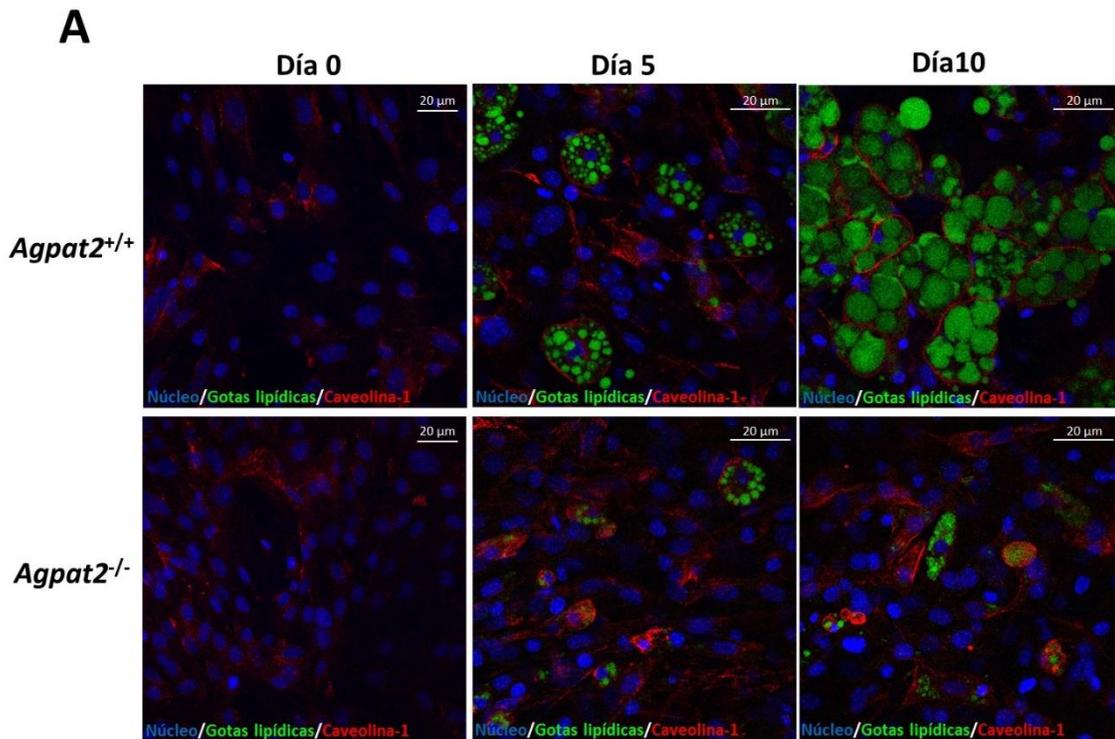


Figura 13: Localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} en los días 0, 5 y 10 post diferenciación adipogénica. En azul se observa tinción de núcleos mediante Hoechst, en verde tinción de gotas lipídicas mediante la sonda BODIPY, y en rojo las proteínas caveolina-1 (A) o cavina-1 (B) mediante anticuerpos específicos para estas proteínas. n = 4 por grupo. Barra de escala: 20 μm.

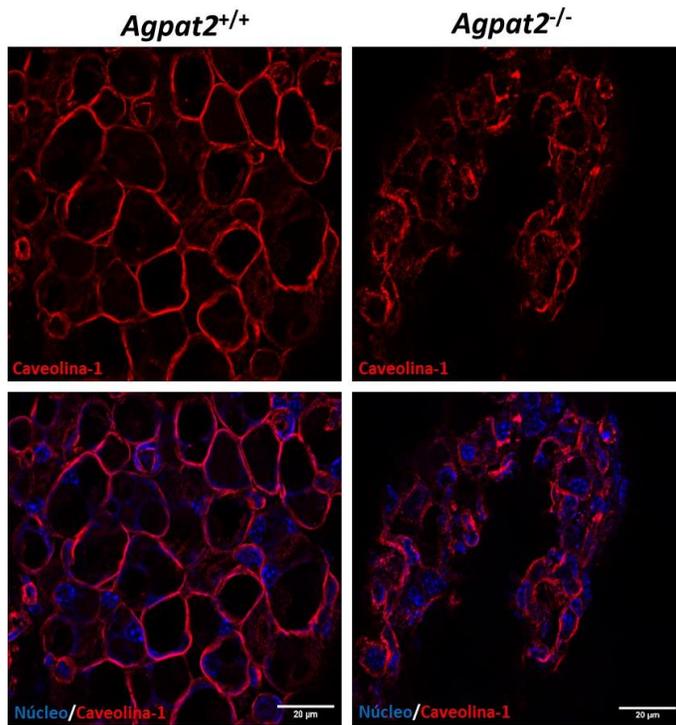
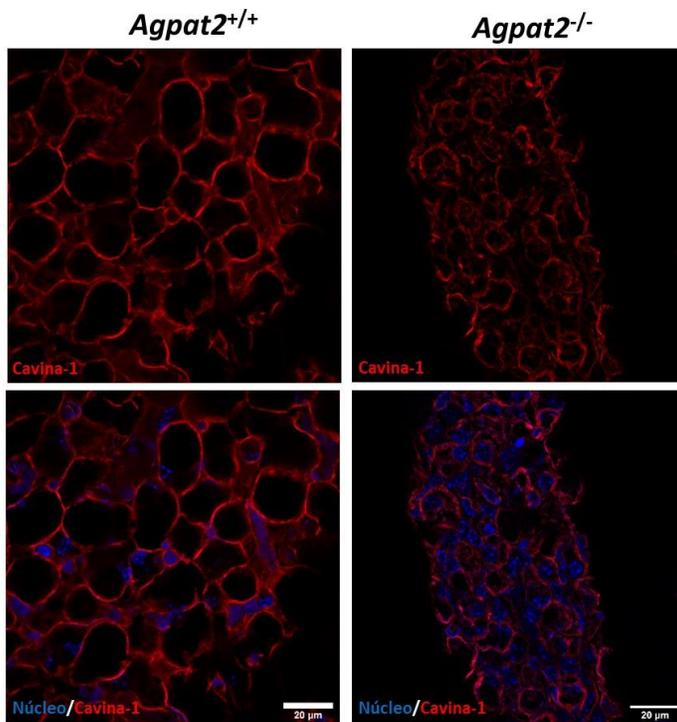
A**B**

Figura 14: Localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} de edad postnatal P0.5. Imágenes representativas de microscopía confocal de tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} recién nacidos. En azul se observa tinción de núcleos mediante Hoechst y en rojo las proteínas caveolina-1 (A) o cavina-1 (B) mediante anticuerpos específicos para estas proteínas. n = 1 por grupo. Barra de escala: 20 μm.

resolución de la microscopía confocal no permite distinguir si esta marca es efectivamente de membrana plasmática o, por el contrario, intracelular, debido a que en adipocitos presentes en el tejido adiposo la mayor parte del volumen celular lo ocupa la gota lipídica, dejando un margen de citoplasma indetectable en este tipo de imágenes.

4.4. Análisis lipídico en homogenizado total de adipocitos *wild type* y *Agpat2*^{-/-} diferenciados adipogénicamente *in vitro*.

4.4.1. Adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan acúmulos intracelulares de colesterol y mayores niveles de 7-dehidrodesmosterol.

El colesterol es relativamente abundante en la MP y es necesario para la formación de caveolas [59]. En adipocitos de rata, la concentración de colesterol en caveolas es de 1.036 ± 55 nmol/mg de proteína, mientras que en el resto de la MP es de 371 ± 17 nmol/mg de proteína [58]. Más aun, la reducción experimental del colesterol en la MP al 50% resulta en desensamblaje de estos microdominios [59]. Por lo tanto, en esta tesis estudiamos los niveles de colesterol en adipocitos *Agpat2*^{-/-} por medio de técnicas complementarias. Para visualizar la abundancia general del colesterol celular y sus posibles variaciones subcelulares entre adipocitos de ambos genotipos, utilizamos una sonda molecular basada en la proteína de fusión PFO-GST (descrita en Materiales y Métodos) que permite la visualización de depósitos de colesterol libre, tanto en preparaciones histológicas como en cultivos celulares. Para cuantificar el colesterol total utilizamos un ensayo enzimático basado en la detección de productos fluorescentes (ver Materiales y Métodos).

Como se puede observar en la Figura 15A, adipocitos *Agpat2*^{-/-} en día 10 de diferenciación presentan numerosos acúmulos intracelulares de colesterol, los cuales no se visualizan en adipocitos *Agpat2*^{+/+} al mismo día de diferenciación. Estas diferencias entre genotipos no son detectadas en días más tempranos de diferenciación (0, 3, 5 y 7 post inducción adipogénica).

Luego de obtener este resultado, surgió la interrogante de en qué compartimento subcelular se encuentran los acúmulos de colesterol en adipocitos *Agpat2*^{-/-}. Para comenzar a contestar esta pregunta, realizamos estudios de colocalización entre la sonda PFO-GST y un

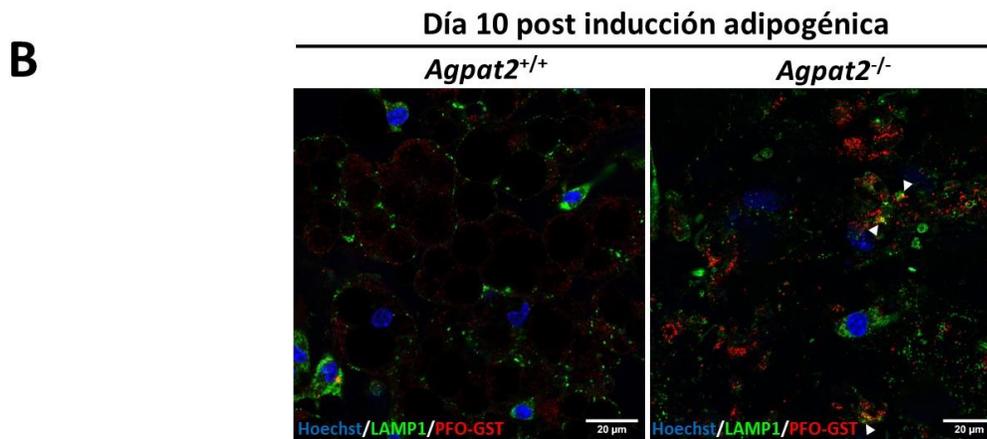
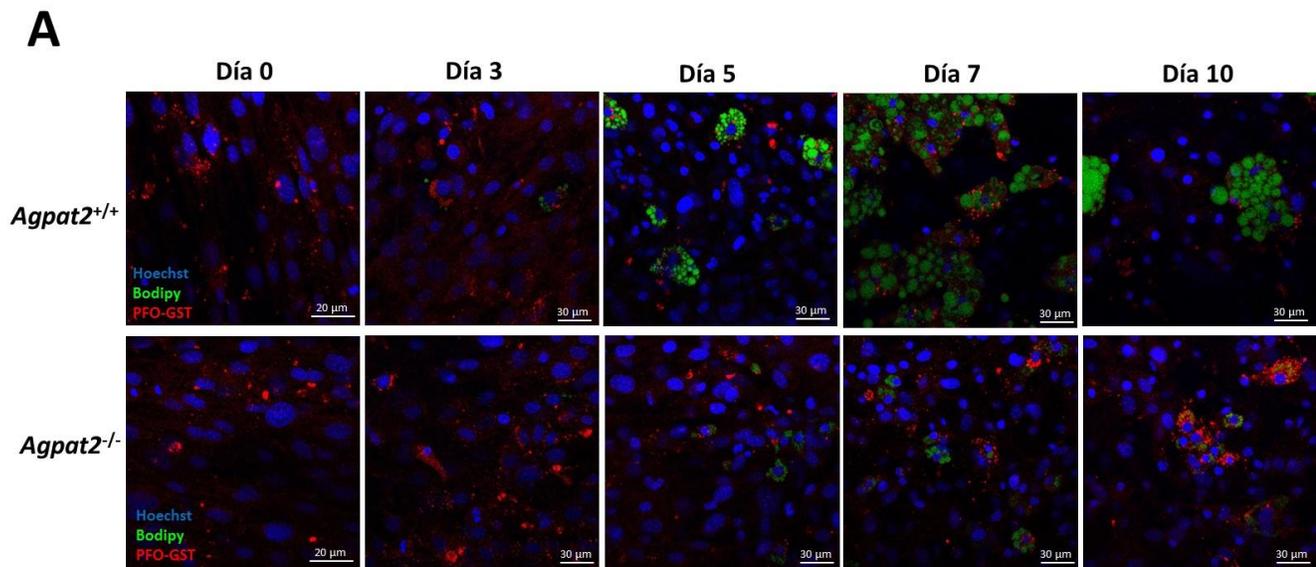


Figura 15: Tinción de colesterol libre en preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro*. Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} en los días 0, 3, 5, 7 y 10 post diferenciación adipogénica. A) En azul se observa tinción de núcleos mediante Hoechst, en verde tinción de gotas lipídicas mediante la sonda BODIPY, y en rojo colesterol libre con la sonda PFO-GST. n=4 por grupo. Barra de escala: 20-30 μm. B) En azul se observa tinción de núcleos mediante Hoechst, en verde tinción de lisosomas mediante anticuerpo que se une a la proteína LAMP1 y en rojo colesterol libre con la sonda PFO-GST. n=2 por grupo. Barra de escala: 20 μm. La punta de flecha blanca indica zonas de colocalización entre el marcador de lisosoma y colesterol.

marcador de lisosoma. Elegimos investigar el lisosoma porque existen enfermedades en las que hay presencia de acúmulos de colesterol, como por ejemplo en la enfermedad de Niemann Pick Tipo C, y estos acúmulos se encuentran en el lisosoma, los cuales inducen muerte celular. Como se puede apreciar en la figura 15B, observamos una baja colocalización entre el marcador de lisosoma y la sonda para colesterol, y la mayoría de los acúmulos de colesterol presentes en los adipocitos *Agpat2*^{-/-} no colocalizan con la marca para lisosomas. Este resultado indica que la mayor parte de los acúmulos de colesterol encontrados en adipocitos *Agpat2*^{-/-} están localizados en organelos diferentes al lisosoma.

Interesantemente, la cuantificación del colesterol total medida por métodos enzimáticos (Figura 16), no muestra diferencias en la concentración de colesterol total entre adipocitos *wild type* y *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* en los días 0, 5 y 10 post diferenciación, sugiriendo que la formación de los acúmulos intracelulares de colesterol no son el resultado de una mayor acumulación de este lípido, sino que más bien de una distribución y/o tráfico intracelular anormal. De manera relevante, el colesterol libre corresponde al 90-95% del colesterol total del adipocito [111]. En concordancia con estas estimaciones, nuestros ensayos enzimáticos no permitieron distinguir diferencias en la masa absoluta de colesterol total y de colesterol libre en adipocitos diferenciados en cultivo.

También realizamos una comparación de los niveles de colesterol durante el transcurso de la diferenciación adipogénica en ambos genotipos. Con este análisis, observamos que en ambos genotipos hay un aumento en la concentración de colesterol en el día 10 de diferenciación en comparación con los días 0 y 5, pero éste solo alcanza la significancia estadística en los adipocitos *Agpat2*^{-/-} (5,2 µg/mg de proteína en el día 10 v/s 4,0 µg/mg de proteína en el día 0).

Además de colesterol, las células mamíferas poseen esteroides derivados de la vía del mevalonato, que corresponden tanto a precursores del colesterol como a metabolitos derivados de él. Adicionalmente, existen esteroides vegetales derivados de la dieta como parte integral del

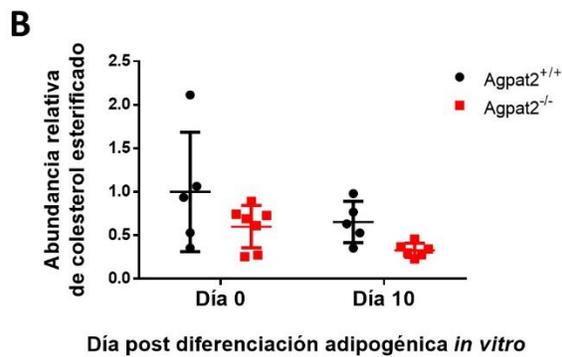
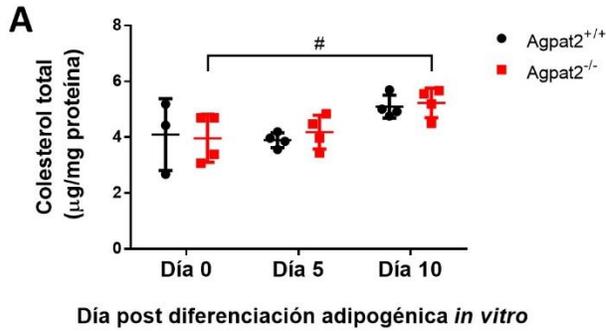


Figura 16: Cuantificación del colesterol total y colesterol esterificado en preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro*. A) Niveles de colesterol total medido por método enzimático en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} en los días 0, 5, y 10 post diferenciación adipogénica. Cada valor corresponde a un cultivo de preadipocitos de animales independientes (n = 3-4 por grupo). B) Niveles de colesterol esterificado medido por espectrometría de masas en preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} en los días 0 y 10 post diferenciación adipogénica. Los niveles de colesterol esterificado fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra, y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} en el día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde a un cultivo de preadipocitos de animales independientes (n = 5-7 por grupo). # p < 0,05 significa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

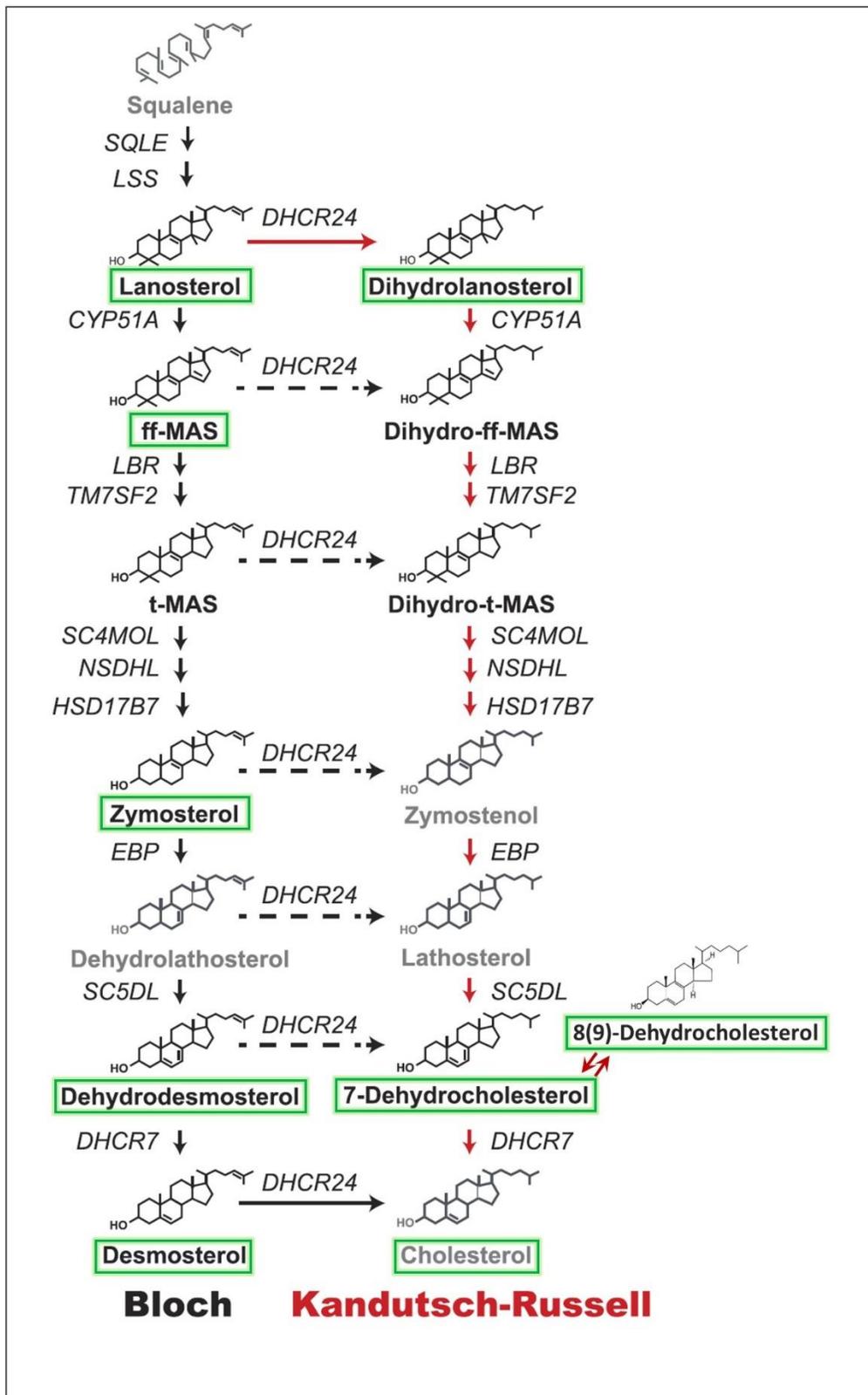
pool de esteroides celulares totales. Relevantemente, algunos de estos compuestos tienen roles en la composición y dinámica de las distintas membranas celulares [56] y en la regulación de la homeostasis del colesterol celular, por medio de la degradación de la enzima Hmg-CoA reductasa y el procesamiento del factor de transcripción SREBP2 [112].

En esta tesis determinamos la abundancia de diversos esteroides mediante HPLC asociada a espectrometría de masas en adipocitos diferenciados *in vitro*, en los días 0 y 10 post inducción adipogénica. En la Figura 17A se muestra un diagrama de la vía del mevalonato, con los intermediarios cuantificados en este trabajo: 7-dehidrocolesterol, 8(9)-dehidrocolesterol, 7-dehidrodesmosterol, desmosterol, zimosterol, FFMAS, lanosterol y 24,25-dehidrolanosterol. Adicionalmente, cuantificamos los niveles de dos metabolitos derivados del colesterol (colestanol y colesteno(Δ^4)) y de fitoesteroides provenientes de la dieta (sitosterol, estigmasterol, estigmastanol) (Figura 17B).

No encontramos diferencias significativas en ninguno de los esteroides evaluados entre genotipos en el día 0 de diferenciación. Por el contrario, en el día 10 de diferenciación, los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan 1,8 veces mayores niveles de 7-dehidrodesmosterol en comparación a adipocitos *Agpat2*^{+/+}, sin diferencias significativas en los otros esteroides cuantificados (Figura 18).

Con respecto a los cambios de los esteroides en el transcurso de la diferenciación adipogénica, observamos que en adipocitos *wild type* el 24,25-dihidrolanosterol disminuye 2,3 veces en el día 10 de diferenciación con respecto al día 0, alcanzando significancia estadística, mientras que en adipocitos *Agpat2*^{-/-} hay una disminución de 1,5 veces, pero que no es estadísticamente significativa.

A



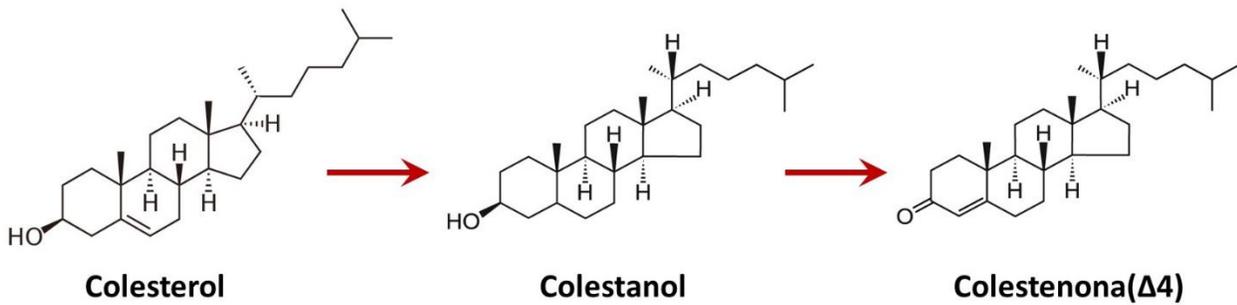
B**Derivados del colesterol****Fitoesteroles**

Figura 17: Estructura de los esteroides analizados en preadipocitos *Agpat2^{-/-}* y *Agpat2^{+/+}* sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro*. A) Representación esquemática de las vías Bloch y Kandutsch–Russell para la conversión enzimática del escualeno a colesterol, con la estructura química y nombre de cada uno de los intermediarios. La vía Bloch, indicada por flechas negras sólidas, se muestra a la izquierda. La vía Kandutsch–Russell, indicada por flechas rojas, se muestra a la derecha. Además, se muestran sitios potenciales de entrecruzamiento de ambas vías, indicadas con flechas entrecortadas. Dentro de recuadros verdes se indican los esteroides medidos en esta tesis. Figura adaptada de [113]. B) Estructura química de los derivados del colesterol colestanol y colesteno(Δ4) y de fitoesteroides analizados en las muestras.

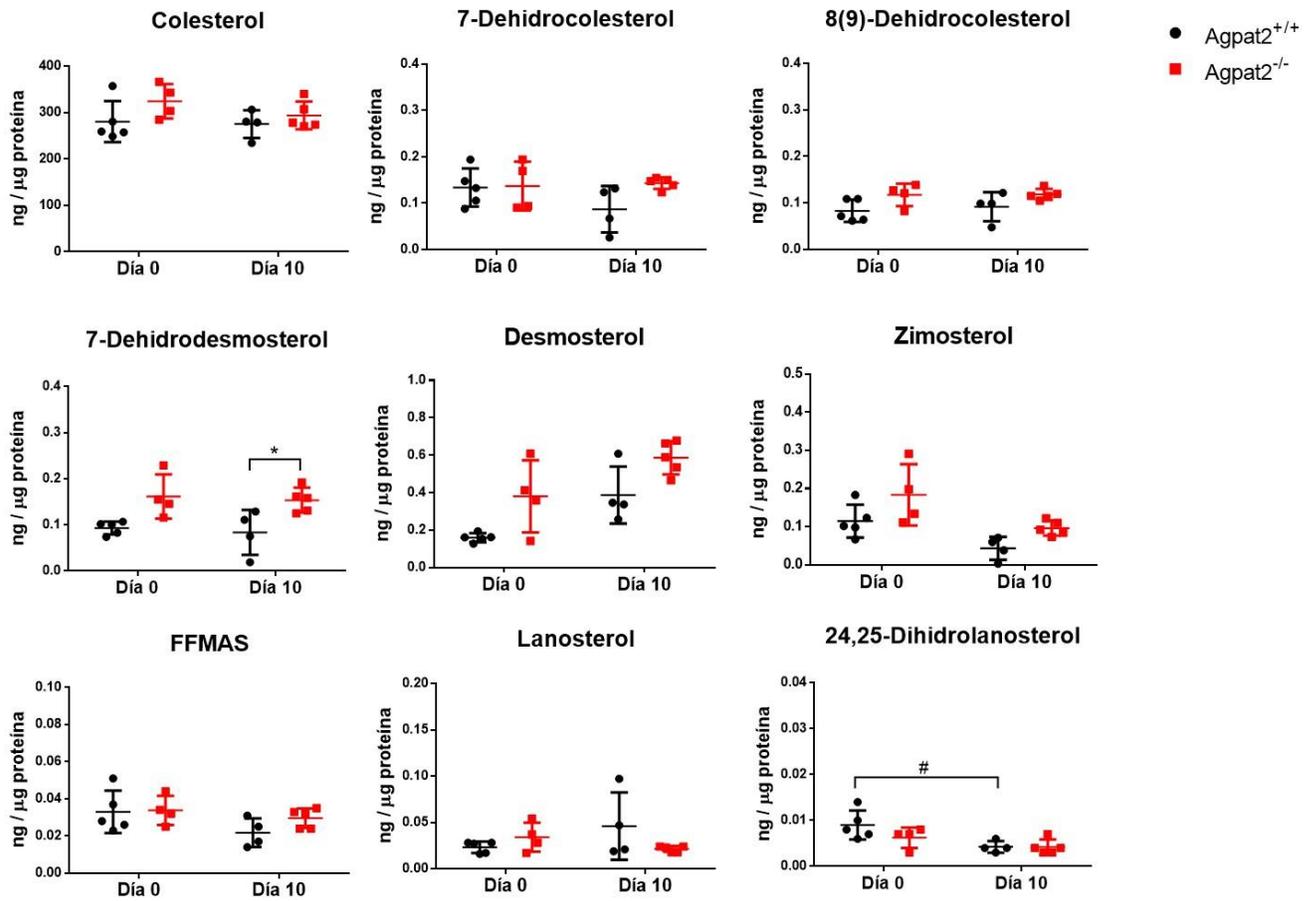
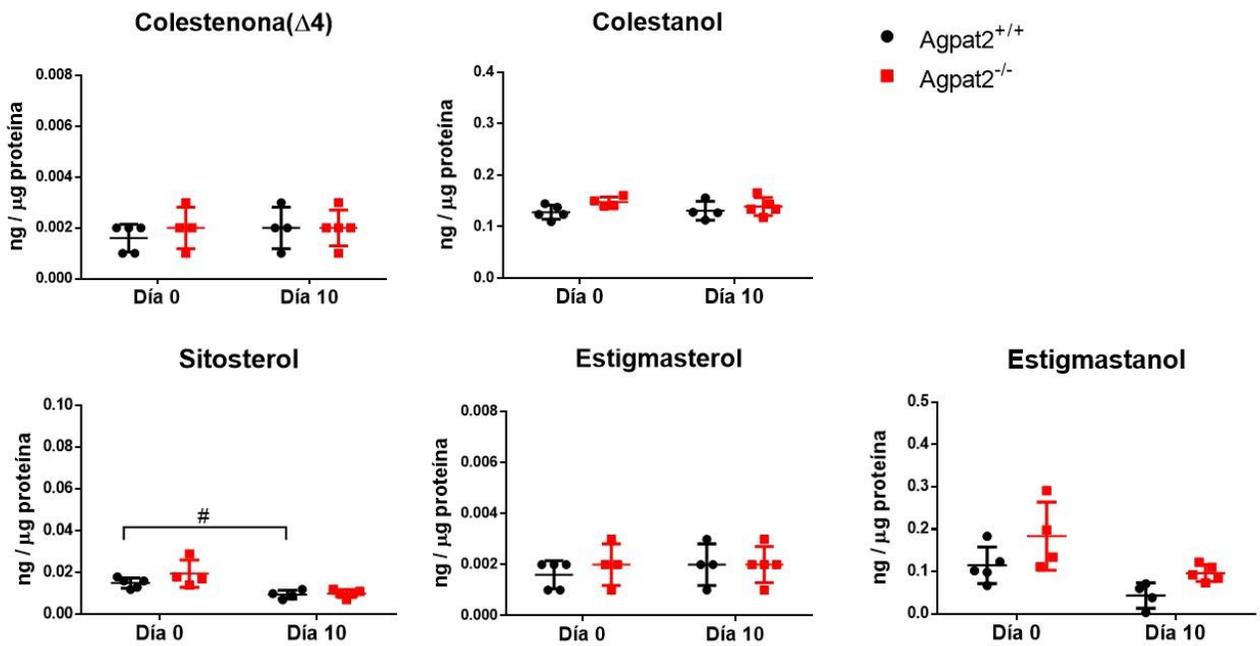
A**B**

Figura 18: Niveles de esteroides en preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} sometidos a diferenciación adipogénica *in vitro*. Análisis de espectrometría de masas de esteroides en homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} en los días 0 y 10 post diferenciación adipogénica. A) Niveles de colesterol e intermediarios de la vía del mevalonato. B) Niveles de metabolitos derivados del colesterol y fitoesteroides. Cada valor indica preadipocitos provenientes de animales independientes (n = 4-5 por grupo). El eje X de los gráficos corresponde al día post inducción adipogénica. * p < 0,05 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05 indica diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

FFMAS: *Follicular fluid meiosis-activating sterol*.

4.4.2. Adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan mayores niveles celulares totales de esfingomielina y menores de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina.

Los resultados mostrados hasta aquí sugieren que, si bien existirían alteraciones en la distribución subcelular de colesterol y caveolina-1 y cavina-1 en los adipocitos *Agpat2*^{-/-}, estos ocurren en días tardíos de la diferenciación adipogénica, y por tanto, no correlacionan con la menor capacidad adipogénica de estas células ni son compatibles como potenciales determinantes de la menor abundancia de caveolas. Es por esto que decidimos cuantificar la composición de lípidos neutros, fosfolípidos y esfingolípidos en homogenizados totales de adipocitos diferenciados en cultivo.

En el día 0 de diferenciación, no encontramos cambios significativos entre genotipos en los niveles totales de triglicéridos ni de diacilglicerol (Figura 19A); sin embargo, en el día 10 de diferenciación, que corresponde a un estado de adipocito maduro, los adipocitos *wild type* presentan 44 veces más contenido de triglicéridos que adipocitos *Agpat2*^{-/-}, siendo esta diferencia explicada por mayores niveles de ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1) y ácido esteárico (18:0) (Figura 19B). Además, los adipocitos *wild type* presentan 110 veces más contenido de diacilglicerol, explicada por mayor contenido de ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), y ácido palmitoleico (16:1).

Aunque tampoco encontramos diferencias entre genotipos en los niveles totales de las diferentes especies de esfingolípidos evaluados en el día 0 de diferenciación, en el día 10 de diferenciación los adipocitos *Agpat2*^{-/-} poseen un 60% más de niveles totales de esfingomielina en comparación a adipocitos *wild type* (Figura 20A). El análisis de las distintas especies de esfingomielina mostró que los adipocitos *Agpat2*^{-/-} en el día 10 de diferenciación poseen niveles

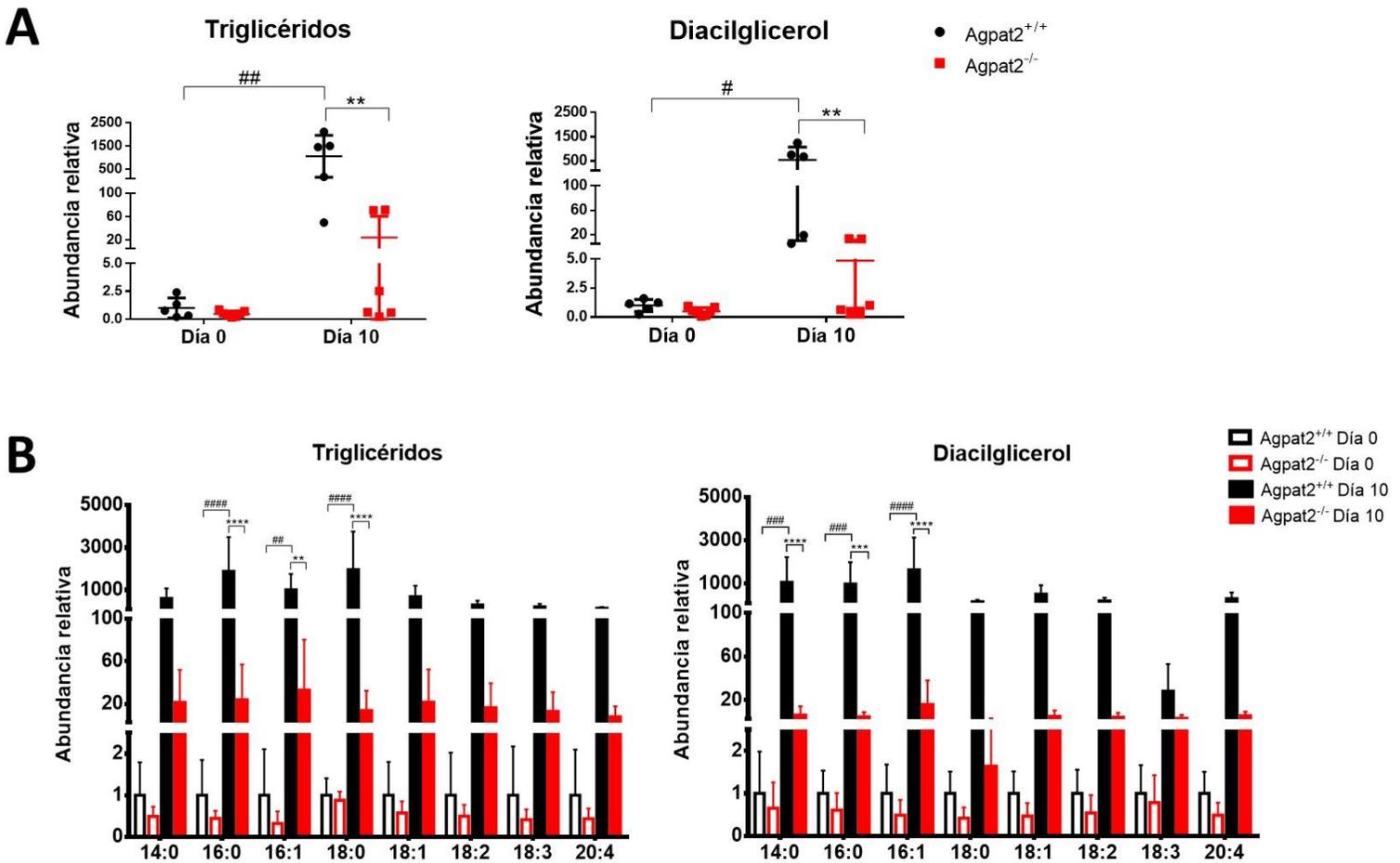


Figura 19: Niveles de triglicéridos y diacilglicerol en homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. A) Niveles de triglicéridos y diacilglicerol totales de homogenizado de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada lípido fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra, y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} a día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde a preadipocitos provenientes de animales independientes (n = 5-7). El eje X de los gráficos corresponde al día post inducción adipogénica. B) Composición de ácidos grasos de triglicéridos y diacilglicerol de homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* a día 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada especie fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra y expresados como veces de cambio respecto a su correspondiente especie en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} en el día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde al promedio ± DE de cultivos de preadipocitos de animales independientes (n = 5-7) * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

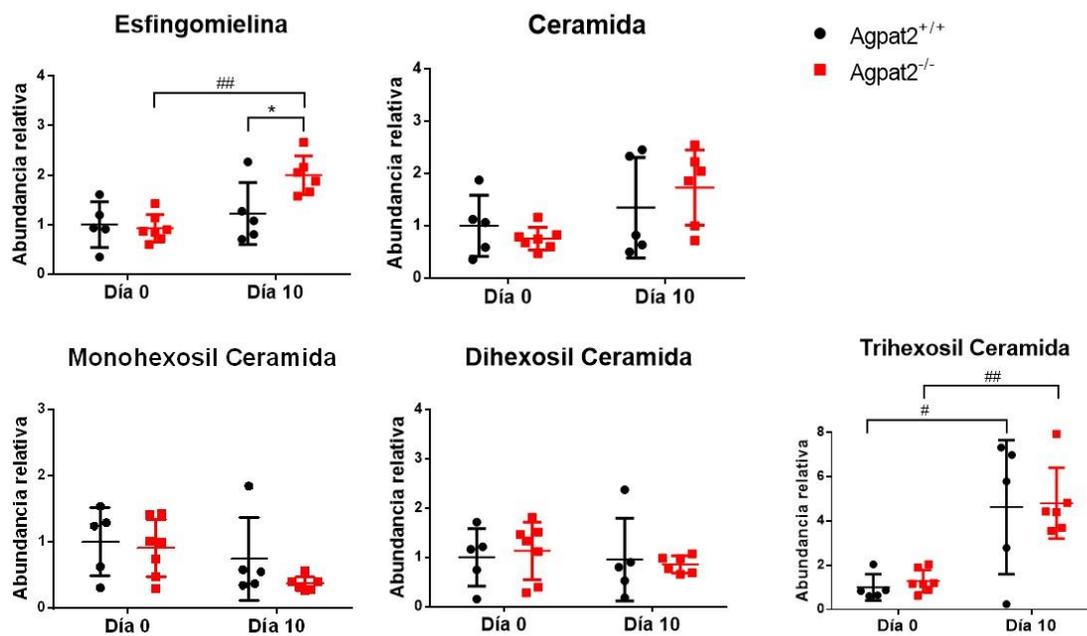
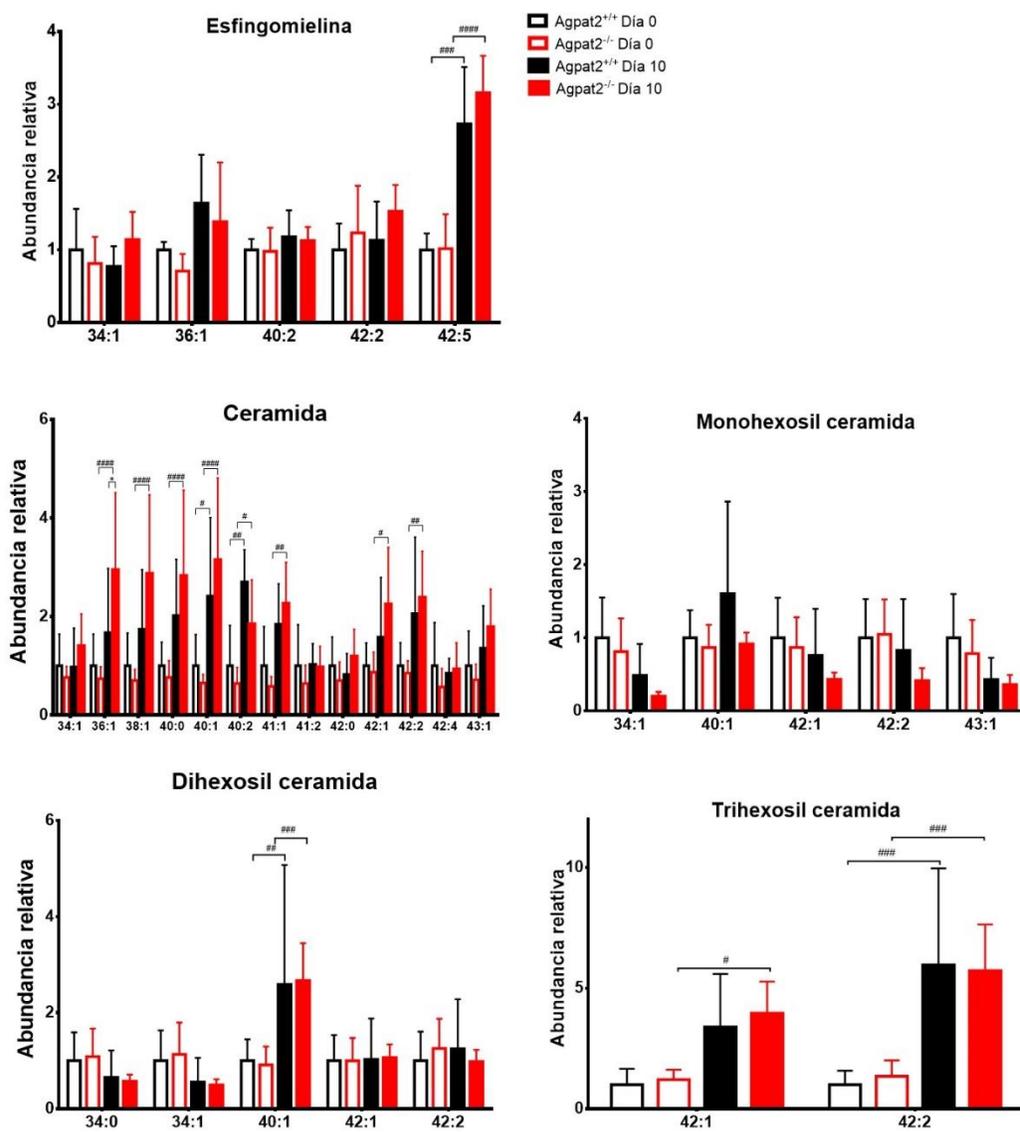
A**B**

Figura 20: Niveles de esfingolípidos en homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. A) Niveles de esfingolípidos totales de homogenizado de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada esfingolípidos fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra, y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} en el día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde a preadipocitos provenientes de animales independientes (n = 5-7). El eje X de los gráficos corresponde al día post inducción adipogénica. B) Niveles de especies de esfingolípidos de homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada especie fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra y expresados como veces de cambio respecto a su correspondiente especie en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} a día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde al promedio ± DE de cultivos de preadipocitos de animales independientes (n = 5-7) * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

significativamente mayores de esfingomielina con 38 átomos de carbono. Interesantemente, esta especie no fue detectada en ninguno de los otros grupos estudiados.

El análisis de los niveles de esfingolípidos con el transcurso de la diferenciación adipogénica mostró que los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan un aumento significativo de 2,2 veces en los niveles de esfingomielina en el día 10 de diferenciación con respecto al día 0, y esta diferencia no fue observada en los adipocitos *wild type*, en el cual los niveles de esfingolípidos tienen un leve aumento de 1,2 veces, siendo no significativo estadísticamente. También notamos que el glicosfingolípidos trihexosil ceramida aumenta durante el transcurso de la diferenciación en ambos genotipos. En efecto, en comparación con el día 0 de diferenciación, los adipocitos *wild type* tienen 4,6 veces más trihexosil ceramida en el día 10 de diferenciación, mientras que los adipocitos *Agpat2*^{-/-} tienen un incremento de 3,8 veces (Figura 20A).

En relación a los niveles de fosfolípidos en homogenizados totales de adipocitos diferenciados *in vitro*, no encontramos diferencias significativas entre genotipos en el día 0 de diferenciación, aunque si observamos que preadipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan una tendencia a mayores niveles de fosfatidilglicerol que preadipocitos *Agpat2*^{+/+}, pero sin alcanzar significancia estadística. Por el contrario, en el día 10 de diferenciación los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan 2,3 veces menos fosfatidiletanolamina y 2 veces menos lisofosfatidiletanolamina en comparación con adipocitos *wild type* (Figura 21A). El análisis de la composición de ácidos grasos de estos fosfolípidos (Figura 21B), muestra que las especies de fosfatidiletanolamina con menores niveles en adipocitos *Agpat2*^{-/-} en el día 10 de diferenciación, son aquellas que contienen ácido palmítico (16:0) (3 veces menos), ácido araquidónico (20:4) (2,2 veces menos), ácido docosapentaenoico (22:5) (2,1 veces menos) y ácido docosahexaenoico (22:6) (2,3 veces menos). Las especies de lisofosfatidiletanolamina disminuidas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} son aquellas sustituidas con los ácidos 10-pentadecenoico (15:1) (2 veces menos) y palmítico (16:0) (3,1 veces menos).

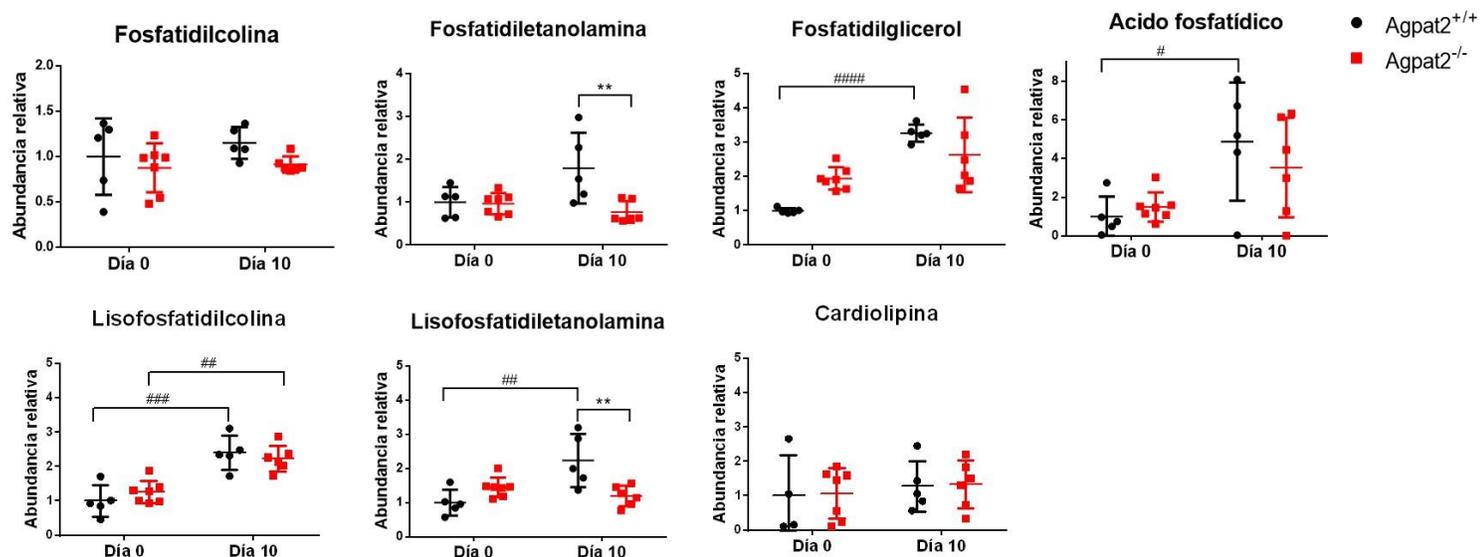
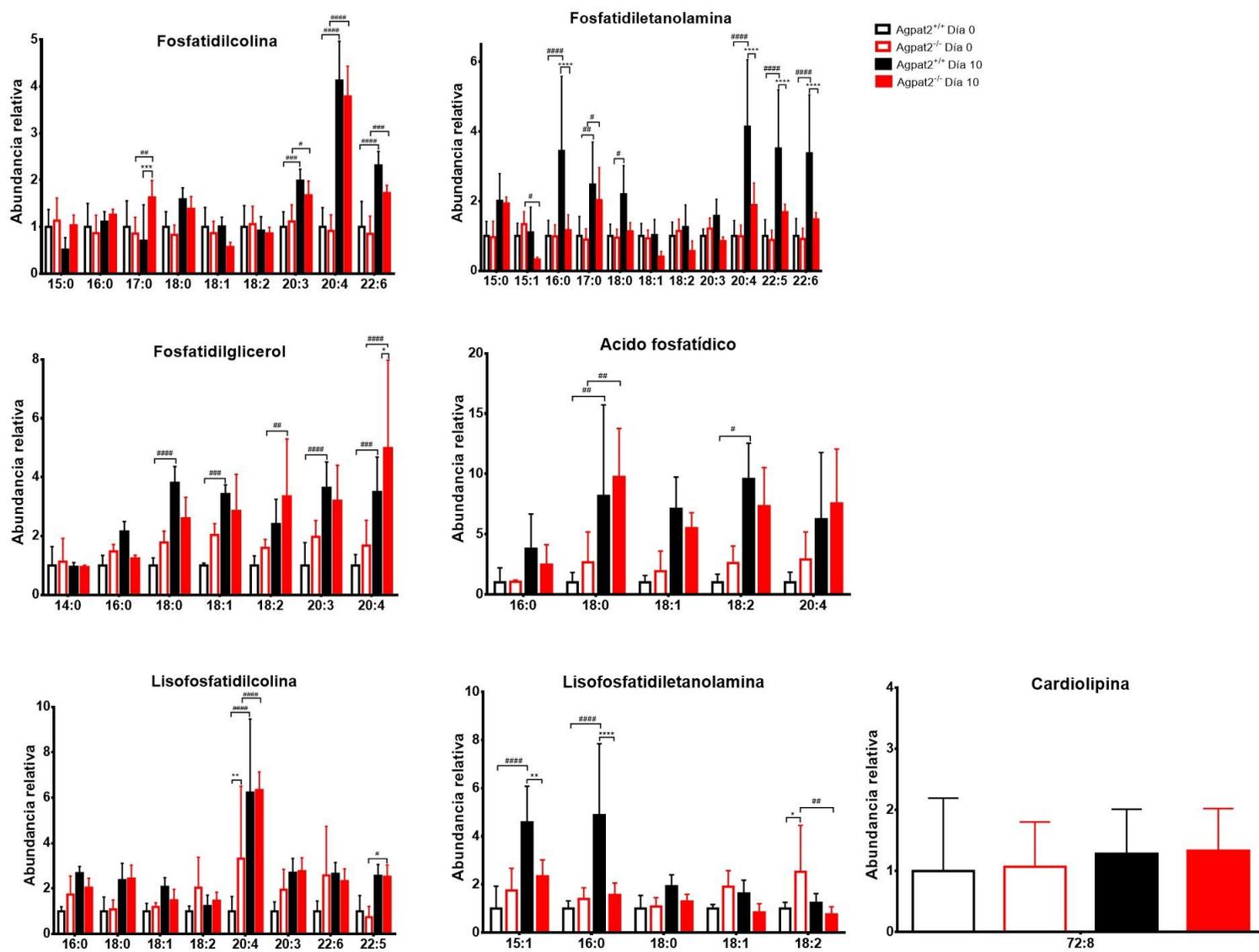
A**B**

Figura 21: Niveles y composición de ácidos grasos de fosfolípidos en homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. A) Niveles de fosfolípidos de homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada fosfolípido fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra, y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} en el día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde a preadipocitos provenientes de animales independientes (n = 5-7). El eje X de los gráficos corresponde al día post inducción adipogénica. B) Contenido de ácidos grasos de fosfolípidos de homogenizado total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* a día 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada especie de ácido graso fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra y expresados como veces de cambio respecto a su correspondiente ácido graso en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} en el día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde al promedio ± DE de cultivos de preadipocitos de animales independientes (n = 5-7). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

Los niveles de fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico y lisofosfatidiletanolamina aumentan durante la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type*, lo que no se observa en adipocitos *Agpat2^{-/-}*. Este aumento es de 3,3 veces para fosfatidilglicerol, de 4,9 veces para ácido fosfatídico y 2,2 veces para lisofosfatidiletanolamina en el día 10 de diferenciación con respecto al día 0. En contraste, los niveles de lisofosfatidilcolina durante la diferenciación adipogénica aumentan en ambos genotipos (2,4 veces para adipocitos *wild type* y 1,8 veces para adipocitos *Agpat2^{-/-}*) (Figura 21A).

Las especies de fosfatidilglicerol que aumentan significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* son aquellas sustituidas con los ácidos esteárico (18:0), oleico (18:1), di-homo γ -linolénico (20:3), y araquidónico (20:4). Si bien adipocitos *Agpat2^{-/-}* no presentan aumento significativo en los niveles totales de fosfatidilglicerol con la diferenciación adipogénica, sí presentan aumento significativo en aquellas especies de fosfatidilglicerol sustituidas con los ácidos linoleico (18:2) y araquidónico (20:4).

Las especies de ácido fosfatídico que aumentan significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* son aquellas sustituidas con los ácidos esteárico (18:0) y linoleico (18:2). Además, adipocitos *Agpat2^{-/-}* muestran un aumento en el ácido esteárico (18:0).

Las especies de lisofosfatidiletanolamina que aumentan significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* son aquellas sustituidas con los ácidos 10-pentadecenoico (15:1) y palmítico (16:0). Por el contrario, adipocitos *Agpat2^{-/-}* muestran una disminución significativa en la especie de lisofosfatidiletanolamina sustituida con el ácido linoleico (18:2).

Las especies de lisofosfatidilcolina que aumentan significativamente a través de la diferenciación adipogénica en ambos genotipos son aquellas sustituidas con los ácidos araquidónico (20:4) y de docosapentaenoico (22:5) solo en adipocitos *Agpat2^{-/-}*.

4.5. Análisis lipídico en homogenizado total de tejido adiposo de ratones *wild type* y *Agpat2*^{-/-}.

4.5.1. Tejido adiposo blanco y pardo de ratones *Agpat2*^{-/-} presentan acúmulos intracelulares de colesterol.

Con el objetivo de comparar los resultados de adipocitos diferenciados *in vitro* con tejidos de animales en etapas tempranas de desarrollo postnatal, también realizamos el análisis de lípidos en el tejido adiposo de ratones durante la primera semana de vida en ambos genotipos.

Como se observa en la Figura 22A, el tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-} presenta acúmulos intracelulares de colesterol libre a las edades postnatal de P0.5 y P2.5, en comparación con sus hermanos de camada *wild type*. Importantly, en la edad P4.5 no fue posible visualizar tejido adiposo blanco en los ratones *Agpat2*^{-/-}, a consecuencia de la masiva muerte de adipocitos e inflamación asociada (Figura 2 en sección Introducción), confirmando nuestros hallazgos previamente publicados [3].

Por su parte, el tejido adiposo pardo interescapular también presenta acúmulos intracelulares de colesterol libre en ratones *Agpat2*^{-/-} a la edad de P4.5; sin embargo, estas diferencias no se observaron en el tejido adiposo pardo de ratones de edades más tempranas (edades postnatal P0.5 y P2.5) (Figura 22B).

En trabajos previos de nuestro laboratorio reportamos que el tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} de edad postnatal P4.5 presenta importante infiltración de macrófagos [3]. Para verificar que los acúmulos de colesterol observados en el tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} están localizados en adipocitos y no en macrófagos, realizamos una colocalización de la tinción contra colesterol con la sonda PFO-GST y la detección de macrófagos por inmunofluorescencia, usando el marcador MAC2.

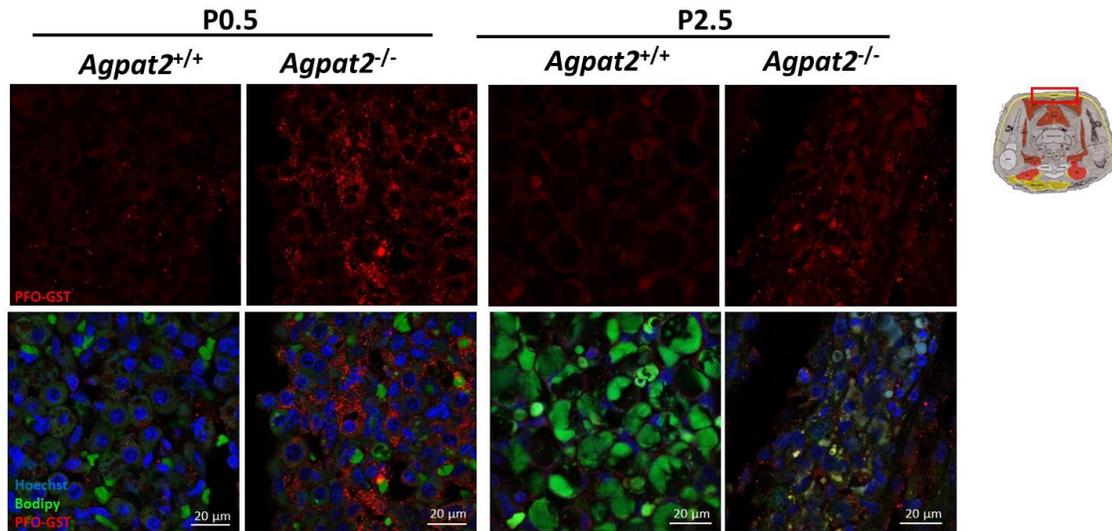
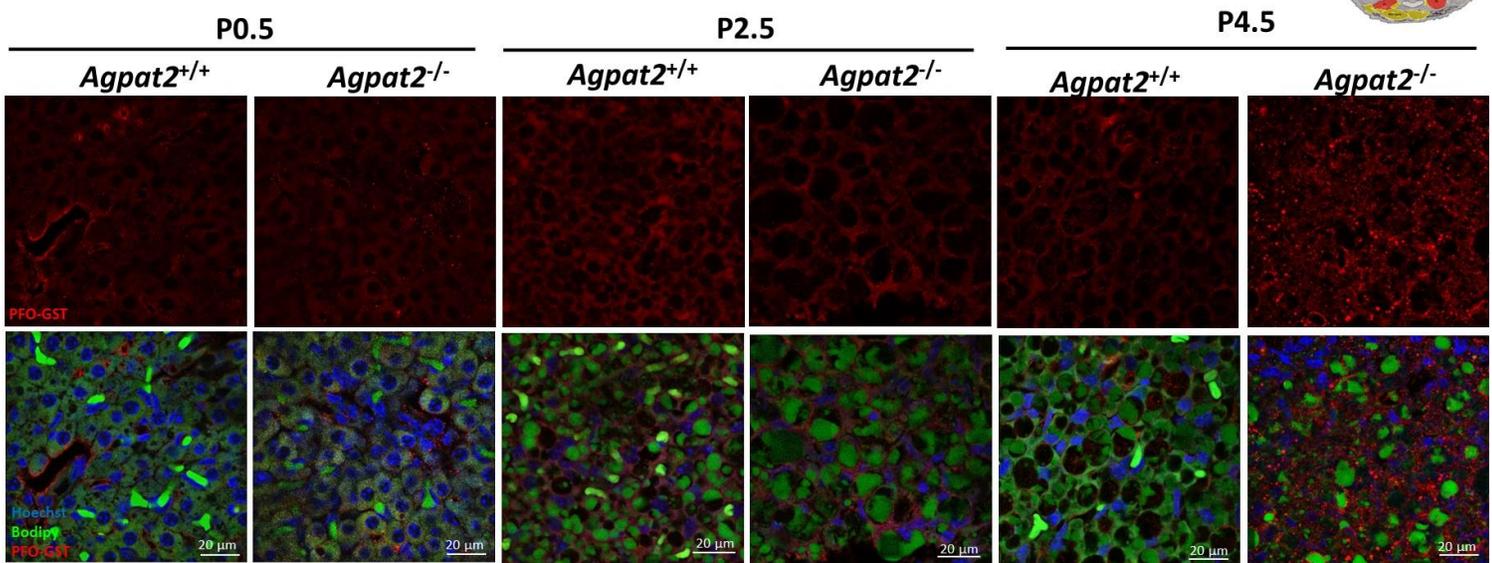
A**B**

Figura 22: Tinción de colesterol libre, gotas lipídicas y núcleos en tejido adiposo blanco subcutáneo y tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}. Imágenes representativas de microscopía confocal de tejido adiposo blanco subcutáneo (A) y tejido adiposo pardo interescapular (B) a diferentes días post nacimiento: P0.5, P2.5 y P4.5. En azul se observa tinción de núcleos mediante Hoechst, en verde tinción de gotas lipídicas mediante la sonda BODIPY, y en rojo colesterol libre con la sonda PFO-GST. n=4 por grupo. Barra de escala: 20 μ m.

Como se muestra en la Figura 23, nuestros análisis de microscopía confocal muestran que los acúmulos de colesterol no presentan colocalización con el marcador de macrófagos, indicando que estas formaciones no se encuentran en este tipo celular.

La cuantificación de colesterol total en el tejido adiposo de los ratones mediante el ensayo enzimático sólo fue realizada en tejido adiposo pardo interescapular, debido a la escasa cantidad de tejido adiposo blanco en ratones durante la primera semana de vida, que hace impracticable su remoción quirúrgica y procesamiento analítico posterior.

Para los días P0.5 y P2.5 no encontramos diferencias significativas en los niveles de colesterol total, libre y esterificado entre genotipos (Figura 24). Por el contrario, en el día postnatal P4.5 el tejido adiposo pardo de ratones *Agpat2*^{-/-} presenta una tendencia a mayor contenido de colesterol total (aumento de 1,8 veces) (Figura 24A) y libre (1,6 veces) (Figura 24B) en comparación con ratones *wild type*, sin alcanzar significancia estadística, mientras que el colesterol esterificado en el tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} es 3,5 veces más abundante que en ratones *wild type* (Figura 24C).

Por otro lado, al analizar los posibles cambios en los niveles de colesterol del tejido adiposo pardo durante el desarrollo postnatal de los ratones, no encontramos variaciones en ratones *wild type*. Por el contrario, en ratones *Agpat2*^{-/-} sí observamos un aumento de 2,2 veces en los niveles de colesterol total y de 3,3 veces en el colesterol esterificado en el día P4.5 en comparación a P0.5.

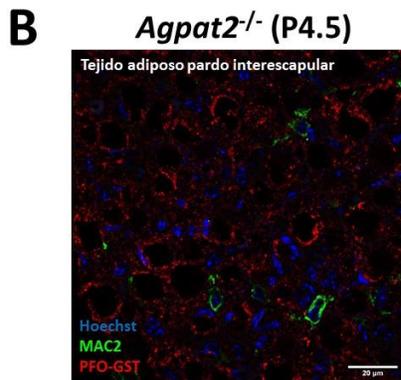
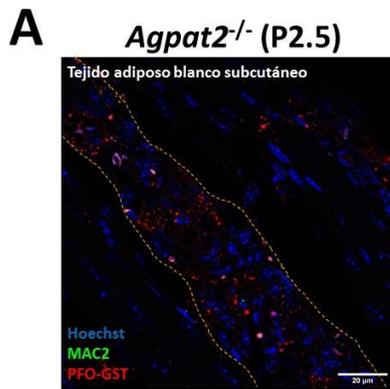


Figura 23: Tinción de colesterol libre, macrófagos y núcleos en tejido adiposo blanco subcutáneo y tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-}. Imágenes representativas de microscopía confocal de tejido adiposo blanco subcutáneo a edad postnatal P2.5 (A) y tejido adiposo pardo interescapular a edad postnatal P4.5 (B). En azul se observa tinción de núcleos mediante Hoechst, en verde tinción de macrófagos mediante anticuerpo contra la proteína MAC2, y en rojo colesterol libre con la sonda PFO-GST. n = 2 por grupo. Barra de escala: 20 µm.

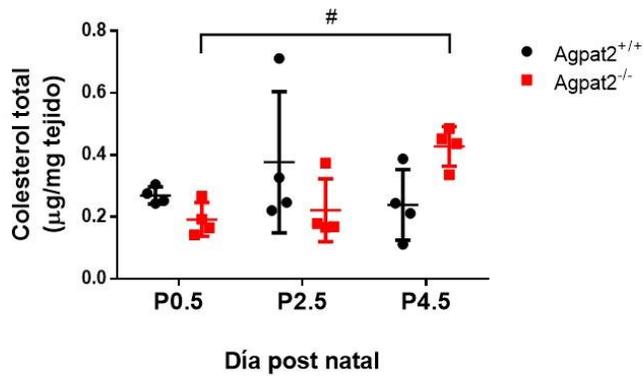
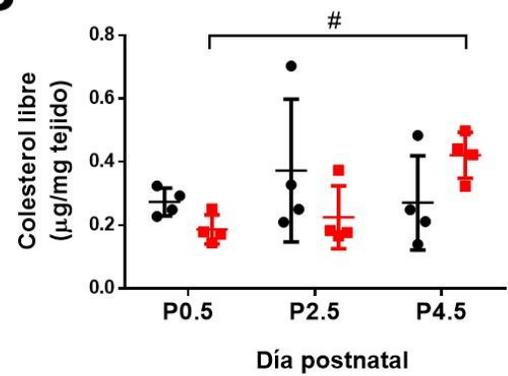
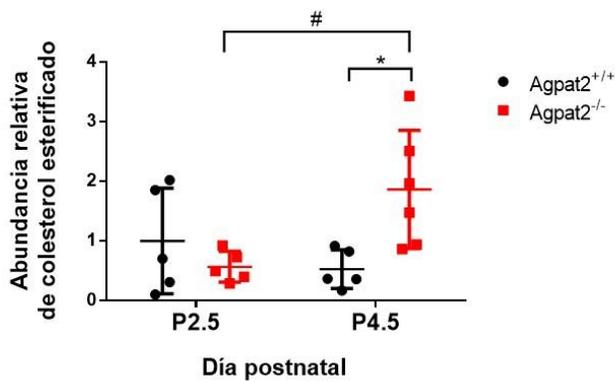
A**B****C**

Figura 24: Cuantificación del colesterol total, libre y esterificado en tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}. Niveles de colesterol total (A) y colesterol libre (B) medido por método enzimático en tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades postnatal P0.5, P2.5 y P4.5. Cada valor corresponde a un cultivo de preadipocitos de animales independientes (n = 4 por grupo). C) Niveles de colesterol esterificado medido por espectrometría de masas en tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades postnatal P2.5 y P4.5. Los niveles de colesterol esterificado fueron normalizados por mg de tejido de cada muestra, y expresados como veces de cambio en comparación con tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{+/+} a edad P2.5. Cada valor corresponde a tejido adiposo de animales independientes (n = 5-6 por grupo). * p < 0,05 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día de edad. # p < 0,05 significa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes edades en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

4.5.2. Tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} tiene niveles aumentados de ceramidas y disminuidos de diversos fosfolípidos.

Interesantemente, no encontramos diferencias significativas en el contenido total de triglicéridos y diacilglicerol del tejido adiposo pardo interescapular entre genotipos para las dos edades evaluadas (P2.5 y P4.5) (Figura 25), lo que contrasta fuertemente con el deterioro morfológico y molecular de este tejido en los ratones *Agpat2*^{-/-} de las mismas edades [3].

El análisis de los niveles de esfingolípidos en homogenizados totales de tejido adiposo pardo interescapular mostró que, al igual que en el caso de los triglicéridos, no existen diferencias significativas entre genotipos a la edad de P2.5. Por el contrario, en edad P4.5, el tejido adiposo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} posee 7,1 veces más ceramidas y 3,1 veces más monohexosil ceramida que el de ratones *wild type* de la misma edad (Figura 26).

Además, adipocitos *Agpat2*^{-/-} muestran un aumento 3,7 veces en los niveles de ceramidas en P4.5 respecto a P2.5, a diferencia de adipocitos *Agpat2*^{+/+} en los cuales los niveles de ceramidas se mantienen constantes entre las dos edades postnatal evaluadas.

En tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} de edad P2.5., no encontramos diferencias en los niveles totales de los distintos fosfolípidos en homogenizados totales. Sin embargo, en la edad de P4.5 el tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} posee niveles menores de fosfatidiletanolamina (4,5 veces), fosfatidilinositol (3,2 veces), ácido fosfatídico (1,9 veces), lisofosfatidilcolina (2 veces) y lisofosfatidiletanolamina (8,9 veces), en comparación con el tejido adiposo de ratones *wild type* de la misma edad (Figura 27).

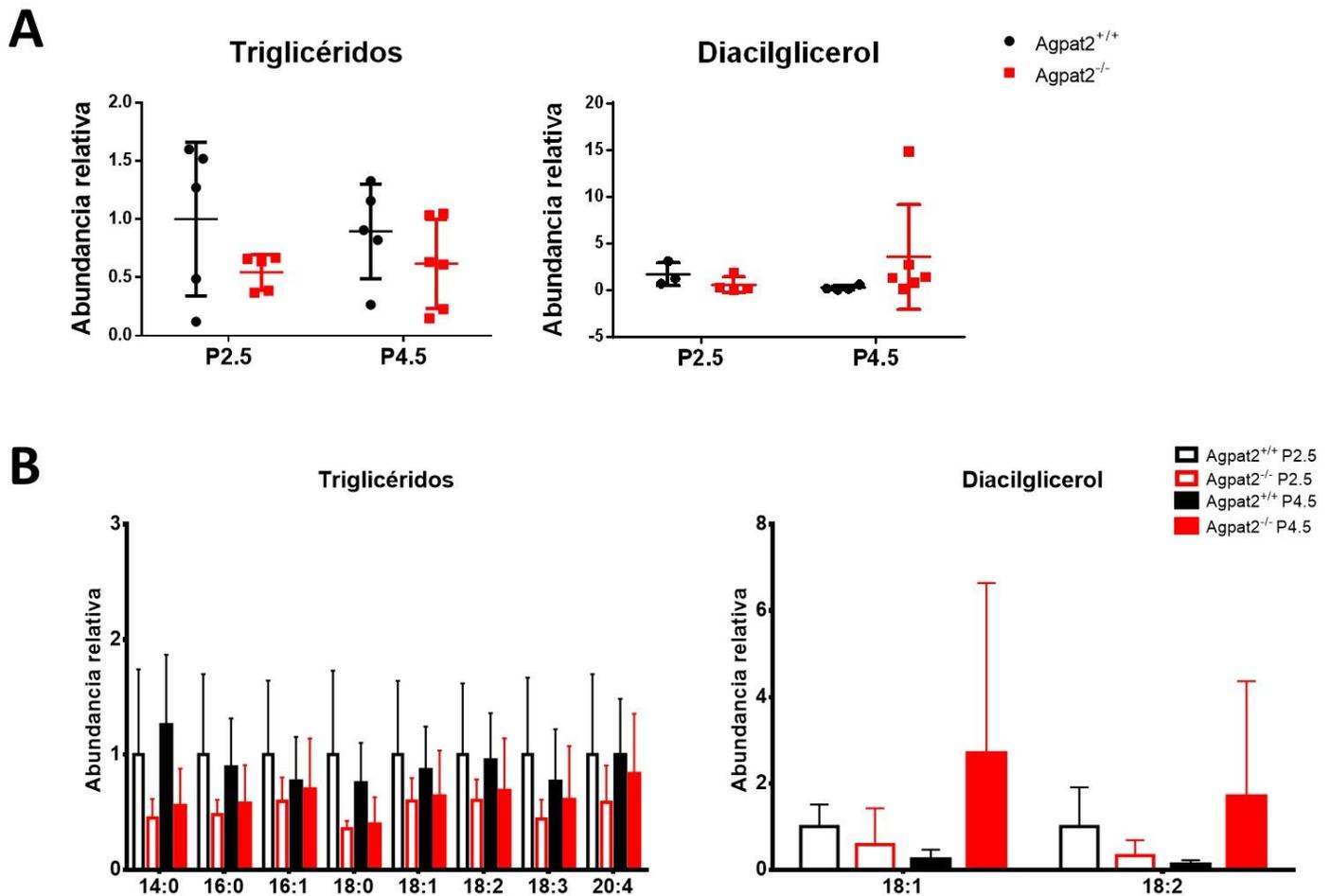


Figura 25: Niveles de triglicéridos y diacilglicerol en tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}. A) Niveles de triglicéridos y diacilglicerol totales de homogenizado de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades P2.5 y P4.5. Cada valor corresponde a muestras de tejido adiposo provenientes de animales independientes (n = 5-6). Los niveles de cada lípido fueron normalizados por la masa de cada tejido, y expresados como veces de cambio en comparación con tejido adiposo *Agpat2*^{+/+} a P2.5. B) Contenido de ácidos grasos de los triglicéridos y diacilglicerol en homogenizado total de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades P2.5 y P4.5. Los niveles de cada especie fueron normalizados por la masa de cada tejido y expresados como veces de cambio respecto a su correspondiente especie en comparación con tejido adiposo *Agpat2*^{+/+} a P2.5. Cada valor corresponde al promedio ± DE de tejido adiposo de animales independientes (n = 5-6). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en la misma edad. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre edades en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

Figura 26: Niveles de esfingolípidos en tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}.

A) Niveles de esfingolípidos totales de homogenizado de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades P2.5 y P4.5. Cada valor corresponde a muestras de tejido adiposo provenientes de animales independientes (n = 5-6). Los niveles de cada esfingolípidos fueron normalizados por la masa de cada tejido, y expresados como veces de cambio en comparación con tejido adiposo *Agpat2*^{+/+} a P2.5. B) Contenido de diversas especies de esfingolípidos de homogenizado total de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades P2.5 y P4.5. Los niveles de cada especie fueron normalizados por la masa de cada tejido y expresados como veces de cambio respecto a su correspondiente especie en comparación con tejido adiposo *Agpat2*^{+/+} a P2.5. Cada valor corresponde al promedio ± DE de tejido adiposo de animales independientes (n = 5-6). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en la misma edad. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre edades en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

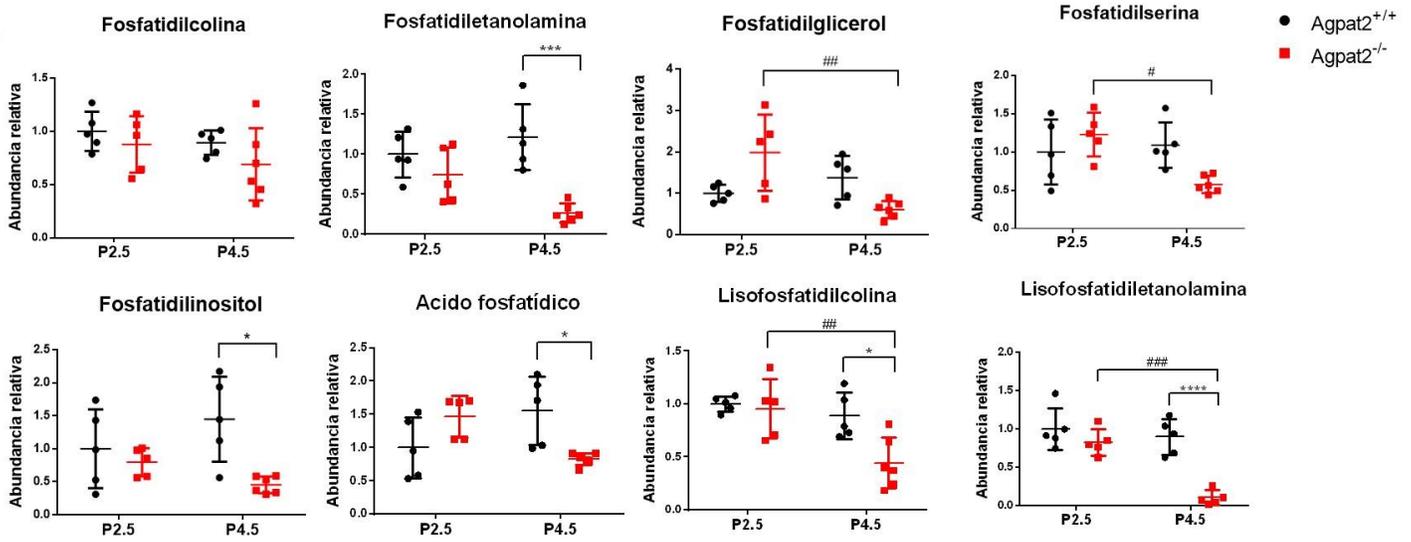
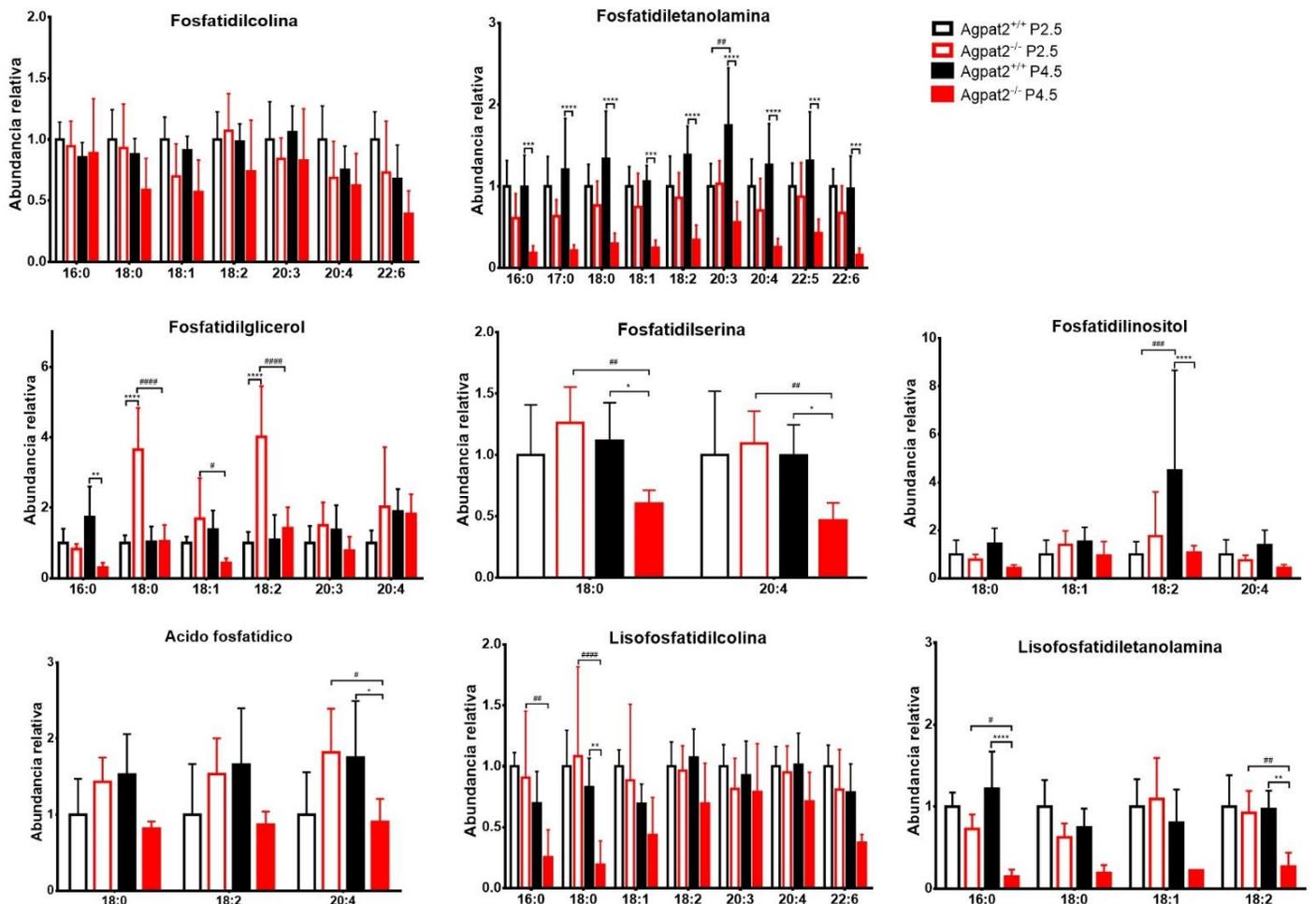
A**B**

Figura 27: Niveles y composición de ácidos grasos de fosfolípidos en tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}. A) Niveles de fosfolípidos de homogenizado total de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades P2.5 y P4.5. Cada valor corresponde a muestras de tejido adiposo provenientes de animales independientes. Los niveles de cada fosfolípido fueron normalizados por la masa de cada tejido, y expresados como veces de cambio en comparación con tejido adiposo *Agpat2*^{+/+} a P2.5. B) Contenido de ácidos grasos de fosfolípidos de homogenizado total de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} a edades P2.5 y P4.5. Los niveles de cada especie fueron normalizados por la masa de cada tejido y expresados como veces de cambio respecto a su correspondiente especie en comparación con tejido adiposo *Agpat2*^{+/+} a P2.5. Cada valor corresponde al promedio ± DE de tejido adiposo de animales independientes (n = 5-6). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en la misma edad. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre edades en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

Las especies de fosfatidiletanolamina que presentan niveles significativamente menores en tejido adiposo de ratones *Agpat2^{-/-}* en comparación a tejido *wild type* a P4.5, corresponden a aquellas sustituidas por los ácidos palmítico (16:0) (5,4 veces), margárico (17:0) (5,7 veces), esteárico (18:0) (4,5 veces), oleico (18:1) (4,3 veces), linoleico (18:2) (4 veces), di-homo γ -linolénico (20:3) (3,1 veces), araquidónico (20:4) 5 veces), docosapentaenoico (22:5) (3,1 veces) y docosahexaenoico (22:6) (6,1 veces). Para el fosfatidilinositol, corresponde al ácido linoleico (18:2) (4,2 veces); para ácido fosfatídico corresponde al ácido araquidónico (20:4) (1,9 veces); para lisofosfatidilcolina corresponde al ácido esteárico (18:0) (4,4 veces); y para lisofosfatidiletanolamina corresponde a los ácidos palmítico (16:0) (8,4 veces) y linoleico (18:2) (3,6 veces) (Figura 27B).

Además, como podemos observar en la Figura 27A, el tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2^{-/-}* a P4.5 muestra una disminución de los niveles totales de fosfatidilglicerol (3,3 veces), fosfatidilserina (2,1 veces), lisofosfatidilcolina (2,1 veces) y lisofosfatidiletanolamina (8,3 veces), en comparación a tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2^{-/-}* a P2.5, fenómeno que no observamos en tejido adiposo de ratones *wild type*.

Las especies de fosfatidilglicerol que disminuyen significativamente en ratones *Agpat2^{-/-}* a la edad de P4.5 en comparación a ratones P2.5 del mismo genotipo, son aquellas sustituidas con los ácidos esteárico (18:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2); para fosfatidilserina corresponde a los ácidos esteárico (18:0) y araquidónico (20:4); para lisofosfatidilcolina corresponde a los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0); para lisofosfatidiletanolamina corresponde a los ácidos palmítico (16:0) y linoleico (18:2) (Figura 27B).

4.6. Análisis lipídico de la membrana plasmática de adipocitos *wild type* y *Agpat2*^{-/-} diferenciados adipogénicamente *in vitro*.

4.6.1. La membrana plasmática de los adipocitos *Agpat2*^{-/-} tiene abundancia normal de colesterol y mayores niveles de 8(9)-dehidrocolesterol.

Para estudiar directamente el rol del colesterol de la MP en la abundancia de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} determinamos la concentración de este y otros lípidos candidatos en preparaciones purificadas de MP de adipocitos.

Los principales componentes lipídicos de la MP de células mamíferas son fosfolípidos, colesterol y esfingolípidos. Dentro de los fosfolípidos, los más abundantes son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélna, fosfatidilinositol y fosfatidilserina [55], [114]. Como se indicó, la composición lipídica de las caveolas es diferente a la del resto de la membrana, con 3 veces mayores niveles de colesterol y 2 veces mayores niveles de esfingolípidos, principalmente esfingomiélna, y algunas especies de ceramidas y gangliósidos [40], [58].

Para evaluar si la menor abundancia de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} se relaciona con concentraciones anormales de los lípidos de la MP, determinamos los niveles de colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos en fracciones de MP purificada de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *wild type* diferenciados adipogénicamente *in vitro*, en los días 0 y 10 post inducción adipogénica (Figura 28).

Como se muestra en la Figura 29, en el día 0 de diferenciación no encontramos diferencias significativas entre genotipos en el contenido de colesterol ni en ninguno de los esteroides evaluados. Tampoco encontramos diferencias en el colesterol de la MP en el día 10 de diferenciación. Sin embargo, encontramos que adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan un aumento de 35% en los niveles de 8(9)-dehidrocolesterol en comparación con adipocitos *wild type*.

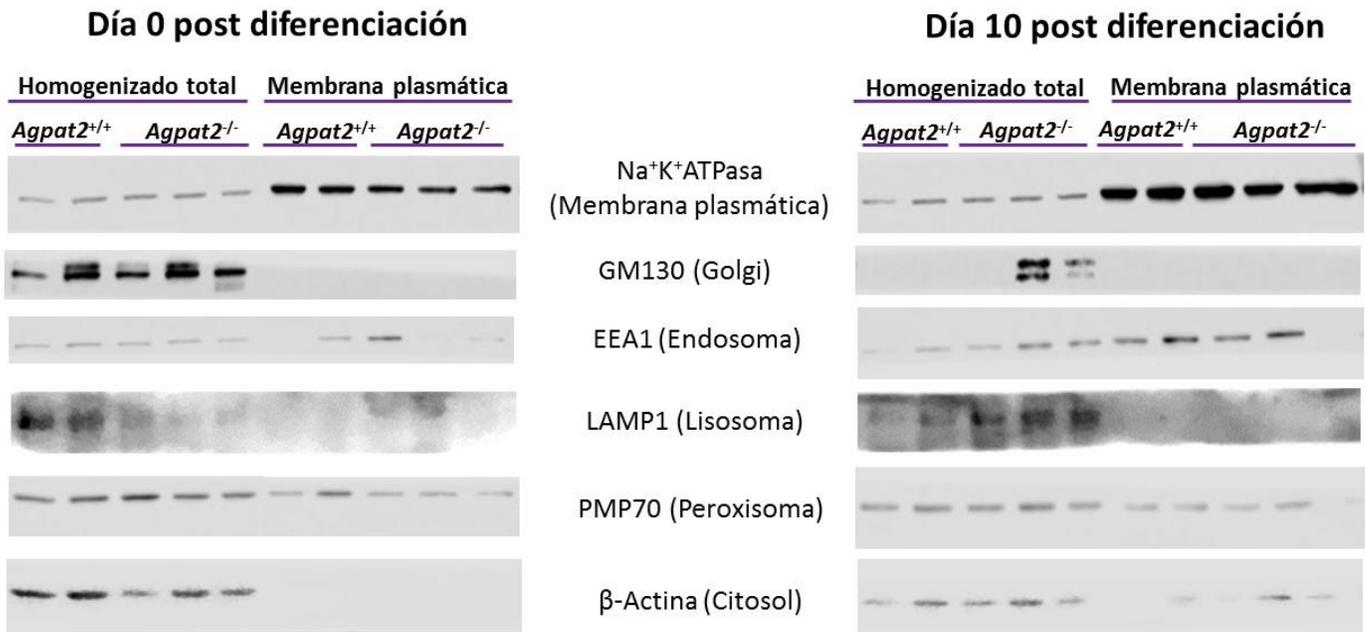


Figura 28: Purificación de fracción de membrana plasmática de preadipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. *Western blot* representativo de muestras de homogenizado total y de fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} en los días 0 y 10 post diferenciación adipogénica *in vitro*. 6 µg de extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, y luego incubadas con anticuerpos específicos para proteínas marcadoras de diferentes organelos de la célula.

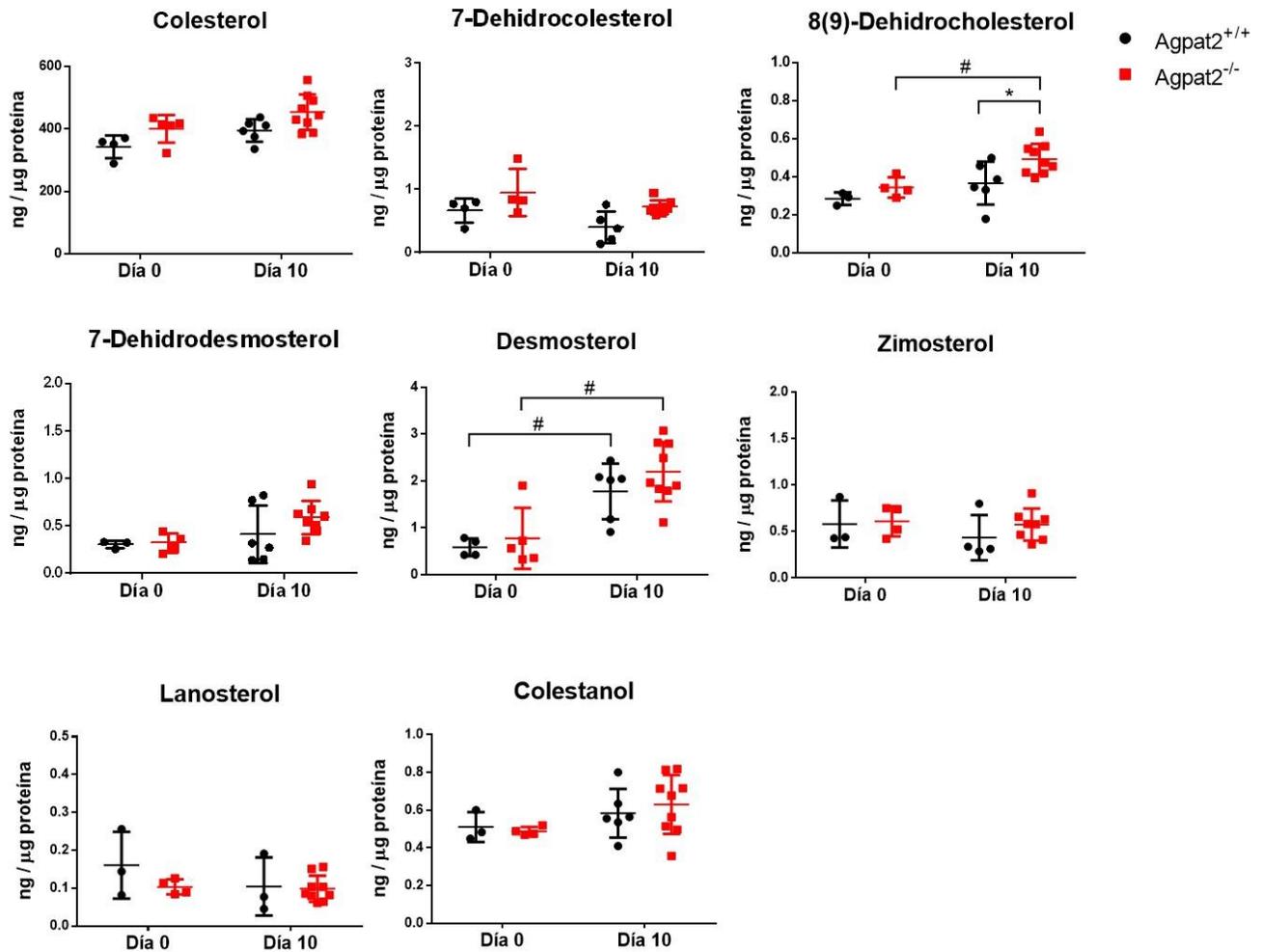


Figura 29: Niveles de esteroides en la fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. Niveles de colesterol, intermediarios de la vía del mevalonato y derivados del colesterol en fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post inducción adipogénica. Cada valor corresponde a la fracción de membrana plasmática proveniente de un cultivo de preadipocitos de animales independientes (n = 4 para día 0; n = 6-9 para día 10). El eje X de los gráficos corresponde al día post inducción adipogénica. * p < 0,05 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05 indica diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's. FFMAS: Follicular fluid meiosis-activating sterol.

Al estudiar los niveles de esteroides durante el transcurso de la diferenciación adipogénica, encontramos que en ambos genotipos el desmosterol aumenta sus niveles 3 veces en el día 10 de diferenciación en comparación al día 0. Además, en el día 10 de diferenciación adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan un aumento de 1,4 veces en 8(9)-dehidrocolesterol con respecto al día 0.

4.6.2. La membrana plasmática de los adipocitos *Agpat2*^{-/-} tiene abundancia normal de esfingolípidos, pero mayor contenido de fosfatidilglicerol en el día 0 post diferenciación y fosfatidilserina en el día 10 post diferenciación.

No encontramos diferencias significativas, ni entre genotipos ni en función del tiempo, en los niveles totales de ninguno de los esfingolípidos cuantificados en la MP de adipocitos diferenciados (esfingomielina, ceramida, monohexosil ceramida, dihexosil ceramida, trihexosil ceramida) (Figura 30).

En contraste con lo que ocurre con esteroides y esfingolípidos, los preadipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan, en el día 0 de diferenciación, 50% más fosfatidilglicerol en su MP en comparación con preadipocitos *wild type* (Figura 31A); aunque estas diferencias no se mantienen en tiempos avanzados de diferenciación adipogénica (Figura 31A). Por otro lado, en el día 10 post diferenciación, los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan un aumento del 85% en el contenido de la fosfatidilserina de la MP, en comparación con adipocitos *wild type*.

El análisis de la composición específica de ácidos grasos de estos fosfolípidos (Figura 31B), mostró que los preadipocitos *Agpat2*^{-/-} poseen 1,7 veces más ácido mirístico (14:0) y 1,6 veces más ácido oleico (18:1) en el fosfatidilglicerol de la MP en el día 0 de diferenciación, en comparación con preadipocitos *wild type*. Por otro lado, la fosfatidilserina de la MP de adipocitos *Agpat2*^{-/-} en el día 10 post diferenciación, contiene 1,4 veces más ácido esteárico (18:0) y 1,5 veces más ácido araquidónico (20:4), en comparación con los adipocitos *wild type* (Figura 31B).

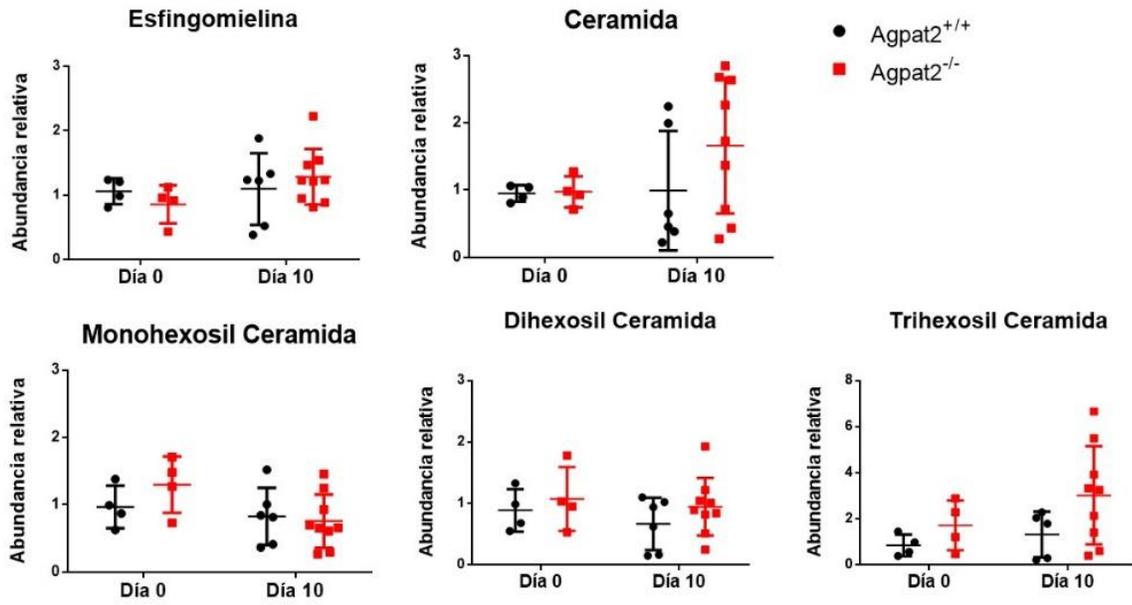
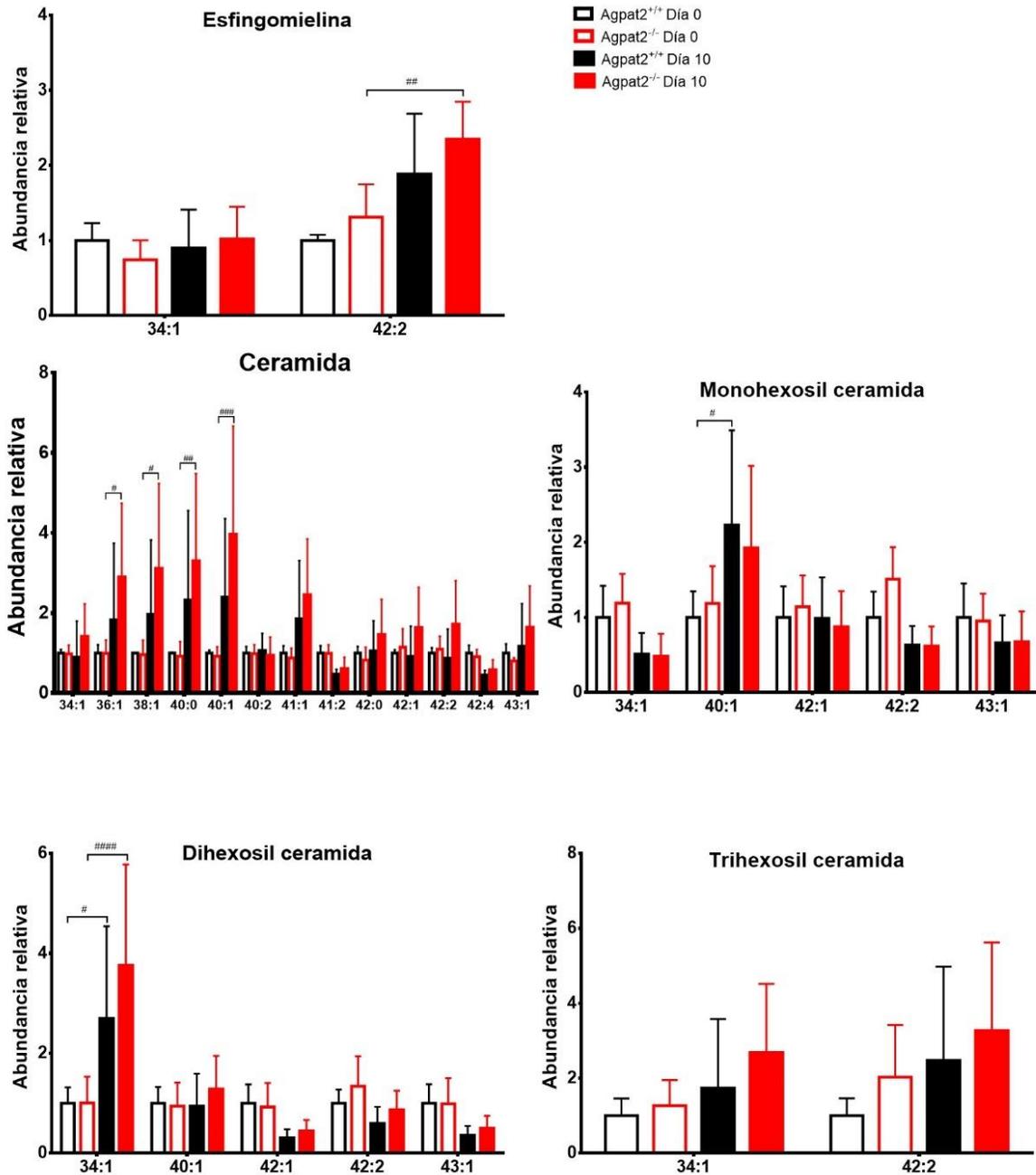
A**B**

Figura 30: Niveles de esfingolípidos en la fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. A) Niveles de esfingolípidos de fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada esfingolípidos fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra, y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} a día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde a la fracción de membrana plasmática proveniente de un cultivo de preadipocitos de animales independientes (n = 4 para día 0; n = 6-9 para día 10). El eje X de los gráficos corresponde al día post inducción adipogénica. B) Especies de esfingolípidos de la fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada especie fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra y expresados como veces de cambio respecto a la correspondiente especie en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} a día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde al promedio ± DE de la fracción de membrana plasmática proveniente de un cultivo de preadipocitos de animales independientes (n = 4 para día 0; n = 6-9 para día 10). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

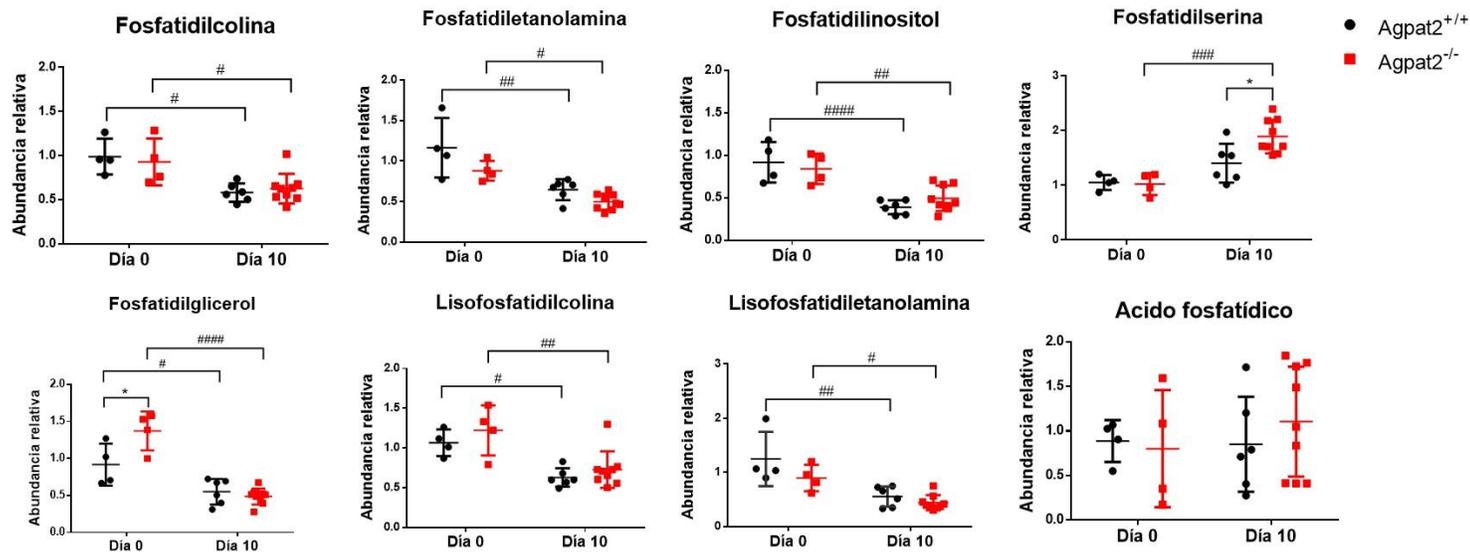
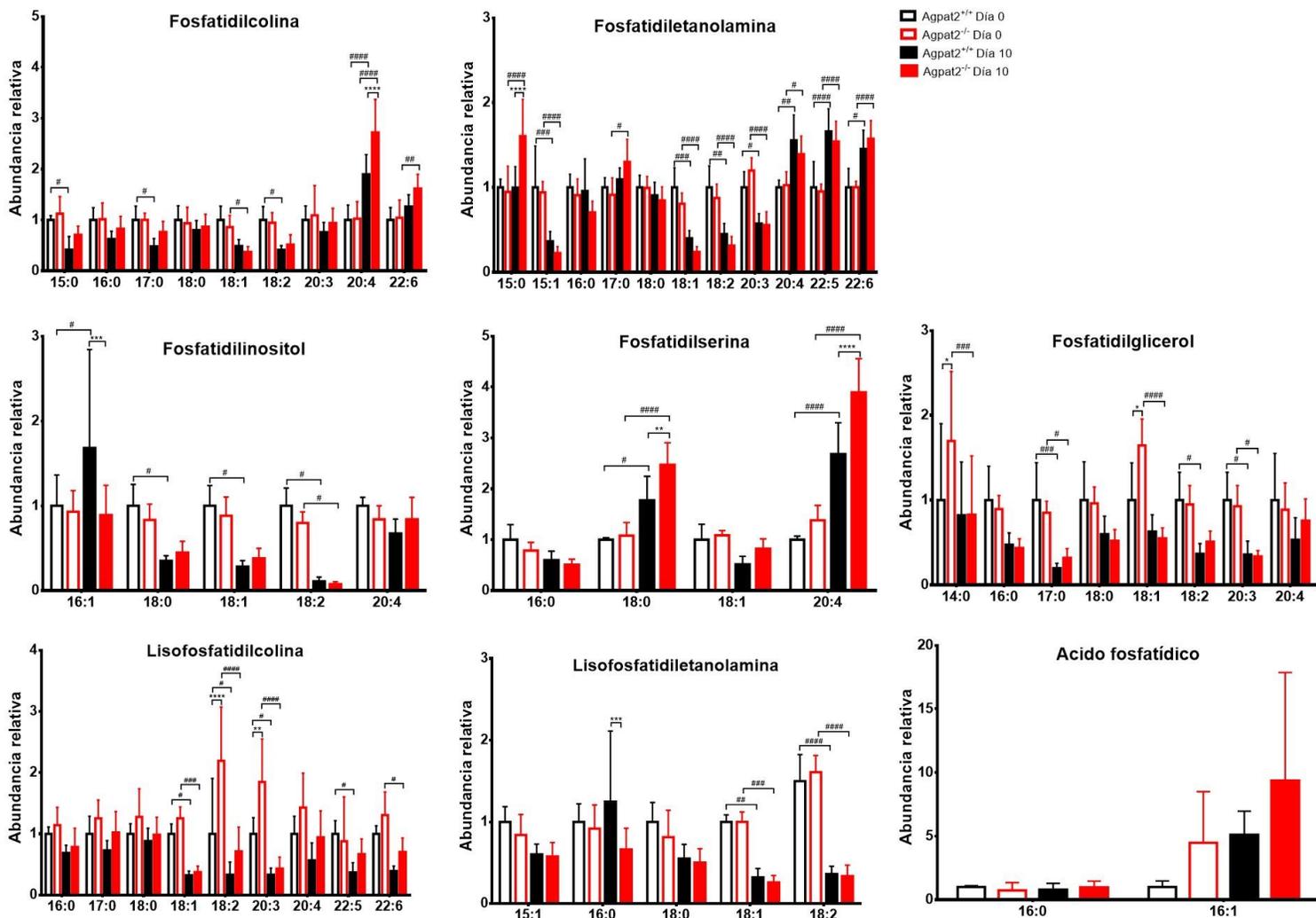
A**B**

Figura 31: Niveles de fosfolípidos y composición de ácidos grasos de fosfolípidos en la fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. A) Niveles de fosfolípidos de fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada fosfolípido fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra, y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} a día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde a la fracción de membrana plasmática proveniente de un cultivo de preadipocitos de animales independientes. El eje X de los gráficos corresponde al día post inducción adipogénica. B) Contenido de ácidos grasos de fosfolípidos de la fracción de membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados *in vitro* en los días 0 y 10 post-diferenciación adipogénica. Los niveles de cada especie de ácido graso fueron normalizados por los niveles de proteínas totales de cada muestra y expresados como veces de cambio respecto al correspondiente ácido graso en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} a día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde al promedio ± DE de la fracción de membrana plasmática proveniente de un cultivo de preadipocitos de animales independientes (n = 4 para día 0; n = 6-9 para día 10). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tiempos en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

Interesantemente, la composición de fosfolípidos de la MP mostró variaciones durante el transcurso de la diferenciación adipogénica, que fueron equivalentes en ambos genotipos (Figura 31A). En efecto, en el día 10 de diferenciación en comparación con el día 0 observamos disminuciones significativas en los niveles totales de fosfatidilcolina (1,7 veces en adipocitos *wild type* y 1,5 veces en adipocitos *Agpat2^{-/-}*), fosfatidiletanolamina (1,8 veces en adipocitos *wild type* y en adipocitos *Agpat2^{-/-}*), fosfatidilinositol (2,4 veces en *wild type* y 1,7 veces en adipocitos *Agpat2^{-/-}*), fosfatidilglicerol (1,7 veces en adipocitos *wild type* y 2,8 veces en adipocitos *Agpat2^{-/-}*), lisofosfatidilcolina (1,7 veces en adipocitos *wild type* y en adipocitos *Agpat2^{-/-}*) y lisofosfatidiletanolamina (2,2 veces en adipocitos *wild type* y 2 veces en adipocitos *Agpat2^{-/-}*). Por el contrario, los niveles de fosfatidilserina aumentaron con la diferenciación adipogénica, pero como se indicó previamente, solo alcanzaron significancia estadística para adipocitos *Agpat2^{-/-}* (1,3 veces en adipocitos *wild type* y 1,9 veces en adipocitos *Agpat2^{-/-}*).

Las especies de fosfatidilcolina que disminuyen significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* son aquellas sustituidas con los ácidos pentadecanoico (15:0), margárico (17:0) y linoleico (18:2). Para los adipocitos *Agpat2^{-/-}* son aquellas sustituidas con el ácido oleico (18:1). Interesantemente, a pesar de que los niveles totales de fosfatidilcolina disminuyen, hay una especie que aumenta significativamente en ambos genotipos, que corresponde al ácido araquidónico (20:4).

Las especies de fosfatidiletanolamina que disminuyen significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* y *Agpat2^{-/-}* son aquellas sustituidas con los ácidos 10-pentadecenoico (15:1), oleico (18:1), linoleico (18:2) y di-homo γ -linolénico (20:3). También hay especies que aumentan en el tiempo en ambos genotipos: ácidos araquidónico (20:4), docosapentaenoico (22:5) y docosahexaenoico (22:6).

Las especies de fosfatidilinositol que disminuyen significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* son aquellas sustituidas con los ácidos esteárico (18:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2). Para los adipocitos *Agpat2^{-/-}* son aquellas sustituidas con el ácido linoleico (18:2).

Las especies de fosfatidilglicerol que disminuyen significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* son aquellas sustituidas con los ácidos margárico (17:0), linoleico (18:2) y di-homo γ -linolénico (20:3). Para los adipocitos *Agpat2^{-/-}* son aquellas sustituidas con los ácidos mirístico (14:0), margárico (17:0), oleico (18:1) y di-homo γ -linolénico (20:3).

Las especies de lisofosfatidilcolina que disminuyen significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* son aquellas sustituidas con los ácidos oleico (18:1), linoleico (18:2), di-homo γ -linolénico (20:3) y docosapentaenoico (22:5). Para los adipocitos *Agpat2^{-/-}* son aquellas sustituidas con los ácidos oleico (18:1), linoleico (18:2), di-homo γ -linolénico (20:3) y docosahexaenoico (22:6).

Las especies de lisofosfatidiletanolamina que disminuyen significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* y *Agpat2^{-/-}* son aquellas sustituidas con los ácidos oleico (18:1) y linoleico (18:2).

Las especies de fosfatidilserina que aumentan significativamente a través de la diferenciación adipogénica en adipocitos *wild type* y *Agpat2^{-/-}* son aquellas sustituidas con los ácidos esteárico (18:0) y araquidónico (20:4).

4.7. La membrana plasmática aislada de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Acpat2*^{-/-} tiene abundancia normal de colesterol y mayor abundancia de zimosterol y FFMAS.

Con el objetivo de comparar los resultados de adipocitos diferenciados *in vitro* con tejidos de animales en etapas tempranas de desarrollo post natal, también realizamos este análisis en MP purificada de tejido adiposo pardo interescapular de ratones recién nacidos (P0.5) de ambos genotipos.

Por su parte, tampoco encontramos diferencias entre genotipos en los niveles de colesterol de la MP del tejido adiposo pardo interescapular de ratones recién nacidos (P0.5) (Figura 32). Sin embargo, al estudiar otros esteroides, encontramos que la MP del tejido adiposo de ratones *Acpat2*^{-/-} posee 2 veces más FFMAS y 3 veces más zimosterol en comparación a ratones *wild type*, sin cambios significativos en los otros esteroides medidos.

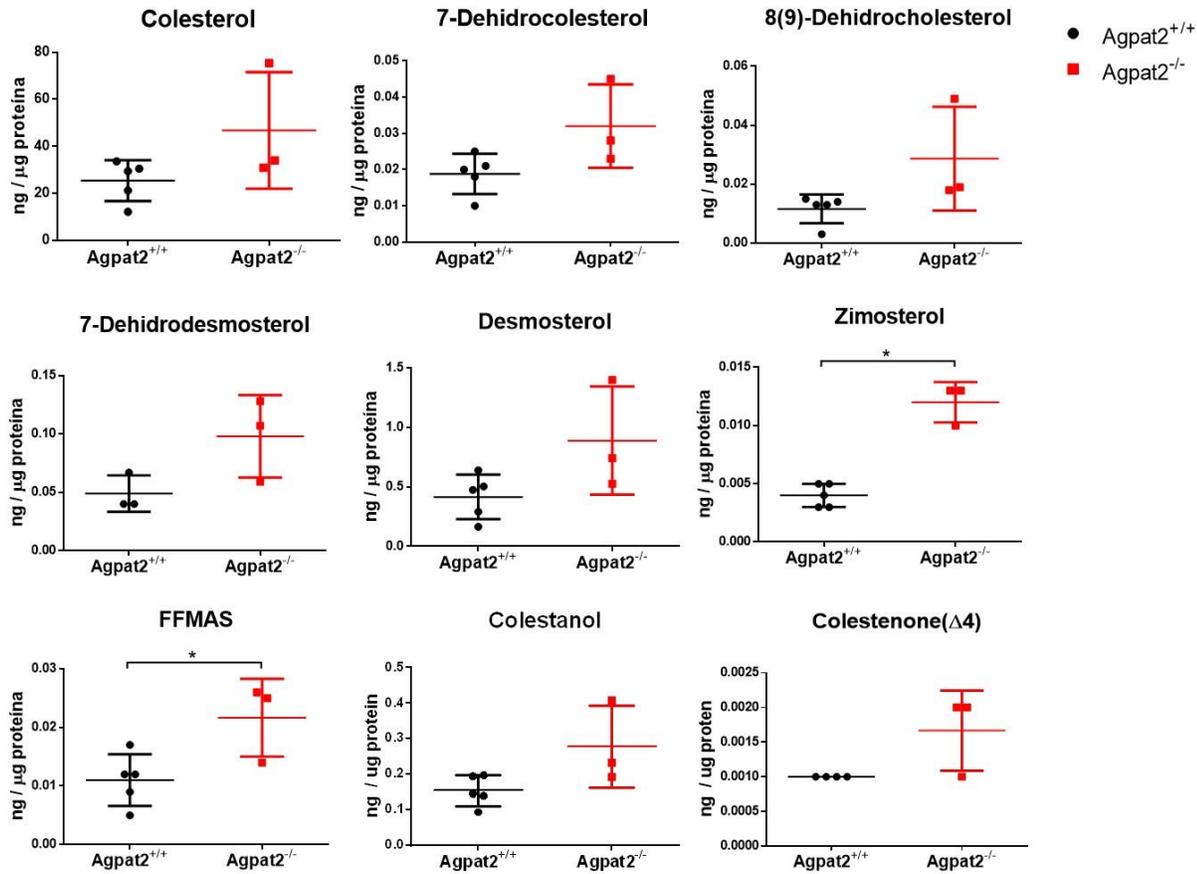


Figura 32: Niveles de esteroides en la fracción de membrana plasmática de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+}. Niveles de colesterol, intermediarios de la vía del mevalonato y derivados del colesterol en fracción de membrana plasmática de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} recién nacidos (P0.5). Cada valor corresponde a la fracción de membrana plasmática proveniente del tejido adiposo de animales independientes (n = 3-5 por grupo). * p < 0,05 significa diferencias estadísticamente significativas por test de t. FFMAS: *Follicular fluid meiosis-activating sterol*.

4.8. Adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan mayor abundancia del mRNA de genes reguladores del metabolismo de colesterol y de esfingolípidos.

Hasta el momento, hemos encontrado que adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados adipogénicamente *in vitro* a día 10 post inducción adipogénica poseen acúmulos intracelulares de colesterol, mayores niveles de esfingomielina y menores de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina; y su membrana plasmática presenta mayor contenido de fosfatidilglicerol a día 0 post diferenciación y fosfatidilserina a día 10 post diferenciación. El tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} a P4.5 posee acúmulos intracelulares de colesterol, niveles aumentados de ceramidas y disminuidos de distintas especies de fosfolípidos: fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina. Para comenzar a entender los mecanismos subyacentes a la alteración lipídica presente en adipocitos *Agpat2*^{-/-}, evaluamos los niveles de mRNA de genes clave para la regulación de lípidos en la célula, que están involucrados en la regulación de colesterol celular y esfingolípidos.

En cuanto a los genes relacionados al colesterol, evaluamos los siguientes: *Srebp2* (*Sterol regulatory element-binding protein 2*), factor de transcripción que regula los niveles de colesterol celular; *Hmg-CoaR* (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase*), enzima limitante de la biosíntesis de colesterol; *Srbl* (*Scavenger receptor class B type I*), *Lrp1* (*Lipoprotein receptor-related protein 1*) y *Ldlr* (*Low density lipoprotein receptor*), implicados en la captación de colesterol extracelular, y *Abca1* (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1*), involucrado en el eflujo de colesterol hacia aceptores extracelulares.

Como se muestra en la Figura 33, en los días 0 y 5 de diferenciación, no hay diferencias significativas entre genotipos en ninguno de los mRNA evaluados. Por el contrario, en el día 10 de diferenciación, adipocitos *Agpat2*^{-/-} poseen niveles significativamente mayores en el mRNA de todos

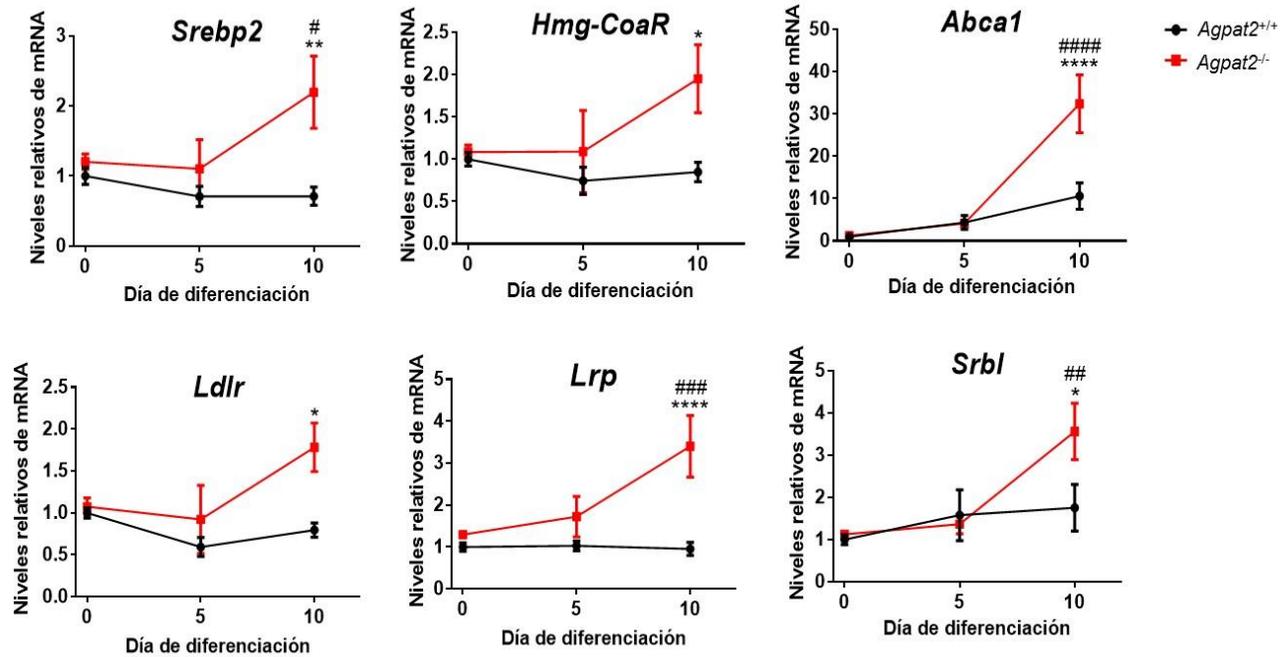


Figura 33: Niveles de mRNA de reguladores del metabolismo de colesterol en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. Los niveles de mRNA de cada gen fueron normalizados por los niveles de mRNA del gen 36B4 y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} en el día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde al promedio \pm DE de preadipocitos provenientes de 6 ratones independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ indica diferencias estadísticamente significativas en comparación a día 0 en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

Srebp2: Sterol regulatory element-binding protein 2; *Hmg-CoaR*: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase; *Srbl*: Scavenger receptor class B type I; *Abca1*: ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1; *Lrp*: Lipoprotein receptor-related protein; *Ldlr*: Low density lipoprotein receptor.

los genes evaluados. Estas diferencias corresponden a niveles mayores de 3,1 veces para *Srebp2*, de 2,5 veces para *Hmg-CoaR*, de 2 veces para *Srbl*, de 3,1 veces para *Abca1*, de 3,4 veces para *Lrp* y de 2,3 veces para *Ldlr*.

Además, al analizar los niveles de mRNA de estos genes a través del transcurso de la diferenciación, encontramos que en predipocitos *Agpat2^{+/+}* los niveles de mRNA se mantienen constantes con la diferenciación adipogénica, a diferencia de preadipocitos *Agpat2^{-/-}*, en el cual observamos que para los genes *Srebp2*, *Abca1*, *Lrp* y *Srbl* hay un aumento en los niveles de mRNA a día 10 post inducción adipogénica en comparación al día 0. Este incremento fue de 1,8 veces para *Srebp2*; 25 veces para *Abca1*; 2,6 veces para *Lrp* y 3,3 veces para *Srbl* en comparación al día 0 de diferenciación de adipocitos *Agpat2^{-/-}*.

Por tanto, adipocitos *Agpat2^{-/-}* presentan un aumento en el mRNA de genes reguladores de los niveles de colesterol a día 10 de diferenciación, lo cual sugiere una desregulación en los niveles y localización de colesterol en la célula, ya que el retículo endoplásmico estaría sensando que hay bajos niveles de colesterol por lo que aumentaría la transcripción de genes relacionados a la síntesis y de transportadores de colesterol.

Las células adquieren esfingolípidos a través de 2 fuentes: por biosíntesis *de novo* y por el reciclaje de esfingolípidos exógenos. Se ha sugerido que la mayor parte de los esfingolípidos de los adipocitos de ratones proviene de la biosíntesis *de novo* [70], por lo que analizamos el mRNA de genes que codifican para enzimas clave en la síntesis de esfingolípidos: *Sptlc2* (Serina palmitoil transferasa), que es la enzima limitante de la síntesis de esfingolípidos, la cual cataliza la condensación de palmitoil-CoA y serina para formar dehidroesfinganina; *Asah1* (Ceramidasa), enzima lisosomal que hidroliza la ceramida en esfingosina y ácido graso libre; *Smpd1* (Esfingomielinasa), que cataliza la degradación de la esfingomielina a ceramida y fosforilcolina; y

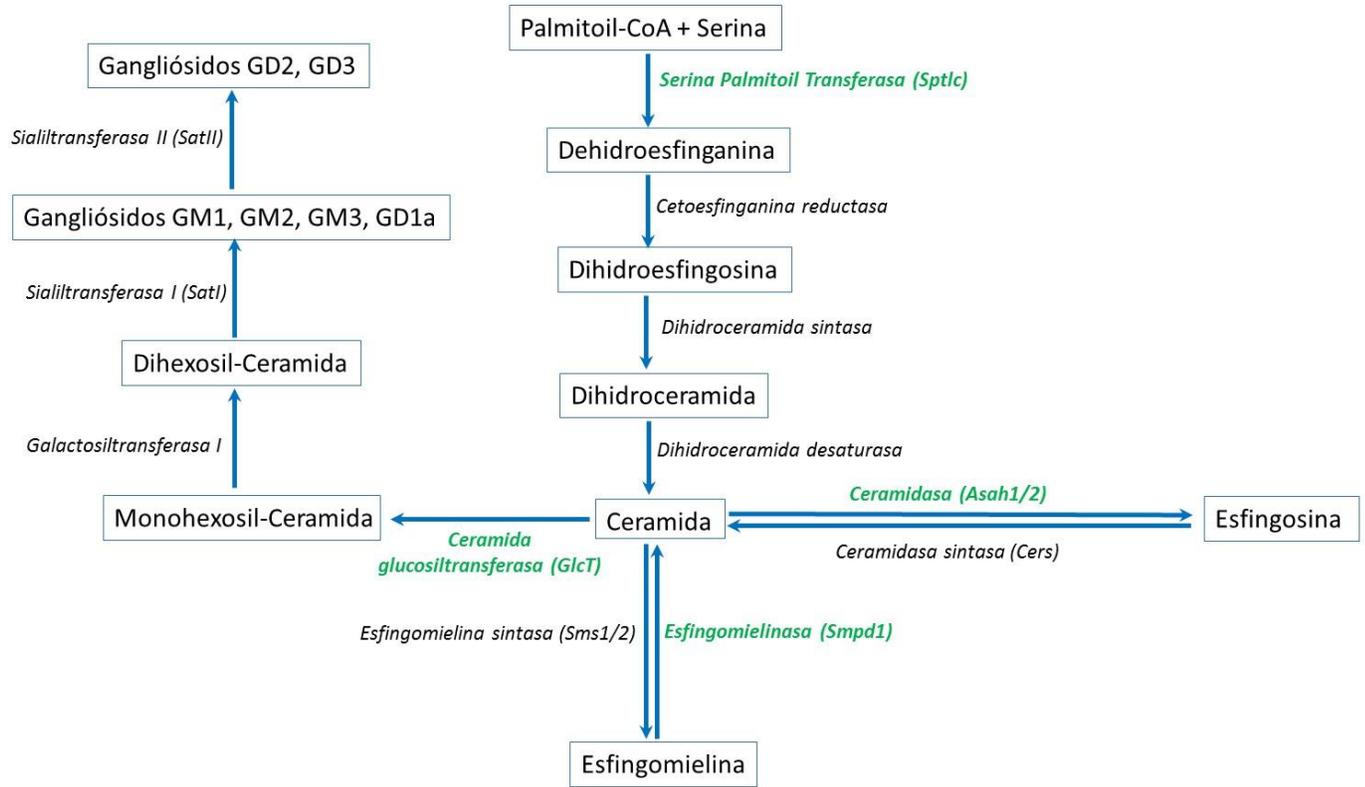
GlcT (Ceramida glucosiltransferasa), enzima que transfiere una molécula de glucosa a la ceramida, formando monohexosil-ceramida [115] (Figura 34A).

A día 0 y 5 post inducción adipogénica, no hay diferencias significativas en los niveles de mRNA de las diferentes enzimas evaluadas entre ambos genotipos. En comparación a adipocitos *Agpat2^{+/+}*, a día 10 post inducción adipogénica adipocitos *Agpat2^{-/-}* presentan mayor contenido de 6,8 veces en los niveles de mRNA de *Sptlc2*, de 8,1 veces de *Asah1*, de 4,1 veces de *Smpd1* y de 8,8 veces de *GlcT* (Figura 34B).

En relación a los cambios en los niveles de mRNA de los genes estudiados durante el transcurso de la diferenciación adipogénica, encontramos que en adipocitos *wild type* los niveles de mRNA de estos genes se mantienen constantes a lo largo de los diferentes días de diferenciación evaluados (días 0, 5 y 10). Por el contrario, en adipocitos *Agpat2^{-/-}* los niveles de mRNA de los genes *Sptlc2*, *Asah1*, *Smpd1* y *GlcT* fueron significativamente mayores en el día 10 post inducción adipogénica en comparación con el día 0, presentando un aumento de 3,7 veces para *Sptlc2*, de 7,5 veces para *Asah1*, de 3,2 veces para *Smpd1* y de 2,6 veces para *GlcT*. Esto sugiere que a día 10 post inducción adipogénica adipocitos *Agpat2^{-/-}* podrían tener una alteración en el metabolismo de esfingolípidos.

A

Vía de síntesis de esfingolípidos



B

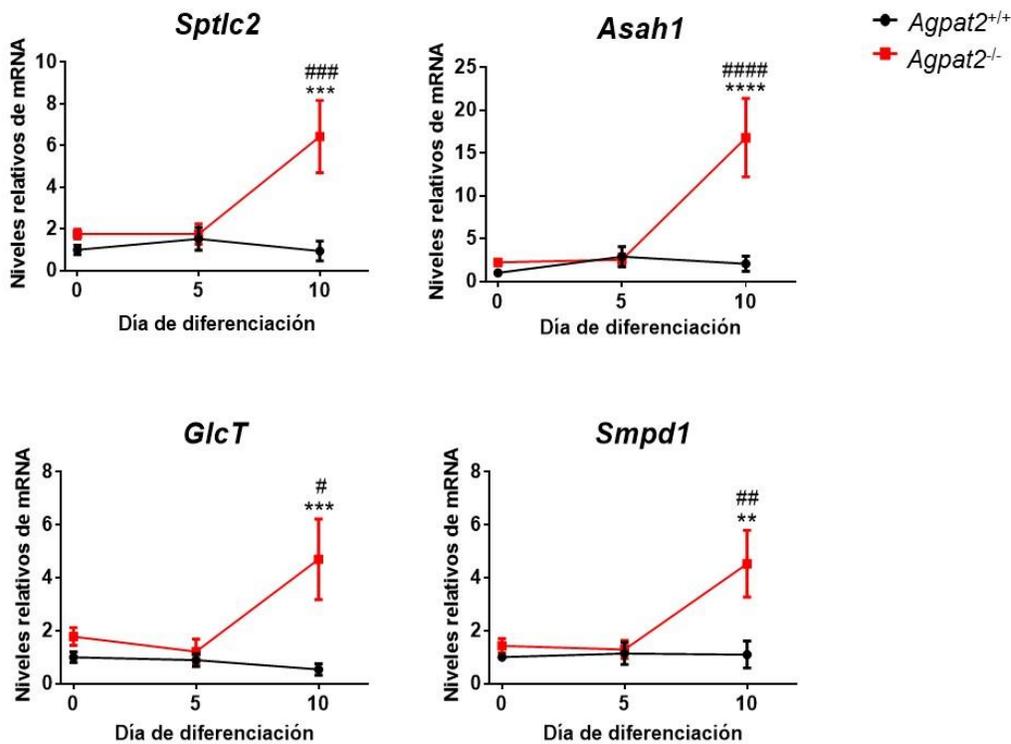


Figura 34: Niveles de mRNA de genes implicados en la síntesis de esfingolípidos en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. A) Esquema de la vía de síntesis de esfingolípidos. B) Niveles de mRNA de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *Agpat2*^{+/+} diferenciados adipogénicamente *in vitro*. Los niveles de mRNA de cada gen fueron normalizados por los niveles de mRNA del gen 36B4 y expresados como veces de cambio en comparación con adipocitos *Agpat2*^{+/+} en el día 0 de diferenciación. Cada valor corresponde al promedio ± DE de adipocitos provenientes de 6 ratones independientes. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas entre genotipos, en el mismo día post diferenciación. # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; #### p < 0,0001 indica diferencias estadísticamente significativas en comparación a día 0 en el mismo genotipo. Los valores de p fueron calculados por test de ANOVA de 2 vías y test *post hoc* de Tukey's.

Sptlc: Serine palmitoyltransferase; *Asah1*: Acid ceramidase; *Smpd1*: Sphingomyelinase; *GlcT*: Ceramida glucosiltransferasa.

Resumiendo, en esta tesis encontramos que adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2^{-/-}* y adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* presentan un número reducido de caveolas, lo cual no afecta los niveles basales de activación de la vía de señalización de insulina. La abundancia de caveolina-1 y cavina-1 en adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* es normal pero su localización subcelular parece estar alterada. Adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2^{-/-}* y adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* poseen acúmulos intracelulares de colesterol. Además, adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* presentan mayores niveles celulares totales de esfingomielina y menores de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina, mientras que el tejido adiposo *Agpat2^{-/-}* a edad postnatal P4.5 posee niveles aumentados de ceramidas y disminuidos de distintas especies de fosfolípidos: fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina. La membrana plasmática de los adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* tiene mayor contenido de fosfatidilglicerol al día 0 post diferenciación y fosfatidilserina al día 10 post diferenciación, sin diferencias en colesterol y esfingolípidos. Las alteraciones observadas en los niveles de lípidos se asociaría a que adipocitos *Agpat2^{-/-}* presentan mayores niveles de mRNA de genes reguladores del metabolismo de colesterol y de genes de síntesis de esfingolípidos.

5. DISCUSIÓN

En estudios previos de nuestro laboratorio mostramos que los ratones deficientes en la enzima AGPAT2 presentan una rápida destrucción de su tejido adiposo (blanco y pardo) durante la primera semana de vida postnatal [3]. Así mismo, encontramos que adipocitos diferenciados *in vitro*, tanto a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) [3] como desde preadipocitos presentes en la fracción estromal vascular del tejido adiposo interescapular [24], [96] presentan menor capacidad adipogénica, manifestada por una baja proporción de células que adquieren gotas lipídicas, la formación de gotas lipídicas de menor tamaño y menor abundancia de marcadores moleculares de adipocitos blancos y pardos maduros [24], [96].

En estos estudios también notamos que los adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo de ratones *Agpat2*^{-/-} así como en MEFs diferenciados adipogénicamente *in vitro* provenientes de ratones *Agpat2*^{-/-} presentan una marcada deficiencia en el número de caveolas en la membrana plasmática en comparación con adipocitos *wild type* [3]. Esta observación resulta particularmente importante en nuestra área de investigación, puesto que mutaciones en los genes codificantes para caveolina-1 y cavina-1 han sido asociadas a LCG en seres humanos y ratones deficientes en estos genes desarrollan defectos en el crecimiento del tejido adiposo (ratón *knock out* para caveolina-1) o bien son francamente lipodistróficos (ratón *knock out* para cavina-1), sugiriendo un rol central de las caveolas en la patogénesis de la LCG.

Estas observaciones nos condujeron a determinar, en esta tesis, si la disminución en el número de caveolas también afecta a los adipocitos del tejido adiposo pardo de los ratones *Agpat2*^{-/-} y evaluar si este fenómeno se asocia a alteraciones en los niveles de lípidos de la membrana plasmática (MP) que han sido previamente reconocidos como determinantes moleculares de las

caveolas (colesterol y esfingolípidos), y de las proteínas caveolina-1 o cavina-1, también previamente reconocidas como elementos necesarios para la normal formación y funcionamiento de estas estructuras de MP.

En relación a nuestro primer objetivo, en esta tesis logramos determinar que adipocitos del tejido adiposo pardo interescapular de los ratones *Agpat2*^{-/-}, en edades postnatales P0.5 y P2.5 presentan un número significativamente menor de caveolas (Figura 8), indicando que el déficit en el número de caveolas es un fenómeno transversal de los diferentes depósitos de tejido adiposo del ratón *Agpat2*^{-/-}. Esta observación es relevante por cuanto los adipocitos pardos “clásicos”, es decir, los que constituyen el tejido adiposo interescapular tienen un origen celular distinto al de los adipocitos blancos. En efecto, los primeros derivan de un linaje miocelular *Myf5*⁺ y expresan un conjunto de genes que les confieren capacidad termogénica bajo el control transcripcional de PRDM16 y PGC1 α . Por el contrario, los adipocitos blancos derivan de precursores mesenquimales *Myf5*⁻ y su perfil de expresión génica determina la formación de una única gota lipídica de gran tamaño y la secreción de diversos productos con actividad hormonal (adipoquinas) [116].

En el presente trabajo, también verificamos que el número reducido de caveolas ocurre en adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados adipogénicamente *in vitro* a partir de precursores del estroma vascular del tejido adiposo interescapular (Figura 9), y que por tanto es un fenómeno celular autónomo, no dependiente del contexto tisular y/o señales sistémicas exclusivamente presentes en los organismos completos.

En base a estos resultados, concluimos que nuestro modelo de diferenciación adipogénica *in vitro* es una herramienta experimental válida para determinar los mecanismos subyacentes a la deficiencia de caveolas en los adipocitos *Agpat2*^{-/-}.

La marcada disminución en el número de caveolas tanto en adipocitos pardos interescapulares como en adipocitos blancos subcutáneos de los ratones deficientes en AGPAT2, así

como en los adipocitos diferenciados *in vitro*, sugiere la existencia de mecanismos generales que previenen la formación de estas estructuras y que serían independientes del linaje celular y que posiblemente están relacionados con procesos relacionados al metabolismo celular común a todos los adipocitos, tales como captación y acumulación de grandes cantidades de ácidos grasos y colesterol.

En esta tesis también evaluamos la abundancia de caveolas en las células endoteliales del tejido adiposo pardo interescapular (Figura 10). No encontramos diferencias en el número de caveolas presentes en la membrana plasmática entre células endoteliales provenientes de ratones *Agpat2*^{-/-} y *wild type*. Sin embargo, para este experimento sólo contamos con un n = 1 por genotipo y realizamos la cuantificación en un número bajo de células (4 a 6 células), por lo que para poder concluir si este fenómeno de las caveolas es exclusivo de tejido adiposo y no de otros tipos celulares, es necesario aumentar el número de ratones analizados y además evaluar la abundancia de caveolas en otros tipos celulares en que estas estructuras son conocidamente abundantes, tales como células epiteliales del tubo digestivo y sistema hepatobiliar, células musculares y fibroblastos. Estas determinaciones se harán en futuros estudios para evaluar la posibilidad que estas anomalías sean aún más generales en los ratones deficientes en AGPAT2, sugiriendo roles de la enzima en los mecanismos de formación de caveolas en diversos tipos celulares.

5.1. Señalización dependiente de insulina y su relación con las caveolas

Para evaluar el impacto funcional de la reducción de caveolas en los adipocitos *Agpat2*^{-/-} en la actividad de vías de señalización dependientes de receptores de superficie celular presentes en la caveola, determinamos la activación basal de la vía de señalización de insulina (Figura 11), ya que se conoce que el receptor de insulina se localiza en caveolas [85] y que esta vía es esencial para la diferenciación adipogénica [117]. Contrario a nuestras predicciones, encontramos que los

adipocitos *Agpat2*^{-/-} poseen niveles equivalentes de fosforilación de las proteínas Akt y Erk que los adipocitos *wild type* en todos los días que siguieron a la inducción adipogénica, indicando que la activación basal de la vía de señalización de insulina no se ve afectada por la falta de caveolas. Concordantemente con esto, los niveles del receptor de insulina, no fueron diferentes entre genotipos en los días de diferenciación evaluados, lo cual implica que en circunstancias de disminución en la abundancia de caveolas, el receptor de insulina se localiza en otros dominios de la membrana plasmática, sin que su capacidad para ser activado por insulina se vea disminuida. En consecuencia, nuestros resultados nos permiten concluir que la carencia de caveolas no reduce la señalización insulínica basal en adipocitos *Agpat2*^{-/-}.

No obstante lo anterior, es importante destacar que el diseño de nuestros experimentos implica la evaluación de la activación de la señalización por insulina en estados basales, ya que los medios de cultivo de inducción y mantención utilizados fueron suplementados con insulina 20 nM, y la recolección de las muestras para cada uno de los días evaluados fue realizada 24 horas después del cambio de medio de cultivo. En consecuencia, se requerirán futuros experimentos de tratamiento con insulina a tiempos cortos para caracterizar completamente el impacto funcional de la carencia de caveolas sobre la señalización insulínica en adipocitos *Agpat2*^{-/-}. Adicionalmente, será importante evaluar otras vías activadas por receptores presentes en caveolas y que están implicadas en la función de los adipocitos, tales como la señalización β -adrenérgica y la dependiente del receptor de adiponectina [34], [86].

5.2. Alteración en localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 y sus posibles determinantes moleculares en adipocitos *Agpat2*^{-/-}.

Tal como se mencionó en la sección introductoria de esta tesis, las proteínas caveolina-1 y cavina-1 son esenciales para la formación de las caveolas, por lo que decidimos analizar los niveles

de estas proteínas en adipocitos *Agpat2*^{-/-}. Interesantemente, pese a la marcada disminución de caveolas de los adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro*, no encontramos diferencias en los niveles celulares totales de estas proteínas (Figura 12), por medio de la técnica de *western blot*, entre ambos genotipos en ninguno de los días de diferenciación evaluados. Dado este resultado, decidimos explorar la posibilidad que defectos en la localización subcelular de estas proteínas fuera un determinante de la disminución de las caveolas en los adipocitos deficientes en AGPAT2. Nuestros análisis de inmunofluorescencia confocal (Figura 13) mostraron que en adipocitos *wild type* ambas proteínas poseen una distribución predominante en la periferia de las células, compatible con localización en la membrana plasmática. Por el contrario, en adipocitos *Agpat2*^{-/-} estas proteínas fueron detectadas en agregaciones intracelulares. Si bien el análisis de la localización subcelular de caveolina-1 y cavina-1 en tejido adiposo (Figura 14) muestra una marca celular periférica menos definida y de intensidad más heterogéneas en tejido adiposo *Agpat2*^{-/-}, no es posible definir con la técnica utilizada (microscopía confocal) si la localización de estas proteínas es citoplasmática o de membrana. La razón de esto es que en adipocitos maduros la gota lipídica ocupa la mayor parte del volumen celular, siendo el citoplasma indetectable con este tipo de imágenes. Por lo tanto, se necesitarían de reconstrucciones tridimensionales del tejido o realizar un fraccionamiento subcelular y analizar mediante *western blot* la presencia de caveolina-1 y cavina-1 en las distintas fracciones para poder aseverar que hay una deslocalización de estas proteínas en el tejido.

Interesantemente, ha sido reportado que mientras la localización en membrana plasmática de ambas proteínas es necesaria para la formación de caveolas [53], la retención o acumulación de caveolina-1 en compartimentos intracelulares determina un número menor de caveolas en la membrana plasmática [118]. Generalmente, el pool de caveolina-1 presente en la MP de los adipocitos parece ser relativamente inmóvil, a menos que las células sean estimuladas, por ejemplo,

con la adición de ácido okadaico para inducir la despolimerización de actina, o por medio de agentes que causen la internalización de la caveola [119]. En ese sentido, un estudio realizado por Cubells y colaboradores encontró que células que expresan altos niveles de Anexina A6 se caracterizan por acumulación de caveolina-1 en el aparato de Golgi, y estas células muestran una reducción significativa del número de caveolas de la MP [118]. También se ha reportado que caveolina-1 en la membrana plasmática puede translocar a compartimentos intracelulares tras estímulos específicos. En un trabajo de Smart y colaboradores, se mostró que la oxidación de colesterol caveolar mediante tratamiento con la enzima colesterol oxidasa rápidamente desplaza caveolina-1 desde la MP hacia vesículas intracelulares que colocalizan con marcadores del aparato de Golgi [120]. Además, como se indica en la sección introductoria 1.3.4, la caveola puede desensamblarse ante ciertos estímulos, tales como un aumento de la tensión de la membrana o por exceso de ácidos grasos, y oligómeros de caveolina-1 y cavina-1 pueden ser internalizados y se translocados a compartimentos intracelulares, desde donde pueden ser reciclados a la MP y formar nuevas caveolas o, eventualmente ser degradadas por vía lisosomal [30]. Es importante destacar que se ha observado que alteraciones en el tráfico de caveolina-1 se asocian a enfermedades humanas. En pacientes con hipertensión arterial pulmonar genética, se han descrito mutaciones en el gen *CAV1* que determinan la generación de una señal de retención en el retículo endoplásmico (RE) en el extremo C-terminal de caveolina-1, que inhibe su exportación desde el RE y, por lo tanto, su destinación a MP, impidiendo así la formación de caveolas [121]. Interesantemente, estudios con fibroblastos cultivados de estos pacientes mostraron reducción significativa en la resistencia al estrés hipoosmolar, avalando así la función de la caveola como una estructura protectora de la integridad física de la MP [121]. Por otro lado, se ha reportado que mutaciones en caveolina-3 asociadas a distrofia muscular de la cintura tipo 1C, determinan acumulación de caveolina-3 en el aparato de Golgi, asociada a defectos en el tráfico de caveolina-3 hacia la MP [122].

Un factor determinante de la distribución intracelular de caveolina es la abundancia de colesterol celular [118], [119], por lo que anomalías en la abundancia o tráfico de colesterol en adipocitos *Agpat2*^{-/-} podría causar las anomalías en la localización subcelular de caveolina-1 y de cavina-1 en estas células, impidiendo que éstas se transloquen a la MP, y por lo tanto, reduciendo la abundancia de caveolas. En el estudio realizado por Cubells y colaboradores, se describió que el aumento del contenido de colesterol en endosomas tardíos y su disminución en la MP y aparato de Golgi inhiben la exportación de caveolina-1 desde el Golgi [118]. En otro estudio, se observó que la sobrecarga de colesterol por medio de su adición a complejos con ciclodextrina en células 3T3-L1, una línea celular tradicionalmente usada en estudios de adipogénesis *in vitro*, estimula la translocación de caveolina-1 a gotas lipídicas [91].

Otro factor potencialmente determinante para la función y localización de caveolina-1 y cavina-1 y su participación en la formación de la caveola son modificaciones post traduccionales a las cuales están sometidas, las cuales pudieran estar alteradas en adipocitos *Agpat2*^{-/-}. Por ejemplo, caveolina-1 es susceptible a fosforilación, acilación y ubiquitinación. La fosforilación en tirosina 14 se requiere para la endocitosis mediada por caveola, y fosforilación en serina 80 localiza a caveolina-1 en el retículo endoplásmico y permite su ingreso a la vía secretora y posterior destinación a la membrana plasmática [123]. Caveolina-1 puede ser ubiquitinada en los residuos de lisina 5, 26, 30, 39, 47 y 57 presentes en la región N-terminal de la proteína, lo cual es necesario para el correcto tráfico hacia endosomas tardíos y recambio de caveolina-1 [124]. Por el contrario, la ubiquitinación en lisina 176 es necesaria para la formación de oligómeros de esta proteína [125]. También, se ha reportado que caveolina-1 es acilada en residuos de cisteína por ácido palmítico y por ácido esteárico. Se ha sugerido que esta acilación puede ser importante para la destinación de caveolina-1 a la membrana y por ende a la formación de la caveola [126], pero otros estudios afirman que esta

acilación no es importante para la localización de caveolina-1 en caveola, sino más bien para la estabilización de la estructura terciaria de la proteína [127].

Cavina-1 también presenta diversas modificaciones post traduccionales: fosforilación, acetilación y ubiquitinación. Se ha reportado que en tejido adiposo blanco de ratón, cavina-1 se acetila en residuos de lisina 291, 293 y 298, lo cual es regulado por el estado nutricional del animal. Al estar acetilada, cavina-1 recluta la enzima lipasa sensible a hormona en la caveola, promoviendo así la lipólisis [128]. Cavina-1 también posee múltiples sitios de fosforilación. Cavina-1 es rápidamente fosforilada en adipocitos en cultivo cuando éstos son estimulados con agentes lipolíticos. Hasta el momento, se ha reportado que fosforilación en serina 365 y/o serina 366 se relaciona al ensamblaje de caveolas. Además, la fosforilación en residuos de serina o treonina inducida por insulina se asocia a pérdida de cavina-1 en membrana plasmática [129]. Además, se ha visto que el sitio de unión a lípidos fosfoinosítidos de cavina-1 también es un sitio de ubiquitinación. La liberación de cavina-1 desde la caveola al citosol produce la exposición de lisinas claves para ser ubiquitinadas, lo cual induce la degradación proteosomal de esta proteína. A través de este mecanismo las células mantienen bajos niveles citosólicos de cavina-1 [130].

Por lo tanto, en futuros estudios se deberá explorar sistemáticamente el patrón de modificaciones post traduccionales de estas proteínas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} como un potencial mecanismo de su localización subcelular anormal.

5.3. La composición lipídica celular total de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y su potencial importancia en la abundancia de caveolas, adipogénesis y muerte lipotóxica.

Está ampliamente demostrado que la disminución de los niveles de colesterol en la MP induce pérdida de caveolas [59], [60], [131]. En esta tesis evaluamos la presencia de depósitos de

colesterol por medio de métodos de fluorescencia confocal con la sonda PFO-GST y cuantificamos su concentración en homogenizados celulares totales por métodos enzimáticos, así como directamente por HPLC acoplado a MS. También cuantificamos otros lípidos que están enriquecidos (esfingomielina) o presentan una composición particular (fosfolípidos) en las caveolas.

Además del papel central de almacenamiento de triglicéridos, el tejido adiposo es el principal depósito de colesterol del organismo [132]. Sin embargo, en estas células el colesterol está integrado en la monocapa fosfolipídica que recubre la superficie de las gotas lipídicas y, por lo tanto, se encuentra exclusivamente como colesterol no esterificado (“libre”). Por su parte, el colesterol esterificado es solo una pequeña fracción del colesterol total de los adipocitos y se encuentra en el núcleo de lípidos neutros de las gotas lipídicas [133].

Por medio de la sonda recombinante PFO-GST, encontramos que en ratones *Agpat2*^{-/-} los adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo en edades P0.5 y P2.5 y del tejido adiposo pardo interescapular a la edad de P4.5 presentan acúmulos intracelulares de colesterol libre (Figura 22), y estas formaciones no fueron detectables en ninguno de los especímenes analizados del tejido adiposo de ratones *wild type* hermanos de camada de las mismas edades. Similarmente, en nuestro modelo *in vitro* encontramos que solo los adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentaron acúmulos de colesterol libre, detectables solo en el día 10 post inducción adipogénica (Figura 15). Es importante mencionar que la sonda PFO-GST detecta solo depósitos de acúmulos de colesterol, y necesita de un umbral de concentración de colesterol para presentar marca positiva [134]. Es por esto que en adipocitos *wild type* no logramos detectar el colesterol de membranas, en especial el colesterol presente en la membrana de la gota lipídica, que es donde se espera encontrar la mayor parte del colesterol en los adipocitos *wild type*. Por lo tanto, esta sonda no permite cuantificar colesterol pero si determinar la presencia de acúmulos de este lípido.

La acumulación de colesterol libre es citotóxica y podría ser un mecanismo que contribuye a la muerte de los adipocitos durante la primera semana de vida en los ratones *Agpat2*^{-/-}. En efecto, en la enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPC), se acumula colesterol y gliceroesfingolípidos en endosomas y lisosomas, resultando en neurodegeneración y esteatohepatitis no alcohólica grave. En la xantomatosis cerebrotendinosa existe disminución en la capacidad del hígado para convertir el colesterol en ácidos biliares, llevando a la acumulación de depósitos tóxicos de colesterol en el cerebelo y otros tejidos [98]. Si bien en nuestro modelo *in vitro* no se observa muerte celular de los adipocitos *Agpat2*^{-/-}, experimentos realizados en nuestro laboratorio en que adipocitos diferenciados adipogénicamente *in vitro* se someten a cantidades elevadas de ácido palmítico, se encontró que los adipocitos *Agpat2*^{-/-} son más susceptibles a la muerte celular que adipocitos *wild type* [96]. Por lo tanto, en futuros estudios evaluaremos el rol del colesterol intracelular en la muerte celular lipotóxica de los adipocitos *Agpat2*^{-/-}, por ejemplo, forzando la remoción de colesterol celular por medio de ciclodextrina. Además, la menor abundancia de caveolas en estos adipocitos, pudiera también promover su muerte lipotóxica, considerando el rol de estas estructuras en la protección contra los ácidos grasos extracelulares.

Por otro lado, se ha descrito que caveolina-1 participa de la regulación de la homeostasis de colesterol intracelular, y puede modular la actividad de proteínas que están involucradas en la regulación del colesterol intracelular [135]. Por lo tanto, la localización anormal de caveolina-1 puede promover, por su parte, contribuir a la alteración de colesterol en adipocitos *Agpat2*^{-/-}.

Si tomamos en cuenta que nuestras cuantificaciones bioquímicas y por espectrometría de masa del colesterol en adipocitos diferenciados *in vitro* y en el tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} no muestran diferencias con células y tejidos controles (Figuras 16, 18, 24) pero los estudios realizados con la sonda PFO-GST muestran que adipocitos *Agpat2*^{-/-} presentan acúmulos de colesterol, podemos concluir que en estas células existe una distribución celular de colesterol

anormal. Si esto es así, es de esperarse que no haya diferencias en la concentración de colesterol total en la célula, ya que en la diferenciación *in vitro* existen células *Agpat2^{-/-}* que no presentan acumulación de colesterol, además de un alto porcentaje de células no diferenciadas; y dado que las gotas lipídicas poseen abundante colesterol, en la medición bioquímica del homogenizado total de los cultivos podría enmascarar diferencias solo detectables por análisis de células individuales.

En esta tesis no realizamos un estudio exhaustivo de la localización subcelular de los acúmulos de colesterol observados en adipocitos *Agpat2^{-/-}*, sino que solamente se estudió su colocalización con el marcador de lisosoma Lamp1 (Figura 15B), que es el organelo en el que suele acumularse el colesterol en otras enfermedades, tales como Niemann Pick tipo B o tipo C. Encontramos que la colocalización de colesterol y Lamp1 es baja. Es necesario realizar estudios de colocalización con marcadores de otros organelos en conjunto con experimentos de fraccionamiento subcelular para definir el compartimento subcelular en el que ocurre la acumulación de colesterol en los adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados.

Nuestro análisis lipidómico por espectrometría de masas, nos reveló que, en comparación a adipocitos *wild type*, los adipocitos *Agpat2^{-/-}* en el día 10 post inducción adipogénica presentan un aumento significativo en uno de los intermediarios de la biosíntesis de colesterol (7-dehidrodesmosterol) (Figura 18), sugiriendo mayor actividad de la vía del mevalonato, conducente a la biosíntesis de colesterol. Concordantemente, la cuantificación de la abundancia de reguladores del metabolismo del colesterol (Figura 33) nos mostró que los adipocitos *Agpat2^{-/-}* presentan mayores niveles en el mRNA de *Hmg-CoAR* y *Srebp2*, implicados en la biosíntesis de colesterol, sugiriendo que adipocitos *Agpat2^{-/-}* podrían presentar un aumento en la tasa de síntesis de colesterol. Sin embargo, también se encontraron niveles elevados de genes relacionados al influjo (*Ldlr*, *Srbl*, *Lrp*) y al eflujo (*Srbl*, *Abca1*) de colesterol, lo cual podría estar equilibrando los niveles

totales de colesterol en la célula, lo cual concuerda con que en la cuantificación bioquímica del colesterol no haya diferencias significativas entre adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *wild type*.

El incremento en la abundancia de *Srebp2* y de sus genes blanco cuantificados en este estudio (*Hmg-CoAR* y *Ldlr*) es compatible con una menor concentración de colesterol en la membrana del retículo endoplásmico de los adipocitos *Agpat2*^{-/-}. Esta interpretación es coherente con nuestra observación de acumulación de colesterol en compartimentos intracelulares en estas células, lo que podría resultar en un tráfico anormal de este lípido, tal como ocurre, por ejemplo en la enfermedad de NPC. No obstante, hay que tener presente que todas estas alteraciones solo fueron detectadas en tiempos tardíos de diferenciación adipogénica (día 10), por lo que es improbable que estén relacionadas causalmente con los defectos adipogénicos de los adipocitos deficientes en AGPAT2, sino que más bien parecen ser una consecuencia de ellos.

Sin embargo, es importante notar que si bien en nuestros estudios la presencia de acúmulos de colesterol en adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* solo pudo ser verificada en tiempos tardíos de diferenciación (día 10), la localización subcelular alterada de caveolina-1 y cavina-1, fue observada a días más tempranos (día 5 de diferenciación). La discordancia temporal entre estos dos fenómenos sugiere que la deslocalización de estas proteínas podría ser explicada, en nuestro sistema experimental, por un tráfico alterado de colesterol solo a días tardíos de diferenciación. Similarmente, es improbable que estas alteraciones en el manejo celular del colesterol sean la causa de la adipogénesis anormal de los adipocitos deficientes en AGPAT2, puesto que son evidentes en tiempos tardíos de este proceso, sino que más bien podrían corresponder a una consecuencia que esté contribuyendo a la destrucción del tejido adiposo por mecanismos lipotóxicos.

Por otro lado, los niveles celulares de esfingomielinas totales en el día 10 de diferenciación en adipocitos *Agpat2*^{-/-} son mayores que los de adipocitos *wild type* (Figura 20), al igual que los niveles de mRNA de enzimas involucradas en la síntesis de esfingolípidos (Figura 34).

Adicionalmente, el análisis de la composición de diversas especies de esfingolípidos mostró que una especie particular de esfingomielina (38 átomos de carbono) fue detectada exclusivamente en adipocitos *Agpat2^{-/-}*. También fue posible detectar que en adipocitos *Agpat2^{-/-}* hubo un aumento de 2 veces en los niveles totales de esfingomielina durante el transcurso de la diferenciación adipogénica (día 0 v/s 10 post inducción adipogénica en adipocitos *Agpat2^{-/-}*).

En el tejido adiposo pardo de ratones *Agpat2^{-/-}*, sin embargo, no se verificó este aumento de esfingomielina (Figura 26), sino que, por el contrario, se encontraron niveles significativamente mayores de ceramidas y monohexosilceramidas en el día P4.5 en comparación con ratones *wild type* de la misma edad. Interesantemente, se conoce que el exceso de ceramidas es un inductor potente de muerte celular programada [136], por lo cual estos lípidos podrían estar involucrados en la destrucción inflamatoria postnatal del tejido adiposo en los ratones *Agpat2^{-/-}*.

En cuanto a los fosfolípidos, nuestro análisis lipidómico reveló que los adipocitos *Agpat2^{-/-}* en el día 10 de diferenciación presentan niveles totales disminuidos de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina en comparación con adipocitos *wild type* (Figura 21). La fosfatidiletanolamina es un fosfolípido abundante en la mitocondria, esto podría tener relación con la morfología anormal de las mitocondrias observada en adipocitos *Agpat2^{-/-}* [3], [96]. La importancia potencial de los menores niveles celulares totales de estos fosfolípidos en la biología de las caveolas en los adipocitos deficientes en AGPAT2 permanece desconocida y será materia de futuras investigaciones.

Pese a estos cambios en los adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados *in vitro*, no encontramos cambios en la abundancia relativa de los distintos fosfolípidos en el tejido adiposo pardo interescapular en ratones de edad P2.5 de ambos genotipos (Figura 27). Por el contrario, en animales de edad P4.5, encontramos que tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2^{-/-}* presenta menores niveles totales de fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico,

lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina, en comparación con tejido proveniente de ratones *wild type* hermanos de camada. Cabe destacar que la medición realizada de estos lípidos es un homogenizado total del tejido y que a la edad de P4.5 el tejido adiposo de los ratones *Agpat2*^{-/-} presenta alteraciones histológicas compatibles con muerte de adipocitos e infiltración de células inflamatorias [3]. Por este motivo, estos cambios en la composición de fosfolípidos son más probablemente consecuencia de la degeneración del tejido adiposo de estos animales antes que su causa.

Con los experimentos realizados en esta tesis, no es posible dilucidar si los niveles alterados de fosfolípidos encontrados en adipocitos *Agpat2*^{-/-} y en tejido adiposo de ratones *Agpat2*^{-/-} son consecuencia directa de la deficiencia de AGPAT2 o si son una consecuencia del metabolismo anormal de lípidos asociada a la adipogénesis deteriorada observada en adipocitos *Agpat2*^{-/-}.

Si bien AGPAT2 cataliza la síntesis de PA a partir de LPA, en nuestros resultados encontramos que adipocitos *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* no poseen diferencias en los niveles de PA en comparación a adipocitos *Agpat2*^{+/+} (Figura 21) ni tampoco en tejido adiposo pardo a edad P2.5 (Figura 27). Interesantemente, MEFs *Agpat2*^{-/-} diferenciados *in vitro* poseen niveles elevados de PA [3], al igual que en otros modelos de adipogénesis deteriorada, tales como células 3T3 en que se realizó un *knock-down* de la proteína Seipin o en células OP9 en que se realizó un *knock down* de *Agpat2* [137], [138]. En ratones que carecen de la proteína Seipin específicamente en el tejido adiposo, también presentan niveles elevados de PA en diferentes depósitos de tejido adiposo blanco y pardo [139], así como el hígado de ratones deficientes en AGPAT2 [140]. El fenómeno de que PA no presente menores niveles en adipocitos *Agpat2*^{-/-} puede ser explicado porque existen otras vías metabólicas que sintetizan PA, las cuales podrían estar activadas. Además de la vía de síntesis de glicerolípidos en la cual participa AGPAT2, PA también puede ser generado por hidrólisis de fosfatidilcolina o cardiolipina por acción de la enzima fosfolipasa D [141]; por fosforilación de DAG

a través de las enzimas DAG quininas [142]; o por la adición de una cadena de ácido graso al LPA a través de la acción de enzimas LPA acil transferasas que no pertenecen a la familia de AGPATs o también por otras isoformas de AGPATs [23]. Interesantemente, se ha encontrado que el hígado de ratones *Agpat2*^{-/-} posee mayores niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas DAG quininas y fosfolipasa D [140] y de otras isoformas de AGPATs: *Agpat1*, *Agpat3*, *Agpat5*, y *Agpat8* [2].

El hecho de que el PA no cambie en adipocitos *Agpat2*^{-/-}, los cuales poseen bajos niveles de triglicéridos (Figura 19), sugiere que la deficiencia de AGPAT2 afecta la disponibilidad de PA para la síntesis de triglicéridos pero no la síntesis de PA ni su uso para la síntesis de otras especies de fosfolípidos.

5.4. La composición lipídica de la membrana plasmática de adipocitos *Agpat2*^{-/-} y su potencial importancia en la abundancia de caveolas y adipogénesis.

El análisis de la composición lipídica de la MP en los días 0 y 10 post inducción adipogénica no mostró diferencias significativas en los niveles de colesterol entre adipocitos *Agpat2*^{-/-} y *wild type* (Figura 29 y 32), lo cual, en principio, permite descartar que menores niveles de colesterol en la MP sean la causa de la menor abundancia de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-}. Tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles de esfingolípidos de la MP (Figura 30). Sin embargo, es muy importante reconocer que la heterogeneidad intrínseca de la población celular en los cultivos de adipocitos *Agpat2*^{-/-}, en los que una alta proporción de células no adquiere gotas lipídicas (~80 %) [24], [96] no permite formalmente descartar que efectivamente las células *Agpat2*^{-/-} que carecen de caveolas sí presenten menores niveles de colesterol en su MP, producto de alteraciones en el tráfico intracelular de este lípido o de las proteínas caveolina-1 y cavin-1.

En ese sentido, una observación importante es que la MP de adipocitos *Agpat2*^{-/-} en el día 0, es decir en su etapa de preadipocito, presentó niveles elevados de fosfatidilglicerol total (Figura 31), en comparación a adipocitos *wild type*. En estudios previos de nuestro laboratorio encontramos que en este estadio de diferenciación no existen mayores diferencias en el perfil global de expresión génica, analizado por microarray de RNA [96], como tampoco diferencias en la ultraestructura celular analizada por microscopía electrónica, sugiriendo que los mayores niveles de fosfatidilglicerol en las células *Agpat2*^{-/-} pudiera depender estrictamente de la deficiencia de la acción enzimática de AGPAT2 y tener un rol causal en la incapacidad adipogénica de estas células. No obstante, hay que considerar que el fosfatidilglicerol es un fosfolípido poco abundante en la MP de mamíferos (1-2% de los fosfolípidos totales) y no cumple roles estructurales en ella. Se ha sugerido que la principal función del fosfatidilglicerol es ser precursor de cardiolipina, un fosfolípido presente exclusivamente en las mitocondrias y que es esencial para la estructura altamente plegada de la membrana mitocondrial interna, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa [143]. En estudios actualmente en curso en nuestro laboratorio estamos estudiando detalladamente la estructura y función mitocondrial en adipocitos *Agpat2*^{-/-}, así como la abundancia y composición de ácidos grasos de la cardiolipina celular [144]. Por lo tanto, desbalances en el contenido de fosfatidilglicerol y de su composición específica de ácidos grasos podría determinar anomalías en la abundancia y composición de cardiolipina y por tanto, disfunción mitocondrial.

También en el día 0 de diferenciación, encontramos un aumento de ácido mirístico (14:0) y ácido oleico (18:1) asociados a fosfatidilglicerol (Figura 31). Se ha demostrado que la modificación de ácidos grasos presente en la membrana plasmática produce una alteración en la fluidez de la membrana o en la composición de microdominios específicos de membrana. Esto afecta una serie de funciones celulares, que incluye cambios en el transporte mediado por receptores, en la unión de ciertas enzimas a la membrana, en la actividad de receptores de membrana, en la unión de

moléculas de señalización a sus receptores, en la fagocitosis, en endocitosis, en exocitosis dependiente de despolarización y en el crecimiento celular [145]. El largo y el grado de insaturación de los ácidos grasos determina su impacto en las propiedades biofísicas de la membrana: ácidos grasos saturados con cadenas cortas forman membranas menos viscosas, y ácidos grasos no saturados forman membranas más fluidas, y mientras más dobles enlaces tenga, más fluida será la membrana [146], [147]. Por lo tanto, el aumento del ácido mirístico (14:0) y ácido oleico (18:1) integrados en el fosfatidilglicerol y por lo tanto posiblemente presentes también en cardiolipina, podrían influir en las propiedades biofísicas de las membranas (posiblemente mitocondriales) alterando su función y fluidez.

La MP de preadipocitos *Agpat2*^{-/-} presentó niveles aumentados de fosfatidilserina total en el día 10 de diferenciación (Figura 31), en comparación con adipocitos *wild type*. En un estudio reciente se mostró que fosfatidilserina regula el ensamblaje y dinámica de la caveola en la membrana plasmática e induce la interacción entre las proteínas caveolina-1 y cavina-1 [73]. Sin embargo, en este estudio analizaron los efectos de la disminución de los niveles de este fosfolípido, sin que se abordaran los efectos de sus niveles aumentados. Por tanto, serán necesarios futuros estudios para determinar el rol del aumento en los niveles de fosfatidilserina sobre la formación y mantención de las caveolas en adipocitos, así como su rol en los defectos adipogénicos de los adipocitos *Agpat2*^{-/-}.

En el día 10 de diferenciación encontramos una composición diferente de ácidos grasos en la fosfatidilserina de la MP de los adipocitos deficientes en AGPAT2, con mayores niveles de ácido esteárico (18:0) y ácido eicosatetraenoico (20:4) (Figura 31). Dado que la fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra en altas concentraciones en la MP, el aumento de estos ácidos grasos también podría modificar la fluidez de la membrana, eventualmente contribuyendo a la muerte celular observada con concentraciones elevadas de ácido palmítico [96].

En cuanto a los esteroides, encontramos que la MP de preadipocitos *Agpat2*^{-/-} en el día 10 de diferenciación adipogénica presenta mayores concentraciones de 8(9)-dehidrocolesterol (Figura 29); y que la MP de tejido adiposo pardo interescapular de ratones *Agpat2*^{-/-} a edad P0.5 presenta mayores niveles de FFMAS y zimosterol (Figura 32). Estos compuestos corresponden a intermediarios de la vía del mevalonato. Sin embargo, todas las enzimas involucradas en esta vía que conduce a la síntesis de colesterol, están en el RE. Por otro lado, dada la alta sensibilidad de nuestros métodos lipídicos, pensamos que su detección en nuestras fracciones purificadas de MP, puede corresponder a contaminación remanente de membrana de RE. El hecho de que 8(9)-dehidrocolesterol esté aumentado en adipocitos *Agpat2*^{-/-} es compatible con una mayor actividad biosintética de colesterol en estas células, tal como se discutió en la sección anterior. Por otro lado, algunos metabolitos de la vía del mevalonato son también moléculas de señalización. Por ejemplo, lanosterol y dihidrolanosterol promueven la degradación de la enzima HMG-CoAR vía proteosoma [148]. Sin embargo, ninguno de los intermediarios cuyos niveles están elevados en la preparación de MP de los adipocitos *Agpat2*^{-/-} ha sido relacionado con algún papel en la regulación del colesterol o alguna otra función en la célula. En un trabajo de Megha y colaboradores, mostraron que precursores de colesterol (principalmente lanosterol y 7-dehidrocolesterol, y en menor medida lanosterol, dihidrolanosterol, zimosterol, zimostenol y desmosterol) incrementaban la estabilidad de balsas lipídicas (*lipid rafts*) ricas en ceramidas en la MP [149].

Considerando todos los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir que el número reducido de caveolas en adipocitos *Agpat2*^{-/-} se asocia a niveles elevados de fosfatidilglicerol en el estado de preadipocito (día 0 post inducción adipogénica) y a niveles elevados de fosfatidilserina en el estado de adipocito (día 10 post inducción adipogénica). Además, es posible que alteraciones en la distribución celular de caveolina-1 y cavina-1 contribuyan al déficit en el número de caveolas. Proponemos que estas alteraciones conducen a un tráfico anormal de colesterol, que determina la

presencia de acúmulos intracelulares de este lípido y mayor actividad biosintética de colesterol, producto de su retención en compartimentos que previenen su destinación normal a la membrana del RE. Por otro lado, la deficiencia de caveolas podría promover o facilitar la muerte celular lipotóxica de los adipocitos *Agpat2^{-/-}*, producto de su mayor sensibilidad a ácidos grasos y también por el exceso de depósitos intracelulares de colesterol (Figura 35).

6. CONCLUSIONES

1. Los adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2^{-/-}* y adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* presentan un número reducido de caveolas.
2. Los niveles basales de activación de la vía de señalización de insulina son equivalentes entre adipocitos *Agpat2^{-/-}* y *wild type* diferenciados *in vitro*.
3. La abundancia de caveolina-1 y cavina-1 celular total en adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* es normal pero ambas se acumulan en compartimentos intracelulares.
4. Los adipocitos del tejido adiposo de ratones *Agpat2^{-/-}* y adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* presentan acúmulos intracelulares de colesterol.
5. Los adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* presentan mayores niveles celulares totales de esfingomielina y menores de fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina, mientras que el tejido adiposo *Agpat2^{-/-}* en ratones de edad P4.5 posee niveles aumentados de ceramidas y disminuidos de distintas especies de fosfolípidos: fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina.
6. Los adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* presentan mayores niveles de mRNA de genes reguladores del metabolismo de colesterol y de genes de síntesis de esfingolípidos.
7. La membrana plasmática de los adipocitos *Agpat2^{-/-}* diferenciados adipogénicamente *in vitro* tiene mayor contenido de fosfatidilglicerol a día 0 post diferenciación y fosfatidilserina a día 10 post diferenciación, sin diferencias en colesterol y esfingolípidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. K. Agarwal and A. Garg, "Congenital generalized lipodystrophy: Significance of triglyceride biosynthetic pathways," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 14, no. 5, pp. 214–221, 2003.
- [2] V. A. Cortés, D. E. Curtis, S. Sukumaran, X. Shao, V. Parameswara, S. Rashid, A. R. Smith, J. Ren, V. Esser, R. E. Hammer, A. K. Agarwal, J. D. Horton, and A. Garg, "Molecular mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance in the AGPAT2-deficient mouse model of congenital generalized lipodystrophy," *Cell Metab.*, vol. 9, no. 2, pp. 165–176, Feb. 2009.
- [3] K. M. Cautivo, C. O. Lizama, P. J. Tapia, A. K. Agarwal, A. Garg, J. D. Horton, and V. A. Cortés, "AGPAT2 is essential for postnatal development and maintenance of white and brown adipose tissue," *Mol. Metab.*, vol. 5, no. 7, pp. 491–505, 2016.
- [4] N. Patni and A. Garg, "Congenital generalized lipodystrophies — new insights into metabolic dysfunction," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 11, no. 9, pp. 522–534, 2015.
- [5] T. Meshulam, M. R. Breen, L. Liu, R. G. Parton, and P. F. Pilch, "Caveolins / caveolae protect adipocytes from fatty acid-mediated lipotoxicity," *J Lipid Res*, vol. 52, no. 8, pp. 1526–1532, 2011.
- [6] D. Moseti, A. Regassa, and W. Kim, "Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 124, pp. 1–24, 2016.
- [7] L. Luo and M. Liu, "Adipose tissue in control of metabolism," *J. Endocrinol.*, vol. 231, pp. R77–R99, 2016.
- [8] K. Sarjeant and J. M. Stephens, "Adipogenesis," *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, vol. 4, no. 9, p. a008417, 2012.
- [9] E. D. Rosen, C. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez, and B. M. Spiegelman, "C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 1, pp. 22–26, 2002.
- [10] F. J. Ruiz-ojeda, A. I. Rupérez, C. Gomez-llorente, A. Gil, and C. M. Aguilera, "Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity : A Review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, p. E1040, 2016.
- [11] F. F. Chehab, "Minireview: Obesity and lipodystrophy - Where do the circles intersect?," *Endocrinology*, vol. 149, no. 3, pp. 925–934, 2008.
- [12] V. A. Cortés and M. Fernández-galilea, "Lipodystrophies : adipose tissue disorders with severe metabolic implications," *J Physiol Biochem*, vol. 71, no. 3, pp. 471–478, 2015.
- [13] W. Berardinelli, "An undiagnosed endocrinometabolic syndrome: report of 2 cases.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 14, no. 2, pp. 193–204, 1954.
- [14] M. Seip, "Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations. A new diencephalic syndrome?," *Acta Paediatr.*, vol. 48, pp. 555–574, 1959.
- [15] A. Agarwal, E. Arioglu, S. De Almeida, N. Akkoc, S. Taylor, A. Bowcock, R. Barnes, and A. Garg, "AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34," *Nat. Genet.*, vol. 31, no. 1, pp. 21–23, 2002.
- [16] J. West, C. K. Tompkins, N. Balantac, E. D. Nudelman, B. Meengs, T. White, S. Bürsten, J. Coleman, A. Kumar, J. W. Singer, and D. W. Leung, "Cloning and Expression of Two Human Lysophosphatidic Acid Acyltransferase cDNAs That Enhance Cytokine-Induced Signaling Responses in Cells," *DNA Cell Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 691–701, 1997.
- [17] J. Magré, M. Delépine, E. Khallouf, T. G. Jr, L. Van Maldergem, J. Papp, M. Meier, A. Mégarbané, B. W. Group, M. Lathrop, and J. Capeau, "Identification of the gene altered in Berardinelli – Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13," *Nat. Genet.*, vol. 28,

- no. august, pp. 365–371, 2001.
- [18] N. V Grishin, W. Li, A. K. Agarwal, A. Garg, K. M. Szymanski, D. Binns, R. G. W. Anderson, and J. M. Goodman, “The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 52, pp. 20890–20895, 2007.
- [19] C. A. Kim, M. Dele, E. Boutet, H. El Mourabit, S. Le Lay, M. Meier, M. Nemani, E. Bridel, C. C. Leite, D. R. Bertola, R. K. Semple, S. O. Rahilly, I. Dugail, J. Capeau, M. Lathrop, and J. Magre, “Association of a Homozygous Nonsense Caveolin-1 Mutation with Berardinelli-Seip Congenital,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 93, no. 4, pp. 1129–1134, 2008.
- [20] S. Shastri, M. R. Delgado, E. Dirik, M. Turkmen, A. K. Agarwal, and A. Garg, “Congenital Generalized Lipodystrophy , Type 4 (CGL4) Associated With Myopathy Due To Novel PTRF Mutations,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 4, pp. 2245–2253, 2010.
- [21] C. A. Meehan, E. Cochran, A. Kassai, R. J. Brown, C. Adelia, E. Cochran, A. Kassai, R. J. Brown, E. Cochran, A. Kassai, and R. J. Brown, “Metreleptin for injection to treat the complications of leptin deficiency in patients with congenital or acquired generalized lipodystrophy,” *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, vol. 9, no. 1, pp. 59–68, 2016.
- [22] K. Takeuchi and K. Reue, “Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis.,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 296, no. 6, pp. E1195–209, 2009.
- [23] A. Yamashita, Y. Hayashi, N. Matsumoto, and Y. Nemoto-sasaki, “Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases,” *Biology (Basel)*, vol. 3, pp. 801–830, 2014.
- [24] M. Fernandez-Galilea, P. Tapia, K. Cautivo, E. Morselli, and V. A. Cortes, “AGPAT2 deficiency impairs adipogenic differentiation in primary cultured preadipocytes in a non-autophagy or apoptosis dependent mechanism,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 467, pp. 39–45, 2015.
- [25] S. Sankella, A. Garg, and A. K. Agarwal, “Activation of sphingolipid pathway in the livers of lipodystrophic Agpat2 ^{-/-} mice,” *J. Endocr. Soc.*, vol. 1, no. 7, pp. 980–993, 2017.
- [26] G. E. Palade, “Fine structure of blood capillaries,” *J. Appl. Phys.*, vol. 24, p. 1424, 1953.
- [27] E. Yamada, “The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse.,” *J Biophys Biochem Cytol.*, vol. 1, no. 5, pp. 445–458, 1955.
- [28] I. Yeow, G. Howard, J. Chadwick, C. Mendoza-topaz, C. G. Hansen, B. J. Nichols, and E. Shvets, “EHD Proteins Cooperate to Generate Caveolar Clusters and to Maintain Caveolae during Repeated Mechanical Stress,” *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 19, pp. 2951–2962, 2017.
- [29] K. Simons and D. Toomre, “Lipid rafts and signal transduction.,” *Nat Rev Mol Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 31–39, 2000.
- [30] R. G. Parton, V. A. Tillu, and B. M. Collins, “Caveolae,” *Curr Biol.*, vol. 28, no. 8, pp. R402–R405, 2018.
- [31] L. Pelkmans and A. Helenius, “Endocytosis Via Caveolae,” *Traffic*, vol. 3, no. 5, pp. 311–320, 2002.
- [32] L. Pelkmans, T. Bu, M. Zerial, and A. Helenius, “Caveolin-Stabilized Membrane Domains as Multifunctional Transport and Sorting Devices in Endocytic Membrane Traffic,” vol. 118, pp. 767–780, 2004.
- [33] F. Bender, M. Montoya, V. Monardes, L. Leyton, and A. Quest, “Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease : Identification of downstream targets for the tumor suppressor protein,” *Biol. Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 151–167, 2002.
- [34] J. M. Rutkowski, J. H. Stern, and P. E. Scherer, “The cell biology of fat expansion,” *J Cell Biol.*, vol. 208, no. 5, pp. 501–512, 2015.

- [35] R. V Stan, "Structure of caveolae," vol. 1746, pp. 334–348, 2005.
- [36] M. Bastiani and R. G. Parton, "Caveolae at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. 22, pp. 3831–3836, 2010.
- [37] M. Drab, P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T. V Kurzchalia, "Loss of Caveolae , Vascular Dysfunction , and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice," *Science (80-.)*, vol. 293, no. 5539, pp. 2449–2452, 2001.
- [38] H. Lee, D. S. Park, X. B. Wang, P. E. Scherer, P. E. Schwartz, and M. P. Lisanti, "Src-induced Phosphorylation of Caveolin-2 on Tyrosine 19. Phospho-caveolin-2 (Tyr(P)19) is localized near focal adhesions, remains associated with lipid rafts/caveolae, but no longer forms a high molecular mass hetero-oligomer with caveolin-1.," *J Biol Chem.*, vol. 277, no. 37, pp. 34556–34567, 2002.
- [39] G. Sowa, "Novel Insights into the Role of Caveolin-2 in Cell- and Tissue-Specific Signaling and Function," *Biochem Res Int.*, vol. 2011, p. 809259, 2011.
- [40] S. Sonnino and A. Prinetti, "Sphingolipids and membrane environments for caveolin," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 4, pp. 597–606, 2009.
- [41] Y. Hagiwara, T. Sasaoka, K. Araishi, M. Imamura, H. Yorifuji, I. Nonaka, E. Ozawa, and T. Kikuchi, "Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, no. 20, pp. 3047–3054, 2000.
- [42] F. Galbiati, J. Engelman, D. Volonte, X. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou, B. Kneitz, W. Edelmann, and M. P. Lisanti, "Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae , Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex , and T-tubule Abnormalities," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 24, pp. 21425–21433, 2001.
- [43] K. G. Rothberg, J. E. Heuser, W. C. Donzell, J. R. Glenney, and R. G. W. Anderson, "Caveolin , a Protein Component of Caveolae Membrane Coats," *Cell*, vol. 68, no. 4, pp. 673–682, 1992.
- [44] C. G. Hansen, N. A. Bright, G. Howard, and B. J. Nichols, "SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae," *Nat Cell Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 807–814, 2009.
- [45] P. F. Pilch, T. Meshulam, S. Ding, and L. Liu, "Caveolae and lipid trafficking in adipocytes," *Clin Lipidol.*, vol. 6, no. 1, pp. 49–58, 2011.
- [46] A. W. Cohen, B. Razani, X. B. Wang, T. P. Combs, T. M. Williams, P. E. Scherer, M. P. Lisanti, W. Alex, B. Razani, X. B. Wang, P. Combs, T. M. Williams, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, "Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue," *Am J Physiol Cell Physiol.*, vol. 285, no. 1, pp. 222–235, 2003.
- [47] B. Razani, T. P. Combs, B. Wang, P. G. Frank, D. S. Park, R. G. Russell, M. Li, B. Tang, L. A. Jelicks, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, "Caveolin-1-deficient Mice Are Lean , Resistant to Diet-induced Obesity , and Show Hypertriglyceridemia with Adipocyte Abnormalities," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 10, pp. 8635–8647, 2002.
- [48] L. Liu, D. Brown, M. Mckee, N. K. Lebrasseur, D. Yang, K. H. Albrecht, K. Ravid, and P. F. Pilch, "Deletion of Cavin / PTRF Causes Global Loss of Caveolae , Dyslipidemia , and Glucose Intolerance," *Cell Metab*, vol. 8, no. 4, pp. 310–317, 2008.
- [49] B. Razani, X. B. Wang, J. A. Engelman, M. Battista, G. Lagaud, X. L. Zhang, B. Kneitz, H. Hou, G. J. Christ, W. Edelmann, and M. P. Lisanti, "Caveolin-2-Deficient Mice Show Evidence of Severe Pulmonary Dysfunction without Disruption of Caveolae," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 2329–2344, 2002.
- [50] C. G. Hansen, E. Shvets, G. Howard, K. Riento, and B. J. Nichols, "Deletion of cavin genes reveals tissue-specific mechanisms for morphogenesis of endothelial caveolae," *Nat.*

- Commun.*, vol. 4, p. 1831, 2013.
- [51] L. Liu, C. G. Hansen, B. J. Honeyman, B. J. Nichols, and P. F. Pilch, "Cavin-3 Knockout Mice Show that Cavin-3 Is Not Essential for Caveolae Formation, for Maintenance of Body Composition, or for Glucose Tolerance," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, p. e102935, 2014.
- [52] A. W. Cohen, B. Razani, W. Schubert, T. M. Williams, X. B. Wang, P. Iyengar, D. L. Brasaemle, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, "Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation," *Diabetes*, vol. 53, no. 5, pp. 1261–1270, 2004.
- [53] N. Briand, C. Prado, G. Mabileau, F. Lasnier, and X. Le Lièvre, "Caveolin-1 Expression and Cavin Stability Regulate Caveolae Dynamics in Adipocyte Lipid Store Fluctuation," *Diabetes*, vol. 63, no. June, pp. 4032–4044, 2014.
- [54] V. A. Tillu, Y. Lim, O. Kovtun, S. Mureev, C. Ferguson, M. Bastiani, K. McMahon, H. P. Lo, T. E. Hall, K. Alexandrov, B. M. Collins, and R. G. Parton, "A variable undecad repeat domain in cavin 1 regulates caveola formation and stability," *EMBO Rep.*, vol. 19, no. 9, p. e45775, 2018.
- [55] G. van Meer and A. I. P. M. de Kroon, "Lipid map of the mammalian cell," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. 1, pp. 5–8, 2010.
- [56] E. J. Dufourc, "Sterols and membrane dynamics," *J Chem Biol*, vol. 1, pp. 63–77, 2008.
- [57] D. Casares and P. V. Escrivá, "Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 9, p. E2167, 2019.
- [58] U. Ortegren, M. Karlsson, N. Blazic, M. Blomqvist, and F. H. Nystrom, "Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, pp. 2028–2036, 2004.
- [59] S. Parpal, M. Karlsson, H. Thorn, P. Strålfors, and P. J. FASEB, "Cholesterol Depletion Disrupts Caveolae and Insulin Receptor Signaling for Metabolic Control via Insulin Receptor Substrate-1, but Not for Mitogen-activated Protein Kinase Control," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 13, pp. 9670–9678, 2001.
- [60] M. R. Breen, M. Camps, F. Carvalho-simoes, A. Zorzano, and P. F. Pilch, "Cholesterol Depletion in Adipocytes Causes Caveolae Collapse Concomitant with Proteasomal Degradation of Cavin-2 in a Switch-Like Fashion," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, pp. 2–9, 2012.
- [61] J. Sánchez-Wandelmer, A. Dávalos, E. Herrera, M. Giera, S. Cano, G. De, M. A. Lasunción, and R. Busto, "Inhibition of cholesterol biosynthesis disrupts lipid raft / caveolae and affects insulin receptor activation in 3T3-L1 preadipocytes," *BBA - Biomembr.*, vol. 1788, no. 9, pp. 1731–1739, 2009.
- [62] M. Murata, J. Peranen, R. Schreinert, F. Wielandt, T. V. Kurzchalia, and K. A. I. Simons, "VIP21 / caveolin is a cholesterol-binding protein," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, no. 22, pp. 10339–10343, 1995.
- [63] S. Li, K. S. Song, and M. P. Lisanti, "Expression and Characterization of Recombinant Caveolin," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 1, pp. 568–573, 1996.
- [64] S. Monier, D. J. Dietzen, W. R. Hastings, D. M. Lublin, and T. V. Kurzchalia, "Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol," *FEBS Lett.*, vol. 388, pp. 143–149, 1996.
- [65] J. E. Schnitzer, D. P. Mcintosh, A. M. Dvorak, J. Liu, and P. Oh, "Separation of Caveolae from Associated Microdomains of GPI-Anchored Proteins A I AA 1A," *Science (80-.)*, vol. 269, no. 5229, pp. 1435–1439, 1995.
- [66] P. Liu and R. G. W. Anderson, "Compartmentalized Production of Ceramide at the Cell Surface," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 45, pp. 27179–27185, 1995.
- [67] X. Wang, P. Sun, and A. S. Paller, "Ganglioside Induces Caveolin-1 Redistribution and

- Interaction with the Epidermal Growth Factor Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 49, pp. 47028–47034, 2002.
- [68] K. Kabayama, T. Sato, and F. Kitamura, "TNF α -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder : involvement of ganglioside GM3," *Glycobiology*, vol. 15, no. 1, pp. 21–29, 2005.
- [69] C. Yu, M. Alterman, and R. T. Dobrowsky, "Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1," *J. Lipid Res.*, vol. 46, pp. 1678–1691, 2005.
- [70] A. Alexaki, B. A. Clarke, O. Gavrilova, Y. Ma, H. Zhu, X. Ma, L. Xu, G. Tuymetova, B. C. Larman, M. L. Allende, M. Teresa, and R. L. Proia, "De novo Sphingolipid Biosynthesis is Required for Adipocyte Survival and Metabolic Homeostasis," *J Biol Chem*, vol. 292, no. 9, pp. 3929–3939, 2017.
- [71] L. J. Pike, X. Han, K. Chung, and R. W. Gross, "Lipid Rafts Are Enriched in Arachidonic Acid and Plasmenylethanolamine and Their Composition Is Independent of Caveolin-1 Expression : A Quantitative Electrospray Ionization / Mass Spectrometric Analysis," *Biochemistry*, vol. 41, pp. 2075–2088, 2002.
- [72] D. W. L. Ma, J. Seo, L. A. Davidson, E. S. Callaway, Y. Fan, J. R. Lupton, and R. S. Chapkin, "PUFA Alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon," *FASEB J.*, vol. 28, pp. 1–28, 2004.
- [73] T. Hiram, R. Das, Y. Yang, C. Ferguson, A. Won, C. M. Yip, J. G. Kay, S. Grinstein, R. G. Parton, and G. D. Fairn, "Phosphatidylserine dictates the assembly and dynamics of caveolae in the plasma membrane," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, pp. 14292–14307, 2017.
- [74] A. R. Busija, H. H. Patel, and P. A. Insel, "Caveolins and cavins in the trafficking , maturation , and degradation of caveolae : implications for cell physiology," *Am J Physiol Cell Physiol.*, vol. 312, no. 4, pp. C459–C477, 2017.
- [75] T. Yamaguchi, C. Lu, L. Ida, K. Yanagisawa, J. Usukura, J. Cheng, N. Hotta, Y. Shimada, H. Isomura, M. Suzuki, T. Fujimoto, and T. Takahashi, "ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1," *Nat. Commun.*, vol. 7, pp. 1–13, 2016.
- [76] J. R. Henley, E. W. A. Krueger, B. J. Oswald, and M. A. Mcniven, "Dynamamin-mediated Internalization of Caveolae," *J. Cell Biol.*, vol. 141, no. 1, pp. 85–99, 1998.
- [77] B. Morén, C. Shah, M. T. Howes, N. L. Schieber, H. T. McMahon, and S. Lemmon, "EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization," *Mol Biol Cell*, vol. 23, no. 7, pp. 1316–1329, 2012.
- [78] K. McMahon, H. Zajicek, W. Li, M. J. Peyton, J. D. Minna, V. J. Hernandez, K. Luby-phelps, and R. G. W. Anderson, "SRBC / cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function," *EMBO J.*, vol. 28, no. 8, pp. 1001–1015, 2009.
- [79] L. Pelkmans, "Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1746, pp. 295–304, 2005.
- [80] B. Sinha, D. Köster, R. Ruez, P. Gonnord, D. Abankwa, R. V Stan, G. Butler-browne, B. Védie, L. Johannes, N. Morone, R. G. Parton, G. Raposo, C. Lamaze, P. Nassoy, P. Université, M. C. Cnrs, C. De Recherche, and L. Physico-chimie, "Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae," *Cell*, vol. 144, no. 3, pp. 402–413, 2011.
- [81] H. Thorn, K. G. Stenkula, M. Karlsson, O. Unn, F. H. Nystrom, J. Gustavsson, and P. Strålfors, "Cell Surface Orifices of Caveolae and Localization of Caveolin to the Necks of Caveolae in Adipocytes," *Mol. Biol. Cell.*, vol. 14, no. October, pp. 3967–3976, 2003.
- [82] P. F. Pilch and L. Liu, "Fat caves : caveolae , lipid trafficking and lipid metabolism in adipocytes," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 8, pp. 318–324, 2011.
- [83] J. Pohl, A. Ring, R. Ehehalt, H. Schulze-bergkamen, A. Schad, P. Verkade, and W. Stremmel,

- “Long-Chain Fatty Acid Uptake into Adipocytes Depends on Lipid Raft Function,” *Biochemistry*, vol. 43, no. 14, pp. 4179–4187, 2004.
- [84] S. Ding, M. Lee, R. Summer, L. Liu, S. K. Fried, and P. F. Pilch, “Pleiotropic Effects of Cavin-1 Deficiency on Lipid Metabolism,” *J Biol Chem.*, vol. 289, no. 12, pp. 8473–8483, 2014.
- [85] J. Gustavsson, S. Parpal, M. Karlsson, C. Ramsing, H. Thorn, M. Borg, M. Lindroth, K. H. Peterson, K. Magnusson, and P. Strålfors, “Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane,” *FASEB J*, vol. 13, no. 14, pp. 1961–1971, 1999.
- [86] Y. Wang, X. Wang, W. B. Lau, Y. Yuan, D. Booth, J. Li, R. Scalia, K. Preston, E. Gao, W. Koch, and X. Ma, “Adiponectin Inhibits Tumor Necrosis Factor- α – Induced Vascular Inflammatory Response via Caveolin-Mediated Ceramidase Recruitment and Activation,” *Circ Res.*, vol. 114, no. 5, pp. 792–805, 2014.
- [87] S. Shigematsu, R. T. Watson, A. H. Khan, and J. E. Pessin, “The Adipocyte Plasma Membrane Caveolin Functional / Structural Organization Is Necessary for the Efficient Endocytosis of GLUT4,” *J Biol Chem.*, vol. 278, no. 12, pp. 10683–10690, 2003.
- [88] N. Aboulaich, P. C. Chui, J. M. Asara, and J. S. Flier, “Polymerase I and Transcript Release Factor Regulates Lipolysis via a Phosphorylation-Dependent Mechanism,” *Diabetes*, vol. 60, pp. 757–765, 2011.
- [89] S. Fagerholm, U. Ortegren, M. Karlsson, I. Ruishalme, and P. Stra, “Rapid Insulin-Dependent Endocytosis of the Insulin Receptor by Caveolae in Primary Adipocytes,” *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e5985., 2009.
- [90] T. Yuan, S. Hong, Y. Yao, and K. Liao, “Glut-4 is translocated to both caveolae and non-caveolar lipid rafts , but is partially internalized through caveolae in insulin-stimulated adipocytes,” *Cell Res.*, vol. 17, pp. 772–782, 2007.
- [91] S. Le Lay, E. Hajduch, R. Margaret, X. Le Lie, C. Thiele, P. Ferre, R. G. Parton, F.- France, M. Curie, and F.- France, “Cholesterol-Induced Caveolin Targeting to Lipid Droplets in Adipocytes : A Role for Caveolar Endocytosis,” *Traffic*, vol. 7, pp. 549–561, 2006.
- [92] C. J. Fielding, A. Bist, and P. E. Fielding, “Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 3753–3758, 1997.
- [93] P. E. Fielding, J. S. Russel, T. A. Spencer, H. Hakamata, K. Nagao, and C. J. Fielding, “Sterol Efflux to Apolipoprotein A-I Originates from Caveolin-Rich Microdomains and Potentiates PDGF-Dependent Protein Kinase Activity,” *Biochemistry*, vol. 41, no. 15, pp. 4929–4937, 2002.
- [94] C. Patlaka, H. Becker, M. Norgård, S. Paulie, A. Nordvall-bodell, P. Lång, and G. Andersson, “Caveolae-mediated endocytosis of the glucosaminoglycan-interacting adipokine tartrate resistant acid phosphatase 5a in adipocyte progenitor lineage cells,” *BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 3, pp. 495–507, 2014.
- [95] J. R. Simard, T. Meshulam, B. K. Pillai, M. T. Kirber, K. Brunaldi, S. Xu, P. F. Pilch, and J. A. Hamilton, “Caveolins sequester FA on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane , augment triglyceride formation , and protect cells from lipotoxicity,” *J. Lipid Res.*, vol. 51, pp. 914–922, 2010.
- [96] P. Tapia, “Mechanisms involved in the loss of brown adipose tissue in the Agpat2 deficient mouse,” 2019.
- [97] K. F. Y, C. Iwasaki, H. Kawaguchi, E. Yasugi, and M. Oshima, “Cell membrane dynamics and the induction of apoptosis by lipid compounds,” *FEBS Lett.*, vol. 446, pp. 113–116, 1999.
- [98] L. Magtanong, P. J. Ko, and S. J. Dixon, “Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death,” *Cell Death Differ.*, vol. 24, pp. 1099–1109, 2016.
- [99] J. Y. U. Fan, C. Grunfeld, and P. Gorden, “Morphological changes of the 3T3-L1 fibroblast

- plasma membrane upon differentiation to the adipocyte form," *J Cell Sci.*, vol. 61, pp. 219–230, 1983.
- [100] P. Scherer, M. Lisanti, G. Baldini, M. Sargiacomo, C. Mastick, and H. Lodish, "Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles," *J Cell Biol.*, vol. 127, no. 5, pp. 1233–1243, 1994.
- [101] S. Palacios-Ortega, M. Varela-guruceaga, F. Milagro, J. Martínez, and C. de Miguel, "Expression of caveolin 1 is enhanced by DNA demethylation during adipocyte differentiation . Status of insulin signaling," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e95100, 2014.
- [102] S. Perez-Diaz, L. A. Johnson, R. M. Dekroon, J. M. Moreno-navarrete, O. Alzate, J. M. Fernandez-real, N. Maeda, and J. M. Arbones-mainar, "Polymerase I and transcript release factor (PTRF) regulates adipocyte differentiation and determines adipose tissue expandability," *FASEB J.*, vol. 28, no. 8, pp. 3769–3779, 2014.
- [103] K. Kwiatkowska, E. Marsza, G. Traczyk, P. Koprowski, Ł. Agnieszka, M. Kulma, A. Grzelczyk, and A. Sobota, "Visualization of cholesterol deposits in lysosomes of Niemann-Pick type C fibroblasts using recombinant perfringolysin O," *Orphanet J Rare Dis*, vol. 9, no. 64, pp. 1–16, 2014.
- [104] C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, and P. C. Fu, "Enzymatic determination of total serum cholesterol," *Clin. Chem.*, vol. 20, no. 4, pp. 470–475, 1974.
- [105] J. Folch, M. Lees, and G. Sloane Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.," *J Biol Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, 1957.
- [106] P. J. Bilan, Y. Mitsumoto, T. Ramlal, and A. Klip, "Acute and long-term effects of insulin-like growth factor I on glucose transporters in muscle cells Translocation and biosynthesis," *FEBS Lett.*, vol. 298, no. 2–3, pp. 285–290, 1992.
- [107] J. G. McDonald, D. D. Smith, A. R. Stiles, and D. W. Russell, "A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma," *J. Lipid Res.*, vol. 53, pp. 1399–1409, 2012.
- [108] G. Vale, S. A. Martin, M. A. Mitsche, B. M. Thompson, K. M. Eckert, and J. G. Mcdonald, "Three-phase liquid extraction : a simple and fast method for lipidomic workflows," *J. Lipid Res.*, vol. 60, pp. 694–706, 2019.
- [109] E. Bligh and W. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification.," *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, 1959.
- [110] A. Agouni, C. Owen, A. Czopek, N. Mody, and M. Delibegovic Mirela, "In vivo differential effects of fasting, re-feeding, insulin and insulin stimulation time course on insulin signaling pathway components in peripheral tissues," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 401, no. 1, pp. 104–111, 2010.
- [111] P. T. Kovanen, E. A. Nikkila, and T. A. Miettinen, "Regulation of cholesterol synthesis and storage in fat cells," vol. 16, pp. 211–223, 1975.
- [112] L. Chen, M. Ma, M. Sun, L. Jiang, X. Zhao, and X. Fang, "Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMG-CoA reductase degradation and SREBP-2 processing," *J. Lipid Res.*, vol. 60, no. 10, pp. 1765–1775, 2019.
- [113] M. A. Mitsche, J. G. McDonald, H. H. Hobbs, and J. C. Cohen, "Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways," *Elife*, vol. 4, pp. 1–21, 2015.
- [114] J. E. Vance, "Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells," *Traffic*, vol. 16, no. 1, pp. 1–18, 2015.
- [115] C. Gault, L. Obeid, and Y. Hannun, "An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown," *Adv Exp Med Biol* ., vol. 688, pp. 1–23, 2010.
- [116] P. Tapia, M. Fern, F. Robledo, and P. Mardones, "Biology and pathological implications of

- brown adipose tissue : promises and caveats for the control of obesity and its associated complications,” vol. 1155, pp. 1145–1164, 2018.
- [117] H. H. Zhang, J. Huang, K. Duvel, B. Boback, S. Wu, R. M. Squillace, C. Wu, and B. D. Manning, “Insulin Stimulates Adipogenesis through the Akt-TSC2- mTORC1 Pathway,” *PLoS One*, vol. 4, no. 7, p. e6189, 2009.
- [118] L. Cubells, S. Vila De Muga, F. Tebar, P. Wood, R. Evans, M. Ingelmo-torres, M. Calvo, K. Gaus, A. Pol, T. Grewal, and C. Enrich, “Annexin A6-Induced Alterations in Cholesterol Transport and Caveolin Export from the Golgi Complex,” *Traffic*, pp. 1568–1589, 2007.
- [119] A. Pol, S. Martin, M. A. Ferna, M. Ingelmo-torres, C. Ferguson, C. Enrich, and R. G. Parton, “Cholesterol and Fatty Acids Regulate Dynamic Caveolin Cell Surface and Lipid Bodies,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, pp. 2091–2105, 2005.
- [120] E. J. Smart, Y. Ying, P. A. Conrad, and R. G. W. Anderson, “Caveolin Moves from Caveolae to the Golgi Apparatus in Response to Cholesterol Oxidation,” *J. Cell*, vol. 127, no. 5, pp. 1185–1197, 1994.
- [121] C. A. Copeland, B. Han, A. Tiwari, E. D. Austin, J. E. Loyd, and R. Gilmore, “A disease-associated frameshift mutation in caveolin-1 disrupts caveolae formation and function through introduction of a de novo ER retention signal,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 28, no. 22, pp. 3095–3111, 2017.
- [122] F. Galbiati, D. Volonte, C. Minetti, J. B. Chu, and M. P. Lisanti, “Phenotypic Behavior of Caveolin-3 Mutations That Cause Autosomal Dominant Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD-1C),” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 36, pp. 25632–25641, 1999.
- [123] A. Schlegel, P. Arvan, and M. P. Lisanti, “Caveolin-1 Binding to Endoplasmic Reticulum Membranes and Entry into the Regulated Secretory Pathway Are Regulated by,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 6, pp. 4398–4408, 2001.
- [124] P. Kirchner, M. Bug, and H. Meyer, “Ubiquitination of the N-terminal Region of Caveolin-1 Regulates Endosomal Sorting by the VCP / p97 AAA-ATPase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 10, pp. 7363–7372, 2013.
- [125] C. Lee, T. Lai, M. Tsai, P. Ou-yang, C. Tsai, and S. Wu, “The influence of a caveolin-1 mutant on the function of P-glycoprotein,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 20486, 2016.
- [126] Q. Cai, L. Guo, H. Gao, and X. Li, “Caveolar Fatty Acids and Acylation of Caveolin-1,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e60884, 2013.
- [127] D. J. Dietzen, W. R. Hastings, and D. M. Lublin, “Caveolin Is Palmitoylated on Multiple Cysteine Residues. Palmitoylation Is Not Necessary for Localization of Caveolin to Caveolae,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 12, pp. 6838–6842, 1995.
- [128] S. Zhou, L. Guo, X. Wang, Y. Liu, W. Peng, and Y. Liu, “Acetylation of Cavin-1 Promotes Lipolysis in White Adipose Tissue,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 37, no. 16, pp. e00058–17, 2017.
- [129] O. Kovtun, V. A. Tillu, N. Ariotti, R. G. Parton, and B. M. Collins, “Cavin family proteins and the assembly of caveolae,” *J. Cell Sci.*, vol. 128, pp. 1269–1278, 2015.
- [130] V. A. Tillu, O. Kovtun, K. McMahon, B. M. Collins, R. G. Parton, and J. York, “A phosphoinositide-binding cluster in cavin1 acts as a molecular sensor for cavin1 degradation,” *Mol Biol Cell*, vol. 26, no. 20, pp. 3561–3569, 2015.
- [131] W.-J. Chang, K. G. Rothberg, B. A. Kamen, and R. G. W. Anderson, “Lowering the Cholesterol Content of MA104 Cells Inhibits Receptor-mediated Transport of Folate,” *J. Cell Biol.*, vol. 118, no. 1, pp. 63–69, 1992.
- [132] S. Prattes, G. Hörl, A. Hammer, A. Blaschitz, W. F. Graier, W. Sattler, R. Zechner, and E. Steyrer, “Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes : triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures,” *J. Cell Sci.*, vol. 113, pp. 2977–2989, 2000.

- [133] P. H. Schreiberman and R. B. Dell, "Adipocyte Cholesterol," *J. Clin. Invest.*, vol. 55, pp. 986–993, 1975.
- [134] A. Das, J. L. Goldstein, D. D. Anderson, M. S. Brown, and A. Radhakrishnan, "Use of mutant 125I-Perfringolysin O to probe transport and organization of cholesterol in membranes of animal cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 26, pp. 10580–10585, 2013.
- [135] P. G. Frank, M. W. Cheung, S. Pavlides, G. Llaverias, D. S. Park, M. P. Lisanti, G. Philippe, M. W. Cheung, S. Pav-, G. Llaverias, D. S. Park, and M. P. Lisanti, "Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis," *Am J Physiol Hear. Circ Physiol*, vol. 291, no. 2, pp. H677–H686, 2006.
- [136] L. M. Obeid, C. M. Linardic, L. A. Karolak, and Y. A. Hannun, "Programmed Cell Death Induced by Ceramide," *Science (80-.)*, vol. 259, no. 5102, pp. 1769–1771, 1993.
- [137] S. E. Gale, A. Frolov, X. Han, P. E. Bickel, L. Cao, A. Bowcock, J. E. Schaffer, and D. S. Ory, "A Regulatory Role for 1-Acylglycerol-3-phosphate- O -acyltransferase 2 in Adipocyte Differentiation," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 16, pp. 11082–11089, 2006.
- [138] M. F. M. Sim, R. J. Dennis, E. M. Aubry, N. Ramanathan, H. Sembongi, V. Saudek, D. Ito, S. O’Rahilly, S. Siniossoglou, and J. J. Rochford, "The human lipodystrophy protein seipin is an ER membrane adaptor for the adipogenic PA phosphatase lipin 1," *Mol. Metab.*, vol. 2, no. 1, pp. 38–46, 2013.
- [139] L. Liu, Q. Jiang, X. Wang, Y. Zhang, R. C. Y. Lin, S. M. Lam, G. Shui, L. Zhou, P. Li, Y. Wang, X. Cui, M. Gao, L. Zhang, Y. Lv, G. Xu, G. Liu, D. Zhao, and H. Yang, "Adipose-specific knockout of Seipin/Bscl2 results in progressive lipodystrophy," *Diabetes*, vol. 63, no. 7, pp. 2320–2331, 2014.
- [140] S. Sankella, A. Garg, J. D. Horton, and A. K. Agarwal, "Hepatic gluconeogenesis is enhanced by phosphatidic acid which remains uninhibited by insulin in lipodystrophic Agpat2-/- mice," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 8, pp. 4762–4777, 2014.
- [141] D. A. Foster, D. Salloum, D. Menon, and M. A. Frias, "Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR)," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 33, pp. 22583–22588, 2014.
- [142] J. Cai, H. Abramovici, S. H. Gee, and M. K. Topham, "Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1791, no. 9, pp. 942–948, 2009.
- [143] W. Stillwell, "Membrane Polar Lipids," in *An Introduction to Biological Membranes*, 2013, pp. 63–87.
- [144] A. M. Figueroa, "Relación entre la composición de fosfolípidos y la morfología y función mitocondrial en adipocitos pardos del ratón lipodistrófico Agpat2-/-," 2018.
- [145] A. A. Spector and M. A. Yorek, "Membrane lipid composition and cellular function," *J. Lipid Res.*, vol. 26, pp. 1015–1035, 1985.
- [146] M. Ibarguren, D. J. López, and P. V. Escribá, "The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure , microdomain organization , cellular functions and human health," *BBA - Biomembr.*, vol. 1838, no. 6, pp. 1518–1528, 2014.
- [147] M. S. Shchepinov and A. B. Manning-Boğ, "Chapter 31: Deuterium Protection of Polyunsaturated Fatty Acids against Lipid Peroxidation," in *Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health*, 2014, pp. 373–383.
- [148] B. Song, N. B. Javitt, and R. A. Debose-boyd, "Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol , an intermediate in the synthesis of cholesterol," *Cell Metab.*, vol. 1, pp. 179–189, 2005.
- [149] Megha, O. Bakht, and E. London, "Cholesterol Precursors Stabilize Ordinary and Ceramide-rich Ordered Lipid Domains (Lipid Rafts) to Different Degrees," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no.

31, pp. 21903–21913, 2006.

- [150] C. M. Blouin, S. Le Lay, A. Eberl, H. C. Köfeler, I. C. Guerrera, C. Klein, X. Le Liepvre, F. Lasnier, O. Bourron, J. Gautier, P. Ferré, E. Hajduch, I. Dugail, C. De Recherche, U. Pierre, C. Paris, U. P. Descartes, S. Umr, F.- France, and P. P. Necker, “Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects,” *J. Lipid Res.*, vol. 51, pp. 945–956, 2010.