

SEPTINA 11, UN NUEVO BIOMARCADOR DEL TEJIDO ADIPOSO Y SU RELACION CON EL METABOLISMO EN HUMANOS

SEPTIN 11, NEW ADIPOSE TISSUE BIOMARKER AND THE RELATIONSHIP WITH HUMAN METABOLISM

Natalia Rocío Moreno Castellanos¹, Amaia Rodríguez², María del Mar Malagón³

- ¹. Grupo de Genética Humana UIS, Departamento de Ciencias básicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
- ². Laboratorio de Investigación Metabólica, Departamento de Endocrinología y Nutrición, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España
- ³. GC-11 Metabolismo y diferenciación Adipocitaria, Instituto Maimonides de investigación Biomédica de Córdoba, Universidad de Córdoba, Córdoba, España

Recibido: Agosto 1 de 2017

Aceptado: Octubre 2 de 2017

*Correspondencia del autor: Natalia Rocío Moreno Castellano. Cra. 32 #29-31, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, E-mail: nrmorcas@uis.edu.co

RESUMEN

Las principales proteínas del citoesqueleto, actina, tubulina y vimentina, sufren modificaciones de expresión y distribución durante el crecimiento del tejido adiposo y la traslocación de GLUT4 estimulada por insulina a la membrana plasmática. La existencia de un nuevo componente del citoesqueleto, las septinas, se ha propuesto recientemente en varios tejidos de mamíferos. El objetivo del estudio fue caracterizar septina 11 (SEPT11) en tejido adiposo humano en estados de obesidad e insulino resistencia. Se utilizaron muestras pareadas de tejido adiposo subcutáneo y omental de 54 pacientes. Los adipocitos fueron las células responsables del cambio de expresión global de SEPT11 en el tejido adiposo humano, la cuál mostro una distribución y asociación con las Caveolas. Se encontró una relación directa de SEPT11 con caveolina-1 en adipócitos, su distribución durante la adipogénesis fue variable, desde filamentos hasta conformar anillos. SEPT11 fue regulada por factores lipogénicos (ie., insulina), lipolíticos (ie., isoproterenol) y proinflamatorio (ie., TNF- α y lipopolisacárido) en adipocitos humanos. En consecuencia, SEPT11 se incrementó en estados de obesidad, además, la expresión se relaciono con la hipertrofia adipocitaria en el tejido omental y con marcadores de resistencia a insulina en tejido subcutáneo.

Todo esto indica que SEPT11 es una nueva proteína del citoesqueleto en adipocitos humanos fuertemente influenciada por la obesidad. Estos resultados amplían nuestra comprensión de la remodelación del citoesqueleto durante el inicio de la obesidad y la resistencia a la insulina.

Palabras claves: Septina 11, tejido adiposo, metabolismo, citoesqueleto, caveolina-1

ABSTRACT

The main cytoskeletal proteins, such as vimentin, actin and tubulin have rearrangements during insulin-stimulated that induces the plasma membrane distribution and rearrangements after adipose tissue growth. Recently has been described in several mammalian tissues, the septins such as a new component of the cytoskeleton. The aim of this study was characterize the expression and regulation of septin 11 (SEPT11) in human adipose tissue in an obesity and insulin resistance state. Paired samples from 64 patients were used obtained the omental and subcutaneous adipose from these samples. Adipocytes contributed to overall expression of Septin11 in adipose tissue and this protein show a caveolar distribution in fat cells. A direct relationship of SEPT11 with caveolin-1 in fat cells. During adipogénesis change the SEPT11 distribution from filaments to rings. SEPT11 was regulated by lipolytic (isoproterenol), proinflammatory (TNF- and lipopolysaccharide) and lipogenic (insulin) stimuli in human adipocytes. Accordingly, SEPT11 was associated to the obesity and adipocyte size in visceral fat and to insulin resistance biomarkers in subcutaneous adipose tissue. All of this suggest that, SEPT11 constitutes a novel cytoskeletal protein in human adipocytes strongly influenced by obesity. These results show a new understanding of the cytoskeleton remodeling during the obesity and insulin resistance.

Keywords: Septin11, adipose tissue, metabolism, cytoskeleton, caveolin-1.

INTRODUCCION

La obesidad es definida como un exceso de adiposidad. El crecimiento del tejido adiposo implica dos mecanismos: hipertrofia (aumento del tamaño celular) e hiperplasia (aumento del número de células) de las células del tejido graso (1, 2). La obesidad hiperplásica parece ser metabólicamente benigna, mientras que el aumento de la hipertrofia de los adipocitos se asocia con disfunción mitocondrial, aumento de la apoptosis y la inflamación, lo que contribuye a la obesidad asociada a trastornos metabólicos (2). La adipogénesis representa un proceso complejo que incluye la determinación de células madre mesenquimales en preadipocitos comprometidos, que a su vez pueden replicarse y diferenciarse a adipocitos maduros (3). En el transcurso de la adipogénesis, tanto fibroblastos como preadipocitos se transforman morfológicamente en adipocitos maduros con una gotita de lípidos unilocular (3). Así, la remodelación del citoesqueleto constituye un paso previo para la transición de preadipocitos a adipocitos con el fin de aumentar la capacidad de almacenamiento de lípidos adipocitos y prevenir la sobrecarga sistémica de lípidos (4, 5), que es la principal causa de resistencia a la insulina.

Los principales componentes citoesqueléticos de los adipocitos son, tubulina y vimentina, los cuales, experimentan cambios de expresión y distribución durante la

adipogénesis, hipertrofia e hiperplasia (4, 6-9). Durante la diferenciación de los adipocitos se observa una baja regulación de la biosíntesis de los componentes del citoesqueleto (7). La actina se organiza como fibras de tensión en los preadipocitos distribuidos a lo largo del citoplasma, pero durante la diferenciación adipocitaria tardía, los filamentos de actina se distribuyen en la corteza (4, 6). La vimentina forma estructuras en forma de jaula alrededor de las gotas lipídicas durante la adipogénesis (8), cuando se desmantela la red de vimentina se reduciendo la capacidad de formar gotas lipídicas en los adipocitos (6,8). Además, se ha propuesto también un papel del citoesqueleto en la captación de glucosa tras tratamiento con insulina y durante la lipogénesis (10, 11). En este sentido, la reorganización estimulada por insulina de la red de microfilamentos basada en actina es esencial para la translocación máxima del transportador de glucosa estimulada por insulina 4 (GLUT4) y su inserción funcional en la membrana plasmática (11, 12). Además, la insulina restaura la reformación de las gotitas lipídicas grandes después de la lipólisis aguda facilitando la fusión microtubular dependiente de las gotitas lipídicas, así como su expansión individual (11). Por último, la actina también es una proteína del citoesqueleto importante en el sostén de y la función de la caveola (13), que son plataformas para la señalización de la insulina y el tráfico de lípidos (14).

La existencia de un cuarto componente del citoesqueleto, las septinas, ha sido propuesto recientemente (15). Las septinas GTPasas de aproximadamente 30-65 kDa que varían su forma, e interactúan con otros componentes del citoesqueleto, es decir, actina y tubulina, y pueden influir profundamente en aspectos de la dinámica del citoesqueleto (16). Además, las septinas interactúan con algunos fosfolípidos, tales como, fosfatidilinositol, presente en la membrana que sirven como sitio de armazón para reclutar proteínas, así como barreras de difusión en la membrana (16, 17). Curiosamente, algunas septinas se han localizado en balsas lipídicas (18), n donde se ha sugerido que regulan la rigidez celular y la elasticidad cortical en conjunto con la actina (15, 19). Estas estructuras complejas están implicadas en diferentes procesos fisiológicos y alteraciones en ellas están asociadas con el desarrollo de algunas enfermedades, dentro de las que se incluyen, infecciones, enfermedades neurodegenerativas y neoplasias (20).

Hasta la fecha, existen 13 septinas diferentes identificadas en humanos (21). Sin embargo, la relevancia funcional de las septinas no se ha descrito aún en los adipocitos humanos. El presente estudio se enfocó en septina 11 (SEPT11), una proteína abundantemente expresada en la membrana plasmática de los adipocitos (22). Por lo tanto, buscamos: a) caracterizar la estructura, expresión y regulación de SEPT11 en el tejido adiposo humano; B) analizar el impacto de la obesidad y la diabetes tipo 2 asociada a la obesidad en SEPT11; y finalmente c) determinar la interacción de diferentes septinas con caveolina-1, componente principal de las caveolas en los adipocitos, ya que esta proteína de andamiaje interactúa con diferentes componentes del citoesqueleto durante la adipogénesis.

MATERIALES Y METODOS

Selección de pacientes y diseño del estudio

Se seleccionaron 54 pacientes, a los que se les extrajo mediante derivación laparoscópica de Y en Roux (n = 44) o funduplicatura de Nissen (n = 10) en la Clínica Universidad de Navarra, de esos pacientes se recogieron muestras pareadas de tejido adiposo de omento y subcutáneo. Todos los sujetos que participaron en el estudio fueron sometidos a evaluación clínica (historia, examen físico, análisis de la composición corporal, entrevistas nutricionales y evaluación de la comorbilidad). El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros, y la grasa corporal (BF) fue estimada por pletismografía de desplazamiento de aire. La obesidad se clasificó según el IMC y el% BF (BF 35% en las mujeres y 25% en los hombres). Los pacientes obesos fueron subclasificados en dos grupos [normoglucecos (NG) y pacientes con intolerancia a glucosa (IGT) o con diabetes tipo 2(DT2)], siguiendo los criterios del Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes (23). Los sujetos con DT2 no estaban en tratamiento con insulina o medicación que pudiera afectar los parámetros bioquímicos.

Los ensayos bioquímicos y hormonales realizados en los sujetos del estudio se midieron como se describió previamente (24). Los parámetros bioquímicos y antropométricos de los sujetos que formaron parte del estudio se muestran en la Tabla 1. Todos los experimentos se realizaron teniendo en cuenta los criterios de la declaración de Helsinki. Los apartados éticos del estudio, así como el diseño experimental fueron debidamente aprobados por el comité encargado de la investigación (073/2013) y se contó con el consentimiento informado de todos los voluntarios.

Tabla 1. Características clínicas de los sujetos incluidos en el estudio

	Delgados NG	Obeso NG	Obeso T2D	P
N	10	24	30	-
Sexo(hombre/mujer)	3/7	12/12	14/16	0.554
Edad(años)	47 ± 5	40 ± 3	44 ± 1	0.247
Altura(m)	1.64 ± 0.01	1.69 ± 0.01	1.67 ± 0.01	0.323
Peso(kg)	62 ± 4	135 ± 5 ^a	132 ± 4 ^a	<0.0001
IMC(kg/m ²)	22.3 ± 0.8	47.4 ± 1.4 ^a	47.6 ± 1.7 ^a	<0.001
Grasa corporal(%)	26.5 ± 2.8	51.6 ± 1.4 ^a	51.6 ± 1.3 ^a	<0.001
Cintura(cm)	63 ± 3	129 ± 5	128 ± 9	0.001
Glucosa(mmol/L)	4.82 ± 0.22	4.94 ± 0.01	6.55 ± 0.38 ^{ab}	0.002
Glucosa 2-h OGTT(mmol/L)	-	6.49 ± 0.28	10.38 ± 0.83 ^b	<0.0001

Insulina (pmol/L)	49.2 ± 10.2	127.8 ± 19.2 ^a	111.0 ± 13.2 ^b	0.036
Insulina 2-h OGTT(pmol/L)	-	591.6 ± 109.2	516.6 ± 49.8	0.495
HOMA	1.75 ± 0.35	4.86 ± 0.83 ^a	5.79 ± 0.98 ^a	0.027
QUICKI	0.35 ± 0.01	0.31 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.06 ^a	0.030
Triglicéridos (mmol/L)	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.4	0.292
Colesterol total(mmol/L)	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.2	0.912
LDL-colesterol (mmol/L)	3.1 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	0.771
HDL-colesterol (mmol/L)	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	0.027
CRP (mg/L)	1.8 ± 0.4	7.7 ± 1.4 ^a	11.2 ± 3.1	0.006
Leptina (ng/mL)	7.8 ± 1.5	46.1 ± 5.9 ^a	51.2 ± 6.8 ^a	0.018
AST (IU/L)	13 ± 3	16 ± 1	16 ± 1	0.254
ALT (IU/L)	13 ± 3	30 ± 5 ^a	29 ± 3 ^a	0.039

Extracción de ARN y PCR en tiempo real

El aislamiento y purificación de ARN se realizaron como se describió anteriormente (24). Se cuantificaron los niveles génicos de SEPT11 y de caveolina 1 (CAV1) mediante PCR en tiempo real. Los cebadores y sondas se diseñaron usando el software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) y se adquirieron de Genosys (Sigma, Steinheim, Alemania). Se diseñaron cebadores o sondas TaqMan® que abarcan fragmentos de las zonas de los extremos de dos exones para asegurar la detección del gen correspondiente evitando la amplificación del ADN genómico. El cDNA se amplificó: 95 °C durante 12 min, seguido de 48 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 2 min a 59 °C, utilizando el TaqMan PCR Master Mix. Las concentraciones de la sonda y el cebador fueron de 200 nmol / l. Todos los resultados se normalizaron con la expresión de 18S rRNA (Applied Biosystems), y la cuantificación relativa se calculó utilizando la fórmula DDCT (25). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

Estudios de Western-blot

Se homogeneizaron células y tejidos y se midió el contenido de proteína como se ha descrito previamente (24). Las muestras (20 µg) se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones de desnaturalización, se realizó posteriormente inmunotransferencia a membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se bloquearon en tampón Tris (TBS) con 0,05% de Tween 20 (TBS-T) que contenía 5% de leche seca sin grasa durante 1 h a temperatura ambiente (RT). Las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C con anti-SEPT11 de conejo policlonal (abcam Ltd., Cambridge, RU) (1: 5.000), anti-calnexina policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) (1: 1.000), Anticuerpos anti-perilipina policlonales de ratón (Novus Biologicals, Littleton, CO,

EE.UU.) (1: 500) o anticuerpos anti-actina monoclonal de ratón (Sigma) (1: 5.000) diluidos en solución de bloqueo. Los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaron utilizando anticuerpos IgG anti-conejo, anti-ratón o anti-cabra conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (1: 5.000) y el sistema de detección ECL Plus de quimioluminiscencia mejorado (Amersham Biosciences). La intensidad de las bandas se determinó por análisis densitométrico con el sistema de documentación de gel Gel Doc™ y el software Quantity One 4.5.0 (Bio-Rad) y se normalizó con valores de densidad de la actina. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Inmunohistoquímica de SEPT11

La inmunodetección de SEPT11 en cortes histológicos de tejido omental y tejido adiposo subcutáneo se realizó mediante el método de inmunoperoxidasa indirecta (24). Se des-parafinaron secciones de tejido adiposo embebido en parafina fijado con formalina (6 µm) y en xileno, se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol y se trataron con H₂O₂ al 3% (Sigma) en metanol absoluto durante 10 minutos a TA para sofocar la actividad de la peroxidasa endógena. Los portaobjetos se bloquearon durante 30 min con suero murino al 1% (Sigma) diluido en TBS (Tris 50 mmol / l, NaCl 0,5 mol / l, pH 7,36) para evitar la adsorción no específica. Los cortes fueron incubados durante toda la noche con anticuerpo específico para identificación de SEPT11 (abcam) a 4 °C diluido 1: 50 en TBS. Después del lavado con TBS, las placas se incubaron con HRP conjugado anti-conejo / ratón (Dako) durante 1 hora a RT. Después de lavar en TBS, se visualizó la reacción de peroxidasa como cromógeno con una solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB, Amersham Biosciences) / H₂O₂ (0,5 mg / ml de DAB, 0,03% de H₂O₂ y Tris-HCl, pH 7,3) y solución de hematoxilina de Harris (Sigma) como co-

lorante. Las secciones fueron deshidratadas, cubiertas y observadas con microscopio óptico Zeiss 40 CFL (Zeiss). Se incluyeron placas de control negativo sin anticuerpo primario para evaluar la tinción no específica.

Cultivos celulares

Las células de la fracción de estroma vascular humana (SVFC) y los adipocitos maduros se aislaron del tejido adiposo omental de sujetos normoglucémicos obesos como se describió previamente (24). Las células se sembraron a 2×10^5 células/cm² y crecieron en medio adipocitario [DMEM / F-12 (Invitrogen), 17,5 mmol / l de glucosa, y antibiótico-antimicótico] suplementado suero de ternero recién nacido (NCS) al 10% de (células SVFC). Después de transcurridos cuatro días, se cambió el medio por un medio para adipocito suplementado con NCS o FBS al 3%, 3-isobutil-1-metilxantina 0,6 mmol / l (IBMX), 0,2 μ mol / l de dexametasona, 2 μ mol / l y 10 μ g G / ml de insulina. Las células se iban alimentaron cada dos días con el mismo medio, pero sin el suplemento de IBMX, durante los 7 días restantes de diferenciación de adipocitos. Los adipocitos de tejido omental humano diferenciados se sumaron durante 24 horas y luego se trataron con concentraciones crecientes de insulina (Sigma), grelina acilada (Tocris), desacil grelina (Tocris), leptina, isoproterenol (Sigma), péptido natriurético atrial (ANP) (Bachem), TNF- (Pepro-Tech), lipopolisacárido (Sigma) y el factor de crecimiento tumoral (TGF-) (PeproTech).

Fraccionamiento subcelular

La fracción citosólica (S) y de membrana (P) de las células se obtuvieron por fraccionamiento subcelular como se describió anteriormente (26). La distribución de proteínas se analizó mediante inmunotransferencia utilizando 50 μ g de proteína de cada fracción.

Fraccionamiento libre de detergentes

Las diferentes fracciones de membrana enriquecidas con caveolina se aislaron a partir de células 3T3-L1 crecidas hasta confluencia en placas de 150 mm de diámetro y se procesaron como se ha descrito previamente (27). Después de dos lavados con PBS, las células se rasparon en 0,5 ml de carbonato de sodio 500 mmol / l, pH 11,00, se transfirieron a una cubeta de plástico y se homogeneizaron en dos etapas usando una aguja de 0,9 \times 40 mm y un baño de ultrasonidos. La concentración fue ajustada a sacarosa al 48% al añadir adición 0,8 ml de sacarosa al 70% preparada en solución salina de tampón de ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico (MES) (MBS) (25 mmol / l de MES a 6,50, 0,15 mol / l NaCl)

y se coloca en la parte inferior de un tubo de ultracentrífuga. Se formó un gradiente de sacarosa discontinuo (p / v) de 5-35% por encima (0,6 ml de sacarosa al 5%, 2,4 ml de sacarosa al 35%, ambos en MBS que contenía 250 mmol / l de carbonato sódico) y se centrifugó a 121.000 g durante 4 h a 4 ° C en un rotor SW40 (Beckman). Se recogieron fracciones de gradiente de sacarosa (450 μ l) de la parte superior del gradiente de sacarosa y posteriormente se analizaron mediante SDS-PAGE.

Análisis Estadístico

Los datos se expresan como media \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre los valores medios se determinaron usando la prueba χ^2 , el ANOVA unidireccional seguido de las pruebas de Scheffé o Dunnet, o el ensayo de Kruskal-Wallis seguido por las comparaciones pareadas de Mann-Whitney U, cuando fue apropiado. Se consideró estadísticamente significativo un valor de P <0,05. Los coeficientes de correlación de Pearson (r) se calcularon para explorar la relación entre dos variables. Los análisis estadísticos fueron realizados por el software SPSS.

RESULTADOS

Caracterización de SEPT11 en tejido adiposo humano

Inicialmente, se hicieron experimentos para evaluar SEPT11 en muestras pareadas de los dos tejidos de los sujetos del estudio. Los análisis de expresión génica y proteica se realizaron mediante PCR en tiempo real, western-blot e inmunohistoquímica. SEPT11 se expresó en tejido adiposo omental y en tejido adiposo subcutáneo, presentando el depósito anterior niveles de transcripción globales más elevados ($1,0 \pm 0,0$ vs, $5,7 \pm 1,3$ A.U., P <0,0001). El tejido Omental (Figuras 1A y 1C) y el tejido adiposo subcutáneo (Figuras 1B y 1D) de pacientes obesos mostraron una mayor expresión de ARNm y proteína de SEPT11 en comparación con individuos delgados. Se encontraron niveles similares de transcripción y proteína de SEPT11 en depósitos de grasa omental y subcutánea obtenidos de pacientes obesos sensibles a la insulina y resistentes a insulina. Curiosamente, los niveles de proteína de SEPT11 en el tejido adiposo omental estaban positivamente relacionados con los marcadores de adiposidad, incluyendo IMC (r = 0,45, P = 0,010), % BF (r = 0,47, P = 0,010) y leptina plasmática (r = 0,38, P = 0,049), mientras que la expresión proteica de SEPT11 en la grasa subcutánea se asoció positivamente con parámetros del metabolismo de la glucosa y la función hepática, como la glucemia

($r = 0,80$, $P < 0,001$), insulinemia ($r = 0,44$, $P = 0,030$), HOMA R = $0,69$, $P < 0,001$), QUICKI ($r = -0,47$, $P = 0,018$), triglicéridos séricos ($r = 0,82$, $P < 0,001$) y transaminasa γ -GT ($r = 0,71$, $P < Y$ el ajustar por sexo).

Para identificar el tipo celular responsable de la producción de SEPT11 en el tejido, se evaluó la presencia de esta proteína en tejido adiposo omental y subcutáneo mediante inmunohistoquímica y PCR en tiempo real. La distribución tisular de SEPT11 mostró una tinción predominante en adipocitos completamente maduros y una menor expresión en la fracción de estroma vascular de depósitos de grasa omental y subcutánea (Figuras 1E-F). Por consiguiente, SEPT11 mRNA se expresó principalmente en adipocitos aislados de tejido adiposo omental, aunque la expresión también se detectó en menor medida en estroma vascular de tejido adiposo omental y tejido adiposo subcutáneo (Figura 1G). Se encontraron niveles de transcripción similares de SEPT11 en adipocitos y fracción de estroma vascular obtenidos a partir de tejido adiposo omental de pacientes obesos sensibles a la insulina y resistentes a insulina (Figura 1H).

Regulación de SEPT11 en adipocitos del tejido adiposo omental de humanos

Dado el aumento de la abundancia de SEPT11 en tejido adiposo omental y la relevancia metabólica de este depósito de grasa (28), los experimentos posteriores se centraron en este tejido. Con el fin de caracterizar la funcionalidad de SEPT11 en el crecimiento del tejido adiposo, se analizó la regulación de SEPT11 por factores lipogénicos (insulina, grelina-acilada y desacil-grelina) y lipolíticos (leptina, isoproterenol y ANP). La insulina aumentó significativamente ($P < 0,05$) la expresión génica y proteica de SEPT11 en adipocitos de tejido omental, mientras que la grelina-acilada reguló negativamente ($P < 0,05$) la expresión génica de SEPT11, estos datos no se replicaron en la expresión proteica ($P = 0,314$) (Figura 2A-B). No se observó ningún efecto de desacil-grelina sobre los niveles de transcripción y proteína de SEPT11. La estimulación lipolítica con isoproterenol disminuyó ($P < 0,05$) la expresión génica y proteica de SEPT11 en los adipocitos omentales (Figura 2C-D). ANP tratamiento también tiende a disminuir la expresión génica y proteica de SEPT11, aunque las diferencias no alcanzan significancia estadística ($P = 0,123$ y $P = 0,149$, respectivamente). La leptina no modificó la expresión de SEPT11 en adipocitos omentales humanos.

Adicionalmente, se sabe que la iniciación de la apop-

tosis por factores proinflamatorios está asociada con la disrupción del citoesqueleto. Por lo tanto, se determinó el impacto de los estímulos proinflamatorios (TNF- α , LPS y TGF- β) sobre la expresión de SEPT11 en adipocitos omentales humanos. Como se muestra en las Figuras 2E-F, TNF- α y LPS regularon a la baja la expresión génica y proteica de SEPT11 en células grasas humanas, mientras que no se observó ningún efecto sobre la expresión de SEPT 11 tras estímulos con de TGF- β .

Localización Caveolar de las septinas en el tejido adiposo humano

La presencia de septinas, incluyendo SEPT11 en las balsas lipídicas de la membrana plasmática, se ha propuesto como mecanismo para regular la elasticidad de los receptores de membrana y anclaje al citoesqueleto de actina (19, 29). Dado que las caveolas son particularmente abundantes en balsas lipídicas y también contienen filamentos de citoesqueleto de actina (30), se analizó la interacción de caveolin-1, la principal proteína de recubrimiento de las caveolas en tejido adiposo humano (31), las imágenes de microscopía electrónica (Figura 3A) confocal e inmunofluorescencia revelan que SEPT11 exhibió una distribución citoesquelética formando anillos que colocaliza con caveolina-1 en adipocitos maduros humanos (Figura 3B). No se detectaron inmunorreacciones cuando se omitieron anticuerpos primarios o secundarios. Después de fraccionamiento subcelular de adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales, encontramos que SEPT11 estaba presente en las fracciones de la membrana citosólica y plasmática, pero no en gota lipídica (Figura 3C). Para investigar el tipo de asociación de SEPT11 con la caveola en los adipocitos, se empleó un método libre de detergentes para aislar Caveolas (Figura 3D) y la interacción entre SEPT11 y caveolina-1 se analizó por ensayo GST *pull down* (Figura 3E). SEPT11 estaba presente en la fracción 2 del fraccionamiento de la membrana celular de caveolas y se halló interacción directa de SEPT11 con caveolina-1 en los ensayos de GST *pull down*. En conjunto, estos datos sugieren que SEPT11 participa en la organización estructural y / o funcional de las caveolas, lo que sugiere su participación en la fisiología de los adipocitos.

La interacción de caveolina-1 con las septinas se confirmó además en muestras emparejadas de tejido adiposo omental y subcutáneo obtenidas de sujetos delgados y obesos (Figura F). Como era de esperar, la expresión génica de CAV1 se incrementó en los grupos obesos en comparación con los individuos delgados, pero no

se encontraron diferencias entre los sujetos obesos con NG y IGT & T2D (Figura 3F). Aunque se observó una tendencia hacia un aumento en los niveles de transcrito de caveolina-1 en el tejido adiposo subcutáneo de los grupos obesos, no se encontraron diferencias estadísticas ($P = 0,290$). Existió correlación positiva entre la expresión génica de SEPT11 y CAV1 en los 2 tejidos, omental y subcutáneo (Figura 3G-H).

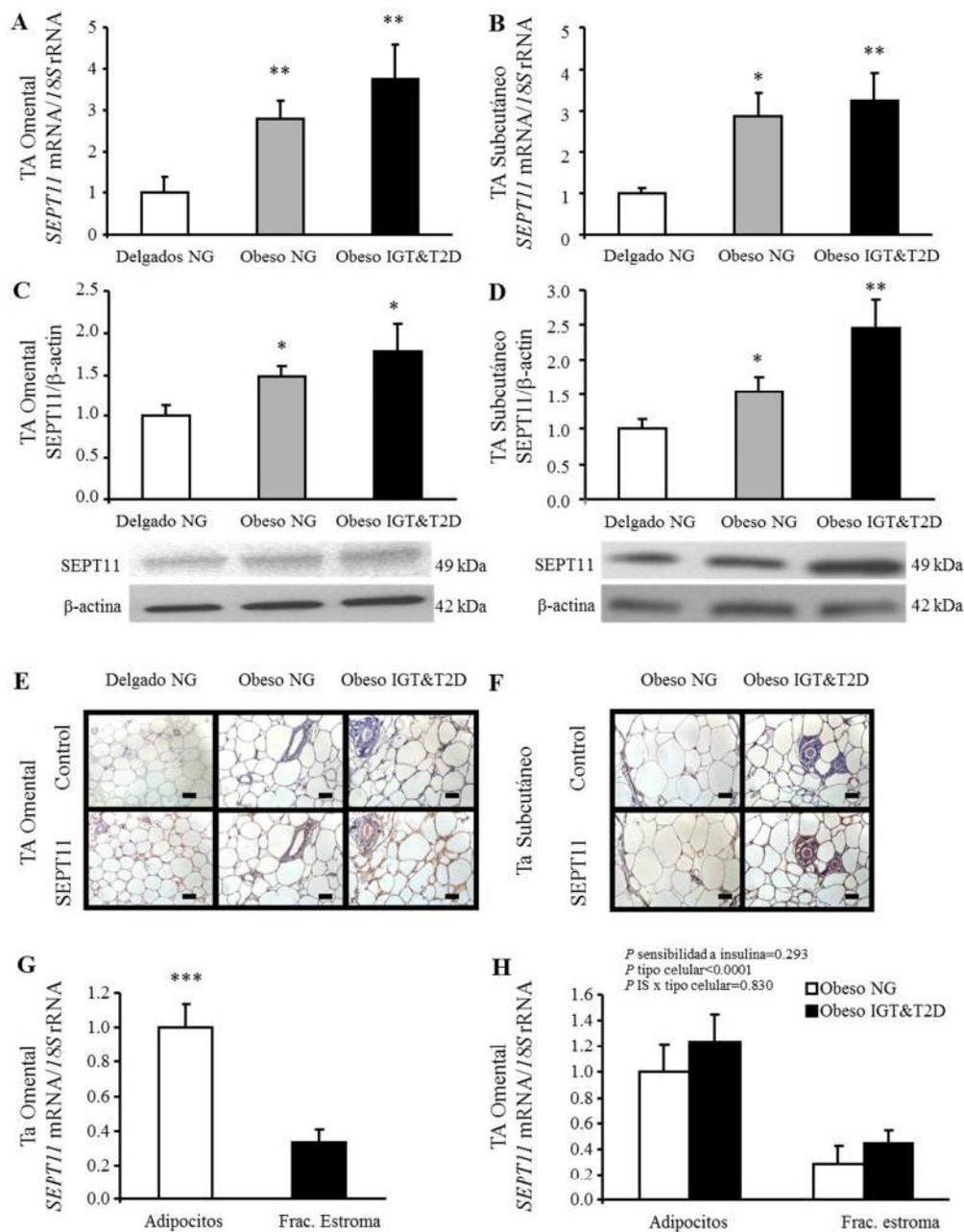
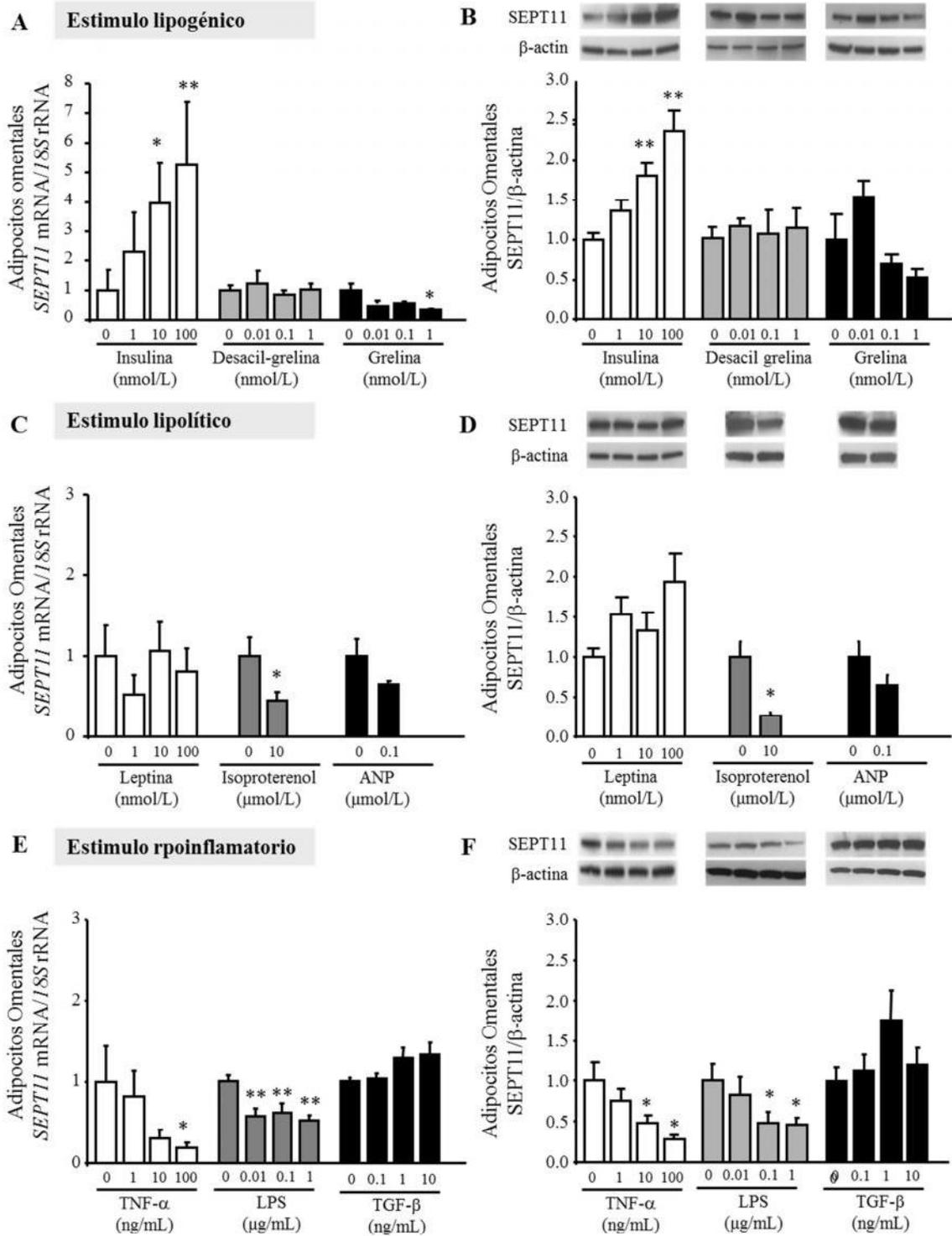


Figura 1. Expresión de SEPT11 en tejido adiposo omental y en tejido adiposo subcutáneo



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs células no estimuladas.

Figura 2. Expresión génica y proteica de SEPT11 en adipocitos de tejido omental,

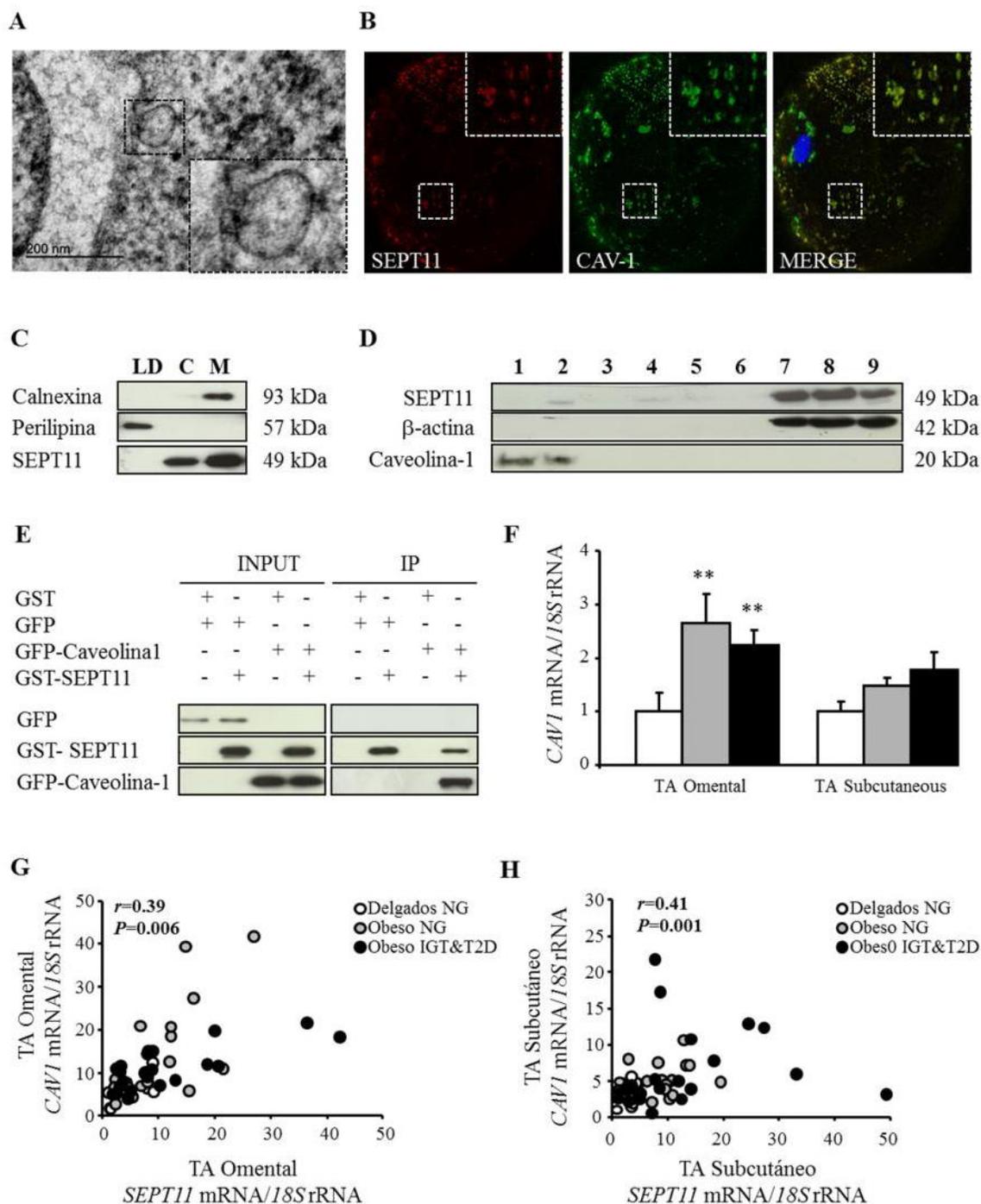


Figura 3. Distribución y expresión de SEPT11 y su relación con Caveolina 1 en adipocitos humanos.

DISCUSION

La remodelación de los componentes del citoesqueleto actina, tubulina y vimentina es clave para la adipogénesis y el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina en los adipocitos (4-6, 31-34). Las septinas, han sido recientemente catalogadas como el cuarto componente del citoesqueleto (15), dentro de ellas SEPT11 se encuentra expresada en membrana plasmática del adipocito (22). Sin embargo, la presencia de SEPT11 no se ha descrito aún en

el tejido adiposo humano. Sobre la base de la expresión génica y proteica, así como los datos de inmunohistoquímica, los adipocitos son el tipo celular responsable de la expresión de SEPT11 en el tejido adiposo humano, aunque una baja transcripción de SEPT11 también se observó en el estroma vascular. En este contexto, algunas septinas se expresan, según algunas publicaciones, en diferentes tipos de células de la fracción de estroma vascular, como neutrófilos, monocitos / macrófagos y fibroblastos (35, 36). Por otra parte, una mayor expresión de SEPT11 se encontró en la grasa subcutánea en comparación con el tejido adiposo omental. Es bien sabido que la grasa omental se asocia con mayor inflamación y sensibilidad a la acción de las catecolaminas, mientras que el tejido adiposo subcutáneo exhibe más sensibilidad a la insulina (28). Adicionalmente, SEPT11 fue regulado negativamente por el agonista α -adrenérgico isoproterenol y los factores proinflamatorios TNF- α y LPS, mientras que fue regulado positivamente por la insulina. La hipertrofia de los adipocitos y la resistencia a la insulina inducen cambios profundos en las proteínas del citoesqueleto actina, tubulina y vimentina (7, 8, 10, 32). En conjunto, éstos resultados de expresión génica en los depósitos grasos parecen aumentar la resistencia a la insulina, la lipólisis y la inflamación en el tejido adiposo visceral (36). La hipertrofia de los adipocitos y la resistencia a insulina inducen cambios profundos en las proteínas del citoesqueleto actina, tubulina y vimentina (7, 8, 10, 34, 36-40). En este sentido, la expresión de la tubulina y la actina en el tejido adiposo es regulada negativamente durante la adipogénesis y aumentada por la restricción calórica y los fármacos sensibilizadores de la insulina (es decir, la rosiglitazona) (41-43). Por otra parte, el citoesqueleto de vimentina se reorganiza durante la diferenciación de los adipocitos, pero no es influenciado por la señalización de insulina (33, 37). En el presente estudio, la expresión génica de SEPT11 se correlacionó positivamente con marcadores de adiposidad en grasa omental y con parámetros de resistencia a insulina en tejido adiposo subcutáneo. La obesidad se asoció con mayor transcripción de SEPT11 y mayores niveles de proteína en los depósitos de grasa omental y subcutánea. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre insulino-sensibles y pacientes resistentes a la insulina, lo que sugiere que la regulación de SEPT11 está más relacionada con el tamaño de los adipocitos que con la resistencia a la insulina propiamente (35, 36).

Por otra parte, las Caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática implicadas en muchos aspectos de la función celular, como el tráfico de lípidos, la transducción de señales, la proliferación o la endocitosis (14, 27, 30). La Caveolin-1, la principal proteína de recubrimiento de la caveola en los adipocitos, desempeña un papel metabólico clave en el tejido adiposo, facilitando la absorción de ácidos grasos libres y el colesterol, así como la señalización de la insulina. En este estudio se encontró que caveolina-1 está regulada positivamente en el omento y el tejido adiposo subcutáneo, confirmando datos previamente publicados (31). Por otra parte, una interacción positiva entre caveolin-1 y SEPT11 se encontró en los adipocitos, como lo demuestran los resultados observados en *GST pull down*, inmunofluorescencia y fracciones de membrana. Estudios previos han demostrado cierta interacción de la caveola con diferentes componentes del citoesqueleto en las células de mamíferos (13, 44). Por ejemplo, los adipocitos 3T3-L1 tienen una estructura de actina organizada de forma única que emana de microdominios de las balsas lipídicas enriquecidas con caveolina en la membrana plasmática (45). Además, la localización de microtúbulos y vimentina en fracciones enriquecidas en caveolina-1 se ha asociado con acumulación intracelular de gotas lipídicas durante la adipogénesis de preadipocitos bovinos (44). Análogamente a los otros componentes del citoesqueleto, las septinas muestran una distribución caveolar y queda por aclarar su papel en la funcionalidad de las caveolas en los adipocitos.

CONCLUSIONES

En resumen, los principales hallazgos del presente estudio son que: a) las septinas constituyen nuevos componentes del citoesqueleto en los adipocitos humanos; B) SEPT11, es una proteína del citoesqueleto abundante en la membrana plasmática de los adipocitos donde interactúa con caveolin-1 además de exhibir una distribución caveolar; c) La insulina, isoproterenol, ANP, TNF- α y LPS constituyen reguladores transcripcionales de SEPT11 en adipocitos humanos; D) SEPT11 aumenta en obesidad y se relaciona con el tamaño de los adipocitos en la grasa omental y con los marcadores de resistencia a la insulina en el tejido adiposo subcutáneo. Estos resultados amplían nuestra comprensión de la remodelación del citoesqueleto durante el inicio de la obesidad y la resistencia a la insulina.

REFERENCIAS

1. Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., et al. (2008). "Dynamics of fat cell turnover in humans". *Nature*. (453) 783-787.
2. Heinonen, S., Saarinen, L., Naukkarinen, J., Rodríguez, A., Frühbeck, G., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Lundbom, N., Vuolteenaho, K., Moilanen, E., et al. (2014). "Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity". *Int J Obes (Lond)*: doi: 10.1038/ijo.2014.31
3. Frühbeck, G., Becerril, S., Sáinz, N., Garrastachu, P., and García-Veloso, M.J. (2009). "BAT: a new target for human obesity?". *Trends Pharmacol Sci*. (30) 387-396.
4. Yang, W., Guo, X., Thein, S., Xu, F., Sugii, S., Baas, P.W., Radda, G.K., and Han, W. (2013). "Regulation of adipogenesis by cytoskeleton remodelling is facilitated by acetyltransferase MEC-17-dependent acetylation of alpha-tubulin". *Biochem J*. (449) 605-612.
5. Pellegrinelli, V., Heuvingh, J., du Roure, O., Rouault, C., Devulder, A., Klein, C., Lacasa, M., Clement, E., Lacasa, D., and Clement, K. (2014). "Human adipocyte function is impacted by mechanical cues". *J Pathol*. (233) 183-95.
6. Verstraeten, V.L., Renes, J., Ramaekers, F.C., Kamps, M., Kuijpers, H.J., Verheyen, F., Wabitsch, M., Steijlen, P.M., van Steensel, M.A., and Broers, J.L. (2011). "Reorganization of the nuclear lamina and cytoskeleton in adipogenesis". *Histochem Cell Biol*. (135) 251-261.
7. Spiegelman, B.M., and Farmer, S.R. (1982). "Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes". *Cell*. (29) 53-60.
8. Lieber, J.G., and Evans, R.M. (1996). "Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation". *J Cell Sci*. (109) 3047-3058.
9. Schiller, Z.A., Schiele, N.R., Sims, J.K., Lee, K., and Kuo, C.K. (2013). "Adipogenesis of adipose-derived stem cells may be regulated via the cytoskeleton at physiological oxygen levels in vitro". *Stem Cell Res Ther*. (4) 79.
10. Kanzaki, M., and Pessin, J.E. (2001). "Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling". *J Biol Chem*. (276) 42436-42444.
11. Ariotti, N., Murphy, S., Hamilton, N.A., Wu, L., Green, K., Schieber, N.L., Li, P., Martin, S., and Parton, R.G. (2012). "Postlipolytic insulin-dependent remodeling of micro lipid droplets in adipocytes". *Mol Biol Cell*. (23) 1826-1837.
12. Lopez, J.A., Burchfield, J.G., Blair, D.H., Mele, K., Ng, Y., Vallotton, P., James, D.E., and Hughes, W.E. (2009). "Identification of a distal GLUT4 trafficking event controlled by actin polymerization". *Mol Biol Cell*. (20) 3918-3929.
13. Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M.R., Morgan, G.P., Marsh, B.J., and Parton, R.G. (2008). "High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions". *Traffic*. (9) 893-909.
14. Méndez-Giménez, L., Rodríguez, A., Balaguer, I., and Frühbeck, G. (2014). "Role of aquaglyceroporins and caveolins in energy and metabolic homeostasis". *Mol Cell Endocrinol*: 10.1016/j.mce.2014.06.017
15. Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). "Septins: the fourth component of the cytoskeleton". *Nat Rev Mol Cell Biol*. (13) 183-194.
16. Hall, P.A., and Russell, S.E. (2004). "The pathobiology of the septin gene family". *J Pathol*. (204) 489-505.
17. Weirich, C.S., Erzberger, J.P., and Barral, Y. (2008). "The septin family of GTPases: architecture and dynamics". *Nat Rev Mol Cell Biol*. (9) 478-489.
18. Spencer, B., Crews, L., and Masliah, E. (2007). "Climbing the scaffolds of Parkinson's disease pathogenesis". *Neuron*. (53) 469-470.
19. Maimaitiyiming, M., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Nagata, K., Suzaki, T., and Maekawa, S. (2008). "Biochemical characterization of membrane-associated septin from rat brain". *J Neurochem*. (106) 1175-1183.
20. Peterson, E.A., and Petty, E.M. (2010). "Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease". *Clin Genet*. (77) 511-524.

21. Hall, P.A., Jung, K., Hillan, K.J., and Russell, S.E. (2005). "Expression profiling the human septin gene family". *J Pathol.* (206) 269-278.
22. Prior, M.J., Larance, M., Lawrence, R.T., Soul, J., Humphrey, S., Burchfield, J., Kistler, C., Davey, J.R., La-Borde, P.J., Buckley, M., et al. (2011). "Quantitative proteomic analysis of the adipocyte plasma membrane". *J Proteome Res.* (10) 4970-4982.
23. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, et al. (2003). "Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus". *Diabetes Care.* (26) 3160-3167.
24. Rodríguez, A., Gomez-Ambrosi, J., Catalan, V., Rotellar, F., Valenti, V., Silva, C., Mugueta, C., Pulido, M.R., Vazquez, R., Salvador, J., et al. (2012). "The ghrelin O-acyltransferase-ghrelin system reduces TNF-alpha-induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes". *Diabetologia.* (55) 3038-3050.
25. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Rodríguez A, Salvador J, Gil MJ, Cienfuegos JA, and Frühbeck G. (2007). "Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus". *Horm Metab Res.* (39) 495-500.
26. Cruz-García, D., Díaz-Ruiz, A., Rabanal-Ruiz, Y., Peinado, J.R., Gracia-Navarro, F., Castaño, J.P., Montero-Hadjadje, M., Tonon, M.C., Vaudry, H., Anouar, Y., et al. (2012). "The Golgi-associated long coiled-coil protein NECC1 participates in the control of the regulated secretory pathway in PC12 cells". *Biochem J.*(443) 387-396.
27. Peiró, S., Comella, J.X., Enrich, C., Martín-Zanca, D., and Rocamora, N. (2000). "PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation". *J Biol Chem.* (275) 37846-37852.
28. Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., and Frühbeck, G. (2007). "Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome?". *Curr Pharm Des.* (13) 2169-2175.
29. Mostowy, S., Janel, S., Forestier, C., Roduit, C., Kasas, S., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., and Lafont, F. (2011). "A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* INVASION PROTEIN InlB and the Met receptor". *Biophys J.* (100) 1949-1959.
30. Parton, R.G., and del Pozo, M.A. (2013). "Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers". *Nat Rev Mol Cell Biol.* (14) 98-112.
31. Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Silva, C., Rotellar, F., Gil, M.J., Cienfuegos, J.A., Salvador, J., and Frühbeck, G. (2008). "Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation". *Clin Endocrinol (Oxf).* (68) 213-219.
32. Stall, R., Ramos, J., Kent Fulcher, F., and Patel, Y.M. (2014). "Regulation of myosin IIA and filamentous actin during insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes". *Exp Cell Res.* (322) 81-88.
33. Franke, W.W., Hergt, M., and Grund, C. (1987). "Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules". *Cell* (49) 131-141.
34. Bhonagiri, P., Pattar, G.R., Habegger, K.M., McCarthy, A.M., Tackett, L., and Elmendorf, J.S. (2011). "Evidence coupling increased hexosamine biosynthesis pathway activity to membrane cholesterol toxicity and cortical filamentous actin derangement contributing to cellular insulin resistance". *Endocrinology.* (152) 3373-3384.
35. Huang, Y.W., Yan, M., Collins, R.F., Diciccio, J.E., Grinstein, S., and Trimble, W.S. (2008). "Mammalian septins are required for phagosome formation". *Mol Biol Cell.* (19) 1717-1726.
36. Hanai, N., Nagata, K., Kawajiri, A., Shiromizu, T., Saitoh, N., Hasegawa, Y., Murakami, S., and Inagaki, M. (2004). "Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11". *FEBS Lett.* (568) 83-88.
37. Blüher, M., Wilson-Fritch, L., Leszyk, J., Laustsen, P.G., Corvera, S., and Kahn, C.R. (2004). "Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes". *J Biol Chem.* (279) 31902-31909.

38. Kumar, N., Robidoux, J., Daniel, K.W., Guzman, G., Floering, L.M., and Collins, S. (2007). "Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis". *J Biol Chem.* (282) 9244-9250.
39. Ding, Y., Wu, Y., Zeng, R., and Liao, K. (2012). "Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse". *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* (44) 394-406.
40. Higami, Y., Barger, J.L., Page, G.P., Allison, D.B., Smith, S.R., Prolla, T.A., and Weindruch, R. (2006). "Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue". *J Nutr* (136) 343-352.
41. Teichert-Kuliszewska, K., Hamilton, B.S., Roncari, D.A., Kirkland, J.L., Gillon, W.S., Deitel, M., and Hollenberg, C.H. (1996). "Increasing vimentin expression associated with differentiation of human and rat preadipocytes". *Int J Obes Relat Metab Disord.* (20) Suppl 3:S108-113.
42. Ahmed, M., Neville, M.J., Edelman, M.J., Kessler, B.M., and Karpe, F. (2010). "Proteomic analysis of human adipose tissue after rosiglitazone treatment shows coordinated changes to promote glucose uptake". *Obesity (Silver Spring).* (18) 27-34.
43. Bouwman, F.G., Wang, P., van Baak, M., Saris, W.H., and Mariman, E.C. (2014). "Increased beta-oxidation with improved glucose uptake capacity in adipose tissue from obese after weight loss and maintenance". *Obesity (Silver Spring).* (22) 819-827.
44. Takenouchi, T., Miyashita, N., Ozutsumi, K., Rose, M.T., and Aso, H. (2004). "Role of caveolin-1 and cytoskeletal proteins, actin and vimentin, in adipogenesis of bovine intramuscular preadipocyte cells". *Cell Biol Int.* (28) 615-623.
45. Kanzaki, M., and Pessin, J.E. (2002). "Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes". *J Biol Chem.* (277) 25867-25869.