

*MEMORIA DE TESIS DOCTORAL*



**PAPEL DE LA CAVEOLINA EN PROLIFERACIÓN  
Y EN REGENERACIÓN HEPÁTICA**

Presentada por  
Rafael Mayoral Moñibas  
para aspirar al grado de Doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid

*Dirigida por*  
*Dr. Lisardo Boscá Gomar*



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DPTO. DE BIOLOGÍA MOLECULAR**



**PAPEL DE LA CAVEOLINA EN PROLIFERACIÓN  
Y EN REGENERACIÓN HEPÁTICA**

*Rafael Mayoral Moñibas*

*Madrid, 2007*

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) y en el Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM), Facultad de Farmacia UCM, bajo la dirección del Dr. Lisardo Boscá Gomar, con ayuda de una beca de CNIC-Bancaja.

*A mi familia*



*A mis amig@s*





*Agradecimientos*

---

Muchos son los caminos por los que discurre el mundo de la ciencia y cada día que pasa nos damos cuenta de que este mundo es más pequeño de lo que parece. Este trabajo de Tesis Doctoral no habría sido posible sin la participación laboral y sin el apoyo personal, de muchas personas con las que he vivido numerosas experiencias y a las que me gustaría dedicar unos párrafos.

En primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr. Lisardo Boscá al que estoy muy agradecido por admitirme en su grupo, por escucharme en todo momento y por tener siempre una actitud dialogante y constructiva.

Mi mas sincero agradecimiento a la Dra. Paloma Martín Sanz, por enseñarme que la ciencia no ha nacido ayer, por saber tanto y por tener la paciencia de enseñarme. Gracias sobre todo por tu cariño, comprensión y consejos personales. Gracias por hacerme sentir en el día a día del trabajo como en mi casa.

Gracias a mi tutor Balbino Alarcón, por su ayuda, por su amable interés y por recibirme siempre con amabilidad. Gracias a Magdalena Sanz por su gran eficacia y por ayudarme siempre con cariño y con una sonrisa en cada trámite administrativo que he necesitado.

Quiero también agradecer a otros grupos de investigación que me han ayudado en la realización de este trabajo, con los que he participado en otros proyectos y con los que he compartido tan buenos momentos.

Gracias a todos los integrantes de los grupos del Dr. Manuel Ortiz de Landázuri y del Dr. Francisco Sánchez Madrid en el Hospital Universitario de La Princesa, donde comencé mis primeros pasos en esto que se llama ciencia, me enseñaron la puerta de entrada y me dieron el empujón a entrar en este camino. Gracias a todos los integrantes de Paco's 1 y Paco's 2; Manu, Román, Juan, Mymo, Olga, Mittel, Mónica, Merche y en especial a Agustín, gracias por tu vitalidad, por tus ganas de hacer ciencia en cualquier sitio y en cualquier situación, gracias por tu apoyo. No quisiera olvidarme del personal del citómetro, de Reuma, de la gente de la 9ª, las chicas de Cecilia, Sonia y Nuria, y de los que formábamos parte de Hi-Tech y New-Lab; Silvia, Julián, Alicia, Luís, Yoli, Gema y al los que mas quiero, Maika, Salva y Elisa por aconsejarme en todo momento con mis decisiones, muchas gracias. Con mucho cariño quiero agradecer en especial a Pilar Ávila, gracias por tener paciencia con el “nuevo becario” y por enseñarme a ser meticuloso y a pensar en lo que necesito antes de necesitarlo. Muchas gracias Pilar.

Gracias a todos los integrantes del Instituto de Bioquímica y del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II de la facultad de Farmacia. Con los que he disfrutado mis primeros años “CNIC”. Gracias a todos por facilitarme la labor diaria y poner todos los medios a mi alcance. Gracias a Miguel, Oscar, Carlos y Antonio, por tener siempre un momento para reírnos y poder evadirnos un poco de nuestra “precaria” situación. Gracias al grupo del Dr. Fernando Escrivá, por ayudarme con mis ultracentrifugaciones y por enseñarme la minuciosa precisión de la matemática, necesaria para que una centrifuga descatalogada siga durando mucho tiempo; con gran afecto, gracias Fernando. En especial quiero dar las gracias a Lucia, mi compañera de enfrente, gracias por ser más que una compañera de trabajo, por ser una verdadera amiga, gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado, por ayudarme cuando lo he necesitado y por hablar mi “mismo lenguaje”, muchas gracias Luci.

Gracias al Dr. Ignacio González-Crespo y a Inmaculada por enseñarme los secretos de la extracción de fracciones enriquecidas en caveolas y sin los cuales no habríamos podido conseguir muchos de los resultados obtenidos.

Gracias a las personas del Instituto de Bioquímica de Valencia, por acogerme siempre tan bien, por sentirme tan a gusto cada vez que he ido a Valencia. Gracias a la Dra. Marta Casado, por enseñarme a extraer y cultivar hepatocitos, por recibirme siempre que ha sido necesario y por tener siempre un momento para discutir cualquier dato. Gracias a Santi por tener siempre un momento para charlar, gracias a Paula, nunca olvidaré nuestro viaje a Elche Xiqueta!, y por supuesto a Belén por trabajar tan bien, tan organizada, por amenizarme mis estancias, por estar siempre que se necesitaba, por tener siempre un momento para un café, y aunque aun no he probado esa horchata tan rica que siempre dices que me vas a invitar... muchas gracias. Gracias a mis “amigas” valencianas, sobretodo a Diana por agradecer mis estancias, por enseñarme la ciudad del Turia y por esas barbacoas en Godella.

Quiero dar las gracias a varias personas del Centro de Investigaciones Biológicas, Eva y África, por disfrutar con vosotras de los congresos de la SEBBM y por la ayudita con el TGF- $\beta$ , gracias a mi colega el Dr. Gaizka con el que he pasado muy buenos momentos, gracias por nuestras profundas charlas a la vera del río Hudson, los paseos por la calle Houston en NYC y los viajes en barco a Staten Island, gracias por hacer más agradable mi estancia en Philadelphia y por acogerme en tu casa. Gracias a Estibaliz, por aguantarnos a Gaizka y a mi cuando nos juntamos y por ser un encanto,

la próxima vez que visite NY intentaré haber aprendido a hablar Vasco para los momentos delicados...

Gracias al Dr. Michael Pack, por darme la oportunidad de conocer otras culturas, por su amabilidad, por estar siempre escuchando y por tratarme como a uno más. Gracias a Cristin, por su eterna sonrisa y por su amabilidad desde el primer día que llegué al laboratorio hasta el último y a Christoff por ayudarme en todo momento, gracias a los demás miembros del grupo, Randy, David, Gangaro, Yosheva, Mani, Waylong y Yuehua por los interminables experimentos de SAM/SAH y Hcy. Gracias a la Dra. Yakeline Tanaka, por acogerme en su hogar, por su hospitalidad y cariño, por las charlas de la mañana y de la tarde y por tratarme como a un hijo. Por supuesto no puedo olvidar dar las gracias a los integrantes de la planta 12 del BRBII en UPENN, Pepe Oliva, Mónica y Cecilia, con los que pasé buenos momentos, gracias por su amabilidad y por integrarme desde la primera semana.

Gracias a todo el personal del CNIC, administración, animalario, almacén, proteómica, a las chicas de compras y a José Luís. Gracias al Dr. Miguel Ángel del Pozo, por su ayuda desinteresada, por dejarnos los ratones KO de Cav-1 y los plásmidos de Cav-1, gracias por atendernos desde el primer día en el que nos avisaste de la dureza del mundo de la caveolina. Gracias a Araceli por dejarme probar sus anticuerpos que han sido muy necesarios para este trabajo.

Gracias a todos los integrantes del grupo del Dr. Juan Miguel Redondo, por ser siempre tan amables conmigo. También quiero dar las gracias a nuestros compañeros de la planta 2ª Norte del CNIC, a los “Lamas” por compartir momentos tanto científicos como personales, en especial gracias a Carlos, Tania, Conchi, Inma y sobretodo a Sara, gracias por ser tan encantadora, por tener siempre una palabra agradable, por preguntar todas las mañanas si quería tomar un café, por las charlas científicas y por tener siempre un momento para compartir experiencias. Gracias toda la unidad de citometría del CNIC, al Dr. Alberto Álvarez y a las “chicas”, Pili, Elvira y Raquel, gracias por vuestro interés en el trabajo y en que las cosas salgan bien, y gracias por tener siempre una actitud constructiva y hacerlo siempre con una sonrisa.

No puedo dejar de dar las gracias a todos los integrantes del grupo del Dr. Lisardo Boscá. Gracias a Sonsoles por escuchar y ayudarme en todo momento, a Lele porque sin el la “época CNIC” no habría sido igual, a Antonio Castrillo y a Alfonso por ser unos crack, a Nora por enseñarme la “PCR Nora Stile”. También he de dar las

gracias a la Dra. Beatriz de las Heras por su apoyo y a Miriam por enseñarme a hacer hepatectomías, a Dani por tener la paciencia de explicarnos tantas matrices y matrices, y por tener siempre un momento “no científico”. Gracias a Gemita y a Susana por ser de tanta ayuda y por reírnos tanto de todo. Gracias a Raquel, por ayudarme con las construcciones y por tener siempre un momento para enseñar a los demás tus conocimientos. Gracias a Amalia, mi compañera de la “época de Farmacia” con la que he compartido muy buenos momentos. Muchas gracias a Mónica, que al final ha sido una persona más del grupo, gracias por ser siempre tan cordial, por tus consejos, por tu amabilidad y tu cariño. En especial tengo que agradecer a mis dos apoyos fundamentales, Jimena y Paqui, sin las cuales todo habría sido diferente, gracias por vuestro cariño comprensión, y por tantas cosas que tendría que decir que llenaría páginas y páginas, con mucho cariño, muchas gracias. No puedo dejar de agradecer los buenos momentos que nos han dejado en la memoria todas aquellas personas que han pasado por el laboratorio, a nuestras chicas mejicanas Carla y Perla, a Simón de Brasil, y por supuesto a Maga nuestra compañera argentina con la que pasé muchos y buenos momentos.

No puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas de mi vida “no científica”, aquellos que con cariño te preguntan “¿Has terminado ya la carrera?” o “¿Qué tal con tus virus?”. No importa cuantas veces lo repitas, siempre te preguntaran lo mismo, aun así, con cariño les cuentas tu vida en el laboratorio y siempre te escucharán, a todos ellos quiero darles las gracias por escucharme y por apoyarme en todo momento. Gracias a mi grupo de amigos, que lo son desde 1º de EGB, David, Enrique, Eduardo, José Eduardo, Arturo, Jesús Antonio, José Francisco, Iván Carrillo, y en especial a Javier y a Juan Manuel con los que comparto muchas experiencias y a los que quiero como hermanos; y como no, tengo que dar las gracias a la persona que más charlas científicas ha aguantado, a Iván Mota, una de las personal a las que se le puede aplicar el calificativo de “buena persona”, muchas gracias por tu cariño “Pota”. Tengo que dar las gracias a mis amigos de “toda la vida” y es así porque no recuerdo el día en que nos conocimos y porque somos amigos de chupete y pañal, gracias a Maria, Ana, Jorge, José y Mario, Edgar, Laura y Chus, Cristina y Eva, Laurita, y en especial a Elena, mi vecina de enfrente con la que tengo muchos y muy buenos recuerdos.

También he de agradecer a mis colegas de la facultad de CC. Biológicas de la UAM, con quienes compartí más que una carrera, fueron nuestros inicios en la vida

adulta y a todos ellos les quiero dar las gracias, en especial a Marta, Patricia, Alfredo, Laura, Rosario, a Martita con la que pasé muchos buenos momentos y en especial a mi querida Almudena.

Por supuesto tengo que dar las gracias a todos los miembros de mi familia, que siempre me han apoyado en este viaje, los que me han soportado y aguantado durante muchos años.

*“Observar sin pensar es tan peligroso como pensar sin observar. La hipótesis es nuestra mejor herramienta intelectual, pero susceptible de mellarse y de enmohecerse, necesitando continuas reparaciones y sustituciones, pero sin la cual fuera imposible labrar honda brecha en el duro bloque de lo real”.*

*Santiago Ramón y Cajal, 1852-1934.  
Cajal y la escuela neurológica española.*

*“Una teoría puede probarse mediante experimentos; pero no hay ningún camino que conduzca de los experimentos a la teoría”.*

*Albert Einstein, 1879- 1955.*







El proceso de la regeneración hepática ha sido reconocido por los científicos desde hace muchos años e incluso fue descrito por los antiguos Griegos, que mencionaron la regeneración del hígado en el mito de Prometeo, quien fue castigado por Zeus tras robar el secreto del fuego a los dioses y entregárselo a los humanos, encadenándolo a una roca en el monte Cáucaso donde era torturado por un águila que se alimentaba de su hígado. La regeneración de este órgano durante la noche convertía el castigo en un tormento interminable. (Adaptado de Bulfinch's mythology).



*Abreviaturas*

---

<b>ADN</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>ADNc</b>	ácido desoxiribonucleico copia
<b>AG</b>	aparato de Golgi
<b>AR</b>	anfíregulina
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino
<b>Cav-1</b>	caveolina-1
<b>CBD</b>	dominio de unión a caveolina
<b>CHAPS</b>	3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato
<b>C/EBP</b>	proteína de unión a la secuencia CAAT
<b>CPH</b>	cultivo primario de hepatocitos
<b>CSD</b>	dominio de anclaje a caveolina
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos
<b>DTT</b>	DL-ditiotreitol
<b>ECL</b>	sistema intensificador de quimioluminiscencia para Western blot
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamino tetracético
<b>EGF</b>	factor de crecimiento epidérmico
<b>EGTA</b>	ácido etilénbis (oxietileno nitrilo) tetracético
<b>ERRs</b>	endosomas de reciclaje de receptores
<b>FEC</b>	fracción enriquecida en caveolina
<b>FCS</b>	suero fetal bovino
<b>FNC</b>	fracción no caveolar
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente
<b>HCC</b>	carcinoma hepatocelular
<b>HGF</b>	factor de crecimiento hepático
<b>HP/PH</b>	hepatectomía parcial / partial hepatectomy
<b>IGFBP</b>	proteína de unión al factor de crecimiento similar al de insulina
<b>IL</b>	interleuquina
<b>INF</b>	interfase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferón gamma
<b>C-MAD</b>	dominio de unión a la membrana C terminal

<b>N-MAD</b>	dominio de unión a la membrana N terminal
<b>MEC</b>	matriz extracelular
<b>MES</b>	ácido morfoetanosulfónico
<b>MMPs</b>	metaloproteasas de matriz extracelular
<b>MP</b>	membrana plasmática
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>eNOS</b>	óxido nítrico sintasa endotelial
<b>PAI</b>	Inhibidor del activador de plasminógeno
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	reacción de la polimerasa en cadena
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PKC</b>	proteína quinasa C
<b>PTB/SH2</b>	dominio de unión a fosfo-tirosina
<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>RTK</b>	receptor tirosina quinasa
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico
<b>Socs</b>	supresor de la señalización por citoquinas
<b>Stat</b>	Transductor de señales y activador de la transcripción
<b>TGF</b>	factor de crecimiento transformante
<b>TLCK</b>	N- $\alpha$ -tiosil-L-lisina clorometil cetona
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-amino metano
<b>TUNEL</b>	TdT-mediated dUTP nick end labelling
<b>uPA</b>	Activador de plasminógeno tipo urokinasa



*Índice*

---

<b>RESUMEN / SUMMARY</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1. CAVEOLAS Y CAVEOLINA... ..	6
1.1. Definición y morfología.....	6
1.2. Composición y propiedades bioquímicas de las caveolas.....	7
2. LA FAMILIA DE LAS CAVEOLINAS.....	9
2.1. La caveolina es la proteína que recubre las caveolas.....	9
2.2. Tres caveolinas diferentes, Cav-1, Cav-2 y Cav-3.....	9
2.3. Especificidad de tejido.....	10
3. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LAS CAVEOLINAS.....	11
3.1. Biogénesis de las caveolinas.....	11
3.1.1. El papel de la caveolina.....	11
3.1.2. El papel del colesterol.....	11
3.2. Topología de membrana de la caveolina.....	12
3.3. Oligomerización de las caveolinas.....	13
3.4. Relación estructural con las otras caveolinas.....	13
4. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS CAVEOLAS/CAVEOLINAS.....	14
4.1. Mecanismos de transducción de señales.....	14
4.1.1. La caveolina como “señalosoma”: señalización compartimentalizada.....	14
4.1.2. Las caveolinas como moduladores de la señalización.....	15
4.2. Oncogénesis y tumorigénesis.....	17
4.2.1. Las caveolas/caveolinas como diana de los oncogenes.....	17
4.2.2. Las caveolinas como supresoras de tumores.....	18
4.2.3. La caveolina en progresión tumoral.....	19
5. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LAS CAVEOLAS Y LA CAVEOLINA.....	20



6. CAVEOLINA E HÍGADO.....	21
7. LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	22
7.1. El proceso de regeneración.....	23
7.2. Señalización por citoquinas.....	26
7.3. Señalización por factores de crecimiento.....	27
7.4. Integración de la señalización.....	29
7.5. Finalización del proceso de regeneración.....	31
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
1. MATERIAL.....	40
1.1. Aparatos.....	40
1.2. Reactivos.....	40
2. MÉTODOS.....	42
2.1. Cultivos celulares y tratamiento.....	42
2.2. Técnica de la perfusión hepática y cultivo primario de hepatocitos.....	42
2.3. Mantenimiento de los animales y operaciones de hepatectomía parcial.....	44
2.4. Descripción de la cepa <i>Cav<sup>tm1Mls</sup>/J</i> .....	45
2.5. Preparación de extractos totales.....	46
2.6. Determinación de proteínas.....	46
2.7. Aislamiento de fracciones de membrana enriquecidas en caveolina.....	46
2.8. Preparación de fracciones microsomales.....	48
2.9. Análisis de proteínas por Western-blot.....	48
2.9.1. Electroforesis y transferencia.....	48
2.9.2. Inmunodetección.....	48
2.10. Tinción de geles de proteínas. Método de Coomassie.....	50
2.11. Inmunoprecipitación de proteínas.....	50
2.12. Preparación de plásmidos y transfecciones en células.....	51

2.12.1. Transformación, crecimiento y purificación de plásmidos de bacterias competentes.....	51
2.12.2. Transfecciones en células.....	52
2.13. Inmunofluorescencia.....	52
2.14. Análisis por citometría de flujo en células de hígado remanente.....	53
2.15. Aislamiento de ARN y análisis de RT-PCR.....	54
2.15.1. Aislamiento de ARN.....	54
2.15.2. RT-PCR.....	54
2.15.3. PCR semicuantitativa.....	55
2.16. Determinación de los niveles de triacilglicerol.....	56
2.17. Aislamiento y fragmentación de iones. Identificación de proteínas.....	56
2.17.1. Digestión peptídica sobre geles SDS-PAGE monodimensionales.	
2.17.2. Cromatografía nano-Líquida y análisis de los tripéptidos mediante trampa iónica y espectrometría de masas.....	57
2.18. Análisis de datos.....	57

## **RESULTADOS.....59**

1. Expresión de Cav-1 en líneas celulares hepáticas y en cultivo primario de hepatocitos.....	60
2. Las citoquinas y los factores de crecimiento inducen la fosforilación de Cav-1 en células hepáticas.....	62
3. Las quinasas c-Src y c-Abl están implicadas en la fosforilación de la Y <sup>14</sup> de Cav-1 en células hepáticas.....	64
4. Los estímulos pro-inflamatorios aumentan la actividad de la tirosina quinasa c-Src en células hepáticas.....	66
5. Tanslocación de Cav-1 desde la fracción caveolar a la fracción no caveolar inducida por citoquinas y los factores de crecimiento.....	68
6. La mutación puntual “Y14F” impide la internalización de la Cav-1.....	70
7. Cav-1 incrementa en el hígado regenerante después de una hepatectomía parcial....	72
8. Cav-1 se tansloca de la fracción caveolar a la fracción no caveolar durante el proceso de regeneración hepática.....	75
9. Cav-1 se fosforila en Y <sup>14</sup> después de HP.....	78

10. La Cav-1 internalizada después de la HP está fosforilada en Y <sup>14</sup> .....	84
11. La actividad de la quinasa c-Src aumenta en la regeneración hepática.....	86
12. Cav-1 no es esencial para el proceso de regeneración hepática.....	87
13. Marcadores de regeneración.....	89
14. Marcadores de ploidía, tamaño y complejidad.....	90
15. El proceso de esteatosis es independiente de la expresión Cav-1.....	91
16. Cav-1 no colocaliza con lípidos en el hígado regenerante después de HP.....	94
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>



*Resumen / Summary*

---

Las caveolas participan en diferentes procesos celulares como el transporte de vesículas independiente de clatrina, la homeostasis del colesterol, la regulación de la transducción de señales, la señalización a través de integrinas y la supresión de la proliferación celular. Se ha descrito la expresión y la función de la caveolina (Cav), proteína mayoritaria de las caveolas, en el hígado y en diferentes líneas celulares hepáticas, en hígado cirrótico humano y en carcinoma hepatocelular.

En este trabajo hemos investigado el papel de la Cav-1 en la regeneración hepática después de hepatectomía parcial (HP), como un modelo de proliferación *in vivo*. Nuestros resultados muestran que Cav-1 incrementa en el hígado después de HP con una redistribución de la proteína desde los dominios enriquecidos en caveolas a la fracción no caveolar. Además, la Cav-1 localizada en la fracción no caveolar se encuentra fosforilada en la tirosina 14, sin embargo el gen de Cav-1 no es indispensable para la regeneración hepática después de HP, como se deduce de los datos obtenidos con los animales deficientes en este gen. Asimismo, la estimulación de los hepatocitos con citoquinas proinflamatorias inducen la translocación de la Cav-1 a la fracción no caveolar y la fosforilación de la tirosina 14 a través de la familia de tirosinas quinasas Src.

Conclusión: Todos estos datos apoyan el papel dinámico de la Cav-1 en la proliferación hepática que se produce *in vivo* después de HP e *in vitro* en líneas celulares hepáticas, pero con mínimas implicaciones en el proceso de la regeneración hepática.

Caveolae participate in several cellular processes such as vesicular transport, cholesterol homeostasis, regulation of signal transduction, integrin signaling, and cell growth. The expression and functional role of caveolin (Cav), the most abundant protein of caveolae, has been reported in liver and in different hepatocyte cell lines, in human cirrhotic liver, and in hepatocellular carcinomas.

The role of Cav-1 in liver regeneration after partial hepatectomy (PH) has been investigated as a model of liver proliferation *in vivo*. Our results show that Cav-1 increases in liver after PH with a redistribution of the protein from the caveola enriched domain to the noncaveolar fraction. Moreover, the Cav-1 located in the noncaveolar fraction is phosphorylated in tyrosine 14, even though the Cav-1 gene is dispensable for liver regeneration after PH, as deduced from data obtained with commercially available animals lacking this gene. In addition to this, the proinflammatory stimulation of hepatocytes induces Cav-1 translocation to a noncaveolar fraction and tyrosine 14 phosphorylation mainly through the activation of tyrosine kinases such as Src.

*Conclusion:* Taken together, these results support a dynamic role for Cav-1 in liver proliferation both *in vivo* after PH and *in vitro* in cultured hepatic cell lines, but with minimal implications for the liver regeneration process.





## *Introducción*

---

## **1. CAVEOLAS Y CAVEOLINA.**

Las caveolas fueron identificadas en los años 50 por microscopía electrónica como invaginaciones de la membrana en la superficie de células epiteliales y endoteliales. Estas vesículas plasmáticas con un tamaño de 50 a 100 nm se denominaron “caveolae intracellulare” por su similitud con una cueva, o “plasmalemmal vesicles” (Palade 1953; Yamada 1955). Cuarenta años después de su descripción se pudo estudiar la naturaleza molecular de las caveolas identificando a una proteína, la caveolina (Cav), como la proteína mayoritaria de estas estructuras (Kurzchalia and Parton 1999), pero además las caveolas están enriquecidas en esfingolípidos y en colesterol. Se han identificado tres tipos de Cav (1, 2, y 3) con diferentes patrones de expresión en células diferenciadas. Cav-1 y Cav-2, ambas con dos isoformas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), se encuentran en adipocitos y células endoteliales (Scherer, Lewis et al. 1997), mientras que Cav-3 solo se expresa en células de tipo muscular (Song, Scherer et al. 1996). Aunque cada vez hay más procesos en los que las caveolas y la caveolina están implicadas, sus papeles fisiológicos son muy diferentes dependiendo del tipo celular y del órgano examinado. En el tejido vascular predominan las funciones endocíticas y vasorreguladoras, mientras que en la musculatura tienen un papel importante en la integridad estructural. Las caveolas participan en diferentes procesos celulares como el transporte de vesículas independiente de clatrina (transcitosis, endocitosis y pinocitosis) (Schnitzer 2001), la homeostasis del colesterol (Fu, Hoang et al. 2004), la regulación de la transducción de señales (Okamoto, Schlegel et al. 1998), la señalización a través de integrinas (del Pozo, Balasubramanian et al. 2005) y la supresión de la proliferación celular (Williams and Lisanti 2005). El desarrollo de los modelos murinos deficientes en caveolina (Drab, Verkade et al. 2001; Galbiati, Engelman et al. 2001; Razani, Engelman et al. 2001; Razani, Wang et al. 2002) han permitido analizar las funciones fisiológicas de la caveolina y las caveolas en mamíferos a nivel celular y sistémico.

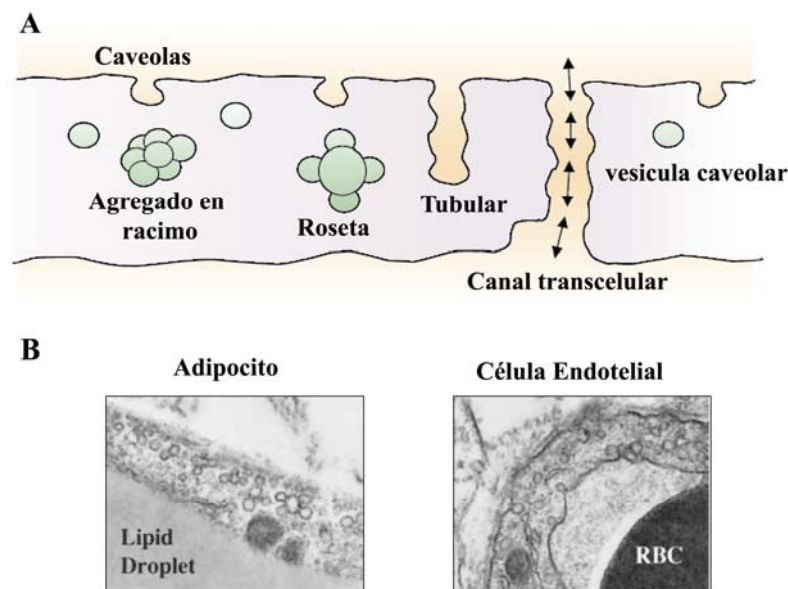
### **1.1. Definición y morfología.**

La definición inicial de caveola fue una descripción tomada a partir de las imágenes de microscopía electrónica de unas vesículas “lisas” procedentes de invaginaciones de membrana que eran diferentes de las vesículas “densas”, que son las vesículas de

clatrina. La definición de las caveolas se ha ampliado y ahora también se denomina caveola a los grupos de pequeñas vesículas que se encuentran próximas a la membrana plasmática y asociadas de manera similar a racimos de uva, rosetas e incluso se fusionan a modo de tubos o canales transcelulares (Fig. 1A). Estas formas no tradicionales de las caveolas se encuentran en diferentes tejidos. Los racimos son muy abundantes en las células musculares, las rosetas en adipocitos, y los túbulos vesiculares en las células endoteliales (Simionescu, Siminoescu et al. 1975; Scherer, Lisanti et al. 1994; Parton, Way et al. 1997). Estas invaginaciones y vesículas no son estáticas y pueden fusionarse con otras estructuras de membrana y otros orgánulos celulares, dejando de ser estrictamente caveolas.

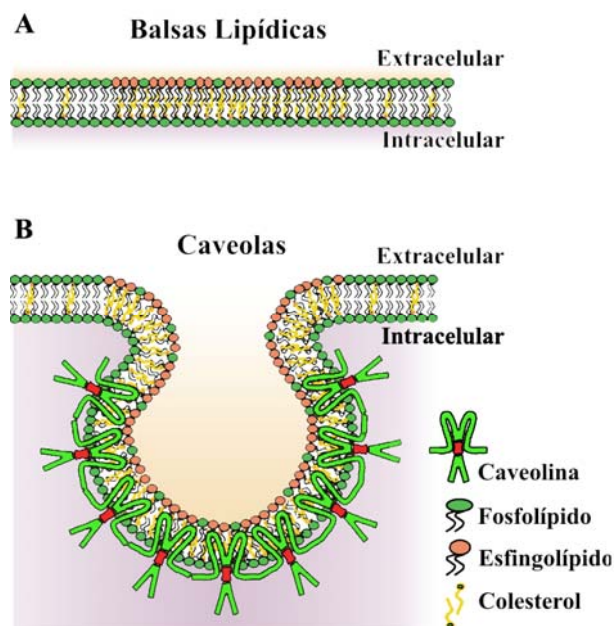
## 1.2. Composición y propiedades bioquímicas de las caveolas.

La membrana plasmática se ha definido por el modelo del “mosaico fluido” (Singer and Nicolson 1972) como una estructura casi líquida, donde tanto los lípidos como las proteínas integrales, que están dispuestos en una organización de mosaico, pueden realizar movimientos de traslación dentro de la bicapa. Pero en esta definición hay que introducir un estado de “líquido ordenado”, donde la bicapa lipídica no está en



**Figura 1. Caveolas: definición morfológica y plasticidad.** A, Las caveolas tienen diferentes formas que difieren de las tradicionales vesículas, pueden formarse agregados a modo de roseta, o de racimo e incluso formar tubos intracelulares o canales que atraviesan las células, como sucede en el caso de las células endoteliales. B, Fotos de microscopía electrónica en adipocitos y células endoteliales. Las rosetas caveolares se encuentran en adipocitos y en células endoteliales se pueden observar todos los tipos de morfologías caveolares (Razani, Woodman et al. 2002).

un continuo recambio de fosfolípidos (Vereb, Szollosi et al. 2003). Los dos estados de la membrana definidos como “líquido ordenado” y como “líquido desordenado” pueden coexistir en la misma membrana plasmática. En las membranas biológicas existen unas ínsulas rígidas, dentro de un mar de fosfolípidos, formadas por colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomiélna) que se denominaron “lipid rafts” o “balsas de lípidos” (Brown and London 1998; Simons and Toomre 2000) (Fig. 2). Las caveolas han sido consideradas tradicionalmente como una forma invaginada y vesicular específica de las balsas lipídicas (Brown and London 1998; Simons and Toomre 2000), y aunque hay proteínas que están en los dos tipos de estructuras, algunas están sólo en las balsas lipídicas o sólo en las caveolas (Liu, Oh et al. 1997). Las caveolas y las balsas lipídicas comparten muchas funciones, la diferencia de estos microdominios radica en la localización de la caveolina, por lo tanto, la caveolina es un marcador selectivo de las caveolas y permite hacer un análisis específico de la función caveolar. La composición específica de fosfolípidos de estas estructuras de membrana hace que estos microdominios tengan propiedades bioquímicas diferentes y puedan ser resistentes a la solubilización en detergentes no iónicos a 4°C, como Tritón X-100, o tengan menor densidad que el resto de las membranas. Estas propiedades son la base de la identificación, purificación y caracterización de las balsas lipídicas y de las caveolas (Brown and Rose 1992; Lisanti, Scherer et al. 1994).



**Figura 2. Organización de las balsas lipídicas y caveolas.** A. Balsas lipídicas, la “fase ordenada” contiene colesterol y está orientadas al exterior celular. La “fase desordenada” se compone básicamente de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina). B, Caveolas. Cuando la Cav se inserta en las balsas lipídicas se forman invaginaciones a modo de cueva. La Cav forma homooligómeros (simplificados en dímeros y en color verde) que proveen la estructura tridimensional necesaria para formar las caveolas. El dominio de oligomerización de Cav-1 se muestra en rojo. (Razani, Woodman et al. 2002).

## **2. LA FAMILIA DE LAS CAVEOLINAS.**

### **2.1. La caveolina es la proteína que recubre las caveolas.**

El descubrimiento de la caveolina se produjo de manera indirecta buscando sustratos fosforilables en fibroblastos transformados con el virus del sarcoma de Rous. De las cuatro proteínas fosforiladas en tirosina que se purificaron, una de 22 kd se la relacionó con la elevada capacidad de transformación del virus y se propuso un papel celular en oncogénesis (Glennay and Zokas 1989). Los anticuerpos generados frente a esta proteína de 22 kd producían una tinción similar a la de los filamentos que recubren las caveolas y que se habían descrito con anterioridad en estudios estructurales. Estos datos sugerían que esta molécula era la proteína que recubría las caveolas y por eso se la denominó *caveolina*, como el primer marcador de microdominios caveolares (Rothberg, Heuser et al. 1992).

### **2.2. Tres caveolinas diferentes, Cav-1, Cav-2 y Cav-3.**

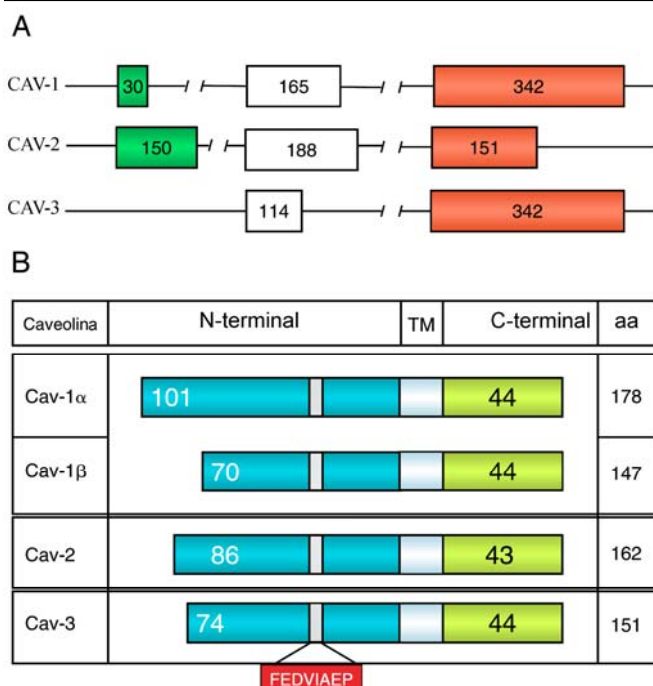
Se han identificado tres miembros de la familia génica de la caveolina (Fig. 3). El gen de CAV-1 se compone de tres exones que se encuentran muy conservados en todas las especies y se han descrito dos isoformas, la predominante o Cav-1 $\alpha$ , de 178 residuos, y una isoforma derivada de una iniciación de la traducción interna (met 32) (Scherer, Tang et al. 1995) denominada Cav-1 $\beta$ , de 147 residuos. CAV-2 fue clonado en adipocitos y se compone de tres exones que codifican para una proteína de 162 residuos cuya secuencia es muy similar a la de Cav-1. Cav-2 $\alpha$  representa la secuencia completa de la proteína. Se han descrito dos isoformas truncadas, Cav-2 $\beta$  y Cav-2 $\gamma$ , que no se han caracterizado (Scherer, Okamoto et al. 1996). El gen de CAV-3 fue identificado a través de una base de datos que buscaba y analizaba librerías de ADNc para genes homólogos a CAV-1, y está compuesto por dos exones que codifican una proteína de 151 residuos (Tang, Scherer et al. 1996). Los tres genes están localizados en el cromosoma 6 murino. Cav-1 comparte con Cav-3 una elevada similitud en la secuencia aminoacídica. Los genes homólogos humanos de CAV-1 y CAV-2 se localizan en el cromosoma 7q31.1 cerca del marcador genético D7S522, que es conocido como un sitio frágil o FRAG7G (Engelman, Zhang et al. 1998). Muchos cánceres epiteliales (mama, próstata, ovarios y renal) tienen delecciones alrededor de

este marcador (Shridhar, Sun et al. 1997; Jenkins, Qian et al. 1998; Lee, Park et al. 2002), lo que sugiere que en esa zona existe un gen supresor de tumores. CAV-2 se encuentra localizado a 67kb por debajo de D7S522 y CAV-1 está 19kb más abajo que CAV-2(Engelman, Zhang et al. 1999). El gen humano de CAV-3 se localiza en 3p25 (McNally, de Sa Moreira et al. 1998; Minetti, Sotgia et al. 1998), a unas 7-10 kb del gen del receptor de la oxitocina y cerca del marcador genético D3S18. Las tres proteínas tienen un motivo común llamado “motivo firma” o "caveolin signature motive” (FEDVIAEP) que está muy conservado en mamíferos (Fig. 3B) (Razani, Woodman et al. 2002).

### 2.3. Especificidad de tejido.

A nivel estructural, las caveolas pueden ser identificadas en la membrana plasmática de muchos tejidos y tipos celulares. La mayoría de las células tienen caveolas, algunas en cantidad elevada, como ocurre en adipocitos, células endoteliales, neumocitos de tipo I, fibroblastos, células de tejido liso muscular y células de músculo estriado (Palade 1953; Napolitano 1963; Mobley and Eisenberg 1975; Gabella 1976; Gil 1983). Pero hay ciertos tipos celulares, como las neuronas y los linfocitos del sistema nervioso central, que no forman este tipo de invaginaciones de membrana (Fra, Williamson et al. 1994; Cameron, Ruffin et al. 1997).

La expresión de Cav-1 y Cav-2 es diferente a la de Cav-3. Los adipocitos, células endoteliales, neumocitos y fibroblastos tienen niveles elevados de Cav-1 y -2, mientras que Cav-3 se expresa en células de tipo muscular como tejido cardíaco,



**Figura 3. La familia de las caveolinas.** A. Secuencia génica de CAV-1, CAV-2 y CAV-3. Los exones se muestran en recuadros y en cada uno está indicado el número de nucleótidos que lo componen. B. Estructura de las 3 proteínas (Cav-1, Cav-2 y Cav-3) incluidas las 2 isoformas de Cav-1, tomando como eje central el dominio TM ó transmembrana. El motivo firma ó “caveolin signature motif” (FEDVIAEP) mediante el cual se caracterizan las caveolinas aparece en el recuadro inferior de color rojo (Hnasko and Lisanti 2003).

esquelético y células de músculo liso (Scherer, Lisanti et al. 1994; Scherer, Okamoto et al. 1996; Tang, Scherer et al. 1996). A pesar de las diferencias de secuencia entre Cav-1 y Cav-2, en los tejidos en los que se expresa Cav-1 se puede detectar Cav-2; pero en aquellos tejidos en los cuales se expresa Cav-3 no se detecta Cav-1, lo que indica que aunque Cav-1 y Cav-3 tienen un alto grado de homología, poseen diferentes funciones *in vivo*.

### **3. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LAS CAVEOLINAS.**

#### **3.1. Biogénesis de las caveolinas.**

##### **3.1.1. El papel de la caveolina.**

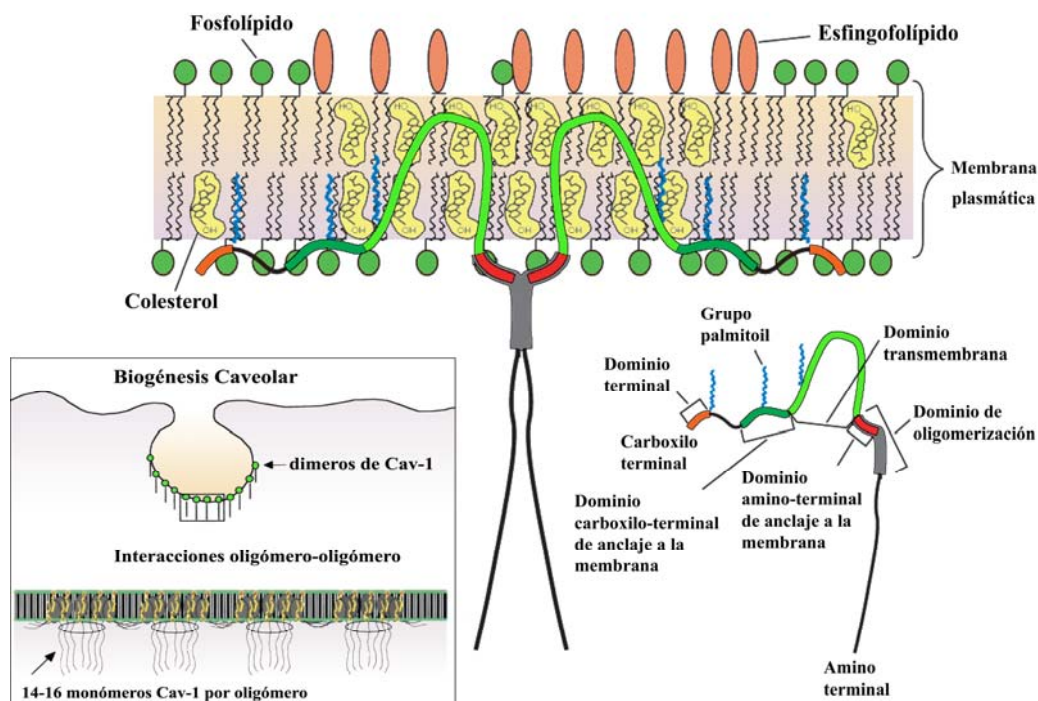
Diferentes experimentos han dejado claro la relación entre la caveolina y la formación de las caveolas. En linfocitos y fibroblastos transformados que no expresan endógenamente caveolina ni forman caveolas, la sobreexpresión de Cav-1 produce la formación de novo de unas invaginaciones de membrana de unos 50 a 100 nm con forma de vesícula (Fra, Williamson et al. 1995; Engelman, Wycoff et al. 1997; Li, Galbiati et al. 1998). La regulación negativa de la expresión de caveolina produce la pérdida de la formación de caveolas (Galbiati, Volonte et al. 1998; Liu, Lee et al. 2001).

##### **3.1.2. El papel del colesterol.**

El colesterol tiene un papel muy importante en la biogénesis de las caveolas. Si se trata a las células con quelantes de colesterol como nistatina, filipina o ciclodextrina, no se produce la formación de caveolas (Rothberg, Heuser et al. 1992; Schnitzer, Oh et al. 1994; Hailstones, Sleer et al. 1998). De hecho, el colesterol tiene tanta afinidad por Cav-1 que se queda asociado a los oligómeros de caveolina en presencia de detergentes como SDS (Murata, Peranen et al. 1995). Aunque las caveolas y las balsas lipídicas son microdominios enriquecidos en colesterol, varios estudios han demostrado que la manipulación del colesterol celular también afecta a la formación de vesículas endocíticas recubiertas de clatrina y de vesículas sinápticas, que son estructuras diferentes a las balsas lipídicas o las caveolas (Rodal, Skretting et al. 1999; Thiele, Hannah et al. 2000).

### 3.2. Topología de membrana de la caveolina.

La caveolina es una proteína de membrana que se inserta en la bicapa lipídica solo por el lado citoplásmico (Kurzchalia, Dupree et al. 1992; Sargiacomo, Sudol et al. 1993). Los análisis secuenciales de Cav-1 indican que contiene una región hidrofóbica de 32 aminoácidos (residuos 102-134) que no es suficiente para formar una estructura que cruce la bicapa lipídica y la unión de la Cav-1 con la membrana se produce por la inmersión de esta secuencia hidrofóbica en la parte citoplásmica de la bicapa lipídica presentando los dominios N-terminal y C-terminal orientados hacia la zona citoplásmica (Dupree, Parton et al. 1993; Monier, Parton et al. 1995). Se han descrito sitios de fosforilación en el dominio N-terminal y sitios de palmitoilación en el dominio C-terminal (Dietzen, Hastings et al. 1995; Li, Seitz et al. 1996). Debido a que Cav-1 no tiene la secuencia consenso de señalización N-terminal que la dirija hacia la membrana plasmática, esta secuencia de 32 aminoácidos le sirve a la caveolina como “péptido señal” para localizarla en la membrana plasmática. Las regiones N y C terminales poseen un “dominio de unión a la membrana” denominado N-MAD y C-MAD. El



**Fig. 4 Disposición de la Cav-1 en la membrana.** Esquema gráfico de la interacción de 2 monómeros de Cav-1 con la membrana. La Cav-1 forma homo-oligómeros de 14 a 16 monómeros o forma hetero-oligómeros con Cav-2. Cav-1 es capaz de anclarse en la membrana por medio del dominio hidrofóbico transmembrana (TM), del dominio C-MAD y del dominio N-MAD. La homo-oligomerización se produce por una región de 40 aminoácidos (residuos 61-101) denominada dominio de oligomerización (OD). Los oligómeros adyacentes interactúan a través del dominio Terminal (TD). Los sitios de palmitoilación (Cys133, -143, y -156) se muestran en azul (Razani, Woodman et al. 2002).



dominio N-MAD es necesario para que la Cav-1 pueda localizarse en la membrana plasmática, mientras que el dominio C-MAD es necesario para su localización en el trans-Golgi. Además Cav-1 es palmitoilada en tres cisteínas de la zona C-terminal (133, 143 y 156) (Dietzen, Hastings et al. 1995). Aunque estas modificaciones post-traduccionales no son necesarias para la localización o la unión de la Cav-1 a la membrana (Schlegel and Lisanti M 2000) actúan estabilizando la estructura total de la proteína en la membrana (Monier, Dietzen et al. 1996).

### **3.3. Oligomerización de las caveolinas.**

Mediante el uso de centrifugaciones en gradientes de velocidad, se describió que la Cav-1 migraba a una región de alto peso molecular de aproximadamente 350 a 400 kDa (Monier, Parton et al. 1995; Sargiacomo, Scherer et al. 1995). Estos complejos se formaban exclusivamente de Cav-1 y solo se dissociaban mediante lavados con detergentes fuertes y altas temperaturas, indicando la existencia de homo-oligómeros de Cav-1 formados por un número aproximado de 14 a 16 monómeros (Fig. 4 recuadro) (Monier, Parton et al. 1995; Sargiacomo, Scherer et al. 1995; Li, Song et al. 1996). Experimentos de reconstitución *in vivo* e *in vitro* de varias deleciones de la molécula de Cav-1 identificaron la región responsable de la oligomerización en los residuos 61-101, región que se denominó “dominio de oligomerización” (Sargiacomo, Scherer et al. 1995; Song, Tang et al. 1997) (Fig. 4). Los oligómeros de Cav-1 de 14 a 16 monómeros pueden interactuar por sus motivos C-terminales y formar complejos mayores oligómero-oligómero para formar las caveolas, de manera similar a como lo hace la clatrina en las vesículas recubiertas por dicha proteína. Estos complejos de alto peso molecular se forman rápidamente después de la síntesis de la Cav-1 en el retículo endoplásmico, antes de ser localizados en el Golgi (Monier, Parton et al. 1995).

### **3.4. Relación estructural con las otras caveolinas.**

Aunque la Cav-1 forma grandes complejos de homo-oligómeros *in vivo*, también se han descrito complejos de alto peso molecular de hetero-oligómeros de Cav-1 y Cav-2 (Scherer, Lewis et al. 1997). Pero en ausencia de Cav-1, Cav-2 no es capaz de formar estos complejos y se queda retenida en el aparato de Golgi en forma de monómeros o dímeros (Scherer, Okamoto et al. 1996; Mora, Bonilha et al. 1999; Parolini, Sargiacomo

et al. 1999). Es decir que Cav-2 es dependiente de Cav-1 tanto para la formación de una supraestructura molecular, como para el tráfico celular (Mora, Bonilha et al. 1999; Parolini, Sargiacomo et al. 1999). Cav-3 tiene propiedades estructurales similares a las de Cav-1, cuando se sobreexpresa, puede oligomerizar y formar estructuras de 350 a 400 kDa que se localizan en caveolas. Pero ambas proteínas no se expresan en los mismos tejidos y así como Cav-1 interacciona con Cav-2, Cav-3 no forma complejos con Cav-2 (Das, Lewis et al. 1999).

#### **4. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS CAVEOLAS/CAVEOLINAS.**

Desde su descubrimiento en los años 50, se ha especulado mucho sobre la función de las caveolas y se han atribuido muchos papeles a las caveolas y a su principal proteína, la caveolina. La relevancia fisiológica de las caveolas se puede resumir en varios aspectos, como son: el transporte vesicular, la homeostasis del colesterol celular, mecanismos de transducción de señales y su capacidad como proteína supresora de tumores. Debido a la amplia literatura existente en la que se describen las diferentes funciones de la caveolina sólo se van a desarrollar en profundidad aquellas implicaciones de la Cav-1 en las que se ha centrado esta tesis doctoral y que incluyen la transducción de señales y la supresión tumoral.

##### **4.1. Mecanismos de transducción de señales.**

###### **4.1.1. La caveolina como “señaloma”: señalización compartimentalizada.**

Las caveolas pueden servir como plataforma para la agregación y/o concentración de otras proteínas. Usando la propiedad de insolubilidad de las caveolas en detergentes suaves y su capacidad de flotar en un gradiente discontinuo de sacarosa Lisanti y colaboradores (Lisanti, Scherer et al. 1994) fueron capaces de obtener una fracción caveolar y determinar las diferentes proteínas que se concentran en ella. La mayoría de las proteínas que se identificaron de esta manera fueron moléculas de transducción de señales que se encontraban a concentraciones mayores que en la membrana plasmática (Sargiacomo, Sudol et al. 1993; Lisanti, Scherer et al. 1994). Esta observación permitió formular la hipótesis de la “señalización a través de caveolinas y de balsas lipídicas” (Lisanti, Scherer et al. 1994). Actualmente con la ayuda de la

proteómica se han identificado numerosas proteínas que se localizan preferentemente en las caveolas, como receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos, proteínas adaptadoras y proteínas estructurales. Las proteínas que se asocian a caveolina mejor descritas son H-Ras, la familia de tirosinas quinasas Src, la subunidad  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas, y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), todas tienen una o varias miristilaciones, palmitoilaciones o grupos prenilo (Li, Okamoto et al. 1995; Feron, Belhassen et al. 1996; Garcia-Cardena, Oh et al. 1996; Li, Couet et al. 1996; Song, Li et al. 1996; Song, Sargiacomo et al. 1997). Dado que las caveolas están implicadas en la compartimentalización de varias vías de señalización, pueden ser consideradas como organelas especializadas en señalización, o más apropiadamente “señalosomas”.

#### **4.1.2. Las caveolinas como moduladores de la señalización.**

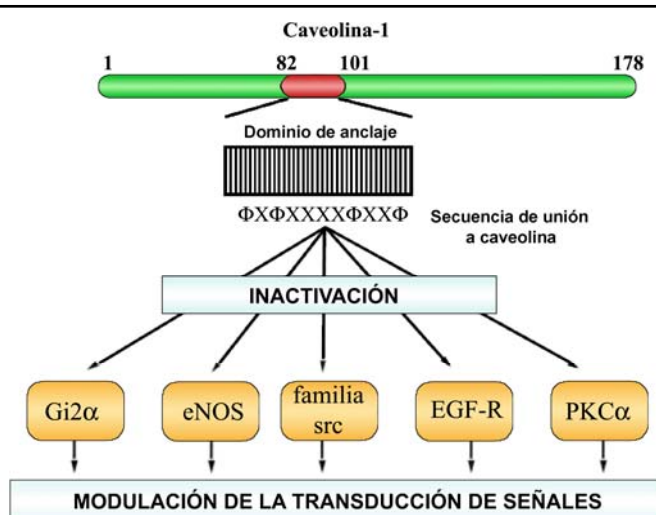
Una de las cuestiones que no hay que descuidar es el significado funcional de la caveolina; son solamente proteínas estructurales que forman las caveolas, o pueden tener un papel activo en la retención o modulación de la actividad de proteínas de transducción de señales.

El concepto de “proteína andamio” o “proteína de anclaje” (scaffolding proteins) no es nuevo y la literatura está llena de descripciones de este tipo de proteínas que actúan restringiendo, organizando y/o regulando la distribución subcelular de otras moléculas de señalización (Pawson and Scott 1997). La Cav-1 tiene una región de 20 aminoácidos (82-101) denominada “dominio de anclaje de la caveolina” o “caveolin scaffolding domain” (CSD) (Fig. 5) que es capaz de inhibir la hidrólisis de GTP por proteínas G heterotriméricas (Li, Okamoto et al. 1995) y regula a otras proteínas como la familia de tirosinas quinasas Src, isoformas de PKC, y H-Ras (Engelman, Zhang et al. 1998; Okamoto, Schlegel et al. 1998; Smart, Graf et al. 1999). Además, con excepción de algunas moléculas de señalización, la interacción con el CSD conduce directamente a la inhibición de la señalización como ocurre con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Couet, Sargiacomo et al. 1997), con *c-neu* (Engelman, Lee et al. 1998) y con eNOS (Razani, Woodman et al. 2002), que ha sido una de las interacciones con caveolina más estudiada (Garcia-Cardena, Fan et al. 1996; Liu, Garcia- et al. 1996; Michel, Feron et al. 1997; Sowa, Pypaert et al. 2001).

Los motivos encontrados en las moléculas que interaccionan con la caveolina se denominan “dominio de unión a caveolina” o “caveolin binding domain” (CBD) (Fig. 5), aunque la presencia de este motivo no implica la interacción directa de la proteína que lo posea con la caveolina. Debido a que las secuencias de CSD y CBD están enriquecidas en aminoácidos aromáticos (Couet, Li et al. 1997), se ha sugerido que estas interacciones se pueden producir por yuxtaposición de interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas.

De manera adicional, Cav-1 es un potente inhibidor de las vías de proliferación como las mediadas por EGFR y varios miembros de las cascadas de quinasas MAP, Ras-p42/p44 (Engelman, Zhang et al. 1999). La progresión del ciclo celular a través de una vía dependiente de p53/p21 (Galbiati, Volonte et al. 2001) y la expresión de varias oncoproteínas están reguladas negativamente por Cav-1 (Williams and Lisanti 2005). Las caveolas concentran diferentes proteínas que tienen un papel en adhesión, migración e invasión celular, como las integrinas  $\alpha V\beta 3$  y  $\beta 1$  (Galvez, Matias-Roman et al. 2004) y algunas metaloproteasas como MMP-2 (Puyraimond, Fridman et al. 2001) y MT1-MMP (Galvez, Matias-Roman et al. 2004). Existe una relación dinámica entre los receptores acoplados a proteínas G y las caveolas, se ha demostrado que hay receptores  $\beta$ -adrenérgicos que colocalizan con caveolas (Schwencke, Okumura et al. 1999; Ostrom, Violin et al. 2000; Rybin, Xu et al. 2000).

La Cav-1 fue identificada como sustrato de la quinasa Src, que la fosforila en la tirosina 14 ( $Y^{14}$ ) (Fig. 6). Cav-1 puede ser fosforilada en respuesta a la estimulación por EGF o insulina; sin embargo, no está claro el significado funcional de la fosforilación en  $Y^{14}$ . Se ha propuesto que esta fosforilación puede servir como sitio de anclaje de proteínas con dominios SH2/PTB, como Grb7, para activar cascadas de señalización



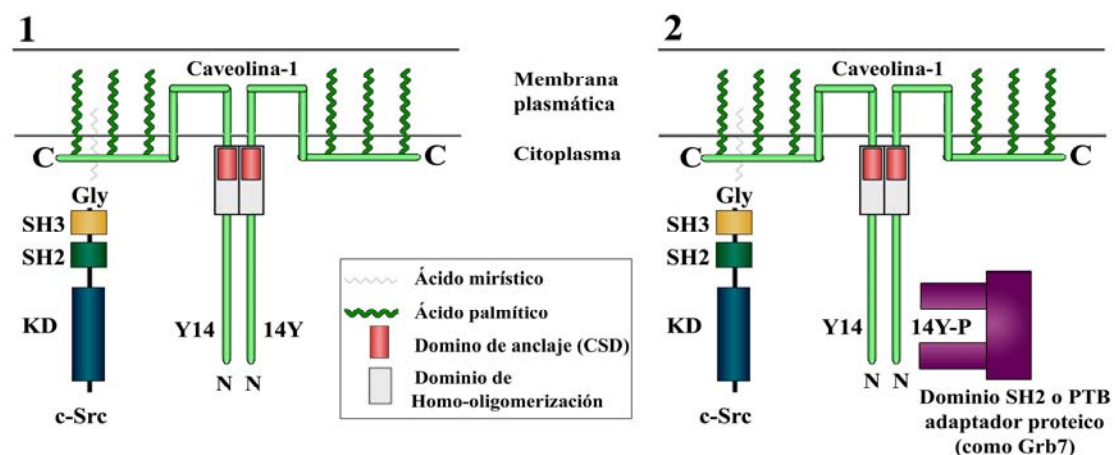
*Figura 5. Interacciones de los dominios de anclaje (CSD) y de unión a caveolina (CBD). Secuencia del dominio de anclaje y de unión a caveolina con varias moléculas de señalización, entre las que destacan: la subunidad  $Gi2\alpha$  de proteínas G heterotriméricas, eNOS, la familia Src quinasas en tirosina, EGF-R, e isoformas de PKC ( $PKC\alpha$ ). En la mayoría de los casos la interacción de las diferentes proteínas de señalización con la caveolina produce un efecto de inhibición y modulación negativa de las vías de transducción de señales (Razani, Woodman et al. 2002).*

(Lee, Volonte et al. 2000; Orlichenko, Huang et al. 2006). Trabajos recientes han descrito que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación en la Y<sup>14</sup> de Cav-1, y que dicha internalización podría regular de manera negativa diferentes vías de proliferación como Rac, Erk y PI3K en células no adherentes (Del Pozo and Schwartz 2007). También se ha descrito que la fosforilación en Y<sup>14</sup> regula la apoptosis mediada por drogas anti-tumorales, como el paclitaxel (Taxano) en células de cáncer de mama MCF-7 (Shajahan, Wang et al. 2007). Además, el estrés celular induce la fosforilación de la Y<sup>14</sup> a través de la activación de p38MAPK y c-Src (Volonte, Galbiati et al. 2001). En este sentido, Cav-1 tendría diferentes dominios con funciones opuestas.

## 4.2. Oncogénesis y tumorogénesis.

### 4.2.1. Las caveolas/caveolinas como diana de los oncogenes.

La transformación celular es un proceso en el que se produce la activación de proto-oncogenes y en el que están implicadas funciones de crecimiento y supervivencia. La hipótesis que refiere a Cav-1 como una diana de los oncogenes fue demostrada cuando se transformaron células NIH 3T3 con una forma activa de H-Ras y se observó una regulación negativa a nivel transcripcional de Cav-1, mientras que el tratamiento de estas células con un inhibidor de la cascada de la quinasa Ras-p42/44 MAPK restituyó la expresión de Cav-1 hasta alcanzar los niveles normales (Engelman, Wycoff et al. 1997).



**Figura 6. Diagrama esquemático de la fosforilación de la tirosina 14 de la Cav-1 por parte de la quinasa Src.** En el primer paso, es necesaria una modificación post-traducciona tanto de c-Src como de Cav-1 para mantener la proximidad. En el segundo paso, c-Src fosforila a la Cav-1 en la tirosina 14. Cav-1 forma una masa de homo-oligómeros de aproximadamente 350 kDa que contiene 14-16 monómeros de caveolina. La fosforilación en la tirosina 14 podría funcionar como un sitio de anclaje para proteínas con dominios SH2 o PTB (phosphotyrosine binding), como Grb7 (Lee, Volonte et al. 2000).

Hay más oncogenes implicados en la regulación negativa de Cav-1 a nivel transcripcional como v-abl, mTAg, bcr-abl, crk1, c-src, c-neu, HPV E6. (Koleske et al., 1995; Engelman et al., 1997; Engelman et al., 1998; Ko et al., 1998; Rasan et al., 2000; Timme et al., 2000; Park et al., 2001). En casi todos los casos, el mecanismo de esta inhibición no se ha descrito, las excepciones incluyen la represión por c-Myc y por la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano. La activación de c-Myc reprime la expresión de Cav-1 a nivel transcripcional (Park, Razani et al. 2001), y la oncoproteína E6 disminuye la expresión de Cav-1 a través de la inhibición de p53, porque en la secuencia del promotor de Cav-1 hay elementos de respuesta a p53 (Bist, Fielding et al. 1997; Razani, Altschuler et al. 2000).

#### **4.2.2. Las caveolinas como supresoras de tumores.**

La decisión de sobrevivir y proliferar o ir a la muerte celular programada, o apoptosis, es esencial para el desarrollo, para mantener la homeostasis tisular y para proteger de un daño celular o genómico. Las caveolas/caveolinas pueden estar implicadas en la modificación del balance entre señales anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. Debido a la capacidad de unión y modulación de la caveolina a diferentes proteínas de vías de señalización, también podría regular, de manera similar, la acción de ciertos proto-oncogenes u oncogenes activados.

Basándose en la capacidad de la Cav-1 de inhibir la actividad de varios proto-oncogenes, se la ha propuesto como una proteína supresora de tumores (Wiechen 2001; Fiucci, Ravid et al. 2002; Capozza, Williams et al. 2003; Williams 2004; del Pozo, Balasubramanian et al. 2005). Se ha descrito una regulación negativa de la transcripción de Cav-1 en células derivadas de tumores y carcinomas primarios (Engelman, Lee et al. 1998; Lee, Reimer et al. 1998; Razani, Altschuler et al. 2000).

Los experimentos de sobreexpresión de Cav-1 indican que es un potente inhibidor de vías proliferativas. Cav-1 puede interaccionar e inhibir moléculas implicadas en supervivencia y proliferación, puede suprimir la función del receptor de EGF (Couet, Sargiacomo et al. 1997), de varios miembros de la cascada de quinasas Ras-p42/MAPK (Engelman, Chu et al. 1998), del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) y de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Liu, Ying et al. 1996; Yamamoto, Toya et al. 1999; Zundel, Swiersz et al. 2000). Además Cav-1 es capaz de sensibilizar a las células hacia estímulos apoptóticos y muerte celular

inducida por acumulación de ceramida, a través de un mecanismo dependiente de PI3K (Zundel, Swiersz et al. 2000), debido a que en las caveolas se acumula esfingomielinina y la enzima que transforma la esfingomielinina en ceramida, la esfingomielinasa (Liu and Anderson 1995).

También se ha descrito que el silenciamiento de Cav-1 por ARN de interferencia en *Caenorhabditis elegans* conduce a la hiperactivación del ciclo meiótico, que es un fenotipo similar a la señalización descontrolada de Ras (Scheel, Srinivasan et al. 1999).

El 60% de los cánceres humanos de mama examinados (carcinomas invasivos) tienen mutaciones en CAV-1 (Hayashi, Matsuda et al. 2001). La mutación específica P132L produce una proteína que actúa a modo de dominante negativo y es suficiente para transformar fibroblastos murinos (NIH 3T3) in vitro (Hayashi, Matsuda et al. 2001; Lee, Park et al. 2002). Además las regiones del promotor de CAV-1 enriquecidas en GC están hipermetiladas en las líneas de cáncer de mama y muestras de tumores de próstata, lo que sugiere un silenciamiento transcripcional (Engelman, Zhang et al. 1998; Cui, Rohr et al. 2001); aunque hay casos en los que no hay cambios en los estados de metilación del promotor de CAV-1 en células tumorales humanas (Hurlstone, Reid et al. 1999).

El marcador genético D3S18 (cerca del que se encuentra CAV-3) es conocido por dos enfermedades, el síndrome de von Hippel-Lindau y el síndrome 3p; en este último se produce una delección hemiciigótica de 3pter-p25, que se caracteriza por un retraso en el crecimiento con deformaciones craneofaciales, retraso mental y defectos en el septo cardíaco (Drumheller, McGillivray et al. 1996). Muchas de las mutaciones que se han identificado en el gen de CAV-3 conducen a una distrofia muscular.

#### **4.2.3. La caveolina en progresión tumoral.**

En muchos artículos científicos se ha descrito una regulación negativa de Cav-1 en diferentes tipos de cánceres y por ello se ha propuesto a Cav-1 como un gen supresor de tumores, pero existen evidencias en las cuales la expresión de Cav-1 está incrementada en diferentes tipos de cáncer. La sobreexpresión de Cav-1 ha sido descrita en las formas más agresivas de cáncer de vejiga, en adenocarcinomas de colon generados experimentalmente en ratones y en células de cáncer de colon humanas, en modelos murinos de cáncer de próstata y en tumores de la familia del Sarcoma de Ewing's (ESFT) (Rajjayabun, Garg et al. 2001; Patlolla, Swamy et al. 2004; Williams,

Hassan et al. 2005; Tirado, Mateo-Lozano et al. 2006). Además la progestina y su análogo químico MPA, inducen la expresión de Cav-1 en cáncer de mama y en proliferación celular (Salatino, Beguelin et al. 2006). La expresión combinada de c-Myc y Cav-1 se ha propuesto como un marcador de carcinoma de próstata en humanos (Yang, Timme et al. 2005).

## **5. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LAS CAVEOLAS Y LA CAVEOLINA.**

Aunque el interés por las caveolas y las caveolinas ha crecido fuertemente en los últimos 10 años, la mayoría de las investigaciones han estado limitadas a los experimentos en líneas celulares o a análisis bioquímicos. A pesar de el éxito de estas aproximaciones en las funciones de las caveolas/caveolinas en endocitosis, tráfico de colesterol, transducción de señales, tumorigénesis y otros procesos, era necesario un modelo *in vivo* para esclarecer las relevancias fisiológicas de las funciones de las caveolas/caveolinas. La caracterización inicial de ratones deficientes en Cav-1 se produjo en 2001 por dos grupos a la vez (Drab, Verkade et al. 2001; Razani, Engelman et al. 2001). La mayor sorpresa apareció cuando no se encontraron anormalidades fenotípicas, aunque un análisis funcional e histológico detallado puso de manifiesto una serie de anormalidades interesantes resumidas en la tabla 1.

Existen ratones deficientes en Cav-1, Cav-2 y Cav-3 (Drab, Verkade et al. 2001; Galbiati, Engelman et al. 2001; Razani, Engelman et al. 2001; Razani, Wang et al. 2002), pero solo en los ratones doble deficientes en Cav-1 y Cav-3, y no para Cav-2, se produce la pérdida de las estructuras caveolares en los tejidos que expresan los diferentes tipos de caveolinas.

A pesar de que las caveolas participan en las numerosas funciones descritas anteriormente, es sorprendente que los distintos modelos murinos que no expresan alguna de las caveolinas sean viables y fértiles. Sin embargo, la pérdida combinada de Cav-1 y Cav-3 produce efectos perjudiciales en la función y la estructura cardíaca (Razani and Lisanti 2001). Los ratones deficientes en Cav-1 desarrollan lesiones tumorales mamarias (Williams, Cheung et al. 2003), y están sensibilizados frente a tumores epiteliales de piel inducidos por carcinógenos (Capozza, Williams et al. 2003).



**TABLA 1**  
Análisis fenotípico de los ratones deficientes en caveolina

Cav-1 -/-	Cav-2 -/-	Cav-3 -/-
Ausencia de caveolas fibroblastos, endotelio y adipocitos	Presencia de caveolas	Ausencia de caveolas
Reducida expresión de Cav-2 recuperada con la expresión de Cav-1	Reducción parcial de expresión de Cav-1 en ciertos tejidos	Cambios miopáticos Variabilidad en el tamaño de la fibra muscular Presencia de fibras necróticas
MEFs Defectuosa endocitosis caveolar Fenotipo hiperproliferativo Disminución en fase G0/G1		Complejos distrofina-glicoproteína Deslocalizados No colocalización con balsas lipídicas
Anormalidades pulmonares Hiper celularidad Septo alveolar reducido Intolerancia al ejercicio Defectuosa endocitosis caveolar	Anormalidades pulmonares (idénticas a Cav-1 -/-) Septo alveolar reducido Intolerancia al ejercicio	Anormalidades del Túbulo-T Deslocalización de marcadores Receptor de Rianodina DHPR-1 $\alpha$ Túbulos-T (tinción de ferrocianato) dilatado/hinchado orientado longitudinalmente funcionan en direcciones irregulares
Disminución del tono vascular Posterior a la activación de eNOS		
Anormalidades en adipocitos/lípidos Resistencia a la dieta inducida Obesidad Acúmulos grasos atróficos Reducción del diámetro de células adiposas Hiper celularidad desdiferenciada Hipertrigliceridemia		
Relevancia clínica Enfermedades pulmonares Cancer Mutación negativa dominante en cancer de mama (P132L) en humanos (esporádica) Obesidad, hiperlipidemia, diabetes	Relevancia clínica Enfermedades pulmonares Importante modelo de estudio Cav-1 -/- y Cav-2 -/-	Relevancia clínica Distrófia muscular Mutación negativa dominante LGMD-1C en humanos Cav-3 (P104L) y otras (autosómica dominante)

## 6. CAVEOLINA E HÍGADO.

En el hígado y en diferentes líneas celulares hepáticas, la expresión de caveolina ha sido demostrada por Northern y por Western blot (Malaba, Smeland et al. 1995; Henley, Krueger et al. 1998) así como su importante papel en la internalización de ligandos específicos a través de caveolas (Janicot, Fouque et al. 1991), en el transporte reverso de colesterol (Fu, Hoang et al. 2004) y en la regulación de la secreción de sales biliares (Moreno, Molina et al. 2003). Además el colesterol y los ácidos grasos regulan el tráfico de caveolinas a través del aparato de Golgi y entre la superficie celular y las acumulaciones lipídicas intracelulares (Pol, Martin et al. 2005). El trabajo de Calvo y

colaboradores (Calvo and Enrich 2000; Calvo, Tebar et al. 2001) caracterizó claramente la morfología y la funcionalidad de las caveolas en hepatocitos de hígado de rata.

Diversos trabajos sugieren un papel para Cav-1 como reguladora de señales mitogénicas en el hígado (Razani, Woodman et al. 2002; Mora, Bonilha et al. 2006). Se han identificado alteraciones en la expresión de Cav-1 en hígado cirrótico humano (Yokomori, Oda et al. 2002), en carcinoma hepatocelular (Yerian, Anders et al. 2004) y en la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial (Pol, Martin et al. 2004).

## **7. LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.**

El hígado es el órgano principal en la homeostasis metabólica, ya que es el responsable del metabolismo, síntesis, almacenaje y redistribución de los nutrientes (Saxema, Zucker et al. 2003). El hígado produce elevadas cantidades de proteínas del suero incluidas la albúmina y las proteínas de “fase aguda”, enzimas y cofactores. Además actúa como órgano de detoxificación y eliminación de xenobióticos por conversión metabólica y excreción biliar. Los tipos celulares que desarrollan en el hígado la mayoría de estas funciones son las células parenquimales, o hepatocitos, que son un 80% de las células hepáticas. El otro 20% son las células no parenquimales, entre las que se incluyen las células endoteliales, las células de Kupffer, los linfocitos y las células esteladas o de Ito. Las células endoteliales están en los vasos circulatorios intrahepáticos, o sinusoides, del hígado, y son una zona importante para la absorción de nutrientes. Las células de Kupffer residen en los sinusoides y son esenciales para la fagocitosis de partículas extrañas y organismos infecciosos, así como en la producción de citoquinas. Los linfocitos son una parte del sistema inmune innato que reside en el hígado para ayudar a resistir infecciones. Las células hepáticas de Ito tienen varias funciones, incluyendo el almacenaje de vitamina A y la producción de matriz extracelular. Todos estos tipos celulares son activados por daño hepático y las células de Ito producen la mayoría de los factores que conducen a la fibrosis hepática. Aunque los hepatocitos adultos tienen una vida larga y normalmente no se dividen, mantienen la capacidad de proliferar en respuesta a daño tóxico o a infecciones.

En el modelo de Hepatectomía Parcial (HP) en roedores, del cual fueron pioneros Higgins y Anderson (Higgins and Anderson 1931) en 1931, se extirpan las dos terceras partes (el 70%) del hígado y el tejido remanente crece hasta alcanzar la masa

original, en un tiempo aproximado de una semana, y después se paraliza el proceso de crecimiento. La regeneración hepática es técnicamente un proceso de crecimiento compensatorio más que de regeneración, ya que el lóbulo eliminado no crece, es el hígado remanente el que se expande para compensar la pérdida de tejido. Este proceso requiere de la activación e interacción compleja de múltiples vías de señalización (Taub 2004).

En el transcurso de la regeneración hepática hay tres cuestiones importantes. Primero, cuales son las señales que conducen a los eventos iniciales del proceso regenerativo. Segundo, como es la arquitectura y función del hígado remanente. Tercero, cuales son las señales que son responsables de suprimir el crecimiento una vez que la masa del hígado se ha reconstituido. Los investigadores han usado aproximaciones genéticas y moleculares para identificar las vías mas importantes que regulan y controlan el proceso regenerativo.

La literatura reciente está llena de datos donde se muestra que la supresión de genes implicados en diferentes vías puede influir de manera negativa en la regeneración hepática, estos datos nos sugieren la idea de la activación de multitud de vías diferentes y la implicación tres tipos de rutas: citoquinas, factores de crecimiento y redes metabólicas que unen la función hepática con el crecimiento celular y la proliferación (Fig. 7). Una característica de estas redes es la redundancia que existe entre sus componentes intracelulares, por consecuencia la pérdida o anulación de un solo gen raramente conduce a la completa inhibición de la regeneración. En los experimentos de HP se suelen observar cambios en el tiempo de la replicación del ADN del hepatocito o diferencias en la mortalidad de una fracción de los animales que poseen modificaciones genéticas. Ningún modelo murino modificado genéticamente ha demostrado un 100% de mortalidad y un bloqueo completo tanto de replicación de ADN como de proliferación celular después de una HP del 70%. Usando los criterios establecidos en otros organismos, un gen de manera individual no puede ser considerado “esencial” para la regeneración hepática. La mayoría de los datos que se conocen sobre las HPs son estudios en ratones modificados genéticamente.

### **7.1. El proceso de regeneración.**

La regeneración tras la HP se lleva a cabo por la proliferación de todas las poblaciones celulares diferenciadas presentes en el órgano, y los primeros en proliferar

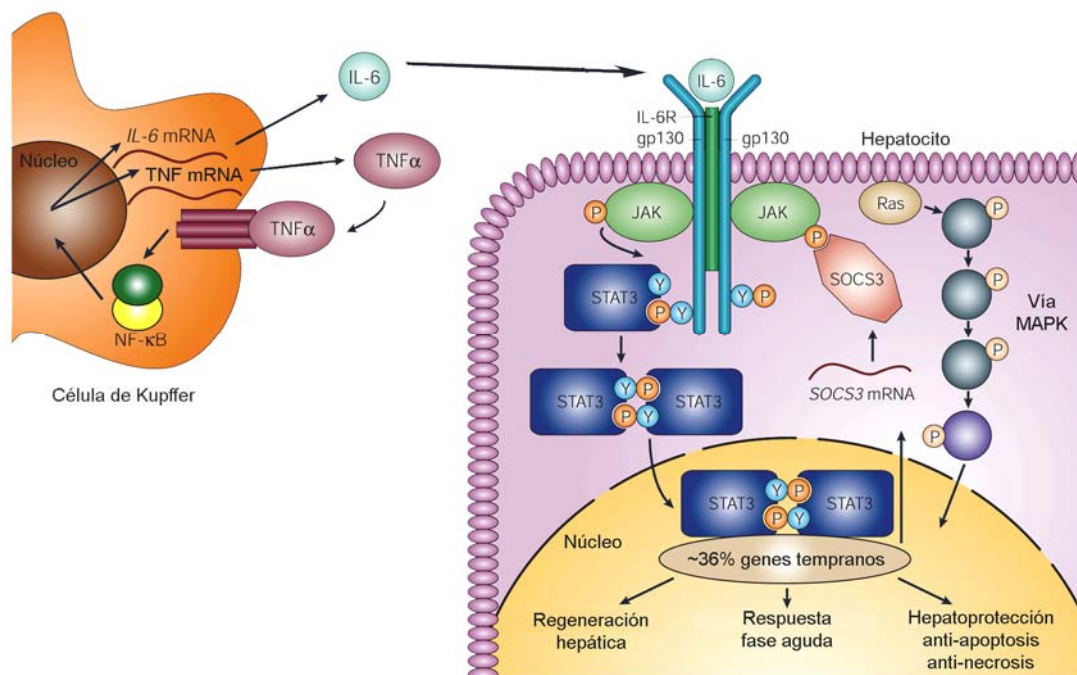
son los hepatocitos. Los hepatocitos en condiciones normales se encuentran en quiescencia y no se dividen (Michalopoulos and DeFrances 1997; Fausto 2000). Sin embargo, tras la HP se activan una serie de vías de señalización en el hígado y aproximadamente el 95% de los hepatocitos entran rápidamente en ciclo (Taub 2004). Tras la resección de tejido hepático, las células de Kupffer incrementan la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Otros factores implicados en la regeneración son también liberados del páncreas (insulina), del duodeno o de la glándula salival (EGF), de la glándula adrenal (noradrenalina), del tiroides (triyodotironina, T3) y de las células de Ito (HGF). La cooperación entre todas estas señales permite a los hepatocitos progresar desde la fase G<sub>0</sub> hacia la fase G<sub>1</sub> y entrar en la fase S o de síntesis de ADN.

La regeneración hepática también ocurre después de una necrosis masiva en el hígado, o de una apoptosis inducida por agentes hepatotóxicos (Fausto 1999; Koniaris, McKillop et al. 2003; Taub 2003). En estos casos, como ocurre en la HP, la masa hepática se recupera por la replicación de los hepatocitos existentes, sin la activación de otro tipo de progenitores celulares (Farber and Gerson 1984). En la regeneración hepática que se produce por la pérdida de las células parenquimales inducida por otras toxinas, como D-galactosamina, ocurre una replicación y diferenciación de células progenitoras denominadas células ovas (Shinozuka, Lombardi et al. 1978; Evarts, Nagy et al. 1987; Lemire, Shiojiri et al. 1991; Dabeva and Shafritz 1993). La contribución de estas células a la regeneración varía dependiendo de la naturaleza del daño o de la dosis del tóxico suministrado. Es importante mencionar que no se han encontrado células de médula ósea que generen hepatocitos en los diferentes procesos de crecimiento hepático *in vivo* tanto fisiológico como patológico (Fausto, Campbell et al. 2006). Pero las células originadas en la médula ósea pueden generar el 20% de las células endoteliales y otras células no parenquimales durante la regeneración hepática (Fujii, Hirose et al. 2002).

Hay múltiples parámetros que afectan a la duración del intervalo que existe entre la HP y el inicio de la síntesis de ADN en los hepatocitos (Krawitt, Betel et al. 1969; Yanagi and Potter 1977). Incluso los ritmos circadianos pueden afectar a la síntesis de ADN y a la expresión de las ciclinas tras la HP (Matsuo, Yamaguchi et al. 2003). En el hígado del ratón la síntesis de ADN, por parte de los hepatocitos, tiene un máximo a las 36-40 horas, con ligeras variaciones entre las diferentes cepas, mientras que en la rata se produce de 12 a 16 horas antes que en el modelo murino. El inicio de la síntesis de ADN en

los hepatocitos tras la HP es un proceso sincronizado que comienza en el área periportal y después avanza hacia la zona perivenosa central (Rabes, Wirsching et al. 1976). La frecuencia de mitosis es menor de lo que cabría esperar según los niveles de síntesis de ADN, y la ploidía de los hepatocitos y el porcentaje de células binucleadas aumenta con sucesivas replications del ADN, lo que lleva finalmente a limitar el proceso regenerativo (Sigal, Rajvanshi et al. 1999). Durante los tres primeros días tras la HP se recupera la mayor parte de la masa hepática y la recuperación suele ser completa a los 5-7 días (Grisham 1962).

Los principales factores que se liberan en la fase de señalización temprana e inician el proceso de preparación para la regeneración son  $TNF-\alpha$  e IL-6; la proliferación es estimulada por el factor de crecimiento hepático (HGF), el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  ( $TGF-\alpha$ ) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y la finalización del proceso regenerativo está regulada por factores de la familia del  $TGF-\beta$ , que detienen la proliferación celular.



**Figura 8. Señalización IL-6-Stat3.**  $TNF-\alpha$  se une a su receptor en células de Kupffer aumentando la expresión de IL-6. La unión de IL-6 a su receptor en el hepatocito activa JAK. La activación de JAK conduce a la fosforilación de STAT3 y a la activación de MAPK. Fosfo-Stat-3 dimeriza y se transloca al núcleo donde media la activación de genes tempranos que participan en regeneración hepática, fase de respuesta aguda y hepatoprotección frente al daño mediado por Fas y tóxicos hepáticos. También se activa la transcripción de Socs-3, que interacciona con JAK bloqueando la señalización por citoquinas (Taub 2004).

## **7.2. Señalización por citoquinas.**

Los factores de transcripción que se activan rápidamente tras la HP son NF- $\kappa$ B, STAT-3, AP-1 y C/EBP- $\beta$  (Cressman, Diamond et al. 1995; FitzGerald, Webber et al. 1995; Greenbaum, Li et al. 1998). Las citoquinas activan a las células de Kuppfer para que liberen TNF- $\alpha$  que actúa de manera autocrina estimulando el receptor 1 de TNF- $\alpha$  (TNF-R1) que conduce a la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y pone en marcha la transcripción y liberación de IL-6 (Cressman, Greenbaum et al. 1994; Aldeguer, Debonera et al. 2002) (Fig. 8), activando así a los hepatocitos adyacentes. La unión de IL-6 a su receptor, IL-6R, que está asociado a dos subunidades de glicoproteína gp130, estimula la actividad tirosina quinasa de la quinasa JAK1 asociada (Levy and Lee 2002; Heinrich, Behrmann et al. 2003). Esta quinasa conduce a dos vías. La primera vía es la de MAPK, que es activada por la señal de traducción SHP2-GRB2-SOS-Ras (SHP2 es una proteína tirosina fosfatasa que tiene un dominio de unión SH2, GRB2 es la proteína de unión al receptor de factores de crecimiento y SOS es la proteína “son-of-sevenless”). La segunda vía es la de señalización de STAT3 que es activada a través de una fosforilación en tirosina. STAT3 dimeriza y se transloca al núcleo, donde activa la transcripción del ~36% de los genes implicados en la respuesta inmediata-temprana y de SOCS-3 que actúa regulando de manera negativa a STAT-3 e inhibiendo la señal de IL-6 (Campbell, Prichard et al. 2001; Taub 2004). Existen también evidencias de que IL-6 puede activar directamente a quinasas implicadas en supervivencia celular como PI3K y AKT (Levy and Lee 2002).

La señalización por TNF- $\alpha$  es requerida para la respuesta proliferativa, como se ha demostrado con el uso de animales deficientes en TNF-R1, que presentan una activación disminuida de NF- $\kappa$ B y de STAT-3 tras la HP (Yamada, Kirillova et al. 1997). Su importancia parece radicar en la incapacidad de inducir la síntesis de IL-6, ya que el tratamiento con IL-6 recupera la capacidad síntesis de ADN en ratones TNF-R1 KO (Fujita, Marino et al. 2001). En animales que carecen de IL-6, tras una HP la recuperación de masa hepática se encuentra retrasada, y se caracteriza por la existencia de necrosis y por un fallo hepático, con una insuficiente activación de STAT-3 (Cressman, Greenbaum et al. 1996; Sakamoto, Liu et al. 1999; Li, Liang et al. 2001). El 40% de los genes inmediatos tempranos que se expresan en el hígado regenerante dependen de IL-6 (Li, Liang et al. 2001; Su, Guidotti et al. 2002; White, Brestelli et al.

2005) y parece que los niveles de IL-6 después de HP son críticos para determinar sus efectos en la regeneración (Blindenbacher, Wang et al. 2003; Zimmers, McKillop et al. 2003).

Además de las citoquinas y factores de crecimiento, en la regeneración hepática interviene la respuesta inmune innata, incluyendo el LPS, los factores del complemento como C3a y C5a (Fujita, Marino et al. 2001) y las moléculas de adhesión intracelular (ICAMs).

### **7.3. Señalización por factores de crecimiento**

Las vías de señalización de las citoquinas actúan en la primera fase de la regeneración, que corresponde a la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular desde G0 a G1. El paso de G1 a S está dirigido por factores de crecimiento que anulan el punto de restricción en la fase G1 tardía y se asocia con la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb), expresión de ciclinas D, E y A, y formación de los complejos cdk4/ciclina-D y cdk4/ciclina-E (Albrecht, Hoffman et al. 1993; Albrecht, Poon et al. 1998; Menjo, Ikeda et al. 1998).

Los efectos de los factores de crecimiento están mediados a través de sus receptores y hay dos sistemas de señalización ligando-receptor que participan en la regeneración hepática, HGF y su receptor *c-met*, y el receptor de EGF (EGFR1 y EGFR2) y sus diferentes ligandos (EGF, TGF- $\alpha$ , Anfirregulina, HB-EGF) (Burr, Toole et al. 1998; Tomiya, Ogata et al. 2000; Padiaditakis, Lopez-Talavera et al. 2001; Okano, Shiota et al. 2003; Huh, Factor et al. 2004). HGF es un potente factor morfogénico, motogénico y mitogénico para los hepatocitos en cultivo (Michalopoulos, Houck et al. 1984; Gherardi and Stoker 1990).

HGF es sintetizado por las células de Ito y actúa sobre los hepatocitos de manera paracrina. Tras ser sintetizado como pro-HGF es rápidamente procesado y activado por proteasas, por el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y su efector, el plasminógeno, tras la HP o un daño hepático (Padiaditakis, Lopez-Talavera et al. 2001; Shimizu, Hara et al. 2001). En la rata, las concentraciones de HGF aumentan más de 20 veces en una hora tras la HP (Lindroos, Zarnegar et al. 1991) y las concentraciones plasmáticas de HGF se elevan en humanos cuando disminuye la masa hepática funcional (Tomiya, Tani et al. 1992). En los hepatocitos, el HGF activa vías de

transducción de señales que provienen de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), AKT, y la quinasa S6K. La señalización de AKT libera TGF- $\alpha$  y otras señales posteriores que están compartidas con las vías de señalización de las citoquinas, como AP1, la quinasa amino-terminal Jun (JNK), pERKs, C/EBP- $\beta$  e IGFBP1.

HGF, además de ser un estimulador directo de la proliferación hepática, regula varios procesos en el hígado, y la delección del gen o de su receptor conlleva a la letalidad en el estado embrionario (Schmidt, Bladt et al. 1995; Burr, Toole et al. 1998; Pediaditakis, Lopez-Talavera et al. 2001; Okano, Shiota et al. 2003; Huh, Factor et al. 2004).

Los ligandos para EGFR incluyen a los factores de crecimiento EGF, TGF- $\alpha$ , anfíregulina (AR), el factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF), epiregulina y betacelulina. Las concentraciones plasmáticas de EGF aumentan aproximadamente un 30% tras la HP; y la noradrenalina, que también aumenta drásticamente tras la HP, estimula la secreción de EGF por las glándulas de Brunner (Olsen, Poulsen et al. 1985). La baja producción de EGF debido a la falta de glándulas salivares ocasiona una recuperación retardada tras la HP (Jones Jr, Tran-Patterson et al. 1995).

Durante la regeneración hepática, los niveles de TGF- $\alpha$  se relacionan mejor que los niveles de HGF con la duración del proceso proliferativo (Tomiyama, Tani et al. 1992; Tomiyama and Fujiwara 1993; Tomiyama, Hayashi et al. 1997). En contraste con HGF, que estimula la replicación de forma paracrina y endocrina, TGF- $\alpha$  es un factor autocrino (Webber, FitzGerald et al. 1993). TGF- $\alpha$  tiene efectos en la movilidad y la vascularización celular, su mayor efecto es la estimulación de la proliferación celular. Los ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- $\alpha$  tienen hepatocitos en continua proliferación y desarrollan cáncer (Webber, Wu et al. 1994).

HB-EGF se expresa antes que HGF y TGF- $\alpha$  después de HP y parece tener un único papel en la regeneración del hígado (Kiso, Kawata et al. 1995; Kiso, Kawata et al. 2003). Una HP del 30% no produce una replicación coordinada del ADN, a pesar de la activación de la cascada de citoquinas (Bucher and Swaffield 1964). Una sola inyección de HB-EGF 24 horas después de una HP del 30% puede anular este bloqueo y hacer que las células progresen en el ciclo celular como una onda de replicación del ADN (Mitchell, Nivison et al. 2005). Los animales con delección homocigótica de anfíregulina (AR), otro ligando de EGFR cuya expresión aumenta rápidamente tras la



HP, exhiben un proceso de regeneración retrasado y disminuido (Berasain, Garcia-Trevijano et al. 2005). Estos datos sugieren que existen funciones definidas para los diferentes ligandos de EGFR que no pueden ser desempeñadas por otros ligandos del receptor en la regeneración hepática, así como en otros procesos biológicos (Michalopoulos and Khan 2005).

La inyección de HGF en ratas normales, induce la síntesis de ADN de los hepatocitos, pero el número de células que inician la síntesis de ADN está limitado a un área relativamente pequeña. Resultados similares aparecen con la administración de TGF- $\alpha$  y EGF. Esto sugiere que los hepatocitos en el hígado normal no están preparados para responder a las señales mitogénicas sin una serie de señales iniciadoras que los lleve a un estado de respuesta (Webber, Godowski et al. 1994).

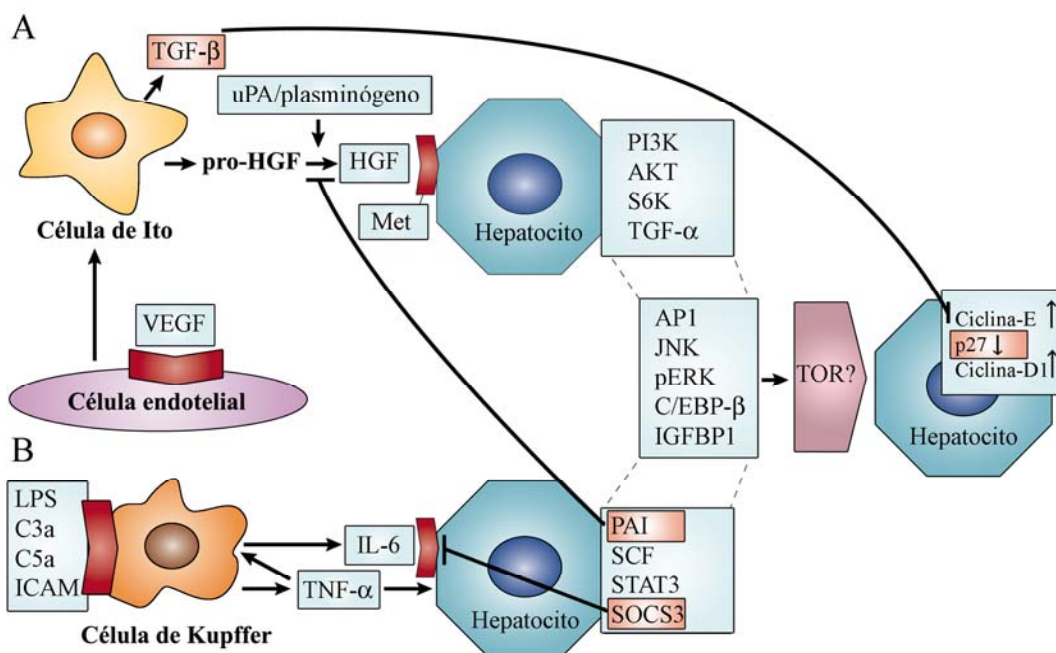
#### **7.4. Integración de la señalización.**

Las vías de señalización en las que están implicadas citoquinas y factores de crecimiento interactúan durante las diferentes fases del proceso de la regeneración y la cooperación entre ambas vías de señales es necesaria para una recuperación total del hígado (Fig. 9). Aunque la activación de un factor de transcripción o de una molécula de transducción de señales se puede producir por diferentes vías de señalización durante el proceso regenerativo, ello no implica que ambas señalizaciones se produzcan en el mismo momento. Esto permite especular acerca de como la combinación de las señales de citoquinas y factores de crecimiento y su expresión diferencial a lo largo del proceso proliferativo, pueden determinar la activación de factores de transcripción o de moléculas de transducción de señales durante la regeneración hepática. La señalización por HGF y TNF- $\alpha$ /IL6 es necesaria para la regeneración hepática, pero hay moléculas de transducción de señales como ERK y JNK, factores de transcripción como AP1 y C/EBP- $\beta$ , y otras moléculas como IGFBP1, que parecen estar reguladas tanto por factores de crecimiento como por citoquinas.

Una de las interacciones que se producen entre citoquinas y factores de crecimiento es la activación de metaloproteasas (MMPs). La actividad de varias de las MMPs incrementa después de HP (Rudolph, Trautwein et al. 1999; Kim, Mars et al. 2000). El principal efecto de TNF- $\alpha$  sobre hepatocitos co-cultivados con células epiteliales es activar a las MMPs, las cuales degradan los componentes de la matriz

extracelular, liberando factores de crecimiento y permitiendo a los hepatocitos proliferar (Lee, Sunnarborg et al. 2003). En hepatocitos en cultivo, TNF puede activar por sí mismo a la MMP denominada TACE (Enzima Convertidora de TGF- $\alpha$ ) y promueve la liberación de TGF- $\alpha$ , que activa a EGFR y se produce la proliferación de los hepatocitos (Argast, Campbell et al. 2004).

Una de las vías de transducción de señales mitogénicas que integra citoquinas y factores de crecimiento es la vía de Ras-Raf-MEK, que conduce a la activación de ERK1/2 y se la relaciona con la replicación de ADN del hepatocito *in vivo* y con la proliferación *in vitro* (Talarmin, Rescan et al. 1999; Coutant, Rescan et al. 2002; Li, Liang et al. 2002; Thoresen, Guren et al. 2003). Los factores de crecimiento como HGF y TGF- $\alpha$  y las citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-6 estimulan la actividad de ERK1/2 en hepatocitos primarios y en líneas celulares hepáticas (Francavilla, Ove et al. 1986; Scheving, Stevenson et al. 2002; Argast, Campbell et al. 2004). Además, TNF- $\alpha$  y HGF pueden activar JNK y MAPK-ERK, claves para la activación de Jun (Westwick, Weitzel et al. 1995), y también pueden inducir la expresión de ciclina D1, una proteína



**Figura 9. Señalización por citoquinas y factores de crecimiento en la regeneración hepática.** Moléculas claves en inmunidad, como LPS, activan la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por células de Kupffer. TNF- $\alpha$  e IL-6 activan Stat-3 (entre otras señales) y varias proteínas que también participan en la señalización por factores de crecimiento. Asimismo, se activan señales que participan en la finalización de la regeneración como TGF- $\beta$ , Socs-3 y p27. El factor de crecimiento HGF se une al receptor Met, activando la vía de PI3K y AKT y la liberación de TGF- $\alpha$  y otras señales compartidas con la señalización por citoquinas como API, JNK, ERKs, C/EBP- $\beta$  e IGFBP1. Esta señalización lleva al aumento de la expresión de ciclinas D1 y E y a una disminución de los niveles de p27 (Taub 2004).

importante para la entrada en el ciclo celular (Diehl, Yin et al. 1994; Talarmin, Rescan et al. 1999). HGF y TNF- $\alpha$ /IL-6 desempeñan un papel importante en la activación de AP-1, implicado en la activación de proteínas que participan en proliferación (Behrens, Sibilía et al. 2002), y la cooperación de AP-1 con STAT-3 amplifica la expresión génica durante la regeneración (Peters, Blinn et al. 2000).

IGFBP-1 es una de las señales más rápidas tras la HP y modula el crecimiento celular por mecanismos dependientes e independientes de señalización por IGF. IL6 regula positivamente la expresión de IGFBP-1 in vivo (91) y HGF in vitro (92).

### **7.5. Finalización del proceso de regeneración.**

El proceso proliferativo se detiene cuando el hígado alcanza una masa adecuada que cubre las necesidades funcionales demandadas por el organismo, con una precisión de  $\pm 10\%$  respecto a la masa original. La finalización de la regeneración es un proceso igual de complejo que la iniciación, pero la mayoría de las investigaciones se han centrado en las vías de señalización que inician la regeneración hepática y por lo tanto la señalización implicada en esta fase ha sido poco estudiada. Aun así, se han identificado varios mediadores que participan en el proceso de finalización, como son los supresores de señalización de citoquinas (SOCS) y miembros de la familia del TGF- $\beta$  (activinas y TGF- $\beta$ 1).

Los SOCS, como su nombre indica, son reguladores negativos de las vías de citoquinas y previenen de la fosforilación en tirosina de las STATs, porque interactúan directamente con las quinasas JAK cuando estas están fosforiladas (activas) e inhiben la activación de STAT (Fig. 8). Además es la propia IL-6, producida por las células de Kupffer, la que promueve un aumento de SOCS-3 en hígado, disminuyendo la activación de STAT-3 y poniendo fin a su propia señal (Campbell, Prichard et al. 2001). Simultáneamente, IL-6 induce la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) (Fig. 9) (Shimizu, Hara et al. 2001). PAI bloquea el procesamiento de pro-HGF a su forma activa o HGF, y por lo tanto IL-6 podría tener un papel en la finalización de la señalización de HGF en la regeneración hepática.

Las activinas son un miembro apoptogénico de la familia del TGF- $\beta$  que bloquean la mitosis. La señalización por activina-A durante la etapa de regeneración es mínima, ya que los niveles celulares de su receptor (ActR) se encuentran disminuidos.

Pero tras la etapa proliferativa, los receptores de activina vuelven a sus niveles normales (Date, Matsuzaki et al. 2000; Refaat, Bahathiq et al. 2004). La señalización por TGF- $\beta$ 1 y las activinas está controlada a otros niveles por factores extracelulares como la folistatina, que es una proteína sérica que se une a los receptores de activina. La administración de folistatina puede bloquear la señalización por activina y acelerar la regeneración hepática e incrementar el tamaño final del hígado (Takabe, Wang et al. 2003).

El TGF- $\beta$  ha sido considerado como una de las señales más importantes en el proceso de finalización de la regeneración. TGF- $\beta$ 1 es un inhibidor de la proliferación y un apoptógeno que participa en el control del tamaño del hígado y que se encuentra elevado en determinadas infecciones virales hepáticas y en cirrosis (Carr, Hayashi et al. 1986; Cain and Freathy 2001; Derynck and Zhang 2003). Tras la HP las células de Ito producen TGF- $\beta$ 1, sin embargo los hepatocitos que empiezan a proliferar son resistentes a la acción de TGF- $\beta$ 1 (Sanchez, Alvarez et al. 1999; Koniaris, McKillop et al. 2003; Herrera, Alvarez et al. 2004). Una de las dianas del TGF- $\beta$ 1 son las proteínas SMAD. En estado de quiescencia la actividad de las proteínas SMAD tiene un nivel basal, pero en el hígado regenerante se produce una sobreexpresión de SMAD mediada por la acción del TGF- $\beta$ 1, sin embargo, su señal se encuentra inhibida por la expresión de los represores transcripcionales SNON y SKI que también están sobreexpresados durante la regeneración hepática y pueden ser los responsables de la resistencia a la señalización del TGF- $\beta$ 1 durante la regeneración. En la fase proliferativa de la regeneración se forman complejos de SNON, SKI y SMADs, dichos complejos disminuyen cuando la masa hepática inicial ha sido restituida, las SMADs dejan de estar reprimidas y su activación permite que el hígado regrese a su estado de quiescencia (Date, Matsuzaki et al. 2000; Macias-Silva, Li et al. 2002). Sin embargo, en ratones que sobreexpresan TGF- $\beta$ 1 específicamente en el hígado, el proceso regenerativo no se encuentra afectado y son capaces de regenerar el hígado hasta alcanzar la masa hepática inicial (Sanderson, Factor et al. 1995; Kopp, Factor et al. 1996). Estos datos indican que aunque TGF- $\beta$  es muy importante para la finalización de la regeneración, no es la única señal. Además de sus efectos mito-inhibitorios, TGF- $\beta$  podría estimular los cambios tempranos en la movilidad de los hepatocitos y podría estar implicado en la regulación de la síntesis de nueva matriz a medida que la histología del hígado se reorganiza durante y tras la regeneración (Petersen, Yee et al. 1994; Stolz and Michalopoulos 1997).





*Objetivos*

---





En esta Tesis Doctoral nos planteamos el estudio de la función de la caveolina-1 en la proliferación y regeneración hepática y para ello los objetivos propuestos fueron los siguientes:

1. Analizar los niveles de expresión de Cav-1 y de Cav-1 fosforilada en la tirosina 14 en líneas celulares hepáticas y en cultivo primario de hepatocitos.
2. Determinar si los estímulos pro-inflamatorios y proliferativos inducen la fosforilación de Cav-1.
3. Establecer las vías de señalización, las quinasas que fosforilan a Cav-1 y las implicaciones que tuviera en la localización subcelular de la Cav-1 dicha fosforilación.
4. Realizar estudios *in vivo* mediante un modelo de proliferación como el de la regeneración hepática que ocurre después de una hepatectomía parcial del 70% y comparar los resultados obtenidos con las líneas celulares hepáticas.
5. Analizar las consecuencias que supondría la anulación del gen de la Cav-1 para el proceso de la regeneración hepática, mediante el uso de ratones carentes del gen de Cav-1.



## *Materiales y Métodos*

---

## **1. MATERIAL.**

### **1.1. APARATOS.**

Se utilizaron balanzas de precisión SARTORIUS, modelo BP 310P, y pHmetro de CRISON, modelo GLP21.

La manipulación y siembra de células se realizó bajo campana de flujo laminar Telstar modelo PV-100. Las células fueron incubadas en un incubador de células Heraeus con un 5% de CO<sub>2</sub> y a saturación de humedad.

Las centrifugaciones hasta 2000g se llevaron a cabo en una centrifuga refrigerada Heraeus modelo Minifuge T. Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrifuga refrigerada Kontron modelo Centrikon H-401, en una microcentrifuga Heraeus modelo Biofuge 13 y en una ultracentrifuga Sorvall modelo RC 5C Plus. Los rotores utilizados para las ultracentrifugaciones fueron: un rotor basculante Sorvall modelo TH-641 y un rotor de ángulo fijo Sorvall modelo T-890.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2000 o en un ND-1000 (NanoDrop Technologies) y las medidas colorimétricas en un lector de placas ATOM 340 ATC.

Las cubetas, fuentes de electroforesis (Power pac 300 y 3000) y aparatos de transferencia fueron comprados a Bio-Rad (Richmond C.A., USA).

Las inmunocitofluorescencias se visualizaron y cuantificaron en un microscopio confocal Radiante 2100 (Zeiss) y las imágenes las imágenes se registraron con el programa LaserSharp y se analizaron con LaserPix software (Bio-Rad).

### **1.2. REACTIVOS.**

Los anticuerpos fueron suministrados por Santa Cruz Laboratories (Santa Cruz, CA), Chemicon International Inc. (Temecula, CA), BD Transduction Laboratories (San José, CA, USA) Cayman Chemical Co. Inc. (Ann Arbor, MI) y por Torrey Pines Biolabs (San Diego, CA). Lipopolisacárido (LPS), citoquinas y otros reactivos fueron suministrados por Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) o Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). PP2 e inhibidores farmacológicos fueron comprados a Calbiochem EMD Biosciences Inc. (San Diego, CA). STI-571 (Gleevec) fue suministrado por Novartis

International AG (Basel, SW). Las placas de cultivo celular fueron proporcionadas por Falcon (Lincoln Park, NJ). El medio de cultivo fue proporcionado por Biowhittaker (Walkersville, MD) y por American Type Culture Collection ATCC (Manassas, VA). Reactivos para electroforesis y Western blot fueron suministrados por Bio-Rad (Hercules, CA). Las membranas de nitrocelulosa empleadas en la transferencia de proteínas para el análisis por Western blot fueron proporcionadas por Amersham.

## **2. MÉTODOS:**

### **2.1. Cultivos celulares y tratamiento.**

Las líneas celulares humanas de hígado inmortalizadas CCL13 (Chang liver, CHL) y HepG2 fueron suministradas por la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Los catálogos de la ATCC para la línea inmortalizada y no tumoral CCL13 (Chang liver, CHL) indican que tiene marcadores de HeLa. Para verificar la naturaleza hepática de los clones, analizamos los marcadores hepáticos  $\alpha$ -fetoproteína y albúmina, que se expresan de manera significativa (datos no mostrados), como describe Lee y colaboradores (Lee and Thorgeirsson 2002). La línea celular HepG2 deriva de un hepatoma y la línea celular HuH-7 está considerada una línea de carcinoma hepatocelular (CHC) y fue proporcionada amablemente por P. Schirmarcher (Institute of Pathology, University of Cologne, Germany). Las líneas celulares CHL y HepG2 se cultivaron en DMEM y las HuH-7 en EMEM suplementado con L-glutamina 2mM (GIBCO). Todas las líneas se suplementaron con 10% suero fetal bovino (FCS) y antibióticos (50  $\mu$ g de penicilina, estreptomycin y gentamicina por ml) a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO<sub>2</sub>. Dieciocho horas antes de cada experimento se eliminó el medio de cultivo y se adicionó medio de cultivo nuevo suplementado con 1% de FCS.

### **2.2. Técnica de la perfusión hepática y cultivo primario de hepatocitos.**

El cultivo primario de hepatocitos se realizó por perfusión con colagenasa en tampón de perfusión TP (HEPES 20 mM pH 7.4, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, NaCl 150 mM, y glucosa 10 mM) a 37°C y siguiendo el método clásico de perfusión /recirculación (29). La perfusión se realizó con una bomba peristáltica y un circuito tubular que contenía el medio TP sin colagenasa. Los animales fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina 92:7 mg/Kg. Se realizó una incisión longitudinal en el abdomen (piel y músculo) y dos cortes laterales en forma de T, de manera que quedara accesible toda la cavidad abdominal. Se colocó una ligadura en la vena cava posterior, por encima de las venas renales, que se dejó sin anudar y se introdujo una cánula conectada al circuito por la vena porta fijada con la ayuda de un hilo. Nada más

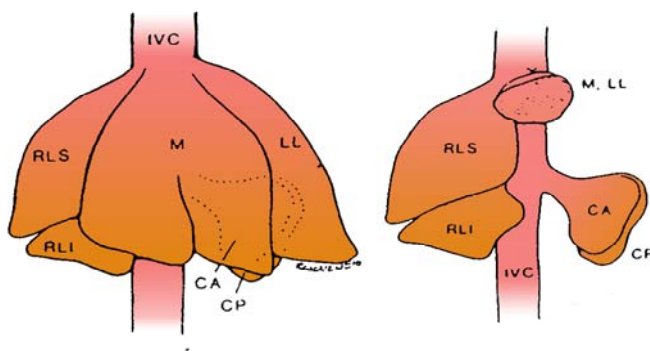
comenzar el flujo, se realizó un corte en el extremo más caudal de la vena cava posterior, por debajo de la ligadura, para dar salida a la solución de perfusión. Después de 3 minutos aproximadamente, cuando el hígado perdió la típica tonalidad marrón y/o rojiza, se abrió la cavidad torácica, se seccionó la vena cava posterior cerca de la salida del corazón, y se anudó fuertemente la ligadura que se había colocado en la vena cava posterior a la altura de los riñones. De esta forma el flujo de perfusión comenzó a salir por la cavidad torácica y se mantuvo así durante 5 minutos más. Pasado este periodo de lavado, se añadió a la solución TP 45 mg de Colagenasa A por cada 100 ml de TP y 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, manteniendo el flujo de 3 a 5 minutos, posteriormente el hígado fue extraído cuidadosamente y se colocó en una placa de petri con TP para disgregarlo mediante la ayuda de unas pinzas romas. El contenido de la placa se filtró progresivamente a través de membranas de nylon de 500, 100 y 50  $\mu$ m de poro sobre un tubo de 50 ml. Después de realizó una centrifugación a 50g durante 1 minuto y el precipitado se resuspendió en 25 ml de TP para centrifugarlo de nuevo a 50g y eliminar los restos hepáticos.

Para determinar la viabilidad celular, los hepatocitos en suspensión se tiñeron con Azul Tripan al 0,2% y aquellas células que mantuvieron su membrana íntegra aparecieron sin teñir. Los hepatocitos se contaron en una cámara Neubauer (Brand) y la viabilidad de las células se consideró buena cuando era superior al 90 %.

$3-4 \times 10^6$  células en suspensión fueron cultivadas en placas de 6 cm con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado con 10% FCS y antibióticos (50  $\mu$ g de penicilina, estreptomycin y gentamicina por ml) a 37°C en una atmósfera humedecida al 5%  $\text{CO}_2$ . Después de 4 horas de incubación para permitir la adhesión celular, se aspiró el medio de cultivo para eliminar aquellas células que no se adhirieron y los hepatocitos aislados se mantuvieron en el mismo medio con 2% FCS.

### 2.3. Mantenimiento de los animales y operaciones de hepatectomía parcial.

Ratones Cav-1<sup>-/-</sup>, de la cepa Cav-1<sup>tm1Mls</sup>/J de 3 meses de edad (20-26 g) y sus controles correspondientes Cav-1<sup>+/+</sup> (Jackson Laboratoires, Bar Harbor, ME) se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar (2018 Teklad global, Harlan Interfauna Ibérica S.L. Barcelona) y se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (con encendido de la luz a las 08:00 a.m.). Las operaciones de hepatectomía parcial (HP), según el método descrito por Higgins y Anderson R.M. (dibujo inferior), se realizaron entre las 08:00 y las 10:00 a.m. Los animales fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina (92:7 mg/Kg) intraperitoneal (i.p.) y sometidos a laparotomía con la eliminación del 70% del hígado (lóbulos inferior izquierdo y superior derecho). Aquellos que mostraban letargia y falta de recuperación se sacrificaron y se eliminaron del experimento. Los animales fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> a los tiempos indicados y los tejidos fueron inmediatamente congelados en N<sub>2</sub> líquido o recogidos en una solución de sacarosa al 30 % en PBS a 4°C durante 24 horas. El tejido precipitado en sacarosa fue congelado en 2-metil-butano que estaba dentro de un vaso de precipitados en contacto con hielo seco y se guardó a -80°C en compuesto OCT<sup>TM</sup> (Tissue Tek) para su análisis posterior. El plasma se obtuvo de la arteria aorta. La ausencia de Cav-1 fue confirmada por RT-PCR y Western blot. El mantenimiento de los animales se realizó siguiendo la normativa internacional (Institutional Care Instruction).



*Modelo de hepatectomía parcial descrito por Higgins y Anderson R.M., según el cual se extirpa el 70% de la masa hepática, sin causar daño a los lóbulos remanentes.*

*Adaptado de: Higgins, GM, and Anderson, R., (Higgins and Anderson 1931).*



#### **2.4. Descripción de la cepa *Cav<sup>tm1Ms</sup>/J***

**Jackson Laboratoires, Bar Harbor, ME.**

<http://jaxmice.jax.org/strain/004585.html>

Los ratones homocigóticos para la delección de Cav-1 son viables, fértiles y no presentan grandes anormalidades físicas. En los ratones deficientes para Cav-1 no se detecta ningún producto génico (proteína) en los tejidos adiposo, pulmonares, cardíacos o en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).

A la edad de 4-5 meses suelen ser más pequeños que los controles, a la edad de un año pesan entre 5 y 7 g menos y son resistentes a la obesidad inducida en la dieta. En el tejido adiposo se produce una patología progresiva que provoca la reducción del tejido adiposo blanco con adipocitos pequeños y adipocitos marrones alargados e hiperplásicos. Tienen alterado el metabolismo lipídico, con una concentración elevada de triglicéridos, de ácidos grasos libres, y niveles reducidos de leptina.

El análisis histológico del tejido pulmonar muestra un tabique alveolar más grande, hiper celularidad, espacios alveolares reducidos e incremento en la densidad de la membrana basal y de fibras reticulares. Los análisis inmunohistoquímicos del tejido pulmonar muestran un incremento de las células endoteliales.

Los segmentos aórticos aislados tienen una vasoconstricción disminuida en respuesta al agonista del receptor adrenérgico  $\alpha$ -1, a fenilefrina y tienen una elevada vasorelajación en respuesta a acetilcolina. Los análisis de microscopía electrónica revelan la completa ausencia de caveolas en las células endoteliales. Los estudios para medir la absorción de la albúmina marcada con fluorocromos o conjugada con oro en experimentos *in vitro* e *in vivo* respectivamente, demostraron un mal funcionamiento de la endocitosis a través de las caveolas.

Los fibroblastos embrionarios deficientes en Cav-1 proliferan dos veces más rápido y son más densos en confluencia, como indican las curvas de crecimiento y los análisis de ciclo celular.

Este ratón deficiente en caveolina es útil para utilizarlo en estudios de transporte vesicular y del colesterol, transducción de señales y supresión tumoral.

## **2.5. Preparación de extractos totales.**

2-3 x10<sup>6</sup> de células en cultivo o 50 mg del hígado remanente fueron homogeneizados en 1 ml (células) o 5 volúmenes de tampón de extracto total [Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10%, 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato (CHAPS) 0.5%, β-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0.1 mM]. Los extractos se mezclaron en el vortex durante 30 min a 4°C y después se centrifugaron 20 minutos a 13000g, el sobrenadante se guardó a -20°C.

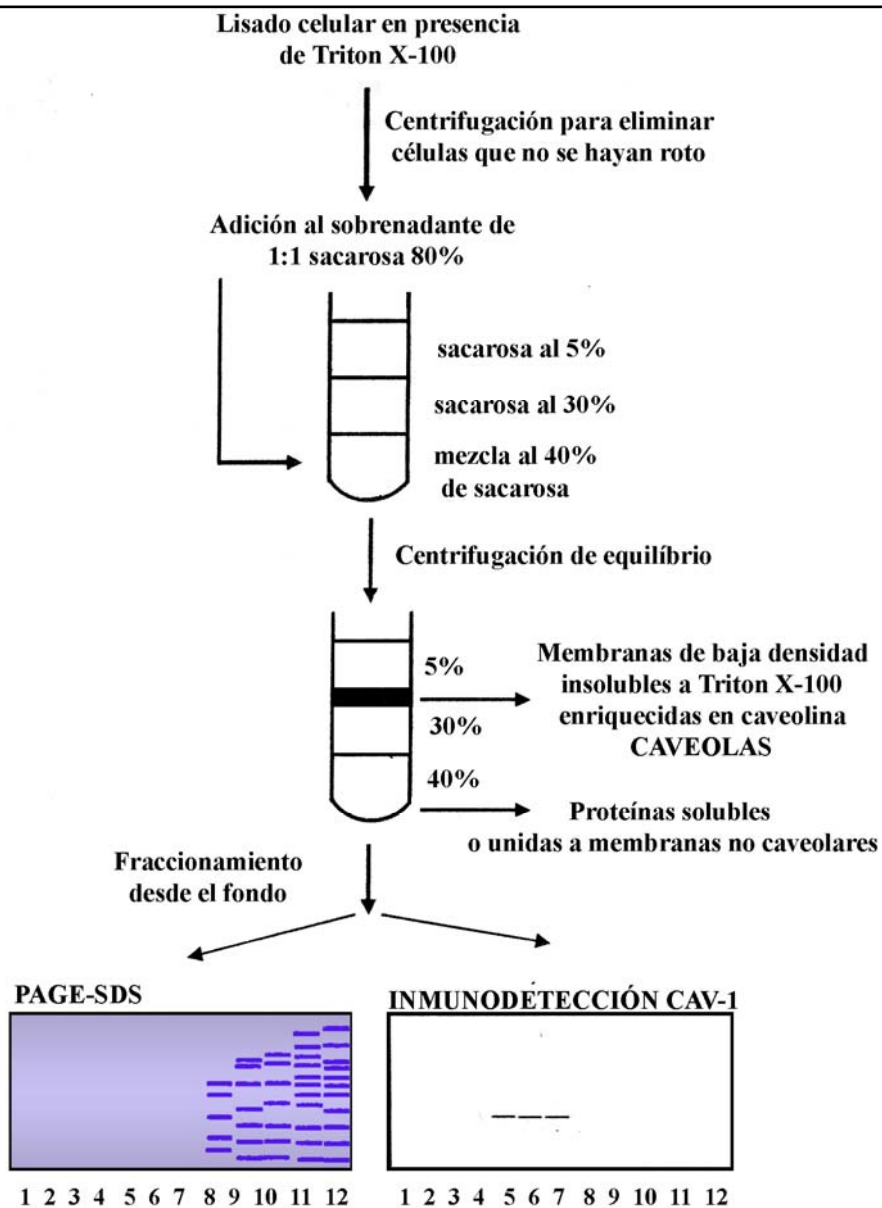
## **2.6. Determinación de proteínas.**

La determinación de la concentración proteica de los extractos se realizó según el método descrito por Bradford (Bradford, 1975. Bio-Rad), usando albúmina de suero bovino como patrón. Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie, azul brillante, por fuerza iónica, con grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 595nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente en la muestra.

## **2.7. Aislamientos de fracciones de membrana enriquecidas en caveolina.**

10 x10<sup>6</sup> células o 50 mg de tejido hepático fueron homogeneizados usando un homogenizador de cristal-Teflón en 2 ml (células) o 5 volúmenes de el medio de extracción MBS (hígado) [ácido morfoetanosulfónico (MES) 25 mM, pH 6.5; NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml y Tritón X-100 al 1%] a 4°C. Los núcleos y las células que no se rompieron en la homogenización se eliminaron por centrifugación a 3000g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se mezcló 1:1 con sacarosa al 80 % preparada en MBS. 4 ml (células) ó 1,5 ml (hígado) de dicha mezcla se colocaron en el fondo de un tubo Ultra-Clear de 13 ml correspondiente al rotor TH-641 (Sorvall) en el caso de los aislamientos celulares o de 5 ml correspondiente al rotor SW60 (Beckman) en el caso de los aislamientos de tejido hepático. El gradiente discontinuo (40-35-5%) se formó sin mezclar las fases cargando sobre la mezcla de 40% 1,5 ml o 4 ml de sacarosa al 30% y posteriormente el mismo volumen de sacarosa al 5% (todos ellos preparados en MBS). Los tubos se

centrifugaron a 200000g durante 18 horas a 4°C en sus correspondientes un rotores basculantes (TH-641 ó SW60) y se recogieron 12 fracciones desde el fondo de cada tubo, las fracciones fueron numeradas del 1 al 12 desde la fracción superior a la inferior. Para precipitar las proteínas, las fracciones fueron mezcladas 1:1 con acetona fría, mezclándose apropiadamente y permitiendo la precipitación durante 2-3 horas a -20°C. Tras este paso, las muestras se centrifugaron a 16000g durante 10 minutos y se dejaron evaporar a temperatura ambiente (Navarro-Lerida, Portoles et al. 2004; Pol, Martin et al. 2004) para eliminar las trazas de acetona. Los precipitados fueron resuspendidos en 100 µl de Tris-HCl 30 mM, pH 6.8 y las alícuotas fueron tratadas con tampón Laemmli y separadas electroforéticamente por SDS-PAGE.



*Esquema representativo del proceso de aislamiento de caveolas.*

## **2.8. Preparación de fracciones microsomales.**

Las células o el tejido hepático fueron homogeneizados en 1 ml (células) o en 5 volúmenes del medio de extracción (PBS, EDTA 1 mM, PMSF 2 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml) seguido de tres ciclos de sonicación de 15 segundos a 4°C y una centrifugación a 6000g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 105000g durante 1 hora a 4°C en un rotor de ángulo fijo T-890 (Sorvall) y los precipitados (fracción de membrana cruda que contiene retículo endoplasmático y membranas plasmáticas, MP+RE) y los sobrenadantes (fracción soluble) se llevaron a volúmenes iguales del medio de extracción inicial.

## **2.9. Análisis de proteínas por Western-blot.**

### **2.9.1. Electroforesis y transferencia.**

Para el análisis de proteínas por Western blot, cantidades iguales de proteína (10-50 µg) de cada fracción (extracto total o fracciones microsomales) o 50 µl de las fracciones obtenidas del gradiente se desnaturalizaron a 95°C en un tampón Laemmli (Tris-HCl pH 6.8 1M, SDS 20%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%) y se cargaron en geles del 8 al 12 % de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29:1) en condiciones reductoras con dodecil sulfato sódico (SDS) y se fraccionaron electroforéticamente. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas Hybond<sup>TM</sup>-PVDF (polyvinylidene difluoride membrane) (Amersham) en un tampón de transferencia constituido por Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% y pH 8.3.

### **2.9.2. Inmunodetección.**

Con el fin de saturar los sitios de unión inespecífica, las membranas se mantuvieron durante 1 hora en una solución de leche en polvo libre de grasa al 5% en PBS. Transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos, durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, las membranas se lavaron con PBS-T (PBS y Tween-20 0.1%) y se expusieron durante 1 hora a temperatura

ambiente con el correspondiente conjugado de peroxidasa anti-rabbit ó anti-mouse, siguiendo el protocolo de ECL recomendado por Amersham. Se realizaron diferentes tiempos de exposición para cada blot usando una cámara CCD acoplada a un Analizador de Imágenes Luminiscentes (LAS3000 TDI, Madrid), para asegurar la linealidad de cada intensidad de banda en cada experimento. El análisis densitométrico se realizó usando el software Science Lab 2001 Image Gauge V4.0 (Fuji Photo Film, CO., LTD). Las unidades expresadas son arbitrarias.

Las cantidades de las diferentes proteínas analizadas, así como de las proteínas utilizadas como normalizadores, se determinaron por Western blot usando los anticuerpos que aparecen en la tabla de anticuerpos utilizados.

Las membranas se sometieron a incubaciones sucesivas con diferentes anticuerpos tras ser tratadas con tampón un tampón salino que contenía PBS, SDS 2% y  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, durante 30 minutos a 60°C y en agitación continua.

**Tabla de anticuerpos utilizados**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>nº Catálogo</b>	<b>Utilidad</b>
<b>Ciclina E</b>	Santa Cruz	sc-481	Detección proteica
<b>Ciclina D1</b>	Santa Cruz	cs-718	Detección proteica
<b>PCNA</b>	Santa Cruz	sc-7907	Detección proteica
<b>p27 Kpi</b>	Santa Cruz	sc-528	Detección proteica
<b>Cav-1</b>	BD Transduction Laboratories	610060	Detección proteica
<b>P-Y14-Cav-1</b>	Chemicon	AB3830	Detección proteica específica
<b>c-Src Total</b>	Santa Cruz	sc-19	Detección proteica
<b>c-Src Activa</b>	Biosource	AHO-0051	Detección proteica específica
<b>p85 (PI3K)</b>	Upstate	06-195	Normalizador proteínas citosólicas
<b>SP1</b>	Santa Cruz	sc-59	Normalizador proteínas nucleares
<b>5'-nucleotidasa</b>	Santa Cruz	sc-25603	Marcador membrana plasmática (MP)
<b>GM130</b>	Santa Cruz	sc-30100	Marcador aparato de Golgi (AG)
<b>Calregulina</b>	Santa Cruz	sc-11398	Marcador Retículo Endoplásmico (RE)
<b>Anexina VI</b>	Santa Cruz	sc-H-114	Marcador endosomas de reciclaje de receptores (ERR)

## **2.10. Tinción de geles de proteínas. Método de Coomassie.**

La tinción proteica sobre geles de acrilamida se realizó por el método clásico de Coomassie, descrito en “Current Protocols” (Ausubel, Brent et al. 1997).

Después de la separación electroforética de proteínas, los geles de acrilamida se sumergieron en una solución fijadora que contenía metanol, ácido acético y agua (50:10:40) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se realizó la tinción de proteínas con la solución de Coomasie que contenía la solución fijadora a la que se le añadió Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,05% (Bio-Rad) y se dejó en agitación durante 1 hora más. Pasado ese tiempo se eliminó el exceso de tinción con un lavado de solución fijadora y posteriormente se realizó el desteñido con una solución de lavado que contenía metanol, ácido acético, y agua (5:7:88). Finalmente el gel de acrilamida se guardó a 4°C en agua destilada.

## **2.11. Inmunoprecipitación de proteínas.**

Para los experimentos de inmunoprecipitación de proteínas se utilizó “Protein A/G PLUS-Agarose” (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) siguiendo las instrucciones del proveedor.

El proceso de la inmunoprecipitación se realizó en todos sus pasos a 4°C. 500 µg del extracto total de proteínas se trataron con 5 µg del anticuerpo policlonal que reconoce a Cav-1 (20 µl) y tampón PBS hasta 1 ml, permitiendo la interacción durante 1 hora en una plataforma rotatoria tipo RK-10-VS. Posteriormente se añadieron 40 µl de Protein A/G Plus Agarose. Los inmunocomplejos se formaron durante 2 horas y después se centrifugaron a 1000g durante 5 minutos. El precipitado se lavó 4 veces en tampón PBS y se centrifugó, cada vez, a 1000g durante 5 minutos. Después del último lavado, el precipitado fue resuspendido en 50 µl de tampón Laemmli para su separación electroforética o en 50 µl de bicarbonato amónico 50 mM para su identificación en la trampa iónica.

## **2.12. Preparación de plásmidos y transfecciones en células.**

### **2.12.1. Transformación, crecimiento y purificación de plásmidos de bacterias competentes.**

Los vectores de expresión que codifican para Wt-Cav-1-GFP o Y14F-Cav-1-GFP, clonados en el vector de expresión pEGF-N1, y cedidos amablemente por el Doctor Miguel Ángel del Pozo, fueron transformados en Subcloning Efficiency™ DH5α™ Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen™ Life technologies). Las bacterias se descongelaron en hielo y se colocó una alícuota de 100 µl en un tubo de microcentrífuga para cada transformación. Directamente se añadieron 10 ng de DNA plasmídico a las bacterias y se mezclaron con agitación suave. Tras incubación en hielo durante 30 minutos se sometieron a un choque térmico en un baño a 37°C durante 1 minuto. Inmediatamente los tubos se pusieron de nuevo en hielo durante 5 minutos y tras este tiempo se añadió 1 ml de medio 2xYT (Tryptona 16 g/l, NaCl 5 g/l y extracto de levadura 10 g/l) sin antibiótico y se mezcló suavemente. Los tubos se incubaron en un baño a 37°C durante 1 hora. De cada tubo de transformación se tomaron 300 µl y se sembraron en una placa de 2xYT-agar con antibiótico (ampicilina). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

A la mañana siguiente se seleccionó una colonia y se inoculó con ella un tubo de 5 ml de 2xYT con antibiótico (100 µg/ml ampicilina) y se dejó crecer en agitación en un incubador de bacterias a 37°C. Por la tarde, el contenido total de este preinóculo se transfirió a un matraz con 250 ml de 2xYT-ampicilina y se incubó en agitación durante toda la noche a 37°C. Los plásmidos transformados fueron purificados mediante “Jet Start Plasmid Purification MAXI Kit”(Genycell Biotech España, S.L.) siguiendo las instrucciones del proveedor y se resuspendieron en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). La concentración de los plásmidos se midieron espectrofotométricamente a 260/280 nm.

### **2.12.2. Transfecciones en células.**

Para los experimentos de transfección transitoria con los vectores de expresión que codifican para Wt-Cav-1-GFP o Y14F-Cav-1-GFP en células CHL, se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen™ Life technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor.

15 x10<sup>4</sup> células se sembraron sobre cristales en placas de 24 pocillos y fueron crecidas a un 60% de confluencia. En tubos eppendorf se prepararon por separado 50 µl de medio OPTI-mem (Biowhittaker) sin antibióticos ni suero con 2 µl de Lipofectamina 2000 y otros 50 µl de medio OPTI-mem con 0,8 µg del plásmido. Se agitaron en un Vortex y posteriormente se añadió la lipofectamina sobre el plásmido. Se agitó fuertemente y se dejó durante 20 minutos para favorecer la formación de los complejos de ADN con los liposomas. Pasado este tiempo se añadieron 100 µl de complejos de transfección a cada pocillo y las células fueron expuestas durante 6 horas al agente de transfección. Después de este periodo se cambió el medio de cultivo y las células se mantuvieron durante 24 horas antes de la estimulación. Posteriormente las células se fijaron en paraformaldehído al 4% para realizar la inmunofluorescencia indirecta.

### **2.13. Inmunofluorescencia.**

Para la inmunofluorescencia sobre cortes de tejido hepático se hicieron secciones de 8 µm con un criotomo (Leica CM1850 Microsystems) de las fracciones del hígado congeladas en compuesto OCT™ y varias secciones no consecutivas se recogieron en portaobjetos. Para realizar inmunocitofluorescencia las células se cultivaron en placas multipocillo de 24, sobre cristales y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS y pH 7.0 durante 15 minutos, se lavaron varias veces en PBS y se permeabilizaron con metanol enfriado a -20°C durante 15 minutos. Las células se bloquearon con albúmina de suero bovino al 3% (BSA) durante una hora a temperatura ambiente, y se incubaron con los correspondientes anticuerpos monoclonales o policlonales diluidos 1:150 en PBS con 1% BSA 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavaron tres veces en PBS y los cristales se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios goat anti-rabbit o rabbit anti-mouse IgG-Cy3,



goat anti-mouse, y se trataron todos con Hoechst 33258 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para la detección y cuantificación de la apoptosis se utilizó el ensayo de TUNEL (Roche) siguiendo las instrucciones del distribuidor. Las preparaciones se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS pH 7.4, durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% y citrato sódico 0,1% frío. La deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora nucleótidos marcados (FITC) a los extremos 3'-OH de las cadenas de DNA fragmentadas de las células apoptóticas. El Hoechst 33342 (10 µg/ml) se utilizó para marcar y analizar los núcleos y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Para la cuantificación se contaron 4 campos significativos de tres preparaciones procedentes de tres animales por condición y se reflejaron los porcentajes de células apoptóticas o células poliploides respecto al control.

Los cuerpos lipídicos se tiñeron con Rojo Nilo. La fluorescencia se visualizó en un microscopio confocal Radiante 2100 (Zeiss) y las imágenes se registraron con el programa LaserSharp y se analizaron con LaserPix software (Bio-Rad). Las secciones histológicas de hígado murino se prepararon siguiendo los procedimientos habituales de tinción (hematosilina/eosina) y fueron fijadas en 4% PFA.

#### **2.14. Análisis por citometría de flujo en células de hígado remanente.**

Secciones de hígado fueron homogenadas en PBS, sobre una placa de petri con la ayuda de un bisturí, hasta obtener fragmentos de 2,5 mm aproximadamente. El homogenado se disgregó en una Dako Medimachine utilizando un filtro Medicon de 50 µm de poro y se dieron 2 sesiones de 30 segundos para digerir todo el tejido y obtener células individuales. El extracto fue filtrado con la ayuda de una jeringa y un filtro de 50 µm. Las células se centrifugaron a 1200rpm durante 5 minutos y a 4°C. El precipitado celular se fijó con etanol frío al 70% durante 2 minutos.

Para evaluar el contenido de lípidos las células se tiñeron con Rojo Nilo a una concentración final de 0,5 µg/ml y para evaluar el ciclo celular y la ploidía se tiñeron

con Hoechst 33342 a una concentración final de 10 µg/ml. Las células se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se analizaron en un citómetro de células BD FACS Canto II.

## **2.15. Aislamiento de ARN y análisis de RT-PCR.**

### **2.15.1. Aislamiento de ARN.**

Las células ( $3-4 \times 10^6$ ) y los fragmentos de hígado regenerante (50 µg) se lavaron con PBS frío, se homogeneizaron con TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen Life Technologies) según las instrucciones del proveedor y el homogeneizado se transfirió a tubos de polipropileno. Una vez en los tubos se añadió a cada muestra 200 µl de cloroformo frío por cada 1 ml de TRIzol<sup>®</sup> y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos. Posteriormente se mantuvieron 15 minutos a 4°C y se centrifugaron durante 15 minutos a 12000g y a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se le añadió el mismo volumen de isopropanol frío que el de TRIzol<sup>®</sup> inicial. A continuación las muestras se mantuvieron durante 1 hora a -80°C con el fin de precipitar el RNA. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12000g y a 4°C y se aspiró el sobrenadante. El precipitado se lavó varias veces con etanol 75% frío y finalmente se resuspendió en agua ultra pura estéril. Para determinar la calidad de los ARNs, se separaron electroforéticamente en geles de 1,5% de agarosa, visualizándolos en un trans-iluminador UVA, y se valoraron en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Los ARNs se conservaron a -80°C

### **2.15.2. RT-PCR.**

La transcripción inversa del ARN extraído del hígado regenerante o de células con Trizol Reagent (Invitrogen) se realizó a partir de 1 µg de ARN al que se le añadieron 50 pmol de Random Hexamer pd(N)<sub>6</sub> como cebador (Amersham Biosciences), llevando posteriormente cada muestra a un volumen final de 10,5 µl con agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 65°C y posteriormente a 4°C durante 1 minuto. A continuación se añadió a cada tubo 9,5 µl del cóctel de síntesis de ADNc (Roche Diagnostics) [4 µl tampón RT 5x, 2 µl DTT 100 mM, 2 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM) (Biotools), 0,5 µl de

inhibidor de ARNasas (Roche Diagnostics), y 50 U de Expand Reverse Transcriptase (1 µl)]. Los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron durante 1 hora a 42°C. Para detener la reacción se calentaron las muestras 1 minuto a 92°C y a continuación se enfriaron rápidamente en hielo. Finalmente, para eliminar posibles trazas de ARN se les añadió 1 µl de ARNasa H a cada uno de los tubos y se mantuvieron a 37°C durante 20 minutos. Los ADNc se conservaron a -20°C.

### **2.15.3. PCR semicuantitativa.**

La amplificación del ADNc por la técnica de la “amplificación de la polimerasa en cadena” (PCR) usando un termociclador eppendorf<sup>®</sup>, se llevó a cabo con 1 U de ADN polimerasa (Biotools) en 35 µl de una mezcla de reacción que contenían 5 µl del ADNc recién sintetizado, 1 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM) (Biotools), 10 µM de cada cebador y 5 µl del tampón de reacción (Biotools). Las condiciones de los 35 ciclos fueron: 3 min a 94°C, 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C, con una elongación final de 5 min a 72°C. Los fragmentos amplificados de ADN fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. La cuantificación de las bandas se llevo a cabo por densitometría después de ser normalizada con el ARN ribosómico 18S. Los cebadores específicos fueron:

Cav-1: 5'AGCCCAACAACAAGGCCAT3' (sentido)  
5'GCAATCACATCTTCAAAGTCAATCTT3' (antisentido, 142 pb)  
NOS-2: 5'CTTTGACGCTCGGAACTGTAGC3' (sentido)  
5'GGCAGTGCATACCACTTCAACC3' (antisentido, 550 bp)  
ARNr 18s: 5'GCAATTATTCCCCATGAACGA3'(sentido)  
5'CAAAGGGCAGGGACTTAATCAA3'(antisentido, 100 bp).

Los cebadores empleados se diseñaron utilizando el programa informático Primer Express<sup>™</sup> (Applied Biosystems) y fueron sintetizados y suministrados por ISOGEN BIOSCIENCE.

## **2.16. Determinación de los niveles de triacilglicerol.**

Los niveles de triacilglicerol (TAG) se determinaron usando los métodos enzimáticos del kit específico suministrado por Biosystems (Barcelona) en homogenados hepáticos.

## **2.17. Aislamiento y fragmentación de iones. Identificación de proteínas.**

Los experimentos de caracterización de modificaciones en la molécula de Cav-1 fueron llevados a cabo por el servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Para ello realizaron la ionización de los analitos correspondientes mediante electronebulización (ESI) y su posterior caracterización en una trampa iónica

### **2.17.1. Digestión peptídica sobre geles SDS-PAGE monodimensionales.**

Después de la tinción de los geles de acrilamida con Coomassie, se realizó un corte de un fragmento del gel, en el sitio aproximado de la proteína requerida y se incubó en agua ultra pura. Posteriormente las proteínas del fragmento se digirieron según el método descrito por Shevchenko (Shevchenko, Wilm et al. 1996). Los fragmentos del gel se equilibraron en bicarbonato amónico 50 mM (tampón ABC) antes de su reducción con DTT 10 mM y alquilación con yodoacetamida 0,1 M, ambos en Tampón ABC. A continuación se añadió tripsina porcina modificada (Promega) a una concentración final de 0,4 µg por fragmento de gel, en tampón ABC, para digerir las proteínas. La digestión se realizó a 37°C durante toda la noche. Finalmente se extrajeron los péptidos con ácido trifluoroacético al 0,5%. La solución final fue desecada mediante vacío y disuelta en 20 µl de una solución que contenía acetonitrilo 5% y ácido acético 0,5% en agua.

### **2.17.2. Cromatografía nano-Líquida y análisis de los tripéptidos mediante trampa iónica y espectrometría de masas.**

Los tripéptidos procedentes de la digestión fueron inyectados en una nano-columna en fase reversa C-18 (Discovery® BIO Wide pore, Supelco, Bellefonte, PA) y analizados en un gradiente continuo desde 0 al 50% de acetonitrilo (95% acetonitrilo, 0,5% ácido acético) durante 45 minutos, seguido de otro gradiente continuo de acetonitrilo desde 50 al 90%, durante 1 minuto. Para eluir los tripéptidos de la nano-columna en fase reversa, la muestra se hizo pasar por una aguja emisora nano-spray PicoTip™ (New Objective, Woburn, MA) a un flujo de 300 nl/min. La ionización se produjo en tiempo real y la dispersión peptídica se realizó en una trampa iónica Esquire HCT (Bruker-Daltoniks, Bremen, Germany) seguido de una espectrometría de masas. Cada segundo, la instrumentación realizaba un escaneo completo el espectro de masas (MS/MS). Las condiciones de fragmentación fueron: una ventana de 3Da (precursor  $m/z \pm 1,5$ ), una fragmentación MS/MS con una amplitud de 0,90 V y una exclusión dinámica de 20 segundos. La cromatografía nano-líquida fue realizada automáticamente en un generador de nano-gradientes (Ultimate nano-HPLC, LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) acoplado a un colector de fracciones automático (Famos, LC Packings). El programa informático utilizado para controlar todo el proceso analítico fue Hystar 2.3.

Los espectros MS/MS fueron analizados usando el programa informático DataAnalysis 5.1 SR1 y BioTools 2.0. El resultado final de análisis se realizó comparando el análisis del espectro con las bases de datos de proteínas MSDB utilizando el programa Mascot software (Matrix Science, London, UK).

### **2.18. Análisis de datos.**

Los datos se expresaron como la media de la desviación estándar (DS). La significación estadística fue estimada mediante la prueba T de Student para observaciones no emparejadas. Los resultados fueron considerados significativos a  $P < 0.05$ . Los datos se analizaron por SPSS para Windows statistical package version 9.0.1.



*Resultados*

---

## **1. Expresión de Cav-1 en líneas celulares hepáticas y en cultivo primario de hepatocitos.**

La función de la caveolina y los mecanismos que regulan su expresión en el hígado carecen de una definición precisa. Inicialmente, en los análisis bioquímicos de membrana plasmática aislada de hígado de rata no se había considerado la presencia de Cav-1, porque se pensaba que las estructuras típicas caveolares estaban restringidas al tejido endotelial. Sin embargo, la presencia de las caveolas/caveolina en el hígado ha sido descrita por Northern y Western blot (Glenney 1992; Malaba, Smeland et al. 1995; Henley, Krueger et al. 1998). No obstante, los niveles de expresión de Cav-1 en el hepatocito son muy inferiores en comparación con los determinados en otros tipos celulares como las células endoteliales o los adipocitos (Calvo, Tebar et al. 2001) y además hay controversia acerca de su distribución subcelular (Oh, McIntosh et al. 1998; Shah, Toruner et al. 1999).

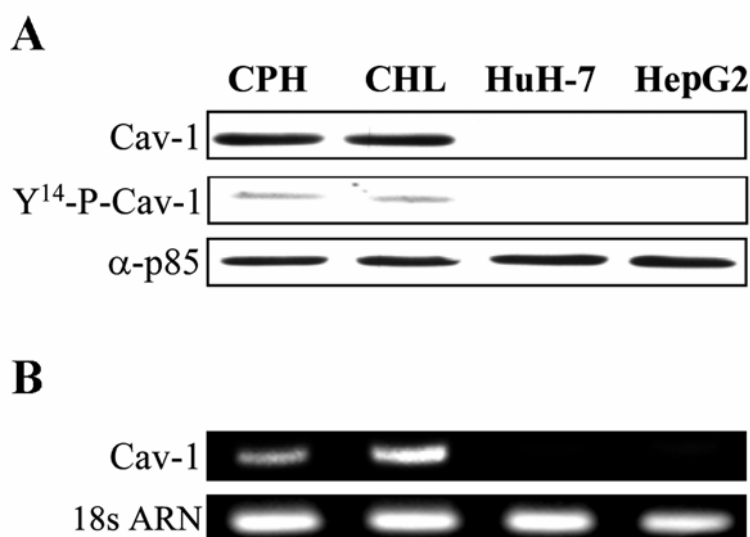
En la secuencia aminoacídica de Cav-1 hay una tirosina en la posición 14 (Y<sup>14</sup>) que se fosforila en respuesta a la estimulación por EGF e insulina, así como por estrés oxidativo (Volonte, Galbiati et al. 2001). Se ha propuesto que esta tirosina, cuando está fosforilada, actúa como sitio de anclaje para proteínas con dominios SH2/PTB y así se activan diferentes vías de proliferación (Lee, Woodman et al. 2001). Pero también se ha descrito que la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 (Y<sup>14</sup>-P-Cav-1) es responsable de la internalización de las caveolas y de la inhibición de vías de proliferación en células no adherentes (Del Pozo and Schwartz 2007).

Por lo tanto, no está del todo claro cual es la funcionalidad de la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1. Además no hay datos anteriores al desarrollo de esta tesis que describan el papel de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 en el hígado. Para intentar esclarecer estos hechos, decidimos evaluar la relevancia fisiológica que podía tener la expresión de la Cav-1 y la fosforilación de su Y<sup>14</sup> en líneas celulares humanas de hígado control (Chang Liver, CHL), líneas humanas de carcinoma hepatocelular (HuH-7 y HepG2) y células derivadas del cultivo primario de hepatocitos de ratón (CPH).



Al analizar por Western blot los niveles de expresión constitutivos de Cav-1 se observó que tanto el CPH, como la línea celular CHL, tienen niveles constitutivos de Cav-1, mientras que no se detectó expresión de Cav-1 en las líneas de carcinoma hepatocelular HuH-7 y HepG2 (Fig. 1A). Además, las líneas hepáticas que expresan Cav-1 muestran también una ligera expresión basal de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 (Fig.1B), que se pudo detectar por Western blot mediante el uso de un anticuerpo específico que sólo reconoce a Cav-1 cuando su Y<sup>14</sup> está fosforilada.

Debido a la elevada similitud de secuencia que existe entre los ARNm de la Cav-1 humana y la murina, diseñamos cebadores específicos que reconocían a Cav-1 en ambas especies. De acuerdo con los niveles proteicos, solo las células CPH y la línea celular CHL expresan el ARNm de Cav-1, mientras que en las líneas celulares HuH-7 y HepG2, no se detectó ARNm de Cav-1 (Fig. 1B).



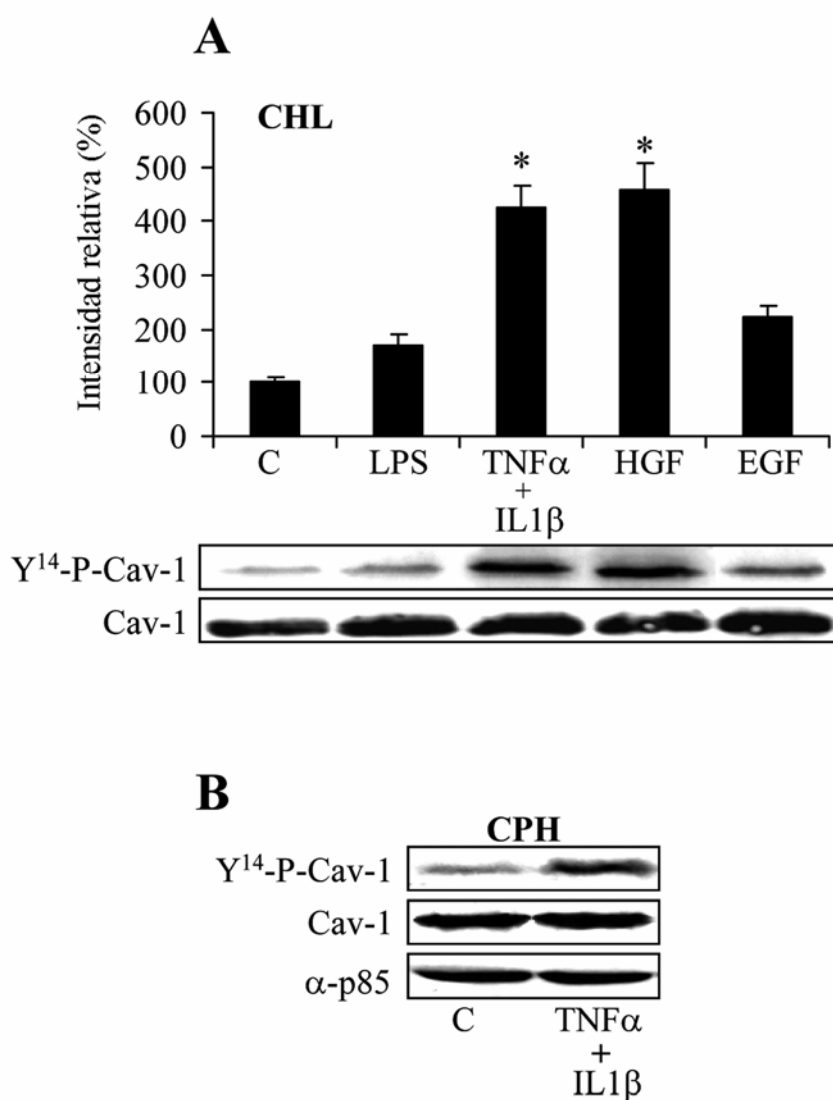
**Figura 1. Expresión de Cav-1 en células hepáticas.** (A) Determinación de los niveles proteicos de Cav-1 y de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 en extractos totales del cultivo primario de hepatocitos (CPH) y de las líneas celulares hepáticas CHL, HuH-7 y HepG2. Los Western blots fueron normalizados con αP85. (B) Análisis representativo de los niveles de ARNm de Cav-1 que se determinaron por PCR semicuantitativa. La expresión de ARNm se normalizó con los niveles de 18S ARNm. Los resultados son una muestra representativa de diferentes Western blots y PCRs, de cuatro experimentos independientes.

## **2. Las citoquinas y los factores de crecimiento inducen la fosforilación de Cav-1 en células hepáticas.**

Las citoquinas y los factores de crecimiento estimulan los procesos proliferativos que ocurren en el hígado (Michalopoulos and Khan 2005), además son capaces de inducir la fosforilación de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 en fibroblastos murinos (Kim, Wiepz et al. 2000; Volonte, Galbiati et al. 2001), por ello, analizamos los efectos que pudieran tener diferentes estímulos pro-inflamatorios, tales como TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  y LPS, y de factores de crecimiento, como HGF y EGF, sobre la fosforilación de Cav-1 en las líneas celulares hepáticas.

La línea celular CHL y el cultivo primario de hepatocitos, que expresa tanto el ARNm como la proteína de Cav-1 (Fig. 1AB) se estimularon durante una hora con 0,5  $\mu$ g/ml LPS, 20 ng/ml TNF- $\alpha$  con 20 ng/ml IL-1 $\beta$ , 20 ng/ml HGF y 20 ng/ml EGF.

De los diferentes estímulos utilizados, tanto TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  como HGF incrementaron de manera significativa la fosforilación de Y<sup>14</sup>-Cav-1 en la línea celular hepática CHL (Fig. 2A). Asimismo, cuando se estimularon las células del cultivo primario de hepatocitos de ratón con TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , se pudo observar un aumento similar en la fosforilación de la Y<sup>14</sup>-Cav-1 (Fig. 2B). En ambos casos, los niveles de Cav-1 se mantuvieron constantes y no se produjeron cambios en su expresión.

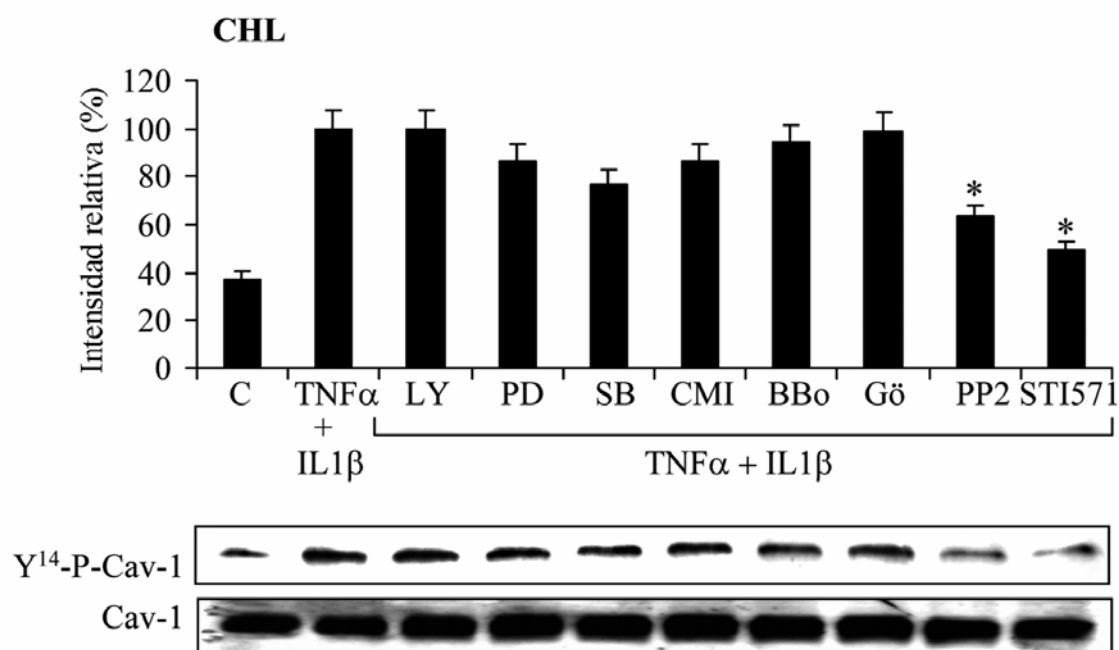


**Figura 2. Fosforilación de Cav-1 mediada por citoquinas y factores de crecimiento.** (A) Cuantificación en extractos celulares totales de los niveles de Cav-1 y de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 en células estimuladas con LPS, TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , HGF y EGF. Los Western blots fueron normalizados con la expresión de Cav-1. (B) Estimulación de los hepatocitos de cultivo primario con TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  durante 1 hora. 18 horas antes de realizar el experimento los CHPs se cultivaron con 2% de FCS. Los Western blots fueron normalizados con  $\alpha$ P85. Los resultados son una muestra representativa de diferentes Western blots y los datos son la media  $\pm$  D.E. de cinco experimentos independientes. \* $P < 0,01$  vs. el correspondiente valor control sin tratamiento.

### **3. Las quinasas c-Src y c-Abl están implicadas en la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 en células hepáticas.**

Para evaluar la contribución de las diferentes vías de señalización intracelular que podían estar implicadas en la fosforilación de Y<sup>14</sup>-Cav-1 mediada por TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , se utilizaron varios tipos de inhibidores específicos de quinasas que están implicadas en diferentes procesos intracelulares, tales como: PI3K (LY204002), MAPK, MEK/ERK (PD98059), p38 MAPK (SB202190), PKA (CMI), PKCs (Gö 6850 y Gö 6976), c-Src (PP2) y c-Abl (STI-571), los inhibidores se muestran entre paréntesis.

Como se muestra en la densitometría del Western blot de la Fig. 3, el pre-tratamiento de la línea CHL con inhibidores de quinasas en serina/treonina no tuvo influencia en los niveles de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 inducidos por TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ; sin embargo, cuando las células fueron pre-tratadas con los inhibidores de c-Src (PP2) o de c-Abl (STI-571) se produjo una inhibición significativa de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 inducida por TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ . Estos resultados están de acuerdo con diversos trabajos que implican a c-Src o a c-Abl en la fosforilación de Y<sup>14</sup>-Cav-1 (Lee, Volonte et al. 2000; Sanguinetti and Mastick 2003; Chen, Li et al. 2005).



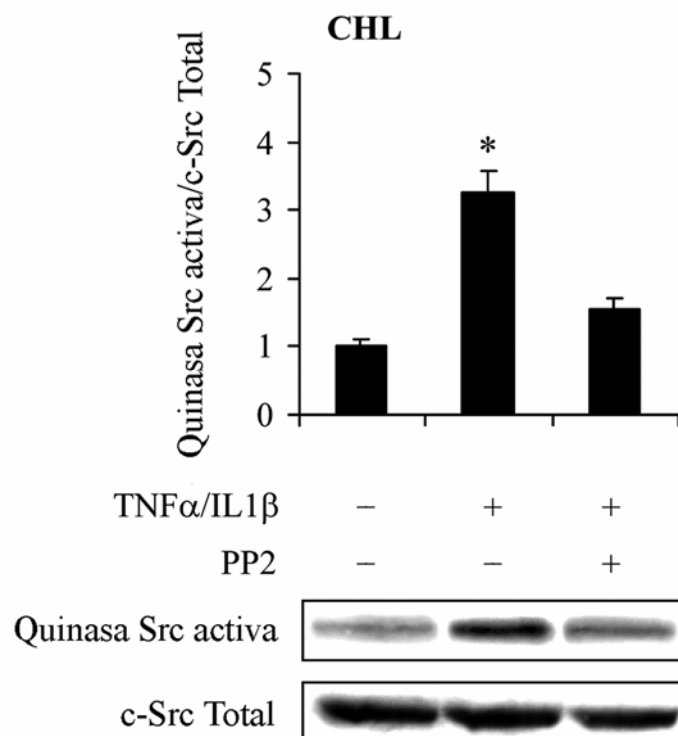
**Figura 3. Inhibición de las vías de señalización intracelular implicadas en la fosforilación de Y<sup>14</sup>-Cav-1.** Cuantificación de los extractos totales celulares de Cav-1 y de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1. La línea celular CHL fue tratada durante 1 hora con diferentes inhibidores: 20  $\mu$ M SB202190 (p38 MAPK), 20  $\mu$ M LY204002 (PI3K), 10  $\mu$ M PD98059 (MAPK/extracellular signal-regulated kinase, MEK/ERK), 0,4  $\mu$ M CMI (PKA), 1  $\mu$ M Gö 6850, 0,1  $\mu$ M Gö 6976 (PKC), 20  $\mu$ M PP2 (familia Src) y 20  $\mu$ M STI-571 (c-Abl) y después se estimuló con una combinación de 20 ng/ml TNF- $\alpha$  más 20 ng/ml IL-1 $\beta$  durante 1 hora. Los Western blots fueron normalizados con la expresión de Cav-1. Los resultados son una muestra representativa de diferentes Western blots y los datos son la media  $\pm$  D.E. de cinco experimentos independientes. \* $P < 0,01$  vs. el correspondiente valor control sin tratamiento.

#### **4. Los estímulos pro-inflamatorios aumentan la actividad de la tirosina quinasa c-Src en células hepáticas.**

La relación entre la fosforilación de Cav-1 y las quinasas en tirosina de la familia de Src quedó patente al transformar fibroblastos embrionarios con una forma oncogénica viral de Src (v-Src) y observar que la proteína que se fosforilaba en mayor proporción era Cav-1 (Glenney 1989). Cav-1 es capaz de interactuar con la forma celular de Src, a través de su dominio CSD (Schlegel and Lisanti M 2000) y el estrés celular induce la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 implicando a c-Src (Volonte, Galbiati et al. 2001). Además, se han co-purificado quinasas de la familia de c-Src y receptores con actividad quinasa junto con Cav-1 (Razani, Woodman et al. 2002). La Fig. 3 indica que dicha fosforilación se produce a través de dos quinasas, c-Src y c-Abl. Los resultados de los experimentos anteriores indicaban que la quinasa c-Src tiene un papel importante en la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 en las líneas celulares hepáticas.

Para saber si c-Src estaba implicada en la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1, la línea celular CHL fue estimulada con 20 ng/ml TNF- $\alpha$  y 20 ng/ml IL-1 $\beta$  durante 1 hora. Mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce a c-Src en su forma activa y un anticuerpo policlonal que reconoce a c-Src total, analizamos sus niveles por Western blot.

Las células CHL que se estimularon con citoquinas pro-inflamatorias mostraron un incremento significativo en la quinasa c-Src activa. Sin embargo, cuando las células fueron preincubadas con el inhibidor PP2 antes de ser estimuladas, no se produjo ningún aumento en la cantidad de la c-Src activa. Además, la cantidad total de c-Src no varió en ninguna de las condiciones experimentales.



**Figura 4. Activación de c-Src mediante estímulos pro-inflamatorios.** Cuantificación de los niveles de c-Src activa y de c-Src total en los extractos totales de células CHL estimuladas y sin estimular con una combinación de TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  durante 1 hora, y presencia o ausencia de 50  $\mu$ M PP2. Los resultados muestran un Western blot representativo y los datos son la media  $\pm$  D.E. de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,05$  vs. el correspondiente valor control sin tratamiento.

## **5. Translocación de Cav-1 desde la fracción caveolar a la fracción no caveolar inducida por citoquinas y los factores de crecimiento.**

Las caveolas se pueden purificar utilizando sus propiedades físico-químicas que hacen que sean insolubles en Tritón-X 100 a 4°C, mediante gradientes discontinuos de sacarosa (5-30-40%). De este tipo de gradiente se pueden obtener tres fases, una fracción enriquecida en caveolas/caveolina (FEC), una interfase (INF) y una fracción no caveolar (FNC) donde se concentran la mayoría de las proteínas celulares.

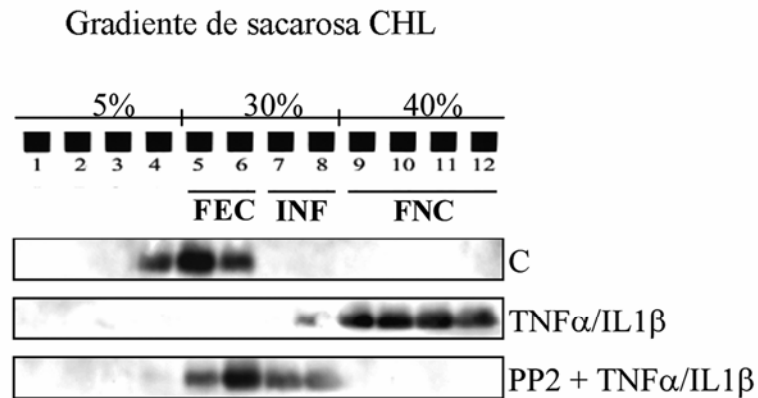
Varios trabajos han identificado a la caveolina en las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Asimismo, se ha descrito que en respuesta a estrés oxidativo la Cav-1 que forma las caveolas es internalizada hacia la zona perinuclear y que en ese estado la Y<sup>14</sup> de Cav-1 se encuentra fosforilada y por lo tanto es capaz de servir como sitio de anclaje para otro tipo de vías de señalización. También se ha descrito que se acumula en los cuerpos lipídicos (Pol, Martin et al. 2004) y que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación de la Y<sup>14</sup>-Cav-1 (Del Pozo and Schwartz 2007).

Con estos precedentes decidimos analizar la implicación que puede tener la fosforilación de la Y<sup>14</sup>-Cav-1 en la distribución subcelular de la Cav-1. Para ello realizamos una purificación de caveolas/caveolina mediante un gradiente discontinuo de sacarosa en la línea celular CHL tratada con o sin 50 µM PP2 durante 1 hora y después se estimularon con 20 ng/ml TNF-α y 20 ng/ml IL-1β durante 1 hora.

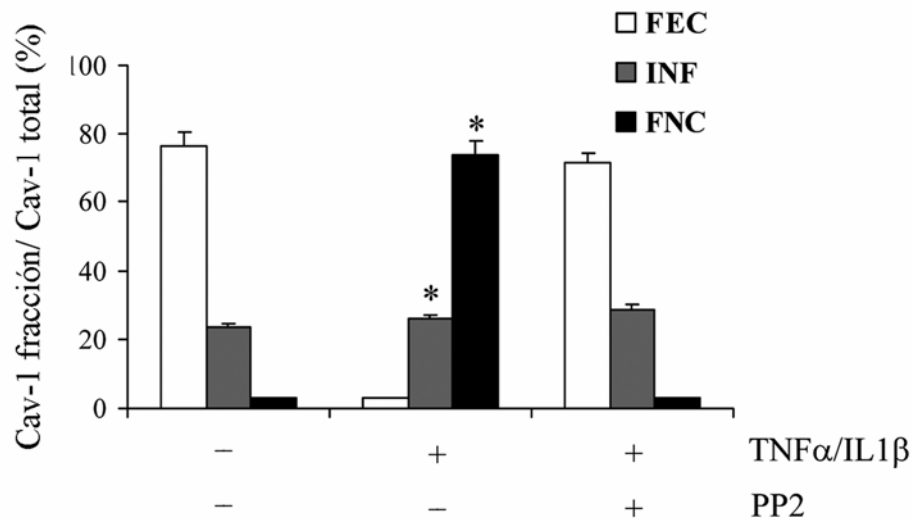
En las células estimuladas con TNF-α/IL-1β, tuvo lugar una redistribución de la Cav-1 desde la fracción enriquecida en caveolas a la fracción no caveolar del gradiente (Fig. 5A). Sin embargo, si antes de estimular las células se pre-tratan una hora con el inhibidor PP2, se impide dicha translocación a la FNC y la Cav-1 se localiza en la FEC. Estos resultados indican que la internalización de la Cav-1 requiere la fosforilación en Y<sup>14</sup>. En la Fig. 5B se puede observar la distribución porcentual de toda la Cav-1 del gradiente en las diferentes fracciones, durante las distintas fases de estimulación o inhibición.



A



B



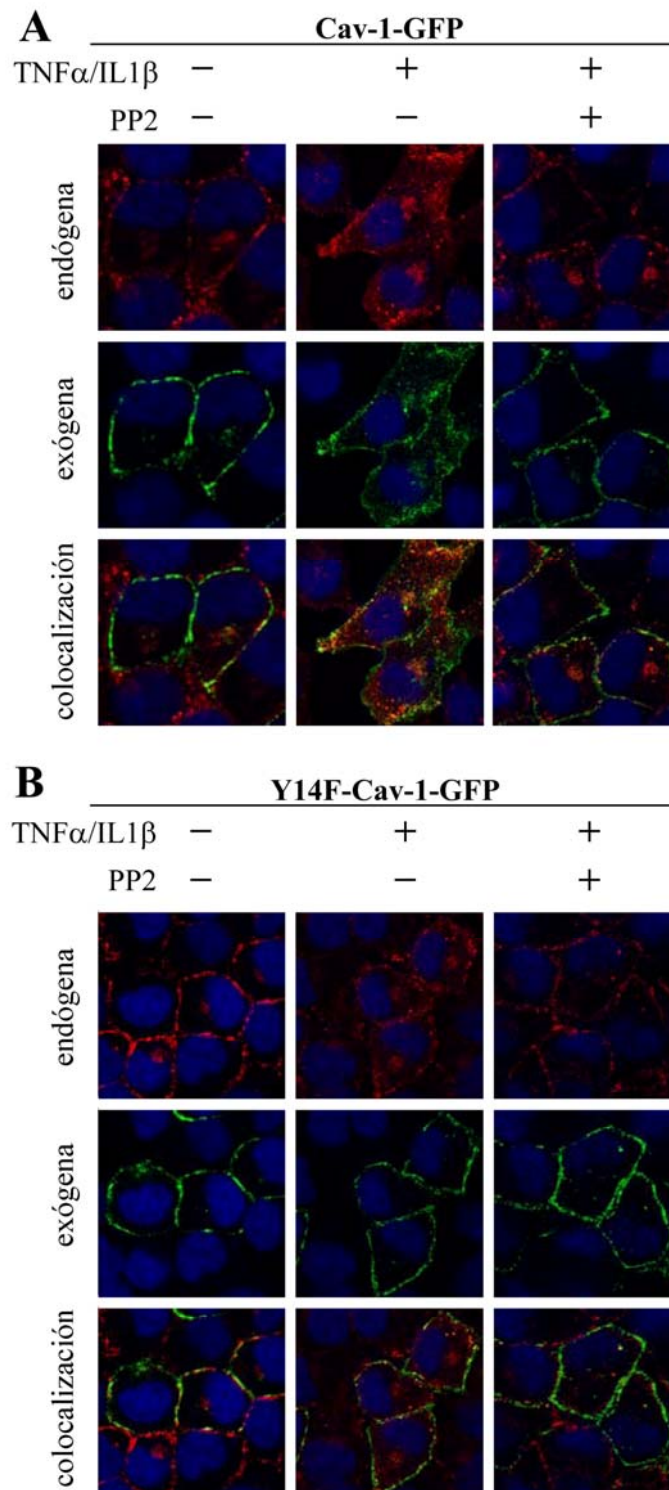
**Figura 5. Translocación de la Cav-1 desde la fracción caveolar a la fracción no caveolar después de la estimulación con citoquinas.** (A) Aislamiento y Western blot de Cav-1 en la fracción enriquecida en caveolina mediante un gradiente discontinuo de sacarosa. La línea celular CHL fue tratada con PP2 durante 1 hora y después se estimuló con TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  durante 1 hora. (B) Cuantificación del análisis densitométrico de la cantidad porcentual de Cav-1 que hay en cada fracción del gradiente. Los datos son expresados como los niveles de Cav-1 en cada fracción referidos a la intensidad total de Cav-1 en cada gradiente y son la media  $\pm$  D.E. de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran un gradiente de sacarosa representativo. \* $P < 0,01$  vs. el correspondiente valor control sin tratamiento.

## **6. La mutación puntual “Y14F” impide la internalización de la Cav-1.**

Los resultados obtenidos indican que los estímulos pro-inflamatorios y los factores de crecimiento inducen la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 a través de la acción de la tirosina quinasa c-*Src*, y que esta fosforilación permite un cambio en la localización de la caveolina, que se transloca desde la FEC a la FNC.

Para ratificar esta última afirmación e investigar más a fondo la función de la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 en la vía de señalización iniciada por estímulos pro-inflamatorios, realizamos transfecciones transitorias en la línea celular CHL con los vectores de expresión de proteínas de fusión para Cav-1-GFP y una construcción mutada en la Y<sup>14</sup> que no es fosforilable, denominada Y14F-Cav-1-GFP.

En las células que fueron transfectadas con el vector de expresión Cav-1-GFP, tanto la Cav-1 endógena (mostrada en rojo) como la exógena (mostrada en verde) colocalizan en la membrana plasmática (Fig. 6A). Pero después de la estimulación con TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , tanto Cav-1 endógena como Cav-1-GFP se encontraron asociadas a compartimentos intracelulares. Este movimiento de la Cav-1 se inhibió al tratar las células con PP2, y la Cav-1 exógena y la endógena permanecieron en la membrana plasmática. Cuando las células se transfectaron con la construcción no fosforilable, Y14F-Cav-1-GFP, solo la Cav-1 endógena se detectó en los compartimentos intracelulares de células estimuladas con TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , mientras que no se produjo la redistribución de la Y14F-Cav-1-GFP (Fig. 6B). Estos resultados indican que la fosforilación y redistribución de Cav-1 son eventos importantes en las vías de señalización que tienen lugar después del tratamiento de las células con estímulos pro-inflamatorios, y de nuevo, la Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 es importante para la localización subcelular de la Cav-1.



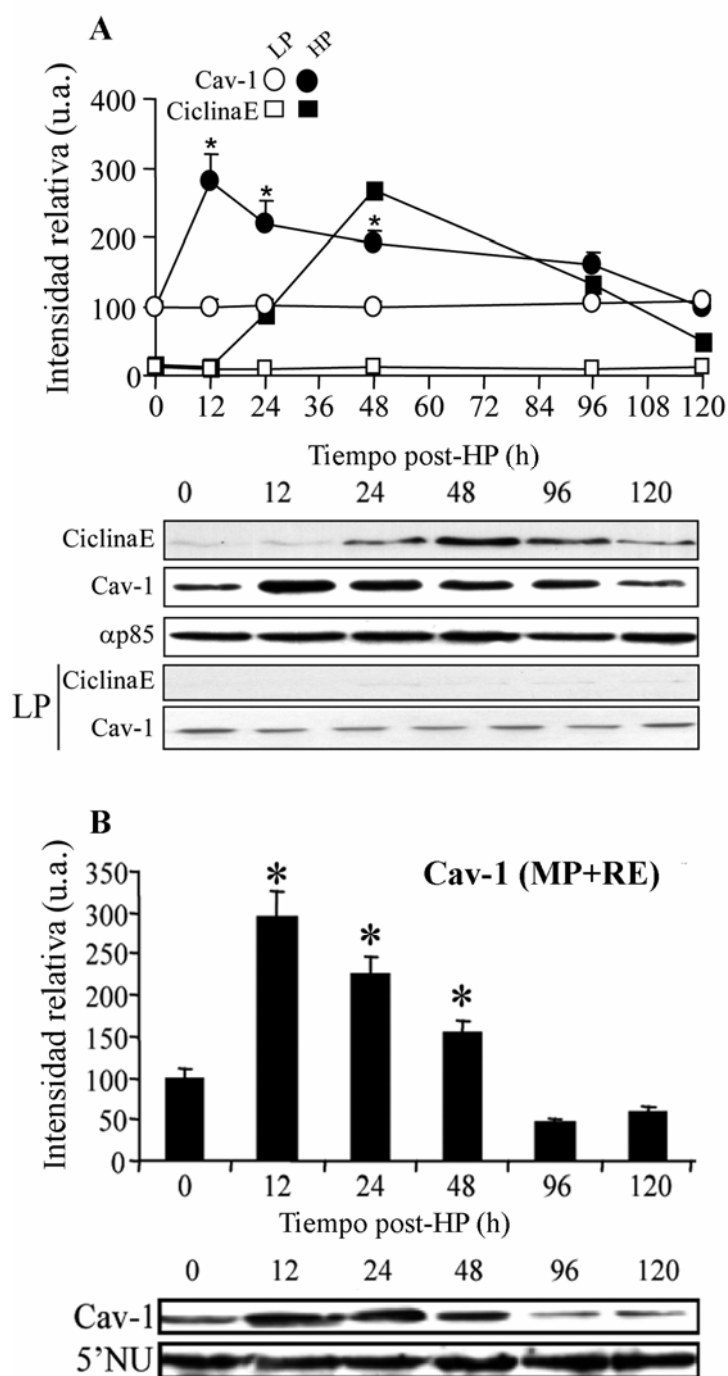
**Figura 6.** Localización de la Cav-1 en CHL transfectadas con las construcciones Cav-1-GFP ó Y14F-Cav-1-GFP después de la estimulación con citoquinas. Inmunocitofluorescencia de la expresión y distribución de Cav-1-GFP (A) ó Y14F-Cav-1-GFP (B). La Cav-1 endógena fue marcada en rojo, Cav-1-GFP e Y14F-Cav-1-GFP en verde y los núcleos fueron marcados en azul con Hoechst 33258.

## **7. Cav-1 incrementa en el hígado regenerante después de una hepatectomía parcial.**

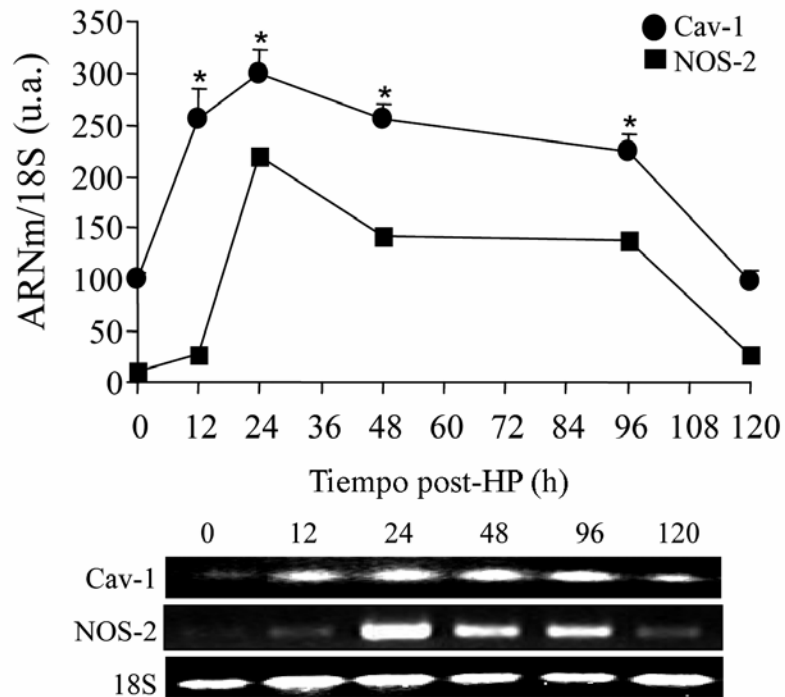
Una vez establecido que en las líneas celulares hepáticas y en el cultivo primario de hepatocitos los estímulos pro-inflamatorios y los factores de crecimiento regulan la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1, decidimos analizar esta regulación en un modelo de proliferación hepática *in vivo* como el de la regeneración que se produce después de una hepatectomía parcial del 70%.

Analizamos los niveles totales de Cav-1 y de ciclina-E (como marcador del proceso de regeneración) en el hígado de ratones controles, sometidos a laparotomía y hepatectomizados. Como muestra la Fig. 7A, a las 12-24 horas después de la HP, Cav-1 incrementó 2,8 veces en extractos proteicos totales de hígado y 3 veces en las fracciones microsomales (Fig. 7B), regresando a los valores controles a los 5 días. En la fracción soluble no se detectó Cav-1 (datos no mostrados). Los niveles máximos de ciclina E se produjeron a las 48 horas posteriores a la HP, datos que están en concordancia con los resultados de Casado y colaboradores (Casado, Callejas et al. 2001).

Como se muestra en la Fig. 8, el análisis por PCR confirmó un aumento de los niveles de ARNm de Cav-1 en el hígado remanente. Asimismo, los niveles de ARNm de NOS-2, usados como control adicional del proceso de regeneración, incrementaron de manera transitoria después de la HP con una expresión máxima a las 24 horas. En los animales sometidos a laparotomía no se apreciaron cambios (datos no mostrados).



**Figura 7. Incremento de Cav-1 en el hígado regenerante después de HP.** (A). Western blots representativos de Cav-1 y Ciclina-E en extractos totales de hígado de ratones hepatectomizados y de ratones sometidos a laparotomía (LP). (B). Western blot de Cav-1 en la fracción de membrana (MP: membrana plasmática; RE: retículo endoplásmico). Los datos son la media  $\pm$  D.E. de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,01$  vs. el valor correspondiente a tiempo 0. Los Western blots de extractos totales fueron normalizados con  $\alpha$ P85 y los de membrana plasmática con 5' nucleotidasa (5'NU).



**Figura 8. Niveles de Cav-1 en el hígado regenerante.** Análisis representativo de los niveles de ARNm de Cav-1 y NOS-2 que se determinaron por PCR semicuantitativa. Las concentraciones de ARNm fueron normalizadas con los niveles de 18S ARNm. Los datos son representados como la media  $\pm$  D.E. de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,01$  vs. el valor correspondiente a tiempo 0.

## **8. Cav-1 se transloca de la fracción caveolar a la fracción no caveolar durante el proceso de regeneración hepática.**

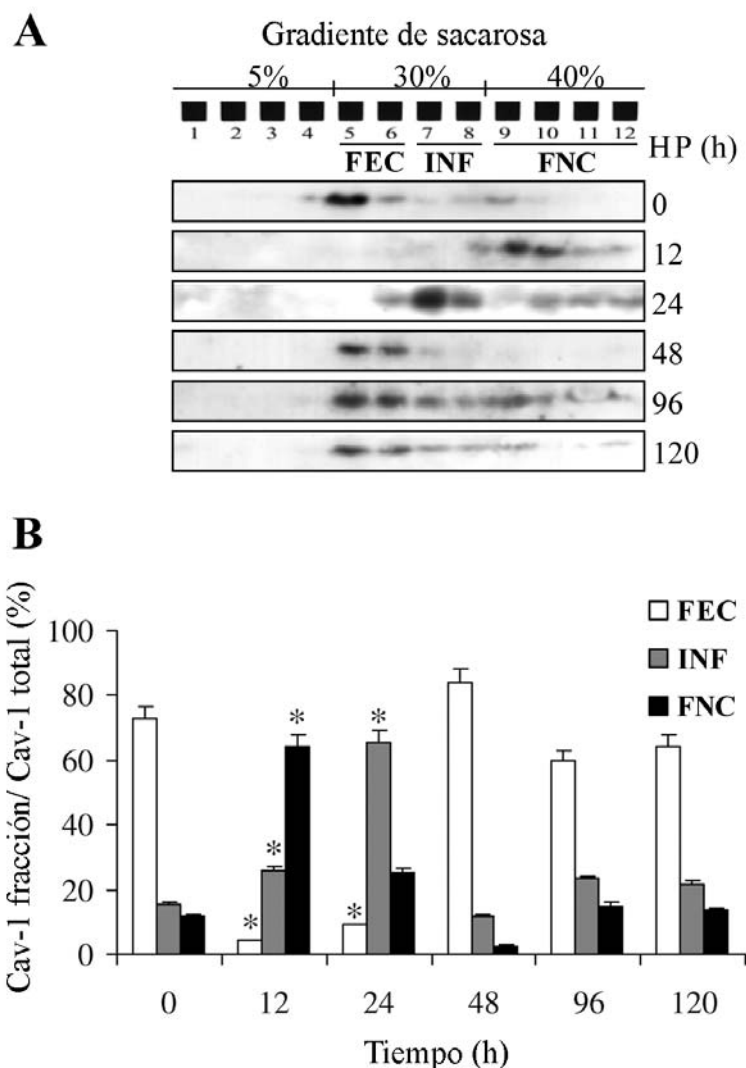
Una vez establecido que los niveles de Cav-1 se incrementaban en el hígado regenerante, analizamos la distribución de la caveolina en un gradiente discontinuo de sacarosa (5:30:40), de manera similar al gradiente realizado en la línea celular CHL que se muestra en la Fig. 5A.

A las 12 horas después de la HP se detectó una redistribución significativa de la Cav-1 desde las fracciones de membrana plasmática enriquecidas en caveolina (FEC, fracciones 5-6) del hígado control (0 horas) a las fracciones 9-12 que corresponden a la fracción no caveolar (FNC), y a la interfase (INF, fracciones 7-8) (Fig. 9A).

Cuando el proceso regenerativo había finalizado (120 horas) la Cav-1 se relocalizó en la FEC, de manera similar a la situación control. La Fig. 9B muestra la distribución porcentual de la Cav-1 que hay en cada fracción del gradiente, en relación a la Cav-1 total que hay en los diferentes tiempos de HP.

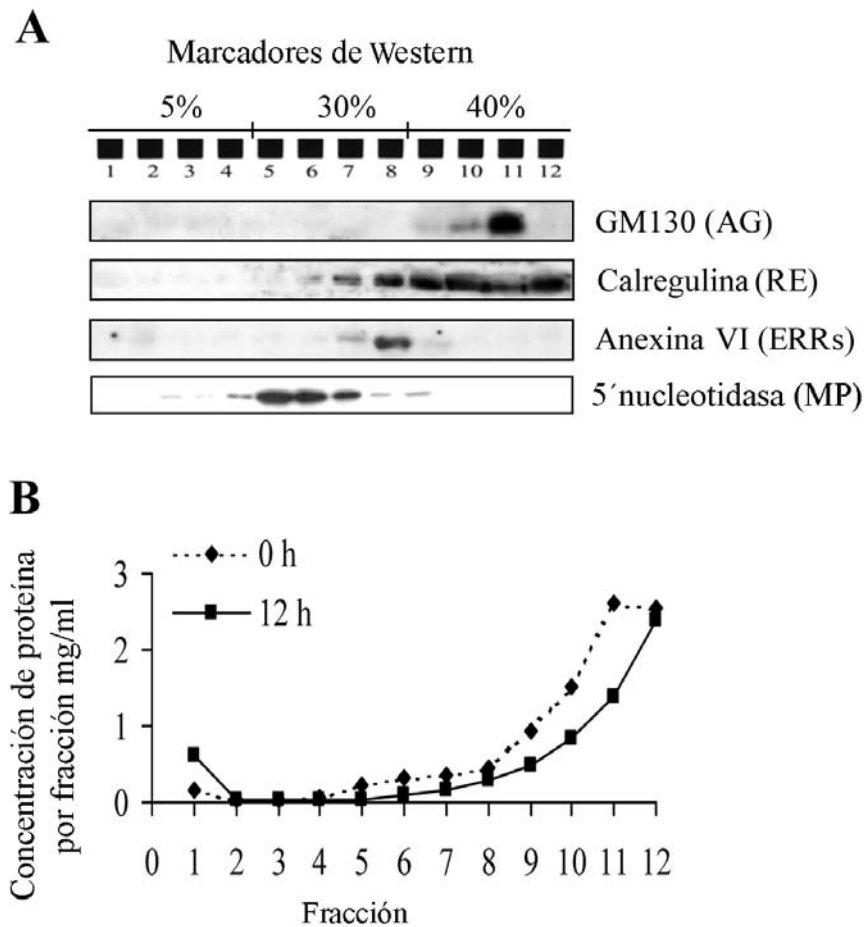
Para determinar la naturaleza subcelular a la que pertenecen cada una de las fracciones que se obtienen mediante un gradiente discontinuo de sacarosa y poder establecer donde se acumula Cav-1 después de HP, utilizamos marcadores específicos de aparato de Golgi (GM130, “Golgi Matrix 130kda), de retículo endoplásmico (calregulina o calreticulina), de endosomas de reciclaje de receptores (anexina VI) y de membrana plasmática (5´nucleotidasa o CD73).

Como se puede observar en la Fig. 10A, las fracciones 9 a 12, donde Cav-1 se localizó a las 12 horas después de HP, corresponden principalmente a retículo endoplásmico y a aparato de Golgi, indicando la internalización de la Cav-1 asociada a las membranas de estos orgánulos celulares. Tanto en la etapa inicial como en las etapas tardías, Cav-1 vuelve a localizarse en la FEC, como indica el marcador de membrana plasmática 5´nucleotidasa. La concentración de proteína de las fracciones del gradiente de sacarosa no varió en los diferentes tiempos de HP, como muestra la cuantificación relativa de los niveles de proteína (Fig. 10B).



**Figura 9. Movimiento de Cav-1 durante el proceso de la regeneración hepática.** (A) Análisis por Western blot de la distribución de Cav-1 en gradientes discontinuos de sacarosa. (B) Cuantificación de la distribución de los niveles proteicos de Cav-1. La cuantificación corresponde a los niveles de Cav-1 de cada fracción respecto de la Cav-1 total. FEC es la Fracción Enriquecida en Cav-1; INF corresponde a la Interfase; FNC es la Fracción No Caveolar, principalmente membrana plasmática (MP) y retículo endoplásmico (RE). Los datos son representados como la media  $\pm$  D.E. de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran un Western blot representativo del gradiente de sacarosa. \* $P < 0,01$  y # $P < 0,05$  vs. el valor correspondiente a tiempo 0.



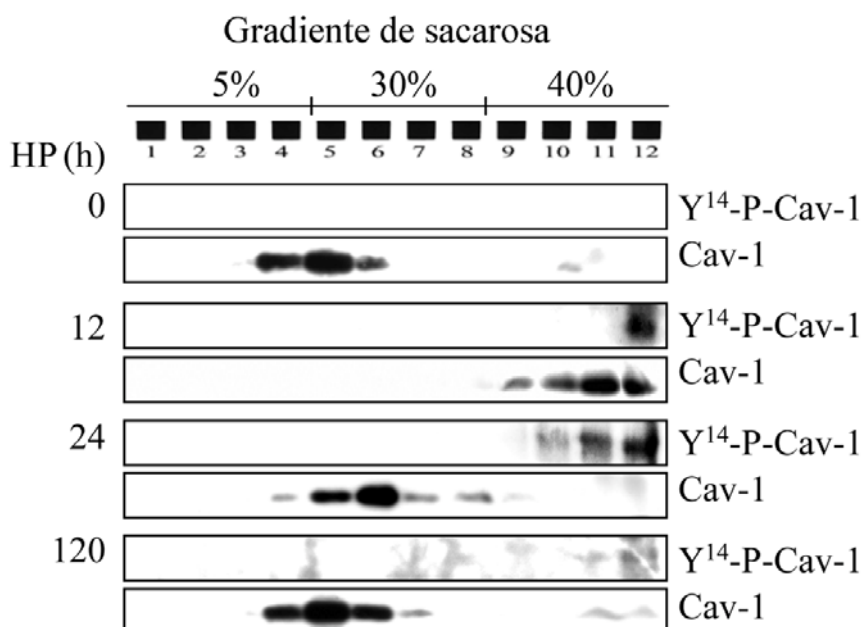


**Figura 10. Marcadores de Western blot de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa.** (A) Western blot representativo de la distribución de los diferentes marcadores en las fracciones del gradiente: GM130 para el aparato de Golgi (AG), calregulina para el retículo endoplasmático (RE), anexina VI para los endosomas de reciclaje de receptores (ERRs) y 5' nucleotidasa para la membrana plasmática (MP). (B) Concentración total de proteína en las diferentes fracciones de los gradientes de 0 y 12 horas después de HP.

### 9. Cav-1 se fosforila en Y<sup>14</sup> después de HP.

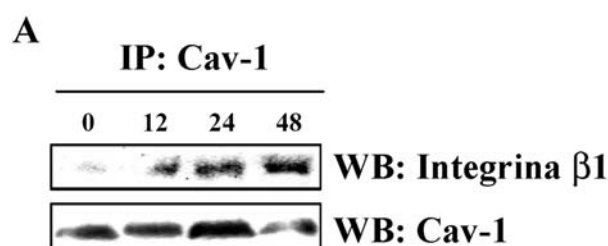
Los resultados obtenidos en las líneas celulares hepáticas, en referencia a la internalización de la Cav-1, indican que la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 es necesaria para esta redistribución, por ello analizamos cual era el estado de la Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 en los gradientes realizados con los extractos de los hígados a diferentes tiempos de regeneración.

Mediante Western blot se detectó una cantidad significativa de Cav-1 que estaba fosforilada a las 12-24 horas después de HP (Fig. 11) y esta fosfoproteína, se localizó en la fracción no caveolar. Cinco días después de la HP no se detectó Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 y la Cav-1 se localizaba en la fracción enriquecida en caveolas del gradiente de sacarosa.

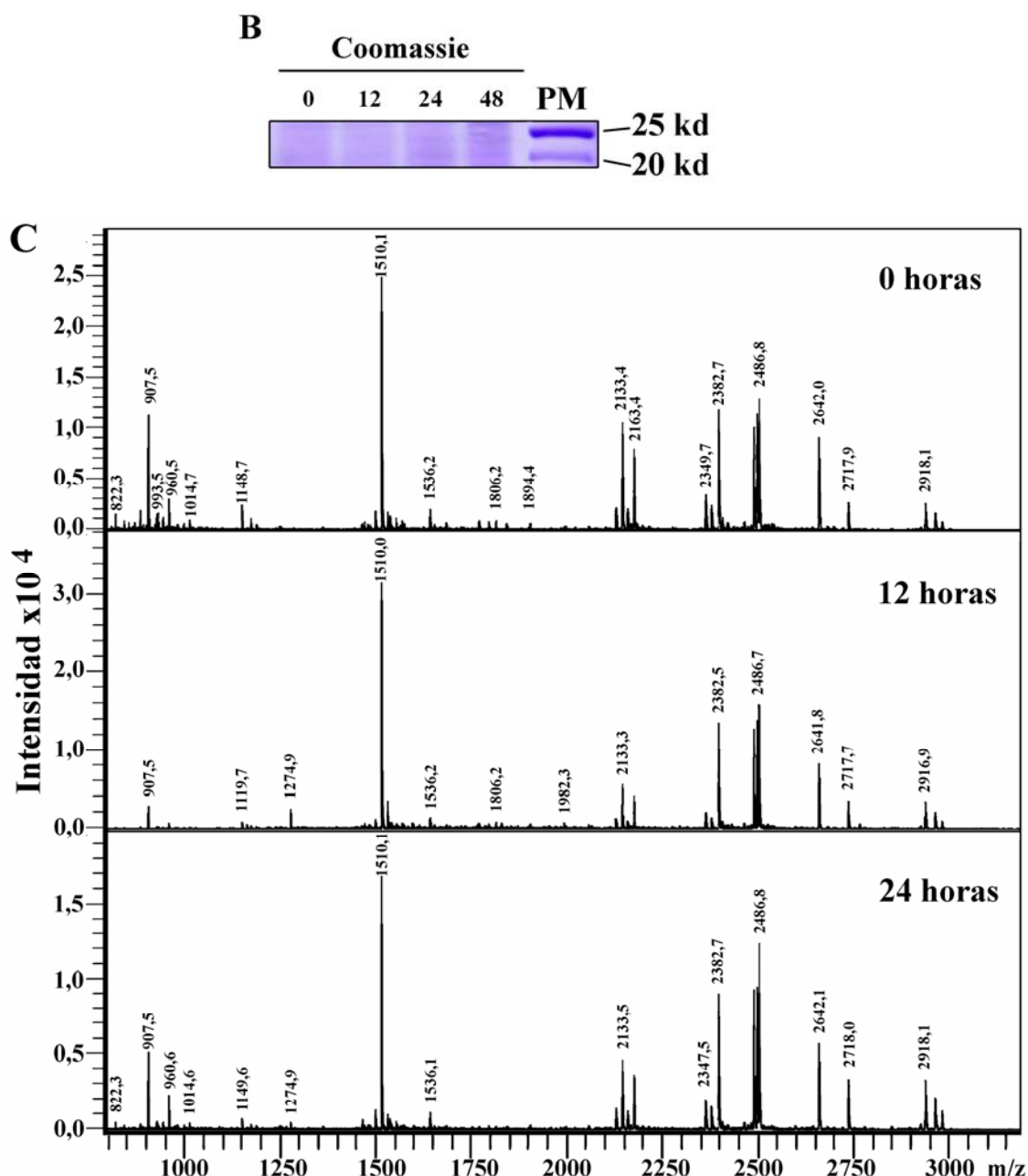


**Figura 11.** Cav-1 se fosforila e internaliza en el hígado regenerante después de HP. Análisis por Western blot de la distribución de Cav-1 y de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 en gradientes discontinuos de sacarosa. Los resultados muestran un Western blot representativo del gradiente de sacarosa para cada tiempo de regeneración.

Para determinar si existían diferencias cuantitativas en la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 a los diferentes tiempos de la HP, se realizaron inmunoprecipitaciones (IPs) de Cav-1 con los extractos de proteína total de 0, 12, 24 y 48 horas después de HP. El resultado de la IP fue separado electroforéticamente en dos geles de acrilamida, con uno de ellos realizó un Western blot frente a Cav-1, y como control de la IP se realizó un Western blot frente a la integrina-β1, que se ha descrito que colocaliza con caveolas (Echarri and Del Pozo 2006; Radcliff, Carlisle-Klusacek et al. 2007). En concordancia con datos anteriores, la expresión de Cav-1 aumenta a las 12-24 horas después de HP. Además cuando se realizó un Western blot frente a la integrina-β1 se pudo observar un aumento de la co-inmunoprecipitación de la integrina-β1 con Cav-1 (Fig. 12A). El otro gel de acrilamida se tiñó con la técnica de Coomassie y se procesó una zona del gel cercana al peso molecular de la Cav-1 (22 kd) que sería utilizada para realizar una cromatografía nano-líquida (C-nL) y un análisis posterior mediante trampa iónica y espectrometría de masas. No se observó ningún cambio significativo en la cromatografía de masas, comparando los datos de 0, 12 y 24 horas (Fig. 12 B y C).



**Figura 12 A. Cuantificación de la Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 por espectrometría de masas en el hígado regenerante después de HP. (A) Inmunoprecipitación de Cav-1 y Western blot de integrina-β1. La inmunoprecipitación se reveló, a su vez, con Cav-1. Los resultados son una muestra representativa de tres IPs independientes para cada extracto.**

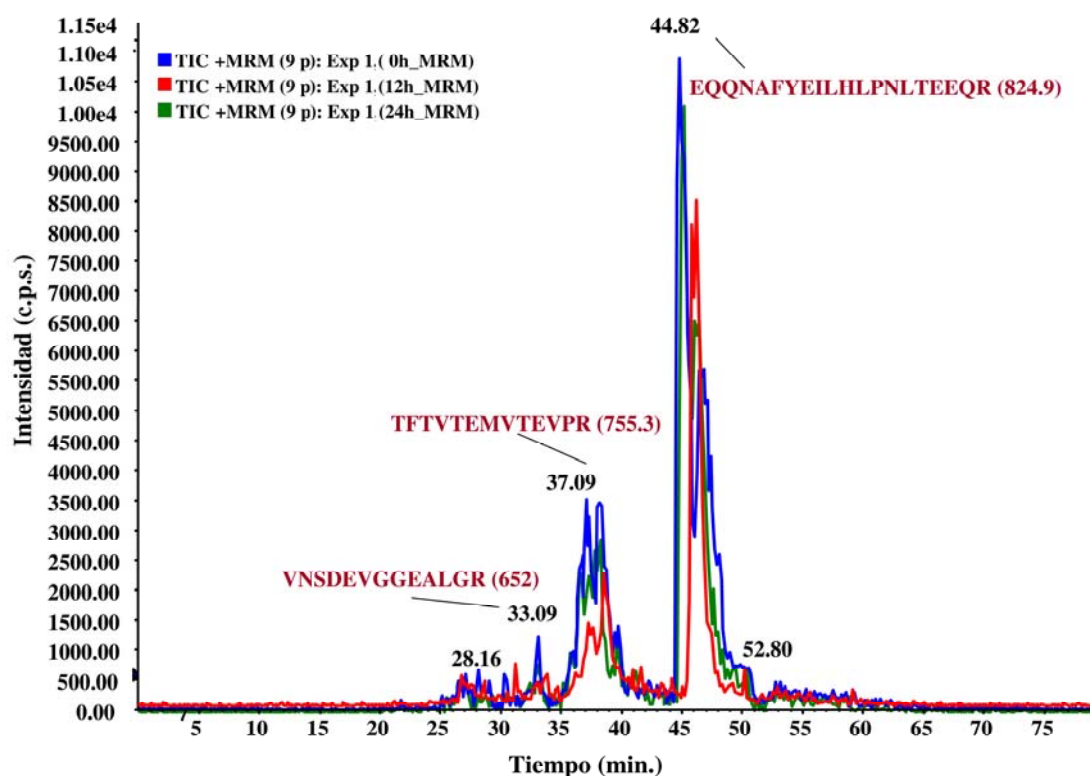


*Figura 12 B y C. Cuantificación de la  $Y^{14}$ -P-Cav-1 por espectrometría de masas de en el hígado regenerante después de HP. (B) Coomassie del gel de acrilamida en el que se separó electroforéticamente el resultado de la IP. Solo se muestra el área del peso molecular de Cav-1 que sería digerido para utilizarlo en la cromatografía-nL y espectrometría de masas. (C) Análisis por espectrometría de masas del resultado de la IP en los extractos totales de 0, 12 y 24 horas después de HP. Los resultados mostrados en Coomassie y la espectrometría de masas son una muestra representativa de tres IPs independientes para cada extracto.*

Posteriormente, para intentar identificar aquellas proteínas que estaban inmunoprecipitando con Cav-1, realizamos una cromatografía-nL seguida de trampa iónica y espectrometría de masas, con la muestra completa del resultado de la IP de los extractos totales de proteína a 0, 12 y 24 horas después de HP. La Cav-1 se utilizó como control interno de la IP, por ello se calcularon las masas relativas de los fragmentos del péptido de Cav-1, teniendo en cuenta la fosforilación teórica (detallada en azul) de las diferentes tirosinas que hay en su secuencia aminoacídica (Tabla 2). Los fragmentos que fueron detectados en la trampa iónica mayoritariamente, no correspondían a las secuencias de la Cav-1, que no pudo ser detectada, y pertenecían a las secuencias de las inmunoglobulinas recombinantes utilizadas en la inmunoprecipitación, IgA e IgG, además se identificaron diferentes proteínas que se encontraban en el inmunoprecipitado de Cav-1 y que se detallan en la tabla 3.

**TABLA 2**

<b>+MRM</b>	<b>PEPTIDO (Secuencia proteica de Cav-1)</b>
<b>654.8</b>	<b>SFLIEIQCISR (2+)</b>
<b>551.8</b>	<b>ASFTTFTVTK (2+)</b>
<b>824.9</b>	<b>YVDSEGHLTYVPIR</b>
<b>864.9</b>	<b>Y<sup>P</sup>VDSEGHLTYVPIR / YVDSEGHL<sup>P</sup>TYVPIR (2+)</b>
<b>904.8</b>	<b>Y<sup>P</sup>VDSEGHL<sup>P</sup>TYVPIR (2+)</b>
<b>652.8</b>	<b>EQGNIYKPNNK (2+)</b>
<b>692.8</b>	<b>EQGNI<sup>P</sup>YKPNNK (2+)</b>
<b>755.3</b>	<b>Péptido de doble carga.</b>



**Figura 13.** Cromatografía-nL de las proteínas que inmunoprecipitan con Cav-1 en el hígado regenerante después de HP. Análisis de los fragmentos proteicos digeridos en las muestras de las IPs de los extractos totales de 0, 12 y 24 horas después de HP. En el gráfico se representa la intensidad vs. tiempo de la cromatografía-nL y posterior espectrometría de masas y muestra los valores de los péptidos mayoritarios de cada inmunoprecipitado. El resultado muestra una gráfica representativa de tres IPs independientes para cada extracto.

TABLA 3

<b>Proteínas detectadas por la LC-3D-trampa iónica en la muestra de 12 horas</b>
Precursor de la proteína A - <i>Staphylococcus aureus</i>
Proteína de unión-IgG - <i>Streptococcus</i> sp. (Grupo G)
Proteína G tipo 7, dominio $\beta 2$ - <i>Streptococcus</i> sp.
Carbamoil-fosfato sintasa
Cadenas pesada y ligera de la $\beta$ -hemoglobina
Precursor de la albúmina del suero
Fragmento fab-igg1 unido a proteína G
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).
Arginino succinato sintasa
Acetil-CoA aciltransferasa 2 (3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial)
Cadena $\alpha$ -hemoglobina y $\delta$ -hemoglobina
Metiltransferasa-N-Glicina
Lectina hepática
Vinculina (Metavinculina)
Proteína asociada al factor de necrosis tumoral tipo 1 (TRAP1)
Conexina
Carbonato deshidratasa

**Tabla 3. Proteínas detectadas por la trampa iónica a las 12 horas después de una HP.** En azul se detallan las proteínas recombinantes del complejo de Inmunoglobulinas utilizado para la IP. En rojo se detallan las proteínas detectadas en el resultado completo de la inmunoprecipitación.

Las diferencias existentes entre los resultados obtenidos en el Western blot y en la cromatografía-nL se pueden explicar por el límite de detección de ambas técnicas. Mediante la técnica de Western blot obtenemos una amplificación de la señal, y el límite de detección varía dependiendo de la cantidad inicial de proteína y del sustrato quimioluminiscente empleado. La utilización de sustratos quimioluminiscentes específicos, como el Femto-signal (Pierce, 34095) permite detectar de  $10^{-15}$  a  $10^{-20}$  g de proteína. Como ejemplo, el límite de detección por el método de tinción con Coomassie es de 0,3 a 1  $\mu$ g de proteína (Ausubel, Brent et al. 1997). La trampa iónica no es un método de amplificación de la señal, este sistema identifica cada partícula proteica por

separado que exista en una muestra, en nuestro caso esto es una limitación, porque la cantidad de Cav-1 que se fosforila en Y<sup>14</sup> suele ser inferior al 1% del total (del Pozo, Balasubramanian et al. 2005). Además, la expresión de caveolina es significativamente inferior en el hígado que en el tejido adiposo o en el tejido endotelial. Aun así, una de las moléculas detectadas por la trampa iónica, la proteína asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAP1), está relacionada con Cav-1 (Im, Lee et al. 2007). El trabajo de Calvo y colaboradores analizó la naturaleza bioquímica de la fracción de membrana plasmática enriquecida en caveolina en el hígado de rata por electroforesis bidimensional (Calvo and Enrich 2000). Este análisis supone otra limitación técnica, porque el aislamiento en rata de fracciones enriquecidas en caveolas se realizó con 10-20 g de hígado, mientras que la cantidad de hígado remanente utilizada en los diferentes extractos o aislamientos en los ratones sometidos a HP, no supera, en alguno de los casos, los 50 mg de tejido.

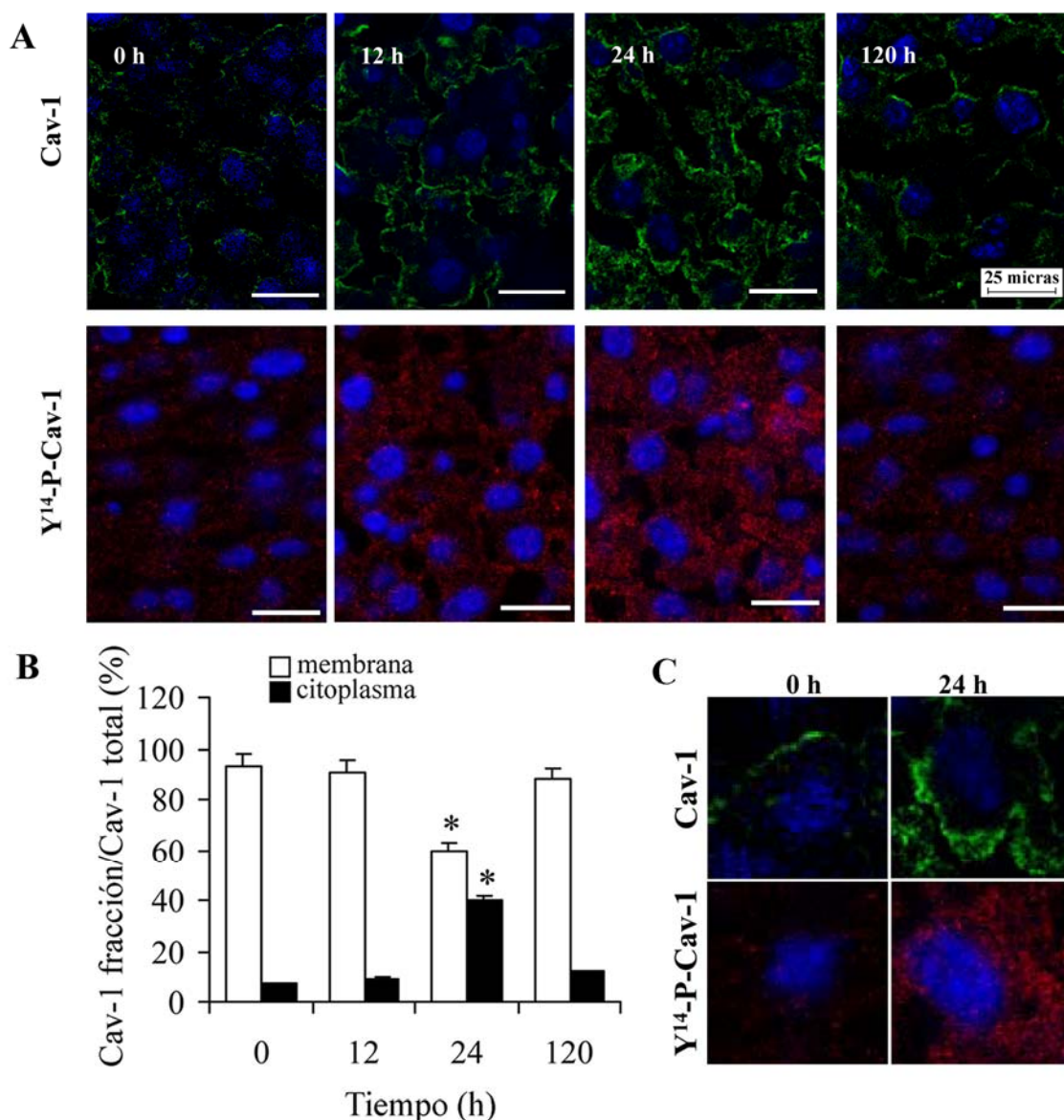
#### **10. La Cav-1 internalizada después de la HP está fosforilada en Y<sup>14</sup>.**

El análisis por Western blot de los gradientes indica que la Cav-1 que está fosforilada se encuentra en las fracciones no caveolares (Fig. 11). Para confirmar la distribución subcelular de Cav-1 en el hígado regenerante, se analizaron por microscopía confocal secciones fijadas de hígado remanente, a las 0, 12, 24 y 120 horas.

La tinción de Cav-1 en las secciones de hígado control (0 horas) se localizó principalmente en la membrana plasmática (Fig. 14A); sin embargo, después de 12 a 24 horas tras HP se produjo un aumento en la intensidad de fluorescencia de Cav-1 y una tinción significativa del citoplasma, por lo tanto, de dominios intracelulares. La Fig. 14B muestra la cuantificación de la fluorescencia de Cav-1, diferenciando entre la fluorescencia de la membrana plasmática y la fluorescencia del citosol.

La localización subcelular de Cav-1 y de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 se muestra con mayor aumento en la Fig. 14C, donde se puede observar que la proteína estaba defosforilada a las 0 horas; sin embargo a las 12-24 horas se produjo un incremento significativo en la tinción de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 que corresponde a los dominios intracelulares. La tinción regresó a la situación inicial a los 5 días después de HP.

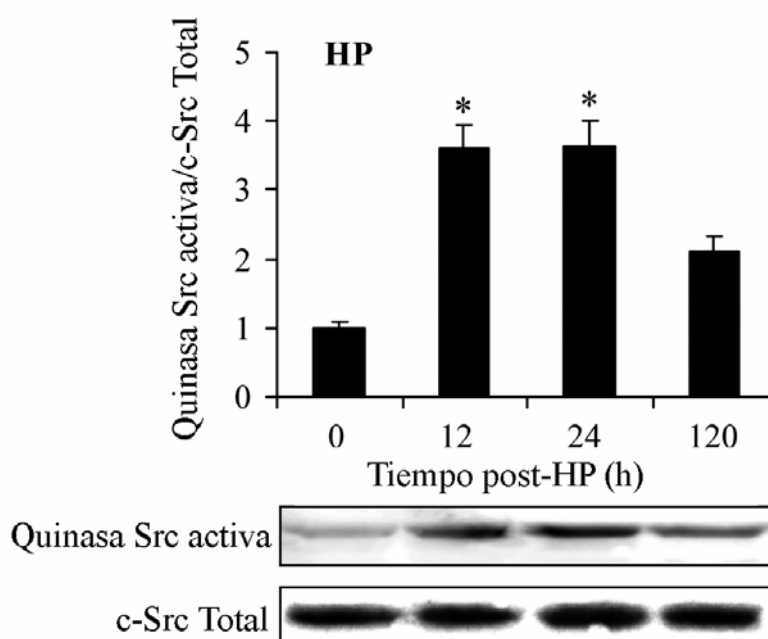




**Figura 14. Cav-1 se fosforila e internaliza en el hígado regenerante después de HP.** (A) Inmunohistoquímica representativa realizada sobre  $\pm 7$  secciones fijadas del hígado regenerante a 0, 12, 24, y 120 horas después de HP. Cav-1 fue marcada en verde,  $Y^{14}$ -P-Cav-1 fue marcada en rojo y los núcleos fueron marcados en azul con Hoechst 33258. (B) Cuantificación de la Cav-1 de la Fig. 14A. Los resultados son expresados como el porcentaje de la fluorescencia de cada fracción vs. la fluorescencia total. (C) Ampliación de las fotos de 14A a 0 y 24 horas. Los datos representan la media  $\pm$  D.E. de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,01$  vs. el valor correspondiente a tiempo 0.

### 11. La actividad de la quinasa c-Src aumenta en la regeneración hepática.

Analizamos el estado de activación de c-Src en las muestras de HPs a los diferentes tiempos. Como se muestra en la Fig. 15, la actividad de la quinasa c-Src incrementó significativamente en las muestras de hígado de 12 y 24 horas después de HP. La cantidad total de c-Src no varió durante el proceso de regeneración hepática.

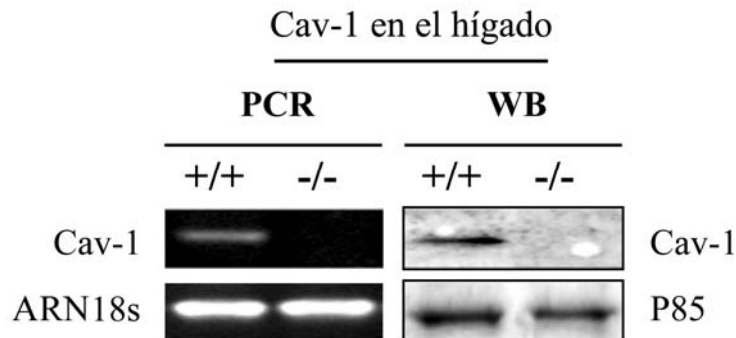


**Figura 15.** Activación de c-Src en regeneración hepática después de HP. La cantidad total y activa de c-Src se determinó en extractos totales de hígados regenerantes después de HP. Los resultados muestran un Western blot representativo y los datos son la media  $\pm$  D.E. de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,05$  vs. el correspondiente valor control sin tratamiento.

## 12. Cav-1 no es esencial para el proceso de regeneración hepática.

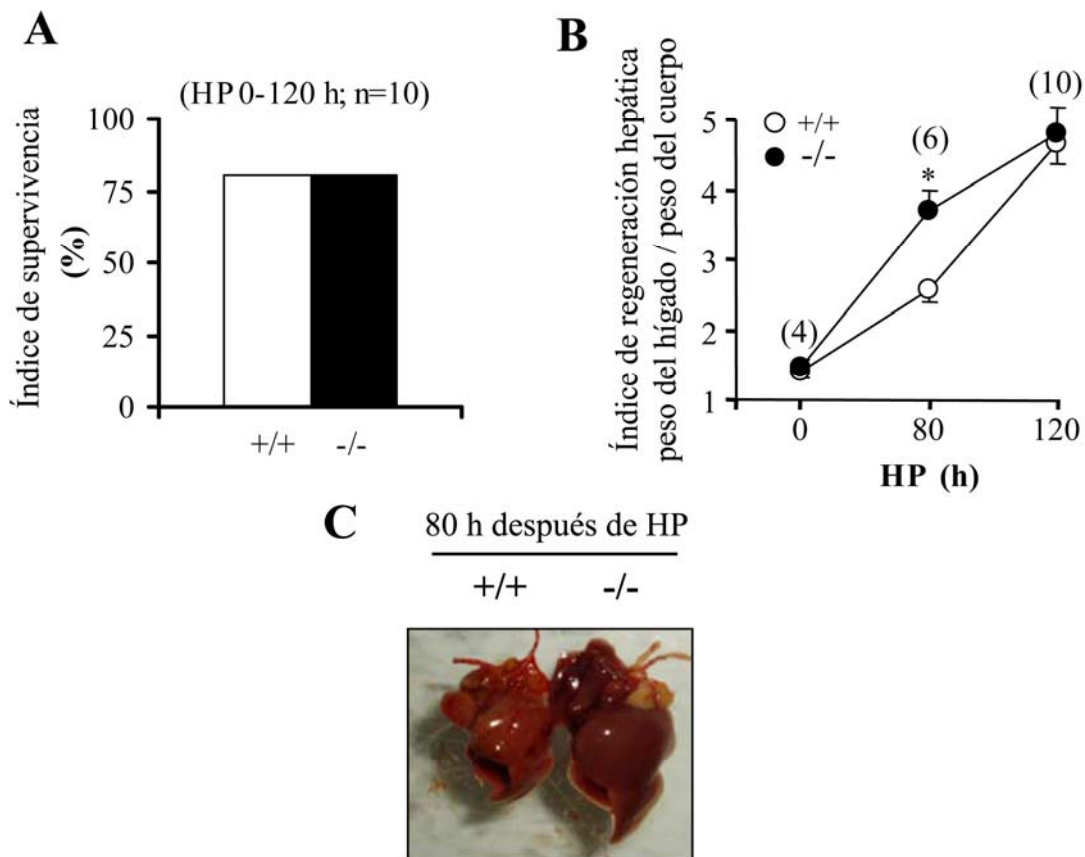
Los resultados expuestos anteriormente indicaban que Cav-1 tiene un papel importante en la regeneración hepática. Además, existían datos precedentes que sugerían un papel funcional de la cav-1 en el proceso de la regeneración hepática (Fernandez, Albor et al. 2006). Para confirmar esta funcionalidad analizamos el efecto de su ausencia utilizando ratones comerciales modificados genéticamente, que son deficientes en Cav-1 y no expresan ni ARNm ni proteína, a los que sometimos a operaciones de hepatectomía parcial.

Para determinar la expresión basal de Cav-1 en los ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup>, realizamos análisis por PCR y por Western blot del hígado de diferentes animales, confirmando que los ratones deficientes para cav-1 no expresaban ni ARNm, ni proteína (Fig. 16).



**Figura 16. Análisis de los niveles de Cav-1 en ratones Cav-1<sup>-/-</sup> y Cav-1<sup>+/+</sup>.** Determinación de los niveles de ARNm, por PCR y de proteína por Western blot de Cav-1 en ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup>. La normalización del ARNm se realizó con 18S ARN para la PCR y con la subunidad p85 de la PI3K para el Western blot. Los resultados muestran un Western blot representativo de tres experimentos independientes.

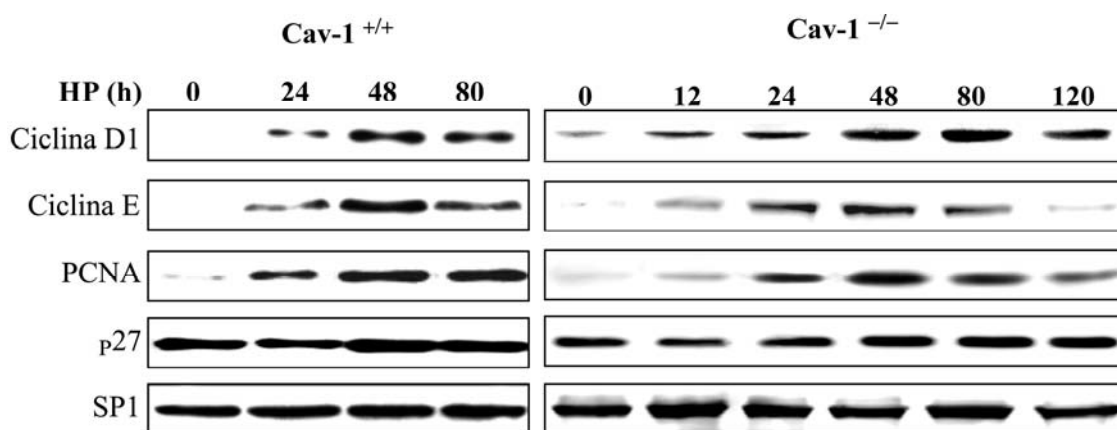
Las HPs se realizaron en dos grupos de 25 ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y 25 ratones Cav-1<sup>-/-</sup> y el proceso de regeneración fue seguido durante 5 días después de la HP. La mortalidad de ambos grupos fue muy similar y se produjo principalmente durante las primeras 24 horas después de la HP (un 20% en ambos grupos; Fig. 17A). Cuando se determinó el índice de regeneración hepática, se pudo observar que los ratones Cav-1<sup>-/-</sup> presentaron una ganancia en masa superior a la de los ratones Cav-1<sup>+/+</sup>, en las primeras 80 horas después de la HP (Fig. 15B, C).



**Figura 17 .Regeneración hepática después de HP en ratones Cav-1<sup>-/-</sup> y Cav-1<sup>+/+</sup>.** (A) Índice de supervivencia en ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup> después de 120 horas de la HP. (B) Índice de recuperación de la masa hepática a los tiempos indicados en la gráfica. El número de animales para cada tiempo se muestra entre paréntesis. (C) Foto representativa en la que se muestra la recuperación hepática a las 80 horas después de la HP. Los resultados son las medias  $\pm$  D.E. del número de ratones indicado. \* $P < 0.01$  vs. el correspondiente valor del ratón Cav-1<sup>+/+</sup>.

### 13. Marcadores de regeneración.

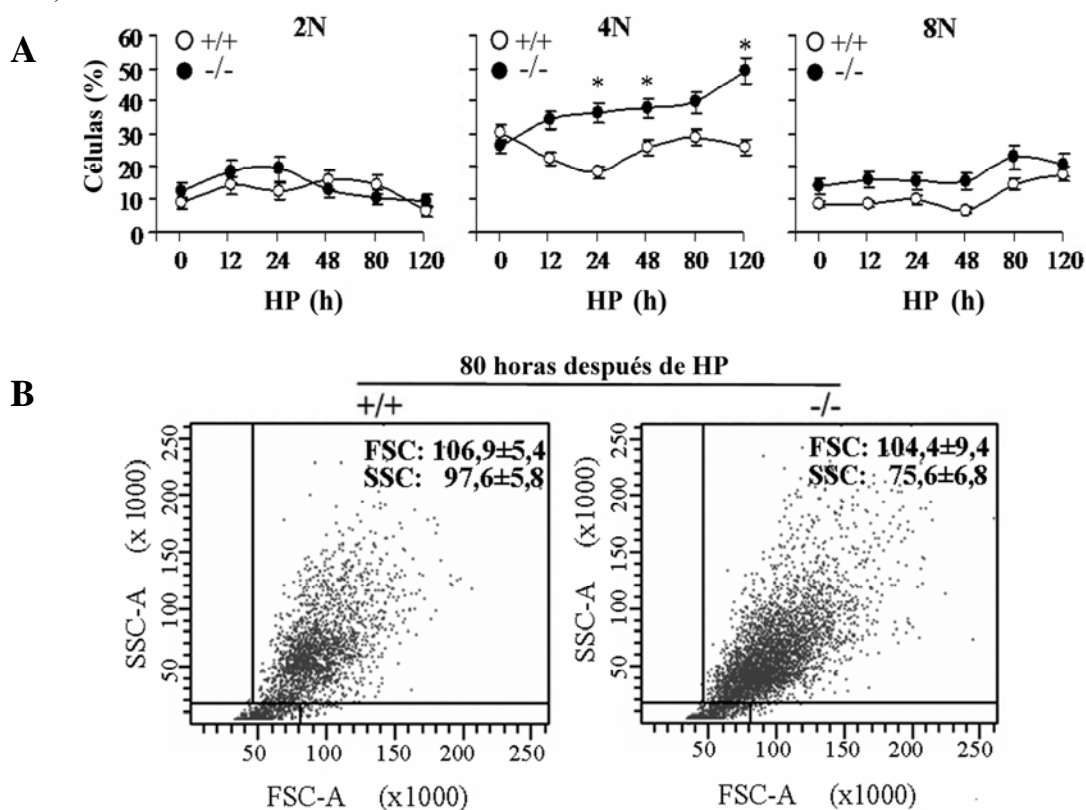
Para investigar la ganancia en masa acelerada de los ratones Cav-1<sup>-/-</sup> en el proceso de la regeneración, se analizaron diferentes parámetros relacionados con el ciclo celular, como ciclinas D1, E, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y p27. Como se puede observar en la Fig. 18, las diferentes proteínas del ciclo celular no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos de ratones. La ciclina E y PCNA manifestaron un máximo a las 48 horas después de la HP, con un incremento moderado a las 12-24 horas en los ratones Cav-1<sup>-/-</sup>.



**Figura 18. Marcadores moleculares de la regeneración hepática en ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup> después de una HP.** Western blot representativo de los niveles de ciclina D1, ciclina E, PCNA y p27 en extractos totales de los hígados remanentes a los tiempos indicados después de la HP. Los Western blots se normalizaron con SP1. Los resultados son la media  $\pm$  D.E. de 6 animales \* $P < 0.01$  vs. el correspondiente valor del ratón Cav-1<sup>+/+</sup>.

#### 14. Marcadores de ploidía, tamaño y complejidad.

Cuando se analizó por citometría de flujo la ploidía de las células del hígado remanente se observó un incremento significativo en la población 4N del ratón Cav-1<sup>-/-</sup>, que podría estar relacionado con la ganancia en masa hepática que tienen estos ratones después de la HP (Fig. 19A). Sin embargo, no se encontraron diferencias en tamaño (forward scatter, FSC) y complejidad granular (side scatter, SSC) entre las células de los hígados de los ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup> a las 80 horas después de una HP (Fig. 19B).



**Figura 19. Análisis por citometría de flujo de los hígados de los ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup>.** (A) Distribución de la ploidía de las células de los hígados regenerantes después de su aislamiento con una Medimachine y teñidos con Hoescht 33342 seguido de análisis de citometría de flujo. (B) Tamaño (Forward scatter, FSC) y granularidad y complejidad (Sidescatter, SSC) de las células aisladas de los hígados regenerantes 80 horas después de HP. La imagen muestra un panel representativo de distribución celular. Los resultados son la media  $\pm$  D.E. de 6 animales. \* $P < 0.01$  vs. el correspondiente valor del ratón Cav-1<sup>+/+</sup>.

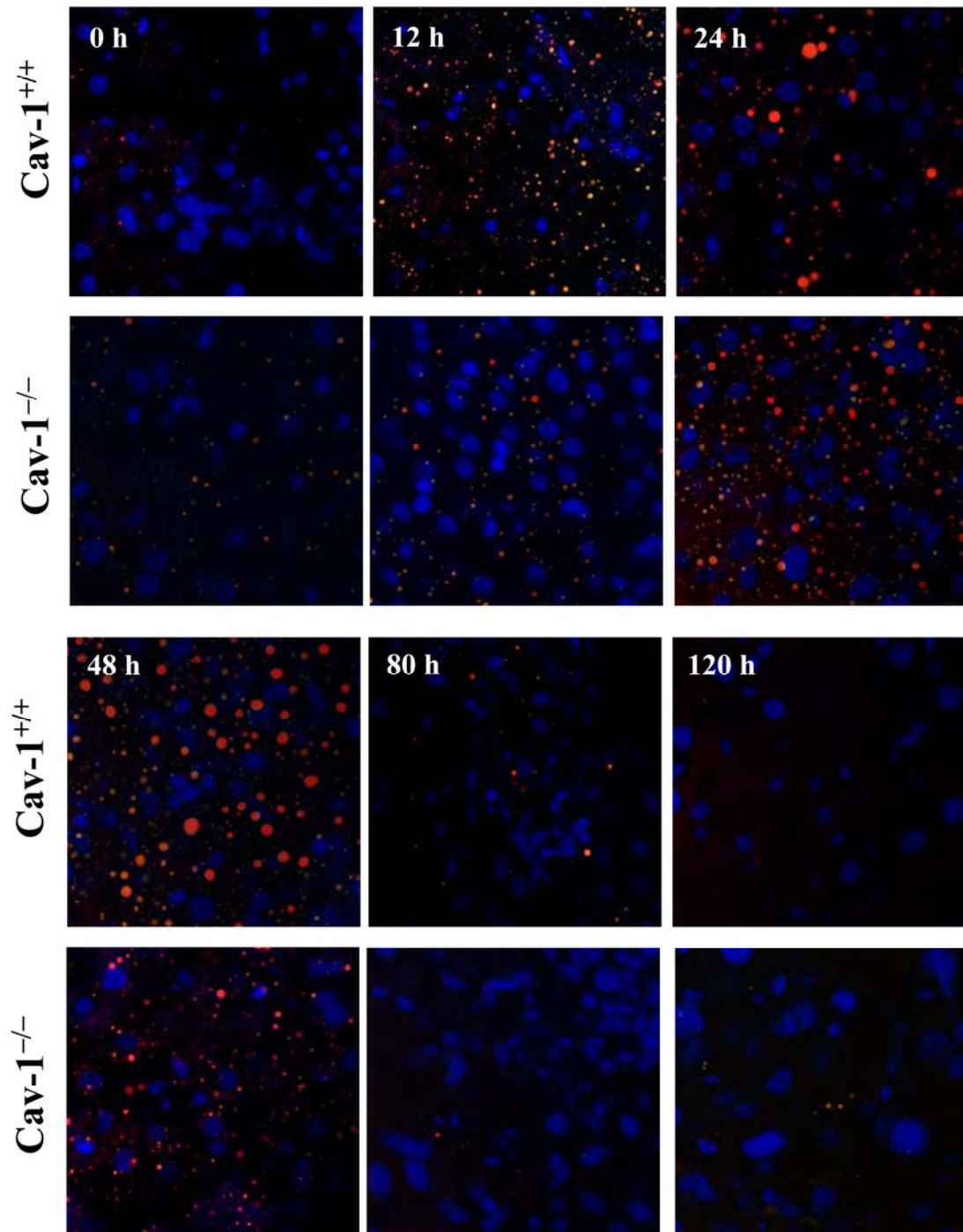
## **15. El proceso de esteatosis es independiente de la expresión Cav-1.**

La acumulación de lípidos es una de las características del proceso de regeneración hepática, y la deficiencia en dicha acumulación ha sido descrita en ratones Cav-1<sup>-/-</sup> en publicaciones anteriores a este trabajo (Fernandez, Albor et al. 2006). Dicha deficiencia se ha asociado con problemas en la regeneración de los ratones deficientes en Cav-1<sup>-/-</sup>.

Hemos investigado la acumulación de lípidos en el hígado de ratones Cav-1<sup>-/-</sup> y en sus controles Cav-1<sup>+/+</sup> durante el proceso de regeneración hepática, mediante la tinción de los lípidos con Rojo-Nilo, sobre secciones fijadas del hígado remanente y analizadas por microscopía confocal. Tanto los ratones Cav-1<sup>+/+</sup> como los Cav-1<sup>-/-</sup> tuvieron una importante acumulación de lípidos entre las 12 y las 48 horas después de la HP (Fig. 20).

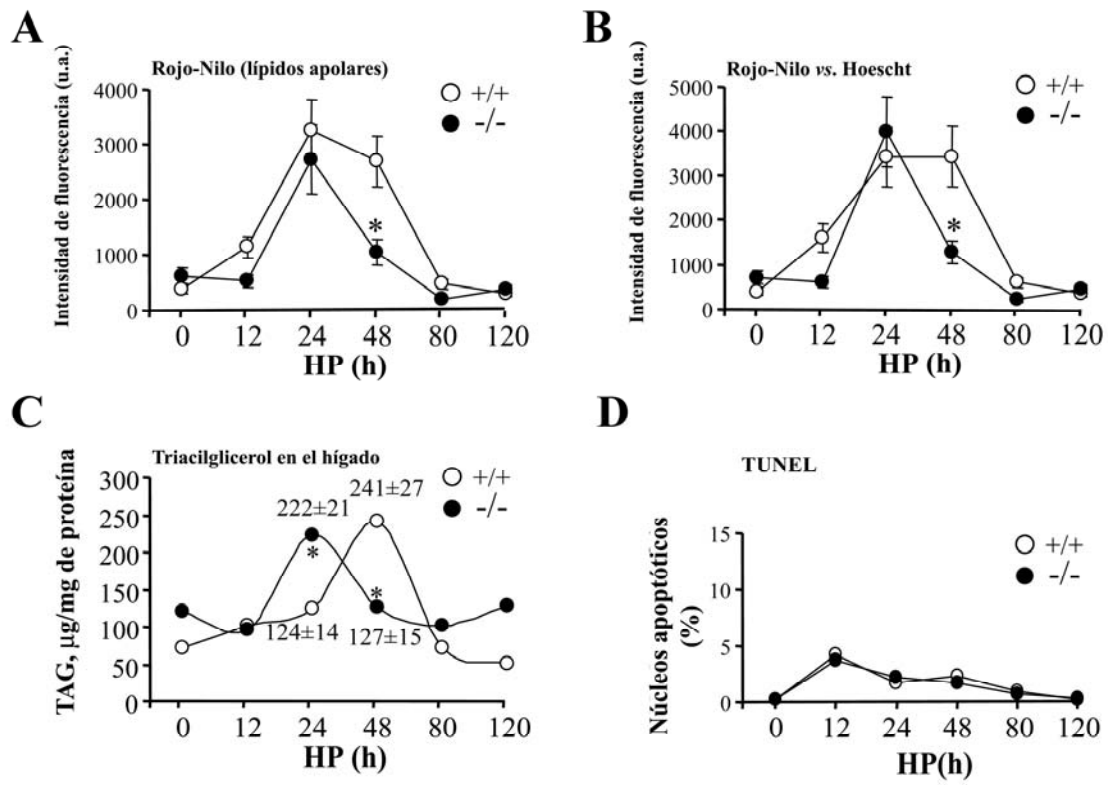
Cuando se cuantificó la acumulación de estos lípidos durante el proceso de regeneración en células aisladas de los hígados remanentes, se detectó un aumento a las 24 horas en los dos grupos de ratones (Fig. 21A). Estos datos están de acuerdo con la tinción de las secciones fijadas de hígado (Fig. 20). Sin embargo, a las 48 horas tras HP, los ratones Cav-1<sup>+/+</sup> mostraron una acumulación de lípidos 3 veces superior a los ratones Cav-1<sup>-/-</sup> (Fig. 21A). Del mismo modo, cuando se realizó una comparación entre el contenido lipídico de las células aisladas y el marcaje nuclear con Hoescht, se llegó a la misma conclusión (Fig. 21B).

Estos resultados están en concordancia con los niveles de triacilgliceroles (TAGs) determinados en homogenados de los hígados remanentes (Fig. 21C). De manera adicional, analizamos por TUNEL, la presencia de células apoptóticas en el hígado remanente y se observó menos de un 2% de núcleos positivos a las 24-48 horas después de la HP, tanto en los ratones Cav-1<sup>-/-</sup> como en los Cav-1<sup>+/+</sup> (Fig. 21D).



*Figura 20. Esteatosis en el hígado regenerante de ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup> después de una HP. Ratones Cav-1<sup>+/+</sup> y Cav-1<sup>-/-</sup> fueron sometidos a una hepatectomía del 70% y se realizó una tinción con Rojo Nilo sobre  $\pm 7$  secciones fijadas del hígado remanente aislado a los tiempos indicados. Las imágenes mostradas son una foto representativa de cada tiempo y de cada tipo de ratón.*





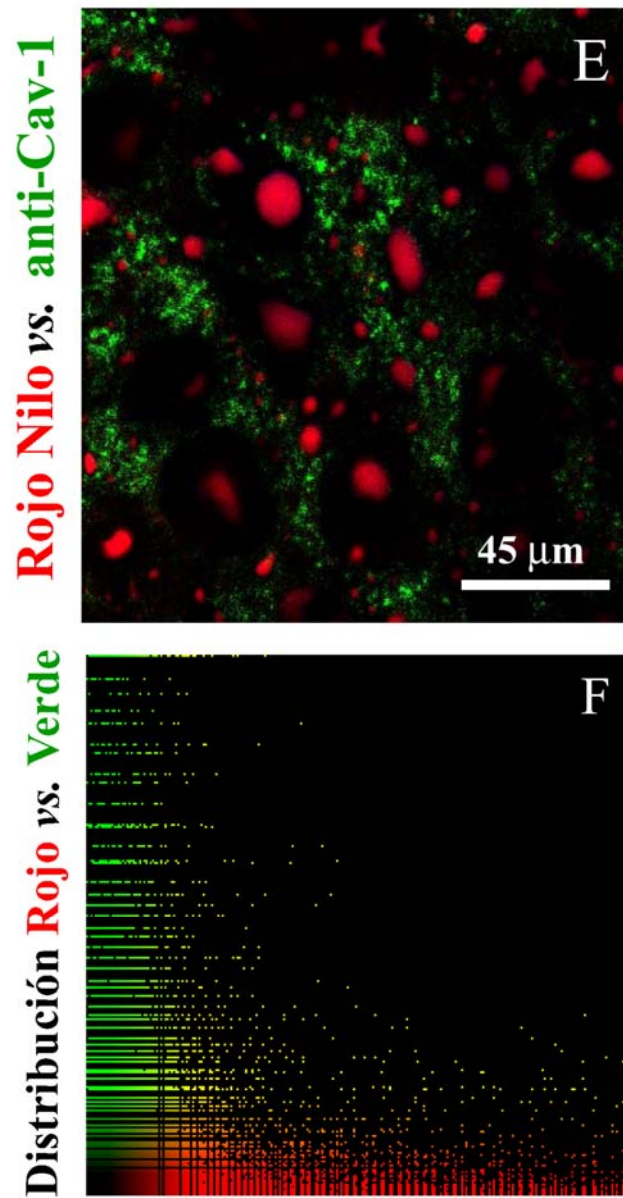
**Figura 21. Relación de la acumulación de lípidos con el ciclo celular.** (A) Intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo cuantificada después del aislamiento celular con una Medimachine y cotejados frente al tiempo de regeneración. (B) Los datos del panel A fueron comparados frente a la tinción nuclear con Hoescht. (C) Niveles de triacilglicerol (TAG), que se determinaron en extractos hepáticos con un kit comercial. (D) Diferentes secciones hepáticas fueron teñidas con TUNEL para determinar el porcentaje de células apoptóticas en las secciones. El resultado es la media  $\pm$  D.E. de 4 – 7 secciones de hígado por cada tiempo. \* $P < 0.01$  vs. el correspondiente valor del ratón Cav-1+/+.

## **16. Cav-1 no colocaliza con lípidos en el hígado regenerante después de HP.**

Varias publicaciones habían descrito la colocalización y de Cav-1 con los cuerpos lipídicos o con acumulaciones lipídicas y también la movilización de Cav-1 desde la membrana plasmática hasta dichos cuerpos lipídicos (Martin and Parton 2005; Pol, Martin et al. 2005). Para poder corroborarlo, realizamos una doble tinción de Cav-1 y Rojo-Nilo sobre secciones fijadas de los hígados remanentes a 24 horas.

No se observó ningún tipo de colocalización entre Cav-1 (verde) y las acumulaciones lipídicas (rojo) a 24 horas después de la HP en los ratones Cav-1+/+ (Fig. 22). Además, el coeficiente de colocalización, que indica cuántos píxeles tienen ambos colores, fue inferior a 0,006, por lo tanto en el hígado regenerante de los ratones *Cav<sup>tm1Mls</sup>/J* a las 24 horas después de una HP, no se produce la colocalización entre Cav-1 y las acumulaciones de lípidos.

Todos estos datos juntos indican claramente que la Cav-1, en el fondo genético analizado en estos experimentos, no es esencial para el proceso de regeneración hepática después de una hepatectomía parcial de 70%.



*Figura 22. Inmunohistoquímica y análisis de la colocalización de Cav-1 con Rojo Nilo. La expresión de Cav-1 (verde) y las acumulaciones lipídicas (rojo) se analizaron mediante microscopía confocal. La distribución de los colores fue evaluada digitalmente para determinar la cantidad de píxeles que tenían ambas fluorescencias.*



*Discusión*

---

Durante la última década, ha surgido un interés creciente por los mecanismos que dirigen la regeneración hepática, interés generado tanto en las ciencias biológicas como en la perspectiva clínica. La regulación del crecimiento de los hígados transplantados y del donador parece seguir los mismos parámetros que regulan la regeneración hepática después de HP en los animales de laboratorio (Pomfret, Pomposelli et al. 2003; Humar, Kosari et al. 2004). El conocimiento ganado en el trabajo experimental debería resolver problemas, como los fallos en el transplante de pequeños fragmentos de hígado o cómo obtener un mayor crecimiento después de un transplante. Otro tema importante es el estudio de la actividad replicativa de los hepatocitos durante la progresión de la cirrosis hepática (Libbrecht and Roskams 2002). Se desconoce qué factores determinan que la regeneración proceda de la proliferación de hepatocitos maduros en HP o de células progenitoras como ocurre después de una cirrosis masiva en el hígado. Es necesario conocer el papel del sistema inmune y de las células linfoides en la iniciación de estos procesos. Además se necesitan mayores avances en la manipulación genética de los ratones, para realizar modelos animales apropiados donde poder estudiar los procesos biológicos y clínicos importantes en el desarrollo molecular y celular de los aspectos de la regeneración hepática.

En este trabajo hemos investigado la función dinámica y potencial de Cav-1 en líneas celulares hepáticas y durante la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial del 70%. Nuestros resultados demuestran que la Cav-1 en el curso de la regeneración hepática y en líneas celulares bajo estímulos pro-inflamatorios, incrementa su expresión, se transloca a las fracciones no caveolares (FNC) y en dichas fracciones se encuentra fosforilada en la Y<sup>14</sup>. Sin embargo, en el ratón Cav<sup>tm1Mls</sup>/J la Cav-1 no es esencial para el proceso de regeneración hepática, ya que los ratones deficientes para Cav-1 sobreviven a la HP y la función y el tamaño del hígado se recuperan totalmente después de HP.

La distribución subcelular de la caveolina y los mecanismos que regulan su expresión en el hígado no se conocen en profundidad. La presencia de las caveolas/caveolina ha sido descrita en el hígado por Northern y Western blot (Glenney 1992; Malaba, Smeland et al. 1995; Henley, Krueger et al. 1998), microscopía electrónica (Montesano, Roth et al. 1982; Janicot, Fouque et al. 1991) y experimentos

de internalización de la toxina colérica o de la proteína de unión a retinol (RBP) (Janicot, Clot et al. 1988; Malaba, Smeland et al. 1995). El hígado está formado por células parenquimales, hepatocitos (80% de la masa hepática), y células no parenquimales (20%), que incluyen principalmente endotelio, células de Kupffer y células de Ito. Aunque varios estudios han descrito que la caveolina, en condiciones normales, tiene bajos niveles de expresión en el hígado (Oh, McIntosh et al. 1998; Shah, Toruner et al. 1999), no queda claro cual es su distribución celular en el tejido. Varios estudios han sugerido la presencia de la caveolina en las células endoteliales hepáticas (Garver, Erickson et al. 1997; Shah, Toruner et al. 1999), sin embargo, otros trabajos describen que la caveolina se encuentra en los hepatocitos y no en las células endoteliales hepáticas que están enriquecidas en vesículas recubiertas de clatrina (Calvo, Tebar et al. 2001). También se ha descrito que las células de Ito y las células de Kupffer tienen caveolas (Tanuma, Ohata et al. 1983; Ohata and Ito 1986). El estudio de Ogi (Ogi, Yokomori et al. 2003) caracterizó la localización ultraestructural de la caveolina en células endoteliales sinusoidales y células de Ito. Mediante microscopía electrónica e inmunotinción con oro describió que la Cav-1 estaba presente en ambos tipos celulares tanto en el aparato de Golgi, como en la membrana plasmática.

Las caveolas/caveolina están implicadas en potocitosis, endocitosis, transcitosis, tráfico de membrana y transducción de señales (Parton and Simons 2007), pero en el hígado, las funciones en las que la caveolina está implicada no están bien definidas. En líneas celulares hepáticas, se ha descrito que la Cav-1 participa en la absorción de ácidos grasos de cadena larga (Pohl, Ring et al. 2002) y en modelos *in vivo* se ha descrito que Cav-1 regula la secreción de sales biliares (Moreno, Molina et al. 2003), el transporte reverso de colesterol (Fu, Hoang et al. 2004), la internalización de ligandos específicos a través de caveolas (Janicot, Fouque et al. 1991), así como la actividad de eNOS inhibiéndola (Shah, Cao et al. 2001). Diversos trabajos sugieren un papel para Cav-1 como reguladora de señales mitogénicas en el hígado (Razani, Woodman et al. 2002; Mora, Bonilha et al. 2006).

Nuestros resultados en las líneas celulares hepáticas demuestran claramente que las células no tumorales y el cultivo primario de hepatocitos expresan una cantidad significativa de Cav-1 en concordancia con su estado de diferenciación, mientras que la

Cav-1 no se detectó en las líneas celulares de hepatoma HepG2 y HuH-7. Demostramos que en células hepáticas no tumorales los estímulos pro-inflamatorios inducen la fosforilación de Cav-1 y la translocación de la proteína fosforilada a la fracción no caveolar. Además, la tirosina quinasa c-Src, que fosforila a Cav-1 en la Y<sup>14</sup>, se activó por factores de crecimiento y por estímulos pro-inflamatorios.

Todos estos datos indicaban que la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de la Cav-1 podía tener un papel importante en el movimiento de las caveolas/caveolina. Diversos trabajos muestran que la Y<sup>14</sup> de la Cav-1 puede ser rápidamente fosforilada en respuesta a estrés oxidativo (Volonte, Galbiati et al. 2001; Sanguinetti and Mastick 2003) y a factores de crecimiento (Kim, Wiepz et al. 2000; Fielding, Chau et al. 2004). Estudios recientes sugieren que la fosforilación de Cav-1 sirve de anclaje para factores de crecimiento celular. Se ha propuesto que esta fosforilación permite la interacción con proteínas con dominios SH2/PTB, como Grb7, para activar vías de señalización (Lee, Volonte et al. 2000; Orlichenko, Huang et al. 2006). En sentido opuesto, otros trabajos han descrito que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación en la Y<sup>14</sup> de Cav-1, y que dicha internalización podría regular de manera negativa diferentes vías de proliferación como Rac, Erk y PI3K en células no adherentes (Del Pozo and Schwartz 2007). También se ha descrito que la fosforilación en Y<sup>14</sup> regula la apoptosis mediada por fármacos anti-tumorales, como el paclitaxel (Taxano) en células de cáncer de mama MCF-7 (Shajahan, Wang et al. 2007). Además, el estrés celular induce la fosforilación de la Y<sup>14</sup> a través de la activación de p38MAPK y c-Src (Volonte, Galbiati et al. 2001). En este sentido, Cav-1 tendría diferentes dominios con funciones opuestas, uno de ellos es el “dominio de anclaje a caveolina” (CSD) por el que ejerce sus efectos inhibitorios y el otro sería la región N-terminal, donde se encuentra la Y<sup>14</sup>, que estaría promoviendo señales de proliferación.

Sin embargo, la localización precisa de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 es controvertida. Se ha propuesto que la Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 se localiza en adhesiones focales, colocalizando con paxilina, en vesículas de fusión derivadas de caveolas, etc. (Aoki, Nomura et al. 1999) y también que Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 se internaliza hacia la zona perinuclear después de estrés oxidativo (Chen, Li et al. 2005). Los estudios en fibroblastos, líneas celulares endoteliales y de riñón han descrito que la fosforilación de la Cav-1 es necesaria para su



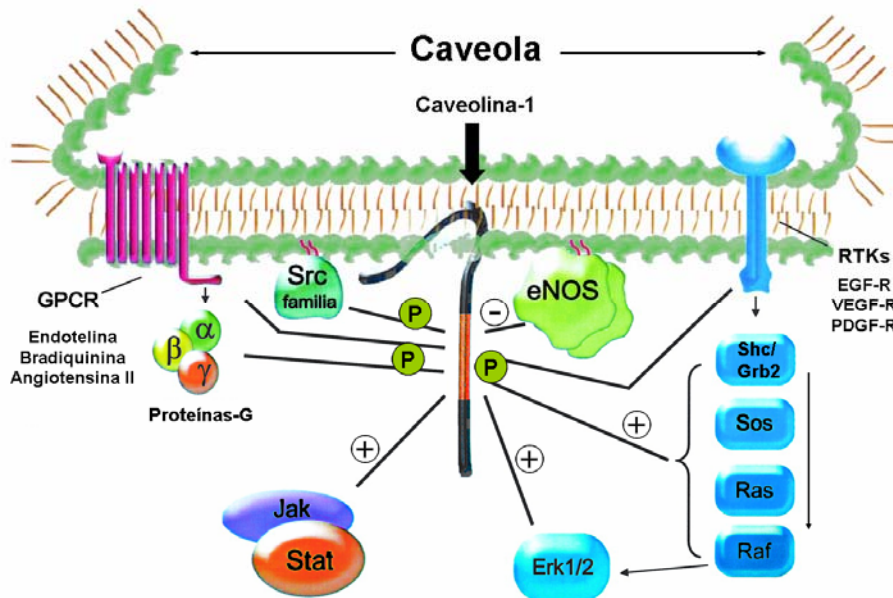
internalización (Parton, Joggerst et al. 1994; Aoki, Nomura et al. 1999; del Pozo, Balasubramanian et al. 2005). Nuestros resultados con la línea celular CHL demuestran que los estímulos pro-inflamatorios inducen la translocación e internalización de la Cav-1 a la fracción no caveolar, estando implicada en este dinamismo la quinasa c-Src. Cuando se trató a las células con un inhibidor farmacológico de c-Src (PP2) se impidió la translocación mediada por estímulos pro-inflamatorios de la Cav-1 desde la FEC a la FNC. Estos resultados se confirmaron por microscopía confocal cuando las células CHL se transfectaron con un vector de expresión de la proteína de fusión Cav-1-GFP, donde se pudo observar que después del tratamiento de las células con estímulos pro-inflamatorios, tanto la Cav-1 endógena, como la Cav-1-GFP se encontraban en dominios citosólicos y que el tratamiento de las células con PP2 inhibía este movimiento. Además, mediante la utilización de un mutante no fosforilable en la Y<sup>14</sup> (Y14F-Cav-1) demostramos que la fosforilación de la Y<sup>14</sup> de Cav-1 es necesaria para su internalización en células hepáticas, debido a que después del tratamiento con estímulos pro-inflamatorios solo la Cav-1 endógena aparecía en los dominios citosólicos, mientras que Y14F-Cav-1, en las diferentes condiciones experimentales, siempre se detectó en la membrana plasmática.

La interacción de Cav-1 con varios receptores de membrana de citoquinas y factores de crecimiento ha sido ampliamente estudiada en diversos trabajos. Se ha descrito que el LPS induce la sobre-expresión de Cav-1 en células endoteliales sinusoidales hepáticas (Kamoun, Karaa et al. 2006). También se ha descrito que mediante la estimulación con IL-1 $\beta$  aumenta la fosforilación de la Cav-1 en células beta, y además se incrementa la translocación de H-Ras a las caveolas promoviendo la activación de factores de transcripción como NF-kB (Veluthakal, Chvyrkova et al. 2005). Los autores sugieren que la fosforilación de Cav-1 es mediada directamente por el receptor de insulina de las células beta, ya que se ha descrito que Cav-1 actúa como un estabilizador del receptor de insulina en la membrana (Cohen, Razani et al. 2003).

Otra de las citoquinas pro-inflamatorias utilizadas en este trabajo de tesis doctoral es el TNF- $\alpha$ . Cav-1 interacciona con el receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR1) para permitir la activación de PI3K y la iniciación de la internalización del receptor mediada por TNF- $\alpha$  a través de las caveolas (D'Alessio, Al-Lamki et al. 2005). Además, TNF- $\alpha$

induce la fosforilación del receptor 2 de VEGF (VEGFR-2), que también se localiza en las caveolas de células endoteliales, activando la vía de PI3K/Akt. Este complejo Cav-1/VEGFR2 se disocia por la estimulación con VEGF (Labrecque, Royal et al. 2003).

En referencia a los factores de crecimiento, además de VEGF, se ha descrito la internalización del receptor de EGF a través de caveolas en estrés oxidativo y bajo estas condiciones la Cav-1 se hiperfosforila a través de c-Src, y esta condición de fosforilación de la Y<sup>14</sup> es necesaria para la localización perinuclear del EGF-R, que permanece activo en esta zona (Khan, Heidinger et al. 2006). Sin embargo la internalización del HGFR se produce a través de vesículas recubiertas de clatrina y además HGF regula negativamente la expresión de Cav-1 en fenómenos proliferativos miogénicos (Li, Xiang et al. 2005; Volonte, Liu et al. 2005).



**Figura 23. Señalización a través de caveolas.** Las caveolas concentran gran cantidad de receptores de membrana y de proteínas transductoras de señales. Esta figura es una simplificación de la denominación de “señalosoma” que reciben las caveolas. Cav-1 puede interactuar con diferentes proteínas a través de su dominio CSD e inhibir su señalización, como en el caso de eNOS. Pero además, Cav-1 puede ser fosforilada por quinasas de la familia de Src, en respuesta a la activación de receptores tirosina quinasa (RTKs) o receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) y transducir diferentes vías de proliferación (Gratton, Bernatchez et al. 2004).

En relación con la patología hepática, la sobre-expresión de Cav-1 ha sido descrita en cirrosis y carcinoma hepatocelular. Mediante análisis por microarrays de nódulos macro-regenerativos y displásicos (MDNS), que son lesiones precursoras de carcinoma hepatocelular, se identificó una expresión anormal de Cav-1 y tromboespondina-1; sin embargo, los análisis histológicos revelaron una función para la caveolina a través de un incremento en las células endoteliales sinusoidales. Esta expresión alterada de Cav-1 probablemente no esté relacionada directamente con la transformación maligna de los hepatocitos y más bien esté implicada en el aporte vascular que llega a la lesión hepática (Yerian, Anders et al. 2004). En hígado cirrótico humano se ha establecido una relación entre la sobre-expresión de Cav-1 y la reducción significativa de la actividad catalítica del óxido nítrico. El incremento de Cav-1 en las células perisinusoidales promueve su unión con la óxido nítrico endotelial, lo que conduce a su inhibición, reducción en la producción de óxido nítrico e incremento en el tono microvascular hepático (Yokomori, Oda et al. 2002; Yokomori, Oda et al. 2003).

Debido a que a Cav-1 se le ha atribuido una función como una proteína supresora de tumores (Wiechen 2001; Fiucci, Ravid et al. 2002; Capozza, Williams et al. 2003; Williams 2004; del Pozo, Balasubramanian et al. 2005), y que los fenómenos que hemos descrito hasta ahora indicaban que la Cav-1 y la fosforilación de su Y<sup>14</sup> podían tener un papel importante en vías de proliferación, decidimos analizar cual era la expresión y distribución celular de la Cav-1 en un modelo *in vivo* de proliferación hepática como es el modelo de la regeneración que ocurre después de una hepatectomía parcial (Fausto, Campbell et al. 2006).

Pol y colaboradores (Pol, Martin et al. 2004) describieron un incremento y redistribución importante de Cav-1, en regeneración hepática después de HP, desde la superficie celular a los cuerpos lipídicos de nueva generación. Los autores sugieren que la asociación de Cav-1 con cuerpos lipídicos se produce junto con la movilización de los lípidos y la parada de la endocitosis y el tráfico de membrana que ocurre en el hígado regenerante. Nuestros resultados demuestran que después de una HP del 70% se produce un aumento significativo de la Cav-1, tanto de ARNm como de proteína, en el hígado regenerante y además se produce una translocación de la proteína desde la fracción enriquecida en caveolas a la fracción no caveolar formada principalmente por

retículo endoplásmico y membrana plasmática, según indicaron los marcadores específicos. Al mismo tiempo, parte de la Cav-1 que es internalizada se encuentra fosforilada en Y<sup>14</sup>, y conjuntamente los niveles de la quinasa c-Src activa se encontraron aumentados de manera significativa durante los primeros 2 días de regeneración. Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica de los hígados remanentes a los diferentes tiempos de estudio, mostrando un importante marcaje de la Cav-1 a las 12-24 horas después de HP en la zona citoplásmica. Tanto los niveles de ARNm como de Cav-1 y de Y<sup>14</sup>-P-Cav-1 regresaron a los niveles iniciales al finalizar el proceso de regeneración hepática. Aunque se detectó una importante acumulación de cuerpos lipídicos en los hígados de los ratones a las 24 horas después de HP, cuando se realizó una tinción con Rojo-Nilo, no detectamos Cav-1 en la fracción de menor densidad del gradiente de sacarosa (fracción 1) y al realizar un análisis por microscopía confocal del hígado a las 24 horas tampoco detectamos colocalización entre Cav-1 con Rojo-Nilo. Estos datos están completamente de acuerdo con observaciones previas en líneas celulares hepáticas (Fujimoto, Kogo et al. 2001).

Como se ha descrito previamente, Cav-1 es considerada como una proteína supresora de tumores, sobretodo por su acción inhibitoria sobre vías pro-proliferativas y anti-apoptóticas. Cuando se analizó el crecimiento de fibroblastos embrionarios (MEFs) del ratón deficiente en Cav-1 (MEFs Cav-1<sup>-/-</sup>) (Razani, Engelman et al. 2001), se observó un incremento en la fase S del ciclo celular del 30% en comparación con su correspondiente control y además sobre un periodo de crecimiento en cultivo de 10 días, los MEFs de Cav-1<sup>-/-</sup> crecen 3 veces más rápido que los Cav-1<sup>+/+</sup>. Pero el ratón deficiente en Cav-1 no manifiesta ningún desarrollo acelerado de tumores en comparación con el ratón Cav-1<sup>+/+</sup>. Es posible que la pérdida conjunta de Cav-1 y de otro gen supresor de tumores tenga un efecto sinérgico. Aún así, el ratón Cav-1<sup>-/-</sup> es viable y fértil, pero tiene problemas de hiperproliferación celular y anomalías vasculares.

Con estos datos precedentes, con nuestros resultados *in vitro*, con las líneas celulares, y los resultados *in vivo*, con el modelo de regeneración hepática después de HP, supusimos que la Cav-1 debería tener un papel importante en las primeras etapas de la regeneración hepática, por ello analizamos en los ratones deficientes para Cav-1 el

proceso de la regeneración hepática. Los resultados obtenidos en el ratón KO de Cav-1 demuestran que el proceso de regeneración después de HP no se afectó por la ausencia del gen de Cav-1, por lo tanto, Cav-1 no es un gen esencial para la regeneración hepática.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, y en discrepancia con nuestros resultados, se describió que Cav-1 era esencial para el proceso de la regeneración hepática (Fernandez, Albor et al. 2006). Para poder entender la discordancia que se produce entre este trabajo y trabajos previos es importante mencionar las diferencias genéticas significativas entre ambas cepas de animales (Drab, Verkade et al. 2001; Razani, Engelman et al. 2001). El fondo genético es muy importante, porque puede afectar al fenotipo y a la respuesta de los animales después de un estrés como el de la HP. Los ratones disponibles comercialmente son WW6 y corresponden a una mezcla de 75%129Sv, 20% C57BL/6J y 5% SJL, y además se han eliminado de la secuencia de Cav-1 los exones 1 y 2, mientras que las células embrionarias utilizadas en la ref. (Fernandez, Albor et al. 2006) son derivadas completamente de un fondo 129Sv, y han eliminado de la secuencia de cav-1 el exón 3. En MEFs de Cav-1<sup>-/-</sup> y en ratones Cav-1<sup>-/-</sup> se ha descrito un aumento en la proliferación, nuestros resultados están de acuerdo con estas premisas, porque en el ratón Cav-1<sup>-/-</sup> se pudo observar un incremento moderado de los marcadores de ciclo celular a las 12-24 horas después de HP; hay una ganancia en masa superior a la de los ratones Cav-1<sup>+/+</sup> en las primeras 80 horas después de HP y esa masa hepática está significativamente aumentada en la población celular 4N. Sin embargo los ratones 129Sv Cav-1<sup>-/-</sup> tienen una mortalidad elevada a las 48-72 horas, sin presencia de apoptosis. Este dato es contradictorio, porque en ratones la fase S ocurre a las 36-40 horas después de HP, y por lo tanto a las 48 horas ya se ha producido un ciclo de división, además a las 72 horas es cuando se produce la mayoría del incremento de la masa hepática (3 días). Hay que señalar que la técnica original de Higgins y Anderson para HP en ratas (Higgins and Anderson 1931) debería ser modificada, en diferentes aspectos técnicos, para tener una reproducibilidad eficiente en ratones (Greene and Puder 2003). Muchas veces, la mortalidad se debe al tipo de anestesia utilizada o las condiciones de la sala de cirugía. Además, cuando se realiza esta técnica, se hace una ligadura de los lóbulos izquierdo y mediano juntos y se suele provocar una necrosis en el lóbulo remanente derecho del ratón probablemente debido a

una obstrucción vascular. Estos datos sugieren una interpretación cuidadosa del efecto que puede tener la anulación de un gen en la mortalidad de los ratones después de HP. Los animales utilizados en este trabajo muestran una leve mortalidad, pero siempre antes de las primeras 24 horas después de la HP, de manera similar en el tipo control y en el ratón Cav-1<sup>-/-</sup>, y un proceso de regeneración completo que fue evidente después de 5 días.

Cabe destacar que, así como se ha descrito que en el ratón 129Sv Cav-1<sup>-/-</sup> el proceso de esteatosis se encuentra alterado, no encontramos una reducción en la acumulación de lípidos en el ratón Cav-1<sup>-/-</sup>, y observamos una acumulación de lípidos prolongada en los animales control cuando se los compara con los Cav-1<sup>-/-</sup>, tanto en tinciones de Rojo-Nilo sobre secciones de hígado regenerante fijado, como en análisis por citometría de flujo. De manera adicional, la apoptosis máxima, que se produce a las 12 horas después de HP, no alcanzó el 5%.

Los estudios clásicos en el campo de la regeneración hepática, han estimado que aproximadamente hay 70 genes que incrementan su expresión en la respuesta temprana (Hortelano, Dewez et al. 1995; Casado, Callejas et al. 2001; Fausto, Campbell et al. 2006). A pesar de esta larga lista de genes implicados en regeneración hepática y de acuerdo con nuestros resultados, no hay un solo modelo murino que con una sola modificación genética tenga una mortalidad del 100%, un bloqueo completo tanto de la replicación del ADN como de la proliferación celular y un bloqueo total del proceso de la regeneración hepática.

Se han estudiado diferentes modelos murinos que presentan deficiencias, en mayor o menor grado, en el proceso de la regeneración. Los defectos observados en la regeneración hepática de los ratones deficientes en TNF-R1 se deben a que aunque las células de Kupffer liberan TNF- $\alpha$  inmediatamente después de la HP, no se produce la estimulación autocrina porque no hay receptor de TNF en la superficie y por lo tanto no se consigue activar a NF- $\kappa$ B (Yamada, Kirillova et al. 1997). Además, estos ratones deficientes en TNF-R1 no inducen la síntesis y liberación de IL-6 necesaria para la señalización posterior que se produce en el hepatocito a través de IL-6R y STAT-3. Sin embargo, el tratamiento de estos animales con IL-6 recupera la capacidad de síntesis de

ADN y proliferación (Fujita, Marino et al. 2001). Los niveles de IL-6 después de HP son críticos en la regeneración (Blindenbacher, Wang et al. 2003; Zimmers, McKillop et al. 2003), el 36% de los genes inmediatos tempranos que se expresan en el hígado regenerante dependen de IL-6 (Li, Liang et al. 2001; Su, Guidotti et al. 2002; White, Brestelli et al. 2005). Los animales que carecen de IL-6R tienen un retraso en la recuperación de la masa hepática después de una HP que se caracteriza por la presencia de necrosis y por un fallo hepático, debido a una activación defectuosa de STAT-3 (Cressman, Greenbaum et al. 1996; Sakamoto, Liu et al. 1999; Li, Liang et al. 2001). La ausencia de STAT-3 resulta letal en estado embrionario y los animales deficientes en STAT-3 de manera selectiva en el hígado ( $Alb^+ Stat3^{-/-}$ ) presentan una recuperación retrasada tras la HP (Li, Liang et al. 2002).

Diferentes receptores de citoquinas, como los receptores de IL-2, IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , colocalizan con caveolas (Sehgal 2003). Además, se ha descrito que Cav-1 es un regulador negativo de la señalización por citoquinas, que actuaría de manera similar a los supresores SOCS, inhibiendo la actividad de los miembros de la familia de la JAK quinasa (Jasmin, Mercier et al. 2006). En este sentido, el aumento de Cav-1 que se produce a las 12-24 horas después de HP, podría estar inhibiendo de varias maneras la señalización de IL-6 en el momento adecuado del proceso regenerativo. Por un lado Cav-1 interaccionaría e inhibiría a las JAK a través de su dominio CSD, y por otro lado se produciría la internalización y degradación de IL-6R impidiendo su señalización a través de las caveolas. Esta inhibición estaría complementando la acción de las SOCS que son expresadas por la propia señalización IL-6/IL-6R/JAK/STAT, y podría contribuir a explicar la ganancia en masa acelerada que se produce durante los tres primeros días en los ratones Cav-1 $^{-/-}$ (Fig. 24A).

Las citoquinas son muy importantes en las primeras etapas del proceso regenerativo, pero también lo son los factores de crecimiento. La señalización a través de HGF-met es necesaria para la entrada en ciclo después de una HP y es responsable de la activación de ERK1/2, además de tener un papel hepatoprotector frente a la apoptosis inducida por CCl<sub>4</sub> (Huh, Factor et al. 2004). Los ratones deficientes en *c-met* en el hígado tienen una elevada mortalidad tras una HP (Borowiak, Garratt et al. 2004).

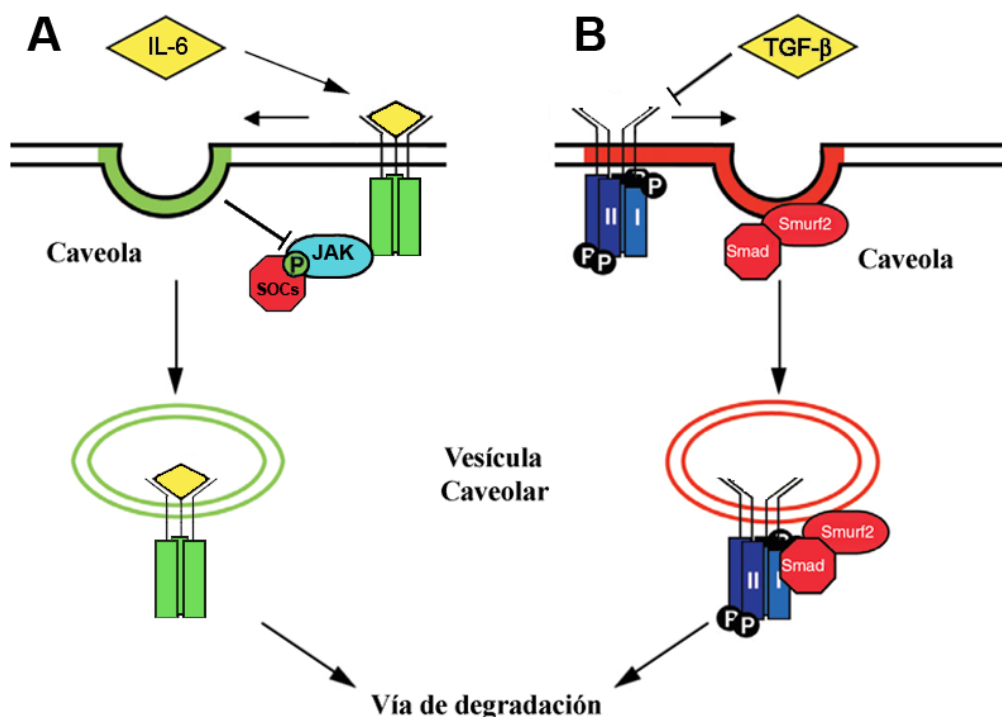
Los ligandos para EGFR, además de EGF, son TGF- $\alpha$ , HB-EGF y anfiregulina (AR). EGF podría ejercer su función al hacerse más disponible para los hepatocitos tras la HP, ya que la disminución de la masa hepática a sólo un tercio tras la HP aumenta la concentración de EGF disponible por unidad de peso del órgano remanente. Aunque TGF- $\alpha$  tiene efectos en la motilidad y la vascularización, su principal efecto es la estimulación de la proliferación celular. El ratón transgénico que sobreexpresa TGF- $\alpha$  tiene una constante proliferación de los hepatocitos y termina desarrollando cáncer (Webber, Wu et al. 1994). La expresión de TGF- $\alpha$  incrementa después de HP y la regeneración hepática en ratones deficientes en el gen de TGF- $\alpha$ , transcurre con normalidad (Russell, Kaufmann et al. 1996), probablemente por compensación de otros ligandos de EGFR. Los animales con delección homocigótica de HB-EGF, presentan una regeneración deficiente tras la HP y esta deficiencia es compensada con un incremento en los niveles de TGF- $\alpha$  (Mitchell, Nivison et al. 2005). No obstante, la administración de anticuerpos anti-TGF- $\alpha$  bloquean en parte la síntesis de ADN tras la HP (Tomiyama, Ogata et al. 2000).

Experimentos realizados en animales que carecen del receptor de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII KO), muestran que TGF- $\beta$  no es requerido para finalizar el proceso de regeneración. Estos animales presentan más activación de activina A y Smad. Un incremento de activina A podría compensar la regulación de la regeneración cuando la señalización por TGF- $\beta$  está inhibida o es suprimida (Oe, Lemmer et al. 2004). La represión transcripcional del receptor de TGF- $\beta$  tipo II (T $\beta$ RII) está implicada en la resistencia a la estimulación por TGF- $\beta$ . Se ha descrito que la expresión de Cav-1 regula negativamente a nivel transcripcional la expresión de T $\beta$ RII y además, experimentos de ARN de interferencia frente a Cav-1 incrementan la expresión de T $\beta$ RII (Lee, Lee et al. 2007). También se ha descrito que Cav-1 interacciona e inhibe la vía de señalización TGF- $\beta$ /SMAD-2 a través de la interacción con T $\beta$ RI (Razani, Zhang et al. 2001). La endocitosis mediada por caveolas de TGF- $\beta$  y de los complejos formados por T $\beta$ Rs conduce a su rápida degradación (Di Guglielmo, Le Roy et al. 2003; Huang and Huang 2005). Así se explicaría que durante el proceso de regeneración hepática los hepatocitos son resistentes a la acción del TGF- $\beta$  que liberan las células de Ito desde las primeras etapas del proceso. Cav-1 podría regular negativamente la expresión en la membrana de



los receptores T $\beta$ I y T $\beta$ II, llevándolos a la degradación vía caveolas durante la sobre-expresión de Cav-1 que se produce a las 12-24 horas (Fig 24B).

Otros modelos murinos en los que se ve afectado más severamente el proceso de la regeneración son los ratones deficientes en la proteína de unión IGF-1 (Leu, Crissey et al. 2003), la sobre-expresión de TGF- $\beta$  (Leu, Crissey et al. 2003), ratones deficientes para TAB2, la proteína que interacciona con TAK1 implicada en la señalización temprana en respuesta a IL-1 $\beta$  (Sanjo, Takeda et al. 2003) y ratones doble deficientes en NOS-2 y COX-(Zeini, Hortelano et al. 2004). En todos estos casos el fallo hepático y la muerte del animal parecen estar provocados por una elevada apoptosis.



**Figura. 24. Posibles vías de regulación de IL-6 y de TGF- $\beta$  por Cav-1 durante la regeneración hepática.** Tanto la señalización de IL-6 como de TGF- $\beta$  sería inhibida por la internalización y posterior degradación de sus receptores vía caveolas. (A) Inhibición de la señalización por la interacción las caveolas con IL-6R. Después de unirse IL-6 a su receptor, Cav-1 interacciona con JAK por el dominio CSD, y además se produce la internalización y degradación de IL-6R. (B) Inhibición de la señalización de TGF- $\beta$ . Los T $\beta$ Rs son internalizados y degradados impidiendo la estimulación de los hepatocitos por TGF- $\beta$ .

Por lo tanto la funcionalidad de Cav-1 consistiría en un mecanismo complementario a las diferentes señales de inhibición que se producen durante la regeneración hepática. Teniendo en cuenta los resultados de esta tesis y los que describen la relación de Cav-1 con el receptor de IL-6 y con los receptores del TGF- $\beta$ , trabajos futuros permitirán profundizar en la implicación de Cav-1 en estas dos vías de señalización durante los procesos proliferativos que tienen lugar en la regeneración hepática después de hepatectomía parcial.





*Conclusiones*

---



1. Las líneas celulares no tumorales y el cultivo primario de hepatocitos expresan una cantidad significativa de Cav-1 en concordancia con su estado de diferenciación, mientras que la Cav-1 no se detectó en las líneas celulares de hepatoma HepG2 y HuH-7.
2. Las células hepáticas no tumorales tratadas con estímulos pro-inflamatorios inducen la fosforilación de Cav-1 y la translocación de la proteína fosforilada a la fracción no caveolar. Además, tirosina quinasas de la familia Src son en parte responsables de la fosforilación de Cav-1 en Y<sup>14</sup>.
3. En la regeneración hepática tras hepatectomía parcial, Cav-1 incrementa y se transloca a fracciones no caveolares, en las fases iniciales del proceso de regeneración, para redistribuirse a la fracción enriquecida en caveolas cuando el proceso regenerativo ha finalizado. Además, la Cav-1 localizada en dominios intracelulares se encuentra fosforilada.
4. Los ratones carentes del gen de Cav-1 regeneran después de hepatectomía parcial, exhibiendo una ganancia de masa en los tres primeros días superior a los animales control, con un aumento de la población 4N. Sin embargo, los animales deficientes en Cav-1 desarrollan una esteatosis similar a los animales salvajes.
5. Cav-1 no es un gen esencial para el proceso de regeneración hepática, dado que los ratones deficientes en Cav-1 sobreviven a la hepatectomía parcial y la masa y función hepática se recuperan de manera similar a los ratones control.





## *Bibliografia*

---

- Albrecht, J. H., J. S. Hoffman, et al. (1993). "Cyclin and cyclin-dependent kinase 1mRNA expression in models of regenerating liver and human liver diseases." *Am J Physiol* 265(5 Pt 1): G857-864.
- Albrecht, J. H., R. Y. Poon, et al. (1998). "Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver." *Oncogene* 16: 2141-2150.
- Aldeguer, X., F. Debonera, et al. (2002). "Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration." *Hepatology* 35: 40-48.
- Aoki, T., R. Nomura, et al. (1999). "Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium." *Exp Cell Res* 253(2): 629-36.
- Argast, G. M., J. S. Campbell, et al. (2004). "Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication." *J Biol Chem* 279: 34530-34536.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1997). *Current Protocols In Molecular Biology*.
- Behrens, A., M. Sibilía, et al. (2002). "Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver." *EMBO J* 21: 1782-1790.
- Berasain, C., E. R. Garcia-Trevijano, et al. (2005). "Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice." *Gastroenterology* 128: 424-432.
- Bist, A., P. E. Fielding, et al. (1997). "Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol." *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10693-10698.
- Blindenbacher, A., X. Wang, et al. (2003). "Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice." *Hepatology* 38: 674-682.
- Borowiak, M., A. N. Garratt, et al. (2004). "Met provides essential signals for liver regeneration." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 10608-10613.
- Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-36.
- Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." *Cell* 68(3): 533-44.
- Bucher, N. L. and M. N. Swaffield (1964). "The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised." *Cancer Res* 24: 1611-25.
- Burr, A. W., K. Toole, et al. (1998). "Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration." *J Pathol.* 185: 298-302.
- Cain, K. and C. Freathy (2001). "Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome." *Toxicol Lett* 120(1-3): 307-15.
- Calvo, M. and C. Enrich (2000). "Biochemical analysis of a caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver." *Electrophoresis*: 3386-3395.
- Calvo, M., F. Tebar, et al. (2001). "Morphologic and functional characterization of caveolae in rat liver hepatocytes." *Hepatology* 33: 1259-1269.
- Cameron, P. L., J. W. Ruffin, et al. (1997). "Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain." *J Neurosci* 17(24): 9520-35.

- Campbell, J. S., L. Prichard, et al. (2001). "Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration." *J Clin Invest* 107(10): 1285-92.
- Capozza, F., T. M. Williams, et al. (2003). "Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation." *Am J Pathol* 162(6): 2029-39.
- Carr, B. I., I. Hayashi, et al. (1986). "Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor." *Cancer Res* 46(5): 2330-4.
- Casado, M., N. A. Callejas, et al. (2001). "Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy." *Faseb J* 15(11): 2016-8.
- Cohen, A. W., B. Razani, et al. (2003). "Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue." *Am J Physiol Cell Physiol* 285(1): C222-35.
- Couet, J., S. Li, et al. (1997). "Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins." *J Biol Chem* 272: 6525-6533.
- Couet, J., M. Sargiacomo, et al. (1997). "Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities." *J Biol Chem*: 30429-30438.
- Coutant, A., C. Rescan, et al. (2002). "PI3K-FRAP/mTOR pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival." *Hepatology* 36: 1079-1088.
- Cressman, D. E., R. H. Diamond, et al. (1995). "Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration." *Hepatology* 21: 1443-1449.
- Cressman, D. E., L. E. Greenbaum, et al. (1996). "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice." *Science* 274: 1379-1383.
- Cressman, D. E., L. E. Greenbaum, et al. (1994). "Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver." *J. Biol. Chem.* 269: 30429-30435.
- Cui, J., L. R. Rohr, et al. (2001). "Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer." *Prostate* 46(3): 249-56.
- Chen, D. B., S. M. Li, et al. (2005). "Tyrosine phosphorylation of caveolin 1 by oxidative stress is reversible and dependent on the c-src tyrosine kinase but not mitogen-activated protein kinase pathways in placental artery endothelial cells." *Biol Reprod* 73(4): 761-72.
- D'Alessio, A., R. S. Al-Lamki, et al. (2005). "Caveolae participate in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and internalization in a human endothelial cell line." *Am J Pathol* 166(4): 1273-82.
- Dabeva, M. D. and D. A. Shafritz (1993). "Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration." *Am. J. Pathol.* 143(6): 1606-20.
- Das, K., R. Y. Lewis, et al. (1999). "The membrane spanning domains of caveolins 1 and 2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo." *J Biol Chem* 274: 18721-18728.

- Date, M., K. Matsuzaki, et al. (2000). "Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury." *J Hepatol* 32(2): 251-60.
- Del Pozo, M. A., N. Balasubramanian, et al. (2005). "Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization." *Nat Cell Biol* 7(9): 901-8.
- Del Pozo, M. A. and M. A. Schwartz (2007). "Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins." *Trends Cell Biol* 17(5): 246-50.
- Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* 425(6958): 577-84.
- Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, et al. (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover." *Nat Cell Biol* 5(5): 410-21.
- Diehl, A. M., M. Yin, et al. (1994). "Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury." *Am. J. Physiol.* 267: G552-561.
- Dietzen, D. J., W. R. Hastings, et al. (1995). "Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues: Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae." *J Biol Chem* 270: 6838-6842.
- Drab, M., P. Verkade, et al. (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." *Science* 293(5539): 2449-52.
- Drumheller, T., B. C. McGillivray, et al. (1996). "Precise localisation of 3p25 breakpoints in four patients with the 3p-syndrome." *J Med Genet* 33(10): 842-7.
- Dupree, P., R. G. Parton, et al. (1993). "Caveolae and sorting of the trans-Golgi network of epithelial cells." *Embo J* 12(4): 1597-605.
- Echarri, A. and M. A. Del Pozo (2006). "Caveolae internalization regulates integrin-dependent signaling pathways." *Cell Cycle* 5(19): 2179-82.
- Engelman, J. A., C. Chu, et al. (1998). "Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain." *FEBS Lett* 428(3): 205-11.
- Engelman, J. A., R. J. Lee, et al. (1998). "Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer." *J Biol Chem*: 20448-20455.
- Engelman, J. A., C. C. Wycoff, et al. (1997). "Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth." *J Biol Chem* 272: 16374-16381.
- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1998). "Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer's disease and muscular dystrophy." *Am J Hum Genetics* 63: 1578-1587.
- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1998). "Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers." *FEBS Lett* 436(3): 403-10.
- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1999). "Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines." *FEBS Lett* 448(2-3): 221-30.

- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1999). "p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity." *J Biol Chem*: 32333-32341.
- Evarts, R. P., P. Nagy, et al. (1987). "A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver." *Carcinogenesis* 8(11): 1737-40.
- Farber, J. L. and R. J. Gerson (1984). "Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals." *Pharmacol Rev* 36(2 Suppl): 71S-75S.
- Fausto, N. (1999). "Lessons from genetically engineered animal models. V. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future." *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): G917-21.
- Fausto, N. (2000). "Liver regeneration." *J Hepatol* 32(1 Suppl): 19-31.
- Fausto, N., J. S. Campbell, et al. (2006). "Liver regeneration." *Hepatology* 43(2 Suppl 1): S45-53.
- Fernandez, M. A., C. Albor, et al. (2006). "Caveolin-1 is essential for liver regeneration." *Science* 313(5793): 1628-32.
- Feron, O., L. Belhassen, et al. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells." *J Biol Chem* 271: 22810-22814.
- Fielding, P. E., P. Chau, et al. (2004). "Mechanism of platelet-derived growth factor-dependent caveolin-1 phosphorylation: relationship to sterol binding and the role of serine-80." *Biochemistry* 43(9): 2578-86.
- FitzGerald, M. J., E. M. Webber, et al. (1995). "Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration." *Cell Growth Differ*. 6: 417-427.
- Fiucci, G., D. Ravid, et al. (2002). "Caveolin-1 inhibits anchorageindependent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells." *Oncogene* 21: 2365-2375.
- Fra, A. M., E. Williamson, et al. (1994). "Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae." *J Biol Chem* 269(49): 30745-8.
- Fra, A. M., E. Williamson, et al. (1995). "De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin." *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8655-8659.
- Francavilla, A., P. Ove, et al. (1986). "Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy." *Cancer Res* 46(3): 1318-23.
- Fu, Y., A. Hoang, et al. (2004). "Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells." *J Biol Chem* 279(14): 14140-6.
- Fujii, H., T. Hirose, et al. (2002). "Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice." *J Hepatol* 36: 653-659.
- Fujimoto, T., H. Kogo, et al. (2001). "Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell." *J Cell Biol* 152(5): 1079-85.
- Fujita, J., M. W. Marino, et al. (2001). "Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice." *Surgery* 129: 48-54.

- Gabella, G. (1976). "Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli." *Cell Tissue Res* 170(2): 161-86.
- Galbiati, F., J. A. Engelman, et al. (2001). "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* 276(24): 21425-33.
- Galbiati, F., D. Volonte, et al. (1998). "Targeted down-regulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade." *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 17: 6633-6648.
- Galbiati, F., D. Volonte, et al. (2001). "Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism." *Mol Biol Cell*: 2229-2244.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, et al. (2004). "Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells." *Mol Biol Cell*: 678-687.
- Garcia-Cardena, G., R. Fan, et al. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1." *J Biol Chem* 271: 27237-27240.
- Garcia-Cardena, G., P. Oh, et al. (1996). "Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for caveolae localization." *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6448-6453.
- Garver, W. S., R. P. Erickson, et al. (1997). "Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C." *Biochim Biophys Acta* 1361(3): 272-80.
- Gherardi, E. and M. Stoker (1990). "Hepatocytes and scatter factor." *Nature* 346(6281): 228.
- Gil, J. (1983). "Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung." *Fed Proc* 42(8): 2414-8.
- Glenney, J. R., Jr. (1989). "Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus." *J Biol Chem* 264(34): 20163-6.
- Glenney, J. R., Jr. (1992). "The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles." *FEBS Lett* 314(1): 45-8.
- Glenney, J. R. J. and L. Zokas (1989). "Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton." *J Cell Biol* 108(6): 2401-8.
- Gratton, J. P., P. Bernatchez, et al. (2004). "Caveolae and caveolins in the cardiovascular system." *Circ Res* 94(11): 1408-17.
- Greenbaum, L. E., W. Li, et al. (1998). "CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy." *J. Clin. Invest* 102: 996-1007.
- Greene, A. K. and M. Puder (2003). "Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management." *J Invest Surg* 16(2): 99-102.

- Grisham, J. W. (1962). "A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3." *Cancer Res.* 22: 842-9.
- Hailstones, D., L. S. Sleer, et al. (1998). "Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells." *J Lipid Res* 39: 369-379.
- Hayashi, K., S. Matsuda, et al. (2001). "Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers." *Cancer Res* 61(6): 2361-4.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." *Biochem. J.* 374(1-20).
- Henley, J. R., E. W. Krueger, et al. (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae." *J Cell Biol* 141: 85-99.
- Herrera, B., A. M. Alvarez, et al. (2004). "Resistance to TGF-beta-induced apoptosis in regenerating hepatocytes." *J Cell Physiol* 201(3): 385-92.
- Higgins, G. M. and R. M. Anderson (1931). *Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.* *Archives of Pathology.* 12: 186-202.
- Hnasko, R. and M. P. Lisanti (2003). "The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease." *Mol Interv* 3(8): 445-64.
- Hortelano, S., B. Dewez, et al. (1995). "Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy." *Hepatology* 21(3): 776-86.
- Huang, S. S. and J. S. Huang (2005). "TGF-beta control of cell proliferation." *J Cell Biochem* 96(3): 447-62.
- Huh, C. G., V. M. Factor, et al. (2004). "Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 4477-4482.
- Humar, A., K. Kosari, et al. (2004). "Liver regeneration after adult living donor and deceased donor split-liver transplants." *Liver Transpl* 10(3): 374-8.
- Hurlstone, A. F., G. Reid, et al. (1999). "Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines." *Oncogene* 18(10): 1881-90.
- Im, C. N., J. S. Lee, et al. (2007). "Iron chelation study in a normal human hepatocyte cell line suggests that tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates production of reactive oxygen species." *J Cell Biochem* 100(2): 474-86.
- Janicot, M., J. P. Clot, et al. (1988). "Interactions of cholera toxin with isolated hepatocytes. Effects of low pH, chloroquine and monensin on toxin internalization, processing and action." *Biochem J* 253(3): 735-43.
- Janicot, M., F. Fouque, et al. (1991). "Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes." *J Biol Chem* 266(20): 12858-65.
- Jasmin, J. F., I. Mercier, et al. (2006). "SOCS proteins and caveolin-1 as negative regulators of endocrine signaling." *Trends Endocrinol Metab* 17(4): 150-8.
- Jenkins, R. B., J. Qian, et al. (1998). "A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer." *Cancer Res* 58(4): 759-66.

- Jones Jr, D. E., R. Tran-Patterson, et al. (1995). "Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration." *Am. J. Physiol.* 268: G872-878.
- Kamoun, W. S., A. Karaa, et al. (2006). "LPS inhibits endothelin-1-induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1." *Hepatology* 43(1): 182-90.
- Khan, E. M., J. M. Heidinger, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking." *J Biol Chem* 281(20): 14486-93.
- Kim, T. H., W. M. Mars, et al. (2000). "Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration." *Hepatology* 31: 75-82.
- Kim, Y. N., G. J. Wiepaz, et al. (2000). "Epidermal growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. Enhanced caveolin-1 tyrosine phosphorylation following aberrant epidermal growth factor receptor status." *J Biol Chem* 275(11): 7481-91.
- Kiso, S., S. Kawata, et al. (1995). "Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy." *Hepatology* 22: 1584-1590.
- Kiso, S., S. Kawata, et al. (2003). "Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy." *Gastroenterology* 124: 701-707.
- Koniaris, L. G., I. H. McKillop, et al. (2003). "Liver regeneration." *J Am Coll Surg* 197(4): 634-59.
- Kopp, J. B., V. M. Factor, et al. (1996). "Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease." *Lab Invest* 74(6): 991-1003.
- Krawitt, E. L., I. Betel, et al. (1969). "A study of the cytidine kinase pathway of nucleotide biosynthesis in regenerating rat liver." *Biochim. Biophys. Acta* 174: 763-5.
- Kurzchalia, T., P. Dupree, et al. (1992). "VIP 21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golginetwork-derived transport vesicles." *J Cell Biol* 118(5): 1003-1014.
- Kurzchalia, T. V. and R. G. Parton (1999). "Membrane microdomains and caveolae." *Curr Opin Cell Biol* 11(4): 424-31.
- Labrecque, L., I. Royal, et al. (2003). "Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol." *Mol Biol Cell* 14(1): 334-47.
- Lee, D. C., S. W. Sunnarborg, et al. (2003). "TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase." *Ann N Y Acad Sci* 995: 22-38.
- Lee, E. K., Y. S. Lee, et al. (2007). "Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF-beta1 through down-regulating the expression of TGF-beta type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells." *Biochem Biophys Res Commun* 359(2): 385-90.
- Lee, H., D. S. Park, et al. (2002). "Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-



- negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia." *Am J Pathol* 161(4): 1357-69.
- Lee, H., D. Volonte, et al. (2000). "Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette." *Mol Endocrinol* 14(11): 1750-75.
- Lee, H., S. E. Woodman, et al. (2001). "Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14)." *J Biol Chem*: 35150-35158.
- Lee, J. S. and S. S. Thorgeirsson (2002). "Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer." *Hepatology* 35(5): 1134-43.
- Lee, S. W., C. L. Reimer, et al. (1998). "Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells." *Oncogene* 16(11): 1391-7.
- Lemire, J. M., N. Shiojiri, et al. (1991). "Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine." *Am J Pathol* 139(3): 535-52.
- Leu, J. I., M. A. Crissey, et al. (2003). "Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation." *Mol. Cell Biol.* 23: 1251-1259.
- Leu, J. I., M. A. Crissey, et al. (2003). "Massive hepatic apoptosis associated with TGF-beta1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice." *J Clin Invest* 111(1): 129-39.
- Levy, D. E. and C. K. Lee (2002). "What does Stat3 do?" *J. Clin. Invest.* 109: 1143-1148.
- Li, N., G. S. Xiang, et al. (2005). "The Listeria protein internalin B mimics hepatocyte growth factor-induced receptor trafficking." *Traffic* 6(6): 459-73.
- Li, S., J. Couet, et al. (1996). "Src tyrosine kinases, G alpha subunits and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases." *J Biol Chem* 271: 29182-29190.
- Li, S., F. Galbiati, et al. (1998). "Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes." *FEBS Lett* 434: 127-134.
- Li, S., T. Okamoto, et al. (1995). "Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin." *J Biol Chem* 270(26): 15693-701.
- Li, S., R. Seitz, et al. (1996). "Phosphorylation of caveolin by Src tyrosine kinases: The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo." *J Biol Chem* 271: 3863-3868.
- Li, S., K. S. Song, et al. (1996). "Expression and characterization of recombinant caveolin: Purification by poly-histidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes." *J Biol Chem* 271: 568-573.

- Li, W., X. Liang, et al. (2002). "STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration." *J. Biol. Chem.* 277: 28411-28417.
- Li, W., X. Liang, et al. (2001). "Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy." *Hepatology* 33: 1377-1386.
- Libbrecht, L. and T. Roskams (2002). "Hepatic progenitor cells in human liver diseases." *Semin Cell Dev Biol* 13(6): 389-96.
- Lindroos, P. M., R. Zarnegar, et al. (1991). "Hepatocyte growth factor (hepatopietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration." *Hepatology* 13(4): 743-50.
- Lisanti, M. P., P. Scherer, et al. (1994). "Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: A signalling hypothesis." *Trends Cell Biol* 4: 231-235.
- Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease." *J Cell Biol* 126(1): 111-26.
- Liu, J., G. Garcia-, et al. (1996). "Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization." *Biochemistry* 35: 13277-13281.
- Liu, J., P. Lee, et al. (2001). "Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation." *Am J Physiol Cell Physiol Biochem* 280: C823-835.
- Liu, J., P. Oh, et al. (1997). "Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains." *J Biol Chem* 272(11): 7211-22.
- Liu, P. and R. G. Anderson (1995). "Compartmentalized production of ceramide at the cell surface." *J Biol Chem* 270(45): 27179-85.
- Liu, P., Y. Ying, et al. (1996). "Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae." *J Biol Chem* 271(17): 10299-303.
- Macias-Silva, M., W. Li, et al. (2002). "Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration." *J Biol Chem* 277(32): 28483-90.
- Malaba, L., S. Smeland, et al. (1995). "Retinol-binding protein and asialo-orosomucoid are taken up by different pathways in liver cells." *J Biol Chem*: 15686-15692.
- Martin, S. and R. G. Parton (2005). "Caveolin, cholesterol, and lipid bodies." *Semin Cell Dev Biol* 16(2): 163-74.
- Matsuo, T., S. Yamaguchi, et al. (2003). "Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo." *Science* 302: 255-259.
- McNally, E. M., E. de Sa Moreira, et al. (1998). "Caveolin-3 in muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* 7(5): 871-7.
- Menjo, M., K. Ikeda, et al. (1998). "Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in liver regeneration." *J Gastroenterol Hepatol* 13((Suppl)): S100-105.
- Michalopoulos, G., K. A. Houck, et al. (1984). "Control of hepatocyte replication by two serum factors." *Cancer Res.* 44(10): 4414-9.

- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." *Science* 276(5309): 60-6.
- Michalopoulos, G. K. and Z. Khan (2005). "Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin." *Gastroenterology* 128: 503-506.
- Michel, J. B., O. Feron, et al. (1997). "Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin." *J Biol Chem* 272: 15583–15586.
- Minetti, C., F. Sotgia, et al. (1998). "Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy." *Nat Genet* 18(4): 365-8.
- Mitchell, C., M. Nivison, et al. (2005). "Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration." *J Biol Chem* 280: 2562-2568.
- Mobley, B. A. and B. R. Eisenberg (1975). "Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology." *J Gen Physiol* 66(1): 31-45.
- Monier, S., D. J. Dietzen, et al. (1996). "Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol." *FEBS Lett* 388: 143–149.
- Monier, S., R. G. Parton, et al. (1995). "VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro." *Mol Biol Cell* 6: 911–927.
- Montesano, R., J. Roth, et al. (1982). "Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins." *Nature (Lond)* 296(5858): 651–3.
- Mora, R., V. L. Bonilha, et al. (1999). "Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae and rafts when co-expressed with caveolin-1." *J Biol Chem* 274: 25708–25717.
- Mora, R. C., V. L. Bonilha, et al. (2006). "Bipolar assembly of caveolae in retinal pigment epithelium." *Am J Physiol Cell Physiol* 290(3): C832-43.
- Moreno, M., H. Molina, et al. (2003). "Hepatic overexpression of caveolins increases bile salt secretion in mice." *Hepatology* 38(6): 1477-88.
- Murata, M., J. Peranen, et al. (1995). "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein." *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10339–10343.
- Napolitano, L. (1963). "The Differentiation of White Adipose Cells. An Electron Microscope Study." *J Cell Biol* 18: 663-79.
- Navarro-Lerida, I., M. T. Portoles, et al. (2004). "Induction of nitric oxide synthase-2 proceeds with the concomitant downregulation of the endogenous caveolin levels." *J Cell Sci* 117(Pt 9): 1687-97.
- Oe, S., E. R. Lemmer, et al. (2004). "Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice." *Hepatology* 40(5): 1098-105.
- Ogi, M., H. Yokomori, et al. (2003). "Distribution and localization of caveolin-1 in sinusoidal cells in rat liver." *Med Electron Microsc* 36(1): 33-40.
- Oh, P., D. P. McIntosh, et al. (1998). "Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium." *J Cell Biol* 141(1): 101-14.
- Ohata, M. and T. Ito (1986). "Experimental study on the fine structure of chicken liver parenchyme with special references to extrasinusoidal macrophages and

- sinusoidal blood cells. Part 1. Sinusoidal cells and macrophages in the normal and India ink-perfused livers." *Arch Histol Jpn* 49(1): 83-103.
- Okamoto, T., A. Schlegel, et al. (1998). "Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane." *J Biol Chem* 273(10): 5419-22.
- Okano, J., G. Shiota, et al. (2003). "Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway." *Biochem. Biophys. Res Commun.* 309: 298-304.
- Olsen, P. S., S. S. Poulsen, et al. (1985). "Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands." *Gut* 26(9): 920-7.
- Orlichenko, L., B. Huang, et al. (2006). "Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells." *J Biol Chem* 281(8): 4570-9.
- Ostrom, R. S., J. D. Violin, et al. (2000). "Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes." *Mol Pharmacol Rev* 57: 1075-1079.
- Palade, G. E. (1953). "Fine structure of blood capillaries." *J Appl Physics* 24: 368-384.
- Park, D. S., B. Razani, et al. (2001). "Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism." *Biochemistry* 40: 3354-3362.
- Parolini, I., M. Sargiacomo, et al. (1999). "Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the Golgi complex." *J Biol Chem* 274: 25718-25725.
- Parton, R. G., B. Joggerst, et al. (1994). "Regulated internalization of caveolae." *J Cell Biol* 127(5): 1199-215.
- Parton, R. G. and K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3): 185-94.
- Parton, R. G., M. Way, et al. (1997). "Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation." *J Cell Biol* 136(1): 137-54.
- Patlolla, J. M., M. V. Swamy, et al. (2004). "Overexpression of caveolin-1 in experimental colon adenocarcinomas and human colon cancer cell lines." *Oncol Rep* 11(5): 957-63.
- Pawson, T. and J. D. Scott (1997). "Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins." *Science (Wash DC)* 278: 2075-2080.
- Pediaditakis, P., J. C. Lopez-Talavera, et al. (2001). "The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat." *Hepatology* 34: 688-693.
- Peters, M., G. Blinn, et al. (2000). "Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration." *Gastroenterology* 119: 1663-1671.
- Petersen, B., C. J. Yee, et al. (1994). "Distinct morphological and mito-inhibitory effects induced by TGF-beta 1, HGF and EGF on mouse, rat and human hepatocytes." *Cell Biol Toxicol* 10(4): 219-30.

- Pohl, J., A. Ring, et al. (2002). "Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway." *J Lipid Res* 43(9): 1390-9.
- Pol, A., S. Martin, et al. (2004). "Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant." *Mol Biol Cell* 15(1): 99-110.
- Pol, A., S. Martin, et al. (2005). "Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies." *Mol Biol Cell* 16(4): 2091-105.
- Pomfret, E. A., J. J. Pomposelli, et al. (2003). "Liver regeneration and surgical outcome in donors of right-lobe liver grafts." *Transplantation* 76(1): 5-10.
- Puyraimond, A., R. Fridman, et al. (2001). "MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells." *Exp Cell Res*: 28-36.
- Rabes, H. M., R. Wirsching, et al. (1976). "Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy." *Cell Tissue Kinet.* 9(6): 517-32.
- Radel, C., M. Carlile-Klusacek, et al. (2007). "Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction." *Biochem Biophys Res Commun* 358(2): 626-31.
- Rajjayabun, P. H., S. Garg, et al. (2001). "Caveolin-1 expression is associated with high-grade bladder cancer." *Urology* 58(5): 811-4.
- Razani, B., Y. Altschuler, et al. (2000). "Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation." *Biochemistry* 39(45): 13916-24.
- Razani, B., J. A. Engelman, et al. (2001). "Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities." *J Biol Chem* 276(41): 38121-38.
- Razani, B. and M. P. Lisanti (2001). "Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease." *J Clin Invest* 108(11): 1553-61.
- Razani, B., X. B. Wang, et al. (2002). "Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae." *Mol Cell Biol* 22(7): 2329-44.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." *Pharmacol Rev* 54(3): 431-467.
- Razani, B., X. L. Zhang, et al. (2001). "Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor." *J Biol Chem* 276(9): 6727-38.
- Refaat, B. A., A. O. Bahathiq, et al. (2004). "Production and localization of activins and activin type IIA and IIB receptors by the human endosalpinx." *Reproduction* 128(2): 249-55.
- Rodal, S. K., G. Skretting, et al. (1999). "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." *Mol Biol Cell* 10: 961-974.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* 68(4): 673-82.

- Rudolph, K. L., C. Trautwein, et al. (1999). "Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats." *Hepatology* 30: 1159-1166.
- Russell, W. E., W. K. Kaufmann, et al. (1996). "Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice." *Mol. Carcinog.* 15: 183-189.
- Rybin, V. O., X. Xu, et al. (2000). "Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway." *J Biol Chem* 275: 41447-41457.
- Sakamoto, T., Z. Liu, et al. (1999). "Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy." *Hepatology* 29: 403-411.
- Salatino, M., W. Beguelin, et al. (2006). "Progestin-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation." *Oncogene* 25(59): 7723-39.
- Sanchez, A., A. M. Alvarez, et al. (1999). "Apoptotic response to TGF-beta in fetal hepatocytes depends upon their state of differentiation." *Exp Cell Res* 252(2): 281-91.
- Sanderson, N., V. Factor, et al. (1995). "Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2572-6.
- Sanguinetti, A. R. and C. C. Mastick (2003). "c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14." *Cell Signal* 15(3): 289-98.
- Sanjo, H., K. Takeda, et al. (2003). "TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling." *Mol Cell Biol* 23(4): 1231-8.
- Sargiacomo, M., P. E. Scherer, et al. (1995). "Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization." *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9407-9411.
- Sargiacomo, M., M. Sudol, et al. (1993). "Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin- rich insoluble complex in MDCK cells." *J Cell Biol* 122: 789-807.
- Saxema, R., S. D. Zucker, et al. (2003). in *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. Saunders, Philadelphia, USA.
- Scheel, J., J. Srinivasan, et al. (1999). "Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans*." *Nat Cell Biol* 1(2): 127-9.
- Scherer, P. E., R. Y. Lewis, et al. (1997). "Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo." *J Biol Chem* 272(46): 29337-46.
- Scherer, P. E., M. P. Lisanti, et al. (1994). "Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles." *J Cell Biol* 127(5): 1233-43.
- Scherer, P. E., T. Okamoto, et al. (1996). "Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family." *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 131-135.

- Scherer, P. E., Z. Tang, et al. (1995). "Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe." *J Biol Chem* 270(27): 16395-401.
- Scheving, L. A., M. C. Stevenson, et al. (2002). "Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation." *Biochem Biophys Res Commun* 290: 197-203.
- Schlegel, A. and P. Lisanti M (2000). "A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 Cterminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo." *J Biol Chem* 275: 21605–21617.
- Schmidt, C., F. Bladt, et al. (1995). "Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development." *Nature* 373: 699-702.
- Schnitzer, J. E. (2001). "Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo." *Adv Drug Deliv Rev* 49(3): 265-80.
- Schnitzer, J. E., P. Oh, et al. (1994). "Filipin-sensitive caveola-mediated transport in endothelium: Reduced transcytosis, scavenger endocytosis and capillary permeability of select macromolecules." *J Cell Biol* 127: 1217–1232.
- Schwencke, C., S. Okumura, et al. (1999). "Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane." *J Cell Biochem* 75: 64–72.
- Sehgal, P. B. (2003). "Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling." *Acta Biochim Pol* 50(3): 583-94.
- Shah, V., S. Cao, et al. (2001). "Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(6): G1209-16.
- Shah, V., M. Toruner, et al. (1999). "Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat." *Gastroenterology* 117(5): 1222-8.
- Shajahan, A. N., A. Wang, et al. (2007). "Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity." *J Biol Chem* 282(8): 5934-43.
- Shevchenko, A., M. Wilm, et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* 68(5): 850-8.
- Shimizu, M., A. Hara, et al. (2001). "Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis." *Hepatology* 33(3): 569-76.
- Shinozuka, H., B. Lombardi, et al. (1978). "Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet." *Cancer Res* 38(4): 1092-8.
- Shridhar, V., Q. C. Sun, et al. (1997). "Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas." *Oncogene* 15(22): 2727-33.
- Sigal, S. H., P. Rajvanshi, et al. (1999). "Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events." *Am. J. Physiol.* 276(G1260-1272).

- Simionescu, N., M. Simionescu, et al. (1975). "Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels." *J Cell Biol* 64(3): 586-607.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31-9.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(23): 720-31.
- Smart, E. J., G. A. Graf, et al. (1999). "Caveolins, liquid-ordered domains and signal transduction." *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304.
- Song, K. S., S. Li, et al. (1996). "Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent free purification of caveolae membranes." *J Biol Chem* 271: 9690-9697.
- Song, K. S., M. Sargiacomo, et al. (1997). "Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation." *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* 43: 293-303.
- Song, K. S., P. E. Scherer, et al. (1996). "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins." *J Biol Chem* 271(25): 15160-5.
- Song, K. S., Z.-L. Tang, et al. (1997). "Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homotypic caveolin-caveolin interactions." *J Biol Chem* 272: 4398-4403.
- Sowa, G., M. Pypaert, et al. (2001). "Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae." *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14072-14077.
- Stolz, D. B. and G. K. Michalopoulos (1997). "Synergistic enhancement of EGF, but not HGF, stimulated hepatocyte motility by TGF-beta 1 in vitro." *J Cell Physiol* 170(1): 57-68.
- Su, A. I., L. G. Guidotti, et al. (2002). "Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11181-11186.
- Takabe, K., L. Wang, et al. (2003). "Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats." *Hepatology* 38(5): 1107-15.
- Talarmin, H., C. Rescan, et al. (1999). "The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes." *Mol Cell Biol* 19: 6003-6011.
- Tang, Z., P. E. Scherer, et al. (1996). "Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle." *J Biol Chem* 271(4): 2255-61.
- Tanuma, Y., M. Ohata, et al. (1983). "Electron microscopic studies on the sinusoidal cells in the monkey liver." *Arch Histol Jpn* 46(3): 401-26.
- Taub, R. (2003). in *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. Saunders, Philadelphia, USA, 2003, Zakim, D.Z. & Boyer, W.B.
- Taub, R. (2004). "Liver regeneration: from myth to mechanism." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 836-47.



- Thiele, C., M. J. Hannah, et al. (2000). "Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles." *Nat Cell Biol* 2: 42-49.
- Thoresen, H., T. Guren, et al. (2003). "Role of ERK, p38 and PI3-kinase in EGF receptor-mediated mitogenic signalling in cultured rat hepato-cytes: requirement for sustained ERK activation." *Cell Physiol Biochem* 13: 229-238.
- Tirado, O. M., S. Mateo-Lozano, et al. (2006). "Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells." *Cancer Res* 66(20): 9937-47.
- Tomiya, T. and K. Fujiwara (1993). "Serum levels of transforming growth factor-alpha in patients after partial hepatectomy as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay." *Hepatology* 18: 304-308.
- Tomiya, T., S. Hayashi, et al. (1997). "Serum transforming growth factor-alpha level can be a parameter for evaluating liver regeneration after partial hepatectomy in patients with liver cancer." *Semin. Oncol.* 24: S6.
- Tomiya, T., I. Ogata, et al. (2000). "The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor-alpha." *Am. J Pathol.* 157: 1693-1701.
- Tomiya, T., M. Tani, et al. (1992). "Serum hepatocyte growth factor levels in hepatectomized and nonhepatectomized surgical patients." *Gastroenterology* 103(5): 1621-4.
- Veluthakal, R., I. Chvyrkova, et al. (2005). "Essential role for membrane lipid rafts in interleukin-1beta-induced nitric oxide release from insulin-secreting cells: potential regulation by caveolin-1+." *Diabetes* 54(9): 2576-85.
- Vereb, G., J. Szollosi, et al. (2003). "Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8053-8.
- Volonte, D., F. Galbiati, et al. (2001). "Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress." *J Biol Chem* 276(11): 8094-103.
- Volonte, D., Y. Liu, et al. (2005). "The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair." *Faseb J* 19(2): 237-9.
- Webber, E. M., M. J. FitzGerald, et al. (1993). "Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor." *Hepatology* 18: 1422-1431.
- Webber, E. M., P. J. Godowski, et al. (1994). "In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus." *Hepatology* 19: 489-497.
- Webber, E. M., J. C. Wu, et al. (1994). "Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice." *Am J Pathol* 145: 398-408.
- Westwick, J. K., C. Weitzel, et al. (1995). "Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration." *J. Clin. Invest.* 95: 803-810.

- White, P., J. E. Brestelli, et al. (2005). "Identification of Transcriptional Networks during Liver Regeneration." *J Biol Chem* 280: 3715-3722.
- Wiechen, K. (2001). "Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene." *Am. J. Pathol.* 159: 1635-1643.
- Williams, T. M. (2004). "Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion." *J. Biol. Chem.* 279: 51630-51646.
- Williams, T. M., M. W. Cheung, et al. (2003). "Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice." *Mol Biol Cell* 14: 1027-1042.
- Williams, T. M., G. S. Hassan, et al. (2005). "Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice." *J Biol Chem* 280(26): 25134-45.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2005). "Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis." *Am J Physiol Cell Physiol* 288(3): C494-506.
- Yamada, E. (1955). "The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse." *J Biophys Biochem Cytol* 1(5): 445-58.
- Yamada, Y., I. Kirillova, et al. (1997). "Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 1441-1446.
- Yamamoto, M., Y. Toya, et al. (1999). "Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling." *Exp Cell Res* 247(2): 380-8.
- Yanagi, S. and V. R. Potter (1977). "Sequential changes in ornithine decarboxylase thymidine kinase, and other enzyme activities in regenerating liver in rats on controlled feeding schedules." *Life Sci.* 20(9): 1509-19.
- Yang, G., T. L. Timme, et al. (2005). "Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression." *Cancer* 103(6): 1186-94.
- Yerian, L. M., R. A. Anders, et al. (2004). "Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis." *Am J Surg Pathol* 28(3): 357-64.
- Yokomori, H., M. Oda, et al. (2002). "Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis." *Liver* 22(2): 150-8.
- Yokomori, H., M. Oda, et al. (2003). "Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide." *J Gastroenterol* 38(9): 854-60.
- Zeini, M., S. Hortelano, et al. (2004). "Simultaneous abrogation of NOS-2 and COX-2 activities is lethal in partially hepatectomised mice." *J Hepatol* 40(6): 926-33.
- Zimmers, T. A., I. H. McKillop, et al. (2003). "Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration." *Hepatology* 38: 326-334.
- Zundel, W., L. M. Swiersz, et al. (2000). "Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide." *Mol Cell Biol* 20(5): 1507-14.



