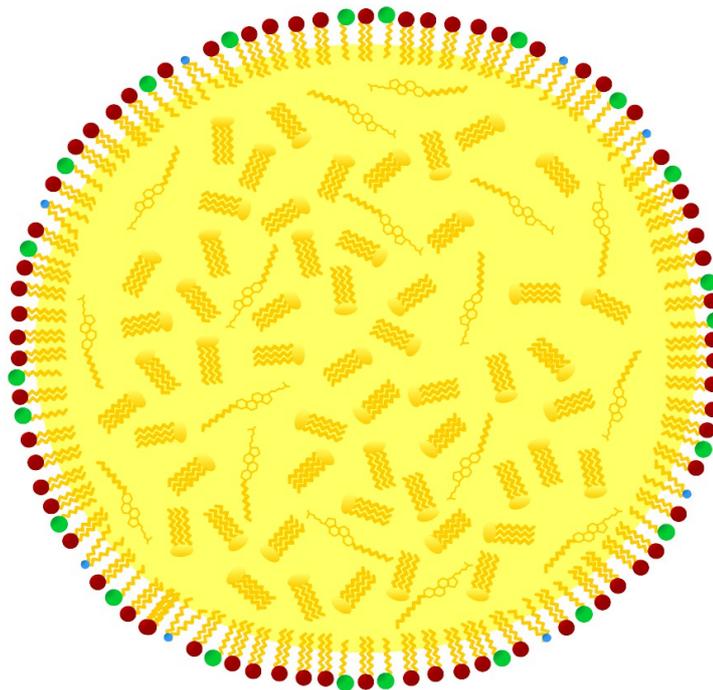


## Trabajo Fin de Máster

# Regulación de la formación de gotas lipídicas en células humanas



Memoria presentada por Rafael Sánchez Martínez  
Tutor: Jesús Balsinde

Septiembre 2015

Máster en Investigación Biomédica  
Curso 2014-2015

TRABAJO FIN DE MÁSTER

*"Regulación de la formación de gotas lipídicas en células humanas"*

Estudiante:

Tutor:

Fdo. Rafael Sánchez Martínez

Fdo. Jesús Balsinde

# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
Biogénesis.....	3
Metabolismo de la biogénesis.....	4
Funciones de las gotas lipídicas.....	7
Hipótesis y objetivos.....	9
<b>Materiales y métodos</b> .....	10
Células THP-1.....	10
Estimulación de las células.....	10
Complejación 2:1 de ácidos grasos con albúmina.....	10
Microscopía de fluorescencia.....	11
Citometría de flujo.....	12
<b>Resultados</b> .....	13
Formación de gotas lipídicas inducida por LPS.....	13
Formación de gotas lipídicas inducida por diferentes ácidos grasos.....	14
Control de formación de LD por albúmina.....	14
Ácido araquidónico y ácido oleico.....	16
Ácido palmítico, ácido palmitoleico, 16:1 n-9, ácido $\alpha$ -linolénico, EPA, DHA.....	16
Dosimetrías de AA y ácido oleico.....	18
Estudios mediante microscopía de fluorescencia.....	19
Formación de LD a concentraciones saturantes de ácidos grasos...20	
<b>Discusión</b> .....	21
<b>Conclusiones</b> .....	22
<b>Bibliografía</b> .....	23

## **Abreviaturas**

AA: Ácido araquidónico

AG: Ácido graso

ATGL: Triacilglicerol lipasa del tejido adiposo (del inglés Adipose Tissue Triacylglycerol Lipase)

BSA: Albúmina del suero bovino (del inglés Bovine Serum Albumin)

DHA: Ácido docohexaenoico (del inglés Docohexaenoic Acid)

EC: Éster de colesterol

EPA: Ácido eicosapentaenoico (del inglés Eicosapentaenoic Acid)

LD: Gotas lipídicas (del inglés Lipid Droplets)

LPS: Lipopolisacárido

MAG: Monoacilglicerol

PA: Ácido fosfatídico (del inglés Phosphatidic Acid)

PC: Fosfatidilcolina (del inglés Phosphatidylcholine)

PE: Fosfatidiletanolamina (del inglés Phosphatidylethanolamine)

PI: Fosfatidilinositol (del inglés Phosphatidylinositol)

PL: Fosfolípido (del inglés Phospholipid)

TAG: Triacilglicerol

## Introducción

Las gotas lipídicas (LD) son orgánulos compuestos principalmente de lípidos presentes en casi todos los organismos, desde procariontas a células humanas. En humanos se encuentran principalmente en tejido adiposo (donde forman una gran gota en los adipocitos), en hígado y en células relacionadas con la respuesta inflamatoria.

El tamaño y el número de LDs varía entre tipos celulares y dentro de un mismo tipo, dependiendo del estado de activación de las células [1] o como resultado de una especialización celular. Por ejemplo, en el tejido hepático, algunas células aisladas presentan muchas más gotas lipídicas que sus vecinas [8], lo que probablemente constituye un mecanismo para reducir la lipotoxicidad en la mayoría de células del tejido.

Su formación y acumulación en la célula se puede deber a diversas causas; como consecuencia de la necesidad de almacenar ácidos grasos (AG) debido a su exceso en patologías como la obesidad o la aterosclerosis, pero también por causas no relacionadas con la necesidad de almacenar lípidos, como por ejemplo en respuesta a estrés celular, procesos como cardiomiopatías y neuropatías, e incluso durante procesos de infección viral hepática por virus como el VIH o el virus de la hepatitis C [8].

Las gotas lipídicas no están rodeadas por una bicapa fosfolipídica, sino por una monocapa externa de fosfolípidos (PL) [2]. Las especies de fosfolípidos presentes son fosfatidilcolina (PC) en un 50-60%, fosfatidiletanolamina (PE) en un 20-30% y en menor medida fosfatidilinositol (PI) y plasmalógenos con cabezas de etanolamina y colina [9]. Su interior es rico en lípidos neutros como triacilglicerol (TAG) y ésteres de colesterol (EC), y puede presentar dominios membranosos complejos (Figura 1) [3].

En leucocitos y otras células, las LD contienen varias proteínas con diversas funciones. Presentan proteínas estructurales en su superficie, principalmente las pertenecientes a la familia PAT (como perilipina, ADRP y TIP 47), proteínas implicadas en la formación de estos orgánulos. También contienen y compartimentalizan enzimas relacionadas con la síntesis, el transporte y el catabolismo lipídico, proteínas involucradas en el transporte vesicular, proteínas del metabolismo de los eicosanoides, protein-quinasas como PKC, PI3K y MAP quinazas, así como proteínas del metabolismo de eicosanoides.

En resumen, las gotas lipídicas son dominios citoplasmáticos inducibles y especializados que funcionan como orgánulos participando en la señalización celular, en la activación y regulación del metabolismo lipídico, en el tráfico de membrana y en la síntesis y secreción

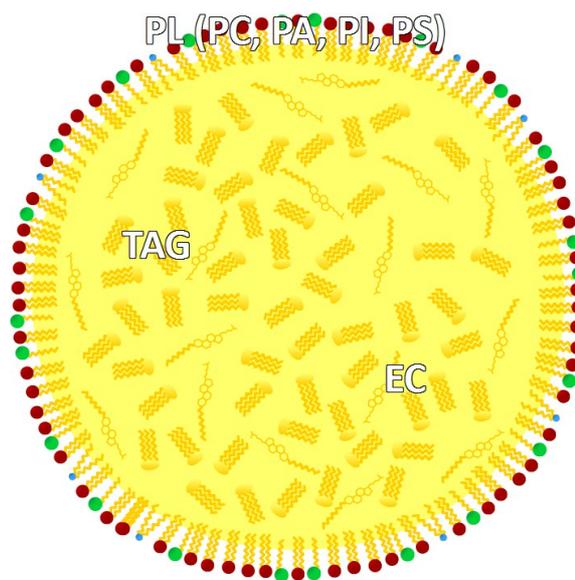


Figura 1. Esquema de la composición de una gota lipídica

de mediadores de la inflamación (eicosanoides). Se les considera la clave de varias enfermedades inflamatorias, los marcadores principales de la activación de los leucocitos y una buena diana de futuros tratamientos antiinflamatorios. [1]

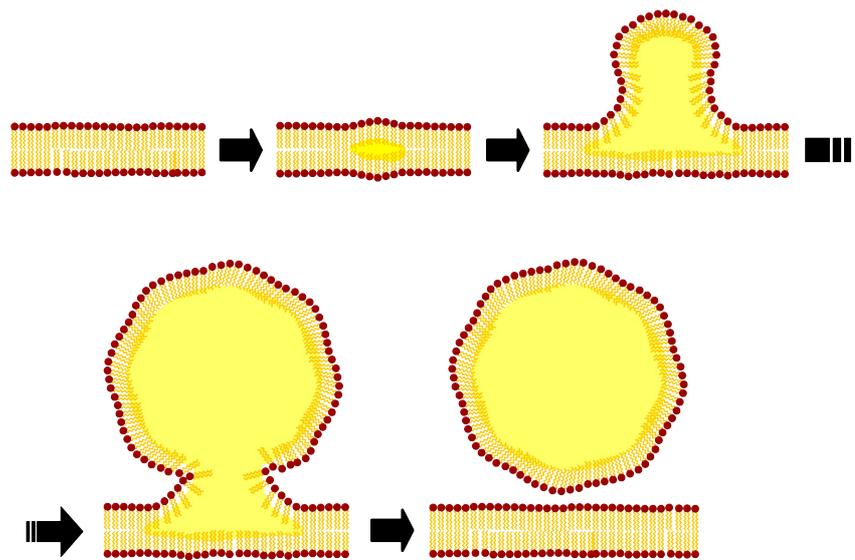
### **Biogénesis**

Como se ha comentado anteriormente, los leucocitos contienen algunas gotas lipídicas de manera basal. Sin embargo, cuando estos se activan, rápidamente se induce la biogénesis de estos orgánulos.

Una gran variedad de estímulos es capaz de inducir esa producción, estímulos inmunes como una infección bacteriana, así como otros eventos patológicos como la obesidad y la presencia de LDL oxidadas. La presencia de ácidos grasos hace que se generen estos orgánulos con el fin de almacenarlos y evitar sus efectos lipotóxicos, además de servir como almacenamiento energético. El estrés celular también puede inducir la génesis de las LD, aunque no se conoce la razón biológica ni si las LD forman parte de un mecanismo de defensa frente al estrés celular.

Las LD se generan probablemente a partir del retículo endoplasmático (RE) y se han propuesto varios modelos de su formación:

El modelo de "budding" explica la formación de estos orgánulos a partir de la acumulación de enzimas del metabolismo lipídico en dominios específicos del RE, donde se empezaría a sintetizar y acumularse lípidos neutros entre las dos monocapas de la membrana. Esa acumulación alcanzaría un tamaño crítico se separa de la membrana del RE, rodeado por la monocapa que deriva de la membrana del RE (Figura 2). Hasta ahora es el modelo más aceptado y el que tomaremos como cierto en este trabajo.



**Figura 2. Esquema del modelo de biogénesis "budding"**

Otros modelos propuestos son el "egg cup" y el "enfolding model". Según el primero, la formación de las LD se produciría en contacto con el RE, pero no dentro de este, y se formarían en agrupaciones ricas en ADRP (Adipose Differentiation-Related Protein) de la membrana del RE, desde donde se les transferirían los lípidos necesarios para su formación. El segundo modelo combina conceptos de los dos modelos anteriores, según éste, las LD se formarían pegadas al RE e incorporarían la membrana del RE.

## Metabolismo de la biogénesis

Los triacilgliceroles y ésteres de colesterol que se acumularán en la membrana del retículo endoplasmático se sintetizan a partir de los ácidos grasos que se encuentran en ese mismo lugar. Las bicapas lipídicas pueden contener hasta un 3-5% (en proporción molar) hasta que se produce la formación de agrupaciones esféricas de aproximadamente 25-28 nm de diámetro entre las dos láminas de la membrana. Estas formaciones son probablemente los precursores de las LD que posteriormente se separan de la membrana [9]

Los pasos necesarios para la formación de las LD son: activación de los ácidos grasos (formación de los acil-CoAs), síntesis de lípidos neutros (principalmente TAG), y síntesis y remodelación de fosfolípidos [9].

### Activación de ácidos grasos

Los ácidos grasos libres deben ser esterificados con coenzima A (CoA) para activarse y poder participar en reacciones de esterificación con otros compuestos. Esta reacción la llevan a cabo las acil-CoA sintetasas (o ACS) (Figura 3-a).

Además de activar los AG para que puedan formar TAG y PL posteriormente, también pueden actuar como transportadores de AG y regular la captación de éstos. Al ser dependientes de ATP modifican el equilibrio AMP/ATP y probablemente se relacionen por ello con la señalización mediada por AMP quinasas. También son capaces de formar complejos con otras proteínas y formar microdominios en el RE en las zonas de génesis de las LD. En estos complejos se produce a la vez la activación de los ácidos grasos y su esterificación para formar lípidos neutros, lo que aumenta la eficiencia del proceso. Además de con enzimas del metabolismo lipídico, también se relacionan con otras proteínas relacionadas con las LD, como por ejemplo proteínas adaptadoras (Espartina/SPG20, ancient ubiquitous protein 1/AUP1) que regulan el tamaño y el número de las LD nacientes.

### Síntesis de lípidos neutros

Los lípidos neutros componen el núcleo que rodea la monocapa exterior de las LD, siendo los más abundantes los TAG y los ésteres de colesterol. Aunque existen otras vías y lugares de síntesis de lípidos neutros, éstos se producen mayoritariamente en el RE mediante la acción de 4 enzimas a partir de glicerol-3-fosfato y AG activados (Figura 3-b).

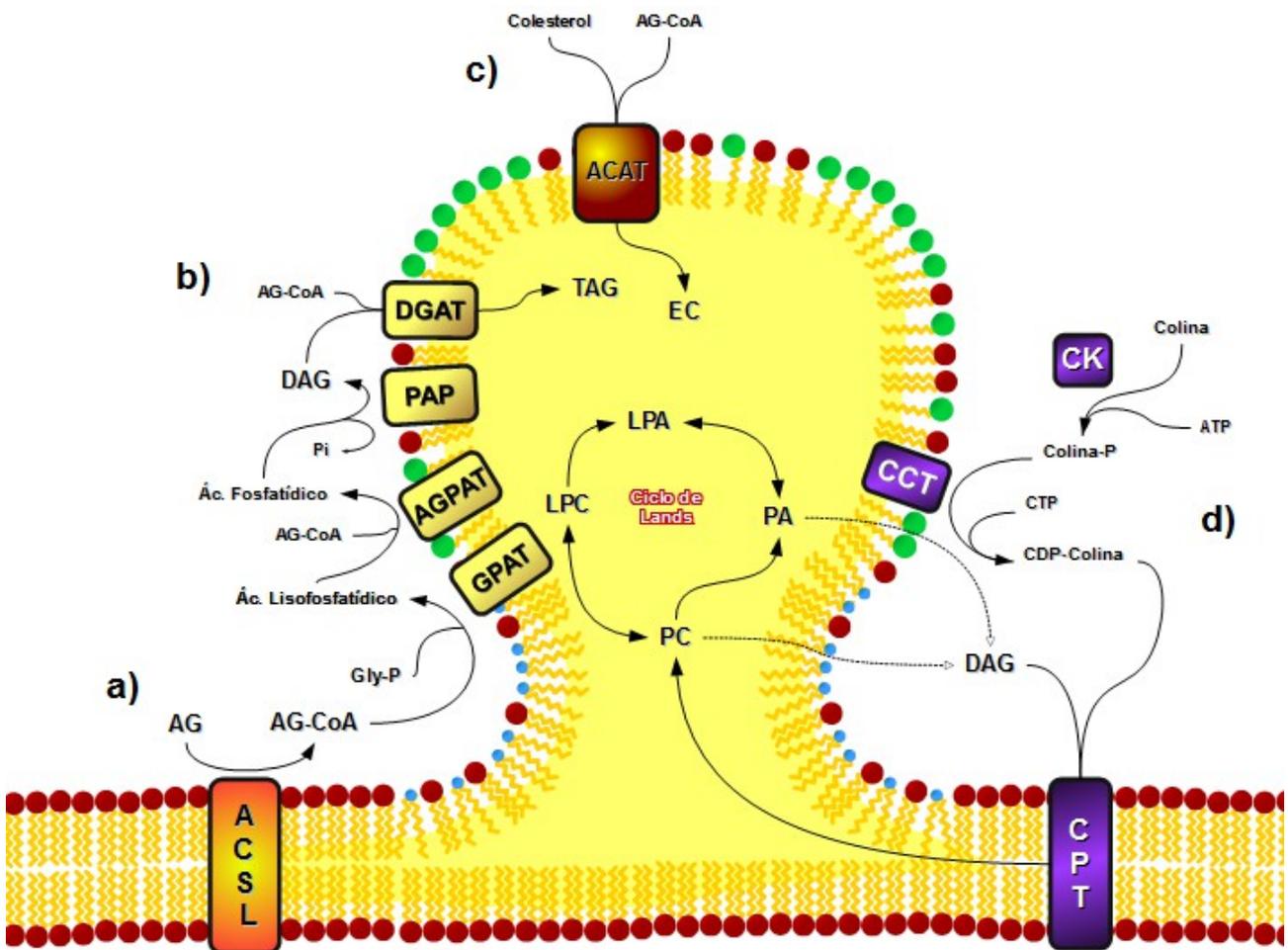
En primer lugar se produce la esterificación de un AG al glicerol-3-fosfato, formando ácido lisofosfatídico. Esta reacción es llevada a cabo por la glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa o GPAT. Posteriormente, la 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa o AGPAT esterifica otro AG para formar ácido fosfatídico. A esta reacción le sigue la pérdida del fosfato catalizada por una fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP) o lipina, resultando en diacilglicerol (DAG). Finalmente un tercer AG activado es esterificado para formar TAG por la diacilglicerol aciltransferasa o DGAT, ya sea su isoforma DGAT1 o DGAT2.

La síntesis de ésteres de colesterol, pese a ser más simple no por ello es menos importante, ya que estas especies están muy presentes en los núcleos de las LD. Simplemente, a una molécula de colesterol le une un ácido graso activado (acil-CoA) una

acil-CoA:colesterol O-transferasa (ACAT 1 o 2) para formar un éster de colesterol (Figura 3-c).

Excepto la PAP/lipina (que se localiza en el citosol), todas las enzimas mencionadas se encuentran de forma basal distribuidas por todo el RE. Cuando se activa la biogénesis de LD, algunas de ellas translocan a las gotas lipídicas mientras que otras como AGPAT1/2 y DGAT1 permanecen exclusivamente en el retículo endoplasmático, sintetizando lípidos neutros que posteriormente alcanzarán el lugar de formación de LD por difusión. A las LD transloca al menos un miembro de cada familia involucrada en cada uno de los pasos de síntesis de TAG descritos anteriormente (GPAT4, AGPAT3, PAP y DGAT2).

Esta diferencia es consecuencia del tipo de dominio hidrofóbico que presenten las proteínas para su anclaje a la membrana. Como las LD están rodeadas de una monocapa de fosfolípidos, las proteínas ancladas a la membrana por un dominio que atraviese la bicapa lipídica completamente (por ejemplo tipo hélice) no pueden acceder a las LD, mientras que aquellas que posean un dominio más pequeño (por ejemplo tipo horquilla) que solo interactúe con una de las dos monocapas de la membrana difunden a las LD sin problema. [10]

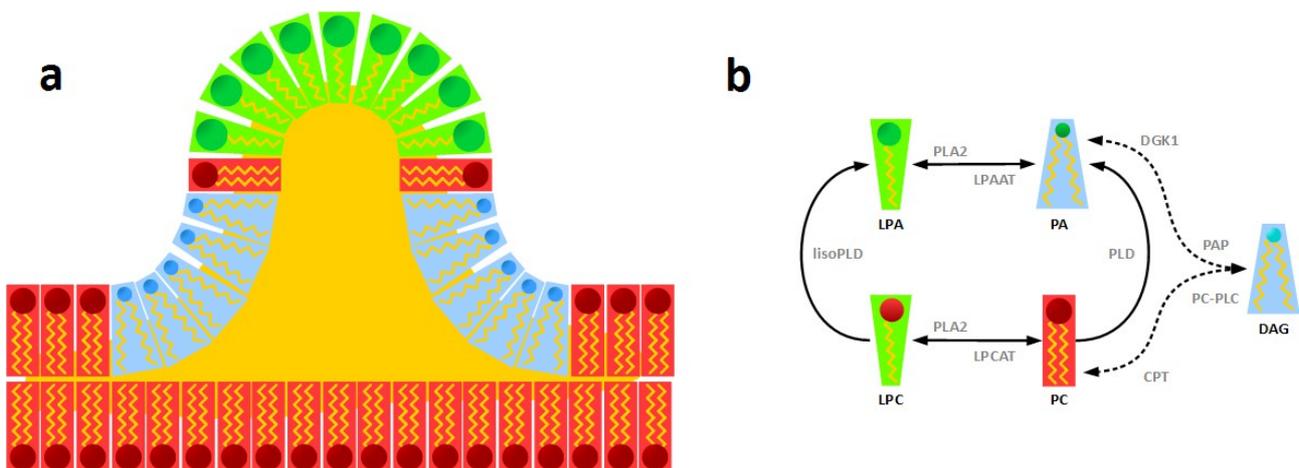


**Figura 3: Esquema de los procesos enzimáticos (activación de AG, síntesis de TAG y EC, síntesis y remodelación de PL) que ocurren durante la biogénesis de las LD. El ciclo de Lands aparece simplificado y en el interior de la masa de lípidos neutros en vez de en la membrana.**

Existen dos vías principales de generación de PL; la síntesis de novo de fosfatidilcolina (vía de Kennedy) y la remodelación (ciclo de Lands).

La síntesis de novo de fosfolípidos es necesaria para apoyar el crecimiento de la gota lipídica, así como para facilitar la remodelación necesaria entre especies de fosfolípidos (Figura 3-d). La síntesis comienza con la fosforilación de una molécula de colina llevada a cabo por la colina quinasa. La colina-fosfato resultante es activada cuando la CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT) cataliza la adición de citidin-trifosfato (CTP) a la colina-fosfato para formar CDP-colina. Este es el paso limitante de la vía de Kennedy y en el cual se produce la regulación. La CCT1 se encuentra en el núcleo, y transloca a las LD nacientes, ya que esta se une a membranas pobres en fosfatidilcolina (PC), especie escasa al comienzo de la biogénesis. El último paso de la síntesis de novo es la unión de DAG a la colina activada, catalizada por la CDP-colina fosfotransferasa (CDT). Esta reacción se localiza en el RE, por lo que la PC sintetizada debe difundir a la LD naciente.

Al contrario que la vía de Kennedy, el ciclo de Lands puede operar por completo en las gotas lipídicas. La remodelación entre tipos de fosfolípidos ayuda a establecer las curvaturas necesarias para la formación de las LD, ya que cada especie de fosfolípido favorece una curvatura diferente según su forma (Figura 4-a). Lisofosfatidilcolina, ácido lisofosfatídico, lisofosfatidiletanolamina y los monoacilglicerol (MAG) favorecen una curvatura positiva, mientras que DAG, EC, ácido fosfatídico y PE favorecen una curvatura negativa y PE favorecen una curvatura negativa. Otras especies sin embargo son "neutras" y no favorecen ningún tipo de curvatura, como la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina [11]. La familia de las fosfolipasas  $A_2$  ( $PLA_2$ ), que hidrolizan un ácido graso de los fosfolípidos para generar lisofosfolípidos, mientras que las aciltransferasas del ácido lisofosfatídico (LPAAT) y de la lisofosfatidilcolina (LPCAT) esterifican un ácido graso a esos lisofosfolípidos para formar ácido fosfatídico (PA) y PC. La fosfolipasa D (PLD) es capaz de transformar la PC en PA, mientras que la lisoPLD hace lo propio convirtiendo la lisofosfatidilcolina en ácido lisofosfatídico [9] (Figura 4-b).



**Figura 4. Importancia de los fosfolípidos en la biogénesis de LD.** a) Diferentes especies de PL deben estar presentes para lograr la curvatura necesaria para la formación de las LD b) Ciclo de Lands: En este ciclo se intercambian las distintas especies de PL. Solo las reacciones representadas con flecha de línea continua corresponden al ciclo de Lands.

## **Funciones de las gotas lipídicas**

Las gotas lipídicas presentan una gran variedad de funciones. La más evidente y probablemente la razón de su aparición en organismos inferiores como las levaduras es el almacenamiento de lípidos. Esta función protege de la lipotoxicidad de los ácidos grasos, almacenándolos en forma de moléculas inertes como el triacilglicerol. Por esta razón, las LD son abundantes en tejidos relacionados con el metabolismo de lípidos, como el tejido adiposo, intestino e hígado, aunque están presentes en muchos otros tejidos no relacionados directamente con el almacenamiento lipídico tales como el músculo esquelético, la corteza de la glándula suprarrenal, glándulas mamarias y células del sistema inmune como los macrófagos.

Las LD proporcionan ácidos grasos cuando éstos son necesarios en condiciones de escasez de nutrientes. Estudios de marcaje fluorescente demostraron una rápida difusión y catabolismo de los AG almacenados en las LD como TAG en las mitocondrias. La razón propuesta para la rapidez de este proceso es que las LD interactúan directamente con las mitocondrias y se produce una transferencia directa que evita la lentitud de la difusión por el citoplasma (anulando también los efectos lipotóxicos que estos AG podrían producir). Esta asociación directa con las LD no sería exclusiva de la mitocondria, ya que en levaduras se ha descrito este tipo de interacción con los peroxisomas, orgánulos donde también se produce la oxidación de AG.

Su segunda función importante es la que realizan en el sistema inmune. Las LD constituyen un lugar de almacenamiento del ácido araquidónico, el precursor de los eicosanoides, moléculas señalizadoras de la respuesta inmune. Debido a que una cantidad considerable del AA se almacena principalmente en ellas, la regulación de su metabolismo y formación de eicosanoides se controla y produce en parte en estos orgánulos.

Sin embargo, recientemente nuevas funciones de las LD están siendo descubiertas, no siendo todas ellas evidentes ni relacionadas con los lípidos, como su capacidad para secuestrar proteínas y evitar su translocación al núcleo, siendo capaces de unir enzimas, factores de transcripción e incluso histonas. Sin embargo, estos hallazgos se han producido mayoritariamente en embriones de *Drosophila* y tejido murino. [8]

### **LDs y el metabolismo lipídico**

La función de almacenamiento y movilización de ácidos grasos como TAG de las LD ocurre principalmente en el tejido adiposo (tanto en el tejido adiposo blanco como en el marrón). Neutralizar la concentración de ácidos grasos libres en las células es importante ya que estos producen efectos nocivos. Una concentración alta de ácidos grasos libres afecta a la integridad de las membranas, altera el equilibrio ácido-base y sirven como precursor de metabolitos dañinos. Estos efectos conducen a estrés del RE, fallo mitocondrial e inflamación [14]. Es por ello por lo que los ácidos grasos libres son esterificados en forma de TAG y almacenados en las LD.

En condiciones en las que esos ácidos grasos son necesarios para la generación de energía, deben ser liberados y movilizados a los lugares donde se produce la beta-oxidación de los ácidos grasos (mitocondria y peroxisomas). Esta movilización se produce en tres pasos catalizados por tres enzimas respectivamente.

El primer paso es la hidrólisis de un ácido graso del TAG para liberarse. Esta reacción es catalizada por la triacilglicerol-lipasa del tejido adiposo (ATGL por sus siglas en inglés), y reporta un ácido graso libre más DAG. La ATGL es la enzima más importante del proceso de lipólisis, siendo responsable aproximadamente un 70% de los ácidos grasos libres que se producen. ATGL presenta una alta afinidad sólo por TAG, y no es capaz de metabolizar otras especies de lípidos neutros como DAG, MAG ni EC. Recientemente se ha descrito que también es capaz de movilizar ácido araquidónico presente en TAG para la formación de eicosanoides [16] en mastocitos (ver apartado a continuación), aunque esta función queda por demostrar en otros tipos de células

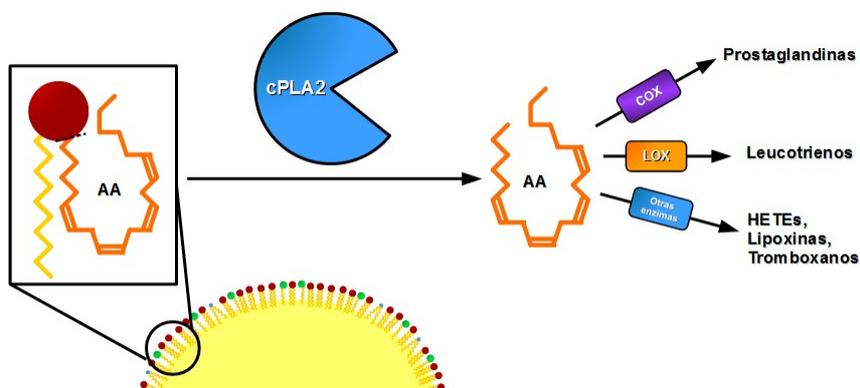
La lipasa sensible a hormonas (HSL por sus siglas en inglés) se encarga de hidrolizar el DAG en MAG y un ácido graso libre. Al contrario que ATGL, HSL presenta afinidad por otras especies de lípidos neutros como TAG, MAG y EC, aunque su afinidad por DAG es mayor que para todas esas especies. Este paso produce el 25% aproximadamente de los ácidos grasos generados por la lipólisis.

Finalmente el MAG es hidrolizado por la monoacilglicérido lipasa (MGL por sus siglas en inglés) para resultar en glicerol y un ácido graso libre. [15]

### Síntesis de eicosanoides

La función de las LD en el sistema inmune esta relacionada principalmente con el metabolismo del ácido araquidónico (AA) para la síntesis de mediadores lipídicos de la inflamación, los eicosanoides. El AA es su sustrato base de todos ellos, y generalmente no se encuentra libre en las células sino que está esterificado mayoritariamente en fosfolípidos, aunque también se puede encontrar en lípidos neutros. El AA es un ácido graso de 20 carbonos con 4 insaturaciones (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, 20:4n-6). El AA se obtiene de la dieta o del ácido linoleico (18:2n-6) mediante síntesis enzimática.

Como eicosanoides se denomina a todo un conjunto de moléculas lipídicas, englobando las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos entre otros. Todos ellos poseen funciones relacionadas con la inflamación (quimiotaxis, producción de citoquinas, regulación de la vasoconstricción, etc).



**Figura 5. Movilización del ácido araquidónico.** El AA que se encuentra esterificado en los PL de membrana de las LD es movilizado por la cPLA2, que rompe el enlace en la posición sn2 del fosfolípido

La producción de los eicosanoides está regulada por la disponibilidad del AA, altamente controlada por el equilibrio entre las reacciones de liberación del AA y las de reacilación. En las células inflamatorias, el AA se almacena principalmente en los PL como PC, PE y PI, aunque también se puede encontrar en los TAG. Sin embargo, es de los PL de donde se cree que se libera mayoritariamente el AA para la producción de eicosanoides por fosfolipasas A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), que hidrolizan el AA presente en la posición sn2 de los PL. Se ha descrito la liberación de AA de la monocapa de PL que rodea las LD, de la membrana de fagosomas y retículo endoplasmático, así como de la envoltura nuclear.

La reincorporación del AA en los PL se produce preferentemente en PC y PI, por las aciltransferasas dependientes de CoA como LPCAT y LPIAT. Una vez incorporado a PC se puede producir la transferencia del AA a PE mediante aciltransferasas independientes de CoA como CoA-IT [5]. Esta reacilación se sigue produciendo incluso cuando se ha activado la liberación de AA, dado que de la gran cantidad de AA liberada solo una pequeña parte de ésta es transformada en eicosanoides. [3]

### **Hipótesis y objetivos**

Para estudiar cualquier aspecto relacionado con el metabolismo lipídico, la síntesis de eicosanoides y cualquier otro proceso en el cual participen las LD en un tipo celular (en este caso, una línea celular con características de monocito), es necesario conocer de qué manera se puede estimular óptimamente la biogénesis de estos orgánulos y conocer las características de las LD que se forman. Este trabajo pretende estudiar la formación de LD en la línea celular monocítica THP-1 estimuladas con LPS y diversos ácidos grasos, cuantificando la inducción de biogénesis de estos orgánulos mediante citometría de flujo y caracterizando su morfología y número mediante microscopía de fluorescencia.

## **Materiales y métodos**

### **Células THP-1**

THP-1 es una línea celular establecida a partir de la sangre de un paciente joven con leucemia monocítica aguda. La línea presenta características de monocito y también puede ser diferenciada a macrófago con ésteres de forbol [27]. Sin diferenciar no es adherente y se cultiva en suspensión en medio RPMI complementado con suero bovino fetal inactivado al 10% (v/v), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 mg/ml).

### **Estimulación de las células**

Se distribuyen 5 millones de células en 5 ml de medio RPMI sin suero, permaneciendo así una hora hasta la estimulación. Pasado el tiempo, se añade el estímulo a la concentración indicada y se espera el tiempo correspondiente, tras lo cual las células son recogidas en tubos falcon pequeños y centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos. Para recoger bien las células es necesario golpear suavemente el frasco de cultivo, porque aunque las células no son adherentes, muchas se pegan suavemente al fondo. Tras eliminar el sobrenadante, se añade 1 ml de PBS 1x y se pasan a un tubo eppendorf, donde se procede a fijar para microscopía o citometría.

### **Complejación 2:1 de ácidos grasos con albúmina**

Los ácidos grasos utilizados para estimular las células se complejan en una relación 2:1 con albumina de suero bovino (BSA) al 20% (equivalente aproximadamente a una concentración de 3 mM) siguiendo el método descrito por *Listenberger et al* [19]. Se procede a la preparación de 2 ml del ácido graso complejado a una concentración de 10mM, de la que luego se añade la cantidad necesaria a las células para obtener la concentración final deseada.

Según si el ácido graso ya se encontraba disuelto o se encontrara en estado sólido (como en el caso del ácido palmítico) se procede de distinta manera. Si es necesario pesarlo, se pesa una cantidad equivalente a 0,02 moles en un tubo eppendorf y se añade 1 ml de NaOH 0,01M. Finalmente, se lleva al termobloque a 70 °C durante 30 minutos. Si el ácido graso ya se encontraba disuelto, se toma un volumen que contenga 2  $\mu$ M del ácido graso en un tubo eppendorf y se evapora el disolvente en el speed vacuum durante 10 minutos, tras lo cual se agregan 200  $\mu$ L de NaOH y se deposita el tubo eppendorf en el termobloque a 70°C durante 30 minutos.

Durante el tiempo en el cual los ácidos grasos permanecen en el termobloque, se agitan cada 10 minutos aproximadamente, procurando tenerlos el mínimo tiempo posible fuera de él, de lo contrario, algunos ácidos grasos (especialmente el ácido palmítico) pueden precipitar. Transcurrido el tiempo se añade un volumen de NaOH 1M en proporción 1:50 (20  $\mu$ L al ml completo y 4  $\mu$ L a los 200  $\mu$ L), y se lleva el termobloque a la campana de cultivos para la complejación.

En tubos eppendorf de 2 ml se prepara previamente la albúmina y se añade medio RPMI sin suero (el medio en el cual se encuentran las células durante la estimulación) para añadir posteriormente el ácido graso. Los volúmenes son los siguientes:

Para el ácido graso que se encontraba en estado sólido; 1566  $\mu$ L de medio incompleto RPMI, 334  $\mu$ L de BSA 20% y 100  $\mu$ L de la preparación del ácido graso (cuya concentración era 20 mM).

Para el ácido graso que se encontraba disuelto; 166  $\mu$ L de medio incompleto RPMI, 334  $\mu$ L de BSA 20% y 200  $\mu$ L de la preparación del ácido graso (cuya concentración era 10 mM).

Finalmente todos los preparados se filtran con filtros de 0,22  $\mu$ m de tamaño de poro.

### **Microscopía de fluorescencia**

Para el análisis mediante microscopía se siguió el protocolo de *Guijas et al* [26], modificado para su uso en células en suspensión. Los tubos eppendorf obtenidos como se indica en el apartado de estimulación se centrifugan a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar el PBS. Las células se resuspenden en 500  $\mu$ L de una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) sacarosa 3% (p/v) a 37° C, y se mantienen durante 30 minutos. Para eliminar la solución de paraformaldehído/sacarosa se centrifugan las células de nuevo a 2000 rpm durante 5 minutos y se lava en PBS 1x (eliminando el sobrenadante, resuspendiendo en 1 ml de PBS 1x, centrifugando a 2000 rpm 5 minutos y eliminando el sobrenadante de nuevo). A continuación se resuspende el pellet en 1mL de Bodipy 493/503 a una concentración de 2  $\mu$ g/ml disuelto en PBS 1x, y se mantiene en oscuridad (el tubo eppendorf envuelto en papel de aluminio) durante 10 minutos agitando en el vortex cada 2,5 – 5 minutos. Se lava en PBS 1x de nuevo y se resuspende en 1mL de DAPI 1 $\mu$ g/ml disuelto en PBS 1x y se mantiene en oscuridad 10 minutos agitando en el vortex cada 2,5 – 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se vuelve a lavar con PBS 1x y se procede al montaje. Tras haber eliminado todo el PBS 1x sobrenadante (con especial esmero en este paso, ya que cuanto menos sobrenadante haya menos líquida quedará la preparación en el medio de montaje), se resuspende la muestra en 25  $\mu$ L de Gelvatol. Esta cantidad se distribuye en dos gotas sobre un portaobjetos. Las gotas se cubren con cubreobjetos circulares de 12mm, presionando suavemente para eliminar todas las burbujas que puedan quedar bajo el cristal, tras lo cual se dejan las muestras en oscuridad. Transcurridas al menos 12 horas, el Gelvatol rebosante de los cristales ya está sólido y se retira con unas pinzas de punta fina y se fijan los cristales en su sitio con unas gotas de laca de uñas. Finalmente, una vez la laca esté seca se procede a la toda de las muestras en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i equipado con una cámara CCD (modelo DS-Ri1; Nikon, Tokyo, Japón). Se usó una lámpara de excitación HBO de mercurio (Osram, Munich, Alemania). Para la fluorescencia de DAPI se usó el filtro UV-2A (Ex 330-380; DM 400; BA 420) y para el Bodipy 493/503 se usó el B-2A (Ex 450-490; DM 505; BA 520). Las imágenes se tomaron con el programa NIS-Elements (Nikon) y se realizó la composición de canales con el programa Image-J ([www.http://imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).

### **Citometría de flujo**

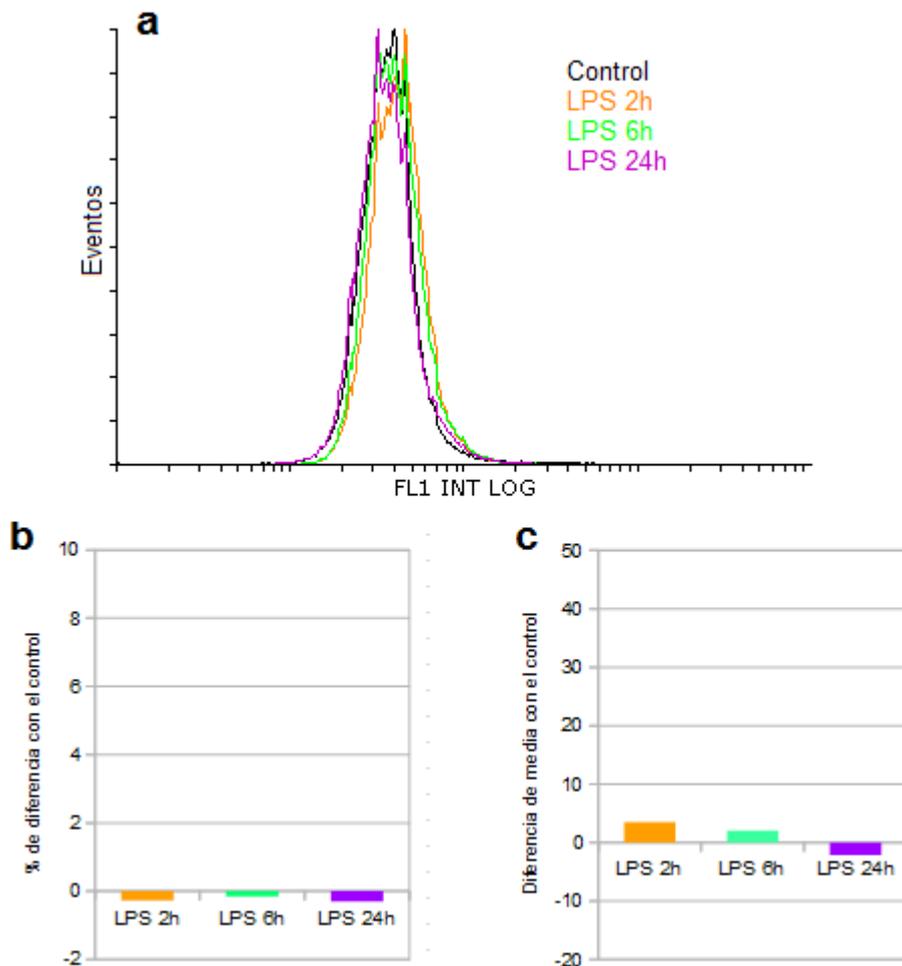
Los tubos eppendorf obtenidos como se indica en el apartado de estimulación se centrifugan a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar el PBS. Las células se resuspenden en 500  $\mu$ L de una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) sacarosa 3% (p/v) a 37° C, y mantenidas durante 15 minutos. Tras centrifugar a 2000 rpm 5 minutos se lava con PBS 1x tal y como se indica en el apartado de microscopía. Para medición de gotas lipídicas por citometría se tiñe con Bodipy 493/503 [17,20], resuspendiendo el pellet en 1mL de Bodipy 493/503 a 2 $\mu$ g/ml disuelto en PBS 1x y se mantiene en oscuridad durante 10 minutos agitando en el vortex cada 2,5 – 5 minutos. Tras centrifugar 5 minutos a 2000 rpm se vuelve a lavar con PBS 1x y se resuspende en 1 ml de PBS 1x para llevar las muestras a los tubos de citometría, mantenidos en hielo. Finalmente, las muestras se analizan en el citómetro FACS Gallios (Beckman Coulter) usando el detector FL1. La fluorescencia fue medida en escala logarítmica. El análisis de datos y la composición de imágenes se llevó a cabo con el programa Flowing Software v2.5 (<http://www.flowingsoftware.com/>)

# Resultados

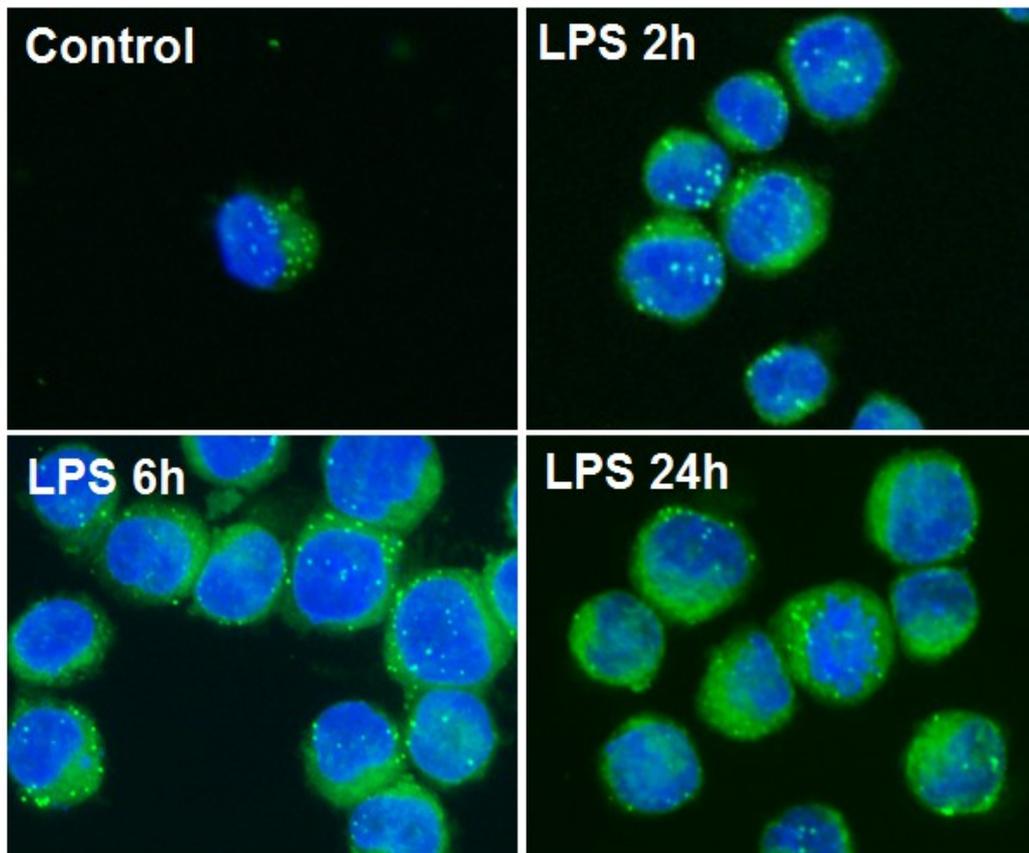
## Formación de gotas lipídicas inducida por LPS

El lipopolisacárido (LPS) constituye un conjunto de moléculas compuestas por una parte lipídica llamada lípido A y un polisacárido que constituye el núcleo o antígeno central y el antígeno O. Este compuesto forma parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, y por ello es capaz de inducir una respuesta inmune, mayoritariamente mediante interacción con el receptor TLR-4 [18,21]. Dado que las gotas lipídicas se pueden producir como respuesta a un estímulo de este tipo, el LPS fue el elegido para comenzar el estudio.

El LPS fue administrado a una concentración de 100 ng/ml (considerada suficiente para la estimulación in vitro de otras células inmunes como macrófagos) tras una hora en medio incompleto, y se recogieron las células tras 2, 6 y 24 horas de estimulación, las cuales se analizaron mediante citometría de flujo (Figura 6) y microscopía de fluorescencia (Figura 7). Para el análisis de las LD las muestras se tiñeron con Bodipy 493/503, colorante que permanece unido a los lípidos neutros. Las LD, cuyo núcleo está compuesto por este tipo de lípidos, se hacen fácilmente visibles al microscopio y detectables por citometría de flujo.



**Figura 6. Cuantificación de la formación de LD inducida por LPS mediante citometría de flujo.** Las células fueron tratadas de la manera descrita en el apartado "Materiales y métodos". No se aprecian diferencias significativas entre las muestras mediante la comparación directa de poblaciones (a), el análisis de regiones (b) ni la diferencia de medias poblacionales (c).



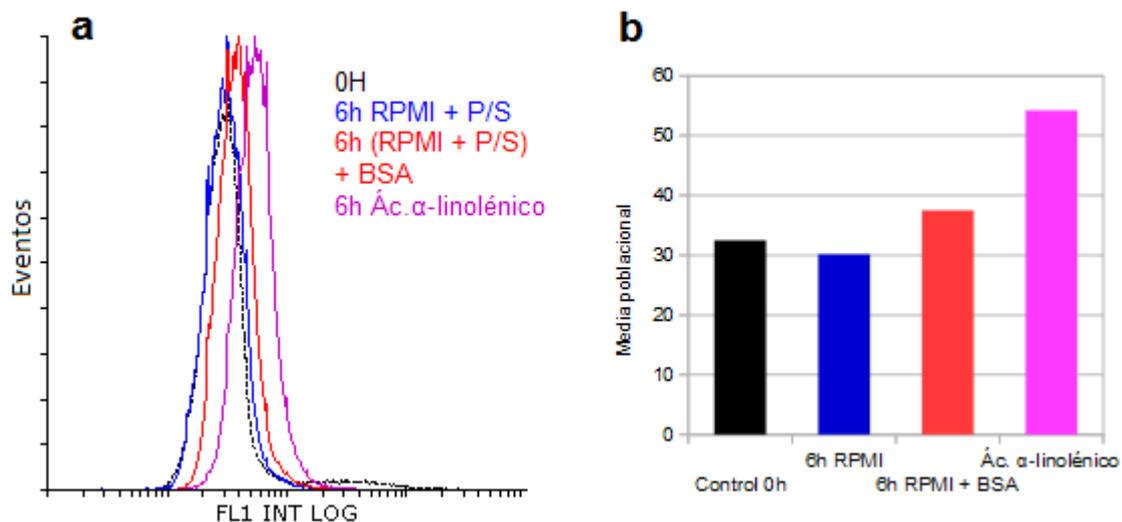
**Figura 7. Caracterización de la formación de LD inducida por LPS mediante microscopía.** Se observa que tanto el número como el tamaño de las LD se mantienen relativamente constantes en cada uno de los tiempos.

El LPS, sin embargo, no fue capaz de inducir la formación de LDs en la línea celular monocítica THP-1. En el estudio mediante ambas técnicas, ninguna muestra presentaba diferencias significativas, apuntando a la incapacidad del LPS de estimular la formación de LD en esta línea celular. Sin embargo, a pesar de la incapacidad del LPS de generar LDs, se comprobó la existencia basal de un cierto número de estos orgánulos en las células.

## **Formación de gotas lipídicas inducida por diferentes ácidos grasos**

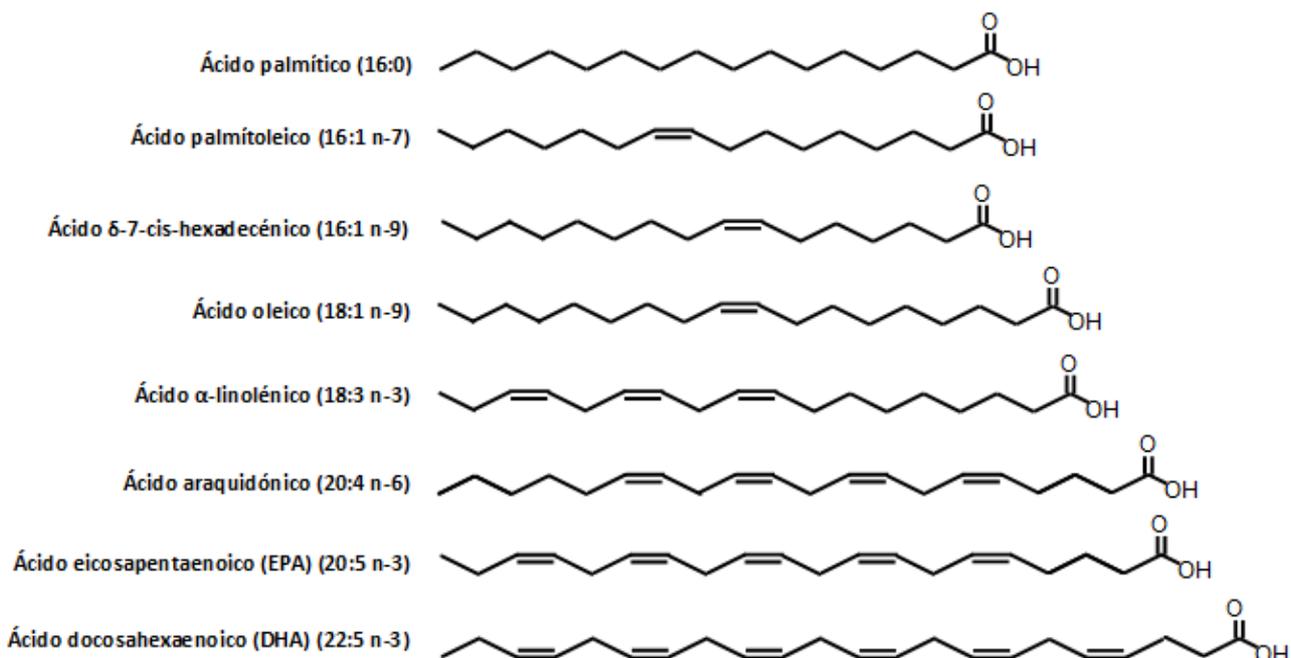
### **Control de formación de LD por albúmina**

Como la administración de los ácidos grasos requiere su complejación con albúmina, se llevó a cabo un experimento para comprobar si ésta puede afectar a las células o a la medida. Para ello, se complementaron células con una cantidad equivalente de albúmina del suero bovino (BSA) a la concentración existente cuando se estimula con un ácido graso 100  $\mu$ M (Figura 8).



**Figura 8. Efecto de la albúmina en la formación de LD.** El control a 0h corresponde a una hora en medio RPMI sin suero (ya que el estímulo siempre se añade tras ese tiempo). La muestra que contiene BSA también contiene una cantidad de NaOH equivalente a la utilizada para complejar los ácidos grasos (ver apartado “Materiales y métodos”). Se utilizó el ácido α-linolénico como control positivo de formación de LD. La figura (a) muestra los histogramas y la figura (b) las medias geométricas poblacionales.

Debido a la diferencia existente entre la población de células que pasaron 6 horas en medio RPMI sin suero con las que se le fue adicionada la BSA, los controles de todos los experimentos que se realizaron con ácidos grasos corresponde a una muestra tratada con una cantidad de BSA equivalente a la que contiene una muestra estimulada con un ácido graso 100 μM.

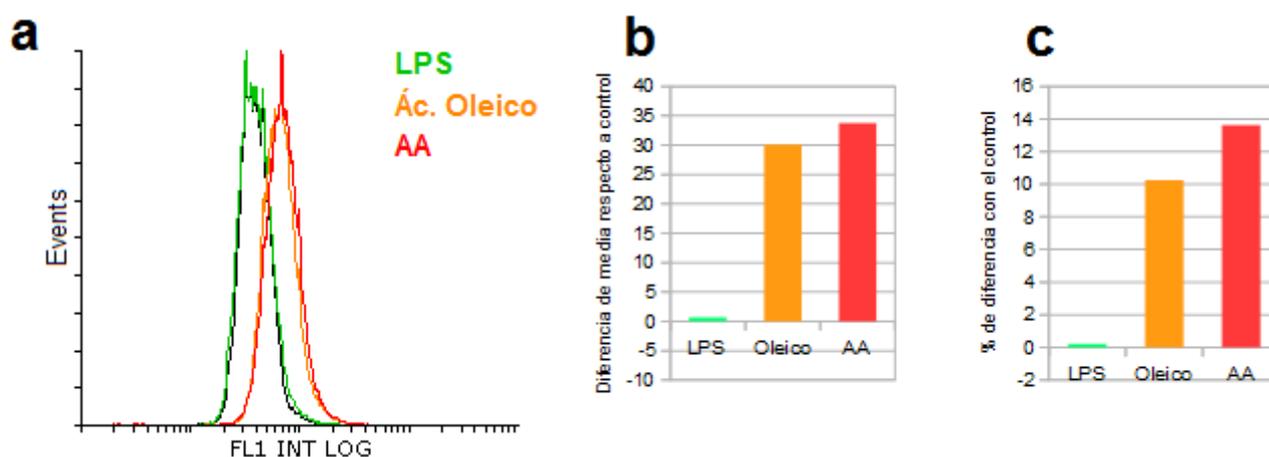


**Figura 9. Estructura de los ácidos grasos utilizados para inducir la formación de LDs.**

## Ácido araquidónico y ácido oleico

Tanto el ácido araquidónico como el ácido oleico [17,20] han sido reconocidos como potentes inductores de la formación de LDs en macrófagos. El ácido araquidónico ya fue descrito en el apartado “*Introducción*”. El ácido oleico es un ácido graso de 18 carbonos de longitud y presenta una insaturación en el carbono 9 (Figura 9). Se encuentra en abundancia en aceites vegetales, especialmente el de oliva como su nombre indica, y su función es principalmente energética.

Ambos ácidos grasos fueron suministrados a las células de la línea THP-1 a una concentración de 100  $\mu$ M, concentración suficiente de ácido oleico para generar LD en macrófagos [20], complejados 2:1 con albúmina tal y como se indica en el apartado “*Materiales y métodos*”, siendo necesario este proceso para conseguir que las células capten adecuadamente el ácido graso a tal concentración [17]. La estimulación con los ácidos grasos se mantuvo durante 6 horas. También se incluyó la estimulación con LPS a 100 ng/ml para comparar su efecto con el de los ácidos grasos (Figura 10).



**Figura 10. Cuantificación de la formación de LD inducida por ácido araquidónico y ácido oleico mediante citometría de flujo.** Las células fueron tratadas de la manera descrita en el apartado “*Materiales y métodos*”. Se muestra un aumento significativo en la producción de LDs por parte de ambos ácidos grasos y se confirma la incapacidad del LPS de generar LDs en esta línea celular. Esto es apreciable tanto en la comparación directa de poblaciones (a), la diferencia de medias poblacionales (b) y el análisis de regiones (c).

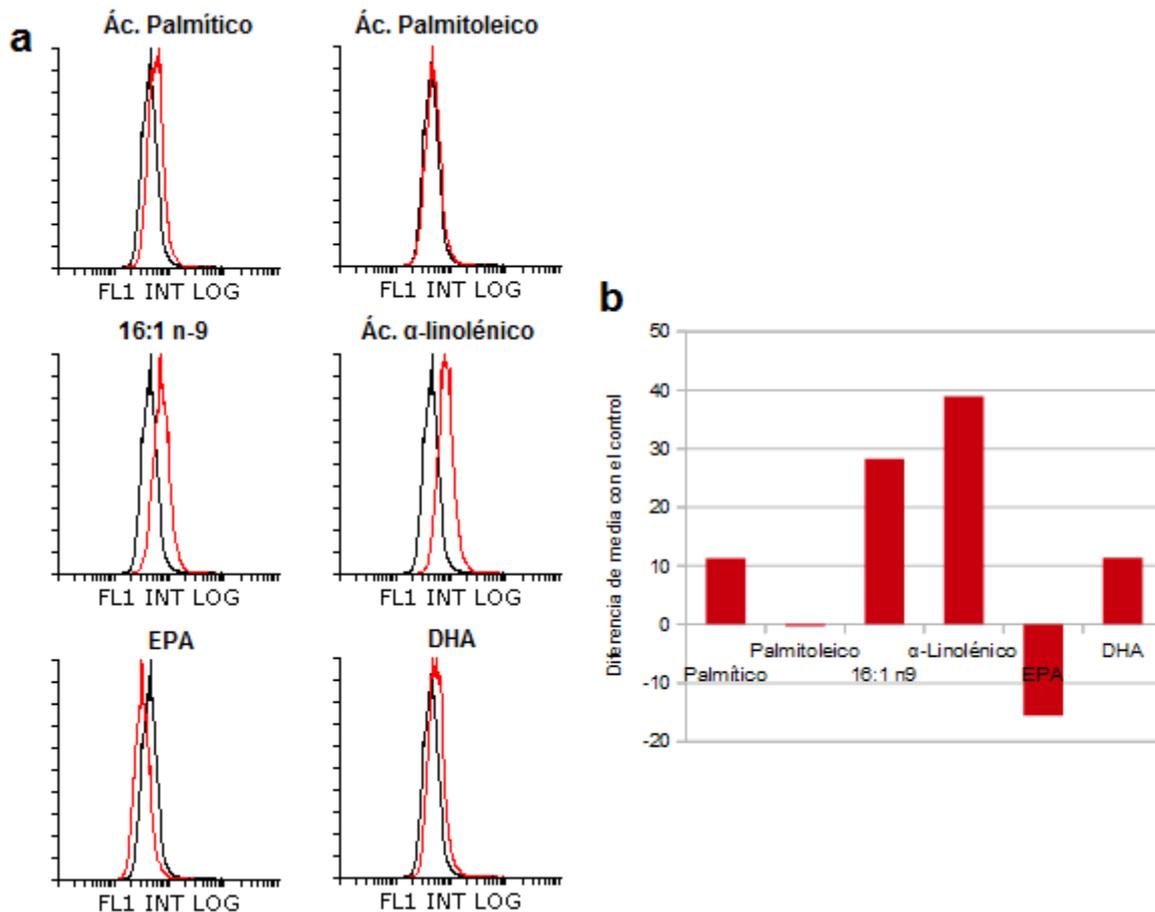
## Ácido palmítico, ácido palmitoleico, 16:1 n-9, ácido $\alpha$ -linolénico, EPA, DHA

Una vez comprobada la capacidad de los ácidos grasos oleico y araquidónico para inducir la formación de LD, se procedió al estudio de los efectos de otros ácidos grasos, ya que se ha descrito que ácidos grasos libres son capaces de inducir la polarización de macrófagos hacia su tipo inflamatorio (M1) y su interacción con los receptores Toll-like 2 y 4 (TLR-2 y TLR-4) [22,23]

El ácido palmítico es el ácido graso más común en animales y plantas. Es un ácido graso saturado de 16 carbonos de longitud y su función es principalmente energética. El ácido palmitoleico también posee 16 carbonos pero presenta una insaturación en el carbono 9. El ácido graso 16:1 n-9, relativamente desconocido, presenta una longitud de 16 carbonos

de longitud que posee una insaturación en el carbono 7. El ácido  $\alpha$ -linolénico posee 18 carbonos y tres insaturaciones que comienzan en los carbonos 9, 12 y 15. Es un ácido graso esencial, precursor del ácido eicosapentaenoico (EPA por sus siglas en inglés), por lo que debe ser obtenido de la dieta. El EPA posee 20 carbonos y 5 insaturaciones, y es precursor a su vez del ácido docosahexaenoico o DHA por sus siglas en inglés. Éste último tiene 22 carbonos de longitud y presenta 6 insaturaciones. (Figura 9).

Las células se trataron 6 horas con los ácidos grasos mencionados a una concentración de 100  $\mu$ M, teñidas con Bodipy y analizadas mediante citometría de flujo (Figura 11).



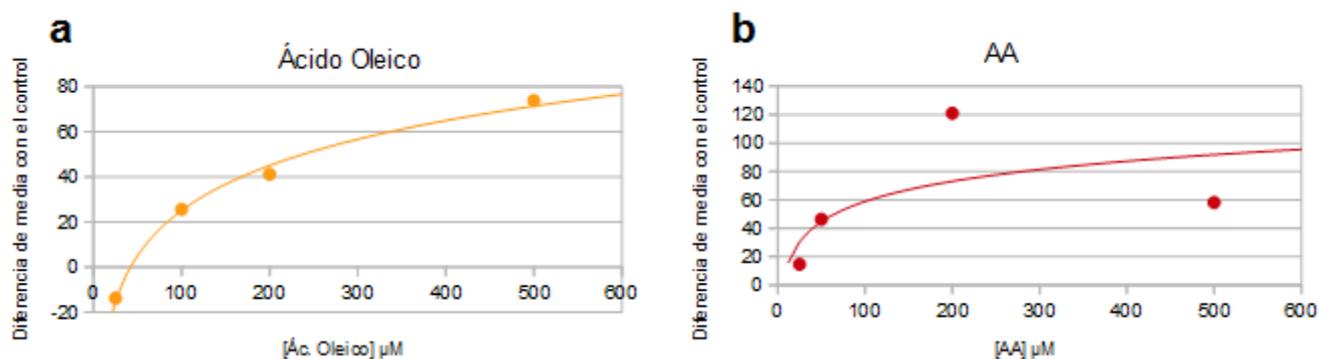
**Figura 11. Cuantificación de la formación de LD inducida por varios ácidos grasos mediante citometría de flujo.** Se muestra la superposición de las poblaciones de cada una de las muestras con la población control (a) y la diferencia de las medias poblacionales de cada muestra con la del control (b).

Se observa que el ácido  $\alpha$ -linolénico y el 16:1 n-9 son los inductores más potentes, aunque el DHA y el ácido palmítico también son capaces de generar una cantidad apreciable de LD. El ácido palmitoleico parece no tener ningún efecto en la formación de gotas lipídicas, y EPA parece inhibir su formación.

### Dosimetrías de AA y ácido oleico

Para mejorar la caracterización de los efectos de estos ácidos grasos sobre la formación de gotas lipídicas se procedió a la realización de dosimetrías hasta una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . Las células fueron tratadas durante 6 horas con diferentes cantidades de AA y ácido oleico y posteriormente analizadas mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo especificado en el apartado “*Materiales y métodos*” (Figura 12).

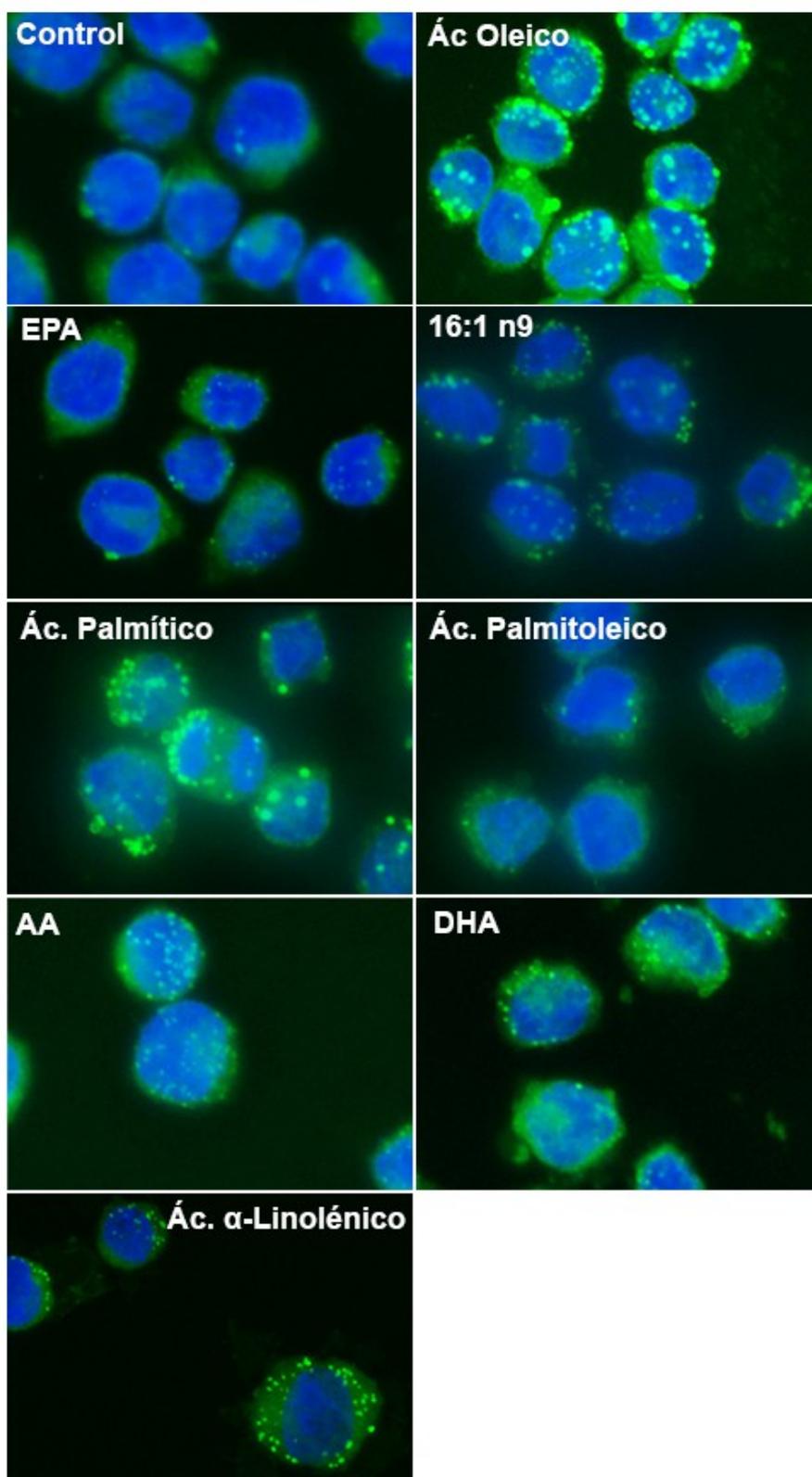
Del estudio ambos ácidos grasos obtenemos que 500  $\mu\text{M}$  es una concentración saturante para ambos ácidos grasos y una concentración adecuada para continuar el estudio de las diferencias entre los ácidos grasos.



**Figura 12. Dosimetrías de ácido oleico y ácido araquidónico.** Las unidades son arbitrarias y al realizarse cada dosimetría por separado no se pueden comparar.

### Estudios mediante microscopía de fluorescencia

Una vez caracterizada la capacidad inductora de LD de cada uno de los ácidos grasos se procedió al estudio morfológico de éstos orgánulos. Los ácidos grasos fueron añadidos a una concentración de 100  $\mu$ M durante 6 horas y posteriormente se prepararon las muestras para microscopía tal y como se indica en el apartado “*Materiales y métodos*” (Figura 13).



Coincidiendo con el estudio citométrico, EPA y el ácido palmitoleico no inducen de manera significativa la formación de éstos orgánulos. Comparando con esos resultados, cabe destacar la potente inducción del ácido palmítico, que parece ser aquí un inductor más potente que los ácidos  $\alpha$ -linolénico y 16:1 n-9.

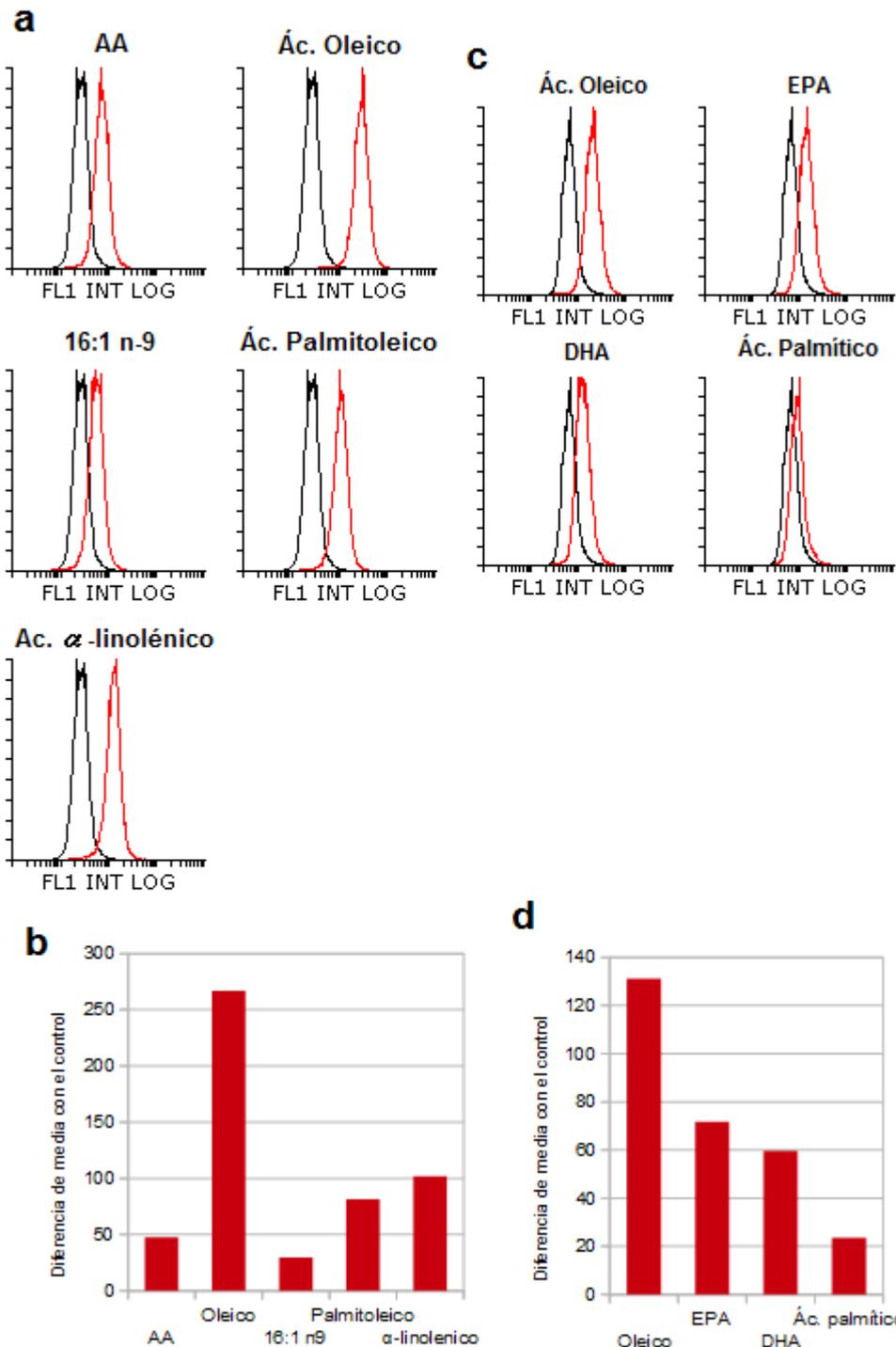
En cuanto a las diferencias morfológicas, se observa que algunos ácidos grasos favorecen la formación de LDs de mayor tamaño y menor número (ácido oleico, ácido palmítico) mientras que otros como el AA, DHA y el ácido  $\alpha$ -linolénico parecen inducir la formación de gotas lipídicas de menor tamaño pero más numerosas.

Figura 13. Caracterización de la formación de LD inducida por varios ácidos grasos mediante microscopía. Imágenes representativas de cada muestra.

## Formación de gotas lipídicas a concentraciones saturantes de ácidos grasos

El estudio de la acción de los ácidos grasos a una concentración saturante nos permite dilucidar mejor las diferencias entre los diferentes mecanismos que puede utilizar cada uno de los ácidos grasos para inducir la formación de estos orgánulos. Para ello, se estimularon las células durante 6 horas con los ácidos grasos a concentración 500  $\mu\text{M}$  y se analizó por citometría la formación de LD.

Primero se analizaron el ácido araquidónico, ácido oleico, 16:1 n-9, ácido palmitoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico (Figura 14-a,b). Posteriormente se estudió el efecto del EPA, DHA y el ácido palmítico añadiendo ácido oleico como referencia



**Figura 14.** Cuantificación de la formación de LD inducida por varios ácidos grasos a concentración saturante mediante citometría de flujo. Se muestra la superposición de las poblaciones de cada una de las muestras con la población control (a, c) y la diferencia de las medias poblacionales de cada muestra con la del control (b, d). La muestra control contiene una cantidad de albúmina equivalente a la que contienen las muestras estimuladas ácidos grasos a una concentración 500  $\mu\text{M}$ .

Como se observa, el ácido oleico parece ser capaz de inducir la aparición de LD de manera mucho más potente que el resto de ácidos grasos, lo que apunta a que dicha inducción se produzca también a través de un mecanismo exclusivo para este ácido graso.

## **Discusión**

Pese a su relativa simplicidad estructural, las gotas lipídicas constituyen un importante objeto de estudio por su participación en el metabolismo lipídico y la respuesta inflamatoria, ambos procesos estrechamente relacionados con patologías muy prevalentes en la actualidad como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el síndrome metabólico. La caracterización de la formación de estos orgánulos con el objetivo de establecer un modelo adecuado de estudio constituye los cimientos de una investigación sobre cualquiera de esos dos procesos.

En este trabajo se ha utilizado el lipopolisacárido como estímulo puramente inmunológico, y los ácidos grasos, cuya inducción de estos orgánulos puede ser debida a varios factores más allá del mero almacenaje, ya que pueden interactuar con receptores como PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\delta$  y presentar interacciones todavía desconocidas. Mientras que el LPS no pareció estimular la formación de LDs, varios ácidos grasos sí que fueron capaces de inducir su aparición. La ineficacia del LPS puede ser debida al tipo celular que presenta esta línea, ya que normalmente se utiliza diferenciada para que adquiera características de macrófago, pero en este estudio no fue así.

En cuanto a los ácidos grasos, no todos indujeron la formación de gotas lipídicas con la misma potencia ni se obtuvieron orgánulos morfológicamente homogéneos para todos ellos. La estimulación por ácido oleico y el ácido palmítico produce unas LDs de tamaño más grande y menos numerosas que las inducidas por el ácido araquidónico, el ácido dodecahexaenoico y el ácido  $\alpha$ -linolénico. Una explicación a esta diferencia puede ser que el ácido oleico y el ácido palmítico induzcan la fusión de las gotas lipídicas, ya sea aumentando la expresión de proteínas de fusión o porque su presencia favorezca la coalescencia de estos orgánulos. La diferencia más directa entre estos dos grupos de ácidos grasos es el número de insaturaciones y la longitud de la cadena, ya que el ácido oleico y el ácido palmítico son poseen 18 carbonos y una insaturación, y 16 carbonos saturados respectivamente. Sin embargo, el ácido  $\alpha$ -linolénico presenta 3 insaturaciones en una cadena de 18 carbonos, el ácido araquidónico posee 4 insaturaciones en su cadena de 20 carbonos y el DHA es un ácido graso de 22 carbonos de longitud y 6 insaturaciones. En adipocitos ha sido descrito que los ácidos grasos n-3 poliinsaturados generan LDs más pequeñas que las inducidas por el ácido esteárico (ácido graso saturado de 18 carbonos de longitud) [24]. Otra explicación puede hallarse en los diferentes papeles que estos ácidos grasos llevan a cabo. Mientras que el ácido oleico y el ácido palmítico tienen una función prevalentemente energética, el otro grupo de ácidos grasos presenta otro tipo de funciones.

Sobre la incapacidad del ácido eicosapentaenoico para generar LDs, cabe mencionar que tanto su precursor, el ácido  $\alpha$ -linolénico como su derivado el DHA si que inducen la formación de gotas lipídicas, lo cual descartaría que el ácido  $\alpha$ -linolénico estuviera induciendo su acción al ser metabolizado a DHA, pues si así fuera, el EPA también sería capaz de fomentar su aparición. En adipocitos, se sabe que tanto EPA como DHA disminuyen la acumulación de lípidos y la formación de gotas lipídicas, pero mediante mecanismos diferentes, [24, 25], lo que podría explicar las diferencias de entre sus efectos sobre este tipo celular, ya que los monocitos no expresan las mismas proteínas relacionadas con la formación de LDs y la señalización implicada en este proceso.

Sin embargo, pese a caracterizar estímulos que nos permiten inducir la formación de estos orgánulos, los resultados de este estudio pueden ser ampliamente expandidos con el objetivo de un conocimiento más profundo sobre la acción concreta de estos estímulos. Los mecanismos por los cuales inducen las gotas lipídicas, más allá de la simple esterificación en lípidos neutros para el almacenaje puede ser estudiada con inhibidores de dicho proceso. La causa de las diferencias morfológicas entre las LDs inducidas por los distintos ácidos grasos puede ser examinada, así como la composición lipídica característica de estos orgánulos inducidos por cada uno de los ácidos grasos mediante técnicas lipidómicas.

## **Conclusiones**

Con los resultados obtenidos podemos concluir, que en la línea celular monocítica THP-1:

- El LPS no fomenta la formación de gotas lipídicas.
- Varios ácidos grasos; ácido oleico, ácido palmítico, ácido araquidónico, ácido dodecahexaenoico y ácido  $\alpha$ -linolénico son potentes estos orgánulos.
- Existen diferencias entre las LDs inducidas por unos ácidos grasos y otros.

Por ello se afirma la posibilidad de utilizar la línea celular THP-1 como un modelo para el estudio de las gotas lipídicas y cualquier proceso celular que requiera de su participación.

## **Bibliografía**

- 1 - Bozza, P. T., K. G. Magalhães, and P. F. Weller. 2009. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. **1791**: 540–551.
- 2 - Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, and T. Fujimoto. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**: 44507–44512
- 3 - Bozza, P. T., I. Bakker-Abreu, R. A. Navarro-Xavier, and C. Bandeira-Melo. 2011. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **85**: 205–213.
- 4 - Astudillo, A. M., D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1821**: 249–256.
- 5 - Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1791**: 1103–1113.
- 6 - Sturley, S. L., and M. M. Hussain. 2012. Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum. *J. Lipid Res*. **53**: 1800–1810.
- 7 - Guijas, C., J. P. Rodríguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1841**: 1661–1671.
- 8 - Welte, M. A.. 2015. Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol*. **25**: R470–481.
- 9 - Pol, A., S. P. Gross, and R. G. Parton. 2014. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol*. **204**: 635–646.
- 10 - Stevanovic, A., and C. Thiele. 2013. Monotopic topology is required for lipid droplet targeting of ancient ubiquitous protein 1. *J. Lipid Res*. **54**: 503–513.
- 11 - Thiam, A. R., R. V. Farese, and T. C. Walther. 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **14**: 775–786.
- 12 - Robenek, M. J., N. J. Severs, K. Schlattmann, G. Plenz, K.-P. Zimmer, D. Troyer, and H. Robenek. 2004. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J*. **18**: 866–868.
- 13 - Hashemi, H. F., and J. M. Goodman. 2015. The life cycle of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology*. **33**: 119–124.
- 14 - Zechner, R., R. Zimmermann, T. O. Eichmann, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass, and F. Madeo. 2012. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*. **15**: 279–291.
- 15 - Nielsen, T. S., N. Jessen, J. O. L. Jørgensen, N. Møller, and S. Lund. 2014. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol*. **52**: R199–222.

- 16 - Dichlberger, A., S. Schlager, K. Maaninka, W. J. Schneider, and P. T. Kovanen. 2014. Adipose triglyceride lipase regulates eicosanoid production in activated human mast cells. *J. Lipid Res.* **55**: 2471–2478.
- 17 - Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Peña, L. Gil-de-Gómez, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**: 10894–10904.
- 18 - Hume, D. A.. 2015. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Front Immunol.* **6**: 370.
- 19 - Listenberger, L. L., D. S. Ory, and J. E. Schaffer. 2001. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 14890–14895.
- 20 - Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol.* **186**: 6004–6013.
- 21 - Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* **282**: 2085–2088.
- 22 - Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**: 175–184.
- 23 - Nguyen, M. T. A., S. Favellyukis, A.-K. Nguyen, D. Reichart, P. A. Scott, A. Jenn, R. Liu-Bryan, C. K. Glass, J. G. Neels, and J. M. Olefsky. 2007. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **282**: 35279–35292.
- 24 - Barber, E., A. J. Sinclair, and D. Cameron-Smith. 2013. Comparative actions of omega-3 fatty acids on in-vitro lipid droplet formation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **89**: 359–366.
- 25 - Manickam, E., A. J. Sinclair, and D. Cameron-Smith. 2010. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids Health Dis.* **9**: 57.
- 26 - Guijas, C., G. Pérez-Chacón, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gómez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid Res.* **53**: 2343–2354.
- 27 - Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer.* **26**: 171–176.