



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y TERAPIAS
AVANZADAS

Valladolid, Julio 2024

Estudio del papel de las lipinas en la respuesta metabólica e inflamatoria en envejecimiento

Memoria del Trabajo Fin de Máster elaborada y
presentada por:
Laura García García

Dirigido por:
Clara Meana González
María Ángeles Balboa García

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Sistema inmune innato e inflamación	4
1.2. Lipinas	4
1.2.1. Lipina-1	5
1.2.2. Lipina-2	6
1.3. Envejecimiento.....	7
1.4. Hipótesis y objetivos	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. Animales	9
2.2. Genotipado de los ratones	9
2.3. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)	10
2.4. Prueba de tolerancia a la insulina (ITT).....	10
2.5. Inducción de shock séptico en ratón	10
2.5.1. Obtención de suero de sangre de ratón	11
2.6. Medición de citoquinas mediante ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)	11
2.7. Medios de cultivo celulares	11
2.8. Diferenciación de macrófagos de médula ósea	11
2.8.1. Estímulos celulares	12
2.9. Extracción de ARN.....	12
2.10. qPCR	13
2.11. Estudios de RNA-seq	13
2.12. Extracción de proteína	14
2.13. Inmunoblot de proteínas (Western blot).....	14
2.14. Análisis estadístico de los datos	15
3. RESULTADOS.....	16
3.1. Estudio de la expresión de genes relacionados con el envejecimiento.....	16
3.2. Efecto del envejecimiento en la expresión génica de las lipinas	17
3.3. Expresión de las lipinas durante la diferenciación de BMDM de animales envejecidos	18
3.4. Efecto de la falta de lipina-2 en la diferenciación de BMDM, en respuestas inflamatorias <i>in vivo</i> y sobre el metabolismo de la glucosa e insulina en el envejecimiento	20
3.5. Efecto de la falta de lipina-1 en la diferenciación de BMDM, en respuestas inflamatorias <i>in vitro</i> y sobre el metabolismo de la glucosa e insulina en el envejecimiento.....	24
4. DISCUSIÓN	27
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA.....	30

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia o ADN complementario

ARN: Ácido ribonucleico

AUC: Área bajo la curva (del inglés, *area under the curve*)

BMDM: Macrófagos derivados de médula ósea (del inglés, *bone marrow-derived macrophage*)

BSA: Albúmina sérica bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)

COX: Ciclooxygenasa (del inglés, *cyclooxygenase*)

DAG: Diacilglicerol (del inglés, *diacylglycerol*)

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño (del inglés, *danger-associated molecular patterns*)

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos (del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ER: Retículo endoplasmático (del inglés, *endoplasmic reticulum*)

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés, *extracellular-signal-regulated kinase*)

Fld: Distrofia del hígado graso (del inglés, *fatty liver dystrophy*)

FW: Hacia delante (del inglés, *forward*)

GTT: Prueba de tolerancia a la glucosa (del inglés, *glucose tolerance test*)

HSC: Células madre hematopoyéticas (del inglés, *hematopoietic stem cells*)

IL: Interleuquina (del inglés, *interleukin*)

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, *inducible nitric oxide synthase*)

ITT: Prueba de tolerancia a la insulina (del inglés, *insulin tolerance test*)

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal (del inglés, *c-Jun N-terminal kinase*)

LPS: Lipopolisacárido (del inglés, *lipopolysaccharide*)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*)

M-CSF: Factor estimulante de colonias macrófago (del inglés, *macrophage colony-stimulating factor*)

NLS: Secuencia de localización nuclear (del inglés, *nuclear localization sequence*)

PA: Ácido fosfatídico (del inglés, *phosphatidic acid*)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés, *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*)

PAP: Fosfatidato fosfatasa (del inglés, *phosphatidate phosphatase*)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

PIC: Mezcla de inhibidores de proteasas (del inglés, *protease inhibitor cocktail*)

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

qPCR: PCR cuantitativa (del inglés, *quantitative PCR*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*)

RV: Inverso (del inglés, *reverse*)

SDS: Dodecilsulfato sódico (del inglés, *sodium dodecyl sulfate*)

TAG: Triacilglicerol (del inglés, *triacylglycerol*)

TLR: Receptor de tipo Toll (del inglés, *Toll-like receptor*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral (del inglés, *tumor necrosis factor*)

wt: Genotipo tipo silvestre (del inglés, *wildtype*)

RESUMEN

Las lipinas son fosfatidato fosfatasas (PAP) dependientes de Mg^{2+} que desempeñan un papel crucial en las vías biosintéticas de lípidos *de novo*. En los macrófagos, células del sistema inmune innato, estas enzimas son esenciales para la generación continua de membranas, el almacenamiento de lípidos y la señalización de receptores de superficie que implican redes lipídicas, lo que las convierte en importantes moduladores de las respuestas inflamatorias. De particular interés son la lipina-1, que tiene un rol proinflamatorio, y la lipina-2, importante para el control de la inflamación, dado que alteraciones en los genes de estas lipinas pueden provocar enfermedades. Debido a que el envejecimiento se asocia con un fenotipo inflamatorio crónico y a alteraciones en vías metabólicas, este estudio se centró en examinar la expresión de las lipinas en tejidos y su comportamiento tanto *ex vivo* como *in vivo* tras un shock endotóxico, además de su posible conexión con el metabolismo de la glucosa y la insulina. Los resultados revelan una clara conexión entre el envejecimiento y las lipinas. Durante el envejecimiento, no se observa una compensación por parte de otras lipinas en ausencia de una de ellas como ocurre en animales jóvenes. Además, la ausencia de lipina-1 afecta el metabolismo de la glucosa, mientras que la ausencia de lipina-2 no provoca alteraciones significativas. Estos hallazgos sugieren nuevas perspectivas para investigar cómo las lipinas están afectadas por el envejecimiento y si contribuyen a este proceso.

Palabras clave: Lipina-1, Lipina-2, macrófagos, inflamación, envejecimiento.

ABSTRACT

Lipins are Mg^{2+} -dependent phosphatidate phosphatases (PAPs) that play a crucial role in *de novo* lipid biosynthetic pathways. In macrophages, cells of the innate immune system, these enzymes are essential for the continuous generation of membranes, lipid storage, and the signaling of surface receptors involving lipid networks, making them important modulators of inflammatory responses. Of particular interest are lipin-1, which has a pro-inflammatory role, and lipin-2, which is important for inflammation control, as alterations in the genes of these lipins can cause diseases. Given that aging is associated with a chronic inflammatory phenotype and metabolic pathway alterations, this study focused on examining lipin expression in tissues and their behavior both *ex vivo* and *in vivo* following an endotoxin shock, as well as their potential connection with glucose and insulin metabolism. The results reveal a clear connection between aging and lipins. During aging, compensation by other lipins in the absence of one, as seen in young animals, is not observed. Additionally, the absence of lipin-1 affects glucose metabolism, whereas the absence of lipin-2 does not cause significant alterations. These findings suggest new perspectives for investigating how lipins are affected by aging and whether they contribute to this process.

Keywords: Lipin-1, Lipin-2, macrophages, inflammation, aging.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema inmune innato e inflamación

El sistema inmune es una estructura compleja y dinámica que protege al organismo contra agentes extraños. Se divide en dos tipos de respuestas determinadas por la velocidad y especificidad de la reacción: innata y adaptativa. La inmunidad innata incluye barreras físicas, químicas y microbiológicas, y también abarca una compleja e interactiva red de células, órganos linfoides y citoquinas. Este sistema está presente desde el nacimiento y representa la primera línea de defensa, proporcionando una protección inmediata al huésped de manera no específica^{1,2}.

La inflamación es una respuesta que se desencadena por condiciones y estímulos nocivos, tanto exógenos como endógenos, como infecciones y lesiones tisulares respectivamente. Esta respuesta inflamatoria se encuentra coordinada por una gran variedad de mediadores que forman redes reguladoras complejas. Dentro de esta red, los macrófagos juegan un papel crucial. Estos son un grupo muy heterogéneo dentro del sistema inmune innato, que tienen la capacidad de reconocer diferentes patrones moleculares: de células dañadas (DAMPs) y asociados a patógenos (PAMPs), siendo su objetivo el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos^{3,4}. Los macrófagos desencadenan una respuesta inflamatoria rápida para eliminar los agentes extraños causantes del daño y contener la infección. Además, modulan la resolución de la respuesta inflamatoria al señalar la reparación de las áreas dañadas^{1,5}.

Una de las características fundamentales de los macrófagos es su gran plasticidad y adaptabilidad, lo que les permite cambiar su fenotipo funcional dependiendo del estímulo al que se expongan, en un proceso denominado polarización. El fenotipo inflamatorio clásico (M1) inicia una inflamación mediante la regulación positiva de un programa de expresión génica que incluye citocinas y quimiocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS). Incluye también una expresión exacerbada de iNOS que genera óxido nítrico (NO) a partir de arginina, para facilitar la destrucción y eliminación del organismo infeccioso^{6,7}. El fenotipo activado alternativamente (M2) describe macrófagos que producen citocinas antiinflamatorias y otros mediadores que controlan la inflamación y coordinan los procesos de reparación de tejidos, producidos frecuentemente por los M1. Para ello, expresan arginasa-1 metabolizando la arginina en prolina y poliaminas esenciales para la proliferación celular y la cicatrización de heridas^{6,8}.

1.2. Lipinas

Las lipinas, previamente denominadas como enzimas PAP, son fosfatidato fosfatasa dependientes de Mg^{2+} que desempeñan un papel importante en las vías biosintéticas de lípidos *de novo*, convirtiendo ácido fosfatídico (PA) en 1,2-diacilglicerol (DAG)⁹. Estos dos lípidos no solo participan en la biogénesis de la membrana al intervenir en la biosíntesis de glicerofosfolípidos, sino que también pueden unirse y activar proteínas de señalización, induciendo una amplia gama de respuestas celulares^{10,11}. Además, el DAG puede acilarse para formar triacilglicerol (TAG), un lípido de almacenamiento de energía⁹.

Asimismo, las lipinas se han descrito como importantes moduladores de las respuestas inflamatorias llevadas a cabo por células del sistema innato como los macrófagos. Esto se debe a la necesidad de estas células de generar continuamente membrana, a su capacidad de almacenamiento de lípidos y a los procesos de señalización de sus receptores de superficie que implican redes lipídicas. Por lo tanto, estas enzimas desempeñan un papel importante en la fisiología y fisiopatología de los macrófagos^{5,12}.

La familia de las lipinas está codificada por tres genes diferentes: LPIN1, LPIN2 y LPIN3 en humanos; y *Lpin1*, *Lpin2* y *Lpin3* en ratones¹³. De estos, los mejores caracterizados son la lipina-1 y la lipina-2, probablemente debido a que mutaciones en sus genes producen enfermedades en humanos o conducen a cambios fenotípicos en ratones^{14,15}.

Todas las lipinas (lipina-1, lipina-2 y lipina-3) comparten una estructura similar con dominios conservados en los extremos amino terminal (N) y carboxilo terminal (C) de la molécula, conocidos como N-LIP y C-LIP, respectivamente. Asimismo, presentan una secuencia de localización nuclear (NLS) cerca del motivo N-LIP y un motivo catalítico (DxDxT) y coactivador transcripcional (LxxIL) ubicados dentro del dominio C-LIP (**Figura 1**)⁵.



Figura 1: Esquema de la estructura de las lipinas. Las lipinas están formadas por un dominio amino terminal (N-LIP), una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio carboxilo terminal (C-LIP), que incluye el motivo catalítico (DxDxT) y el coactivador transcripcional (LxxIL). Esquema modificado de Balboa, M.A. et al, *The Role of Lipins in Innate Immunity and Inflammation* (2019)⁵.

Debido a este último motivo, las lipinas pueden influir en eventos de transcripción génica al coactivar factores de transcripción metabólicos^{5,16} o al interactuar directamente con factores de transcripción inflamatorios^{5,17}.

En el sistema inmune, específicamente en los macrófagos que expresan los tres genes de la familia (lipina-1, lipina-2 y lipina-3)⁵, la lipina-1 tiene un papel proinflamatorio participando en procesos de transducción de señal y en la generación de citoquinas inflamatorias^{18,19}. Por otro lado, la lipina-2 tiene un papel importante en el control de la inflamación y de la activación del inflammasoma^{20,21}. La lipina-1 y la lipina-2, por tanto, tienen papeles opuestos en el desarrollo de las respuestas inflamatorias. Estos efectos pueden deberse a sus diferentes funciones y a la regulación antagónica que ejercen sobre los receptores como los TLR, que se describen a continuación⁵.

1.2.1. Lipina-1

La lipina-1 tiene una gran relevancia en la señalización inflamatoria inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS). El LPS induce la liberación de citoquinas inflamatorias, como la IL-6, IL-1 β y TNF- α , a través de la unión al receptor de reconocimiento de patrones de las células innatas TLR4, activando las vías de señalización asociadas a la inflamación^{22,23}. Estas vías de señalización son llevadas a cabo por MAPK, incluyendo ERK, JNK y el factor p38²⁴, o por la vía de NF- κ B²⁵. La lipina-1 contribuye a la fosforilación completa de dichos factores, provocando así una respuesta inflamatoria¹⁸.

Por otro lado, la lipina-1 estimula la expresión de enzimas proinflamatorias inducidas por LPS, entre las que se encuentra la COX-2, encargada de metabolizar el ácido araquidónico para la producción de eicosanoides, e iNOS, que produce NO, siendo ambos mediadores de la inflamación (**Figura 2**)⁵.

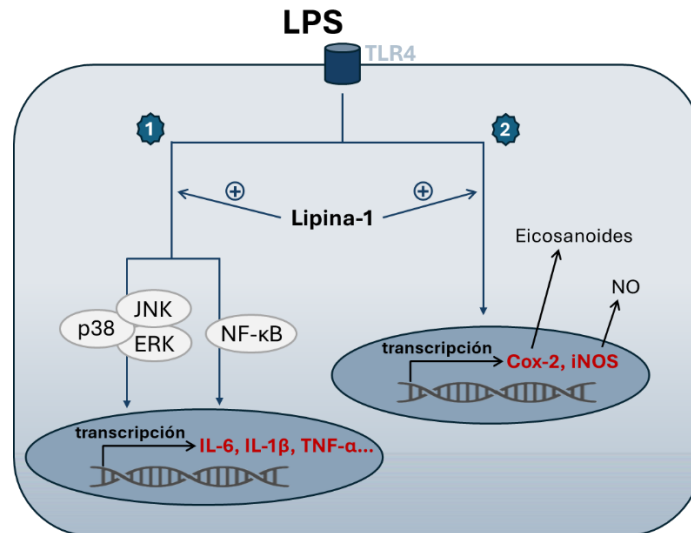


Figura 2: Representación esquemática de las principales vías reguladas positivamente por la lipina-1. 1) Producción de citoquinas proinflamatorias a través de las vías de MAPK y NF-κB. 2) Producción de enzimas proinflamatorias, Cox-2 e iNOS. Esquemas adaptados de Balboa, M.A. et al, *The Role of Lipins in Innate Immunity and Inflammation* (2019)⁵.

Debido a la importancia que tiene la lipina-1 en la regulación de la inflamación, alteraciones en esta enzima o en los genes que la codifican juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis¹⁹ o el cáncer colorrectal asociado a la colitis²⁶.

1.2.2. Lipina-2

La lipina-2 tiene una gran relevancia en la señalización inflamatoria producida por LPS. La lipina-2 contrarresta esta situación al restringir la fosforilación de JNK y ERK reduciendo la sobreproducción de citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos, como IL-6 o TNF- α ²⁷.

Por otro lado, esta enzima regula la actividad del inflamasoma. La función final de los inflamasomas es la producción de la citoquina IL-1 β mediante la activación de la caspasa-1, una proteasa que escinde la pro-IL-1 β . La lipina-2 controla la sobreproducción de IL-1 β al influir en las fases necesarias para la activación del inflamasoma (**Figura 3**)^{5,28}.

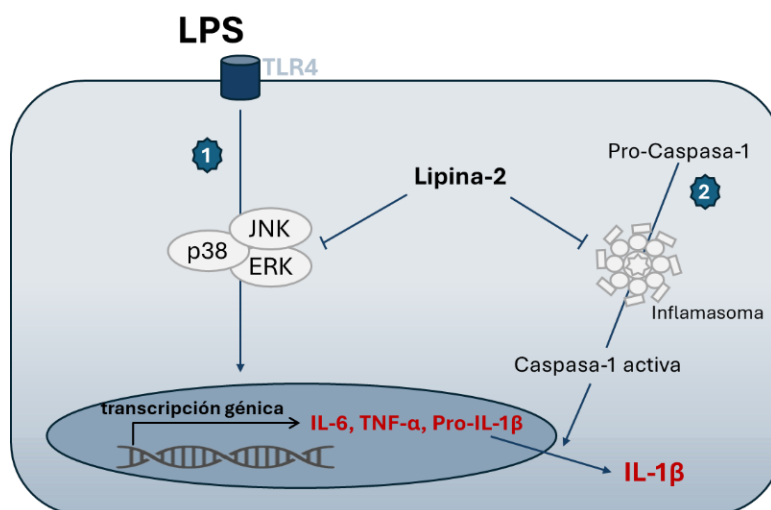


Figura 3: Representación esquemática de las principales vías reguladas negativamente por la lipina-2. 1) Inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias mediante la vía de MAPK. 2) Inhibición de la actividad del inflamasoma. Esquemas adaptados de Balboa, M.A. et al, *The Role of Lipins in Innate Immunity and Inflammation* (2019)⁵.

Debido a la importancia de la lipina-2 en la regulación de la inflamación, alteraciones en esta enzima o en los genes que la codifican, producen enfermedades autoinflamatorias como el síndrome de Majeed²⁹.

1.3. Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno común, complejo y natural, en el que la inflamación se ha considerado un sello distintivo que puede dañar el sistema inmunológico³⁰. El envejecimiento de los órganos y los organismos suele ir acompañado de la generación de respuestas inflamatorias. El proceso y la acumulación de senescencia celular contribuye significativamente al desarrollo de daños orgánicos y enfermedades, lo que puede conducir a una mayor inflamación, formando un círculo vicioso³¹.

En los últimos años, se ha desarrollado el concepto de inmunosenescencia, caracterizada por una alteración en la respuesta inmune del cuerpo a los antígenos endógenos y exógenos, lo que lleva a una disminución de la capacidad antitumoral del individuo y de la capacidad de eliminar células senescentes³². La senescencia de las células madre hematopoyéticas (HSC) es la base de la inmunosenescencia y se caracteriza por cambios en su autorrenovación, sesgo de diferenciación y metabolismo energético^{31,33}. Estudios previos de transcriptómica que comparan las HSC de ratones viejos y jóvenes han indicado que existe un sesgo hacia la diferenciación mielóide a costa del desarrollo linfóide^{33,34}.

Además de la alteración en la diferenciación de las HSC, las células del sistema inmune innato también presentan disfunciones que afectan su función normal³¹. Los macrófagos presentan un deterioro durante el envejecimiento que contribuye de manera crítica a la inmunosenescencia, donde su capacidad para eliminar células senescentes de los tejidos mediante autofagia se encuentra reducida³⁵. Asimismo, los macrófagos envejecidos muestran un aumento notable en componentes del fenotipo secretor asociado a la senescencia, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β ³¹.

El envejecimiento se asocia también con alteraciones en numerosas vías metabólicas que causan enfermedades y disfunciones. Se ha reconocido que el envejecimiento va acompañado de un aumento de los niveles de glucosa e insulina en sangre. El aumento de la resistencia a la insulina, la disminución de la captación periférica de glucosa, y la función alterada de las células β son algunos de los contribuyentes al metabolismo anormal de la glucosa³⁶.

Debido al proceso de envejecimiento celular enzimas como las lipinas también se encuentran alteradas, tanto en órganos como en células. Estudios previos han destacado que, en animales jóvenes, una deficiencia de lipina-2 provoca un aumento compensatorio de la lipina-1 en órganos como el hígado y el cerebelo. Sin embargo, durante el proceso de envejecimiento la lipina-1 reduce sus niveles en cerebelo, impidiendo los procesos de compensación mencionados en animales jóvenes. Esta falta de compensación conlleva al desarrollo de ataxia debido a alteraciones en la composición de fosfolípidos cerebrales³⁷.

1.4. Hipótesis y objetivos

El proceso de envejecimiento, caracterizado por un estado de inflamación crónica³¹ y a alteraciones en vías metabólicas³⁶, es actualmente considerado por gran parte de la comunidad científica como la principal enfermedad a la que se enfrenta el ser humano. El estado inflamatorio en el envejecimiento es consecuencia de la acumulación de células senescentes o la generación de un microambiente altamente oxidativo, lo que provoca una activación permanente del sistema inmunitario que predispone al organismo a desarrollar patologías de base inflamatoria tales como aterosclerosis. Además, el envejecimiento se asocia con un aumento de los niveles de glucosa e insulina en sangre. Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación muestran que la familia de las lipinas está involucrada en procesos de eferocitosis y respuestas inflamatorias dependientes de la alteración en la producción de especies reactivas de oxígeno, así como en la alteración del

metabolismo de la glucosa. No obstante, hasta ahora, todos los estudios experimentales se han realizado en animales jóvenes, y aún no se ha explorado cómo estas enzimas pueden afectar los procesos inflamatorios durante la vejez.

Basándonos en esto, nos proponemos estudiar el papel de las lipinas en la respuesta metabólica e inflamatoria asociada al envejecimiento.

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- I. Estudiar la expresión y la posible compensación entre los distintos miembros de la familia de las lipinas durante el envejecimiento.
- II. Analizar *in vitro* la implicación de las lipinas en la expresión y producción de mediadores inflamatorios frente a componentes bacterianos en ratones envejecidos.
- III. Estudiar el posible papel de las lipinas en la homeostasis de la glucosa y la respuesta inflamatoria en situación de shock endotóxico en ratones envejecidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales

Los ratones macho y hembra de tipo salvaje (*wt*) y *Lpin2*^{-/-} (deficientes en lipina-2) de la cepa C57BL/6J fueron adquiridos del *Toronto Centre for Phenogenomics*, mientras que los ratones hembra de tipo salvaje (*wt*) y *fld* (con deficiencia de lipina-1) de la cepa BALB/c fueron adquiridas en *The Jackson Laboratory*. Estos animales fueron alojados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, manteniéndolos en condiciones ambientales estables de temperatura (20-24°C), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, y se les suministró alimentación ad libitum. Los experimentos fueron realizados siguiendo la normativa 2010/63UE de la Comunidad Europea y la legislación española que regula la investigación animal (RD 53/2013 BOE34/11370 a 11421,2013).

Asimismo, en este estudio se emplearon células de médula ósea extraídas de los fémures y tibias de ratones hembra de las dos cepas mencionadas previamente: C57BL/6J, tanto de tipo salvaje como *Lpin2*^{-/-}; y de la cepa BALB/c, tanto de tipo salvaje como *fld*.

2.2. Genotipado de los ratones

El ADN genómico de los ratones C57BL/6J, *wt* y *Lpin2*^{-/-}, se obtuvo al digerir cola de ratón en tampón de digestión cuya composición se detalla en la **Tabla 1**, a una temperatura de 55°C durante toda la noche. Después de la digestión, se añadieron 250 µl de NaCl 5M a las muestras, se mezclaron por inversión y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 16000 xg (velocidad máxima) durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se transfirieron 500 µl del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se agregó 1 ml de etanol al 96%. Tras agitar por inversión, se centrifugó a máxima velocidad y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado y se añadió 1 ml de etanol al 96% al pellet de ADN, se agitó con vortex y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad y 4°C durante 5 minutos. Se eliminó el etanol, se centrifugó brevemente para bajar los restos que pudieran quedar en las paredes y se retiró con pipeta. Finalmente, el pellet se dejó secar durante 2-3 minutos a temperatura ambiente para, posteriormente resuspenderlo en 100 µl de agua libre de nucleasas. La concentración de ADN se determinó mediante espectroscopía en el Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 1: Composición del tampón de digestión para genotipado.

REACTIVO	VOLUMEN → C _{final}
Tris 1M pH 8.0	50 µl → 100mM
EDTA 0.5M pH 8.0	5 µl → 5mM
NaCl 5M	20 µl → 200mM
SDS 10%	10 µl → 0.2%
H ₂ O milliQ	415 µl
Proteinasa k 20mg/ml	6.3 µl → 0.25mg/ml

Con el propósito de determinar el genotipo de los animales, se llevó a cabo la amplificación de 200 ng del ADN obtenido de las colas de los ratones mediante PCR, siguiendo el protocolo que se detalla en la **Figura 4**.

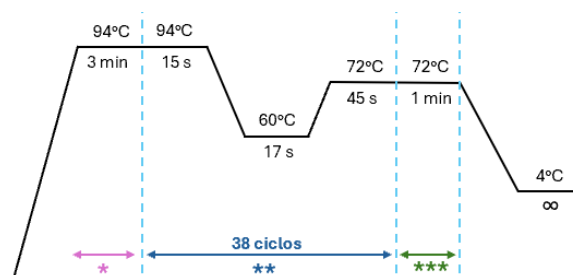


Figura 4: Diagrama del protocolo de PCR. Incluye una etapa inicial de desnaturalización (*), seguida por una fase de amplificación (**) y finaliza con una etapa de extensión final (***).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, según lo especificado en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Reacción de PCR convencional para el genotipado de ratones.

REACTIVO	VOLUMEN → C _{final}
Tampón (5x)	5 µl → 1x
dNTPs (25mM)	0.2 µl → 200µM
Oligonucleótido 1 FW (10µM)*	0.8 µl → 320nM
Oligonucleótido 2 RV (10µM)*	0.8 µl → 320nM
Oligonucleótido 3 FW (10µM)*	1.5 µl → 320nM
Oligonucleótido 4 RV (10µM)*	1.5 µl → 320nM
Phusion HSII (2u/µl)	0.2 µl → 0.016u/µl
ADN molde (muestra)	15 µl

*Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Oligonucleótidos usados en PCR convencional para el genotipado de ratones *wt* y *Lpin2^{-/-}* (MWG Biotech).

Lpin2 (Oligonucleótido 1 FW) Lpin2 (Oligonucleótido 2 RV)	5'-GCAGTTGTATATTGGTGGTGAGCTG-3' 5'-AGCTGAGCATTACAAGGACTGACAC-3'	Set 1: 490 pb
TCP-Lac (Oligonucleótido 3 FW) Lpin2 (Oligonucleótido 4 RV)	5'-CCATTACCAGTTGGTCTGGTGTGTC-3' 5'-GTGGATGTCCTTCCAGTGTTTG-3'	Set 2: 618 pb

Los fragmentos de ADN amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) (Biotools) utilizando una solución de tinción de Ácidos Nucleicos GelRed™ (Biotium). En paralelo a las muestras, se corrió una solución compuesta por 1 µl de un patrón de marcadores de tamaño molecular conocido (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific), 2 µl de tampón de carga y 9 µl de agua libre de nucleótidos. Las bandas de ADN se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (GelDoc XR, Bio-Rad).

Se logró distinguir entre ratones *wt*, heterocigotos y homocigotos recesivos (*Lpin2^{-/-}*) según las bandas obtenidas tras la amplificación. Cabe mencionar que los ratones BALB/c habían sido genotipados previamente por el laboratorio años atrás.

2.3. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)

Para evaluar las alteraciones de la homeostasis de la glucosa *in vivo*, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IP-GTT). Para ello, se ayunó a ratones hembra *wt* y *Lpin2^{-/-}* de la cepa C57BL/6J, y a ratones hembra *wt* y *fld* de la cepa BALB/c durante 18 horas y se les inyectó glucosa, vía intraperitoneal, a razón de 1 g/kg de peso corporal. Los niveles de glucosa en sangre se midieron en diferentes momentos: antes de la inyección de glucosa (tiempo 0), 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección, utilizando un glucómetro digital (Contour Next, Ascensia).

2.4. Prueba de tolerancia a la insulina (ITT)

Para evaluar la sensibilidad a la insulina, se realizó la prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (IP-ITT). Para ello, se les inyectó Humulina (Lilly, EE.UU.), vía intraperitoneal, a razón de 0.75 u/kg de peso corporal. Los niveles de glucosa en sangre se midieron en diferentes momentos: antes de la inyección de insulina (tiempo 0) y a los 15, 30, 60, 90 y 110 minutos después de la inyección, utilizando un glucómetro digital (Contour Next, Ascensia).

2.5. Inducción de shock séptico en ratón

A los ratones hembra *wt* y *Lpin2^{-/-}* de la cepa C57BL/6J se les indujo shock séptico mediante una inyección intraperitoneal de LPS a razón de 5 mg/kg de peso corporal, disuelto en PBS estéril, durante un período de 6 horas. Los ratones del grupo control recibieron una inyección solamente de PBS. Después de 6 horas de tratamiento, se les extrajo sangre para la obtención

de suero y, posteriormente, los animales fueron sacrificados. Tras el sacrificio, se recogieron muestras de hígado y bazo, las cuales se conservaron a -80°C .

2.5.1. Obtención de suero de sangre de ratón

Para analizar los niveles de citoquinas en suero de ratones tratados con LPS y a los ratones control, se les extrajo sangre del corazón. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de 10 mg/ml de ketamina (Merial) y 5 mg/kg de xilacina (Bayer). Para confirmar que los animales habían llegado al plano quirúrgico de anestesia, se les aplicó presión en las almohadillas de las patas posteriores.

Una vez confirmado el plano de anestesia, se localizó el latido del corazón y se realizó una punción cardiaca. Tras la extracción de la sangre, se realizó la dislocación cervical del animal.

La sangre se mantuvo en reposo durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente para permitir la coagulación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 xg durante 10 minutos a 20°C . El sobrenadante, suero, se recogió en tubos nuevos y se almacenó a -80°C hasta su análisis mediante ELISA.

2.6. Medición de citoquinas mediante ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

El ELISA es una técnica inmunoenzimática que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una base sólida mediante la unión de anticuerpos. Estos anticuerpos, de forma directa o indirecta, producen una reacción cuyo producto puede cuantificarse mediante espectrofotometría.

En este estudio, se utilizó esta técnica para detectar IL- 1β , IL-6 y TNF- α en los sueros de ratones, obtenidos según lo descrito en el apartado 2.5.1.

Para cuantificar las distintas citoquinas, se siguieron las instrucciones de la casa comercial, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), y se midió la absorbancia a longitudes de onda de 450 y 570 nm utilizando el espectrofotómetro VersaMax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices).

2.7. Medios de cultivo celulares

- Medio de cultivo de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM): Se empleó medio RPMI 1640 complementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina (L-Gln) y antibióticos: 100 U/ml de penicilina (P) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (S).

- Medio condicionado de cultivo de BMDM: Se utilizó medio RPMI 1640 suplementado con un 10% (v/v) de FBS, 2 mM de L-glutamina (L-Gln), antibióticos: 100 U/ml de penicilina (P) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (S), al cual se añadió un 10% de medio condicionado de macrófagos (sobrenadante L929).

2.8. Diferenciación de macrófagos de médula ósea

Los precursores de médula ósea obtenidos de ratones de la cepa C57BL/6J, tanto *wt* como *Lpin2^{-/-}*, y de la cepa BALB/c, tanto *wt* como *fld*, fueron inducidos a diferenciarse hacia macrófago.

Una vez sembradas las placas, se incubaron a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO_2 . En el cuarto día, ya se observó un cambio en la morfología celular y un incremento en la adherencia a la superficie de la placa, indicando el inicio de la diferenciación.

En los días 4 y 6, se reemplazó el medio de las células por medio condicionado de cultivo de BMDM fresco. El día 7, se cambió a medio de cultivo de BMDM sin medio condicionado, y el día 8 se llevaron a cabo los experimentos. Además, en los días 0, 3 y 5, se tomó una

muestra por día para realizar el análisis de los niveles de ARN y proteína con el propósito de investigar el proceso de diferenciación (**Figura 5**).

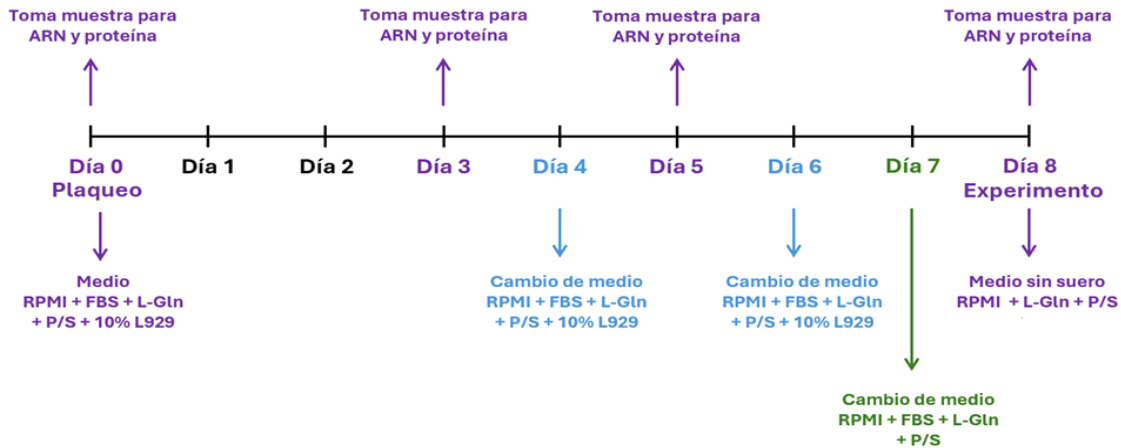


Figura 5: Esquema del procedimiento para la toma de muestra durante la diferenciación de BMDM de ratones viejos. Se tomaron muestras en los días 0, 3, 5 y 8 de la diferenciación para análisis de ARN o proteínas. En los días 4 y 6 se cambió el medio por medio de cultivo de BMDM con medio condicionado, y el día 7 se cambió por medio de BMDM sin medio condicionado.

2.8.1. Estímulos celulares

LPS (Sigma-Aldrich): El lipopolisacárido bacteriano, componente de las membranas de las bacterias gramnegativas, es un potente estimulador de la respuesta inmunitaria debido a su reconocimiento por los receptores TLR4. Se utiliza a una concentración final de 200 ng/ml.

2.9. Extracción de ARN

Para extraer el ARN total de las muestras de tejido, hígado y bazo, obtenidas de ratones de la cepa C57BL/6J, *wt* y *Lpin2^{-/-}*, así como de los cultivos celulares se empleó el reactivo RNeasy Lysis Buffer (Qiagen).

El procedimiento de extracción siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Se añadió 1 ml de RNeasy Lysis Buffer a las muestras y se resuspendió hasta obtener una solución homogénea. Para los tejidos, se llevó a cabo su disgregación utilizando varillas de homogeneización y jeringas de 1 ml con agujas de 21G.

La concentración del ARN extraído se determinó mediante espectrofotometría utilizando el Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, donde los ácidos nucleicos presentan una mayor absorbancia. Además, se evaluó la pureza de las muestras de ARN calculando el cociente de absorbancia 260 nm/280 nm, considerando como puras aquellas muestras cuyo cociente estaba próximo a 2.

Posteriormente, se realizó la transcripción de 1000 ng de ARN extraído a ADNc utilizando el Kit comercial *Verso cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific). Este proceso se realizó en un volumen final de 10 μ l, según lo especificado en la **Tabla 4**. La reacción se llevó a cabo en un baño termostático a 42°C durante 60 minutos, seguido de la inactivación de la enzima a 92°C durante 2 minutos. Las muestras de ADNc obtenidas se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Tabla 4: Reacción de transcripción de ARN extraído a ADNc.

REACTIVO	VOLUMEN \rightarrow C _{final}
Tampón (5x)	2 μ l \rightarrow 1x
dNTPs (5mM)	1 μ l \rightarrow 0.5mM
Oligo-dT (500ng/ μ l)	0.5 μ l \rightarrow 25ng/ μ l
RT enhancer	0.5 μ l
Enzima retrotranscriptasa	0.5 μ l
ARN molde (muestra)	5.5 μ l

2.10. qPCR

Se llevaron a cabo PCR cuantitativas (qPCR) para analizar la expresión génica, dado que este método es altamente sensible y permite una cuantificación relativa del ADN amplificado durante la PCR.

La amplificación se realizó en un termociclador ABI7500 (Applied Biosystems), mezclando 20 ng de ADNc, obtenido como se describe en el apartado anterior (2.9.), con la mezcla comercial para PCR, PowerUp™ SYBR™ Green (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La reacción se realizó en un volumen final de 10 µl, conforme a lo especificado en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Reacción para hacer qPCR.

REACTIVO	VOLUMEN → C _{final}
Oligonucleótido FW (10 µM)*	0.5 µl → 500nM
Oligonucleótido RV (10 µM)*	0.5 µl → 500nM
SYBR™ Green Master Mix (2x)	5 µl
ADNc molde (muestra)	4 µl

*Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Oligonucleótidos de genes de ratón usados para qPCR (adquiridos en MWG Biotech)

GEN	SECUENCIA FW (5'→3')	SECUENCIA RV (5'→3')
Lpin1	CTCCGCTCCCGAGAAAAG	TCATGTGCAAATCCACGGACT
Lpin2 (exón 4)	TTGGGTGATAATGGGGAAGCC	CTGAGCTGGCCTTTCATTTC
Lpin3	TGGAATTGGGATGACAAGGT	CACTGCAAGTACCCCTTGGT
Adgre1	TGACTCACCTTGTGGTCCTAA	CTTCCCAGAATCCAGTCTTTCC
Gapdh	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
CycloB (Ciclofilina B)*	GGCTCCGTCGTCTTCCTTTT	ACTCGTCCTACAGATTCATCTCC

*Nombre de la proteína para la que codifica el gen

El protocolo de amplificación se encuentra detallado en la **Figura 6**.

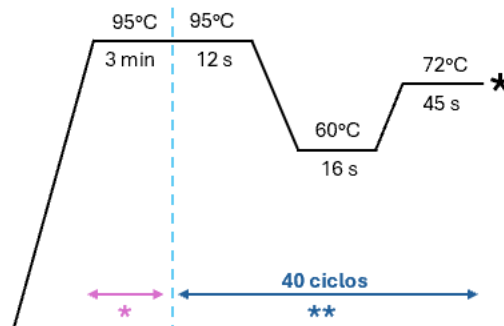


Figura 6: Diagrama del protocolo de qPCR. Incluye una fase de pre-incubación (*) seguida de una fase de amplificación (**). Al final de cada ciclo de amplificación, se registró la fluorescencia (*).

Para el análisis de datos, se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$, que relaciona el número de copias entre las diferentes condiciones que se obtiene al final de una reacción optimizada utilizando la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_t \text{ muestra} - C_t \text{ CycloB}) - (C_t \text{ calibrador} - C_t \text{ CycloB})]}$$

2.11. Estudios de RNA-seq

En este estudio, se analizó la expresión de diversos genes relacionados con el envejecimiento, basándose en un análisis previo de RNA-seq realizado en el laboratorio con muestras de macrófagos. El listado de genes analizados se obtuvo de la base de datos *Human Aging Genomic Resources* (HAGR). El *heatmap* se generó a partir de los valores de logCPM

(cuentas por millón) de los genes diferencialmente expresados entre las muestras *wt* y las carentes de lipina-2 o carentes de lipina-1, representando con color verde las menores expresiones y con color rojo las mayores.

2.12. Extracción de proteína

Para la obtención de los extractos proteicos de los cultivos celulares, se utilizó un tampón de lisis celular, cuya composición detallada se encuentra en la **Tabla 7**. Este tampón hipotónico permite que las células se hinchen y se rompan, liberando los núcleos y su contenido citoplasmático.

Las células se resuspendieron en tampón de lisis y se mantuvieron bajo agitación constante en una cámara fría durante 30 minutos. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 16000 xg durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante, que contiene la fracción proteica, se recogió.

Tabla 7: Composición del tampón de lisis celular para extracción de proteína.

REACTIVO	VOLUMEN → C _{final}
NaCl (1M)	150 µl → 150mM
Tris-HCl pH 7.4 (1M)	20 µl → 20mM
Triton X-100 (10%)	50 µl → 0.5%
Ortovanadato (200mM)	0,5 µl → 100µM
H₂O milliQ	759,5 µl
Antes de usar se añaden:	
PMSF (1mM)	10 µl
PIC (1x)	10 µl

Para determinar la concentración de proteína total en los lisados celulares, se utilizó el método de Bradford (*Protein Assay Dye Reagent concentrate*, Bio-Rad Laboratories)³⁸. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro BioPhotometer.

La concentración de proteína se determinó utilizando una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de BSA, aplicando la Ley de Lambert-Beer.

2.13. Inmunoblot de proteínas (*Western blot*)

Para analizar los niveles de expresión de proteínas, se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito por Laemmli³⁹, el cual separa las proteínas según su tamaño. Se utilizó un sistema discontinuo basándose en la utilización de dos geles contiguos de diferente porosidad, pH y fuerza iónica: un gel concentrador en la parte superior y un gel separador en la parte inferior.

Para esta electroforesis, 50 µg de muestra (obtenida como se describe en el apartado anterior, 2.12.) se desnaturalizaron en un tampón de carga (composición en la **Tabla 9**) a 95°C durante 5 minutos.

La electroforesis se realizó utilizando un gel separador de 10% de acrilamida-bis-acrilamida (Bio-Rad Laboratories) y un tampón de electroforesis (composición en la **Tabla 9**). Se aplicó un voltaje constante de 65V durante 20 minutos para compactar la muestra y luego 120V durante 90 minutos para separar las proteínas por tamaño. Se corrieron en paralelo con las muestras estándares preteñidos de diferentes pesos moleculares (*Spectra™ Multicolor Broad Protein Ladder*, Bio-Rad Laboratories).

Posteriormente, se realizó la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) denominado *Western Blot* en el tampón de transferencia, CAPS. Las proteínas se transfirieron usando un sistema Bio-Rad a 300 mA durante 90 minutos.

Para reducir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario a la membrana de PVDF, esta se incubó con una solución de bloqueo rica en proteínas compuesta por PBS (1x) y 5% de leche (p/v) durante toda la noche a 4°C en agitación suave.

Para el *immunoblot* de las proteínas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS Tween-20 suplementado con 0.5% de leche (composición detallada en la **Tabla 9**). Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, diluido en PBS Tween-20 suplementado con 0.5% de leche.

En la **Tabla 8** se muestra el listado de los anticuerpos y la dilución empleada.

Tabla 8: Listado de anticuerpos utilizados en Western Blot.

ANTICUERPO PRIMARIO			
ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Lpin2	Conejo	1:1000 0.5% leche	Bethyl
Cox-2	Conejo	1:1000 0.5% leche	Cayman
iNOS	Ratón	1:1000 0.5% leche	BDbioscience
β -Actina	Ratón	1:20000 0.5% leche	Sigma-Aldrich
ANTICUERPO SECUNDARIO			
ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-IgG de conejo	Burro	1:5000 0.5% leche	Cytiva
Anti-IgG de ratón	Cabra	1:5000 0.5% leche	Biorad

Finalmente, las membranas se incubaron con el reactivo ECL (*Western Blotting Substrate*, Thermo Fisher Scientific), suplementado con 3% de H₂O₂. La señal de quimioluminiscencia se detectó mediante películas autorradiográficas *Fuji-Medical XRay Film* (Fujifilm), exponiendo la película en el *cassette* de revelado (GE Healthcare, Amersham, Biosciences) en completa oscuridad durante el tiempo adecuado. La película se reveló en el sistema Curix 60 (AGFA) y se digitalizó con el escáner GS-800 *Calibrated Densitometer* (Bio-Rad).

Tabla 9: Composición de los tampones utilizados en Western Blot.

TAMPONES	COMPOSICIÓN
Tampón de carga (5x)	156mM Tris, 50% glicerol (v/v), 10% SDS (p/v), 20% β -mercaptoetanol (v/v), 0.002% azul de bromofenol (p/v) Ajustándolo a pH 6.8
Tampón de electroforesis	25mM Tris-base, 0.2M glicina, 1g/l SDS
Tampón fosfato salino con Tween-20 (PBS Tween-20)	136mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5mM KH ₂ PO ₄ Ajustándolo a pH 7.4 0.05% Tween-20 (v/v)

2.14. Análisis estadístico de los datos

Los datos presentados se representan como media \pm error estándar (S.E.M). Las comparaciones entre los grupos se determinaron utilizando el análisis estadístico *t de Student* o ANOVA de una y dos vías, indicado en las figuras. Para este análisis se emplearon los programas ImageJ y SigmaPlot 11.0, considerándose estadísticamente significativos valores de p menores o iguales a 0.05.

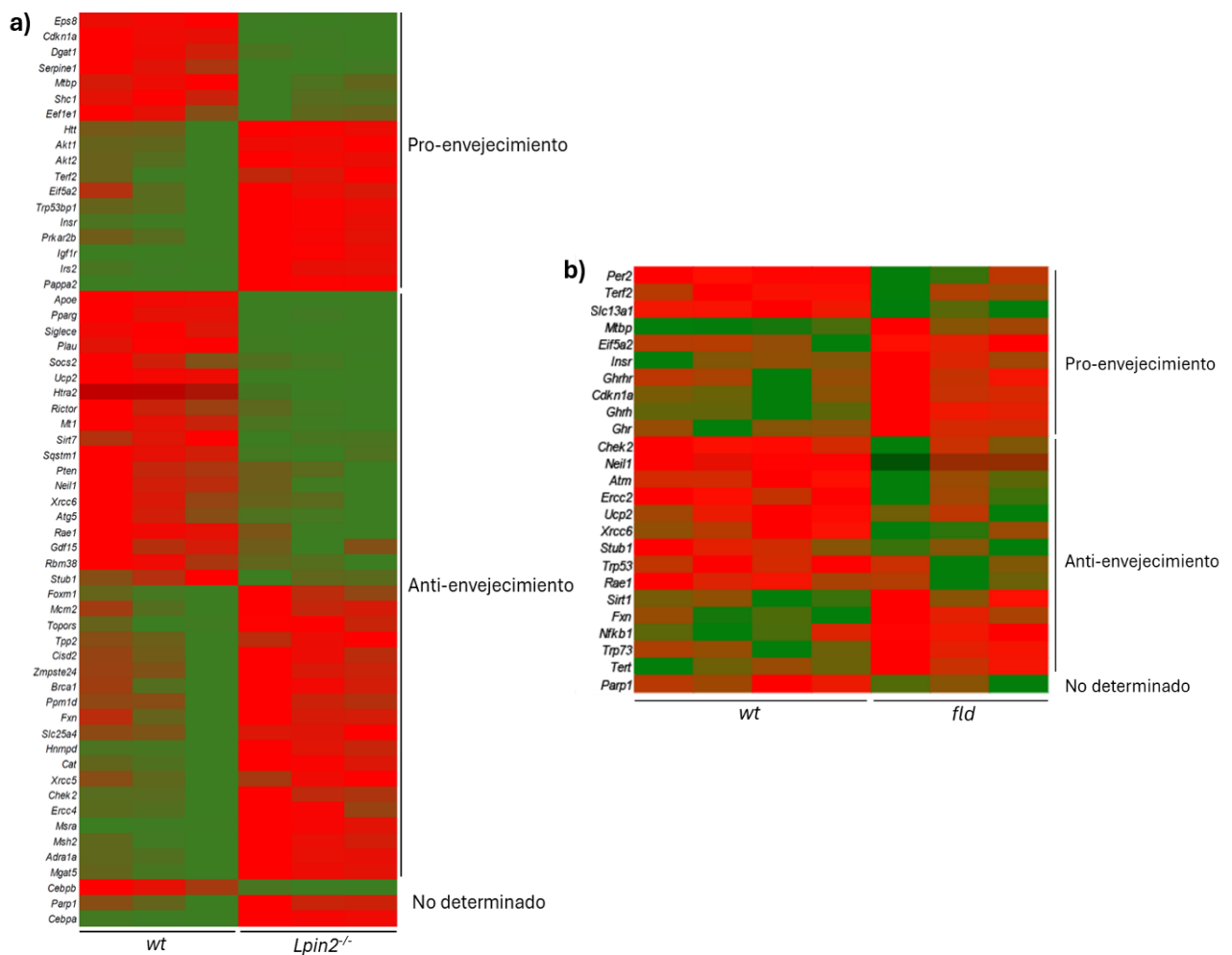
3. RESULTADOS

3.1. Estudio de la expresión de genes relacionados con el envejecimiento

En el presente trabajo, nos propusimos estudiar si la expresión de lipina-1 o lipina-2 afectaba la expresión de diversos genes relacionados con el envejecimiento.

El *heatmap* mostrado en la **Figura I** revela que la ausencia de lipina-2 o de lipina-1 provoca alteraciones significativas tanto en genes pro-envejecimiento como en genes anti-envejecimiento.

En términos específicos en ausencia de lipina-2, se observaron cambios relevantes en genes anti-envejecimiento, tales como *ApoE*, *Rictor* y *Pparg* (**Figura I-c**). De igual manera, los genes pro-envejecimiento como *Akt1*, *Akat2* e *Igf1r* mostraron cambios significativos en su expresión (**Figura I-d**). No obstante, el análisis de la variación global de la expresión génica observada en el *heatmap*, se evidencia que la alteración en los genes pro- y anti-envejecimiento es equitativa. Esta observación sugiere que la lipina-2 no puede ser categorizada de manera concluyente como un factor exclusivamente pro- o anti-envejecimiento, es decir, su rol exacto en los procesos de envejecimiento celular requiere estudios adicionales para ser elucidado completamente. En el caso de la lipina-1 también se encontraron cambios en genes relacionados con el envejecimiento, aunque en menos número que para la lipina-2.



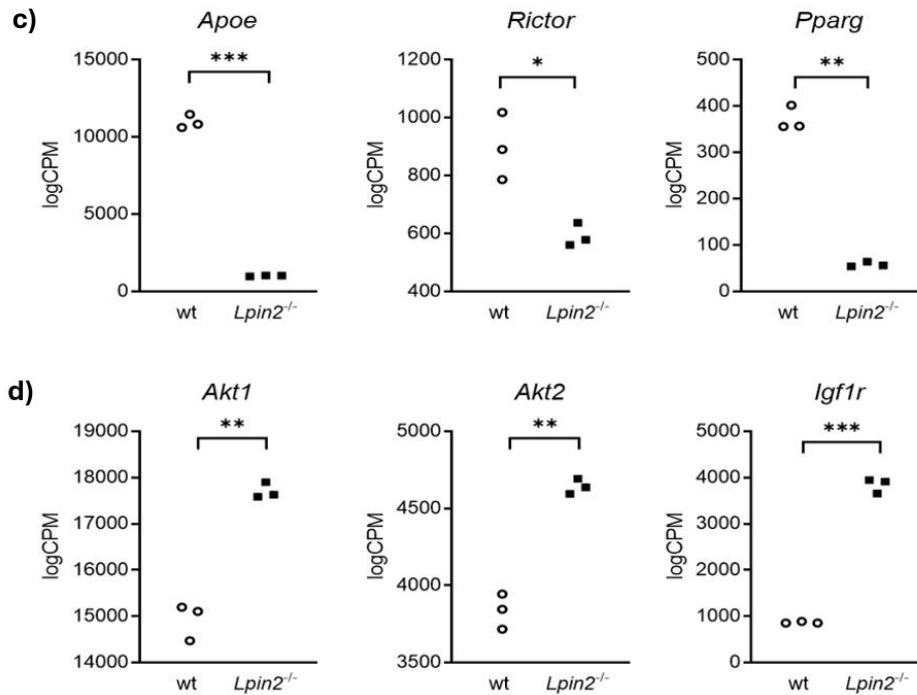


Figura 1: Análisis de la expresión de genes relacionados con el envejecimiento. Heatmap de genes relacionados con el envejecimiento en macrófagos wt y *Lpin2*^{-/-} (a) o de animales wt y fld (b). c) Representación gráfica de la expresión génica de los genes *Apoe*, *Rictor* y *Pparg* (anti-envejecimiento) en macrófagos wt y *Lpin2*^{-/-}. d) Representación gráfica de los genes *Akt1*, *Akt2* e *Igf1r* (pro-envejecimiento) en macrófagos wt y *Lpin2*^{-/-}. Los datos representan las medidas de tres cultivos independientes (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (comparando wt vs *Lpin2*^{-/-}; test estadístico t de Student).

3.2. Efecto del envejecimiento en la expresión génica de las lipinas

Estudios previos muestran que la lipina-1 es capaz de compensar la ausencia de lipina-2 en el cerebelo de ratones jóvenes, pero esta capacidad se pierde con el envejecimiento³⁷. En este trabajo, nos propusimos investigar si la pérdida de dicha compensación ocurre también en otros tejidos, fijándonos especialmente en aquellos que están relacionados con las respuestas inflamatorias.

Para ello, analizamos la expresión génica relativa de los tres miembros de la familia de las lipinas (*Lpin1*, *Lpin2* y *Lpin3*) en hígado y bazo de ratones jóvenes y viejos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura II**.

En ratones jóvenes, los datos indican que tanto *Lpin1*, como *Lpin3* aumentan su expresión en respuesta a la ausencia de lipina-2 en ambos tejidos, sugiriendo una compensación efectiva.

Sin embargo, en ratones viejos se observa una notable disminución en esta capacidad compensatoria. Los niveles de expresión de lipina-1 y lipina-3 no se incrementan en respuesta a la falta de lipina-2, ni en el hígado ni en el bazo. Esta pérdida de compensación podría contribuir a disfunciones celulares y tisulares relacionadas con el envejecimiento y al desarrollo de inflamación, ya que las lipinas juegan roles cruciales en células inmunes como los macrófagos.

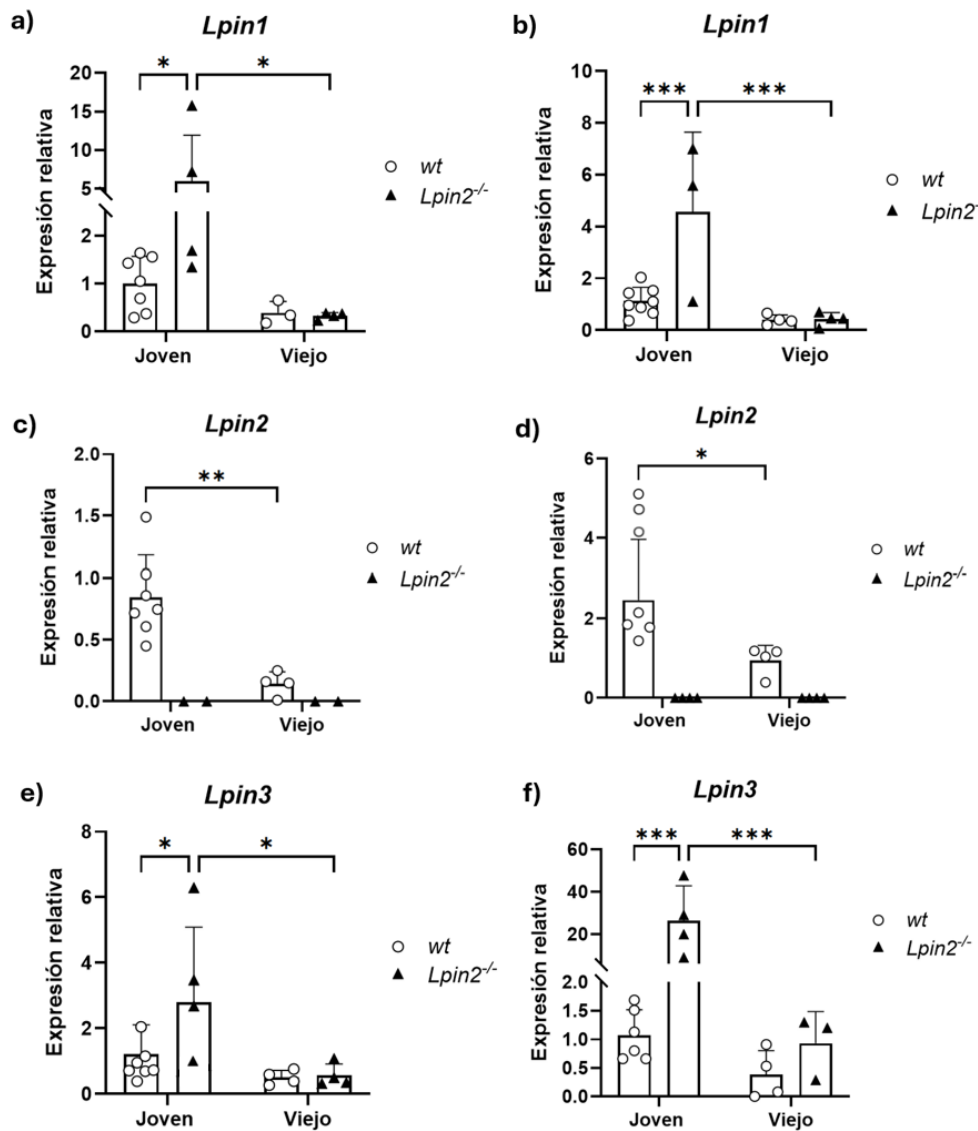


Figura II: Expresión relativa de los genes que codifican para lipinas. Representación gráfica de la expresión génica relativa de lipina-1 (a), lipina-2 (c) y lipina-3 (e) en el hígado de ratones jóvenes y viejos; y de la expresión relativa de lipina-1 (b), lipina-2 (d) y lipina-3 (f) en el bazo de ratones jóvenes y viejos. Los datos se expresan como medias \pm error estándar de ratones independientes ($n=7$ wt joven; $n=4$ $Lpin2^{-/-}$ joven; $n=4$ wt viejo; $n=4$ $Lpin2^{-/-}$ viejo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test estadístico t de Student).

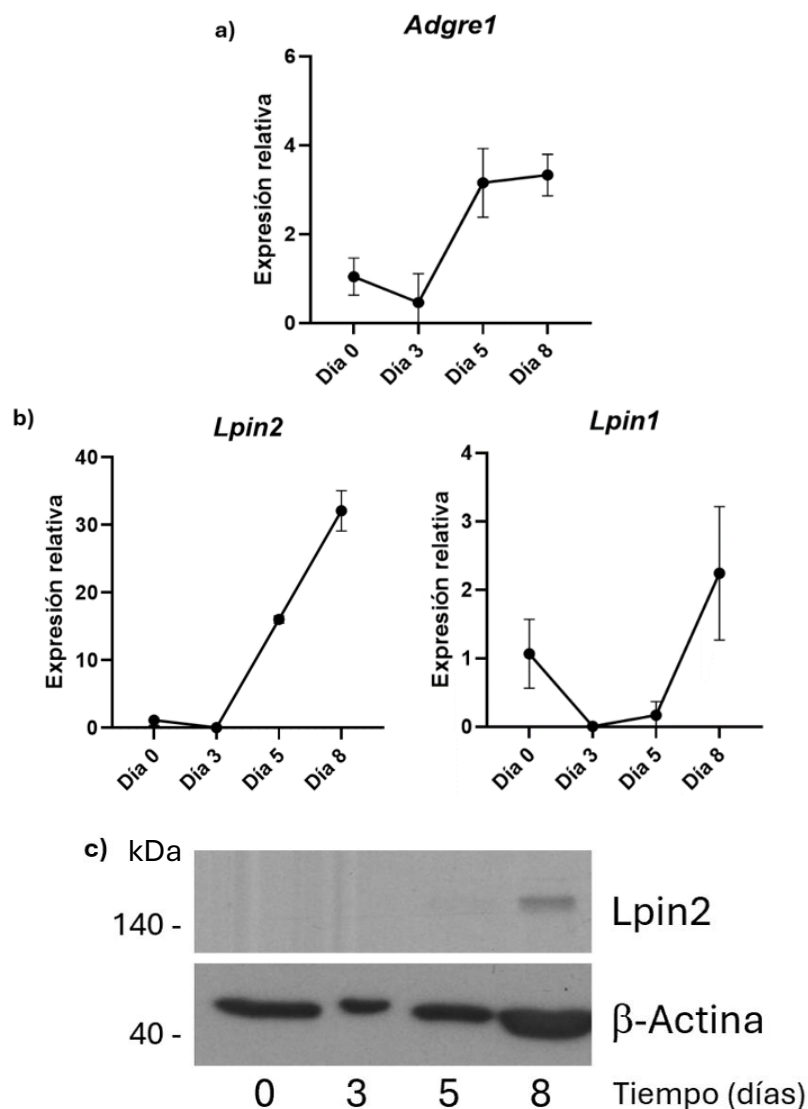
En resumen, los resultados revelan que, de forma similar a lo descrito en la literatura en cerebelo, la capacidad de la lipina-1 y lipina-3 para compensar la ausencia de expresión de lipina-2 se mantiene en tejidos como el hígado y bazo en ratones jóvenes. Sin embargo, esta capacidad se pierde con el envejecimiento. Esta pérdida de compensación podría tener implicaciones importantes en la fisiología de estos tejidos en el contexto del envejecimiento y de la inflamación.

3.3. Expresión de las lipinas durante la diferenciación de BMDM de animales envejecidos

Investigaciones previas han demostrado que el envejecimiento afecta la producción de células de la línea mieloide durante la hematopoyesis³³, y estudios previos en el laboratorio han demostrado que la expresión de las lipinas se altera durante la diferenciación a macrófagos. En base a ello, se propuso estudiar la expresión de las lipinas durante el proceso de diferenciación a macrófagos provenientes de animales envejecidos.

Los análisis por qPCR realizados muestran que la expresión de *Adgre1* (gen que codifica para la expresión del marcador de macrófago F4/80) aumenta durante la diferenciación de los macrófagos, indicando que las células hematopoyéticas de animales envejecidos mantienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* a macrófago (**Figura III-a**). Observamos también un incremento progresivo en la expresión de *Lpin2*, coincidiendo con estudios previos de nuestro laboratorio. En contraste, *Lpin1* mostró una disminución en sus niveles de expresión durante la diferenciación, seguida de una recuperación a día 8 (**Figura III-b**). En estudios anteriores del laboratorio con animales jóvenes, se había reportado un aumento progresivo de lipina-1 durante la diferenciación, lo que no coincide con los resultados obtenidos en animales viejos.

La expresión de lipina-2 fue confirmada mediante *Western Blot*, mostrando que su presencia es detectable solo a 8 días de diferenciación, cuando los macrófagos están completamente diferenciados (**Figura III-c**). De hecho, mediante análisis por microscopía (**Figura III-d**), observamos al octavo día de diferenciación que las células presentaban la adherencia y la morfología característica de los macrófagos.



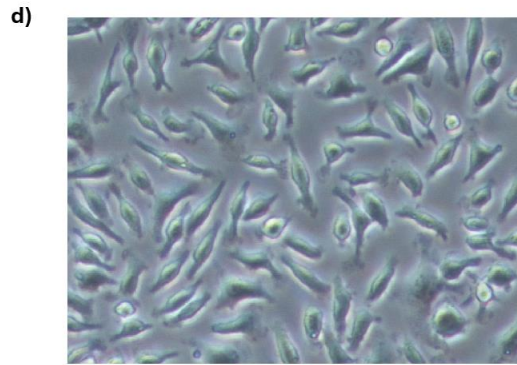


Figura III: Expresión génica del marcador de macrófago *Adgre1* (F4/80) y de las lipinas durante la diferenciación de BMDM de ratones envejecidos. a) Representación gráfica de la expresión génica del marcador de macrófago F4/80 (*Adgre1*) durante la diferenciación de las BMDM. b) Representación gráfica de la expresión génica de *lipina-1* y *lipina-2* a lo largo de la diferenciación de las BMDM. c) Western Blot de *lipina-2* durante la diferenciación de BMDM, utilizando β -actina como control de carga. d) Imagen de microscopio óptico de los macrófagos obtenidos al octavo día de la diferenciación. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de ratones independientes ($n=2$).

Estos hallazgos sugieren que el envejecimiento altera la expresión de las lipinas durante la diferenciación de HSC a macrófagos. La confirmación de la expresión de *Adgre1* y las características morfológicas de los macrófagos respaldan la diferenciación efectiva de HSC en este contexto de envejecimiento.

3.4. Efecto de la falta de *lipina-2* en la diferenciación de BMDM, en respuestas inflamatorias *in vivo* y sobre el metabolismo de la glucosa e insulina en el envejecimiento

Dada la importancia de la *lipina-2* en la biología de los macrófagos⁵, evaluamos el impacto de la ausencia de esta lipina en la diferenciación de BMDM de animales envejecidos.

Para analizar este proceso de diferenciación, realizamos un estudio de expresión génica cuyos resultados se presentan en la **Figura IV**. En ausencia de *lipina-2* la expresión de *Adgre1* presenta una tendencia a aumentar, especialmente a día 8 de diferenciación con respecto a las células *wt*, lo que confirma que este proceso no se ve afectado por la ausencia de *lipina-2* (**Figura IV-a**). Además, se observó que la falta de *lipina-2* no se compensa por incrementos en la expresión de *Lpin1* durante el proceso de diferenciación (**Figura IV-b**).

Al octavo día de diferenciación, las observaciones microscópicas revelaron que las BMDMs carentes de *lipina-2* no presentaban diferencias morfológicas en comparación con las BMDM obtenidas de ratones viejos *wt*, mostradas anteriormente (**Figura III-d**).

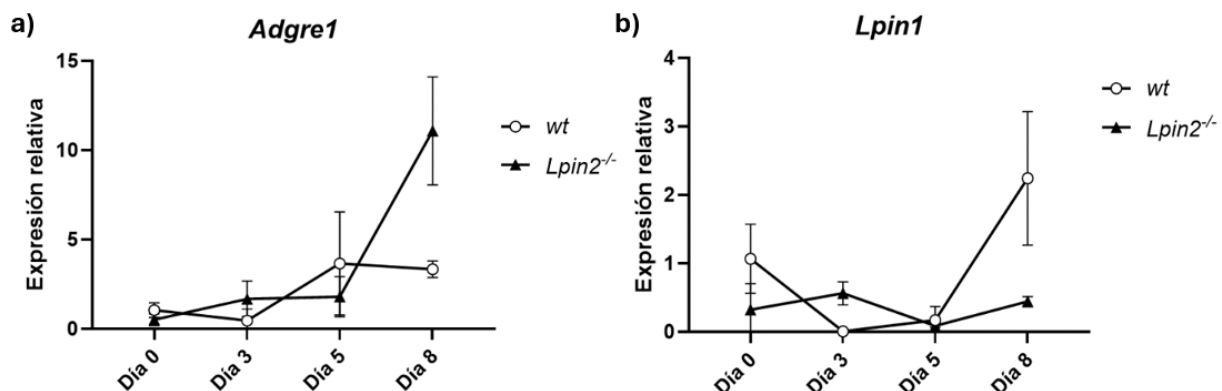


Figura IV: Diferenciación de BMDM de animales *Lpin2*^{-/-} envejecidos. a) Representación gráfica de la expresión génica del marcador de macrófagos F4/80 (*Adgre1*) durante la diferenciación de las BMDM carentes de *lipina-2*. b) Representación gráfica de la expresión génica de *Lpin1* a lo largo de la diferenciación de las BMDM carentes de *lipina-2*. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de ratones independientes ($n=2$).

En resumen, los hallazgos confirman que el envejecimiento afecta la capacidad de compensación entre las diferentes lipinas. Sin embargo, sugieren que la ausencia de lipina-2 no inhibe la diferenciación de los macrófagos.

Investigaciones anteriores han demostrado que el sistema inmunológico se altera durante el envejecimiento³². Además, estudios previos en nuestro laboratorio han revelado una respuesta exacerbada en la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β y TNF- α , en animales jóvenes carentes de lipina-2 tras la inducción de shock endotóxico. Basándonos en estos antecedentes y con el objetivo de profundizar en la implicación funcional de la lipina-2, en el presente estudio nos propusimos investigar las respuestas a un shock endotóxico en animales envejecidos.

Para realizar este análisis, utilizamos ratones envejecidos, tanto *wt* como carentes de lipina-2, que fueron posteriormente regentipados (**Figura V-a**). Tras 6 horas de tratamiento con LPS (inyección intraperitoneal) se recogió la sangre mediante punción cardiaca y se evaluaron los niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α mediante ELISA, según lo detallado en la sección de materiales y métodos.

Los resultados obtenidos, representados en la **Figura V**, no muestran diferencias significativas en los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 (**Figura V-b**), IL-1 β (**Figura V-c**) y TNF- α (**Figura V-d**) entre los animales viejos *wt* y los animales viejos carentes de lipina-2.

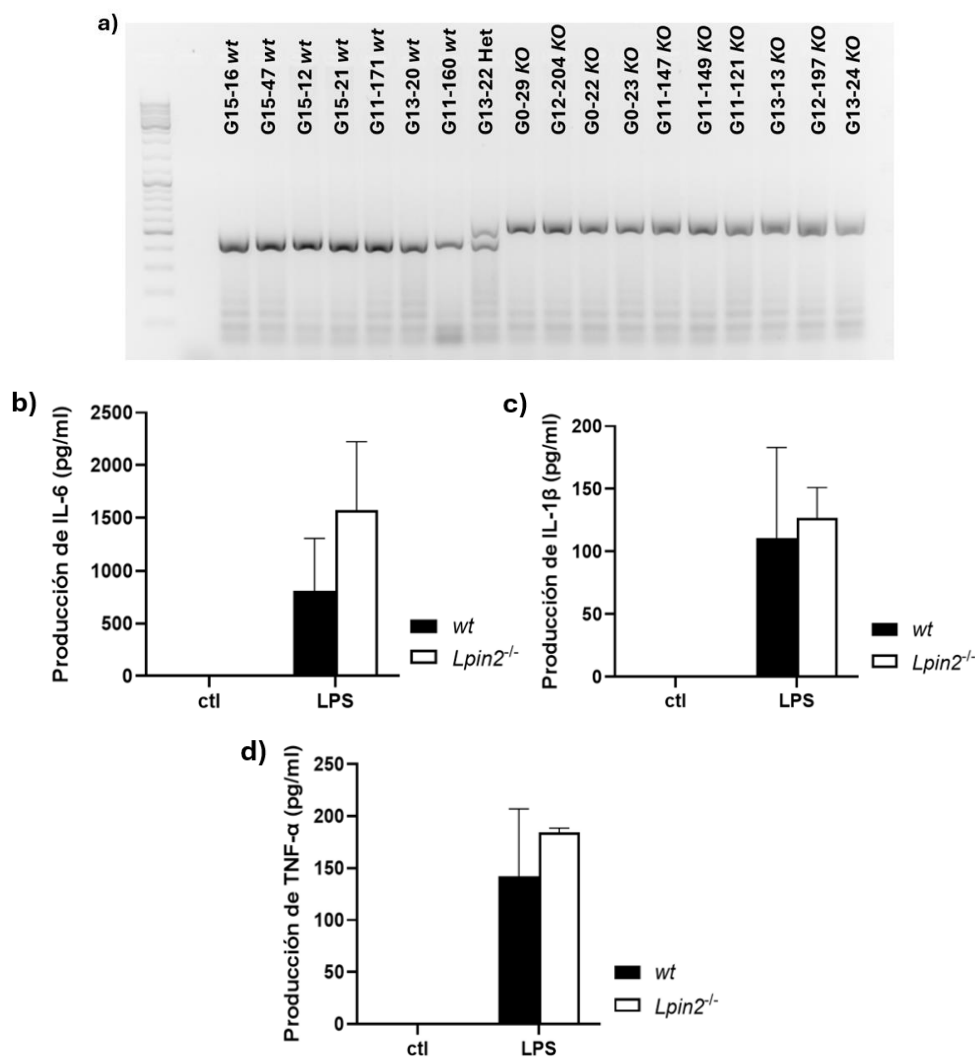


Figura V: Respuesta inflamatoria in vivo frente a un shock endotóxico en ausencia de lipina-2. a) Genotipado de los ratones hembra empleados para el estudio. b) Representación gráfica de la expresión de IL-6, IL-1 β y TNF- α durante el shock endotóxico.

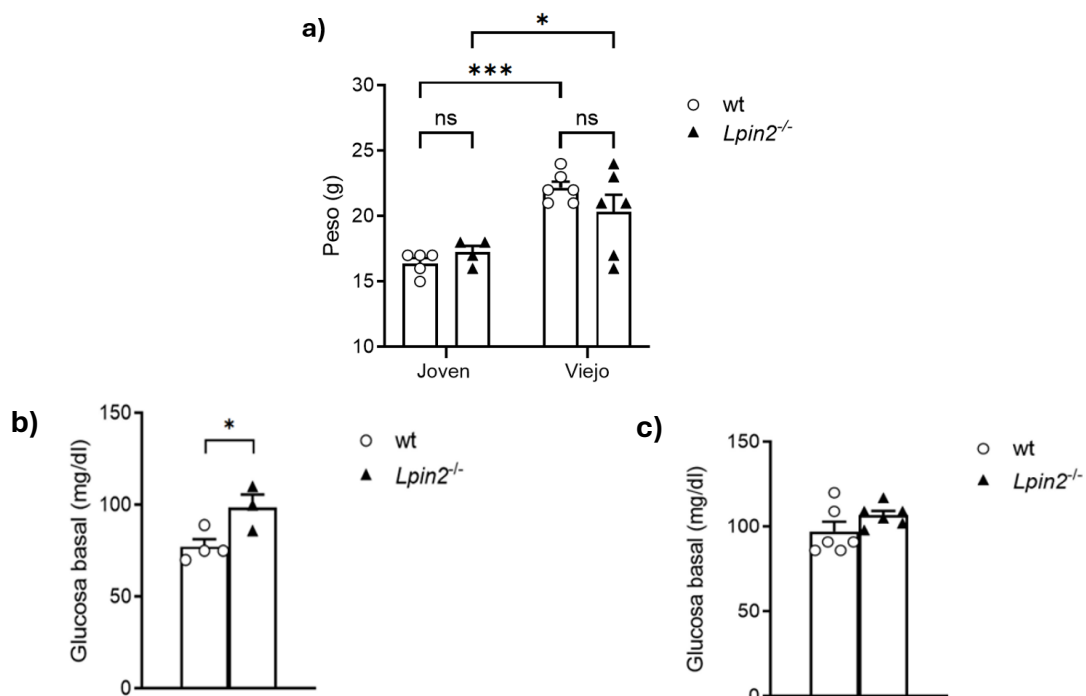
la activación mediada por LPS en ratones viejos. Se recogió suero de ratones, wt y *Lpin2*^{-/-}, que habían sido tratados con LPS (5 mg/Kg) durante 6 horas. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de ratones independientes (n=8 wt; n=10 *Lpin2*^{-/-}).

Los resultados obtenidos difieren de los observados en animales jóvenes, donde la ausencia de lipina-2 provoca un exceso de inflamación. Estos datos sugieren que la ausencia de lipina-2 no tiene un impacto significativo en la modulación de la expresión de estas citoquinas en el contexto del envejecimiento tras un shock endotóxico. Sin embargo, esta conclusión podría estar limitada por el reducido número de animales empleados, o porque el tiempo de tratamiento con LPS fue demasiado prolongado para detectar diferencias en alguna de estas citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α).

Estudios previos han demostrado que el metabolismo de la glucosa y la insulina se ve alterado con el envejecimiento³⁶. En base a estos hallazgos, investigamos el metabolismo de la glucosa en ratones jóvenes y viejos carentes de lipina-2 con el objetivo de conocer si existe una implicación metabólica por parte de la lipina-2.

Se evaluó primeramente el peso de los animales. Los animales envejecidos mostraron mayor peso que los animales jóvenes (**Figura VI-a**) y no se detectaron diferencias significativas entre animales que expresasen o no lipina-2, sugiriendo que la enzima no participa en este parámetro en animales jóvenes o envejecidos.

En cuanto al metabolismo de la glucosa, los datos indican que los ratones jóvenes carentes de lipina-2 tienen niveles basales de glucosa ligeramente más altos que los ratones wt (**Figura VI-b**), pero responden mejor en la prueba de tolerancia a la glucosa (**Figura VI-d** y **Figura VI-f**). Sin embargo, el análisis del metabolismo de la glucosa en ratones viejos carentes de lipina-2, reveló que éstos mantienen un metabolismo de la glucosa idéntico al de los ratones wt (**Figura VI-c**, **Figura VI-e** y **Figura VI-g**).



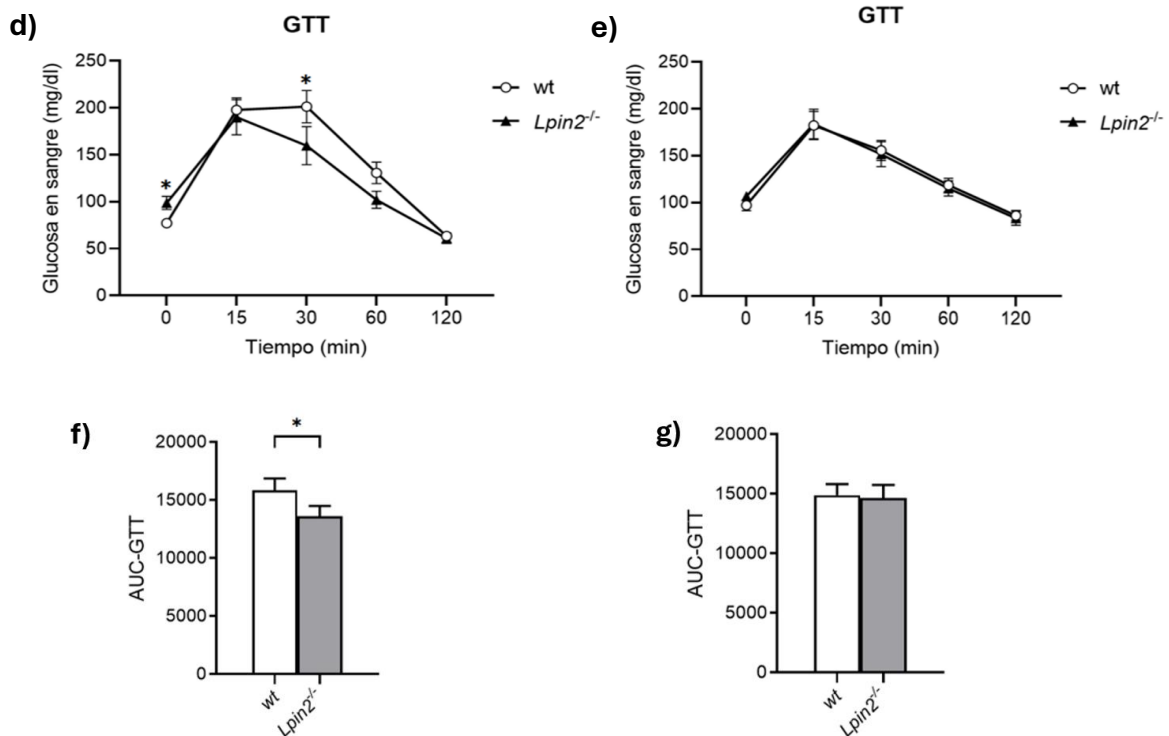
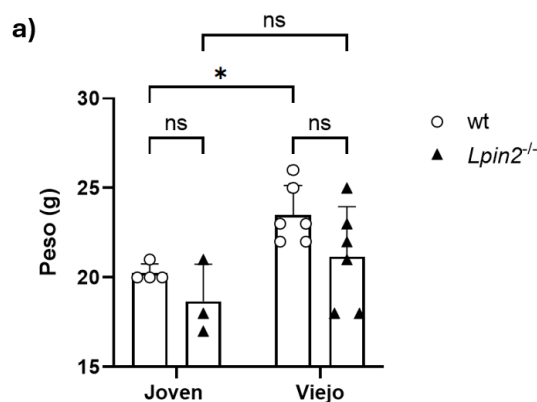


Figura VI: Efecto de la ausencia de lipina-2 en el metabolismo de la glucosa. a) Representación gráfica de los pesos de ratones jóvenes y viejos, wt y Lpin2^{-/-}, utilizados para estudiar el metabolismo de la glucosa. Representación gráfica de la curva del test de tolerancia a la glucosa (GTT) en ratones jóvenes (b) y viejos (c), wt y Lpin2^{-/-}; de la glucosa basal (a tiempo 0 de la prueba de tolerancia a la glucosa, GTT) en ratones jóvenes (d) y viejos (e), wt y Lpin2^{-/-}; y del área bajo la curva (AUC-GTT) en ratones jóvenes (f) y viejos (g), wt y Lpin2^{-/-}. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de ratones independientes (n=4 jóvenes; n=6 viejos). *p < 0,05, ***p < 0,001 (empleando el test estadístico t de Student).

En cuanto a la respuesta a insulina, los resultados mostrados en la **Figura VII-a** no revelan diferencias significativas dependiente de la lipina-2 en el peso de los ratones, tanto jóvenes como viejos, en concordancia con lo visto previamente en los ratones empleados para el estudio del metabolismo de la glucosa. Los resultados representados en la **Figura VII** muestran que en ratones jóvenes deficientes en lipina-2 no existen diferencias significativas en comparación con los ratones wt, indicando un metabolismo de la insulina normal (**Figura VII-b**, **Figura VII-d** y **Figura VII-f**). Sin embargo, en ratones viejos deficientes en lipina-2, se observó un ligero aumento en la respuesta a la insulina con respecto a los ratones wt, aunque su respuesta es menor y necesitan más tiempo para recuperar los niveles de glucosa basales (**Figura VIII-c**, **Figura VII-e** y **Figura VII-g**).



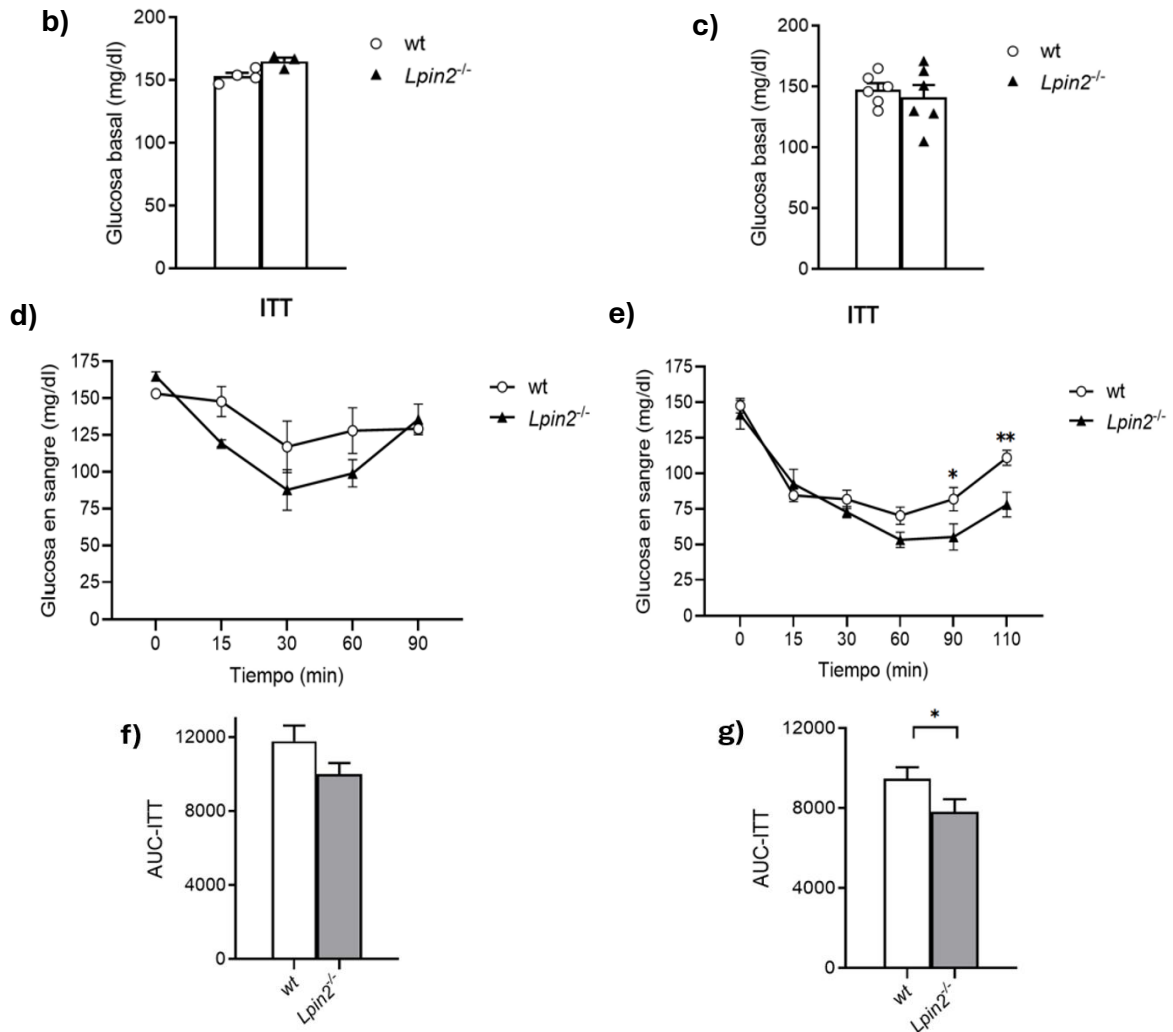


Figura VII: Efecto de la ausencia de lipina-2 en respuesta a insulina. a) Representación gráfica de los pesos de ratones jóvenes y viejos, wt y *Lpin2^{-/-}*, utilizados para estudiar el metabolismo de la insulina. Representación gráfica del test de tolerancia a la insulina (ITT) en ratones jóvenes (b) y viejos (c), wt y *Lpin2^{-/-}*; de la glucosa basal (a tiempo 0 de la prueba de tolerancia a la insulina, ITT) en ratones jóvenes (d) y viejos (e), wt y *Lpin2^{-/-}*; y del área bajo la curva (AUC-ITT) en ratones jóvenes (f) y viejos (g), wt y *Lpin2^{-/-}*. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de ratones independientes ($n=4$ jóvenes; $n=6$ viejos). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (empleando el test estadístico t de Student).

En resumen, los resultados indican que la ausencia de lipina-2 resulta en un ligero incremento de la sensibilidad a insulina en ratones viejos, sin afectar significativamente el peso corporal o los niveles de glucosa en ninguna de las edades estudiadas.

3.5. Efecto de la falta de lipina-1 en la diferenciación de BMDM, en respuestas inflamatorias *in vitro* y sobre el metabolismo de la glucosa e insulina en el envejecimiento

Se ha demostrado en estudios anteriores que las lipinas juegan un papel crucial durante la activación de los macrófagos⁵. Además, datos previos de nuestro laboratorio indicaban que, en ratones jóvenes sin lipina-1, existe una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias tras tratamiento con LPS. En este estudio, también nos propusimos investigar cómo la falta de lipina-1 afecta la diferenciación de los macrófagos durante el envejecimiento y su influencia en las respuestas inflamatorias inducidas por LPS.

Mediante análisis por Western Blot se evaluó en células de animales viejos wt y *flid* la expresión de lipina-2 durante el proceso de diferenciación macrófagica y de marcadores de activación inflamatoria (COX-2 e iNOS) tras estimulación con LPS a día 8 de diferenciación (**Figura VIII**).

Los hallazgos indican que la lipina-2 se expresa únicamente una vez que las células se han diferenciado en macrófagos, en concordancia con lo mostrado anteriormente (**Figura III**). Sin embargo, observamos una disminución en su expresión, lo que respalda la hipótesis de que, en ausencia de una lipina, las otras no pueden compensar esta falta en el envejecimiento. Además, la ausencia de lipina-1 no provocó cambios significativos en la expresión de iNOS y COX-2 tras estimulación con LPS, sugiriendo que la ausencia de lipina-1 no contribuye a la desregulación de las respuestas inflamatorias mediadas por LPS en el envejecimiento.

Al octavo día de diferenciación, las observaciones por microscopía revelaron que las células no presentaban diferencias morfológicas en comparación con las BMDM obtenidas de ratones viejos *wt*, mostradas en la **Figura III-d**.

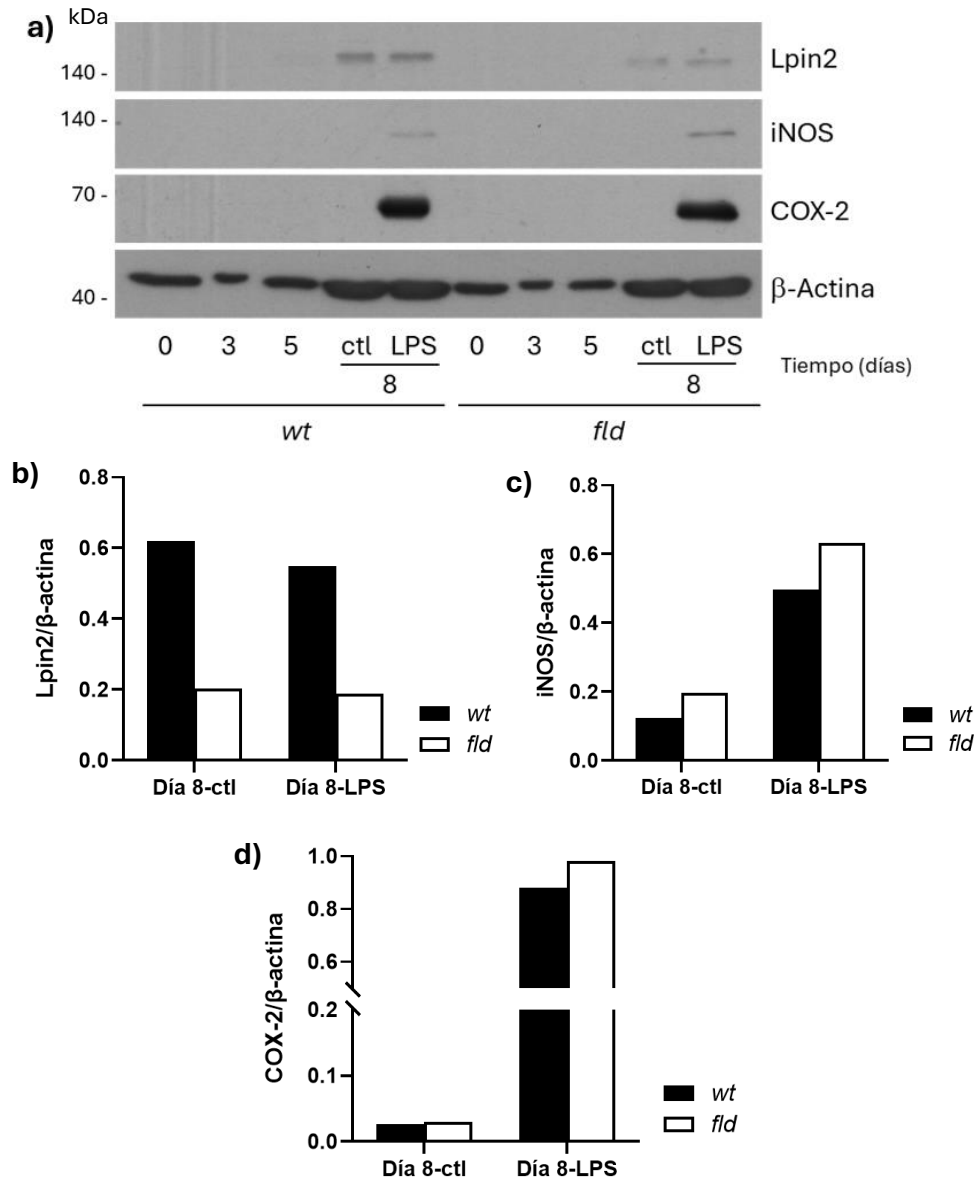


Figura VIII: Efecto de la lipina-1 en la expresión de lipina-2 durante la diferenciación de BMDM de animales envejecidos y en la expresión de marcadores de la activación mediada por LPS. a) Expresión proteica de lipina-2 (Lipin2), iNOS y COX-2 en los extractos celulares obtenidos de células wt y fld de animales envejecidos, analizado por Western Blot. β -actina se utilizó como control de carga. Cuantificación relativa de la expresión proteica de lipina-2 (b), iNOS (c) y COX-2 (d) respecto a la β -actina, mediante densitometría utilizando Fiji.

Los resultados parecen indicar que, aunque la lipina-2 es esencial para la diferenciación de macrófagos, su expresión disminuye con la edad. Además, los resultados sugieren que la

lipina-1 no tiene un impacto significativo en las respuestas inflamatorias asociadas a LPS en el envejecimiento, al contrario de lo descrito previamente para animales jóvenes¹⁸.

En cuanto a parámetros metabólicos, el análisis del peso corporal mostró que la lipina-1 participa en el mantenimiento del peso corporal, tanto en animales jóvenes como envejecidos (**Figura IX-a**).

Se ha descrito en estudios anteriores que los ratones jóvenes deficientes en lipina-1 desarrollan menor tolerancia a la glucosa⁴⁰. Basándonos en estos hallazgos, investigamos el metabolismo de la glucosa en ratones envejecidos con deficiencia de lipina-1.

En ratones viejos carentes de lipina-1, observamos una marcada alteración en la homeostasis de la glucosa, como se ilustra en la **Figura IX-b** y **Figura IX-c**, concordando con la bibliografía en ratones jóvenes⁴⁰. Además, estos ratones mostraron niveles basales de glucosa significativamente más altos en comparación con los ratones wt (**Figura IX-b**).

En resumen, los resultados indican que la ausencia de lipina-1 provoca una notable alteración en el metabolismo de la glucosa y afecta a la ganancia de peso en ratones independientemente de su edad.

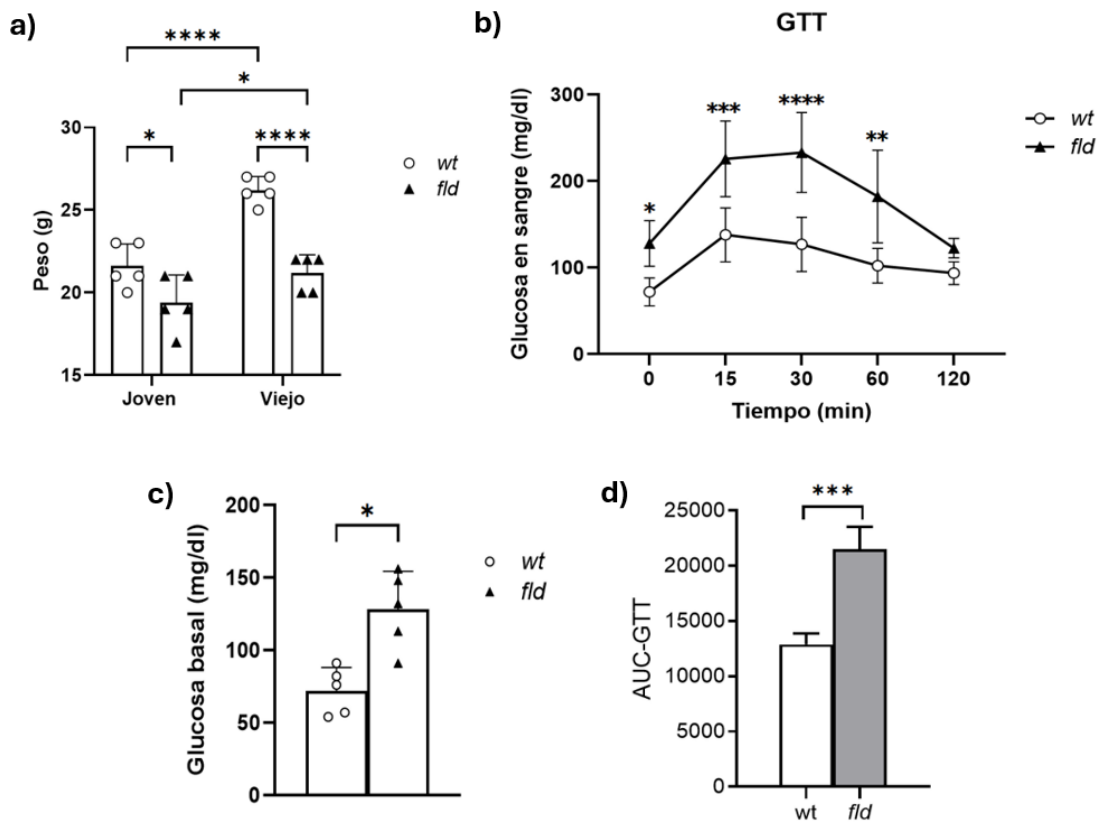


Figura IX: Efecto de la falta de lipina-1 en el metabolismo de la glucosa. a) Representación gráfica de los pesos de ratones jóvenes y viejos, wt y fld, utilizados para estudiar el metabolismo de la glucosa. b) Representación gráfica del test de tolerancia a la glucosa en ratones viejos, wt y fld (GTT). c) Representación gráfica de la glucosa basal (a tiempo 0 de la prueba de tolerancia a la glucosa, GTT) en ratones viejos, wt y fld. d) Representación gráfica del área bajo la curva (AUC-GTT) en ratones viejos, wt y fld. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de ratones independientes (n=5). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (empleando el test estadístico t de Student).

4. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un proceso progresivo que afecta a los seres vivos, provocando el deterioro del organismo y facilitando la aparición de diversas enfermedades y deficiencias. En este contexto, la excesiva activación del sistema inmune innato puede llevar a estados de inflamación crónica. La comprensión de los mecanismos subyacentes a la inflamación ha ganado importancia en el estudio del envejecimiento³¹. Investigaciones previas en nuestro laboratorio han demostrado que las lipinas juegan un papel crucial en la activación de las células del sistema inmune innato, especialmente en los macrófagos⁵. Por lo tanto, entender y estudiar el papel de las lipinas en estas células es esencial para profundizar en la investigación sobre el envejecimiento.

En primer lugar, este estudio ha permitido observar mediante análisis de datos de expresión génica de experimentos de RNA-seq que los macrófagos presentan alteraciones en la expresión de genes relacionados con el envejecimiento en ausencia de lipina-2 o lipina-1. Los resultados muestran cambios equilibrados en la expresión de genes anti-envejecimiento y pro-envejecimiento, lo que impide determinar de manera concluyente el papel de las lipinas en este contexto. Sin embargo, sería interesante investigar en el contexto de envejecimiento si estos cambios de expresión afectan la funcionalidad de los macrófagos, ya que la disminución en genes anti-envejecimiento como *ApoE*, *Rictor* y *Pparg*, observada en ausencia de lipina-2, está relacionada con un aumento de la inflamación. La ausencia de *ApoE* se asocia con una mayor probabilidad de desarrollar lesiones ateroscleróticas espontáneas⁴¹, la ausencia de *Rictor* reduce la capacidad de los macrófagos para eliminar células apoptóticas⁴², y la falta de *Pparg* está relacionada con una mayor expresión de genes proinflamatorios^{43,44}. Además, el aumento en la expresión de genes pro-envejecimiento como *Akt* e *Igf1r*, observado en ausencia de lipina-2, también se relaciona con un incremento de la inflamación al aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias^{45,46}. Estos hallazgos concuerdan con resultados previos obtenidos en el laboratorio, que demuestran que los macrófagos carentes de lipina-2 son más proinflamatorios⁴⁷.

Se ha descrito con anterioridad que la ausencia de una lipina en el cerebelo provoca una compensación por parte del resto de la familia, y que el envejecimiento elimina esa compensación³⁷. En el presente trabajo se ha investigado el comportamiento de las lipinas en hígado y bazo en ratones jóvenes y envejecidos. En bazo por ser un tejido inmune relevante y en hígado para poder comparar con estudios anteriores³⁷ y por ser un órgano que responde a estímulos inflamatorios como el LPS. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman esta compensación entre lipinas en los órganos de ratones jóvenes. Sin embargo, los resultados también demuestran que esta compensación se pierde con el envejecimiento en los órganos analizados, hígado y bazo, lo que, junto a los datos de cerebelo anteriormente publicados³⁷, sugiere que esta pérdida podría ocurrir a nivel sistémico.

En este trabajo se ha confirmado que las células hematopoyéticas envejecidas mantienen la capacidad de diferenciarse exitosamente a macrófagos *in vitro*. Además, la expresión de lipina-2 aumentaba durante el proceso de diferenciación de los macrófagos procedentes de ratones envejecidos, como se había descrito previamente por nuestro laboratorio para macrófagos provenientes de ratones jóvenes. No obstante, los niveles de lipina-1 no cambiaron significativamente a lo largo del proceso, a diferencia de lo que ocurre en células de animales jóvenes descrito previamente por nuestro laboratorio. Esto puede indicar que la lipina-1 pierde paulatinamente su expresión a lo largo del envejecimiento, puesto que este efecto se ha descrito en cerebelo con anterioridad³⁷.

La ausencia de lipina-1 o lipina-2 no compromete la diferenciación de las células hematopoyéticas a macrófago. Sin embargo, se observó que la ausencia de una lipina no es compensada por el otro miembro de la familia a lo largo del proceso de diferenciación. Además, se ha encontrado que tanto los efectos proinflamatorios de la lipina-1, como los anti-inflamatorios de la lipina-2, parecen desaparecer durante el envejecimiento. Esto queda reflejado por los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias en un modelo de shock

endotóxico, y en las respuestas *in vitro* ante un estímulo desencadenante de la respuesta inmune. Este hallazgo es significativo en el ámbito de las enfermedades inflamatorias relacionadas con mutaciones en los genes que codifican para lipinas, como el síndrome de Majeed, que se origina por una mutación en la lipina-2. Los resultados indicarían que el envejecimiento podría actuar como una protección en estas enfermedades, disminuyendo la respuesta inflamatoria y pudiendo disminuir los síntomas en los pacientes afectados.

Los resultados obtenidos tras someter a los ratones a un shock endotóxico con LPS no proporcionan información relevante sobre si la producción de citoquinas proinflamatorias está alterada en el envejecimiento ya que una serie de complicaciones asociadas a la cría de la colonia de animales nos ha impedido realizar en paralelo análisis en ratones jóvenes. Sin embargo, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado un aumento en la producción de citoquinas, especialmente IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en animales jóvenes en ausencia de lipina-2. La desaparición de diferencias entre animales que expresan o no lipina-2 en animales envejecidos del presente estudio podría deberse a que las mediciones de citoquinas como IL-1 β y TNF- α se realizaron seis horas después del shock, momento en el cual los niveles de estas citoquinas podrían haber comenzado a disminuir. Esta limitación temporal sugiere que futuras investigaciones deberían considerar un marco temporal más amplio y variado para medir la respuesta inflamatoria.

En este trabajo también se ha demostrado que la ausencia de lipina-1 provoca alteraciones en la homeostasis de la glucosa, observando que en ratones envejecidos se mantiene lo descrito para ratones jóvenes⁴⁰. Sin embargo, estos ratones engordan mucho menos que los ratones *wt* y sus macrófagos diferenciados *in vitro* presentan una respuesta inflamatoria similar que la de los ratones *wt*. Por tanto, a la vista de estos resultados, y puesto que normalmente la alteración en el metabolismo de la glucosa va asociada a incrementos de peso y de inflamación, cabría esperar que los animales deficientes en lipina-1 envejecidos tuvieran la misma o menor alteración del metabolismo de la glucosa que los animales *wt*. Puesto que dicho metabolismo está influenciado por una combinación de factores que incluyen la secreción de insulina estimulada por la glucosa, la sensibilidad tisular a la insulina y la producción hepática de glucosa, posibles explicaciones para este fenotipo sería que el hígado de estos animales produzca más glucosa, algo que habría que investigar en el futuro, o que la no presencia de tejido adiposo, descrita en estos animales, contribuya de forma notable a la utilización de glucosa⁴⁰.

Sin embargo, la ausencia de lipina-2 produjo un ligero incremento de la sensibilidad a glucosa en animales jóvenes, sin cambios apreciables en cuanto a sensibilidad a insulina con respecto a los animales *wt*. Durante el envejecimiento, estos animales presentan las mismas respuestas a glucosa, un ligero aumento de sensibilidad a insulina y un menor aumento de peso que los animales *wt*. Aunque en esta parte del trabajo no se han medido las respuestas inflamatorias de los macrófagos *in vitro*, los resultados *in vivo* indican que frente a un tratamiento agudo con LPS estos animales tienen las mismas respuestas inflamatorias que los animales *wt*. En base a estos resultados, la mayor sensibilidad a la insulina presente en los animales envejecidos carentes de lipina-2 no parece estar relacionada con la capacidad inflamatoria de estos animales. Por tanto, la lipina-2 podría ejercer su función de alguna manera distinta. De todas formas, los ratones carentes de lipina-2 envejecidos presentan menos peso que los ratones *wt* envejecidos, y esto sí podría estar ayudando a un mejor control metabólico en ausencia de lipina-2. Por todo ello, la falta de lipina-1 o de lipina-2 parece tener efectos metabólicos opuestos, a pesar de que las dos provocan una disminución de peso en los animales.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la compensación entre lipinas se ve afectada por el envejecimiento, lo que podría tener implicaciones significativas para la comprensión de enfermedades inflamatorias y metabólicas relacionadas con las lipinas. La investigación futura debería enfocarse en la funcionalidad de los macrófagos y el impacto específico de las lipinas en diferentes contextos celulares y tisulares para obtener una visión más completa de su papel en el envejecimiento y la inflamación.

5. CONCLUSIONES

- I. Durante el envejecimiento, no se observa una compensación en la expresión de las lipinas en ausencia de alguna de ellas en tejidos como el hígado o el bazo.
- II. La expresión de lipina-2 incrementa progresivamente durante la diferenciación de los macrófagos, pero no puede compensar la ausencia de lipina-1 tras un shock endotóxico. Asimismo, la lipina-1 no puede compensar la ausencia de lipina-2 a lo largo del proceso de diferenciación.
- III. La lipina-1 juega un papel crucial en el metabolismo de la glucosa, mientras que la lipina-2 no tiene el mismo impacto.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet*. 2001;357(9270):1777-1789. doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
2. Lebrero Fernández P. *Phospholipid arachidonic acid remodeling in macrophages: role of plasmalogen species*. Universidad de Valladolid; 2019. doi:10.35376/10324/40219
3. Tran N, Mills EL. Redox regulation of macrophages. *Redox Biol*. 2024;72:103123. doi:10.1016/j.redox.2024.103123
4. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-435. doi:10.1038/nature07201
5. Balboa MA, de Pablo N, Meana C, Balsinde J. The role of lipins in innate immunity and inflammation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(10):1328-1337. doi:10.1016/j.bbalip.2019.06.003
6. Haydar D, Gonzalez R, Garvy BA, et al. Myeloid arginase-1 controls excessive inflammation and modulates T cell responses in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Immunobiology*. 2021;226(1):152034. doi:10.1016/j.imbio.2020.152034
7. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-916. doi:10.1038/ni1001-907
8. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-737. doi:10.1038/nri3073
9. Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin Homolog Is a Mg²⁺-dependent Phosphatidate Phosphatase Enzyme. *J Biol Chem*. 2006;281(14):9210-9218. doi:10.1074/jbc.M600425200
10. Ghosh S, Strum JC, Sciorra VA, Daniel L, Bell RM. Raf-1 Kinase Possesses Distinct Binding Domains for Phosphatidylserine and Phosphatidic Acid: PHOSPHATIDIC ACID REGULATES THE TRANSLOCATION OF Raf-1 IN 12-O-TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETATE-STIMULATED MADIN-DARBY CANINE KIDNEY CELLS (*). *J Biol Chem*. 1996;271(14):8472-8480. doi:10.1074/jbc.271.14.8472
11. Lutkewitte AJ, Finck BN. Regulation of Signaling and Metabolism by Lipin-mediated Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity. *Biomolecules*. 2020;10(10):1386. doi:10.3390/biom10101386
12. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):553-565. doi:10.1038/nri.2016.70
13. Chen Y, Rui BB, Tang LY, Hu CM. Lipin Family Proteins - Key Regulators in Lipid Metabolism. *Ann Nutr Metab*. 2014;66(1):10-18. doi:10.1159/000368661
14. Péterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet*. 2001;27(1):121-124. doi:10.1038/83685
15. Al-Mosawi ZS, Al-Saad KK, Ijadi-Maghsoodi R, El-Shanti HI, Ferguson PJ. A splice site mutation confirms the role of LPIN2 in Majeed syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007;56(3):960-964. doi:10.1002/art.22431
16. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metab*. 2006;4(3):199-210. doi:10.1016/j.cmet.2006.08.005
17. Kim HB, Kumar A, Wang L, et al. Lipin 1 Represses NFATc4 Transcriptional Activity in Adipocytes To Inhibit Secretion of Inflammatory Factors. *Mol Cell Biol*. 2010;30(12):3126-3139. doi:10.1128/MCB.01671-09
18. Meana C, Peña L, Lordén G, et al. Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014;193(9):4614-4622. doi:10.4049/jimmunol.1400238
19. Navratil AR, Vozenilek AE, Cardelli JA, et al. Lipin-1 contributes to modified low-density lipoprotein-elicited macrophage pro-inflammatory responses. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):424-432. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.012
20. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN. NALP3 Forms an IL-1 β -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder.
21. de Pablo N, Meana C, Martínez-García J, et al. Lipin-2 regulates the antiviral and anti-inflammatory responses to interferon. *EMBO Rep*. 2023;24(12):e57238. doi:10.15252/embr.202357238
22. Shen J, Liu Y, Ren X, et al. Changes in DNA Methylation and Chromatin Structure of Pro-inflammatory Cytokines Stimulated by LPS in Broiler Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Poult Sci*. 2016;95(7):1636-1645. doi:10.3382/ps/pew086
23. Cochet F, Peri F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):2318. doi:10.3390/ijms18112318
24. Chan ED, Riches DWH. IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38 mapk in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2001;280(3):C441-C450. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.3.C441
25. Park MY, Ha SE, Kim HH, et al. Scutellarein Inhibits LPS-Induced Inflammation through NF- κ B/MAPKs Signaling Pathway in RAW264.7 Cells. *Molecules*. 2022;27(12):3782. doi:10.3390/molecules27123782
26. Meana C, García-Rostán G, Peña L, et al. The phosphatidic acid phosphatase lipin-1 facilitates inflammation-driven colon carcinogenesis. *JCI Insight*. 3(18):e97506. doi:10.1172/jci.insight.97506
27. Valdearcos M, Esquinas E, Meana C, et al. Lipin-2 Reduces Proinflammatory Signaling Induced by Saturated Fatty Acids in Macrophages *. *J Biol Chem*. 2012;287(14):10894-10904. doi:10.1074/jbc.M112.342915
28. Lordén G, Sanjuán-García I, de Pablo N, et al. Lipin-2 regulates NLRP3 inflammasome by affecting P2X7 receptor activation. *J Exp Med*. 2017;214(2):511-528. doi:10.1084/jem.20161452

29. Ferguson PJ, El-Shanti H. Majeed Syndrome: A Review of the Clinical, Genetic and Immunologic Features. *Biomolecules*. 2021;11(3):367. doi:10.3390/biom11030367
30. Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*. 2019;571(7764):183-192. doi:10.1038/s41586-019-1365-2
31. Li X, Li C, Zhang W, Wang Y, Qian P, Huang H. Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8:239. doi:10.1038/s41392-023-01502-8
32. Pawelec G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? *Exp Gerontol*. 2018;105:4-9. doi:10.1016/j.exger.2017.10.024
33. Rundberg Nilsson A, Soneji S, Adolfsson S, Bryder D, Pronk CJ. Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. *PLoS ONE*. 2016;11(7):e0158369. doi:10.1371/journal.pone.0158369
34. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9194-9199. doi:10.1073/pnas.0503280102
35. Stranks AJ, Hansen AL, Panse I, et al. Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun*. 2015;7(4):375-391. doi:10.1159/000370112
36. Lee CT, Ng HY, Zhong HR, Wang Y, Liu CH, Lee YT. Ageing-Related Alterations in Renal Epithelial Glucose Transport. *Int J Mol Sci*. 2023;24(22):16455. doi:10.3390/ijms242216455
37. Dwyer JR, Donkor J, Zhang P, et al. Mouse lipin-1 and lipin-2 cooperate to maintain glycerolipid homeostasis in liver and aging cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):E2486-E2495. doi:10.1073/pnas.1205221109
38. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
39. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
40. Reue K, Xu P, Wang XP, Slavin BG. Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J Lipid Res*. 2000;41(7):1067-1076. doi:10.1016/S0022-2275(20)32011-3
41. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):1006-1014. doi:10.1161/01.ATV.0000128849.12617.f4
42. Gerlach BD, Ampomah PB, Yurdagul A, et al. Efferocytosis Induces Macrophage Proliferation to Help Resolve Tissue Injury. *Cell Metab*. 2021;33(12):2445-2463.e8. doi:10.1016/j.cmet.2021.10.015
43. Kökény G, Calvier L, Hansmann G. PPAR γ and TGF β —Major Regulators of Metabolism, Inflammation, and Fibrosis in the Lungs and Kidneys. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):10431. doi:10.3390/ijms221910431
44. Röszer T, Menéndez-Gutiérrez MP, Lefterova MI, et al. Autoimmune Kidney Disease and Impaired Engulfment of Apoptotic Cells in Mice with Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ or Retinoid X Receptor α Deficiency. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;186(1):621-631. doi:10.4049/jimmunol.1002230
45. Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, Cheng Y, Ibrahim J, Tuma PL. Akt1 and Akt2 Isoforms Play Distinct Roles in Regulating the Development of Inflammation and Fibrosis Associated with Alcoholic Liver Disease. *Cells*. 2019;8(11):1337. doi:10.3390/cells8111337
46. Fang WY, Tseng YT, Lee TY, et al. Triptolide prevents LPS-induced skeletal muscle atrophy via inhibiting NF- κ B/TNF- α and regulating protein synthesis/degradation pathway. *Br J Pharmacol*. 2021;178(15):2998-3016. doi:10.1111/bph.15472
47. Lordén G. Regulación de la activación del inflammasoma NLRP3 por lipina-2 en macrófagos. Published online 2016. Accessed July 2, 2024. <https://digital.csic.es/handle/10261/158358>