



Universidad de Valladolid

Máster en Investigación Biomédica y
Terapias Avanzadas

Implicación de la lipina-2 en el desarrollo de
estrés del retículo en células del sistema
inmune durante la exposición a altas
concentraciones de nutrientes

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

2025

Autor: Milagros González Flores

Directoras: Clara Meana González y María Ángeles Balboa García

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistema inmunitario: macrófagos	1
1.2. Metabolismo lipídico y sobrecarga de nutrientes.....	1
1.3 Lipinas.....	2
1.4 Retículo endoplasmático y respuesta a estrés celular	4
2. HIPÓTESIS.....	5
3.OBJETIVOS.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1 Líneas celulares y cultivo.	6
4.2. Obtención de sobrenadantes celulares.....	6
4.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	7
4.4 Estimulación con ácidos grasos.	7
4.4.1 Preparación de ácido palmítico (16:0) y ácido oleico (18:1 n-9).....	7
4.5 Extracción de ARN	8
4.5 Síntesis de cDNA mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR).....	8
4.6 Análisis de expresión génica por RT-qPCR.....	9
4.7 Microscopía confocal	9
4.8 Citometría de flujo.....	10
4.8.2 Cuantificación de gotas lipídicas	10
4.9 Análisis de secuenciación de ARN (ARN-seq)	10
4.10 Análisis estadístico	11
5.RESULTADOS	11
5.1 Descripción genotípica y funcional de las líneas celulares	11
5.2 Evaluación de la formación de gotas lipídicas en presencia de ácido palmítico	12
5.2.1 Análisis de la expresión génica de lipina-2 en presencia de ácido palmítico	13
5.3 Implicación de la lipina-2 en la formación de gotas lipídicas dependientes de palmítico.....	13
5.3.1 Estudio de formación de gotas lipídicas mediante microscopía confocal	14
5.3.2 Cuantificación de gotas lipídicas mediante citometría	15
5.4 Estudio de la implicación de lipina-2 en el estrés del retículo asociado a exceso de nutrientes	16
6. DISCUSIÓN.....	20
7. CONCLUSIONES.....	25
8. BIBLIOGRAFÍA.....	26

ABREVIATURAS

- **AG:** Ácidos Grasos
- **ATF** (*Activating Transcription Factor*): Factor de Transcripción Activador
- **ATP:** Ácido trifosfatídico
- **BiP** (*Binding Immunoglobulin Protein*): Proteína de Unión a inmunoglobulina
- **BSA** (*Bovine Serum Albumin*): albúmina de suero bovino
- **CHOP** (*C/EBP Homologous Protein*): proteína homóloga a C/EBP
- **DAG:** Diacilglicerol
- **DAMP** (*Damage Associated Molecular Pattern*): Patrones Moleculares asociados a Daños
- **eIF2 α** (*Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha*): Factor de iniciación de la traducción Eucariótica 2 alpha
- **ERAD** (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*): Degradación Asociada al Retículo Endoplasmático
- **HRP** (*Horseradish peroxidase*): peroxidasa de rábano
- **iBMMs** (*Immortalized Bone Marrow Macrophages*): macrófagos inmortalizados de médula ósea
- **IL:** Interleucina
- **IRE1** (*Inositol-Requiring Enzyme 1*): Enzima 1 requerida por inositol
- **JNK** (*c-Jun N-terminal kinase*): quinasa N-terminal de c-Jun
- **LPS:** lipopolisacárido
- **LD** (*Lipid Droplet*): Gotas lipídicas
- **MAPK** (*Mitogen-Activated Protein kinase*): quinasa activada por mitógenos
- **NFATc4** (*Nuclear Factor of Activated T-Cells c4*): Factor Nuclear de células T activadas c4
- **NF- κ B** (*Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*): Factor Nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas
- **NLRP3** (*NOD-Like Receptor Family Pyring Domain Containing 3*): Receptor Tipo NOD con dominio de Pirina contenido 3
- **PA:** Ácido fosfatídico
- **PAMP** (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*): Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
- **PAP** (*Phosphatidate Phosphatase*): Fosfatidato fosfatasa
- **PBS** (*Phosphate-buffered saline*): Tampón Fosfato Salino
- **PC:** Fosfatidilcolina
- **PE:** Fosfatidiletanolamina
- **PERK** (*Protein Kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*): Quinasa del RE similar a la proteína quinasa R (PKR)
- **PFA:** paraformaldehído
- **PGC** (*PPAR Gamma Coactivator*): coactivador gamma de PPAR
- **PKC** (*Protein Kinase C*): Proteína quinasa C
- **PPAR α** (*Peroxisome proliferator-Activated Receptor alpha*): Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
- **RE:** Retículo Endoplasmático
- **S1P** (*Site-1 Protease*): proteasa del sitio 1
- **S2P** (*Site-2 Protease*): proteasa del sitio 2
- **STAT** (*Signal Transducer and activator of transcription*): Transductor de Señales y Activador de la transcripción
- **TAG:** triacilglicéridos
- **LDL** lipoproteína de baja densidad
- **TNF** (*Tumor Necrosis Factor*): Factor de necrosis tumoral
- **UPR** (*Unfolded Protein Response*): respuesta a proteínas desplegadas
- **XBP1** (*X-box Binding Protein 1*): Proteína 1 de Unión a la Caja X

RESUMEN

El estilo de vida occidental, marcado por una dieta hipercalórica y el sedentarismo, ha incrementado la incidencia de enfermedades metabólicas en las últimas décadas. En macrófagos, células del sistema inmune altamente ubicuas, el exceso de lípidos puede gestionarse mediante diferentes mecanismos como su almacenamiento en gotas lipídicas. Sin embargo, cuando se supera la capacidad de manejo lipídico, como ocurre en situaciones de lipotoxicidad, se activa la respuesta de estrés del retículo endoplasmático (RE), lo que puede inducir inflamación y disfunción celular si no se resuelve. La participación de enzimas del metabolismo lipídico en esta respuesta, particularmente en condiciones de sobrecarga nutricional, sigue siendo poco comprendida. Derivado de su papel dual como fosfatidato fosfatasa dependientes de Mg^{2+} para la síntesis de lípidos, y su función como corregulador transcripcional para modular respuestas inmunes, la enzima lipina-2 podría desempeñar un papel clave en este proceso. Por ello, el estudio se ha centrado en determinar el papel que juega la lipina-2 en el desarrollo de estrés del RE ante una sobrecarga de ácido palmítico. Los resultados sugieren que lipina-2 contribuye a la formación de gotas lipídicas en el manejo de exceso de lípidos, aunque no se ha identificado su participación regulando el estrés del RE ni la inflamación asociada a este. Aunque la ausencia de lipina-2 no activó directamente vías de estrés del RE, la compensación por lipina-1 y otros mecanismos alternativos podrían estar involucrados. Estos hallazgos abren la posibilidad de investigar nuevos mecanismos implicados en la regulación lipídica en ausencia de lipina-2.

Palabras clave: lipina-2, macrófagos, retículo endoplasmático, lipotoxicidad, exceso nutricional

ABSTRACT

The Western lifestyle, characterized by a hypercaloric diet and physical inactivity, has increased the incidence of metabolic diseases in recent decades. In macrophages, highly ubiquitous cells of the immune system, excess of lipids can be handled through different mechanism, such as their storage in lipid droplets. However, when lipid-management capacity is exceeded, as occurs under lipotoxic conditions, the endoplasmic reticulum (ER) stress response is activated, which can lead to inflammation and cellular dysfunction if not resolved. The involvement of lipid metabolism enzymes in this response, particularly under nutritional overload, is still poorly understood. Due to its dual role as a Mg^{2+} -dependent phosphatide phosphatase involved in lipid synthesis, and as a transcriptional co-regulator modulating immune responses, the enzyme lipin-2 could play a key role in this process. Therefore, the study focused on determining the role of lipin-2 in ER stress development in response to palmitic acid overload. The results suggest that lipin-2 contributes to lipid droplet formation in the management of excess lipids, although its involvement in regulation ER stress or the associated inflammation was not identified. While the absence of lipin-2 did not directly activate ER stress pathways, compensation by lipin-1 or other alternative mechanism might be involved. These findings pave the way for exploring additional mechanism governing lipid homeostasis in the absence of lipin-2.

Key words: lipin-2, macrophages, endoplasmic reticulum, lipotoxicity, nutritional excess

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema inmunitario: macrófagos

El sistema inmunitario es una red compleja e interactiva de órganos linfoides, células especializadas, factores humorales y citocinas que cumplen funciones esenciales en la defensa del organismo frente a infecciones o daños. Así mismo, se encarga del mantenimiento y la restauración de la homeostasis tisular en situaciones estériles e infecciosas (Parkin & Cohen, 2001; Sattler, 2017). Para ello, este sistema se organiza en dos grandes líneas de defensa: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata, representa la primera línea de defensa y se desencadena de manera inmediata ante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o daños (DAMP) (Guo et al., 2015; Marshall et al., 2024). Por su parte, la inmunidad adaptativa es específica y dependiente del antígeno, aunque más lenta, y puede generar memoria inmunológica para responder de manera más eficiente tras la exposición posterior al antígeno (Marshall et al., 2024).

Dentro del sistema inmunitario innato, los macrófagos destacan como una población heterogénea de células presentes en la mayoría de los tejidos que cumplen un papel importante como defensa frente a patógenos, regulando respuestas celulares críticas para el crecimiento, remodelación y homeostasis tisular (Lazarov et al., 2023; McComb et al., 2019). Su característica principal es la plasticidad, es decir, la capacidad de poder adaptarse a señales ambientales cambiando su perfil mediante un proceso denominado polarización. En este sentido, se han propuesto dos subconjuntos distintos de macrófagos, los de activación clásica (M1) y los de activación alternativa (M2) (Batista-Gonzalez et al., 2020).

Los macrófagos M1, de fenotipo proinflamatorio, son activados por señales como el interferón γ (IFN- γ), lipopolisacárido o interleucina (IL)-1 y están implicados en la destrucción de patógenos. Para ello, producen óxido nítrico (NO) y secretan citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-22 o IL-23 (Batista-Gonzalez et al., 2020). Esta respuesta inflamatoria, conservada evolutivamente, constituye un mecanismo inmunitario esencial para limitar la supervivencia y proliferación de patógenos (Guo et al., 2015; Wärnberg et al., 2009). Por el contrario, los macrófagos M2, de fenotipo antiinflamatorio, se activan por hongos, parásitos, células apoptóticas, IL-4, IL-13, IL-10 o el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) para ejercer una respuesta antinflamatoria y reparar tejidos dañados (Rószler, 2015; Yunna et al., 2020).

1.2. Metabolismo lipídico y sobrecarga de nutrientes

El metabolismo lipídico es un proceso fisiológico esencial y complejo que desempeña un papel importante en el ajuste de nutrientes, la regulación hormonal y la homeostasis energética (Y. Li et al., 2017). Se estima que aproximadamente el 5% de los genes están involucrados en la síntesis de lípidos, los cuales participan en procesos como la regulación de la estructura y función celular, vías de señalización y expresión génica, lo que refleja su importancia en las células (Zhang & Reue, 2017; Y. Zhu et al., 2024). Especialmente, los lípidos desempeñan un papel central en las funciones de los macrófagos y sus estados de activación, siendo esenciales para el desarrollo de una respuesta inflamatoria efectiva, su diferenciación y expresión génica (Vogel et al., 2022).

Aunque los ácidos grasos (AG) libres son esenciales para diversas funciones fisiológicas, su exceso puede ser perjudicial al acumularse en tejidos no adiposos y desencadenar procesos de lipotoxicidad (Engin, 2017). En condiciones fisiológicas, los AG derivados de la dieta se almacenan en el tejido adiposo o se β -oxidan para satisfacer las demandas energéticas. Sin embargo, si el suministro de lípidos supera la capacidad de almacenamiento, ya sea por una ingesta calórica elevada o por un metabolismo

lipídico defectuoso, acaban acumulándose en tejidos y células, incluyendo los macrófagos, que no están capacitados para su almacenamiento o su procesamiento (Ghemrawi et al., 2018; Vogel et al., 2022).

En estas condiciones, los AG saturados de cadena larga, como el ácido palmítico (16:0), AG más consumido, y el ácido esteárico (18:0) tienden a ser convertidos en lípidos complejos como ceramidas y ésteres de colesterol, derivando en efectos adversos de lipotoxicidad como son el estrés del retículo endoplasmático (RE), inflamación o resistencia a la insulina (Celik et al., 2023; Engin, 2017; Ghemrawi et al., 2018). Para contrarrestar esta sobrecarga lipídica, las células ponen en marcha mecanismos de manejo de lípidos, como la canalización de AG hacia la formación de gotas lipídicas (*LD*, *Lipid Droplet*), su incorporación a lípidos estructurales de membrana o su β -oxidación en las mitocondrias. En particular, la formación de gotas lipídicas constituye una estrategia clave para preservar la homeostasis celular, al facilitar el almacenamiento de lípidos y permitir su movilización según las necesidades energéticas, estructurales o de señalización. Además, estas estructuras juegan un papel protector crucial frente al estrés proteotóxico y lipotóxico, permitiendo el secuestro de lípidos o proteínas en exceso. Sin embargo, ante exposiciones prologadas a sobrecargas lipídicas, estos mecanismos pueden volverse insuficientes y comprometer la viabilidad celular (Liao & Pon, 2022; Prieur et al., 2010; Yoon et al., 2021).

Actualmente, los estilos de vida poco saludables, caracterizados por la sobrenutrición y sedentarismo, se han vuelto cada vez más comunes en la sociedad moderna, contribuyendo significativamente al aumento global de las patologías como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 o la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Lemmer et al., 2021). Curiosamente, a pesar de que cada una de estas enfermedades presenta síntomas fisiológicos y clínicos diferentes, comparten características fisiológicas como el estrés intracelular y la inflamación (Ghemrawi et al., 2018). Además, en muchas de estas enfermedades, los macrófagos sufren alteraciones en su metabolismo lipídico, lo que hace que estos se encuentren cargados de lípidos, funcionen de manera aberrante y contribuyan así al desarrollo de la patología (Deng et al., 2023; Vogel et al., 2022). Muchas de estas enfermedades representan actualmente un gran desafío para la salud pública. Por ello, identificar los genes clave que regulan el metabolismo lipídico y cómo su alteración contribuye al fenotipo y función de los macrófagos, sería crucial (Vogel et al., 2022; Yu & Muehleman, 2023; Y. Zhu et al., 2024).

1.3 Lipinas

Dentro del sistema de regulación del metabolismo lipídico, destaca la familia de las lipinas, formada por 3 miembros: lipina-1, lipina-2 y lipina-3. Estas enzimas, actúan como fosfatidato fosfatasas (PAP) dependientes de Mg^{2+} , catalizando la desfosforilación del ácido fosfatídico (PA) en diacilglicerol (DAG), un paso clave para la síntesis de triglicéridos (TAG) en la vía del glicerol-3 fosfato. Además, las lipinas pueden funcionar también como coactivadoras transcripcionales regulando la expresión de genes del metabolismo lipídico o la inmunidad innata (Chen et al., 2015; Reue, 2009; Watahiki et al., 2020).

A nivel estructural, todas las lipinas comparten dos dominios altamente conservados: el dominio N-terminal (N-LIP) y el dominio C-terminal (C-LIP), que a su vez contiene los motivos funcionales: DxDxT y LXXIL. El motivo DxDxT es esencial para la actividad PAP, permitiendo la generación de DAG que a su vez actúa como precursor en la síntesis de fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC), principales componentes de la membrana plasmática, y de TAG, que pueden almacenarse posteriormente en gotas lipídicas (Csaki & Reue, 2010; Siniosoglou, 2013). Por otro lado, el motivo LXXIL es necesario para la función como coactivador transcripcional de las lipinas, permitiendo su interacción con receptores nucleares y factores de transcripción unidos al ADN para su regulación (Csaki & Reue, 2010; Zhang & Reue, 2017) (Figura 1).

Además, a diferencia de otras enzimas de la vía del glicerol fosfato, las lipinas son proteínas citoplasmáticas que pueden asociarse transitoriamente con el retículo endoplasmático (RE) en respuesta a estímulos como ácidos grasos, o desplazarse al núcleo para ejercer su función (Csaki et al., 2013; Zhang & Reue, 2017). También pueden localizarse en gotas lipídicas, endolisosomas y mitocondrias, aunque su función celular no se conoce completamente (Zhang & Reue, 2017).

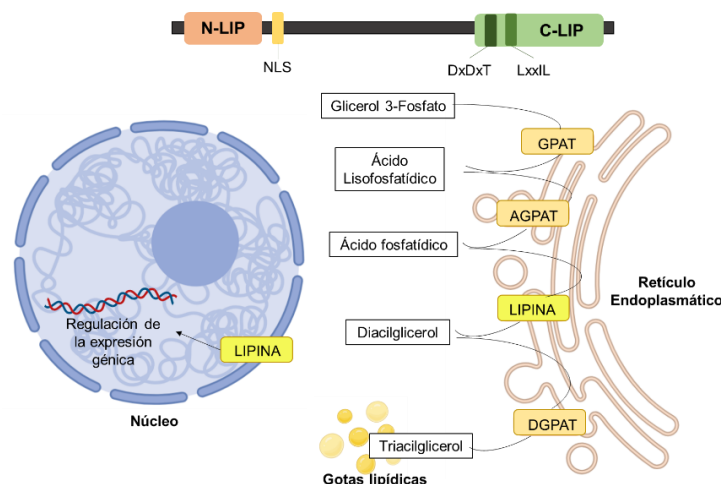


Figura 1. Funciones de las lipinas y estructura proteica. Las lipinas son fosfatidato fosfatasas dependientes de Mg^{2+} formadas por los dominios N-terminal (N-LIP) y C-terminal (C-LIP). Este último, a su vez, se encuentra formado por los motivos DxDxT, que proporciona la actividad PAP para desfosforilar el ácido fosfatídico en diacilglicerol, penúltimo paso de la vía del glicerol 3-fosfato; y LxxIL que les confiere actividad como coactivador transcripcional regulando la expresión de diversos genes. Imagen propia generada con Biorender adaptada de (Brohée et al., 2021; Zhang & Reue, 2017)

Así mismo, pese a sus funciones compartidas, las lipinas exhiben patrones de expresión tisular distintos, lo que sugiere que realizan funciones únicas (Chen et al., 2015).

1.3.1 Lipina-1

El gen *Lpin1*, se expresa en gran medida en el tejido adiposo, el músculo esquelético y los testículos, aunque se observa en bajos niveles en otros tejidos como el hígado, el riñón, el cerebro, el corazón y los pulmones (Chen et al., 2015). Entre sus funciones, la lipina-1 regula la oxidación de ácidos grasos mediante su interacción con $PPAR\alpha$ y el coactivador $PGC-1\alpha$ en hepatocitos, aunque también puede activar o reprimir la expresión del factor nuclear de células T activadas c4 (NFATc4) para modular la expresión de genes inflamatorios en adipocitos (Reue & Wang, 2019; Zhang & Reue, 2017).

Además de ello, se ha demostrado que esta proteína ejerce un papel proinflamatorio en los macrófagos, posiblemente al regular la producción de DAG, quien a su vez promueve la activación de la proteína quinasa C (PKC) y al factor de transcripción AP-1, que induce las actividades proinflamatorias (Meana et al., 2014; Vozenilek et al., 2018).

1.3.2 Lipina-2

Lpin2, es la isoforma más abundante en el hígado y también se expresa significativamente en el intestino delgado, regiones cerebrales específicas y macrófagos (Chen et al., 2015; Reue & Wang, 2019). Además de su función PAP, esta isoforma desempeña un papel clave como regulador antiinflamatorio crítico, ya que modula la cascada de señalización de la familia de proteínas MAPK y la formación del inflammasoma NLRP3. En consecuencia, la deficiencia de lipina-2 en macrófagos está asociada a una sobreproducción de $IL-1\beta$, y en humanos da lugar al síndrome de Majeed, un trastorno

hereditario raro que cursa con inflamación espontánea en los huesos y la piel (Lordén et al., 2017; Watahiki et al., 2020).

1.3.3 Lipina-3

Por su parte, *Lpin3* se encuentra en niveles bajos en varios tejidos, principalmente en el intestino delgado y el hígado, y es la menos estudiada, posiblemente porque su deficiencia es compensada por otros miembros de la familia (Reue & Zhang, 2008).

1.4 Retículo endoplasmático y respuesta a estrés celular

El retículo endoplasmático es un orgánulo multifuncional esencial para el metabolismo celular, que participa en la producción de lípidos (colesterol, glicerolípidos y ceramidas), en la síntesis y plegamiento de proteínas y en la regulación de la dinámica del calcio. Esto le convierte en una estructura central para la detección de nutrientes, la adaptación metabólica y la resistencia al estrés (Ghemrawi et al., 2018; Lemmer et al., 2021).

La acumulación excesiva de lípidos, también deriva en un RE sobrecargado, produciendo un acúmulo de proteínas mal plegadas y estrés del orgánulo (Engin, 2017). Esta situación promueve la activación de un mecanismo de protección denominado respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded protein response*) que busca restaurar la homeostasis celular reduciendo la síntesis proteica, aumentando la expresión de chaperonas o expandiendo la membrana del RE activando a la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico (Oakes & Papa, 2015; So, 2018). También facilita la eliminación de proteínas mal plegadas mediante la vía ERAD (ERAD, *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*) por el cual, las proteínas son degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma en el citosol (Celik et al., 2023).

El sistema UPR está formado por 3 sensores de estrés críticos para el control de calidad: PERK (PERK, *Protein Kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 (IRE1, *Inositol-1 Requiring Enzyme 1*) y ATF6 (ATF6, *Activating Transcription Factor 6*) (Oakes & Papa, 2015). En condiciones basales, estos sensores permanecen inactivos mediante su unión a la chaperona BiP (BiP, *Binding immunoglobulin protein*), un componente de la vía ERAD. Sin embargo, cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del RE, BiP se disocia de los sensores, permitiendo su activación. En el caso de PERK e IRE1, estos dimerizan y se autofosforilan, mientras que ATF6 es transportado al Aparato de Golgi, donde es proteolizado (Di Conza & Ho, 2020; Ghemrawi et al., 2018).

La activación de PERK produce la fosforilación del eIF2 α (*Eukaryotic Initiation Factor 2 α*), lo que bloquea la traducción y con ello la síntesis proteica. Así mismo, esta vía promueve la traducción de ATF4 (ATF4, *Activating transcription factor 4*), un factor de transcripción que induce la expresión de CHOP (CHOP, *C/EBP Homologous Protein*), que inicia la apoptosis cuando el estrés del RE no se ha resuelto (Celik et al., 2023; So, 2018). Con respecto a IRE1, mediante su actividad endorribonucleasa corta y empalma el ARNm de XBP1 (XBP1, *X-box binding protein 1*), dando lugar a una forma funcional que regula la expresión de chaperonas así como de otros genes implicados en el aumento de tamaño y función del RE (Lemmer et al., 2021; Mustapha et al., 2021; Oakes & Papa, 2015). En el caso de ATF6, este se transloca al Aparato de Golgi, donde es escindido por las proteasas S1P (S1P, *Site-1 Protease*) y S2P (Site-2 Protease) para la liberación de la forma activa de ATF6 (ATF6 citoplasmático N-terminal, ATF6-N), un factor de transcripción que promueve la expresión de chaperonas del RE, componentes de la vía ERAD y XBP1 (Oakes & Papa, 2015; So, 2018) (Figura 2).

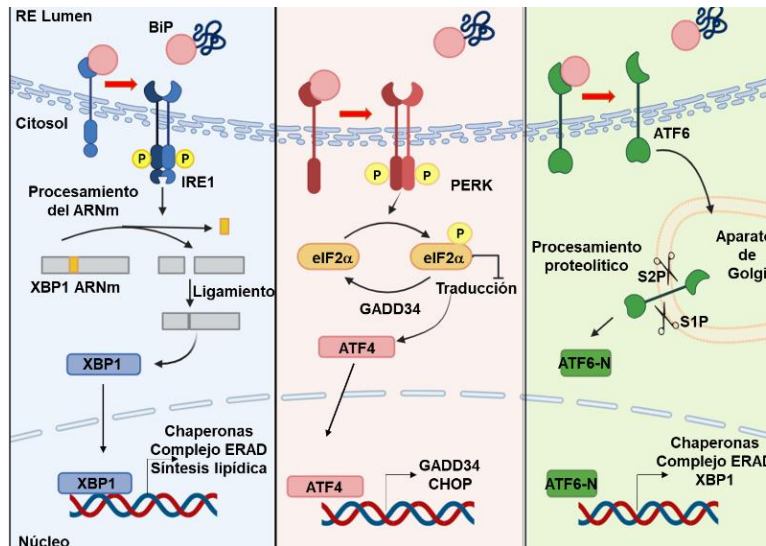


Figura 2. Vías de señalización del sistema UPR. Ante la acumulación excesiva de lípidos, el Retículo Endoplasmático pone en marcha el sistema UPR (UPR, Unfolded Proteine Response), constituido por los sensores: IRE1 (IRE1, Inositol-1 Requiring Enzyme 1), PERK (PERK, Protein Kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) y ATF6 (ATF6, Activating Transcription Factor 6). En condiciones basales, estas proteínas se mantienen inactivas mediante su unión a la chaperona BiP (BiP, Binding immunoglobulin protein). Sin embargo, ante la acumulación de proteínas mal plegadas, este se disocia de ellas favoreciendo su activando y con ello, de rutas que inhiben la síntesis proteica, su correcto plegamiento o eliminación. Imagen propia creada con Biorender modificada de (So, 2018)

En cambio, si bien la señalización del sistema UPR es crucial para manejar el estrés celular, su alteración puede promover una señalización proinflamatoria excesiva (Bettigole & Glimcher, 2015). Esto se debe a que la UPR no solo regula funciones metabólicas, sino que también interactúa con componentes clave en las vías de señalización del sistema inmune, como STAT, JNK y NF- κ B para resolver la infección frente a patógenos (Díaz-Bulnes et al., 2020; Yoon et al., 2021). Esto explica su relación con las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, y su asociación con diversos trastornos autoinmunes e inflamatorios (So, 2018).

Además, cabe destacar que la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IFN γ puede retroalimentar el estrés del RE en macrófagos. Sin embargo, aún no está claro si este fenómeno es una causa o una consecuencia del estrés del RE. Por este motivo, es fundamental comprender mejor la relación entre los procesos inmunitarios y el estrés del RE y cómo este puede alterar el umbral de señalización proinflamatoria en macrófagos (Bettigole & Glimcher, 2015).

2. HIPÓTESIS

Numerosos trastornos metabólicos representan actualmente un gran desafío para la salud pública debido a su rápido incremento en las últimas décadas (Chong et al., 2023). En muchas de estas enfermedades, la activación de las respuestas de estrés del retículo, desencadenadas por un exceso nutricional, actúa inicialmente como un mecanismo protector orientado a restaurar la homeostasis celular. No obstante, cuando el estrés se prolonga y no logra resolverse adecuadamente, puede provocar alteraciones celulares y comprometer la función de diversos órganos y tejidos, contribuyendo así a la progresión de la patología (Yuan et al., 2024). Una característica común en estas enfermedades es la presencia de un estado inflamatorio crónico (Ghemrawi et al., 2018), especialmente en células del sistema inmune como los macrófagos, lo que podría estar vinculado a la activación persistente de la respuesta al estrés del RE. Estudios previos realizados por este grupo, han descrito que alteraciones en la enzima lipina-2 tiene un efecto directo sobre la respuesta inflamatoria de los macrófagos (Lordén et al., 2017). Además, esta enzima parece también participar en la

formación de gotas lipídicas tras la exposición a ácidos grasos (Valdearcos et al., 2012). Por este motivo, se plantea como hipótesis de este trabajo que la ausencia de lipina-2 podría estar relacionada con la acumulación de lípidos intracelulares, la activación de la respuesta al estrés del retículo endoplasmático y el desarrollo de respuestas inflamatorias exacerbadas, particularmente en un contexto de sobrecarga de nutrientes como los lípidos.

3.OBJETIVOS

Teniendo en consideración estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo es evaluar la implicación de la enzima lipina-2 en el manejo intracelular de lípidos, el estrés del retículo y la inflamación en condiciones de sobrecarga lipídica. Para ello, los objetivos concretos que se proponen son:

1. Analizar la función de lipina-2 durante la formación de gotas lipídicas tras una sobreexposición a lípidos exógenos
2. Establecer la implicación de la enzima lipina-2 en el grado de estrés del retículo endoplasmático inducido por la exposición a altas concentraciones de lípidos exógenos.
3. Determinar la relación entre la formación de gotas lipídicas y la generación de estrés del retículo

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Líneas celulares y cultivo.

Para el presente trabajo, se utilizaron dos líneas celulares macrofágicas inmortalizadas, derivadas de médula ósea de ratón (iBMMs, *Immortalized Bone Marrow Macrophages*), de genotipo salvaje (WT, *Wild Type*) y deficientes para el gen *Lpin2* (*Lpin2*^{-/-}) procedentes de la cepa C57BL/6J (Toronto Centre for Phenogenomics).

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Corning) enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Fetal Bovine Serum, Gibco®, Thermo Fisher Scientific), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific), en adelante referido como «medio de cultivo». Las condiciones de cultivo incluyeron una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.

Para su mantenimiento, se realizaron pases celulares tras alcanzar una confluencia del 80%. Primero, las células se lavaron con PBS estéril y se incubaron con 0.05% de tripsina-EDTA (Corning) durante 3 minutos a 37°C. A continuación, se paró la reacción enzimática mediante la adición del doble de volumen de medio de cultivo y se centrifugaron a 240 x g durante 10 minutos. Finalmente, las células recolectadas se resuspendieron en medio de cultivo y sembraron en nuevos flask.

4.2. Obtención de sobrenadantes celulares

La detección de citoquinas en los sobrenadantes de las células WT y *Lpin2*^{-/-}, se realizó a partir de cultivos sembrados en placas de 12 pocillos a una confluencia de 500 000 células por pocillo. Antes de proceder a su estimulación, se retiró el medio de cultivo descrito previamente y se sustituyó por medio de cultivo sin suero durante 1 hora.

Transcurrido el periodo de incubación, las células fueron estimuladas con 200 ng/mL de lipopolisacárido (Sigma-Aldrich) durante 4 horas, con el objetivo de promover la transcripción de citoquinas proinflamatorias. A continuación, las células fueron estimuladas con 2 mM de ATP (Sigma-Aldrich) diluido en medio de cultivo sin suero durante 40 minutos para promover la secreción de citoquinas. Finalizada la estimulación, los sobrenadantes celulares se transfirieron a tubos limpios y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos a 4°C para la eliminación de los restos celulares. Finalmente, se almacenaron a -80°C hasta su análisis mediante el ensayo ELISA.

4.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Con el fin de evaluar el estado inflamatorio de las líneas celulares WT y *Lpin2*^{-/-}, se cuantificaron los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes celulares, mediante un ensayo ELISA. El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA, es una técnica de inmunoensayo sensible y específica que permite la detección y cuantificación de antígenos inmovilizados mediante el uso de anticuerpos marcados que pueden detectarse de forma directa o indirecta utilizando métodos colorimétricos, quimioluminiscentes y/o fluorescentes.

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) utilizando los sobrenadantes celulares obtenidos como se describe previamente. Primero, se recubrieron placas ELISA con el anticuerpo de captura específico para IL-1 β , previamente diluido en buffer de recubrimiento, a 4°C toda la noche. Tras la incubación, se aspiró el contenido de los pocillos y se lavaron 3 veces con una solución de 0.05% de Tween-20 diluida en PBS durante 1 minuto por lavado. Después, los pocillos se bloquearon con diluyente 1X para evitar uniones inespecíficas durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, la curva patrón se realizó preparando diluciones seriadas de IL-1 β desde el valor máximo indicado por el fabricante (1000 pg/mL) hasta el límite de sensibilidad (8 pg/mL). Seguidamente, se añadió 100 μ L de las muestras problema en sus correspondientes pocillos y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, los pocillos se lavaron 3-5 veces durante 1 minuto con la solución de lavado previamente descrita y se incubaron con un anticuerpo biotinilado durante 1 hora. Tras ello, se realizaron nuevamente entre 3-5 lavados, y se incubó con estreptavidina unida a HRP (HRP, *Horseradish peroxidase*) durante 30 minutos. Finalmente, los pocillos se lavaron 5-7 veces durante 1 minuto para eliminar el exceso de estreptavidina-HRP no unido.

Para la detección de los niveles de citoquinas en las muestras analizadas, se añadió 100 μ L del sustrato TMB a cada pocillo durante 15 minutos a temperatura ambiente y se paró la reacción mediante la adición de 100 μ L de ácido sulfúrico 2N. La reacción quimioluminiscente resultante de la interacción entre el sustrato y la HRP, se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm y restando la absorbancia inespecífica registrada a 570 nm, en el espectrofotómetro VersaMax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices).

4.4 Estimulación con ácidos grasos.

Con el objetivo de identificar la implicación de la lipina-2 en la acumulación de lípidos intracelulares, el desarrollo de estrés en el Retículo Endoplasmático (RE) y la respuesta inflamatoria, las líneas celulares previamente descritas fueron expuestas a una alta concentración de ácidos grasos, específicamente ácido palmítico (16:0) y ácido oleico (18:1 n-9), durante distintos tiempos. Antes de llevar a cabo el procedimiento, se retiró el medio de cultivo para ser reemplazado por medio sin suero durante una hora antes de la exposición, de manera que se lograra evitar la interferencia de otros ácidos grasos.

4.4.1 Preparación de ácido palmítico (16:0) y ácido oleico (18:1 n-9).

La exposición de las líneas celulares con ácido palmítico (Sigma-Aldrich) o ácido oleico (Sigma-Aldrich) se realizó a una concentración final de 100 μ M o 500 μ M. Primero, los ácidos grasos se disolvieron en 0.01 N NaOH previamente calentado, durante 20 minutos a 70°C agitando las soluciones cada 5 minutos. Tras completarse el tiempo de incubación, se comprobó la disolución del ácido graso y en caso de no ser completa, se adicionó 1N NaOH hasta obtenerla.

A continuación, las muestras se mezclaron con 20% (p/v) (3 mM) de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich), previamente precalentada a 37°C, a una proporción 3:1 (Ácidos grasos: BSA) para reducir su toxicidad en las células. Finalmente, las muestras preparadas se diluyeron en medio de cultivo sin suero, se filtraron mediante un maya de 0.22 µM (Merck Millipore) y fue añadida a las placas de cultivo según la condición.

4.5 Extracción de ARN

La extracción de ARN total a partir de cultivos WT y *Lpin2*^{-/-} sembrados en placas de 12 pocillos a una confluencia de 500 000 células, estimuladas o sin estimular con ácido palmítico u oleico, se realizó utilizando el reactivo PRImeZOL™ (Canvax Biotech). Este compuesto permite obtener de forma íntegra el ARN mediante la destrucción de las estructuras celulares y la inhibición de las ARNasas.

Para llevar a cabo la extracción, se siguieron las instrucciones establecidas por la casa comercial. Primero, las muestras se resuspendieron con 1 mL de PRImeZOL™ pipeteando el lisado celular varias veces para asegurar una disrupción celular suficiente y una buena homogeneización. Tras 5 minutos de incubación, se añadieron 200 µL de cloroformo, se agitó eficazmente y tras su incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron 12 000 x g durante 15 minutos a 4°C. A continuación, la fase acuosa superior obtenida, donde se localiza el ARN, se precipitó mezclándolo con la misma cantidad de isopropanol (proporción 1:1), se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 12 000 x g durante 10 min a 4°C. Después, el precipitado se lavó y mezcló con 75% etanol, concentración óptima que no precipita sales, y se centrifugó 10 000 x g durante 10 minutos. Finalmente, el pellet se dejó secar, se resuspendió en agua libre de nucleasas y se incubó a 55°C durante 10 minutos para favorecer la perfecta disolución del ARN.

La concentración de ARN extraído, se determinó utilizando el espectofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Así mismo, se evaluó su pureza mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 nm, en los cuales, un valor cercano a 2 fue indicativo de una baja contaminación proteica y de residuos respectivamente.

4.5 Síntesis de cDNA mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR)

La PCR de transcripción inversa (RT-PCR), es una técnica en la cual, una hebra de ARN se retrotranscribe en ADN complementario (ADNc) mediante la acción de una transcriptasa inversa. Este paso es esencial para poder analizar la expresión relativa de ARN mensajero (ARNm) mediante RT-qPCR evitando las dificultades asociadas a la inestabilidad del ARN monocatenario.

Para realizar la síntesis de ADNc, se utilizó el kit “Verso cDNA Synthesis” (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El proceso se realizó empleando 1 µg de ARN en un volumen final de 10 µL, junto con los volúmenes especificados para cada reactivo en la Tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes requeridos de los reactivos para la síntesis de ADNc.

Reactivo	Volumen (µL)
5X Buffer de síntesis de ADNc	2
Mezcla de dNTP	1
Cebadores ARN (Decámeros producidos al azar)	0.5
Potenciadores de la retrotranscripción	0.5
Mezcla de enzimas Verso	0.5
Agua libre de nucleasas	Hasta 10
Volumen total	10

Una vez preparadas las mezclas, estas se incubaron en un baño termostático durante 1 hora a 42°C para la transcripción inversa. Finalmente, la transcriptasa inversa fue inactivada sometiendo las muestras a 95°C durante 3 minutos. Las muestras de ADNc obtenidas fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

4.6 Análisis de expresión génica por RT-qPCR

La expresión relativa de ARNm se evaluó por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), una técnica altamente sensible y específica de síntesis de ADN *in vitro* que permite monitorizar la amplificación de la muestra y cuantificar su concentración inicial a partir de la fluorescencia emitida. Su análisis se realizó en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) empleando 20 ng de ADNc, 5 µL de SYBR Green 2X (Thermo Fisher Scientific) y 500 nM (0.5 µL) de los cebadores sentido y antisentido indicados en la *Tabla 2*, hasta alcanzar un volumen final de 10µL.

Tabla 2. Lista de cebadores de ratón empleados en RT-qPCR adquiridos en MWG Biotech

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Atf4</i>	ATGGCCCGGCTATGGATGA	CGAAGTCAAACCTCTTTCAGATCC
<i>Ddit3</i>	CCACCACACCTGAAAGCAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
<i>Hspa5</i>	ACTTGGGACCACCTATTCT	ATCGCCAATCAGACGCTCC
<i>Il1b</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>Il6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>Lpin1</i>	CTCCGCTCCCGAGAGAAAG	TCATGTGCAAATCCACGGACT
<i>Lpin2</i>	TTGGGTGATAATGGGGAAGCC	CTGAGCTGGCCTTTTCATTTT
<i>Ppib</i>	GGCTCCGTCGTCTTCTTTT	ACTCGTCCTACAGATTCATCTCC
<i>Ptgs2</i>	TGAGCAACTATTCCAAACCAGC	GCACGTAGTCTTCGATCACTATC

Las condiciones utilizadas para la reacción se describen a continuación:

Tabla 3. Temperaturas y tiempos requeridos durante la RT-qPCR. El protocolo incluye una fase de desnaturalización inicial y una fase de amplificación. Al final de cada ciclo de amplificación se registró la fluorescencia (*).

	Tiempo		Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	3 minutos		95	1
Amplificación	Desnaturalización	12s	95	40
	Anillamiento	16s	60	
	Extensión (*)	28s	72	

Las muestras se analizaron por triplicado mediante el análisis comparativo $\Delta\Delta C_T$, respecto los valores C_T del gen de referencia *Ppib* (Ciclofilina B), cuya expresión fue invariable en las condiciones experimentales utilizadas. Los resultados se representan como la media $\pm$ el error estándar de las muestras respecto a la condición control especificada para cada gen de interés.

4.7 Microscopía confocal

Para identificar la relación entre la ausencia de lipina-2 y la formación de gotas lipídicas por acumulación de lípidos intracelulares, las líneas WT y *Lpin2*^{-/-} se sembraron a una confluencia de 500 000 células sobre cristales de 15 mm de diámetro, y se estimularon con ácido palmítico u oleico durante 6 o 24 horas.

Completados los tiempos de exposición, se retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS. Tras ello, se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA, *Paraformaldehído*, Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con 2 µg/mL de BODIPY® 493/503 (Thermo Fisher)

durante 10 minutos a temperatura ambiente. Comprendido este tiempo, las muestras volvieron a lavarse 3 veces con PBS y a continuación se incubaron con 20 μ M/mL Hoechst 3342 (Thermo Scientific) para marcar los núcleos, 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos en presencia de Gelvatol (9,6% Polivinil-alcohol (p/v), 24% glicerol (v/v), 2,5% DABCO (p/v)). Su análisis se realizó por microscopía confocal (Leica TCS SP5X) y el programa *ImageJ*.

4.8 Citometría de flujo

Por otra parte, se realizó citometría de flujo para cuantificar el número de gotas lipídicas en células WT y *Lpin2*^{-/-} control y estimuladas con ácido palmítico u oleico. Esta técnica permite analizar suspensiones de células, partículas o fragmentos subcelulares y obtener datos precisos sobre estas mediante el análisis de parámetros como la fluorescencia y la dispersión de la luz.

Primero, se realizó una titulación para identificar la concentración óptima de sonda que pudiera identificar correctamente la acumulación de gotas lipídicas. Para ello, las células WT en condiciones basales, como control negativo, o tras la estimulación con 100 μ M de ácido oleico como control positivo, se cultivaron a una confluencia de 500 000 células en placas de 6 pocillos, y se incubaron a diferentes concentraciones con la sonda BODIPY: 0.04 μ g/mL, 0.2 μ g/mL, 1 μ g/mL y 2 μ g/mL. Además de esto, se incluyeron controles negativos no marcados con la sonda en ambas condiciones para establecer la autofluorescencia celular.

Completada la exposición a ácidos grasos, se retiró el sobrenadante celular y, a continuación, los pocillos se cubrieron con 600 μ L de tripsina precalentada a 37°C durante 4 minutos. Pasado el periodo de incubación, se detuvo la reacción con 600 μ L de medio de cultivo resuspendiendo eficazmente, y el volumen se transfirió a tubos de 1.5 mL que se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, se retiró la fracción líquida y el pellet se resuspendió con 400 μ L de PBS.

Después, las muestras se incubaron con 100 μ L a diferentes concentraciones de BODIPY® 493/503, durante 15 min a temperatura ambiente y tras la incubación, se realizó un lavado con PBS. Posteriormente, se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 μ L de PBS, que fue transferido a tubos de citometría para su análisis. La señal fluorescente se registró en el citómetro espectral Cytex™ Aurora 5L y los datos se analizaron a través del programa *FlowJo*.

4.8.2 Cuantificación de gotas lipídicas

Para analizar la diferencia de formación de gotas lipídicas entre células WT y *Lpin2*^{-/-} control y estimuladas con ácido palmítico o ácido oleico, estas líneas se sembraron a una confluencia de 500 000 células en placas de 12 pocillos. El procedimiento fue el mismo que se describe anteriormente, aunque en este caso, la incubación con BODIPY® se realizó a la concentración óptima identificada en la titulación.

4.9 Análisis de secuenciación de ARN (ARN-seq)

Con el objetivo de hallar una posible relación entre la alteración de las enzimas del metabolismo lipídico con procesos de estrés del RE, se analizó la expresión de diversos genes relacionados con estas vías. Para ello, se emplearon los datos obtenidos de un análisis previo de ARN-seq realizado por el laboratorio para macrófagos múridos WT y *Lpin2*^{-/-} peritoneales, en condiciones basales y tras su exposición a 25 μ g de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) durante 8 horas. Los genes incluidos en el análisis se obtuvieron de la base de datos *Gene Ontology Annotations* (GEO) utilizando como término de búsqueda «Responsable de estrés en el retículo endoplasmático».

Para realizar su análisis, se partió de los valores de logCPM (logaritmo de cuentas por millón) correspondientes a cada gen de las muestras WT y *Lpin2*^{-/-} y, a continuación, los datos se normalizaron mediante Z-score, con el fin de identificar la expresión relativa de cada gen y facilitar la comparación entre condiciones genotípicas bajo sobrecarga lipídica. Los resultados se mostraron a través de un mapa de calor (*Heatmap*), donde los tonos rojos indicaron una mayor expresión relativa, mientras que los tonos azules representaron una disminución de la misma. Así mismo, los valores de logCPM de algunos genes se representaron en forma de histogramas para comparar su expresión con la del resto de genes analizados

4.10 Análisis estadístico

Los datos presentados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de los resultados obtenidos de un experimento representativo de dos o tres realizados por duplicado o triplicado. La significancia estadística utilizada para comparar dos grupos se realizó mediante la prueba t de Student, mientras que para comparaciones entre tres o más grupos se utilizó un test ANOVA. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***). El análisis estadístico se realizó a través del programa *SigmaPlot*.

5.RESULTADOS

5.1 Descripción genotípica y funcional de las líneas celulares

En primer lugar, se confirmó la identidad genotípica de las líneas celulares utilizadas en este estudio analizando la expresión génica de *Lpin2* por RT-qPCR. Los resultados mostraron que las células *Lpin2*^{-/-} no presentaron una expresión detectable para el ARNm de *Lpin2* en comparación con la línea WT (Figura 3).

Por otra parte, estudios en desarrollo del laboratorio indican que las células deficientes en lipina-2 presentan un posible mecanismo compensatorio por otros miembros de la familia de las lipinas. En este sentido, también se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de *Lpin1* en células WT y *Lpin2*^{-/-}. Los resultados obtenidos (Figura 3), confirmaron su expresión en ambas líneas celulares, siendo significativamente mayor en las células *Lpin2*^{-/-}, apoyando los datos con los resultados preliminares.

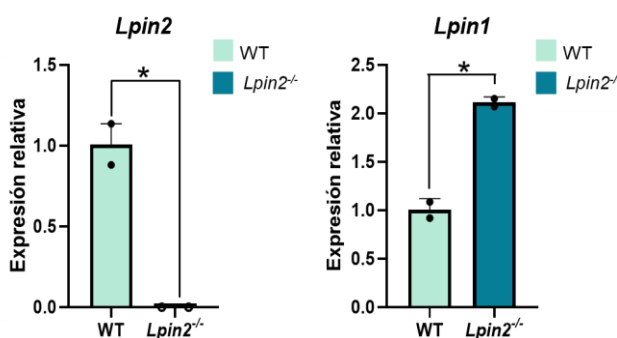


Figura 3. Expresión génica evaluada por RT-qPCR para los genes *Lpin2* y *Lpin1* en macrófagos inmortalizados murinos WT (azul claro) y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}, azul oscuro). Los gráficos muestran la expresión relativa $\pm$ el error estándar de los ARNm en las células *Lpin2*^{-/-} respecto a la condición WT de un experimento representativo, de un total de dos realizado por duplicado. El test estadístico utilizado fue una t de Student. * $p < 0.05$

Además, como confirmación funcional del genotipo celular, se evaluó la activación del inflammasoma NLRP3 cuantificando la producción de IL-1 β tras la estimulación con LPS y ATP mediante ELISA. Los resultados mostraron un aumento significativo en la producción de IL-1 β en las células *Lpin2*^{-/-} respecto a las WT, un comportamiento que ya había sido comprobado en estudios previos del laboratorio (Lordén et al., 2017).

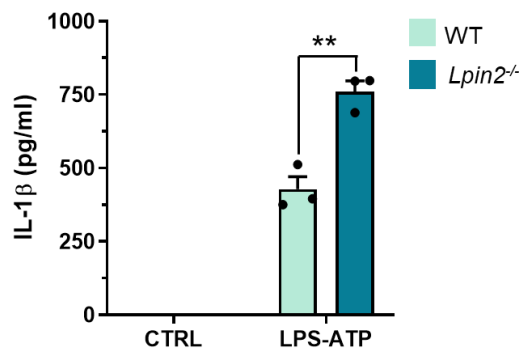


Figura 4. Evaluación de la producción de IL-1 β mediante ELISA. La activación del inflamasoma NLRP3 se analizó cuantificando los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes de macrófagos murinos WT (azul claro) y deficientes en lipina-2 (*Lpin2^{-/-}*, azul oscuro) inmortalizados, tras la estimulación con 200 ng/mL LPS y 2mM de ATP. Los gráficos muestran la concentración media de IL-1 β en pg/mL $\pm$ el error estándar en las líneas descritas, tras ser o no estimuladas con LPS y ATP, de un experimento representativo de un total de tres realizado por triplicado. El test estadístico aplicado fue una t de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.2 Evaluación de la formación de gotas lipídicas en presencia de ácido palmítico

Las gotas lipídicas son orgánulos citoplasmáticos compuestos por lípidos, que desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis lipídica celular. Específicamente, en situaciones de sobrecarga lipídica, estas estructuras almacenan AG libres en exceso, evitando así su efecto tóxico (Mathiowetz & Olzmann, 2024). El ácido palmítico (16:0), es uno de los ácidos grasos saturados cuyo consumo en exceso se ha asociado con diversos trastornos metabólicos, encontrándose significativamente elevados en pacientes obesos. Además, su acumulación provoca respuestas inflamatorias que son un factor importante en el desarrollo de diversas enfermedades (Korbecki & Bajdak-Rusinek, 2019).

Debido a su importancia e implicación en diversas patologías y mecanismos fisiológicos, y con el fin de validar el modelo celular empleado con otros modelos no inmortalizados, se evaluó su capacidad para esterificar ácido palmítico en lípidos neutros y formar gotas lipídicas. Para ello, las células WT se estimularon durante 6 horas con 100 μ M de ácido palmítico y se compararon con células tratadas en condiciones idénticas con ácido oleico (18:1 n-9), un ácido graso monoinsaturado ampliamente utilizado por su capacidad para promover la formación de gotas lipídicas (Nakajima et al., 2019). En ambos casos, los ácidos grasos se complejaron con BSA para minimizar su toxicidad. Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal confirmaron que el modelo celular utilizado fue capaz de responder en presencia de ácido palmítico de manera similar a lo descrito en otros modelos (Uchiyama et al., 2025). Además, a través del software *ImageJ*, se verificó que las LD formadas, fueron de menor tamaño con respecto a las generadas con ácido oleico, confirmando lo descrito previamente en la literatura (Eynaudi et al., 2021) (Figura 5). Así mismo, se observó una reducción en el número de gotas lipídicas inducidas por palmítico en relación con el tratamiento con oleico.

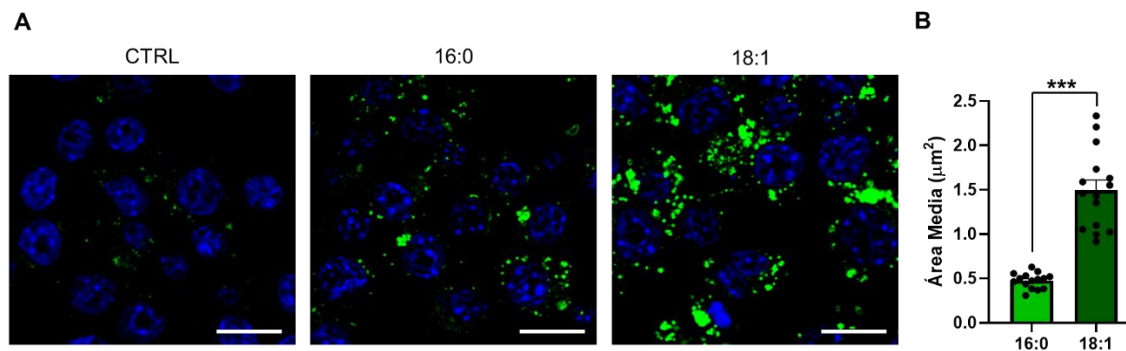


Figura 5. Análisis del tamaño de las gotas lipídicas en macrófagos murinos inmortalizados WT, tras la exposición durante 6 horas con 100 μ M de ácido palmítico (16:0) o ácido oleico (18:1) complejados con BSA. (A) Gotas lipídicas marcadas con BODIPY 493/503 (verde) visualizadas mediante microscopía confocal en células WT sin tratar (CTRL) y estimuladas con ácido palmítico u oleico. Se muestra una imagen representativa por condición de un total de dos experimentos realizados por triplicado. La barra de escala se corresponde con 10 μ m. (B) Área media de las LD formadas en células WT tratadas con ácido palmítico (16:0, verde claro) u oleico (18:1, verde oscuro). Los datos se obtuvieron tras analizar un grupo de $n = 15$ células por condición, de un experimento, de un total de dos realizado. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar. El test estadístico aplicado fue t de Student. *** $p < 0.001$.

5.2.1 Análisis de la expresión génica de lipina-2 en presencia de ácido palmítico

Por otro lado, se evaluó mediante RT-qPCR si la expresión de la enzima lipina-2 se veía regulada en respuesta a la estimulación con ácido palmítico. Para ello, las células WT y *Lpin2*^{-/-} (como control negativo), se mantuvieron en condiciones basales o fueron estimuladas con 100 μ M de ácido palmítico complejado con BSA, durante 24 horas. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo del ARNm de *Lpin2* en las células WT tras la estimulación con ácido palmítico (Figura 6).

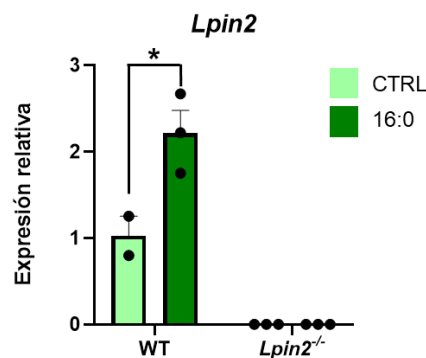


Figura 6. Expresión génica evaluada por RT-qPCR para el gen *Lpin2* en macrófagos inmortalizados de ratón WT y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}) en condiciones basales (CTRL, verde claro) o tras ser expuestos con 100 μ M de ácido palmítico (16:0, verde oscuro) complejado con BSA, durante 24 horas. Los gráficos muestran la expresión relativa $\pm$ el error estándar de los ARNm en las células descritas, de un experimento representativo, de un total de dos realizado por triplicado. El test estadístico utilizado fue t de Student. * $p < 0.05$.

5.3 Implicación de la lipina-2 en la formación de gotas lipídicas dependientes de palmítico

Las gotas lipídicas, están formadas principalmente de triacilglicéridos sintetizados a través de la vía del glicerol-3-fosfato (Mathiowetz & Olzmann, 2024). En este proceso, las lipinas juegan un papel fundamental al catalizar el penúltimo paso de esta ruta metabólica y, por tanto, determinan la formación de TAG. Por todo ello, una vez se hubo comprobado la capacidad del ácido palmítico para inducir la formación de gotas lipídicas en células WT, se analizó si este efecto se mantenía en células deficientes en lipina-2.

5.3.1 Estudio de formación de gotas lipídicas mediante microscopía confocal

Para comenzar, se analizó nuevamente mediante microscopía confocal la formación de gotas lipídicas en células WT y con el fin de evaluar la implicación de lipina-2 en este proceso, se incluyeron las células *Lpin2*^{-/-}. Del mismo modo, las células fueron expuestas con 100 μ M de ácido palmítico o ácido oleico (empleadas como control positivo para la formación de LD), complejadas con BSA en relación 3:1, durante 6 o 24 horas. La tinción con la sonda BODIPY 493/503 permitió visualizar una mayor señal fluorescente verde, indicativa de la acumulación de LD, en las células tratadas con ambos ácidos grasos en comparación con las condiciones control (Figura 7A).

Por otro lado, el análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas mediante el software *ImageJ*, reveló un incremento en el número de gotas lipídicas por célula tras la exposición tanto a ácido palmítico como ácido oleico respecto de la condición control, siendo este proceso dependiente del tiempo de tratamiento (Figura 7B). No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de LD formadas entre las células WT y las deficientes en lipina-2, ni en condiciones basales ni tras la estimulación con ácido palmítico, aunque si se reportaron diferencias en el tratamiento con ácido oleico (Figura 7C).

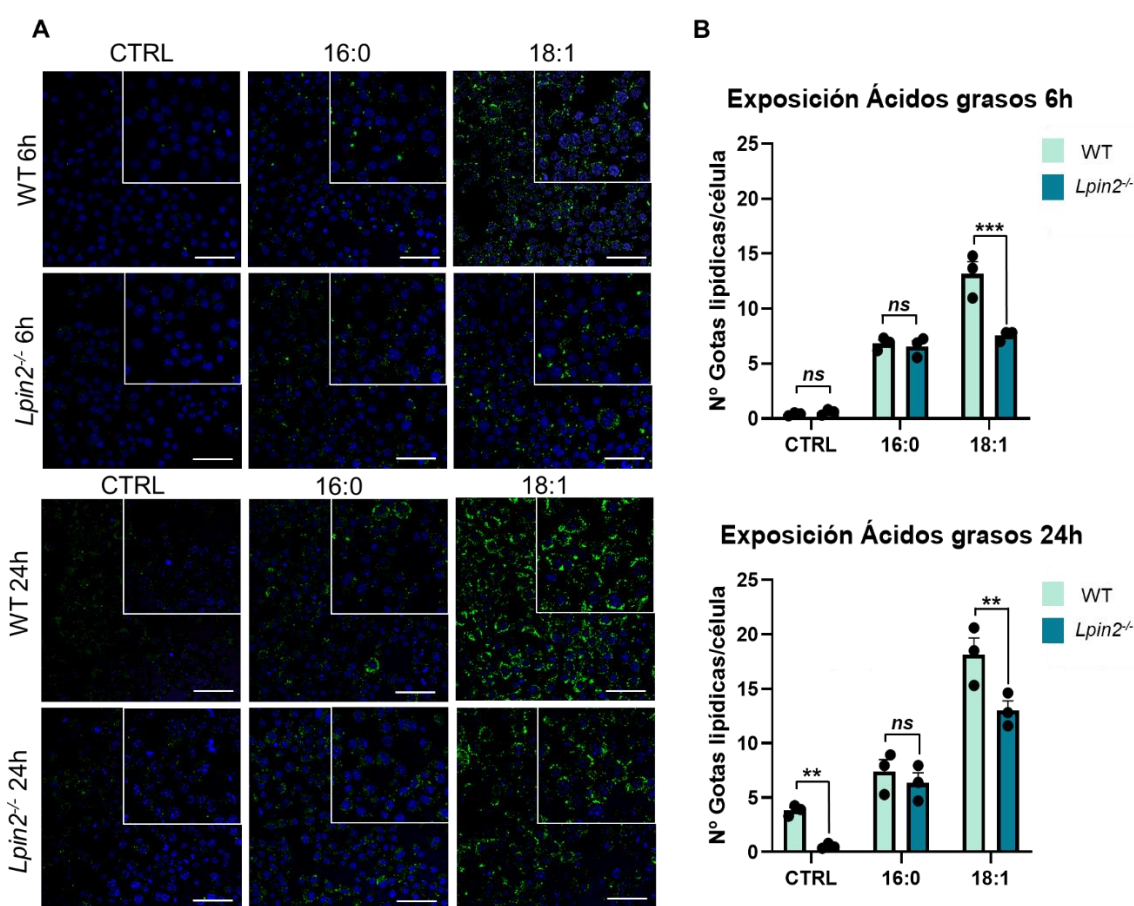


Figura 7. Análisis de formación de gotas lipídicas en macrófagos inmortalizados de ratón, WT y deficientes en *Lpin2* (*Lpin2*^{-/-}) mediante microscopía confocal, tras la estimulación con ácidos grasos. A) Imágenes representativas de microscopía confocal de núcleos celulares teñidos con Hoescht 3342 (azul) y gotas lipídicas marcadas con BODIPY 493/503 (verde) en células no estimuladas (CTRL) o estimuladas con 100 μ M de ácido palmítico (16:0) o ácido oleico (18:1) complejados con BSA, durante 6 horas (panel superior) o 24 horas (panel inferior). Se muestra una imagen representativa por condición de un total de dos experimentos realizados por duplicado. La barra de escala se corresponde a 50 μ m. B) Promedio de gotas lipídicas por célula analizadas para cada tratamiento entre células WT (azul claro) y *Lpin2*^{-/-} (azul oscuro) tras la estimulación durante 6 o 24 horas. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de un experimento representativo de dos realizados por duplicado. Test estadístico ANOVA ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, no significativo (ns).

5.3.2 Cuantificación de gotas lipídicas mediante citometría

Tras estudiar mediante microscopía confocal la formación de gotas lipídicas inducidas por ácido palmítico en células WT y *Lpin2*^{-/-}, se procedió a cuantificar de forma más robusta el número de LD acumuladas en condiciones basales y tras la estimulación con ácido palmítico mediante citometría.

Para ello, previamente se realizó la titulación de la sonda BODIPY 493/503 para optimizar su concentración de uso, y poder de esta forma analizar de forma eficiente el número de gotas lipídicas acumuladas. En este proceso, las células WT se incubaron a diferentes concentraciones de BODIPY (0.04, 0.2, 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$) en condiciones basales y tras la estimulación con 100 μM de ácido oleico complejoado con BSA, durante 24 horas, utilizado como control positivo dada su capacidad descrita para promover la formación de gotas lipídicas. En base a los resultados arrojados por la titulación (Figura 8) y teniendo en cuenta los resultados de microscopía en los que se identificó una menor formación de gotas lipídicas tras la exposición a palmítico, se consideró la concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ la concentración más óptima

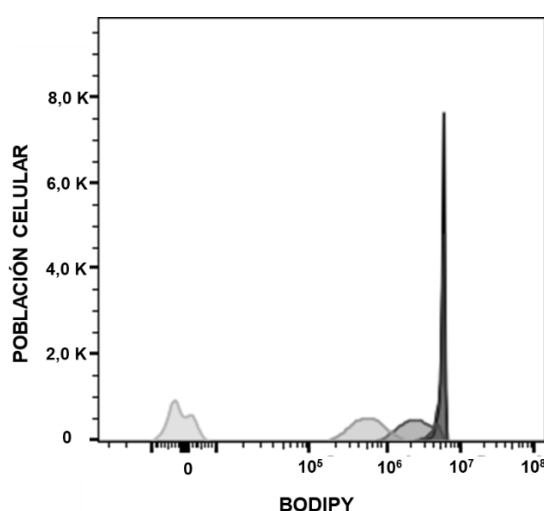


Figura 8. Titulación de la sonda BODIPY 493/503. La concentración óptima de sonda a utilizar para cuantificar la acumulación de gotas lipídicas, se realizó incubando la sonda a diferentes concentraciones: 0.04, 0.2, 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ (representadas con una escala de grises desde la concentración más baja marcada con colores claros hasta la concentración más alta marcada con colores más oscuros) en macrófagos inmortalizados de ratón WT en condiciones basales o tratados con 100 μM de ácido oleico (control positivo) durante 24 horas. La señal fluorescente emitida se analizó y representó mediante el software FlowJo.

Una vez determinada la concentración óptima de sonda BODIPY, se procedió a cuantificar la formación de gotas lipídicas en células WT y *Lpin2*^{-/-}. Para ello, las muestras en condiciones basales o estimuladas con 500 μM de ácido palmítico complejoado con BSA, durante 8 horas, se incubaron con 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de la sonda BODIPY durante 15 minutos y se analizaron mediante citometría. La intensidad media fluorescente (MFI), analizada en el software *FlowJo* reveló una mayor señal fluorescente en células WT respecto a las células deficientes en lipina-2 (Figura 9). Estos resultados unidos al aumento requerido de lipina-2 durante la formación de gotas lipídicas en respuesta a ácido palmítico, sugiere la implicación de lipina-2 en este proceso, confirmando en macrófagos inmortalizados lo previamente descrito en líneas de macrófagos silenciados RAW 264.7 (Valdearcos et al., 2012).

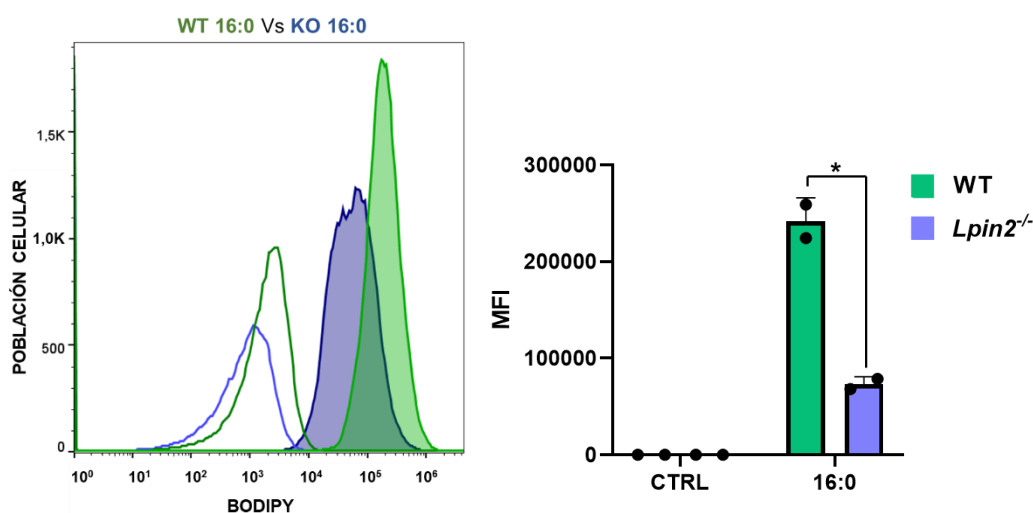


Figura 9. Citometría espectral para el análisis de formación de gotas lipídicas marcadas con 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de la sonda BODIPY 493/503, en células macrófagicas inmortalizadas de ratón WT (verde) y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}, azul) estimuladas durante 8 horas con 500 μM de ácido palmítico (16:0). Se muestran los perfiles de expresión de la sonda BODIPY (histogramas coloreados) respecto a la condición control (histogramas transparentes). Los gráficos indican la intensidad media fluorescente (MFI) en condiciones basales (CTRL) y tras el tratamiento con ácido palmítico (16:0) en células WT (verde) y *Lpin2*^{-/-} (azul). Se muestra un experimento representativo de dos realizados. Test estadístico *t* de Student **p* < 0.05.

5.4 Estudio de la implicación de lipina-2 en el estrés del retículo asociado a exceso de nutrientes

Numerosas investigaciones respaldan que una sobrecarga de nutrientes puede inducir estrés del RE, contribuyendo a una desregulación metabólica vinculada a diversos trastornos como la obesidad o la diabetes mellitus tipo II (Palomer et al., 2018). Debido a que entre las respuestas adaptativas activadas por las células frente a una situación de sobrecarga lipídica se encuentra la formación de gotas lipídicas, (Jarc & Petan, 2019) y dado que en el modelo experimental utilizado se observó una diferencia significativa en la formación de LD entre macrófagos inmortalizados WT y deficientes en lipina-2 tras una sobrecarga de ácido palmítico, se quiso evaluar el efecto de este exceso de lipídico sobre el RE y el posible papel de la lipina-2 regulando estas vías.

Para ello, se analizó por RT-qPCR la expresión del ARNm de diferentes marcadores clásicos de estrés del RE (*Hspa5* (BiP) *Ddit3* (CHOP)) en macrófagos WT y *Lpin2*^{-/-} mantenidos en condiciones basales o tras 6 horas de tratamiento con 100 μM de ácido palmítico complejoado con BSA en relación 3:1. Además, como control de la estimulación, se evaluaron los niveles de ARNm de lipina-2 en ambas situaciones. A partir de este momento, los resultados se presentan organizados en dos grupos: en los paneles superiores se muestran las diferencias dentro de cada genotipo según el tratamiento, mientras que en los paneles inferiores se comparan los genotipos bajo la misma condición de tratamiento. En estas condiciones, se pudo observar que el tiempo de exposición elegido no fue suficiente para inducir cambios significativos en los niveles de *Ddit3* ni *Hspa5* en ninguna de las líneas celulares en comparación con la situación control (Figura 10). Del mismo modo, la expresión de *Lpin2* en células WT no se modificó, lo que sugiere que el tiempo de exposición o la cantidad de estímulo, fue insuficiente para desencadenar una respuesta de estrés detectable en el RE.

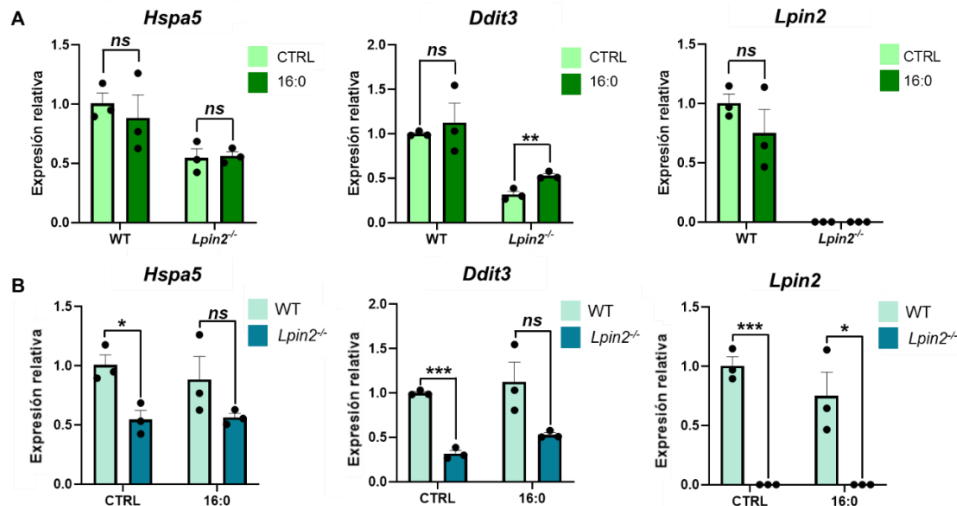


Figura 10. Expresión génica evaluada por RT-qPCR para marcadores de estrés del retículo endoplasmático (*Hspa5* y *Ddit3*) y *Lpin2*, en las líneas macrofágicas inmortalizadas múridas WT (azul claro) y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}; azul oscuro), en condiciones basales (CTRL, verde claro) y tras la estimulación durante 6 horas con 100 μ M de ácido palmítico (16:0, verde oscuro) complejo con BSA. A) Comparativa entre tratamientos dentro de cada genotipo. B) Comparativa entre genotipos bajo la misma condición de tratamiento. Los gráficos muestran la expresión relativa $\pm$ el error estándar de los ARNm en las células descritas, de un experimento de dos realizado por triplicado. El test estadístico utilizado fue ANOVA. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, no significativo (ns)

Dado que la que exposición de 6 horas no indujo ni estrés del RE, ni un aumento en la expresión de *Lpin2* en las células WT, a continuación, se extendió el tratamiento a 24 horas con la misma concentración de ácido palmítico. Los resultados obtenidos tras el análisis por RT-qPCR, mostraron un incremento significativo en la expresión de *Lpin2* en células WT (Figura 11), confirmando la activación de vías asociadas a la síntesis de lípidos debido a la sobrecarga lipídica. No obstante, tampoco se detectaron aumentos significativos en la expresión de *Hspa5* ni *Ddit3*, sugiriendo que las células son capaces de gestionar la sobrecarga lipídica derivada de esta concentración de ácido palmítico.

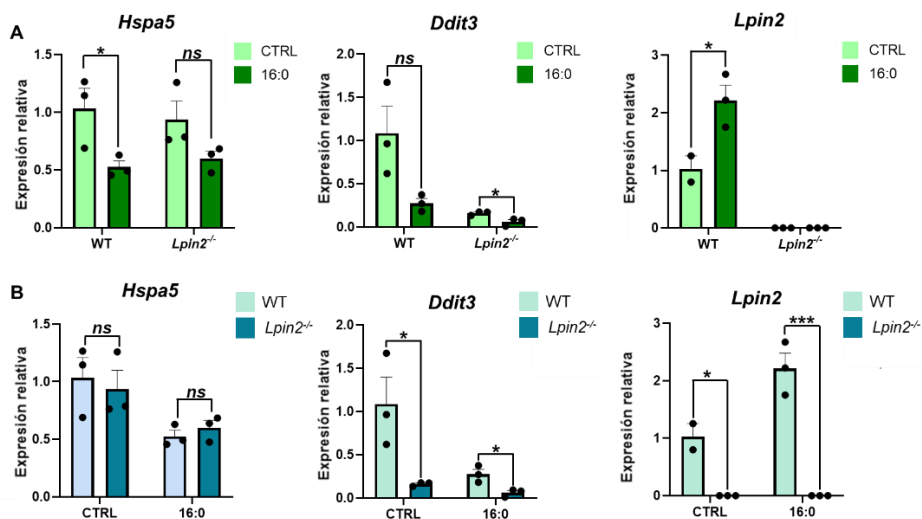


Figura 11. Expresión génica evaluada por RT-qPCR para marcadores de estrés del retículo endoplasmático (*Hspa5* y *Ddit3*) y *Lpin2*, en macrófagos inmortalizados múridos WT (azul claro) y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}; azul oscuro), en condiciones basales (CTRL, verde claro) o tras la estimulación durante 24 horas con 100 μ M de ácido palmítico (16:0, verde oscuro) complejo con BSA. A) Comparativa entre tratamientos dentro de cada genotipo. B) Comparativa entre genotipos bajo la misma condición de tratamiento. Los gráficos muestran la expresión relativa $\pm$ el error estándar de los ARNm en las células descritas, de un experimento representativo de un total de dos, realizado por triplicado. El test estadístico utilizado fue ANOVA * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, no significativo (ns).

Tras estos resultados, se incrementó la intensidad del estímulo sometiendo a las células con 500 μ M de ácido palmítico. En estas condiciones, se evaluó por RT-qPCR la expresión de los marcadores de estrés del retículo endoplasmático *Hspa5*, *Ddit3* y *Atf4*. Los resultados mostraron un aumento significativo de *Ddit3* y *Atf4* en ambos genotipos tras el tratamiento con ácido palmítico, siendo esta expresión significativamente mayor en las células WT (Figura 12). Sin embargo, la expresión de *Hspa5* no se modificó de manera significativa, lo que podría indicar que solo algunas vías de este mecanismo adaptativo se hubiesen activado.

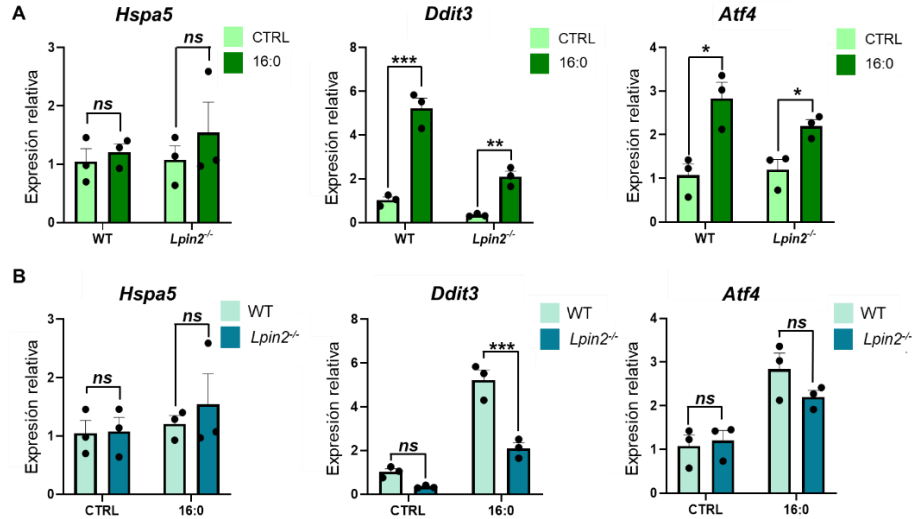


Figura 12. Expresión génica evaluada por RT-qPCR para marcadores de estrés del retículo endoplasmático (*Ddit3*, *Hspa5* y *Atf3*), en macrófagos inmortalizados murinos WT (azul claro) y deficientes en *Lpin2* (*Lpin2*^{-/-}, azul oscuro), en condiciones basales (CTRL, verde claro) o tras la estimulación durante 8 horas con 500 μ M de ácido palmítico (16:0, verde oscuro) complejoado con BSA. A) Comparativa entre tratamientos dentro de cada genotipo. B) Comparativa entre genotipos bajo la misma condición de tratamiento. Los gráficos muestran la expresión relativa $\pm$ el error estándar de los ARNm en las células descritas, de un experimento representativo de dos, realizado por triplicado. El test estadístico utilizado fue ANOVA. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, no significativo (ns).

Por otro lado, el análisis por RT-qPCR en las mismas condiciones para el gen *Lpin2* mostró un incremento significativo en células WT tras el tratamiento con ácido palmítico, confirmando la activación adecuada por el estímulo lipotóxico (Figura 13). En conjunto, estos resultados sugieren que, ante una sobrecarga lipídica, las células no son capaces de gestionar eficazmente el exceso de lípidos, lo que lleva a una activación de mecanismos de estrés del RE como estrategia para restablecer la homeostasis celular. No obstante, dicha activación resulta ser menor en ausencia de lipina-2.

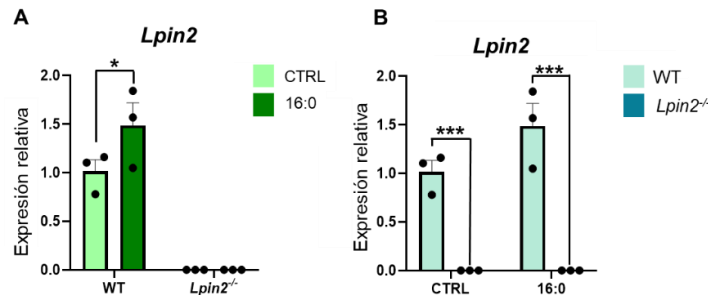


Figura 13. Expresión génica evaluada por RT-qPCR para *Lpin2*, en macrófagos inmortalizados murinos WT (azul claro) y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}, azul oscuro), en condición basal (CTRL, verde claro) o tras la estimulación con 500 μ M de ácido palmítico (16:0, verde oscuro) complejoado con BSA. A) Comparativa entre tratamientos dentro de cada genotipo. B) Comparativa entre genotipos bajo la misma condición de tratamiento. Los gráficos muestran la expresión relativa $\pm$ el error estándar de los ARNm en las células descritas, de un experimento representativo de dos, realizado por triplicado. El test estadístico utilizado fue t de Student. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, no significativo (ns).

Por otra parte, dada la interacción entre las vías de respuesta de estrés del retículo endoplasmático y la activación de mediadores proinflamatorios (W. Li et al., 2020), se evaluó el estado inflamatorio de las células WT y *Lpin2*^{-/-} en condiciones de sobrecarga lipídica. Para ello, se analizó mediante RT-qPCR la expresión génica de los mediadores inflamatorios IL-6 (*Il6*), COX-2 (*Ptgs2*) e IL-1β (*Il1b*) tras la estimulación con 500 μM de ácido palmítico durante 8 horas. Los resultados mostraron un aumento significativo de *Il6* respecto a su condición basal (Figura 14). Sin embargo, este aumento fue significativamente menor en comparación a las células WT, lo que sugeriría la implicación de la lipina-2 en la activación de estas vías. Por otro lado, aunque también se encontró una expresión diferencial en *Ptgs2* tras el tratamiento con ácido palmítico en células WT, este comportamiento no se produjo en las células deficientes en lipina-2. También se observó un incremento en los niveles de *Il1b*, aunque en este caso no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos.

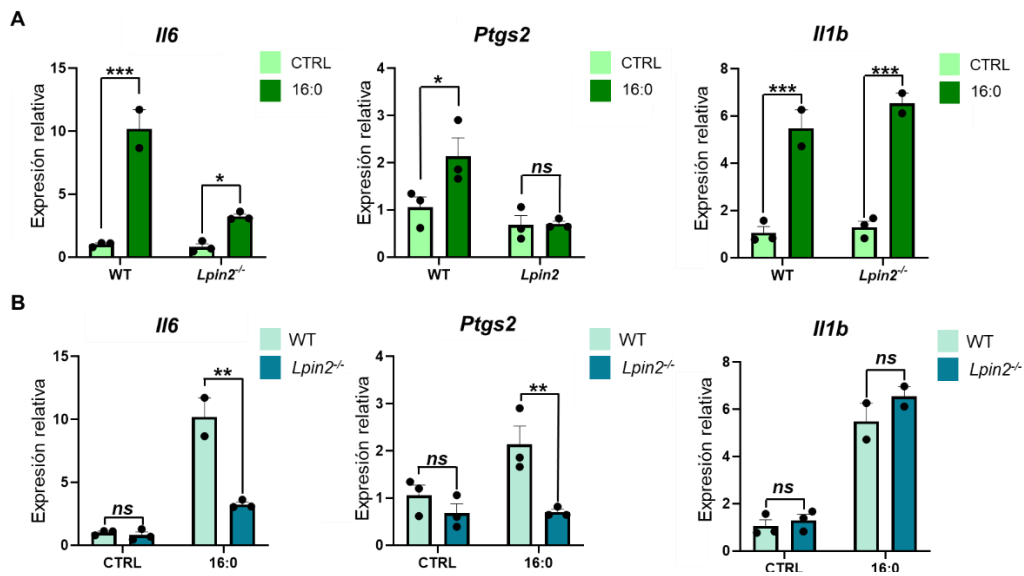


Figura 14. Expresión génica evaluada por RT-qPCR para mediadores inflamatorios (*Il6* y *Ptgs2*) en macrófagos inmortalizadas murinos WT (azul claro) y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}, azul oscuro), en condición basal (CTRL, verde claro) o tras la estimulación con 500 μM de ácido palmítico (16:0, verde oscuro) complejo con BSA en relación 3:1, durante 8 horas. A) Comparativa entre tratamientos dentro de cada genotipo. B) Comparativa entre genotipos bajo la misma condición de tratamiento. Los gráficos muestran la expresión relativa ± el error estándar de los ARNm en las células descritas, de un experimento representativo de dos, realizado por triplicado. El test estadístico utilizado fue ANOVA. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, no significativo (ns).

Finalmente, se quiso evaluar el posible papel de la lipina-2 regulando vías de respuesta al estrés del RE analizando otro estímulo metabólico como es un exceso de oxLDL, que se caracteriza por compartir rutas de activación celular al ácido palmítico a través del receptor CD36 (Vogel et al., 2022), generar acumulación intracelular de lípidos y desencadenar rutas de estrés del RE (Ishiyama et al., 2011; Yao et al., 2014). Para ello, se aprovechó un RNAseq realizado en el laboratorio en macrófagos peritoneales WT y *Lpin2*^{-/-} en condiciones basales y tras la exposición a oxLDL, y se analizó una lista de genes asociados a estrés del RE obtenido de la base de datos GEO.

El análisis representado en el heatmap (Figura 15A) mostró patrones relativos de expresión diferencial entre macrófagos peritoneales *Lpin2*^{-/-} y WT. En el primer caso, la exposición a oxLDL pareció incrementar la expresión de los genes *Hspa5*, *Ern1* y *Xbp1* y reducir la de *Ddit3* y *Atf3* respecto a su condición basal. Por el contrario, en los macrófagos peritoneales WT no se apreció ningún cambio relevante tras la exposición a oxLDL. De forma similar, los niveles absolutos de expresión de *Hspa5* y *Ern1* aumentaron en las células *Lpin2*^{-/-} tratadas con oxLDL en comparación con el resto de genes analizados, mientras que la de *Atf3* disminuyó tanto en células WT como en

células *Lpin2*^{-/-} expuestas a oxLDL (Figura 15B y 15C). Estos resultados, junto con los observados en macrófagos de médula ósea, podrían ser un indicativo de la activación parcial y selectiva de las vías de respuesta al estrés del RE ante estrés lipídico.

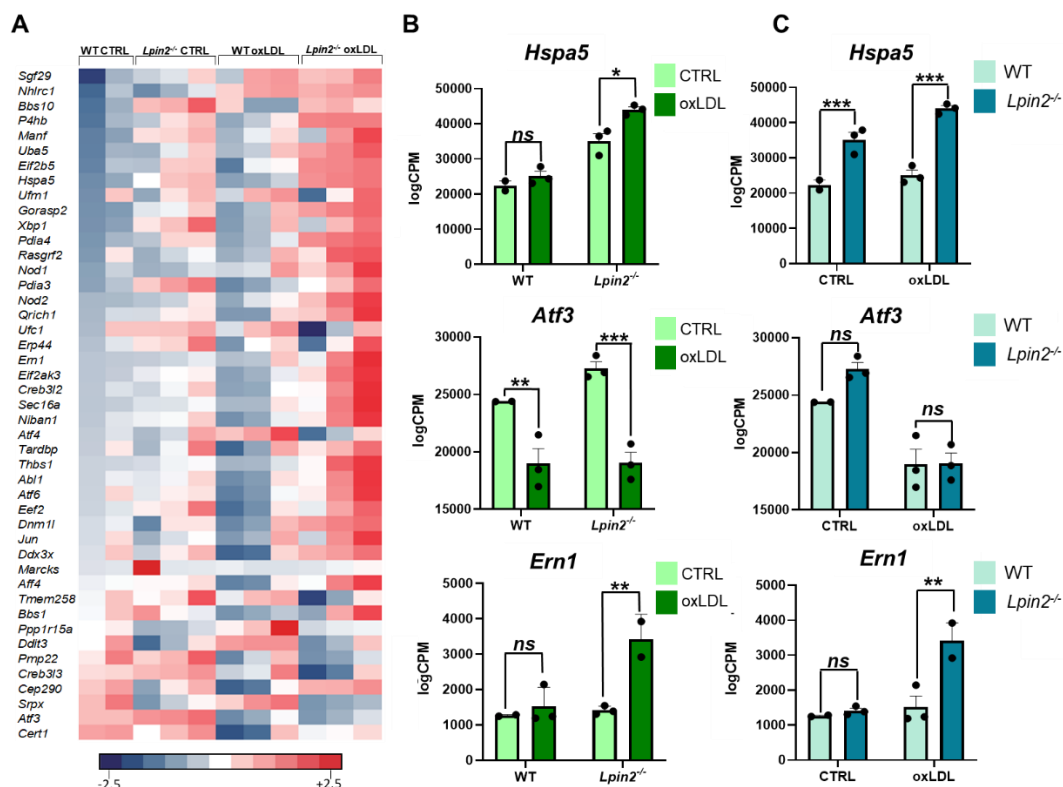


Figura 15. Análisis de la expresión de genes relacionados con vías de respuesta a estrés del retículo endoplasmático (RE) en macrófagos peritoneales WT y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}) en condiciones basales (CTRL) o tras su exposición durante 8 horas con 25 µg de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL). A) Heatmap de genes relacionados con vías de estrés del RE. Se representa la expresión relativa mediante Z-score de tres cultivos independientes (n=3), donde los tonos fríos indican baja expresión y los tonos cálidos, alta expresión. B) Comparativa de genes relacionados con la respuesta al estrés del RE (*Hspa5*, *Atf3* y *Ern1*) entre una condición basal (CTRL, verde claro) o tras la exposición a oxLDL (verde oscuro) dentro de cada genotipo. C) Comparativa de genes relacionados con la respuesta al estrés del RE (*Hspa5*, *Atf3* y *Ern1*) entre macrófagos WT (azul claro) y *Lpin2*^{-/-} (azul oscuro) bajo la misma condición. Los datos se representan como la media del logaritmo de cuentas por millón (logCPM) ± el error estándar, de tres cultivos independientes (n=3). El test estadístico utilizado fue ANOVA. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, no significativo (ns)

6. DISCUSIÓN

En las últimas dos décadas, se ha producido un aumento continuo en la prevalencia global de enfermedades metabólicas como hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia, obesidad y enfermedad de hígado graso no alcohólico (Chong et al., 2023). Esta situación se ha visto fuertemente agravada por la tendencia actual a unos estilos de vida poco saludables, y a un mayor consumo de productos ultraprocesados, que incrementan los niveles de ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo y pueden derivar en procesos de lipotoxicidad (Mann et al., 2024).

En los macrófagos, el correcto manejo de lípidos es esencial para preservar la homeostasis tisular y evitar alteraciones en diversos tejidos y órganos que puedan contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas (Guha Ray et al., 2023; Vogel et al., 2022). Sin embargo, en condiciones de sobrecarga lipídica, la captación de lípidos por encima de su capacidad de almacenamiento o manejo, puede alterar la función del retículo endoplasmático y activar los mecanismos de respuesta de estrés a través de la vía UPR, mediada por los sensores PERK, ATF6 e IRE1. No obstante, aunque este

mecanismo en su inicio es clave para combatir el estrés metabólico y decidir la supervivencia celular, el estrés del RE no resuelto puede perturbar su homeostasis lipídica, producir estrés oxidativo e inflamación y conducir a la disfunción celular (Ghemrawi et al., 2018; Mann et al., 2024; Vogel et al., 2022).

Si bien la activación de vías de respuesta a estrés del RE han sido ampliamente caracterizadas en condiciones de sobrecarga lipídica (Celik et al., 2023; Ma et al., 2024), aún se desconocen los mecanismos exactos por los que las enzimas del metabolismo lipídico puedan contribuir en estos procesos en los macrófagos. En este contexto, la enzima lipina-2 podría ser un componente clave, ya que participa en el metabolismo lipídico actuando como fosfatidato fosfatasa, y además modula respuestas inmunes a través de su función como coregulador transcripcional (Watahiki et al., 2020). Por este motivo, el presente trabajo analiza la implicación de la lipina-2 en el desarrollo de estrés del RE en macrófagos inmortalizados procedentes de médula ósea de ratón, WT y deficientes en *Lpin2*, en un entorno de sobrecarga lipídica.

Los análisis de expresión génica, muestran un aumento en los niveles de lipina-1 en macrófagos carentes de lipina-2, lo que podría indicar la relevancia de la homeostasis lipídica para los macrófagos. El mecanismo de compensación que parece ocurrir en las células, ya ha sido previamente descrito en otros contextos tisulares. Reue y sus colaboradores (Dwyer et al., 2012), describen en animales *Lpin2*^{-/-} un aumento de lipina-1 que permite mantener el equilibrio lipídico y prevenir alteraciones neurológicas como la ataxia. Esta compensación, se pierde con la edad lo que nuevamente sugiere que el mantenimiento de la homeostasis lipídica es esencial para un correcto estado fisiológico. Además, este estudio identifica diferencias para compensar el déficit de lipina-2 según el tipo celular, el tejido y el sistema experimental (*in vitro* o *in vivo*), lo que hace especialmente relevante profundizar cómo se ocurre esta compensación en los macrófagos y cuales podrían ser sus consecuencias funcionales en caso de no ocurrir.

En consideración con estos datos, como parte del presente trabajo, se quiso demostrar la adecuación funcional de esta nueva línea utilizada en el contexto de la activación inflamatoria general, en particular mediante la activación inflamatoria. Los resultados obtenidos confirman una total reproducibilidad con los datos ya reportados anteriormente por el grupo de trabajo (de Pablo et al., 2023; Lordén et al., 2017), realizado en macrófagos diferenciados de sangre periférica y silenciados para *Lpin2*, así como en macrófagos derivados de médula ósea de animales silvestres y deficientes en lipina-2. Estos hallazgos respaldan la idoneidad de la línea como modelo experimental para estudiar las consecuencias de la deficiencia de la lipina-2, particularmente su implicación en una respuesta inflamatoria exacerbada ante diferentes estímulos.

Para evaluar la implicación de la lipina-2 en los mecanismos de estrés del RE, se ha realizado un análisis en la formación de gotas lipídicas en el contexto de sobrecarga lipídica inducida por palmítico, un ácido graso abundante en la mayoría de los alimentos cuyos niveles se han detectado elevados en pacientes obesos (Carta et al., 2017; Korbecki & Bajdak-Rusinek, 2019). Como se ha comentado previamente, la lipina-2 es una fosfatidato fosfatasa dependiente de magnesio con una importancia relevante en el metabolismo lipídico, ya que cataliza la conversión del AP en DAG, el cual resulta esencial para la síntesis de TAG a partir de ácidos grasos (Welcome et al., 2025). El triacilglicérido, además de servir como fuente principal de energía en las células, constituye uno de los lípidos neutros necesarios para la biogénesis de LD. Esto es importante ya que, bajo condiciones de exceso de lípidos, las gotas lipídicas pueden secuestrar el exceso de AG, y manejar el estrés lipotóxico (Jarc & Petan, 2019; Zadoorian et al., 2023).

Sobre esta base funcional, y tras comprobar que los macrófagos inmortalizados son capaces de mimetizar la respuesta a un exceso de nutrientes, se procedió a examinar el comportamiento de las células carentes de lipina-2. En estos análisis, se encontraron

discrepancias entre los resultados obtenidos mediante microscopía y citometría, dos técnicas comúnmente empleadas para el estudio de la formación de gotas lipídicas (Valdearcos et al., 2012). Según los datos de microscopía, se podría llegar a concluir que la lipina-2 no se encuentra implicada en la biogénesis de gotas lipídicas. No obstante, los resultados observados en citometría siguen el comportamiento previamente descrito, donde se identifica que la ausencia de lipina-2 en las células se asocia con una capacidad reducida para formar gotas lipídicas tras la exposición a ácidos grasos. Estas diferencias pueden atribuirse a las particularidades metodológicas de cada técnica. Aunque la microscopía resulta muy útil para visualizar LD, su cuantificación requiere gran pericia técnica para evitar sesgos. En cambio, la citometría es una técnica más automatizada donde los datos dependen menos de una manipulación individual (Siddiqui & Livák, 2023; Wolins et al., 2018). Es por esto que, aunque se considera necesario aumentar el tamaño muestral para poder obtener una conclusión más firme, se considera que los resultados obtenidos por citometría son más fiables en este contexto. Además, el incremento detectado en la expresión génica de *Lpin2* bajo estas condiciones, podría corroborar las diferencias funcionales encontradas, reforzando el papel de la lipina-2 durante la formación de gotas lipídicas de acuerdo con datos previamente publicados en líneas celulares de macrófagos y hepatocitos (Gropler et al., 2009; Valdearcos et al., 2012).

Parte de la hipótesis planteada en este trabajo contempla una posible relación entre la formación de gotas lipídicas y la activación de vías de estrés del retículo endoplasmático en un contexto de sobrecarga nutricional. Por este motivo, de forma paralela a los análisis de biogénesis de gotas lipídicas, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión génica de diversos marcadores clásicos de estrés del RE (*Hspa5*, *Ddit3* y *Atf4*). Teniendo en cuenta que en la literatura se ha descrito que concentraciones relativamente bajas de ácido palmítico complejado con BSA, como 100 μ M, pueden resultar tóxicas y reducir la viabilidad celular (Park et al., 2014), se decidió iniciar el estudio exponiendo a las células con dicha concentración. Según se observa en los resultados, esta concentración de palmítico no produjo estrés del RE ni en las células WT ni en las deficientes en lipina-2 tras 6 horas. Además, tampoco se detectó variaciones en los niveles de expresión de *Lpin2*. En conjunto, estos hallazgos podrían sugerir que los macrófagos inmortalizados empleados en el estudio son capaces de gestionar la posible lipotoxicidad producida de manera independiente a la presencia de lipina-2. No obstante, tras 24 horas de exposición, si se detecta un aumento de lipina-2 en las células. En relación con ello, se identifica como una limitación del estudio haber realizado los análisis de forma independiente sin considerar los cambios en la expresión génica a lo largo del tiempo. Por tanto, se plantea como necesario llevar a cabo estudios temporales más detallados que permitan caracterizar con mayor precisión la progresión de la respuesta celular frente a la sobrecarga lipídica.

Adicionalmente, se exploró el efecto de una concentración más elevada de ácido palmítico (500 μ M) durante 8 horas de exposición. Esta condición experimental resultó ser la más adecuada, ya que permitió detectar un incremento en los niveles de expresión de *Didt3* y *Atf4*. No obstante, la expresión de *Didt3* fue significativamente menor en macrófagos *Lpin2*^{-/-}, lo que sugiere una respuesta diferencial al estrés en ausencia de esta enzima. En paralelo, se observó un aumento significativo de *Lpin2* en macrófagos WT, lo que sugiere que su papel es clave para regular la homeostasis lipídica en situaciones de estrés del RE. En este sentido, se ha demostrado en hepatocitos que la activación del factor de transcripción *Atf4* en respuesta al estrés del RE induce la expresión de *Lpin2* (Ryu et al., 2011), lo que podría explicar el incremento observado.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la inflamación parece constituir un desencadenante relevante del estrés del retículo endoplasmático, y que trabajos previos del grupo han evidenciado una participación clave de la lipina-2 tanto en la activación del inflammasoma como en la respuesta inflamatoria, se evaluó la expresión de distintos

genes proinflamatorios (*Il6*, *Ptgs2* e *Il1b*) tras la exposición con 500 μ M de ácido palmítico durante 8 horas. En los macrófagos WT, se detectó un incremento en todos los genes analizados, mientras que en los macrófagos deficientes en *Lpin2*, únicamente se observó un aumento significativo en *Il6*, aunque en una magnitud menor a las WT, y en *Il1b*, cuyos niveles fueron comparables entre ambos genotipos. Estos resultados respaldan la capacidad del ácido palmítico para inducir una respuesta inflamatoria, estimulando la expresión de genes *Il6* y *Ptgs2*, en concordancia con lo descrito en estudios previos (Kochumon et al., 2022; Oh et al., 2014). La menor inducción de estos genes en las células carentes de lipina-2 podría estar relacionada con una activación más atenuada de las vías de estrés del RE, ya que se ha descrito que mediadores como *Ddit3* puede amplificar las señales inflamatorias (Díaz-Bulnes et al., 2020; Ghemrawi et al., 2018). En este sentido, los datos apoyan la idea de que el estrés del RE puede contribuir a potenciar la inflamación en condiciones de sobrecarga lipídica. Por otro lado, el incremento de *Il1b* observado tanto en células WT como en *Lpin2*^{-/-} podría estar vinculado a la activación del inflammasoma NLRP3 a través de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales inducidas por ácido palmítico (Wen et al., 2011).

Un aspecto de lo más relevante encontrado, es que en situaciones de sobrecarga lipídica en los que se observa la activación de ciertos componentes de las vías de respuesta de estrés en células silvestres, estos mecanismos no ocurren en las células deficientes en lipina-2, pareciendo encontrarse protegidas bajo esta situación. Tampoco se encuentra una respuesta inflamatoria tan exacerbada tras la exposición a palmítico. Teniendo en consideración que estas células carecen de *Lpin2* y que los resultados por citometría indicaron una menor formación de gotas lipídicas, resulta importante preguntarse qué puede estar ocurriendo en estas células para manejar el exceso de ácidos grasos sin que sean almacenadas en gotas lipídicas, ni produzcan los niveles de estrés del retículo que se detecta en las células silvestres.

Tal y como se ha reportado, el exceso de ácidos grasos saturados puede seguir distintos destinos metabólicos además de su almacenamiento en gotas lipídicas. Entre estos se incluye su incorporación a lípidos de membrana, su canalización hacia la β -oxidación mitocondrial o su conversión en metabolitos o intermediarios lipídicos (Vogel et al., 2022). En este contexto, es posible que el ácido palmítico haya sido esterificado en fosfolípidos e incorporado a las membranas celulares como estrategia para atenuar su efecto lipotóxico (Ceja-Galicia et al., 2025). Otra vía posible sería su redirección hacia la β -oxidación, lo cual coincidiría con resultados preliminares obtenidos en este laboratorio, en los que se ha observado un incremento en la oxidación mitocondrial del ácido palmítico en ausencia de lipina-2. No obstante, ambas rutas presentan limitaciones. Una acumulación excesiva de fosfolípidos saturados puede alterar la fluidez y composición de las membranas, comprometiendo su funcionalidad. Por otro lado, una sobrecarga de ácido palmítico puede promover la síntesis de ceramidas, lo que se ha asociado con disfunción mitocondrial y la activación de vías apoptóticas (Ceja-Galicia et al., 2025; Engin, 2024). Adicionalmente, estudios recientes han reportado diferencias en la activación de respuestas al estrés del RE entre distintas poblaciones de macrófagos, siendo esta respuesta más pronunciada en macrófagos de tipo M1 en comparación los M2 (Wei et al., 2022; M. Zhu et al., 2024). Este hecho, podría estar relacionado con las diferencias observadas en el presente estudio. Por tanto, se plantea como línea de investigación futura analizar el estado de polarización de los macrófagos empleados, especialmente considerando la estrecha relación entre el metabolismo lipídico y la regulación de la polarización (Yan & Horng, 2020).

Finalmente, con el propósito de comprender mejor la implicación de una sobrecarga lipídica en un contexto fisiopatológico y su posible vínculo con el síndrome metabólico, se analizó en un modelo *in vitro* de aterosclerosis la expresión de diferentes marcadores de estrés del RE utilizando datos obtenidos mediante RNAseq. En macrófagos deficientes en lipina-2, la exposición a oxLDL pareció incrementar algunos genes

asociados a estrés del RE como *Hspa5*, *Ern1* y *Xbp1* mientras que redujo otros como *Ddit3*, y *Atf3*, este último descrito como un supresor negativo de la inflamación (Suganami et al., 2009). En contraste, en los macrófagos WT no se apreciaron cambios relevantes. Cabe destacar que estos resultados difieren de los obtenidos tras la exposición a ácido palmítico, en los que no se ha encontrado incrementos en genes asociados a estrés del RE en macrófagos *Lpin2*^{-/-} pero si en WT. Estas discrepancias, podrían atribuirse, en parte, a las diferencias en el origen de los macrófagos empleados en estos estudios: peritoneales en el caso del RNAseq, y derivados de médula ósea en los ensayos con palmítico, que, como ya se ha documentado influye en su programación metabólica y en las respuestas que desarrollan frente a distintos estímulos (Artyomov et al., 2016). Además, la activación diferencial de las vías de estrés del RE podría estar relacionada con la distinta sensibilidad de sus sensores ante estímulos específicos (DuRose et al., 2006).

En definitiva, los hallazgos sugieren que, en situaciones de exceso de nutrientes, la enzima metabólica lipina-2 parece ser determinante para manejar el estrés lipídico favoreciendo la incorporación de ácidos grasos a gotas lipídicas. Además, el modelo celular empleado, representa adecuadamente el comportamiento esperado en situaciones de sobrecarga lipídica, lo que le convierte en un buen modelo para estudiar la implicación de la lipina-2 en diferentes trastornos metabólicos. Las diferencias halladas en macrófagos carentes de lipina-2, ponen de manifiesto la necesidad de investigaciones adicionales que permitan esclarecer los mecanismos alternativos que puedan estar detrás de estos cambios.

En este sentido, como líneas futuras de investigación, sería interesante explorar la activación de ATF6, considerado uno de los principales sensores del estrés del retículo endoplasmático. Este factor de transcripción, conocido por activarse en respuesta a la acumulación de lípidos, se transloca al núcleo para promover la expresión de otros genes implicados en el estrés del RE (So, 2018). Para evaluar su activación en ausencia de lipina-2, las células *Lpin2*^{-/-} podrían ser transfectadas con plásmidos que expresen quimeras de ATF6 fusionadas con proteínas fluorescentes, y posteriormente ser expuestas a ácido palmítico. Esta estrategia permitiría visualizar su localización subcelular y determinar si, en ausencia de lipina-2, se produce una activación eficiente de esta vía, lo que permitiría esclarecer su papel en el desarrollo de estrés del RE. Así mismo, se plantea como estrategia complementaria realizar un estudio lipidómico que permita esclarecer el destino del ácido palmítico en las células carentes de lipina-2. Este enfoque, permitiría determinar si el ácido graso se está esterificando e incorporando a lípidos neutros, si se acumula en el citoplasma (mediante análisis lipidómicos de fracciones subcelulares) o si, por el contrario, está siendo redirigido hacia otras rutas metabólicas como su β -oxidación mitocondrial, la síntesis de ácidos grasos o su incorporación en membranas. Por otro lado, considerando el aumento encontrado en la expresión de lipina-1 en las células deficientes en lipina-2, sería pertinente evaluar la posibilidad de la existencia de un mecanismo compensatorio y las repercusiones que alteraciones en esta vía puedan tener sobre la funcionalidad de los macrófagos. Para ello, podría realizarse un silenciamiento génico temporal de *Lpin1* mediante ARN de interferencia (ARNi), con el objetivo de analizar si la ausencia de estrés del RE en presencia de palmítico, es debida a una posible compensación funcional.

7. CONCLUSIONES

1. En situaciones de exceso lipídico, la expresión de lipina-2 se incrementa para favorecer el almacenamiento de ácidos grasos libres en gotas lipídicas y mantener la homeostasis lipídica
2. La activación de vías asociadas a estrés del retículo endoplasmático inducida por estrés lipídico en macrófagos WT podría estar mediada por lipina-2
3. Los macrófagos deficientes en *Lpin2* parecen utilizar mecanismos alternativos independientes a la formación de gotas lipídicas y la activación de las vías de estrés del retículo endoplasmático en situaciones de sobrecarga lipídica

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Artyomov, M., Sergushichev, A., & Schilling, J. D. (2016). Integrating Immunometabolism and Macrophage Diversity. *Seminars in immunology*, 28(5), 417-424. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.004>
2. Batista-Gonzalez, A., Vidal, R., Criollo, A., & Carreño, L. J. (2020). New Insights on the Role of Lipid Metabolism in the Metabolic Reprogramming of Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10, 2993. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02993>
3. Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 107-138. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112116>
4. Brohée, L., Crémer, J., Colige, A., & Deroanne, C. (2021). Lipin-1, a Versatile Regulator of Lipid Homeostasis, Is a Potential Target for Fighting Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4419. <https://doi.org/10.3390/ijms22094419>
5. Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Frontiers in Physiology*, 8, 902. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>
6. Ceja-Galicia, Z. A., Cespedes-Acuña, C. L. A., & El-Hafidi, M. (2025). Protection Strategies Against Palmitic Acid-Induced Lipotoxicity in Metabolic Syndrome and Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(2), 788. <https://doi.org/10.3390/ijms26020788>
7. Celik, C., Lee, S. Y. T., Yap, W. S., & Thibault, G. (2023). Endoplasmic reticulum stress and lipids in health and diseases. *Progress in Lipid Research*, 89, 101198. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101198>
8. Chen, Y., Rui, B.-B., Tang, L.-Y., & Hu, C.-M. (2015). Lipin family proteins—Key regulators in lipid metabolism. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 66(1), 10-18. <https://doi.org/10.1159/000368661>
9. Chong, B., Kong, G., Shankar, K., Chew, H. S. J., Lin, C., Goh, R., Chin, Y. H., Tan, D. J. H., Chan, K. E., Lim, W. H., Syn, N., Chan, S. P., Wang, J.-W., Khoo, C. M., Dimitriadis, G. K., Wijarnpreecha, K., Sanyal, A., Nouredin, M., Siddiqui, M. S., ... Chew, N. W. S. (2023). The global syndemic of metabolic diseases in the young adult population: A consortium of trends and projections from the Global Burden of Disease 2000–2019. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155402>
10. Csaki, L. S., Dwyer, J. R., Fong, L. G., Tontonoz, P., Young, S. G., & Reue, K. (2013). Lipins, Lipinopathies, and the Modulation of Cellular Lipid Storage and Signaling. *Progress in lipid research*, 52(3), 10.1016/j.plipres.2013.04.001. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.001>
11. Csaki, L. S., & Reue, K. (2010). Lipins: Multifunctional Lipid Metabolism Proteins. *Annual review of nutrition*, 30, 257-272. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104729>
12. de Pablo, N., Meana, C., Martínez-García, J., Martínez-Vicente, P., Albert, M., Guerra, S., Angulo, A., Balsinde, J., & Balboa, M. A. (2023). Lipin-2 regulates the antiviral and anti-inflammatory responses to interferon. *EMBO Reports*, 24(12), e57238. <https://doi.org/10.15252/embr.202357238>
13. Deng, L., Kersten, S., & Stienstra, R. (2023). Triacylglycerol uptake and handling by macrophages: From fatty acids to lipoproteins. *Progress in Lipid Research*, 92, 101250. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2023.101250>
14. Di Conza, G., & Ho, P.-C. (2020). ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity. *Cells*, 9(3), 695. <https://doi.org/10.3390/cells9030695>
15. Díaz-Bulnes, P., Saiz, M. L., López-Larrea, C., & Rodríguez, R. M. (2020). Crosstalk Between Hypoxia and ER Stress Response: A Key Regulator of Macrophage Polarization. *Frontiers in Immunology*, 10, 2951. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02951>
16. DuRose, J. B., Tam, A. B., & Niwa, M. (2006). Intrinsic Capacities of Molecular Sensors of the Unfolded Protein Response to Sense Alternate Forms of Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 17(7), 3095-3107. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0055>

17. Dwyer, J. R., Donkor, J., Zhang, P., Csaki, L. S., Vergnes, L., Lee, J. M., Dewald, J., Brindley, D. N., Atti, E., Tetradis, S., Yoshinaga, Y., De Jong, P. J., Fong, L. G., Young, S. G., & Reue, K. (2012). Mouse lipin-1 and lipin-2 cooperate to maintain glycerolipid homeostasis in liver and aging cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), E2486-E2495. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205221109>
18. Engin, A. B. (2017). What Is Lipotoxicity? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 960, 197-220. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_8
19. Engin, A. B. (2024). Mechanism of Obesity-Related Lipotoxicity and Clinical Perspective. En A. B. ENGIN & A. ENGIN (Eds.), *Obesity and Lipotoxicity* (pp. 131-166). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-63657-8_5
20. Eynaudi, A., Díaz-Castro, F., Bórquez, J. C., Bravo-Sagua, R., Parra, V., & Troncoso, R. (2021). Differential Effects of Oleic and Palmitic Acids on Lipid Droplet-Mitochondria Interaction in the Hepatic Cell Line HepG2. *Frontiers in Nutrition*, 8, 775382. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.775382>
21. Ghemrawi, R., Battaglia-Hsu, S.-F., & Arnold, C. (2018). Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. *Cells*, 7(6), 63. <https://doi.org/10.3390/cells7060063>
22. Gropler, M. C., Harris, T. E., Hall, A. M., Wolins, N. E., Gross, R. W., Han, X., Chen, Z., & Finck, B. N. (2009). Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 6763-6772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807882200>
23. Guha Ray, A., Odum, O. P., Wiseman, D., & Weinstock, A. (2023). The diverse roles of macrophages in metabolic inflammation and its resolution. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1147434. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1147434>
24. Guo, H., Callaway, J. B., & Ting, J. P.-Y. (2015). Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nature medicine*, 21(7), 677-687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
25. Ishiyama, J., Taguchi, R., Akasaka, Y., Shibata, S., Ito, M., Nagasawa, M., & Murakami, K. (2011). Unsaturated FAs prevent palmitate-induced LOX-1 induction via inhibition of ER stress in macrophages. *Journal of Lipid Research*, 52(2), 299-307. <https://doi.org/10.1194/jlr.M007104>
26. Jarc, E., & Petan, T. (2019). Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 92(3), 435-452.
27. Kochumon, S., Jacob, T., Koshy, M., Al-Rashed, F., Sindhu, S., Al-Ozairi, E., Al-Mulla, F., Rosen, E. D., & Ahmad, R. (2022). Palmitate Potentiates Lipopolysaccharide-Induced IL-6 Production via Coordinated Acetylation of H3K9/H3K18, p300, and RNA Polymerase II. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 209(4), 731-741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100928>
28. Korbecki, J., & Bajdak-Rusinek, K. (2019). The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: An overview of molecular mechanisms. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 68(11), 915-932. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01273-5>
29. Lazarov, T., Juarez-Carreño, S., Cox, N., & Geissmann, F. (2023). Physiology and diseases of tissue-resident macrophages. *Nature*, 618(7966), 698-707. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06002-x>
30. Lemmer, I. L., Willemsen, N., Hilal, N., & Bartelt, A. (2021). A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Molecular Metabolism*, 47, 101169. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101169>
31. Li, W., Cao, T., Luo, C., Cai, J., Zhou, X., Xiao, X., & Liu, S. (2020). Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(14), 6129-6140. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10614-y>
32. Li, Y., Ma, Z., Jiang, S., Hu, W., Li, T., Di, S., Wang, D., & Yang, Y. (2017). A global perspective on FOXO1 in lipid metabolism and lipid-related diseases. *Progress in Lipid Research*, 66, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.04.002>
33. Liao, P.-C., & Pon, L. A. (2022). Lipid droplets in stress protection: Distinct mechanisms of lipid droplet microautophagy. *Autophagy Reports*, 1(1), 197-200. <https://doi.org/10.1080/27694127.2022.2067643>

34. Lordén, G., Sanjuán-García, I., de Pablo, N., Meana, C., Alvarez-Miguel, I., Pérez-García, M. T., Pelegrín, P., Balsinde, J., & Balboa, M. A. (2017). Lipin-2 regulates NLRP3 inflammasome by affecting P2X7 receptor activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(2), 511-528. <https://doi.org/10.1084/jem.20161452>
35. Ma, K., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, L., & Li, M. (2024). Endoplasmic reticulum stress: Bridging inflammation and obesity-associated adipose tissue. *Frontiers in Immunology*, 15, 1381227. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1381227>
36. Mann, V., Sundaresan, A., & Shishodia, S. (2024). Overnutrition and Lipotoxicity: Impaired Efferocytosis and Chronic Inflammation as Precursors to Multifaceted Disease Pathogenesis. *Biology*, 13(4), 241. <https://doi.org/10.3390/biology13040241>
37. Marshall, J. S., Upton, J. E. M., Vliagoftis, H., Hildebrand, K. J., Byrne, A., & Watson, W. (2024). Introduction to immunology and immune disorders. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 20(3), 69. <https://doi.org/10.1186/s13223-024-00932-5>
38. Mathiowetz, A. J., & Olzmann, J. A. (2024). Lipid droplets and cellular lipid flux. *Nature cell biology*, 26(3), 331-345. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01364-4>
39. McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F. (2019). Introduction to the Immune System. En K. M. Fulton & S. M. Twine (Eds.), *Immunoproteomics: Methods and Protocols* (pp. 1-24). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_1
40. Meana, C., Peña, L., Lordén, G., Esquinas, E., Guijas, C., Valdearcos, M., Balsinde, J., & Balboa, M. A. (2014). Lipin-1 Integrates Lipid Synthesis with Proinflammatory Responses during TLR Activation in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 193(9), 4614-4622. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400238>
41. Mustapha, S., Mohammed, M., Azemi, A. K., Yunusa, I., Shehu, A., Mustapha, L., Wada, Y., Ahmad, M. H., Ahmad, W. A. N. W., Rasool, A. H. G., & Mokhtar, S. S. (2021). Potential Roles of Endoplasmic Reticulum Stress and Cellular Proteins Implicated in Diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 8830880. <https://doi.org/10.1155/2021/8830880>
42. Nakajima, S., Gotoh, M., Fukasawa, K., Murakami-Murofushi, K., & Kunugi, H. (2019). Oleic acid is a potent inducer for lipid droplet accumulation through its esterification to glycerol by diacylglycerol acyltransferase in primary cortical astrocytes. *Brain Research*, 1725, 146484. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146484>
43. Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2015). The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual review of pathology*, 10, 173-194. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
44. Oh, E., Yun, M., Kim, S. K., Seo, G., Bae, J. S., Joo, K., Chae, G. T., & Lee, S.-B. (2014). Palmitate induces COX-2 expression via the sphingolipid pathway-mediated activation of NF-κB, p38, and ERK in human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research...*, 306(4), 339-345. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1434-6>
45. Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2018). Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 178-190. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>
46. Park, E.-J., Lee, A. Y., Park, S., Kim, J.-H., & Cho, M.-H. (2014). Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.027>
47. Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
48. Prieur, X., Röszer, T., & Ricote, M. (2010). Lipotoxicity in macrophages: Evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 327-337. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.09.017>
49. Reue, K. (2009). The Lipin Family: Mutations and Metabolism. *Current opinion in lipidology*, 20(3), 165-170. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32832adee5>
50. Reue, K., & Wang, H. (2019). Mammalian lipin phosphatidic acid phosphatases in lipid synthesis and beyond: Metabolic and inflammatory disorders. *Journal of Lipid Research*, 60(4), 728-733. <https://doi.org/10.1194/jlr.S091769>

51. Reue, K., & Zhang, P. (2008). The lipin protein family: Dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS letters*, 582(1), 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.014>
52. Röszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015, 816460. <https://doi.org/10.1155/2015/816460>
53. Ryu, D., Seo, W.-Y., Yoon, Y.-S., Kim, Y.-N., Kim, S. S., Kim, H.-J., Park, T.-S., Choi, C. S., & Koo, S.-H. (2011). Endoplasmic reticulum stress promotes LIPIN2-dependent hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 60(4), 1072-1081. <https://doi.org/10.2337/db10-1046>
54. Sattler, S. (2017). The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. En S. Sattler & T. Kennedy-Lydon (Eds.), *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology* (pp. 3-14). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_1
55. Siddiqui, S., & Livák, F. (2023). Principles of Advanced Flow Cytometry: A Practical Guide. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2580, 89-114. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2740-2_5
56. Siniosoglou, S. (2013). Phospholipid metabolism and nuclear function: Roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 575-581. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.014>
57. So, J.-S. (2018). Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Molecules and Cells*, 41(8), 705-716. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0241>
58. Suganami, T., Yuan, X., Shimoda, Y., Uchio-Yamada, K., Nakagawa, N., Shirakawa, I., Usami, T., Tsukahara, T., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Yasuda, K., Matsuda, J., Kamei, Y., Kitajima, S., & Ogawa, Y. (2009). Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circulation Research*, 105(1), 25-32. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.196261>
59. Uchiyama, A., Kon, K., Morinaga, M., Fukada, H., Yaginuma, R., Fukuhara, K., Yamashina, S., Iwabuchi, K., & Ikejima, K. (2025). Palmitic acid induces insulin resistance and oxidative stress-mediated cell injury through accumulation of lipid rafts in murine hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 745, 151242. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.151242>
60. Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Peña, L., Gil-de-Gómez, L., Balsinde, J., & Balboa, M. A. (2012). Lipin-2 Reduces Proinflammatory Signaling Induced by Saturated Fatty Acids in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 10894-10904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.342915>
61. Vogel, A., Brunner, J. S., Hajto, A., Sharif, O., & Schabbauer, G. (2022). Lipid scavenging macrophages and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(1), 159066. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159066>
62. Vozenilek, A. E., Navratil, A. R., Green, J. M., Coleman, D. T., Blackburn, C. M. R., Finney, A. C., Pearson, B. H., Chrast, R., Finck, B. N., Klein, R. L., Orr, A. W., & Woolard, M. D. (2018). Macrophage-Associated Lipin-1 Enzymatic Activity Contributes to Modified Low-Density Lipoprotein-Induced Proinflammatory Signaling and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(2), 324-334. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310455>
63. Wärnberg, J., Gomez-Martinez, S., Romeo, J., Díaz, L.-E., & Marcos, A. (2009). Nutrition, inflammation, and cognitive function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 164-175. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03985.x>
64. Watahiki, A., Shimizu, K., Hoshikawa, S., Chiba, M., Kitamura, H., Egusa, H., Fukumoto, S., & Inuzuka, H. (2020). Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(2), 477-483. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.119>

65. Wei, W., Zhang, Y., Song, Q., Zhang, Q., Zhang, X., Liu, X., Wu, Z., Xu, X., Xu, Y., Yan, Y., Zhao, C., & Yang, J. (2022). Transmissible ER stress between macrophages and tumor cells configures tumor microenvironment. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 79(8), 403. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04413-z>
66. Welcome, F. S., Elizaire, T. C. M., & Airola, M. V. (2025). Lipin phosphatidic acid phosphatases: Structure, function, regulation, and disease association. *Advances in Biological Regulation*, 96, 101082. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2025.101082>
67. Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T.-H., Brickey, W. J., & Ting, J. P.-Y. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunology*, 12(5), 408-415. <https://doi.org/10.1038/ni.2022>
68. Wolins, N. E., DeHaan, K. N., Cifarelli, V., & Stoeckman, A. K. (2018). Normalized neutral lipid quantitation by flow cytometry. *Journal of Lipid Research*, 59(7), 1294-1300. <https://doi.org/10.1194/jlr.D084871>
69. Yan, J., & Horng, T. (2020). Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions. *Trends in Cell Biology*, 30(12), 979-989. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.006>
70. Yao, S., Miao, C., Tian, H., Sang, H., Yang, N., Jiao, P., Han, J., Zong, C., & Qin, S. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Macrophage-derived Foam Cell Formation by Up-regulating Cluster of Differentiation 36 (CD36) Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 4032-4042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.524512>
71. Yoon, H., Shaw, J. L., Haigis, M. C., & Greka, A. (2021). Lipid metabolism in sickness and in health: Emerging regulators of lipotoxicity. *Molecular cell*, 81(18), 3708-3730. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.027>
72. Yu, Z., & Muehleman, V. (2023). Eating Disorders and Metabolic Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 2446. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032446>
73. Yuan, S., She, D., Jiang, S., Deng, N., Peng, J., & Ma, L. (2024). Endoplasmic reticulum stress and therapeutic strategies in metabolic, neurodegenerative diseases and cancer. *Molecular Medicine*, 30(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s10020-024-00808-9>
74. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877, 173090. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
75. Zadoorian, A., Du, X., & Yang, H. (2023). Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00845-0>
76. Zhang, P., & Reue, K. (2017). Lipin proteins and glycerolipid metabolism: Roles at the ER membrane and beyond. *Biochimica et biophysica acta*, 1859(9 Pt B), 1583-1595. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.007>
77. Zhu, M., Cheng, Y., Zuo, L., Bin, B., Shen, H., Meng, T., Wu, Z., Rao, P., Tang, Y., Li, S., Xu, H., Sun, G., Wang, H., Zhang, G., & Liu, J. (2024). siRNA-loaded folic acid-modified TPGS alleviate MASH via targeting ER stress sensor XBP1 and reprogramming macrophages. *International Journal of Biological Sciences*, 20(10), 3823-3841. <https://doi.org/10.7150/ijbs.96113>
78. Zhu, Y., Wan, F., Liu, J., Jia, Z., & Song, T. (2024). The Critical Role of Lipid Metabolism in Health and Diseases. *Nutrients*, 16(24), 4414. <https://doi.org/10.3390/nu16244414>