



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Síntesis de novo de glicerolípidos en
macrófagos***

Tesista: Lic. Quiroga, Ivana Yoseli

Directora: Dra. GONZALEZ BARÓ, María del Rosario

Codirectora: Dra. Pellon Maison, Magalí

Año 2016

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María del Rosario Gonzalez Baró y la co-dirección de la Dra. Magali Pellon Maison.

Mi reconocimiento

A las autoridades del INIBIOLP, el Dr. Horacio Garda y la Dra. Margarita García, por haberme abierto las puertas del Instituto,

A la Cátedra de Anatomía B y al Dr. Julio Hijano por brindarnos amablemente un espacio para poder trabajar con comodidad.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por otorgarme la beca de iniciación de doctorado y al CONICET, por haberme otorgado la beca de finalización de doctorado que me permitieron realizar este trabajo de Tesis Doctoral y por el apoyo que otorgaron a nuestro grupo de investigación,

A BECAR, por otorgarme la beca de estadías en Estados Unidos para estudiantes de Doctorado que me permitió realizar una buena parte de los experimentos que componen esta tesis.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Médicas que me permitieron inscribirme y realizar mi trabajo para optar por el título de Doctor.

Mi agradecimiento

A mi directora de tesis, la Dra. María Gonzalez Baró (“Marita”), por haberme aceptado en su grupo de investigación, por todo lo que me enseñó durante estos años, por todos sus consejos y su guía y por haberme permitido desarrollar una relación que trasciende lo laboral caracterizada por la empatía y el respeto mutuo.

A mi co-directora de tesis, la Dra. Magali Pellon Maison, por su gran ayuda dentro y fuera del trabajo durante todos estos años, su excelente predisposición al trabajo, la discusión enriquecedora de resultados y su constante guía fundamental para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Dr. Mauro Montanaro, por sus consejos acerca de “la vida científica”, su constante predisposición para resolver cuestiones relacionadas al buen funcionamiento del grupo, y por su “buena onda” que más de una vez fue responsable de robarnos una sonrisa en momentos de tensión y estrés.

A la Dra. Rosalind Coleman, por haberme permitido realizar una estadía de investigación en su laboratorio de la Universidad de Carolina del Norte, por proveerme de todo lo necesario para realizar mi trabajo, y sobre todo por sus generosos y enriquecedores consejos y guía durante ese periodo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Eli, Bel, Marian, Sole, Carli, Guille, Debo y Santi quienes crearon en el laboratorio un ambiente de amistad y cooperación constante que trascendió el lugar de trabajo. Gracias por todos sus consejos y por su alegría.

A mis compañeros del laboratorio de la Universidad de Carolina del Norte, Pam, Amanda, Zegning, Liyang, Flor y Eric, por su compañerismo, su predisposición para ayudar y por hacer de mi estadía en el exterior una experiencia maravillosa tanto en lo laboral como en lo personal.

A todo el personal del INIBIOLP, sobre todo a Horacio Garda, su director, Marina y Silvana, por siempre estar dispuestos a colaborar.

A mi familia por siempre alentarme a perseguir mis sueños y apoyarme en cada paso, desde cerca o a la distancia.

A mis amigos, son muchos para nombrarlos, gracias por hacer que todos estos años de esfuerzo sean más lindos, gracias por escucharme en los momentos difíciles y festejar cada logro junto a mí.

A Federico, por apoyarme y alentarme a crecer en todo momento, por dejarme ser parte de su vida y ser mi conexión a tierra, por sus abrazos, su contención y su compañía invaluable.

A Dios, por ser mi apoyo y fortaleza incondicional en todo tiempo, por darme la oportunidad de haber llegado a cumplir este sueño y de seguir soñando aún más.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS UTILIZADAS:	1
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Inmunometabolismo.....	5
Macrófagos: Tipos y funciones	5
Polarización de macrófagos	6
Activación clásica de macrófagos en el contexto del proceso infeccioso.....	7
Rol de los macrófagos en la formación de la placa aterogénica: transición de macrófago a célula espumosa	9
Metabolismo de lípidos durante la activación de macrófagos y su transición a células espumosas.....	11
Vía de síntesis de novo de glicerolípidos	11
Glicerol-3-fosfato acil transferasa (GPAT)	13
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS:	16
1. MODELOS EXPERIMENTALES.....	16
1.1. Cultivos celulares	16
1.2. Animales: <i>Mus musculus</i>	17
1.3. Obtención de macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón (BMDM)...	17
2. ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS MEDIANTE EL USO DE KLA ₂ -LÍPIDO A	18
3. DIFERENCIACION MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA MEDIANTE EL USO DE LDL OXIDADAS	18
4. DIFERENCIACION DE MONOCITOS A MACRÓFAGOS MEDIANTE EL USO DE ESTERES DE FORBOL (PMA)	18
5. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON DNA.....	18
5.1. Cepa utilizada de bacterias.	19
5.2. Medios de cultivos utilizados para bacterias.	19
5.3. Preparación de bacterias competentes.	19
5.4. Transformación de bacterias con DNA plasmídico.....	19
5.5. Obtención de plásmidos a pequeña escala (miniprep).....	20
5.6. Obtención de plásmidos a gran escala (maxiprep).....	20
5.7. Cuantificación de DNA.	20
5.8. Digestión con enzimas de restricción.	21
5.9. Electroforesis en geles de agarosa.	21

5.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
5.11. Transfección de células eucariotas.	21
6. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON RNA.	22
6.1. Obtención de RNA.....	22
6.2. Cuantificación de RNA.	22
6.3. Evaluación de la calidad de RNA.	23
6.4. Obtención de DNA complementario (cDNA).	23
6.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).	23
7. SILENCIAMIENTO DE Gpat3 MEDIANTE shRNA.	26
7.1. shRNA utilizados.	26
7.2. Generación de partículas lentivirales.....	27
7.3. Transducción de células RAW 264.7 con vectores lentivirales	28
8. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON PROTEÍNAS.....	29
8.1. Obtención de homogenatos totales de células.....	29
8.2. Cuantificación de proteínas.	29
8.3. Medición de actividad enzimática de la glicerol-3-fosfato acil transferasa (GPAT)....	30
9. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON LÍPIDOS	30
9.1. Tinción de gotas de lípido mediante la técnica de Oil Red O.	30
9.2. Extracción de lípidos mediante la técnica de Bligh y Dyer.	31
9.3. Separación de lípidos por cromatografía de capa delgada (TLC).	31
9.4. Cuantificación de triglicéridos (TAG) totales.....	31
9.5. Cuantificación de PL totales.	31
9.6. Ensayos de incorporación de [¹⁴ C]-acetato y [¹⁴ C]- ácido oleico ([¹⁴ C]-OA) en lípidos.	32
10. ENSAYOS FUNCIONALES	32
10.1. Ensayos de Fagocitosis.....	32
10.2. Medición de la liberación de citoquinas mediante método Luminex.	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	33
SECCIÓN 1: ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS Y SU FUNCIÓN DURANTE LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS.....	33
1.1. SÍNTESIS DE NOVO DE GLICEROLÍPIDOS DURANTE LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS.....	33
1.1.1. La activación de células RAW 264.7 con KLA produce la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL.....	33
1.1.2. La activación de células RAW 264.7 con KLA produce un aumento en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos.....	34

1.1.3. Durante la activación de células RAW 264.7 con KLA aumenta la expresión de las isoformas <i>Gpat3</i> y <i>Gpat4</i> mientras que disminuye la expresión de la isoforma <i>Gpat1</i>	35
1.1.4. La expresión de <i>GPAT3</i> y <i>GPAT4</i> aumenta durante la transición de monocitos THP1 a macrófagos luego del tratamiento con ésteres de forbol.	37
1.1.5. La actividad GPAT aumenta tras la activación de células RAW 264.7 con KLA.	38
1.1.6. La activación de macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón produce la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL.	39
1.1.7. La activación de BMDM con KLA produce un incremento en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos.....	40
1.1.8. La actividad GPAT3/4 aumenta tras la activación de BMDM con KLA pese a la disminución de la expresión del mRNA.	41
1.2. ROL DE GPAT3 Y GPAT4 EN EL METABOLISMO DE GLICEROLÍPIDOS Y SUS CONSECUENCIAS FUNCIONALES DURANTE LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS.	44
1.2.1. El silenciamiento de <i>Gpat3</i> en células RAW 264.7 provoca una disminución en la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL.	44
1.2.2. El silenciamiento de <i>Gpat3</i> produce una disminución en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos en células RAW 264.7 activadas.....	45
1.2.3. Los BMDM <i>Gpat3^{-/-}</i> y <i>Gpat4^{-/-}</i> poseen una menor actividad GPAT NEM-sensible y acumulan menos gotas de lípido, TAG y PL luego de su activación.....	47
1.2.4. La ausencia de GPAT3 o GPAT4 produce una disminución en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos en BMDM activados.....	50
1.2.5. El silenciamiento o la ausencia de <i>Gpat3</i> o <i>Gpat4</i> en células RAW 264.7 y/o BMDM afectan la capacidad fagocítica luego de la activación con KLA.	52
1.2.6. La ausencia de <i>Gpat3</i> o <i>Gpat4</i> en BMDM afecta la expresión y liberación de citoquinas y quimioquinas al medio.	55
Conclusiones parciales:	58
SECCIÓN 2: ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS Y SU FUNCIÓN DURANTE LA TRANSICIÓN MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA.	59
2.1. SÍNTESIS DE NOVO DE GLICEROLÍPIDOS DURANTE LA TRANSICIÓN MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA.....	59
2.1.1. La incubación de células RAW 264.7 con oxLDL produce su transición a célula espumosa.	59
2.1.2. El tratamiento de células RAW 264.7 con oxLDL produce un aumento en la síntesis de novo de TAG.....	61
2.1.3. Durante la transición célula RAW 264.7- célula espumosa aumenta la expresión de <i>Gpat3</i> y la actividad GPAT.....	62
2.1.5. La incubación de BMDM con oxLDL produce su transición a célula espumosa.	63
2.1.6. La expresión de <i>Gpat3</i> aumenta durante la transición BMDM- célula espumosa.	

.....	64
2.2. ROL DE GPAT3 Y GPAT4 EN EL METABOLISMO DE GLICEROLÍPIDOS Y SUS CONSECUENCIAS DURANTE LA TRANSICIÓN MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA.	65
2.2.1. El silenciamiento de <i>Gpat3</i> en células RAW 264.7 atenúa la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL tras su transición a célula espumosa.	65
2.2.2. El silenciamiento de <i>Gpat3</i> provoca una disminución en la síntesis de novo de TAG durante la transición células RAW 264.7- célula espumosa.	66
2.2.3. Los BMDM <i>Gpat3</i> ^{-/-} y <i>Gpat4</i> ^{-/-} acumulan menos gotas de lípido, TAG y PL luego de su transición a célula espumosa.	69
2.2.4. La ausencia de <i>Gpat4</i> en BMDM afecta la liberación de citoquinas y quimioquinas al medio durante su transición a célula espumosa.	70
Conclusiones parciales:.....	72
CONCLUSIÓN.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

AA: ácido araquidónico

acLDL: lipoproteína de baja densidad acetilada

ACSL: acil-CoA sintetasa para ácidos grasos de cadena larga

AGPAT: ácido lisofosfatídico aciltransferasa

BMDM: macrófagos derivados de médula ósea

CE: ésteres de colesterol

Cho: colesterol

CPT1: carnitina aciltransferasa 1

DGAT: acilCoA:diacilglicerol aciltransferasa

FA: ácidos grasos

FAS: ácido graso sintasa

FFA: ácidos grasos libres

G3P: glicerol-3-fosfato

GK: glicerol quinasa

GPAT: glicerol-3-fostato aciltransferasa

IL-10: Interleuquina 10

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

IL-6: Interleuquina 6

iNOS: óxido nítrico sintasa

KLA: kdo₂-Lípido A (2-keto-3-deoxyoctonic acid lípid A)

KO: knock-out (referido al ratón deficiente en un gen)

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPA: ácido lisofosfatídico

LPS: lipopolisacárido

MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MCP-1 o CCL2: proteína quimioatrayente de monocitos

M-CSF: macrophage colony stimulation factor (factor de estimulación de formación de colonias de macrófagos)

MyD88: factor de diferenciación mieloide 88

NEM: *N*-etil maleimida

NF- κ B: factor nuclear κ B

OA: ácido oleico

oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada

PA: ácido fosfatídico

PAMPs: patrones moleculares asociados con patógenos

PAP: fosfatidato fosfohidrolasa

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PI: fosfatidilinositol

PL: fosfolípidos

PMA: 12-miristato, 13-acetato de forbol

PS: fosfatidilserina

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RRP: receptores de reconocimiento de patrones

TAG: triacilgliceroles

Th1: linfocito T helper 1

Th2: linfocito T helper 2

TIR: receptor Toll-interleuquina 1

TLC: thin layer chromatography (cromatografía en capa delgada)

TLR: toll like receptor (receptor tipo Toll)

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TRIF: proteína contenedora de dominios TIR que activa interferón- β

RESUMEN

Los macrófagos son células involucradas en la inmunidad innata y el mantenimiento de la homeostasis tisular. Tanto durante la activación de macrófagos por la exposición a patógenos como en la transición macrófago-célula espumosa en el contexto de la formación de la placa aterogénica se produce un aumento en la cantidad de gotas de lípido intracelulares. Los mecanismos por los cuales se acumulan estos lípidos y la relevancia que éstos poseen para la funcionalidad del macrófago no se conocen por completo. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue determinar la contribución de la síntesis de novo de glicerolípidos a la acumulación de gotas de lípido durante procesos de transición de macrófagos y en particular, evaluar el rol que cumple la enzima limitante de este proceso, la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT). Se demostró que la inducción de la síntesis de novo de glicerolípidos (triacilgliceroles y fosfolípidos) contribuye al aumento en la masa de lípidos en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 y en macrófagos primarios derivados de médula ósea tratados con KLA (componente activo del LPS bacteriano) o con LDL oxidadas. Particularmente se comprobó que hay un incremento en la actividad GPAT correspondiente a las isoformas que se expresan en retículo endoplásmico GPAT3 y GPAT4. Mediante la utilización de modelos de silenciamiento de estas dos isoformas se demostró que ambas contribuyen a la activación de la síntesis de glicerolípidos observada. En cuanto a la relevancia funcional de estos lípidos, se comprobó que se requiere de la movilización de glicerolípidos mediante la actividad de lipasas para que se produzca el proceso de fagocitosis en forma eficiente. Estos lípidos liberados contribuyen no sólo energéticamente proveyendo de ácidos grasos para la β -oxidación, sino que también son requeridos presumiblemente para la producción de señales que inicien el proceso. La ausencia de GPAT3 o GPAT4 disminuye la eficiencia de la fagocitosis y en particular la carencia de GPAT4 exacerba la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, sugiriendo para esta isoforma un rol en la atenuación de las señales inflamatorias lo que la posiciona como un potencial blanco terapéutico.

INTRODUCCIÓN

Inmunometabolismo

Durante los últimos años el campo de la inmunología ha empezado a interesarse en un nuevo aspecto del sistema inmune: el “metabolismo del sistema inmune o “inmunometabolismo”. Esta rama emergente del saber busca dilucidar nuevos conocimientos acerca de dos aspectos principales: el primero se centra en el estudio del efecto de las células inmunes en órganos que regulan el metabolismo del organismo completo, como en el caso del rol de los macrófagos en el tejido adiposo de personas obesas, el exceso en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y el desarrollo de la resistencia a insulina (Romeo, et al., 2012; Johnson and Olefsky, 2013), y el segundo explora el rol de las distintas vías metabólicas dentro de las células del sistema inmune y cómo éstas regulan la respuesta inmunológica (Pearce, et al., 2013). En lo referente a este último aspecto, existe un gran interés en dilucidar cómo y por qué las células inmunes activan o desactivan ciertas vías metabólicas, cómo éstas se interrelacionan y de qué forma aportan metabolitos intermedios que funcionan activando o inhibiendo las vías de señalización que terminan por regular la respuesta biológica de cada una de ellas. La ampliación de estos estudios resulta fundamental, ya que el conocer las enzimas que regulan vías metabólicas clave en la capacidad de cada célula para efectuar su respuesta inmune, permite individualizar blancos terapéuticos contra los cuales desarrollar fármacos capaces de lograr una moderación, apagado o aumento en la intensidad de esa respuesta de acuerdo a las necesidades de tratamiento en cada patología.

Macrófagos: Tipos y funciones

En los últimos años ha cobrado gran interés el estudio del inmunometabolismo de macrófagos. Los macrófagos son células hematopoyéticas derivadas de monocitos ampliamente distribuidas a lo largo del organismo que juegan un rol vital en el mismo. A pesar de que durante muchos años se ha considerado a los macrófagos como meros efectores del sistema inmune innato, estas células cumplen roles muy diversos. Como su nombre lo indica, los macrófagos son fagocitos muy eficientes que contribuyen no sólo a la defensa contra antígenos extraños en el contexto de la inmunidad innata, sino también al mantenimiento de la homeostasis del organismo a través de la eliminación de células apoptóticas, senescentes y dañadas generadas durante el recambio de tejidos, así como también de células cancerosas (Gordon and Taylor, 2005). Además, esta capacidad de fagocitar y eliminar células apoptóticas es utilizada por los macrófagos para cumplir un rol vital en el proceso de organogénesis y desarrollo embrionario concentrándose en sitios de alta tasa de muerte celular como las membranas interdigitales (Hopkinson-Woolley, et al., 1996). Esta función de remodelación de tejidos se mantiene en el adulto, donde los macrófagos son cruciales en procesos de regeneración luego de infecciones y lesiones (Koh and DiPietro, 2011).

Además de los monocitos circulantes con potencialidad de ser reclutados y diferenciarse en macrófagos en sitios de lesiones e infecciones, existen macrófagos residentes en múltiples órganos en donde cumplen diferentes funciones de acuerdo al microambiente en el cual se

encuentran (Gordon and Taylor, 2005). Ejemplos de ello son los macrófagos en el hígado (células Kupffer) que ayudan en la remoción de toxinas circulantes (Roberts, et al., 2007), los macrófagos alveolares, que en el pulmón se especializan en capturar y eliminar antígenos ambientales luego de su inhalación (McCusker and Hoidal, 1989), los osteoclastos, que resultan fundamentales en el proceso de remodelación del hueso (Hadjidakis and Androulakis, 2006), los múltiples tipos de macrófagos que residen en el intestino, en donde participan en el mantenimiento de la tolerancia hacia la flora bacteriana y los alimentos (Murray and Wynn, 2011), y las diferentes clases de macrófagos del sistema nervioso central, tales como la microglía y los macrófagos meningeales, cuyas funciones incluyen la presentación de antígenos y el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Hickey, 1999).

A pesar de que la captura de restos celulares sería la función principal de los macrófagos en condiciones normales, estas células son capaces de secretar un conjunto de mediadores solubles que también contribuyen al mantenimiento de la homeostasis, incluyendo enzimas, citoquinas, quimioquinas, derivados del ácido araquidónico (AA) y glicoproteínas como la fibronectina (Takemura and Werb, 1984).

Como miembros del sistema inmune innato, los macrófagos funcionan como centinelas en todos los tejidos, proveyendo una defensa inmediata contra antígenos extraños gracias a su ubicación estratégica cerca de las superficies epiteliales del organismo. De esta forma, la respuesta inmune innata a cargo de los macrófagos se inicia con el reconocimiento de estructuras moleculares muy conservadas y presentes en grandes grupos de microorganismos denominadas “patrones moleculares asociados con patógenos” (PAMP). La identificación de PAMPs es llevada a cabo por los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) presentes en la superficie del macrófago. Uno de los RRP más comunes es el TLR4, perteneciente a la familia de los TLR (Toll like receptors), receptores que identifican PAMPs presentes en bacterias y algunos virus. TLR4 junto con CD14 reconocen al lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, específicamente el componente activo del mismo, el Kdo₂-Lípido A (2-keto-3-deoxyoctonic acid lípid A, KLA) (Kielian and Blecha, 1995; Dobrovolskaia and Vogel, 2002; Raets, et al., 2006).

El reconocimiento de PAMPs permite que los macrófagos incorporen rápidamente a los microorganismos invasores y los encapsulen en un compartimiento fagocítico. Luego, este fagosoma se fusiona con el lisosoma, organela de pH muy ácido que promueve la degradación y eliminación de las partículas incorporadas. Por último, la capacidad de los macrófagos de adquirir antígenos y exponerlos a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase dos (MHC II), así como también la capacidad de producir citoquinas específicas, permite que estas células contribuyan al sistema inmune adaptativo al influenciar el comportamiento de linfocitos T.

Polarización de macrófagos

Los macrófagos son una población de células muy heterogénea en cuanto a su polarización fenotípica ya que pueden ser activados adquiriendo fenotipos y funciones muy diferentes de acuerdo a las condiciones presentes en su microambiente. Entre ellos encontramos por un lado a los macrófagos activados en forma clásica o pro-inflamatoria (M1) y por otro a aquellos que son activados en forma alternativa y que desarrollan un perfil anti-inflamatorio (M2). Cada uno de los extremos fenotípicos M1 y M2 está asociado a un patrón de expresión específico de receptores, citoquinas, quimioquinas y efectores proteicos marcadores

(Tabla 1). Los macrófagos activados de manera clásica son muy potentes en la eliminación de microorganismos y células tumorales mientras producen citoquinas pro-inflamatorias y activan respuestas inflamatorias mediadas por linfocitos T helper 1 (Th1). Los M2, por el contrario, balancean las respuestas inflamatorias actuando a través de la respuesta adaptativa de clase Th2. Además de estos extremos funcionales, en los últimos años se ha propuesto la existencia de una amplia variedad de estados intermedios dependiendo del contexto en el que estas células son activadas (Martínez, et al., 2008; Martínez and Gordon, 2014; Mosser and Edwards, 2008; Stout and Suttles, 2004 y Murray, et al., 2014).

Fenotipo	Macrófagos activados en forma clásica (M1) pro-inflamatorios	Macrófagos activados en forma alternativa (M2) anti-inflamatorios
Receptores implicados	TLR2, TLR4, FcγRI, II, III	Mrcl, SRA, SRB, CXCR1, CXCR2
Citoquinas	IL-1, 6, 8, 12, TNFα,	IL-4, IL-10, TGFβ,
Quimioquinas	MCP1 (Ccl-2), Ccl-3, 5	MCP2, Ccl-1
Efectores	ROS, iNOS	Arginasa

Tabla 1. Propiedades básicas de macrófagos polarizados (modificado de Martínez, et al., 2008; Mantovani, et al., 2003).

Activación clásica de macrófagos en el contexto del proceso infeccioso

El LPS es un inductor inflamatorio que activa macrófagos de forma clásica M1 y produce la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias tales como TNF-α, IL-1, IL-6 y MCP-1 (Figura1A). Específicamente, este ligando se une a receptores TLR4, lo cual induce su dimerización y subsiguiente unión tanto al factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) como a TRIF, proteína contenedora de dominios TIR (receptor Toll-interleuquina 1) que activa interferón-β. Estas vías señalizadoras terminan activando a proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y al factor nuclear κB (NF-κB), con la consecuente liberación de una variedad de moléculas pro-inflamatorias y la inducción de los interferones tipo 1 y todos los genes que son activados por ellos (Lu, et al., 2008) (Figura1B).

Luego de ser activados, los macrófagos salen de su estado quiescente, su metabolismo se vuelve más glucolítico e incrementan su capacidad fagocítica y la liberación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (ROS) para eliminar las partículas extrañas. Además, durante este proceso se altera el metabolismo de lípidos, lo cual resulta de gran interés debido a su relevancia en la inducción y resolución del proceso inflamatorio (Andreyev, et al., 2010). Por ejemplo, la activación tipo M1 por acción del LPS lleva a un incremento en la producción de moléculas señalizadoras derivadas de AA, incluyendo a leucotrienos y prostaglandinas implicados en el desarrollo del proceso inflamatorio (Greene, et al., 2011).

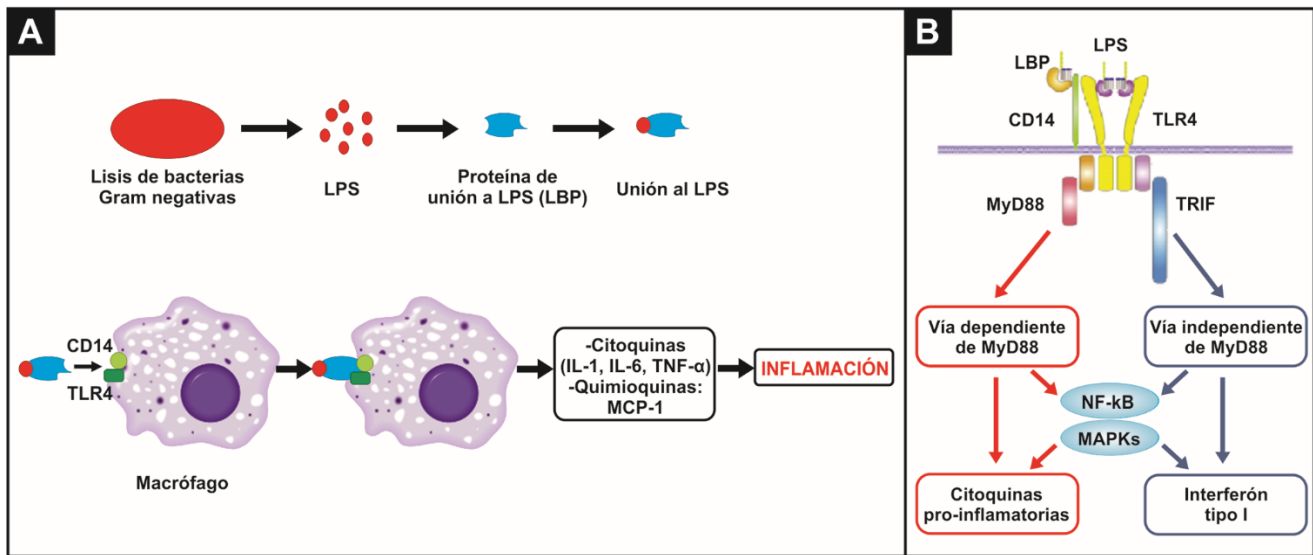


Figura 1. Activación clásica de macrófagos con LPS. Durante una infección bacteriana, el LPS que compone la membrana de las bacterias Gram-negativas se acopla a una proteína de unión a LPS (LBP). Este complejo es censado por los receptores CD14-TLR4, lo cual provoca la dimerización de los TLRs y su fusión a MyD88 y a TRIF, en las que se denominan vía MyD88 dependiente y MyD88 independiente. Estas vías implican la activación de NF- κ B y de las MAP quininas (MAPK). El efecto final de estas vías de señalización es la producción y liberación de proteínas pro-inflamatorias y la activación del Interferón tipo 1, lo cual lleva la activación clásica de macrófagos o M1 y al proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio no resuelto en forma correcta muchas veces resulta en daño tisular y por ello se lo considera blanco de múltiples terapias y ha cobrado especial interés en enfermedades vinculadas al desarrollo de un episodio inflamatorio exacerbado, como es el caso de la obesidad, la aterosclerosis, y diversas enfermedades autoinmunes (Flavell, 2002; Reed, 1999). Esto se produce, entre otras cosas, debido a que las especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico producido por macrófagos activados en forma clásica son altamente tóxicos para microorganismos invasores, pero también pueden ser dañinos para los tejidos que rodean la zona de infección, llevando al desarrollo de procesos inflamatorios aberrantes y/o crónicos (Serbina, et al., 2008). Es por ello que las respuestas pro-inflamatorias y antimicrobianas desarrolladas por macrófagos M1 deben ser controladas para prevenir el daño colateral de los órganos involucrados. En la regulación y atenuación de estas respuestas pro-inflamatorias los macrófagos M2 cumplen un rol fundamental, ya que poseen un potente efecto anti-inflamatorio y contribuyen a la regeneración de tejidos. Así, el balance entre las poblaciones de ambos tipos de macrófagos resulta fundamental para mantener la homeostasis de los tejidos, y una alteración en este balance es un patrón que se observa en forma reiterada en múltiples patologías que involucran un proceso inflamatorio exacerbado (Murray and Wynn, 2011). En el tejido adiposo, por ejemplo, los macrófagos M2 mantienen la funcionalidad de los adipocitos, la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, lo cual puede prevenir el desarrollo de obesidad inducida por la dieta y diabetes tipo II (Lumeng, et al., 2007; Odegaard, et al., 2007). Sin embargo, se ha reportado que a medida que la obesidad progresa, los macrófagos de tipo M2 sufren una transformación hacia un fenotipo pro-inflamatorio M1, lo cual termina por inducir resistencia a la insulina (Vandanmagsar, et al., 2011; Chawla, et al., 2011). Respecto a otras patologías, también se han identificado a las citoquinas TNF, IL-18, IL-12 e IL-23 derivadas de macrófagos M1 como importantes mediadores de varias enfermedades autoinmunes e infecciones crónicas incluyendo la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoidea, la esclerosis

múltiple y la hepatitis autoinmune (Murphy, et al., 2009; Smith, et al., 2009; Kawane, et al., 2006).

Rol de los macrófagos en la formación de la placa aterogénica: transición de macrófago a célula espumosa

La aterosclerosis es una patología caracterizada por la acumulación de material graso en las paredes de las arterias, seguido por un progresivo deterioro y reducción del flujo sanguíneo debido a un exacerbado proceso inflamatorio que muchas veces puede resultar en la formación de un trombo y la oclusión del vaso (Ross, 1999; Lusis, 2000). Hasta el momento, las principales aproximaciones terapéuticas destinadas a reducir la predisposición a sufrir aterosclerosis se basan en la corrección del exceso de lipoproteínas tales como las LDL (lipoproteínas de baja densidad) ricas en ésteres de colesterol (CE) y con un contenido menor de triacilgliceroles (TAG) mediante el uso de fibratos, agonistas de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR) α , y estatinas, inhibidores de la enzima reguladora de la síntesis endógena de colesterol (Cho) (Glass and Witztum, 2001). Sin embargo, los avances en la comprensión de las vías metabólicas y de los procesos celulares implicados en la aterogénesis impulsan al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Una de estas estrategias se basa en la manipulación de los procesos metabólicos que tienen lugar en las propias células que formarán la placa de ateroma, entre las cuales destacan los monocitos y los macrófagos. Estas células desempeñan un papel fundamental en todas las fases del desarrollo de la aterosclerosis, por lo cual constituyen dianas terapéuticas idóneas para una acción anti-aterogénica.

Durante el proceso de desarrollo de la placa aterogénica los monocitos son reclutados al sitio de la lesión, luego se adhieren al endotelio, y por un proceso de transvasación migran hacia la capa íntima (Figura 2). En este lugar, los monocitos se diferencian en macrófagos cuando censan la presencia del factor de estimulación de formación de colonias de macrófagos (M-CSF), una citoquina formada en la placa íntima del vaso dañado (Hansson, 2005). Al sufrir este proceso de diferenciación, los macrófagos incrementan el nivel de expresión de receptores TLRs y de tipo “scavenger” o “basurero” como los SR-A y CD-36 que internalizan lipoproteínas modificadas, tales como LDLs acetiladas (acLDL) u oxidadas (oxLDL). La captación de estas partículas induce la transición de macrófago a célula espumosa (Kunjathoor, et al., 2002). Estas células reciben ese nombre debido a su fenotipo caracterizado por la acumulación de múltiples gotas de lípido, organelas dinámicas rodeadas por una monocapa de fosfolípidos (PL) que acumulan lípidos neutros, mayoritariamente CE provenientes de las LDL modificadas y también TAG (Guo, et al., 2009). Además del rol de los receptores basurero en este proceso, los TLR del macrófago desempeñan un papel relevante en la respuesta inmune que caracteriza el proceso aterosclerótico, ya que están implicados en la activación de la respuesta inflamatoria en estas células (Tobias and Curtiss, 2005). En las lesiones arteroscleróticas se han identificado distintas poblaciones de macrófagos, M1, M2 y de fenotipos intermedios. Al parecer, en esta patología al igual que en otras, el equilibrio entre la cantidad de macrófagos de cada tipo y las citoquinas que cada uno libera es fundamental para la formación de la placa (McLaren, et al., 2011). Se han caracterizado citoquinas que funcionan como estimuladoras de la formación de la célula espumosa, como INF- γ , IL-1 β y TNF- α (McLaren and Ramji, 2009; Li, et al., 2010; Panousis and Zuckerman, 2000; Hsu and Twu, 2000; Persson, et al., 2008; Lei, et al. 2009; Devlin, et al., 2002) así como también otras que actúan inhibiendo este proceso: TGF- β e IL-10

(Mallat, et al., 1999; Pinderski, et al., 2002; Rubic, et al., 2006; Han, et al., 2010) mientras que el rol de otras citoquinas como la IL-6 es controversial (Liao, et al., 1999; Huber, et al., 1999; Keidar, et al., 2001). Se conoce además, que en lesiones aterogénicas tempranas, los macrófagos fagocitan células apoptóticas en forma eficiente y secretan citoquinas anti-inflamatorias de forma tal que previenen la ocurrencia de necrosis secundaria (induciendo más apoptosis temprana) y disminuyendo la progresión de la placa. Por el contrario, en situaciones de aterosclerosis avanzada los macrófagos sufren apoptosis tardía o necrosis y la fagocitosis de células apoptóticas no ocurre adecuadamente. En esta situación la resolución en el marco inflamatorio falla y la concentración de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , y TNF- α aumentan. Entre otras consecuencias, estas citoquinas provocan la inducción de metaloproteinasas vía la cascada de señalización NF- κ B que favorece la degradación de la matriz vascular con la consiguiente formación de una placa necrótica inestable y su ruptura (Glass and Witztum, 2001; Gargiulo, et al. 2015).

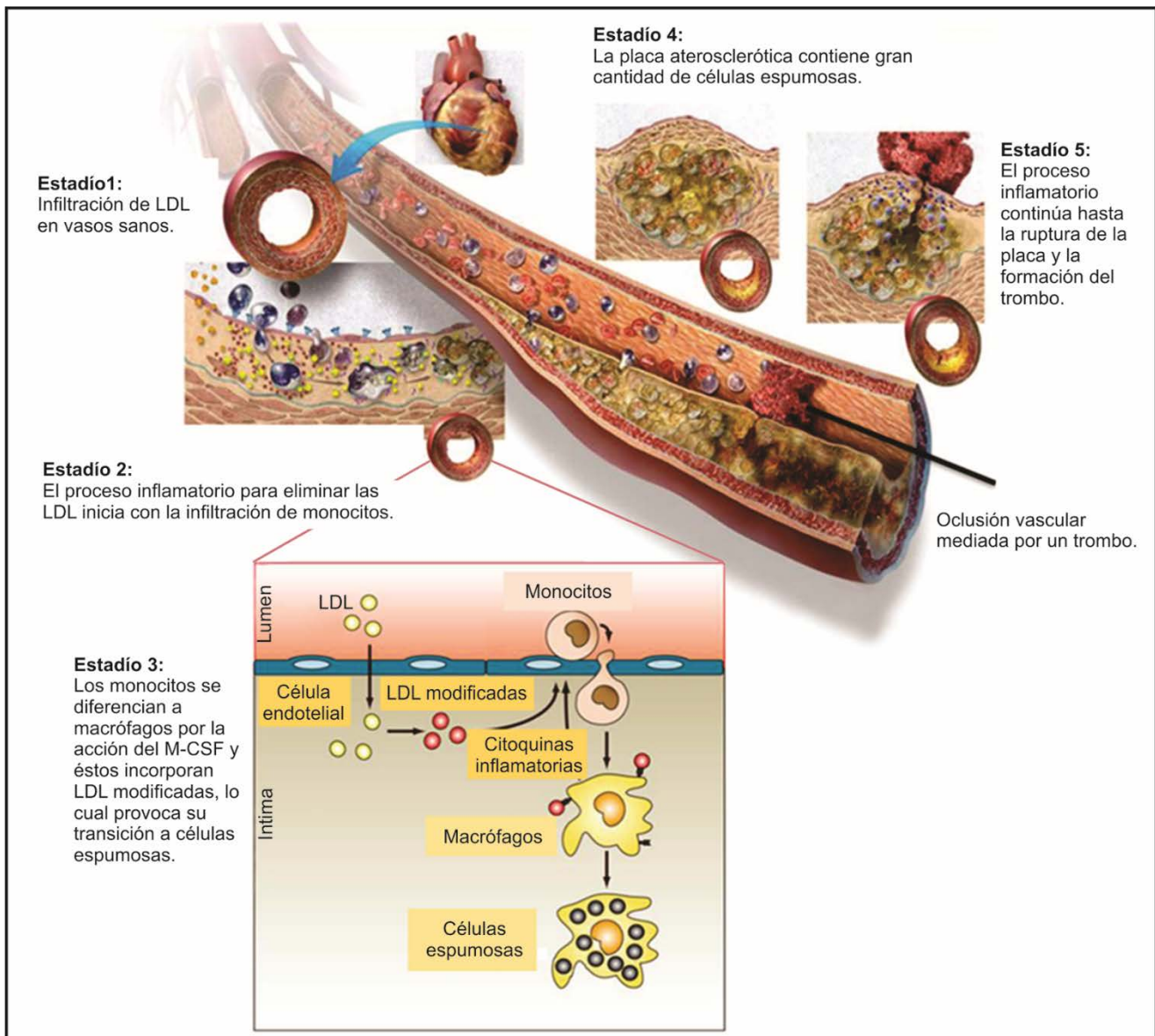


Figura 2. Progresión de la placa aterogénica. La placa aterogénica se inicia con la acumulación de LDLs en los vasos sanos,

y la subsiguiente infiltración de monocitos. Luego estos monocitos se diferencian a macrófagos estimulados por el factor de diferenciación de colonias de macrófagos (M-CSF). Por último, estos macrófagos incorporan lipoproteínas modificadas y sufren una transición a célula espumosa. La placa progresa en el estado inflamatorio hasta su ruptura y formación del coágulo que en casos graves llega a provocar una trombosis. Figura modificada de Libby, 2002.

Metabolismo de lípidos durante la activación de macrófagos y su transición a células espumosas

Tanto en la respuesta inflamatoria inducida por la infección, como en la transición macrófago-célula espumosa, el metabolismo de lípidos desempeña roles fundamentales en la funcionalidad del macrófago. En ambos procesos, se acumulan gotas de lípido intracelulares. En el caso de macrófagos activados con LPS, las gotas lipídicas están compuestas mayoritariamente por TAG (Beutler, 2003; Fung, et al., 1993; Dennis, et al., 2010), mientras que la célula espumosa formada en el contexto de la placa aterogénica contiene mayoritariamente CE provenientes de las oxLDLs. Además, durante esta transición, se reportó la existencia de un aumento en la masa de TAG, pero su función en estas células es aún objeto de estudio (Guo, et al., 2009). Concomitantemente con el incremento en la cantidad de lípidos neutros, durante la formación de la célula espumosa y su activación mediada por LPS se ha descrito también un aumento en la síntesis de PL, mayormente de fosfatidilcolina (PC) (Tabas, 2000; Dennis, et al., 2010).

Durante muchos años se consideraron a las gotas de lípido como simples depósitos de reserva de lípidos neutros, sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la biogénesis de estas organelas es un proceso altamente regulado que termina por producir un reclutamiento de proteínas y lípidos específicos con roles en la señalización celular, la activación y la regulación del metabolismo de lípidos, el tráfico de membranas y el control de la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios como citoquinas y eicosanoides (Fung, et al., 1993; S., Devlin and Haskill, 1989; Silva, et al., 2009, Bozza, et al., 2009). En particular, se ha propuesto que la liberación de ciertas citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α requieren de la síntesis de PC, puesto que este PL resulta fundamental para la correcta remodelación de membranas del aparato de Golgi que media la formación de vesículas de liberación de dichas moléculas señal (Tian, et al., 2008). También se ha relacionado la cantidad de TAG acumulados en gotas de lípido con el desencadenamiento de apoptosis de macrófagos (Aflaki, et al., 2011) y el rol fundamental de la familia de fosfolipasas A2 en la formación y mantenimiento de la homeostasis de gotas de lípido de macrófagos (Guijas, et al., 2014). Por último, se ha planteado también que se requiere de una cierta cantidad de TAG para permitir la formación de gotas de lípido típicamente mixtas (compuestas por TAG y CE), y que una disminución en la cantidad de TAG provoca un acomodamiento estructural atípico de los CE (Lada, et al., 2002). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se requieren de más estudios tendientes a dilucidar los mecanismos que llevan a esta acumulación de glicerolípidos (TAG y PL) en gotas de lípido de macrófagos, y la influencia que éstos tienen en distintos aspectos de su fisiología y funcionalidad.

Vía de síntesis de novo de glicerolípidos

El estudio de las enzimas implicadas en la síntesis de TAG y PL en un contexto inmunológico podría no sólo develar nuevas vías de conexión entre inmunidad y metabolismo, sino permitir también el desarrollo de nuevas estrategias en el control de los procesos

inflamatorios y, especialmente, de aquellos que tienen lugar durante la obesidad y otros procesos patológicos complejos de origen multigénico.

La síntesis de novo de glicerolípidos a partir de *sn*-glicerol-3-fosfato (G3P) fue descrita en los años 50 por el laboratorio de Eugene Kennedy (Kennedy and Weiss, 1956; Borkenhagen and Kennedy, 1957; Kennedy, 1961) (Figura 3A). La vía comienza utilizando como sustrato ácidos grasos (FA) sintetizados por la ácido graso sintasa (FASN, por sus siglas en inglés) y activados mediante la unión a la coenzima A por acción las acilCoA sintetisas de cadena larga (ACSL). En el primer y segundo paso, el G3P se esterifica secuencialmente con estos acilCoAs en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de la molécula, dando como productos el ácido lisofosfatídico (LPA) y el ácido fosfatídico (PA). Estas reacciones de acilación están catalizadas por las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y acilglicerolfosfato aciltransferasa (AGPAT) respectivamente. La principal fuente de G3P que alimenta esta vía metabólica proviene del catabolismo de la glucosa, aunque también en menor medida contribuye la fosforilación directa del glicerol mediante la glicerol quinasa (GK) (Christie, 2003). El grupo fosfato del PA, se hidroliza en una reacción catalizada por la enzima fosfatidato fosfohidrolasa (PAP) para dar 1,2-diacil-*sn*-glicerol (DAG), el cual se esterifica en la posición 3 dando TAG. Esta última reacción está catalizada por la enzima acilCoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Alternativamente, tanto a partir de PA como de DAG, pueden ser sintetizados distintos PL, entre ellos, fosfatidil colina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE). De todas las enzimas de la vía, la actividad GPAT es la que presenta una menor actividad específica y por lo tanto es considerada como la enzima limitante (Bell and Coleman, 1980). Además este paso es regulado recíprocamente con la beta oxidación de FA a través de modulación alostérica de la carnitina aciltransferasa 1 (CPT1).

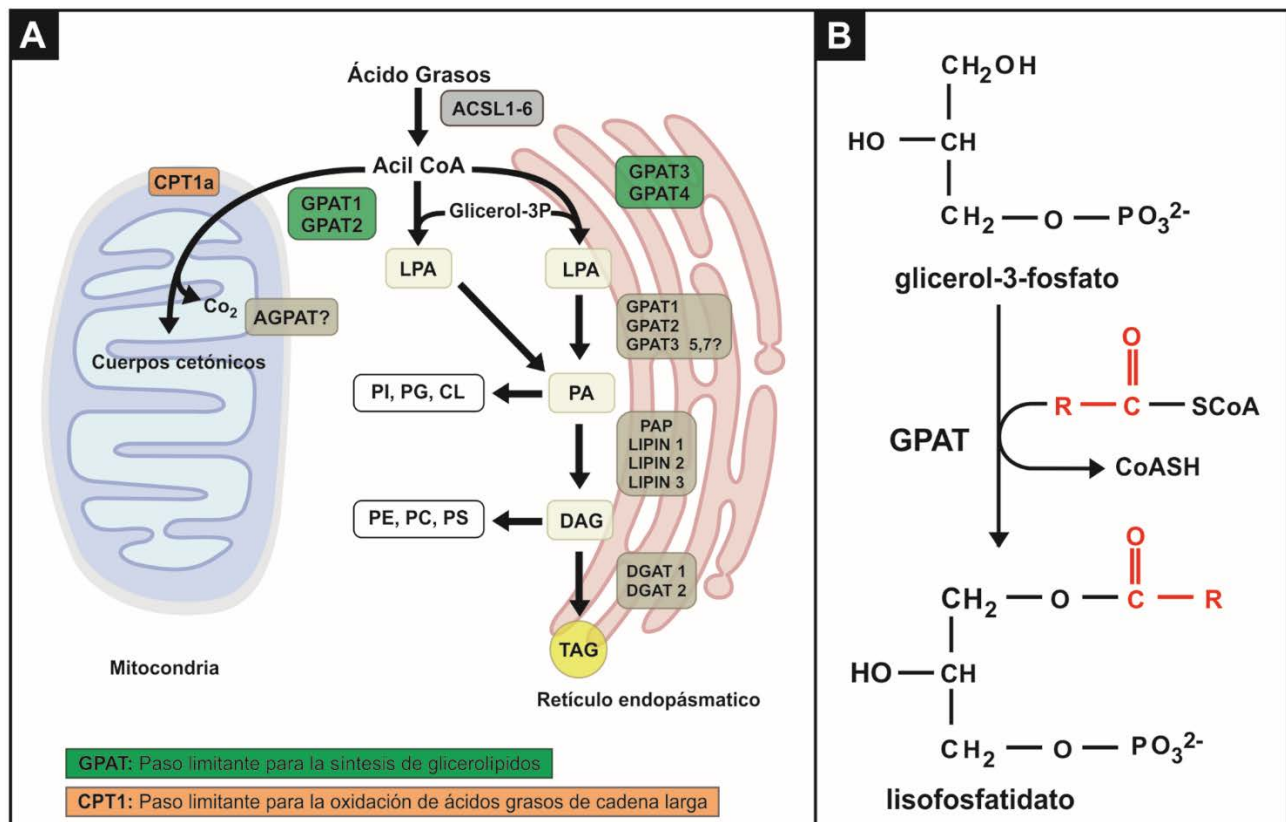


Figura 3. Vía de síntesis de novo de glicerolipidos. A) Los FA son primero activados mediante unión de una molécula de Co-A a través de la acción de las ASCLs 1-6, luego el primer acil-coA es esterificado en la posición 1 del glicerol-3-fostato por acción de las GPATs 1-4 dando LPA. La esterificación del segundo ácido graso en la posición 2 es catalizada por las AGPATs para producir PA. Luego de ello las PAP eliminan el grupo fosfato para formar DAG que es acilado en la tercera posición por las DGAT para producir TAG. La producción de PL en esta vía se da a partir del PA mayoritariamente, pero también a partir del DAG. La CPT1 compete por los acil-CoA con las GPATs para dirigirlos hacia la beta oxidación. **B)** Reacción catalizada por la GPAT.

Glicerol-3-fosfato acil transferasa (GPAT)

Hasta el momento se han descrito cuatro isoformas de GPAT en mamíferos (GPAT1-4) [EC 2.3.1.1]. Estas isoenzimas se diferencian por su ubicación subcelular y tisular, su sensibilidad a sustancias reactivas a grupos –SH como la *N*-etilmaleimida (NEM) y por su preferencia de sustrato (Wendel, et al., 2009). Se pueden resumir algunas de sus características en la siguiente tabla:

Isoforma	N° Genebank (<i>Mus musculus</i>)	Ubicación subcelular	Ubicación tisular	Sustrato de preferencia	Sensibilidad al NEM
GPAT1	NM_008149.3	Mitocondria	Hígado, Tejido Adiposo, Corazón	Palmitoil-CoA	Resistente
GPAT2	NM_001081089		Testículo	Araquidonil-CoA	
GPAT3	NM_172715.3	Retículo endoplásmico	Tejido Adiposo, Intestino Delgado, Riñón, Corazón	Sin preferencia	Sensible
GPAT4	NM_018743		Hígado, Tejido Adiposo, Testículo		

Tabla 2. Características de las 4 isoformas de GPAT.

La GPAT1, producto del gen *Gpam*, fue la primera isoforma en ser clonada a partir de tejidos de roedores (Paulauskis and Sul, 1988; Bhat, et al., 1999). Es una enzima mitocondrial cuya expresión se da en tejido adiposo, corazón y mayoritariamente en hígado, en donde cumple un rol fundamental en la síntesis de TAG (Wendel, et al., 2013).

GPAT2 se describió por primera vez en mitocondrias hepáticas en un modelo de ratón *Knock-out* (KO) para *Gpat1* (*Gpat1^{-/-}*) (Lewin, et al., 2004). Esta enzima es similar a GPAT1 tanto en su estructura, peso molecular y en su localización sub-celular en la membrana mitocondrial externa, pero su expresión se da casi en forma exclusiva en testículo en donde es relevante para el desarrollo espermático (García-Fabiani, et al., 2015). Asimismo, esta isoforma también se expresa en algunos tipos de tumores y se la ha relacionado con la progresión de los mismos (Pellon-Maison, et al., 2014).

La GPAT3, también llamada AGPAT9, fue la primer GPAT microsomal en ser clonada (Cao, et al., 2006), su expresión es alta en tejido adiposo, en donde representa el 80% de la actividad GPAT según lo descrito en un modelo de ratón KO (Cao, et al., 2014). Además, se expresa altamente en intestino delgado y cumple un rol relevante en la absorción de lípidos provenientes de la dieta (Khatun, et al., 2016). Por otro lado, también se ha descrito que GPAT3 se expresa en macrófagos y que su expresión aumenta 3 veces luego de que los

mismos son activados con LPS (Feingold, et al., 2012).

La GPAT4, inicialmente anotada como AGPAT6, es también una enzima microsomal, y se expresa, al igual que GPAT3, en tejidos lipogénicos tales como hígado y tejido adiposo y en testículo, en donde ha mostrado ser relevante para la síntesis de TAG (Vergnes, et al., 2006).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS: la síntesis de novo de glicerolípidos contribuye a la acumulación de estas moléculas en macrófagos activados en respuesta a la infección y durante su transformación patológica a célula espumosa; en estos procesos resulta crucial la actividad de alguna isoforma específica de la enzima que cataliza el paso limitante de esta vía, la GPAT. Además, se hipotetiza que éstos glicerolípidos cumplen un rol en distintos aspectos funcionales del macrófago, entre ellos, la producción de moléculas señal como citoquinas y quimioquinas y el proceso de fagocitosis.

Objetivo General:

- Estudiar la síntesis de novo de glicerolípidos en macrófagos durante procesos de transición tanto fisiológicos (activación por patógenos) como patológicos (formación de la célula espumosa) y evaluar el rol de esta vía metabólica en su funcionalidad.

Objetivos Específicos:

- 1) Determinar si la síntesis de novo de glicerolípidos se induce durante la activación de macrófagos y durante su transición a célula espumosa.
- 2) Evaluar el nivel de expresión y actividad de enzimas iniciales de la vía de síntesis de novo de glicerolípidos, principalmente de las 4 isoformas de GPAT durante la activación del macrófago y su transición a célula espumosa.
- 3) Analizar el rol de las diferentes isoformas de GPAT sobre la acumulación de gotas de lípido y la síntesis de novo de glicerolípidos durante la activación del macrófago y la formación de la célula espumosa.
- 4) Evaluar el rol que cumplen la síntesis de novo de glicerolípidos y las diferentes isoformas de GPAT en distintas funciones desempeñadas por el macrófago: su capacidad fagocítica y la liberación de citoquinas y quimioquinas durante su activación y transición a célula espumosa.

MATERIALES Y MÉTODOS:

1. MODELOS EXPERIMENTALES

1.1. Cultivos celulares

Para este trabajo, las diferentes líneas celulares utilizadas fueron obtenidas de ATCC y mantenidas en condiciones de temperatura (37 °C), humedad (98 %) y tensión de CO₂ (5 %) constantes. Para el mantenimiento de las líneas celulares, los medios fueron suplementados con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (de ahora en más denominados como medio “completo”). En el caso particular de la línea celular RAW 264.7, el medio DMEM de alta glucosa fue suplementado con 10% SFB libre de endotoxinas y Hepes (4g/l) y no se le adicionaron antibióticos. Las células fueron subcultivadas una vez por semana y mantenidas en placas de 100 mm. Para el subcultivo: se retiró el medio de cultivo, la monocapa de células se lavó con 5 ml de PBS tibio y luego se agregó 0,5 ml de tripsina 0,25% en EDTA 0,9 mM (Gibco). La acción de la tripsina se frenó con 5 ml de medio de cultivo completo tibio y las células se dispersaron por pipeteo. Un décimo del volumen se colocó en una placa de cultivo nueva y se completó con 10 ml de medio completo tibio. Sólo en el caso de la línea RAW 264.7 se las subcultivó utilizando *cell scrapers* (Greiner). Para ello, partiendo de placas de 100 mm, se levantó la monocapa raspándola suavemente con el *scraper*, para luego dispersar las células por pipeteo. Luego, un décimo del volumen se colocó en una placa nueva y se agregaron 10 ml de medio completo. Todo el material de cultivo fue esterilizado por autoclave o por filtración en el caso de los medios de cultivo. En la tabla 2 se detallan las líneas celulares utilizadas.

Nombre	Código en ATCC	Origen	Medio de cultivo
RAW 264.7	TIB-71	Línea monocítica de ratón (<i>Mus musculus</i>) obtenida a partir de tumor ascítico inducido por el virus de Abelson	DMEM
HEK 293T	CRL-3216	Línea celular derivada de HEK 293 que contiene el antígeno T del virus SV40, permitiendo replicar vectores que porten con el sitio de replicación del SV40	DMEM

THP1	TIB-202	Línea de monocitos humanos	RPMI
------	---------	----------------------------	------

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas.

1.2. Animales: *Mus musculus*

Los experimentos con animales fueron realizados en su totalidad en la Universidad de Carolina del Norte, Estados Unidos y aprobados por su IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*).

Se utilizaron ratones C57BL/6J wild type, KO para *Gpat3* (*Gpat3^{-/-}*) (Cao, et al., 2014), y para GPAT4 (*Gpat4^{-/-}*) (Vergnes, et al., 2006). Los animales fueron mantenidos en cuartos con temperatura controlada (23 °C), ciclos de luz/oscuridad de 12 hs y la administración de agua y alimento fue *ad libitum*.

1.3. Obtención de macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón (BMDM)

Para la obtención de macrófagos primarios derivados de médula ósea (BMDM por sus siglas en inglés "*Bone Marrow Derived Macrophages*") se utilizaron ratones hembras y machos de entre 8 y 16 semanas de edad. En cada experimento se utilizó una misma cantidad de animales de cada sexo de edades similares en cada grupo para evitar cualquier diferencia de datos debido a la variabilidad etaria y/o sexual. Los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical de acuerdo a los protocolos aprobados por el IACUC de la Universidad de Carolina del Norte. Luego, se colectaron los fémures y tibias, teniendo especial cuidado de eliminar cualquier resto de tejidos blandos y utilizando material estéril diferente para cada genotipo. A partir de este momento se trabajó bajo campana de flujo laminar para conservar la esterilidad del cultivo celular. La cabeza de los huesos fue cortada con tijeras de cirugía y se extrajo la médula ósea utilizando jeringas con SFB 1% en PBS tibio para barrer el contenido interno. Luego se dispersó la médula subiéndolo y bajándolo repetidas veces el contenido extraído con pipeta de plástico. Las células se colectaron mediante centrifugación a 200g y se lisaron los glóbulos rojos mediante el uso de buffer de lisis de acetato de potasio (GIBCO). Las células restantes fueron re-suspendidas en RPMI con 10% SFB y antibióticos y el agregado de 20ng/ml de M-CSF (Biolegend) y conservadas en placas de Petri para cultivos bacterianos durante 6 días. De esta forma las células que se diferencian en macrófagos son las únicas que logran adherirse a la superficie de las placas de cultivo bacteriano sin pre-tratamiento. Luego de los 6 días, las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS tibio para eliminar detritos y células contaminantes, contadas y sembradas en placas para cultivos celulares en una densidad adecuada para cada experimento. Al día siguiente se realizaron los ensayos correspondientes.

2. ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS MEDIANTE EL USO DE KLA₂-LÍPIDO A

Para lograr la activación tanto de células RAW264.7 como de BMDM, se las trató con 100ng/ml de Kdo₂-Lípido A (KLA), el componente activo del lipopolisacárido bacteriano (LPS), según lo descrito por Denis, et al., 2010, teniendo especial cuidado en sonicar la solución madre 10 minutos antes de cada uso para lograr una dispersión completa. En todos los casos, la eficiencia de la activación se evaluó analizando el nivel de expresión de la citoquina pro-inflamatoria *Tnf-α*.

3. DIFERENCIACION MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA MEDIANTE EL USO DE LDL OXIDADAS

Los macrófagos fueron transformados en células espumosas mediante la incubación con 100µg/ml de oxLDL en medio libre de suero. Las LDL se obtuvieron mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de plasma de individuos normolipidémicos. La oxidación de las mismas se realizó mediante incubación con 5µM CuSO₄ durante 8h a 37°C. Se eligió este tiempo de tratamiento ya que fue aquel con el que se obtuvo un nivel de oxidación aceptable, según lo controlado mediante sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, y con las cuales, además, las células tratadas mostraron un nivel de supervivencia mayor al 80% (datos no mostrados). La transformación efectiva en célula espumosa se monitoreó observando la clara aparición de una gran cantidad de gotas de lípido en el interior celular, y a través de la medición de la expresión del marcador *Cd36*, receptor basurero de LDL modificadas y FA que se sobre-expresa durante esta transición (Kunjathoor, et al., 2002; Tsukamoto, et al., 2002).

4. DIFERENCIACION DE MONOCITOS A MACRÓFAGOS MEDIANTE EL USO DE ESTERES DE FORBOL (PMA)

La diferenciación de la línea celular de monocitos humanos THP1 a macrófagos se llevó a cabo mediante la incubación con palmitoil-miristoil forbol (PMA) durante una noche. Debido a que la línea celular THP1 corresponde a monocitos que crecen en suspensión, y que al diferenciarse se adhieren al sustrato, la optimización de este modelo se llevó a cabo siguiendo la eficiencia de adherencia celular con distintas concentraciones y tiempos de incubación con PMA. Se seleccionó la condición de siembra de 2x10⁶ células/ml con 1µg/ml de PMA con la cual se logró la adherencia del 90% de las células obteniendo una monocapa con una confluencia del 70-80%.

5. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON DNA

Para todos los procedimientos de biología molecular o de trabajo con bacterias se utilizó material (tips, microtubos, tubos de PCR, etc.) esterilizado por autoclave.

5.1. Cepa utilizada de bacterias.

Para los experimentos de expansión de vectores de silenciamiento se utilizó la cepa de bacterias de *Escherichia coli* JM109. Esta cepa es fácilmente transformable y de fácil crecimiento y es sensible a los antibióticos ampicilina y kanamicina, lo que permite la selección de colonias que, por transformación, incorporen vectores con resistencia a dichos antibióticos.

5.2. Medios de cultivos utilizados para bacterias.

Para el crecimiento de bacterias se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) líquido o medio LB suplementado con 1,5% de agar (LB-Agar) como medio sólido. Ambos medios fueron esterilizados en autoclave y en caso de requerir antibióticos, éstos fueron agregados una vez que el medio alcanzó una temperatura igual o menor a 50 °C.

5.3. Preparación de bacterias competentes.

Para la preparación de bacterias JM109 químicamente competentes, se siguió el protocolo descrito por Inoue, et al., 1990. A 250 ml de SOB [triptona (Britania) 2% p/v; extracto de levadura 0,5% (Britania); NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM] en un erlenmeyer de 2l se le agregó la solución de Magnesio junto con 10 colonias de *E.coli* JM109 picadas de la placa de LB-Agar. Se dejaron crecer por aproximadamente 15 hs a 22 °C con agitación vigorosa, hasta alcanzar una DO de 0,6. Luego, se colocó el erlenmeyer en hielo por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 2100 x g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, el pellet se re-suspendió en 80 ml de Buffer de Transformación (MnCl₂ 55 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM; HEPES 0,01 M; pH 6,7) y se incubó 10 minutos en hielo. Luego se centrifugó por 10 minutos a 2100 x g a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en 20 ml de buffer TB frío, al que se le adicionaron 1,4 ml de DMSO (7 % DMSO). Por último, las células re-suspendidas se volvieron a incubar en hielo por 10 minutos, se alicuotaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70 °C.

5.4. Transformación de bacterias con DNA plasmídico.

Para la transformación de bacterias competentes con DNA plasmídico se siguió el protocolo de Sambrook, et al., 1989. Se agregaron aproximadamente 10 ng de DNA plasmídico a 100µl de células competentes, se mezcló y se incubó en hielo por 30 minutos. Luego se procedió a realizar el shock térmico a 42 °C durante 45 segundos. Luego de 5 minutos en hielo,

se le agregaron 600 µl de medio SOC (peptona 20 gr/L; extracto de levadura 5 gr/L; NaCl 0,584 gr/L; KCl 0,186 gr/L; glucosa 20 mM; pH 7,0) a temperatura ambiente y se llevaron a una incubadora a 37 °C y agitación por una h. Por último, las bacterias fueron sembradas en placas LB-Agar con el antibiótico correspondiente según el gen de resistencia que porte el plásmido transformado e incubadas toda la noche en estufa a 37 °C. En caso de placas de LB-Agar-ampicilina la concentración del antibiótico fue de 100 µg/ml, en el caso de placas de LB-Agar-kanamicina la misma fue de 50 µg/ml.

5.5. Obtención de plásmidos a pequeña escala (miniprep).

Para la obtención de plásmidos a pequeña escala se partió de cultivos bacterianos de 5 ml en medio LB líquido (con el antibiótico correspondiente) que se dejaron crecer toda la noche a 37 °C y 180 rpm. Para la purificación del plásmido se utilizaron kits comerciales de Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit) o de GE Healthcare (illustra Plasmid Mini Spin Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.6. Obtención de plásmidos a gran escala (maxiprep).

Para la obtención de plásmidos a gran escala se siguió un protocolo adaptado de Sambrook, et. al., 1989. Se partió de un cultivo de bacterias en 200 ml de LB líquido (con el antibiótico correspondiente) que se dejó crecer toda la noche a 37 °C y 180 rpm. Luego de centrifugarlo a 6000 x g por 10 minutos a 4°C, se resuspendió en 10 ml de glucosa 50 mM; Tris 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; pH 8.0 y se agregó 0,5 ml de Lisozima (10 mg/ml). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 10 ml de NaOH 0,2 M; SDS 1% y se incubó 5 minutos más a temperatura ambiente. Después se agregaron 10 ml de Solución acetato de potasio 3M; ácido. Luego se centrifugó 20 minutos a 20000 x g a 4 °C, el sobrenadante se filtró y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol para luego dejar incubando 30 minutos a -20 °C. Más tarde se centrifugó 30 minutos a 15000 x g y a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Al pellet obtenido se lo lavó con etanol 70 % y se centrifugó 10 minutos a 15000 x g. El sobrenadante se descartó y se dejó secar al pellet. Este se resuspendió en 0,5 ml de agua estéril, se agregaron 2 µl de Ribonucleasa A y se incubó 30 minutos a 37 °C. Una vez finalizada esta incubación, se guardó a -20 °C.

5.7. Cuantificación de DNA.

Para medir la concentración de DNA se usó un espectrofotómetro marca Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience) o un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo). Los mismos

leen absorbancias a 260 nm, 280 nm, y 230 nm permitiendo así no sólo medir la concentración del ácido nucleico, sino también detectar la presencia de proteínas y otros contaminantes. Se consideraron como adecuados los cocientes: $260/280 > 1,8$ y $260/230 > 2,0$.

5.8. Digestión con enzimas de restricción.

En general, el corte con enzimas de restricción realizadas durante la expansión y verificación de los vectores silenciadores para GPAT3 y SCR, se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, durante 1-2 hs a la temperatura adecuada para la enzima utilizada, siguiendo el siguiente protocolo provisto por el fabricante (New England Biolabs o Invitrogen).

5.9. Electroforesis en geles de agarosa.

Para la preparación de geles de agarosa se utilizó Certified Molecular Biology Agarose (BioRad) en una concentración de 0,5-1 %, según el tamaño del producto a separar, en buffer TBE (Tris 0,05 M; Ácido Bórico 0,05 M; EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM). La corrida electroforética se llevó a cabo a 100 V por 45-80 minutos en una cuba horizontal. Para la visualización de las bandas, el gel fue teñido luego con bromuro de etidio y para el análisis del mismo se usó un transiluminador Hoefer Macrovue UV-20 y se tomaron fotos con una cámara Kodak DC 210 Zoom Digital Camera y el software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, LP).

5.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el chequeo inicial de expresión de distintos genes relacionados al metabolismo de glicerolípidos se utilizó la polimerasa iProof High-Fidelity DNA (BioRad). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Veriti (Thermo). La secuencia de los *primers* utilizados se detalla en la sección que describe las PCR en tiempo real.

5.11. Transfección de células eucariotas.

Para la transfección de células HEK 293T con vectores silenciadores o SCR, se trabajó en placas de 60 mm. Se procedió a transfectar esta línea celular haciendo uso de cationes lipídicos (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Se agregó el DNA plasmídico de interés sobre células 80% confluentes. Para ello, se diluyó el DNA (10 µg) en medio de cultivo correspondiente incompleto (500 µl) y la Lipofectamina 2000 (relación Lipofectamina 2000:DNA, 3:1, vol:µg) en el mismo volumen de medio incompleto. Luego de una incubación de 5 minutos se mezclaron

y se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Al finalizar la incubación se retiró el medio de cultivo de las células, se lavó la monocapa con PBS tibio y se agregaron 1,5 ml de medio incompleto. Pasados los 20 minutos, se agregaron los complejos DNA-cationes lipídicos a las células y se incubaron por 6 hs en estufa a 37 °C. Pasadas las 6 hs de incubación, se retiró el medio y se agregó medio de cultivo completo. A las 24 y 48 hs se colectó el medio y se filtró para transducir posteriormente las células RAW 264.7 con los lentivirus presentes en el medio. En la sección “Producción de lentivirus” se describe detalladamente esta técnica.

6. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON RNA.

Para todos los procedimientos de trabajo con RNA todo el material fue esterilizado previamente en autoclave y se utilizó agua MiliQ tratada con el inhibidor de RNAsas, dietilpircarbonato (DEPC, Sigma), tanto para re-suspender el RNA como para la preparación de las mezclas de reacción para la síntesis de DNAc y para qPCR.

6.1. Obtención de RNA.

Para la obtención de RNA se utilizó el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen) o TriReagent (MRC) cuyo fundamento se basa en lo descrito por Chomczynski and Sacchi, 1987. Brevemente, partiendo de células en cultivo en placas de 60 mm se agregó 1 ml del reactivo, se pipeteó varias veces, se agregaron 200 µl de cloroformo y luego se agitó vigorosamente por 15 segundos y se dejó reposar por 10 minutos. Luego se centrifugó por 15 minutos a 12000 x g a 4 °C, para obtener dos fases: una fase inferior rosa de fenol-cloroformo y una superior acuosa incolora. Se separó la fase superior y se le agregó 500 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión y se dejó reposar por 15 minutos, para luego centrifugar 15 minutos a 12000 x g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de RNA se lavó tres veces con etanol 75%. El pellet se dejó secar a 50 °C por 5 minutos y luego se re-suspendió en 20-60 µl de agua MiliQ-DEPC y se guardó a -70 °C.

6.2. Cuantificación de RNA.

Para medir la concentración de RNA se usó un espectrofotómetro marca Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience) o un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo). Se prestó especial atención a los valores de los cocientes 260/280 y 230/260 para evaluar la presencia de contaminantes.

6.3. Evaluación de la calidad de RNA.

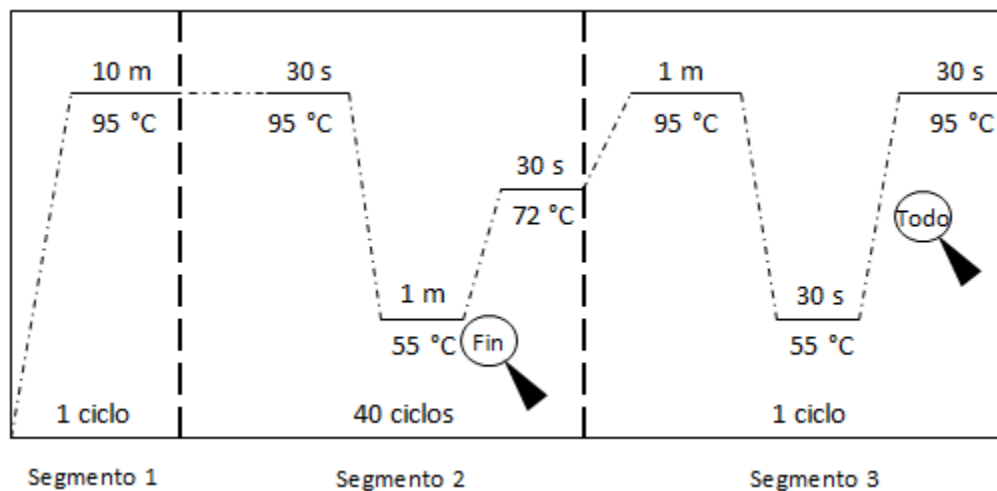
Para determinar la integridad del RNA obtenido y la presencia o no de contaminación con DNA, se corrieron 0,5 µg de cada muestra en un gel con 1 % de agarosa p/v en TBE, por 20 minutos a 120 V en una cuba electroforética horizontal. Se evaluó la presencia de las típicas bandas 28S y 18S, siendo la intensidad de la primera el doble de la segunda. Sólo se trabajó con las muestras cuya corrida electroforética resultó satisfactoria.

6.4. Obtención de DNA complementario (cDNA).

Para la obtención de cDNA se utilizaron los kits comerciales High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante, usando 1 µg de RNA.

6.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Para la determinación de la cantidad de RNA mensajero (mRNA) de algún gen en particular en algún tipo celular se utilizó el método de PCR cuantitativa (qPCR) a partir de DNAC. Para esto se utilizaron las *supermix* comerciales iQ SYBR Green Supermix (BioRad) o Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific) según las insctrucciones del fabricante. Como molde se utilizó una dilución 1/5- 1/10 de cDNA. Para el ciclado y la lectura de la fluorescencia se usó un equipo Stratagene Mx3000P. En general, el protocolo de ciclado y de lectura de fluorescencia fue el siguiente:



La temperatura de annealing varió de 55 a 59°C dependiendo de la temperatura de desnaturalización de cada par de primers. Para realizar los cálculos se utilizó el método de $\Delta\Delta Ct$

o el *software* qBase que permite calcular las cantidades relativas de cada gen, teniendo en cuenta la eficiencia de amplificación, varios genes *housekeeping* y la propagación de errores debidos a los distintos cálculos.

Tabla 3. *Primers* utilizados para qPCR. Subrayados se muestran los genes *housekeeping* usados:

Primer		Secuencia
Gpat1 ratón	<i>Forward</i>	TGGGCATCTCGTATGATCGC
	<i>Reverse</i>	TTCTGATAACGCCTCTCGCC
GPAT1 humano	<i>Forward</i>	GGTGAACAACCTGGGCAAACC
	<i>Reverse</i>	CGCTTGCTCCAGGGAAAGTA
Gpat2 ratón	<i>Forward</i>	ATCCTACTGCTGCTGCACCT
	<i>Reverse</i>	ACAGCAGCTTTGCACTCAGA
GPAT2 humano	<i>Forward</i>	ATCCTGCTGCTGATGCACCT
	<i>Reverse</i>	ACAGCAGCTTTCTGCTCAAT
Gpat3 ratón	<i>Forward</i>	CTTTGAAATCGGAGGAACCA
	<i>Reverse</i>	TTTGCAAACCTGAACTGCGTC
GPAT3 humano	<i>Forward</i>	CCTCTGAGGGTTACCTTGGC
	<i>Reverse</i>	CCTCCCTTCTGGGGTCTGTA
Gpat3 de ratón análisis de silenciadores 1	<i>Forward</i>	GCGCTCAGAAATAAAGGACAGA
	<i>Reverse</i>	GGGGTTATACTTTATGGCCACTG
Gpat3 de ratón análisis de silenciadores 2	<i>Forward</i>	ACTAGAGAGGAAGGAGAAGACG
	<i>Reverse</i>	AGTTCTGCGAAGCCATGTTTA
Gpat4 ratón	<i>Forward</i>	GGCATGGTGACGTACCTTCT
	<i>Reverse</i>	GCTTCAGCCAGCACAAAGAC
GPAT4 humano	<i>Forward</i>	TCCCATGACTAGAGAGGCAGA
	<i>Reverse</i>	CTGCTCCTCCTTGAACGTGT
Cpt1 ratón	<i>Forward</i>	CACTGCAGCTCGCACATTAC

	<i>Reverse</i>	CTCTGCTCTGCCGTTGTTGT
CPT1 humano	<i>Forward</i>	ATGTACGCCAAGATCGACCC
	<i>Reverse</i>	TGACCACGTTCTTCGTCTGG
Gk ratón	<i>Forward</i>	TGAACCTGAGGATTTGTCAGC
	<i>Reverse</i>	CCATGTGGAGTAACGGATTTTCG
GK humano	<i>Forward</i>	CTGGGACAAGATAACTGGAGAGC
	<i>Reverse</i>	TCAACGGTAGACTGGGTTCTTA
Tnfa ratón	<i>Forward</i>	CTCTTCTGCCTGCTGCACTT
	<i>Reverse</i>	GGCTACAGGCTTGTCACCTCG
<u>Actb ratón</u>	<i>Forward</i>	<u>AAGAGCTATGAGCTGCCTGA</u>
	<i>Reverse</i>	<u>TACGGATGTCAACGTCACAC</u>
<u>ACTB humano</u>	<i>Forward</i>	<u>GGACTTCGAGCAAGAGATGG</u>
	<i>Reverse</i>	<u>AGCACTGTGTTGGCGTACAG</u>
<u>RPL 4</u>	<i>Forward</i>	TGAACACAACCCAAAAACGA
	<i>Reverse</i>	TTCGCTGAGAGGCATAGACC
Mcp-1 ratón	<i>Forward</i>	GGCTCAGCCAGATGCAGTTA
	<i>Reverse</i>	CTGCTGCTGGTGATCCTCTTG
Il-1b ratón	<i>Forward</i>	GCAACTGTTCCCTGAACTCAACT
	<i>Reverse</i>	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
Il-6 ratón	<i>Forward</i>	GGGACTGATGCTGGTGACAA
	<i>Reverse</i>	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
Il-10 ratón	<i>Forward</i>	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
	<i>Reverse</i>	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
Cd36 ratón	<i>Forward</i>	TGTAGCAGCTGCACCACATA
	<i>Reverse</i>	TGGAACCAAACCTGAGGAATGGA
CD36 humano	<i>Forward</i>	TGAGTTTGGTTCCGTACCCTG

	<i>Reverse</i>	TGAGGCTGCATCTGTACCAT
--	----------------	----------------------

7. SILENCIAMIENTO DE Gpat3 MEDIANTE shRNA.

Para estudiar el efecto de la expresión de *Gpat3* en el metabolismo de lípidos durante la activación del macrófago o su transición a célula espumosa, se trabajó con la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7. La expresión de *Gpat3* se silenció por medio de vectores que portan un RNA de interferencia contra el transcripto primario de esta enzima.

7.1.shRNA utilizados.

Se trabajó con los vectores de la compañía GIPZ Dharmacon shRNA Vectors, basados en el silenciamiento con RNA pequeños en forma de horquilla (*short hairpin RNA*, shRNA). Cuatro plásmidos con 30 nucleótidos específicos contra todas las distintas variantes de *splicing* de *GPAT3* (sh*Gpat3*) fueron adquiridos, junto con un vector control cuya secuencia blanco no aparea con ningún mRNA de ratón (*Non-effective 29-mer scrambled shRNA cassette*, SCR) (Tabla 4). Estos vectores poseen además el gen de resistencia a puomicina y a kanamicina (gen de resistencia eucariota y procariota respectivamente) y el gen de la Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) regulado por el promotor del Citomegalovirus (CMVp).

Para seleccionar el vector sh*GPAT3* que mejor silenciara *GPAT3*, se intentó realizar una transfección transitoria mediante el uso de lipofectamina de cada uno de los vectores en células RAW 264.7, pero dado que la eficiencia en la transfección de esta línea celular es muy baja, se procedió a producir lentivirus portadores de cada silenciador, y posteriormente infectar las células RAW 264.7 con cada uno de ellos, seleccionar y expandir un clon y, por último, seleccionar aquella línea que posea el mayor porcentaje de silenciamiento chequeando su expresión mediante q-PCR.

Clon	N° de identificación del clon	Secuencia
1	V2LMM_48102	TATCCACGATGCTTCAGTC
2	V3LMM_507380	TGCCCACGATCATCTTGCT
3	V3LMM_50377	ATTGTTGATGCAAGTACCT

4	V3LMM_507378	TTTTAAACATCATGACTGA
---	--------------	---------------------

Tabla 4. Secuencia de silenciadores para *Gpat3* utilizados

7.2. Generación de partículas lentivirales.

Para este trabajo de tesis se usó un sistema lentiviral de segunda generación, compuesto por los siguientes tres vectores:

- Vector con el transgen: los vectores con el DNA que codifica para un RNA de interferencia (shRNA) contra en transcripto de *Gpat3* de ratón descritos más arriba, o para un shRNA que no aparea con ningún transcripto (vector con secuencia *scramble*, SCR) poseen el gen que codifica para la proteína TurboGFP (GFP: *Green fluorescent protein*) en un mismo transcripto bicistrónico (permitiendo identificar microscópicamente a las células que expresan el shRNA), genes de selección procariota (ampicilina) y eucariota (puromicina), entre otras características.
- Vector de empaquetamiento: psPAX2 (Addgene, # 12260). Contienen los genes virales: *gag*, *pol*, *tat* y *rev* y también el gen de resistencia a ampicilina para la selección de bacterias transformantes durante su amplificación.
- Vector de envoltura: pMD2.G (Addgene, # 12259). Contiene el gen de la proteína de envoltura VSV-G y el gen de resistencia a ampicilina.

Estos vectores fueron amplificados en bacterias JM109 como se describió anteriormente y su purificación se llevó a cabo utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) o por medio de la maxipreparación de plásmidos. Además, se chequeó la identidad de cada vector por medio de análisis con enzimas de restricción como se describió con anterioridad.

La línea celular HEK293 y sus derivadas genéticamente modificadas son las principales líneas celulares utilizadas para la producción de lentivirus. La forma más común de obtención de lentivirus es la de transfección transitoria de los vectores lentivirales en una línea celular empaquetadora y luego la purificación de los mismos por ultracentrifugación. Se usó la línea celular HEK 293T (293T) que, además de ser alta y fácilmente transfectable, fue modificada de manera tal que expresa constitutivamente el antígeno T grande del virus SV40, lo que permite la replicación de los plásmidos que tengan el SV40 Ori en células eucariotas, aumentando así el número de plásmidos por célula y permitiendo que estos se diseminen a través de la línea celular cuando las células se dividen. Este origen de replicación eucariota está presente en dos de los 3 vectores usados en la producción de lentivirus.

Para la obtención de partículas lentivirales se siguió el siguiente protocolo:

Día 1: se plaquearon las células 293T en placas de 100 mm en medio DMEM completo (5% de SFB y antibióticos) de manera tal que su confluencia al día siguiente no fuera más que de 40 % (entre $1-2 \times 10^6$ células/placa). Se plaquearon mínimo 2 placas de células: una para producir lentivirus con el shRNA y otra para producir lentivirus SCR.

Día 2: se procedió a la transfección de las 293T mediante el uso de cationes lipídicos como se describe más arriba.

Día 3: se observaron las placas al microscopio óptico invertido Olympus CKX41 equipado con una lámpara fluorescente y se chequeó que las células se hayan transfectado eficientemente (70-90 % de células verdes). Se retiró completamente el medio de cultivo conteniendo partículas lentivirales, se colocó en tubos de 50 ml para conservarlo a 4 °C, y se reemplazó por 10 ml de DMEM completo fresco. Esto se repitió con todas las placas, que luego se devolvieron a la estufa de cultivo hasta el día siguiente.

Día 4: ídem anterior.

Día 5: se retiró el medio de cultivo de las placas, se juntaron todos los sobrenadantes provenientes de placas 293T productoras de lentivirus shRNA y todos aquellos provenientes de placas productoras de lentivirus SCR y se procedió a su concentración por ultracentrifugación. Para ello, primero se centrifugaron los tubos de 50 ml a baja velocidad (10 minutos a 1800 rpm 4 °C) para sedimentar aquellas células que se hayan despegado de la placa y detritos celulares. Luego, éstos sobrenadantes se ultracentrifugaron a 21000 rpm en un rotor SW 32 Ti en una ultracentrífuga Beckman Coulter LE-80K, por 2 hs y media a 4 °C. A continuación, los sobrenadantes se descartaron y los tubos se invirtieron sobre gases estériles para eliminar el exceso de medio de cultivo. Luego se agregaron 150 µl de PBS frío sobre el pellet, se taparon los tubos y se dejaron toda la noche a 4 °C, para permitir que el pellet de partículas lentivirales se hidrate bien.

Día 6: dentro del flujo laminar, se pipeteó 30 veces el pellet de lentivirus en PBS y se alicuotó de a 50 µl en microtubos de 500 µl y se guardaron inmediatamente a -70 °C.

7.3. Transducción de células RAW 264.7 con vectores lentivirales

Para lograr una línea estable con *Gpat3* silenciada se incubaron células RAW 264.7 con distintas cantidades de virus durante diferentes tiempos. La eficiencia de la transducción fue evaluada mediante el conteo de células expresando GFP luego de 72h. Las células transducidas (5-10%) fueron seleccionadas utilizando puromicina durante varios pasajes y el método de *cloning ring* para un mejor aislamiento de las colonias positivas. Luego de obtener poblaciones enriquecidas en células transducidas (aproximadamente 90% de células positivas), se realizó

una dilución límite en placa de 96 pocillos y se obtuvo un clon puro de cada línea silenciada y dos líneas SCR distintas para utilizar como control.

Luego de esto, se procedió a seleccionar aquella línea celular con el mayor porcentaje de silenciamiento. Para ello se extrajo RNA de cada línea, se realizó la retrotranscripción y cuantificación del nivel de mensajero de *Gpat3* a través de qPCR utilizando primers específicamente diseñados en torno a la zona complementaria a los RNAi. El nivel de silenciamiento de la línea seleccionada se monitoreó regularmente por qPCR.

8. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON PROTEÍNAS.

8.1. Obtención de homogenatos totales de células

Las células fueron colectadas en buffer H (HEPES-KOH 10 mM; sacarosa 0,25 M; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; pH 7,4) suplementado con un 0,002% v/v de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma), en hielo, centrifugadas para concentrarlas y luego re-suspendidas en un pequeño volumen de buffer H dependiendo de la densidad celular. Luego, se disgregaron mecánicamente con un homogeneizador de vidrio/teflón tipo Potter utilizando un sistema motorizado (Tri-R Instruments, 1000 rpm).

8.2. Cuantificación de proteínas.

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en el cambio de color del colorante Comassie Brilliant Blue G-250 en presencia de distintas concentraciones de proteínas. Para determinar la concentración de proteínas de una determinada muestra, se realizaron diluciones 1/100, 1/50 o 1/5 y, en paralelo, una curva de calibración con albúmina 1mg/ml y luego se leyó su absorbancia a 465 y 595 nm en un lector de placas DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter). Luego se restó Abs 594nm-Abs 465nm y con ese valor se construyó la curva de calibración y se determinó la concentración de proteínas de las muestras. Sólo se utilizaron los valores de las muestras problema cuyo valor estuviera dentro de los límites de la curva de calibración.

Alternativamente, se cuantificaron las proteínas utilizando la técnica de BCA (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.3. Medición de actividad enzimática de la glicerol-3-fosfato acil transferasa (GPAT)

La actividad GPAT (EC 2.3.1.15) se midió siguiendo un protocolo descrito previamente (Gonzalez-Baro et al, 2001) con modificaciones. La cantidad apropiada de muestra se diluyó en solución isotónica de sacarosa 0,25 M y se agregó a la mezcla de reacción, de modo de obtener un volumen final de 200 μ l. La composición final de la mezcla de reacción fue: buffer Tris-HCl 75 mM pH 7,4; MgCl₂ 4 mM; albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/ml; NaF 8 mM; DTT 1 mM; glicerol-3-fosfato 0,8 mM (0,5 μ Ci [¹⁴C]Glicerol-3-fosfato, Amersham Biosciences) y palmitoil-CoA 60 μ M. La reacción se inició con el agregado de la muestra y al cabo de 10 minutos de incubación a 37°C se frenó con 600 μ l de HClO₄ 1%. Luego se realizaron dos lavados con Metanol: Cloroformo (2:1), se separó el producto de los sustratos por formación de dos fases luego del agregado de agua y cloroformo. La radiactividad presente en los productos de reacción solubles en cloroformo se determinó en un contador de centelleo líquido.

Para determinar la actividad GPAT NEM sensible, se midió la actividad total (actividad GPAT) y la actividad en presencia de NEM 2 mM (actividad GPAT NEM resistente). La actividad NEM sensible se obtuvo por diferencia.

9. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON LÍPIDOS

9.1. Tinción de gotas de lípido mediante la técnica de Oil Red O.

Para realizar la tinción de gotas de lípido neutros, las células sembradas en cubre objetos esterilizados por autoclave fueron fijadas en paraformaldehído 4% durante 1h y luego lavadas tres veces con PBS. La tinción se realizó utilizando 6ml de una solución stock de Oil Red O (0,5g en 100ml de isopropanol) con 4ml de agua destilada. Esta solución de trabajo fue preparada fresca cada vez y filtrada con papel Whatman #1. Luego de 1h de incubación con el colorante, las células fueron lavadas una vez con isopropanol 60% durante 10 segundos y de tres a cinco veces con sacarosa 0,25M. Luego se procedió al montaje en porta objetos con PBS-glicerol 1:1 y sellado con esmalte de uñas para la toma de fotos en microscopio óptico con lente de inmersión 100X. Para el conteo del área de gotas de lípido se tomaron fotos de 10 campos al azar de cada tratamiento y se analizaron 10 células en cada campo. Alternativamente se realizó la modificación para que la técnica sea cuantitativa en forma directa. Para esto, luego de los lavados se retiraron los cubreobjetos con células teñidas y se los colocó en otra placa de cultivo de células limpia (1 cubre objeto por pocillo). Luego se agregó 0,3ml de isopropanol por pocillo para extraer el colorante incorporado en las células. Luego de 30 minutos de extracción con agitación, se procedió a medir la cantidad de colorante liberado cuantificando la absorbancia a 490nm.

9.2. Extracción de lípidos mediante la técnica de Bligh y Dyer.

La extracción de lípidos totales fue realizada según lo descrito por Bligh y Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Rápidamente, las células fueron colectadas por raspado con 0,8ml de metanol y 0,2ml de H₂O (por pocillo en placa de 12) en un tubo de vidrio. Luego se le agregaron 0,4ml de cloroformo, se mezcló en vortex y se dejó toda la noche a -20°C. Al día siguiente los tubos fueron centrifugados 5 minutos a 4°C a baja velocidad, el sobrenadante fue colectado y guardado a -20°C mientras que se realizó una segunda extracción de lípidos sobre el precipitado agregando 0,75ml de metanol:cloroformo (2:1) e incubando a -20°C durante 3 hs. Más tarde se recuperó el sobrenadante de este segundo tubo y se juntó con el primer sobrenadante para luego formar dos fases por el agregado de 0,55ml de cloroformo y 0,65ml de H₂O. Después de mezclar vigorosamente los tubos fueron dejados a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron para lograr una separación completa de las fases y se colectó la fase de cloroformo inferior. El cloroformo de las muestras fue evaporado en SpeedVac y los lípidos fueron re-suspendidos en 0,1ml de metanol: cloroformo.

Los volúmenes de solventes fueron recalculados para otros tamaños de placas de cultivos, conservando siempre la relación entre los mismos.

9.3. Separación de lípidos por cromatografía de capa delgada (TLC).

Para realizar la separación de lípidos se realizaron cromatografías en capa delgada (TLC) de dos pasos en placas de sílica gel G150 20x20cm de 250 micrones de espesor de fase estacionaria. El primer paso para separar lípidos polares se realizó hasta la mitad de la placa con la mezcla de solventes: cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (65:25:4 v/v/v), se dejó secar la placa durante una hora y se realizó el segundo paso para separar lípidos neutros con la mezcla heptano: éter isopropílico: ácido acético (60:40:4 v/v/v). La identidad de las manchas de lípidos reveladas por vapores de yodo fue identificado por comparación con estándares genuinos corridos simultáneamente.

9.4. Cuantificación de triglicéridos (TAG) totales.

La cuantificación de triglicéridos totales luego de la extracción de lípidos se realizó por el método enzimático de Trinder utilizando el kit para determinación de TAG en plasma de SIGMA según las instrucciones del fabricante.

9.5. Cuantificación de PL totales.

La cuantificación de los PL totales se realizó separando los lípidos extraídos por TLC con la mezcla de solventes del segundo paso de separación de lípidos neutros antes mencionada. En estas condiciones, los PL totales quedan en el punto de siembra. Las placas fueron carbonizadas sumergiéndolas en una solución 5% de ácido sulfúrico en PBS durante 5 segundos e incubadas luego a 100°C en estufa durante 20 minutos. La intensidad de las manchas obtenidas en el punto de siembra fue analizada y comparada con una curva estándar de concentración conocida a través del análisis de imagen con el programa Image J.

9.6. Ensayos de incorporación de [¹⁴C]-acetato y [¹⁴C]- ácido oleico ([¹⁴C]-OA) en lípidos.

Los ensayos de marcado isotópico fueron llevados a cabo agregando los precursores durante las últimas 3h del tratamiento correspondiente. Se agregó 0,1mCi/ml de [¹⁴C]-acetato directamente en el medio de cultivo o se incubaron las células con una mezcla de AO frío (sin marca) 200mM con 2,4μCi/ml de [¹⁴C]- OA previamente complejados con albúmina libre de FA 0,25% durante 1h a 37°C. Además se adicionó 1mM de carnitina durante la incubación. Se extrajeron los lípidos y fueron re-suspendidos en 100μl de metanol: cloroformo (2:1), de ellos 2 alícuotas de 10μl se cuantificaron por centelleo líquido para el cálculo de la incorporación de acetato en lípidos totales y 80μl se separaron por TLC como se describió con anterioridad. La incorporación de [¹⁴C]-acetato en cada especie lipídica fue analizada mediante escaneo de radioactividad en Bioscan y corregida por concentración de proteínas de cada muestra.

10. ENSAYOS FUNCIONALES

10.1. Ensayos de Fagocitosis

El ensayo de la capacidad fagocítica de macrófagos se llevó a cabo utilizando las BioPartículas *E. coli* conjugadas con pHrodo® Red para fagocitosis (Molecular Probes, Life Technologies). Estas *E. coli*, tienen la particularidad de estar conjugadas a una sonda que sólo fluoresce cuando se la expone a pH bajo. Dado que el proceso de fagocitosis implica la fusión del fagosoma con el lisosoma, y así se expone a las partículas incorporadas al bajo pH de esta organela, estas bacterias conjugadas resultan muy eficientes para la medición de la capacidad fagocítica eliminando pasos de lavado y falsos positivos de partículas adheridas a la superficie celular pero no incorporadas, lo cual es un problema muy común en ensayos que utilizan sondas convencionales y son analizados a través de imágenes. Este ensayo se realizó en placa de 96 pocillos con células 95% confluentes y se midió la fluorescencia (560/585) (Ex/Em) en fluorómetro.

10.2. Medición de la liberación de citoquinas mediante método Luminex.

La determinación de la concentración de citoquinas en el sobrenadante de los macrófagos fue hecha mediante el inmunoensayo multiplex Luminex-MAGPIX. Este ensayo se basa en el uso de múltiples anticuerpos acoplados a bioesferas magnéticas presentes en un pocillo de placa de 96 y permite el análisis de hasta 50 analitos en un único pocillo. Las placas fueron diseñadas por el fabricante acoplando los anticuerpos que corresponden a los analitos de nuestro interés (TNF-α, MCP-1 (CCL2), IL-1b, IL-6 e IL-10). Se colectaron sobrenadantes de células BMDM *wt*, *Gpat3^{-/-}* y *Gpat4^{-/-}* tratados durante 8h con KLA u oxLDL, se las centrifugó para eliminar restos celulares y se conservó a -80°C hasta realizar la determinación. Los ensayos fueron llevados a cabo en el servicio de Luminex MAGPIX del Departamento de Patología y Laboratorio de Medicina de la Universidad de Carolina del Norte, EEUU, según instrucciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

SECCIÓN 1: ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS Y SU FUNCIÓN DURANTE LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS

1.1. SÍNTESIS DE NOVO DE GLICEROLÍPIDOS DURANTE LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS

1.1.1. La activación de células RAW 264.7 con KLA produce la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL

Con el objeto de estudiar la cinética de acumulación de glicerolípidos durante la activación de macrófagos, se trataron células RAW 264.7 con 100ng/ml de KLA durante 4, 8, 12 y 24h. La validación del ensayo de activación se realizó midiendo la expresión de la citoquina pro-inflamatoria *Tnf- α* ; en este experimento se observó que la expresión de dicho marcador aumenta significativamente 40 y 10 veces a las 4 y 8h de tratamiento ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente) (Figura 1A). Las gotas de lípidos aumentaron significativamente 4 veces a las 12 hs de tratamiento y este incremento se mantuvo a las 24 hs ($p < 0,001$) (Figura 1B-C). Por otro lado, se determinó la cantidad total de TAG y PL tras 24 hs de incubación y se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) de aproximadamente 50% en la masa de TAG y 55% en la masa de PL (Figura 1D-E). Estos resultados confirman que, en nuestro modelo de estudio de activación de células RAW 264.7 con KLA, se produce un aumento en la cantidad de lípidos almacenados en gotas de lípido, coincidiendo con lo reportado con anterioridad por Beutler, 2003; Fung, et al., 1993; Dennis, et al., 2010 y Tabas, 2000.

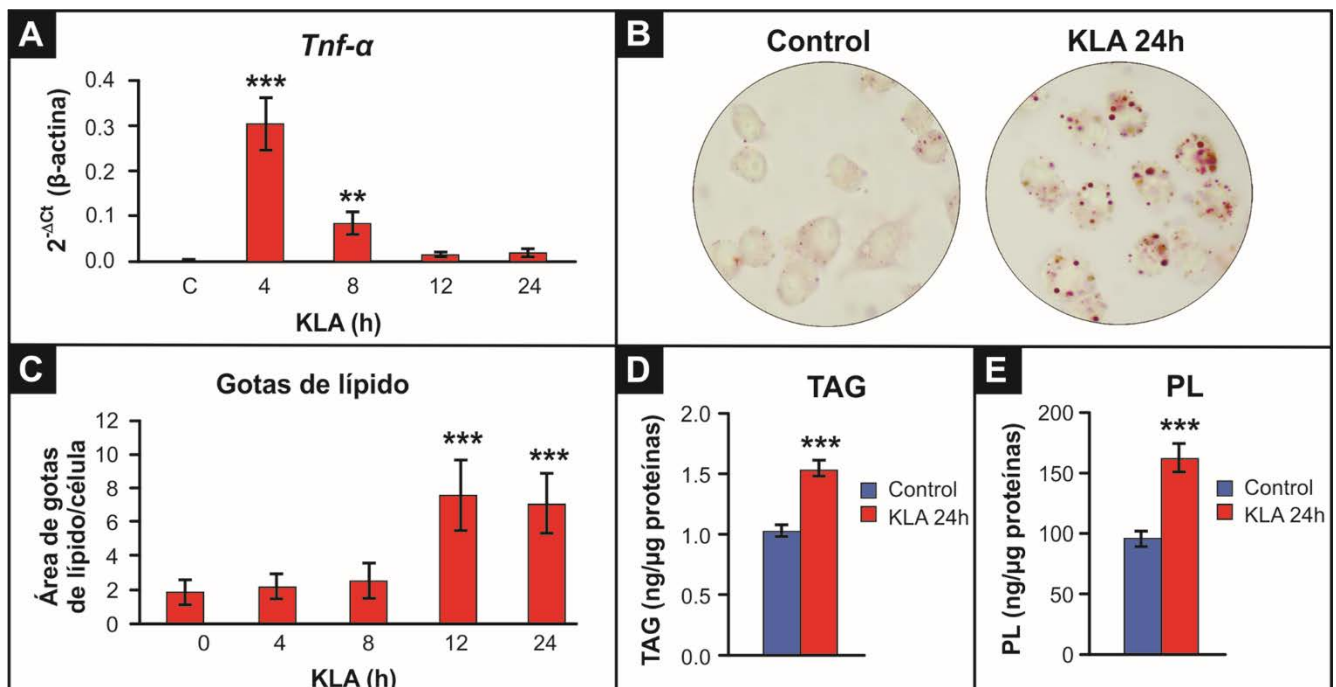


Figura 1. Activación y acumulación de lípidos en células RAW264.7 tratadas con KLA. Células RAW 264.7 fueron tratadas con 100ng/ml KLA durante los tiempos que se indican. **A)** Se realizó la extracción de RNA y retrotranscripción seguida de qPCR para cuantificar la expresión del marcador de diferenciación *Tnf- α* . **B-C)** Las células fueron fijadas y teñidas con Oil-Red O y se

cuantificó mediante análisis de imágenes el área de gotas de lípido por célula **D)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con KLA durante 24h. Se cuantificaron los TAG totales mediante el método enzimático de Trinder. **E)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con KLA durante 24h. Los lípidos fueron separados mediante TLC y los PL totales fueron cuantificados mediante comparación con curva estándar. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. **p <0,01, ***p<0,001.

1.1.2. La activación de células RAW 264.7 con KLA produce un aumento en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos

La acumulación de glicerolípidos en una célula puede darse como consecuencia de uno o varios de los siguientes procesos: a) disminución de la degradación (llevada a cabo por lipasas, fosfolipasas, o β -oxidación de FA), b) incorporación de lípidos pre-formados (por ejemplo los glicerolípidos presentes en lipoproteínas endocitadas) o c) aumento de la síntesis de novo a partir de precursores sencillos como el acetil-CoA y el glicerol.

En el presente trabajo de tesis se ha hecho hincapié en el estudio de la síntesis de novo de glicerolípidos y de los genes y enzimas involucrados en este proceso durante la activación de macrófagos. Para el estudio de esta vía metabólica, se trataron células RAW 264.7 con KLA durante 24hs y en las últimas 3 hs de tratamiento se las incubó con [14 C]-acetato (precursor de la síntesis de novo de FA y Cho) o [14 C]-ácido oleico exógeno (OA por sus siglas en inglés). El análisis de la incorporación de estas dos moléculas marcadas, no sólo permite analizar si se incrementa la síntesis de novo de glicerolípidos, sino que también, posibilita distinguir si los FA utilizados provienen de fuentes exógenas (incorporación de [14 C]-OA) o si son sintetizados de novo (incorporación de [14 C]-acetato). Como se observa en la Figura 2A, **la incorporación de [14 C]-acetato en lípidos totales aumentó significativamente (p<0,05) un 37% luego de 24hs** de tratamiento con KLA. Al analizar la distribución de la marca en las distintas fracciones lipídicas se observó un aumento significativo en los PL: 69% en PS/PI (p<0,05) y 2 veces en PC (p<0,01). También la incorporación de [14 C]-acetato aumentó un 50 % en los ácidos grasos libres (FFA por sus siglas en inglés) (p<0,05), mientras que en los TAG la incorporación se duplicó (p<0,05). Por último, no se observó un incremento en la incorporación de [14 C]-acetato en la fracción de Cho o CE, lo que demuestra que, por un lado, la síntesis de novo de Cho no se activa en este proceso y por el otro, que los FA sintetizados de novo no resultan almacenados en CE sino que son canalizados hacia la síntesis de PL y TAG. En lo referente a la incubación con [14 C]-OA, **no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la incorporación de [14 C]-OA en lípidos totales.** Al analizar la distribución de la marca en las distintas fracciones lipídicas sí se apreció un aumento significativo (p<0,01) de poco más del 50% en la incorporación de este ácido graso exógeno marcado en TAG, mientras que no se observó que este sea utilizado para la síntesis de PL.

Estos resultados permiten concluir que **la síntesis de novo de TAG y PL se induce durante la activación de células RAW 264.7 con KLA** y, en concordancia con reportes previos (Ecker et al., 2009), la fuerza impulsora del proceso podría ser la **inducción de la síntesis de novo de FA**. Los FA exógenos se incorporan en menor medida y lo hacen sólo en la fracción de TAG, por lo que en este modelo, no serían los sustratos preferidos para la síntesis de novo de PL.

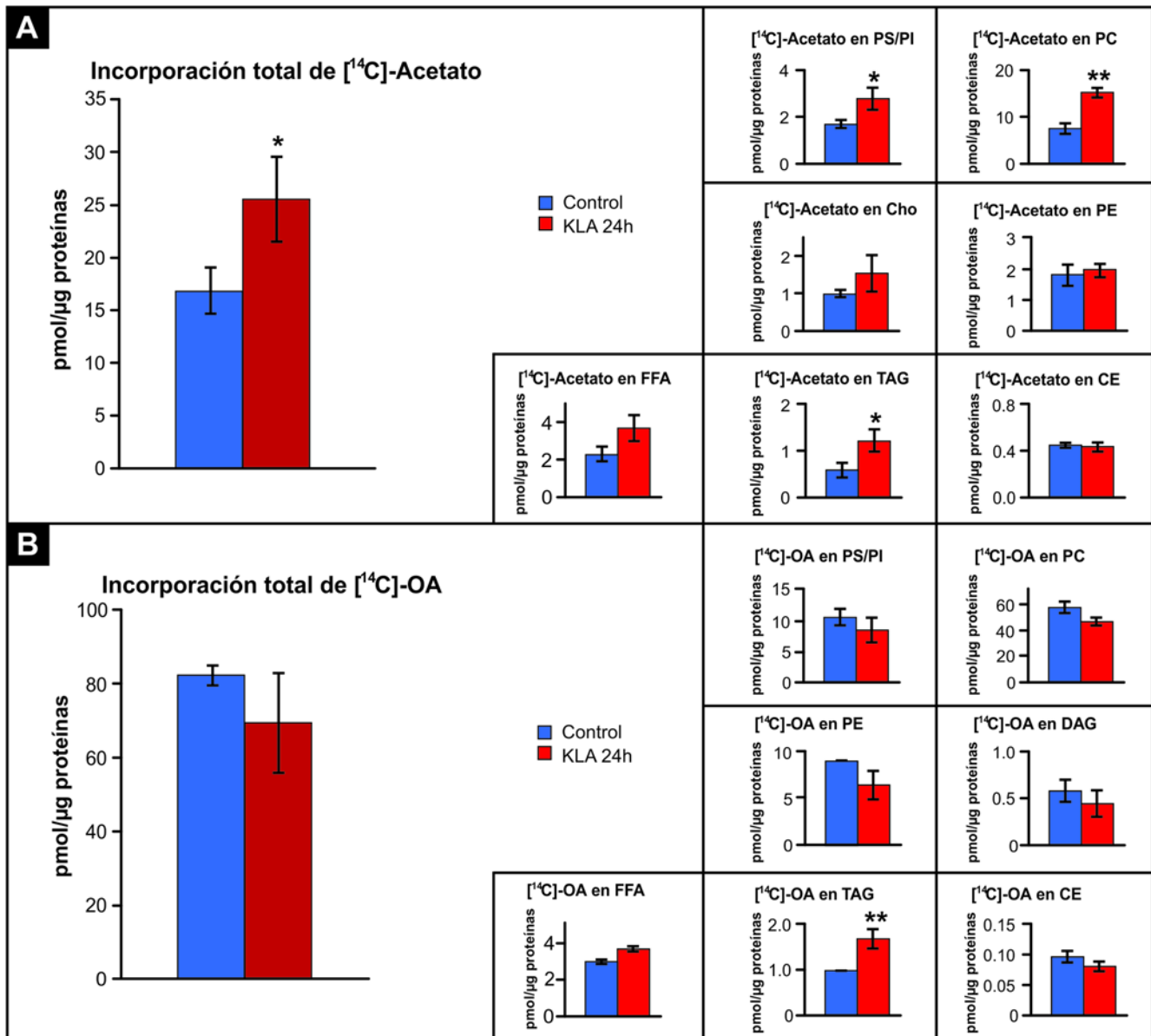


Figura 2. Incorporación de $[^{14}\text{C}]$ -acetato y $[^{14}\text{C}]$ -ácido oleico en glicerolípidos durante la activación de células RAW 264.7. Células RAW 264.7 fueron tratadas durante 24hs con KLA y en las últimas 3hs de tratamiento se las incubó con **A)** $[^{14}\text{C}]$ -acetato o **B)** $[^{14}\text{C}]$ -ácido oleico (OA). Los lípidos totales fueron extraídos utilizando el método de Bligh y Dyer y separados por TLC. La marca incorporada en cada tipo de lípido fue cuantificada en un equipo Bioscan y analizada por comparación con estándares. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

1.1.3. Durante la activación de células RAW 264.7 con KLA aumenta la expresión de las isoformas *Gpat3* y *Gpat4* mientras que disminuye la expresión de la isoforma *Gpat1*

Como se mencionó en la sección introductoria, el paso limitante en la síntesis de novo de glicerolípidos está catalizado por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), enzima que cataliza la acilación del glicerol-3-fosfato para dar ácido lisofosfatídico (LPA). En células de mamífero, se han descrito cuatro genes que codifican para GPATs. Con el objetivo de evaluar la variación en la expresión de estos genes durante la activación de macrófagos, se trataron

células RAW 264.7 durante 4, 8, 12 y 24hs con KLA y se midió el nivel de mRNA mediante qPCR. Como se muestra en la Figura 3, se observó una variación temporal en los niveles de expresión de los distintos genes que codifican GPATs. El gen que codifica para la isoforma mitocondrial GPAT1 presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) de 4 y 2 veces en su expresión respecto del control a las 12 y 24hs de tratamiento respectivamente, *Gpat2* se expresó basalmente sin mostrar cambios (datos no mostrados), mientras que los genes que codifican para las isoformas de retículo endoplásmico ***Gpat3* y *Gpat4* mostraron un aumento significativo de su expresión** (5 veces a las 8 hs de tratamiento ($p < 0,01$), 2,5 veces a las 12hs ($p < 0,05$) y 2 veces a las 24 hs de tratamiento ($p < 0,05$) para *Gpat3*, en concordancia con lo descrito con anterioridad (Feingold, et al. 2012) y 4 veces luego de las 8hs de tratamiento para *Gpat4* ($p < 0,01$) (Figura 3). Asimismo, también se determinó la expresión del gen que codifica para la glicerol quinasa (*Gk*), enzima que cataliza la fosforilación del glicerol para dar glicerol-3-fosfato y se observó un aumento del doble en el nivel de expresión de este gen al cabo de 4hs de tratamiento ($p < 0,05$). Por último, el gen que codifica para la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (*Cpt1a*), que cataliza el paso limitante en la β -oxidación de FA de cadena larga, disminuye significativamente su expresión luego de 8 y 12hs de tratamiento ($p < 0,05$) en concordancia con lo descrito con anterioridad (Feingold, et al., 2012).

Estos resultados de expresión génica, indicarían que tras la activación de macrófagos con KLA, se produce una disminución de la utilización de FA como fuente de energía (β -oxidación), y un aumento de la esterificación de los mismos en glicerolípidos. La existencia de múltiples isoformas de GPAT permite hipotetizar que cada una de ellas cumple un rol diferencial en este proceso. Por ejemplo, GPAT1 cumple un rol específico en la incorporación de FA exógenos en los TAG de hepatocitos (Wendel, et al., 2013; Coleman and Lee, 2004), GPAT3 sería la isoforma que desempeña un rol central en la adipogénesis en tejido adiposo (Cao et al., 2014), mientras que GPAT4 limita la disponibilidad de FA para la β -oxidación en el tejido adiposo marrón (Cooper et al., 2015) y desempeña un rol fundamental en la producción de TAG en la glándula mamaria lactante (Beigneux, et al., 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, indican que **serían GPAT3 y GPAT4 las isoformas involucradas en la síntesis de novo de glicerolípidos estimulada por la activación de macrófagos con KLA**. El hecho de que sean las isoformas microsomales de GPAT las inducidas en este proceso podría explicar resultados de estudios de lipidómica que muestran un aumento en la masa de varios PL (tales como PC y PA) particularmente en retículo endoplásmico tras la activación de células RAW 264.7 (Andreyev, et al., 2010). Por otro lado, es llamativo que los perfiles temporales de expresión de GPAT3 y GPAT4 son diferentes. Particularmente, *Gpat3* aumenta a las 8 hs de tratamiento y si bien se observa una disminución de la expresión en función del tiempo, los niveles de expresión permanecen altos a las 24hs de tratamiento, mientras que el aumento de expresión de *Gpat4* es mucho más agudo, con un pico a las 8hs que desciende bruscamente a los niveles basales a las 12 y 24hs. Esta respuesta podría sugerir roles diferenciales para la actividad de las enzimas codificadas por estos genes.

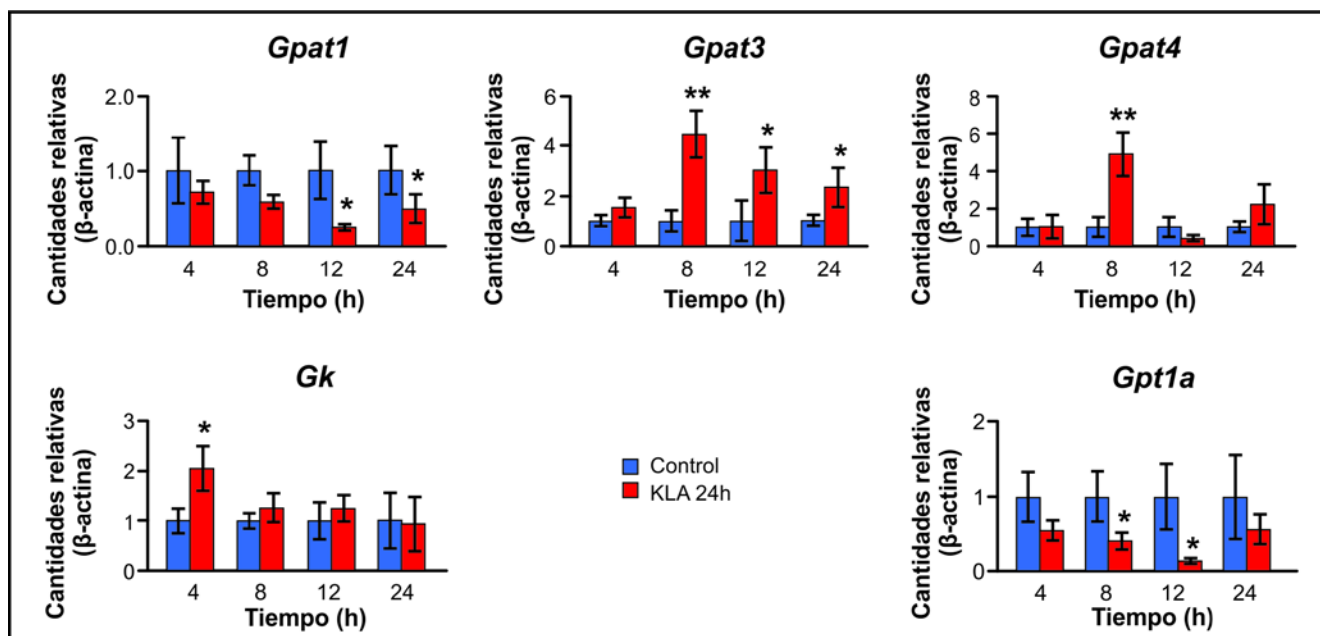


Figura 3. Análisis de la expresión de genes relacionados al metabolismo de glicerolípidos durante la activación de células RAW 264.7. Se realizó la extracción de RNA de células RAW 264.7 tratadas durante 4, 8, 12 o 24hs con KLA y luego de realizada la retrotranscripción, se cuantificó la expresión por qPCR de los genes indicados. Los resultados fueron normalizados por comparación con β -actina y son promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

1.1.4. La expresión de *GPAT3* y *GPAT4* aumenta durante la transición de monocitos THP1 a macrófagos luego del tratamiento con ésteres de forbol.

Como se detalló en la sección introductoria, los macrófagos son células fagocíticas de linaje mieloide que se diferencian a partir de monocitos bajo la acción de determinados estímulos. Bajo la hipótesis de que en el proceso de diferenciación se expresarán diferencialmente genes vinculados con la funcionalidad del macrófago, se estudió la expresión de genes que codifican GPATs durante este proceso. Para ello se utilizaron monocitos humanos THP1, los que fueron estimulados a la diferenciación mediante incubación durante diferentes tiempos con ésteres de forbol (PMA). La diferenciación a macrófago se evidencia a simple vista por la adhesión de los monocitos que inicialmente crecen en suspensión a la superficie de las placas de cultivo.

En este modelo de diferenciación se observó que *GPAT1* permaneció constante y *GPAT2* no se expresó, mientras que *GPAT3* mostró un aumento de 4 y 5 veces luego de 12 y 24hs de tratamiento respectivamente ($p < 0,01$) y *GPAT4* se duplicó luego de 12hs ($p < 0,01$) (Figura 4). *CPT1a* disminuyó su expresión en alrededor de un 40% a las 8, 12 y 24hs ($p < 0,05$, $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) indicando una posible regulación negativa sobre la β -oxidación de los FA. Estos resultados, fortalecen la idea de que tanto *GPAT3* como *GPAT4* desempeñan un rol relevante en el metabolismo de glicerolípidos de macrófagos, ya que los genes que las codifican no sólo se inducen durante el proceso de activación, sino que también lo hacen durante la diferenciación de macrófagos a partir de monocitos.

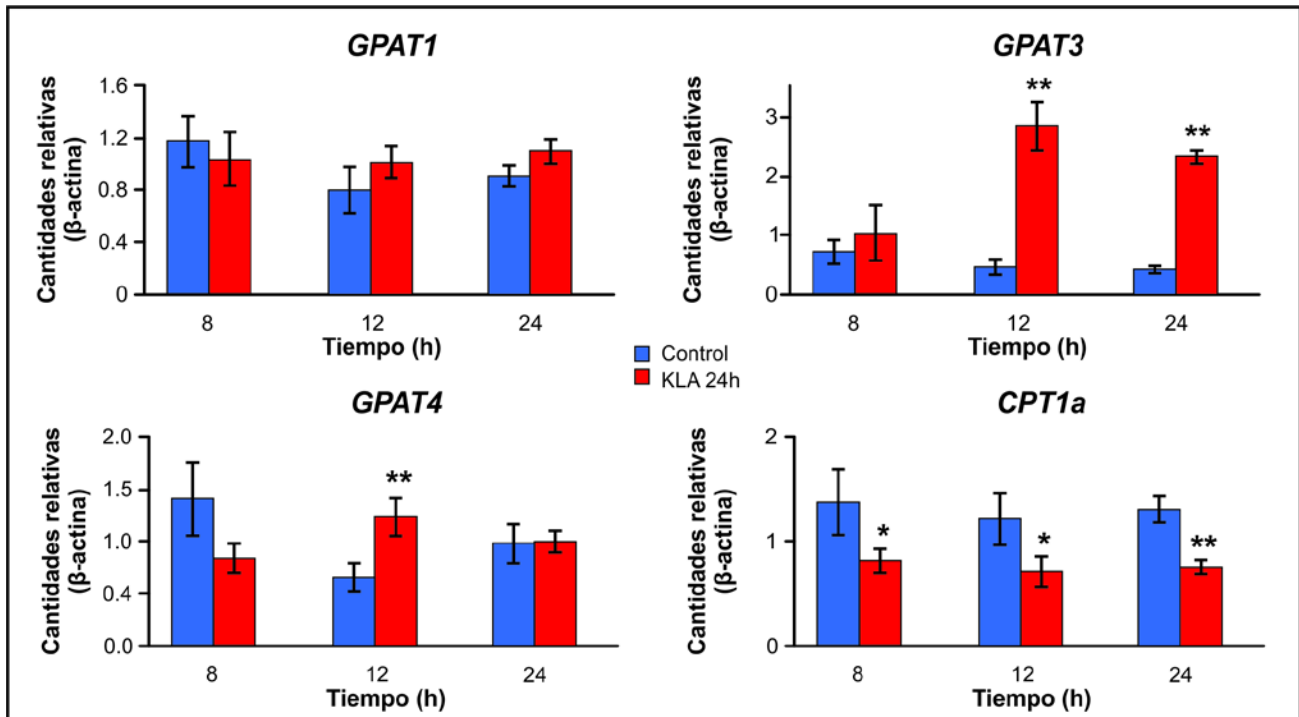


Figura 4. Expresión de genes relacionados al metabolismo de glicerolípidos durante la transición de monocitos THP1 a macrófagos mediante el tratamiento con PMA. Se realizó la extracción de RNA de células THP1 tratadas durante 8, 12 o 24hs con PMA y luego de realizada la retrotranscripción, se cuantificó la expresión por qPCR de los genes indicados. Los resultados fueron normalizados por comparación con β-actina y son promedio de 3 experimentos independientes. *p <0,05, **p<0,01.

1.1.5. La actividad GPAT aumenta tras la activación de células RAW 264.7 con KLA

Si bien los niveles de expresión de genes sugieren ciertos cambios metabólicos, es importante analizar la actividad de las proteínas que codifican para estudiar su rol a nivel bioquímico. Es por ello que se analizó la actividad GPAT en lisados de células RAW 264.7 tratadas con KLA durante 4, 8, 12 y 24hs. Se observó que **la actividad GPAT NEM sensible atribuible a GPAT3 y GPAT4 fue 27% mayor (p<0,05) a las 8 hs con respecto al control** mientras que la actividad GPAT NEM resistente correspondiente a GPAT1 no se modificó durante todo el tratamiento (Figura 5).

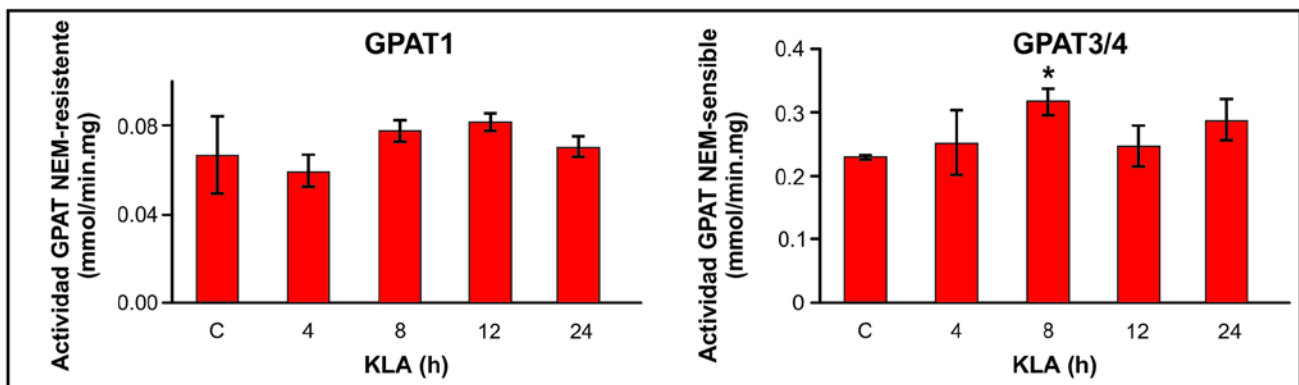


Figura 5. Actividad enzimática de GPAT3 y/o 4 durante la activación de células RAW 264.7. La actividad GPAT fue analizada en lisados totales de células tratadas con KLA durante diferentes tiempos en presencia o ausencia de NEM 2 mM. Los resultados

son promedio de tres experimentos independientes. *p <0,05, **p<0,01.

1.1.6. La activación de macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón produce la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL.

Las células RAW 264.7 han sido ampliamente utilizadas como modelo de macrófagos murinos en distintos tipos de estudios. Sin embargo, la utilidad de esta línea celular para el análisis del metabolismo y la respuesta inflamatoria durante la activación es limitada, ya que se ha descrito que las células RAW 264.7 presentan una respuesta mucho más atenuada en comparación a la de macrófagos primarios luego de ser activados con KLA (Maurya, et al., 2013). Esto podría deberse a que se trata de células inmortalizadas que después de múltiples pasajes sufren desdiferenciación y adquieren rasgos similares a los de células tumorales, alejándose gradualmente de las características fenotípicas de su tipo celular original. Por tal motivo, y con el objetivo de **utilizar otro modelo que permita verificar los resultados obtenidos en células RAW 264.7, se utilizaron macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDM)**. La activación de estas células mediante tratamiento con KLA se confirmó también determinando el nivel de expresión de la citoquina pro-inflamatoria *Tnf-α*. Los resultados indican que este marcador de diferenciación se sobre-expresa desde las 4h de tratamiento (p<0,001), alcanzando un pico a las 8 hs de tratamiento donde el gen se sobre-expresa 35 veces (p<0,01) (Figura 6A). La acumulación de gotas de lípido en este modelo se analizó tras 24 hs de tratamiento con KLA y se observó un aumento del 50% (p<0,001) (Figura 6B-C). Asimismo, **la masa de TAG aumentó poco más de dos veces** (p<0,01) (Figura 5D) y **la masa de PL también se duplicó tras 24 hs** de tratamiento (p<0,001) (Figura 6E). Estos resultados son coherentes con los obtenidos al activar células RAW 264.7 con KLA, ya que los incrementos en la masa de TAG y PL son comparables en ambos modelos.

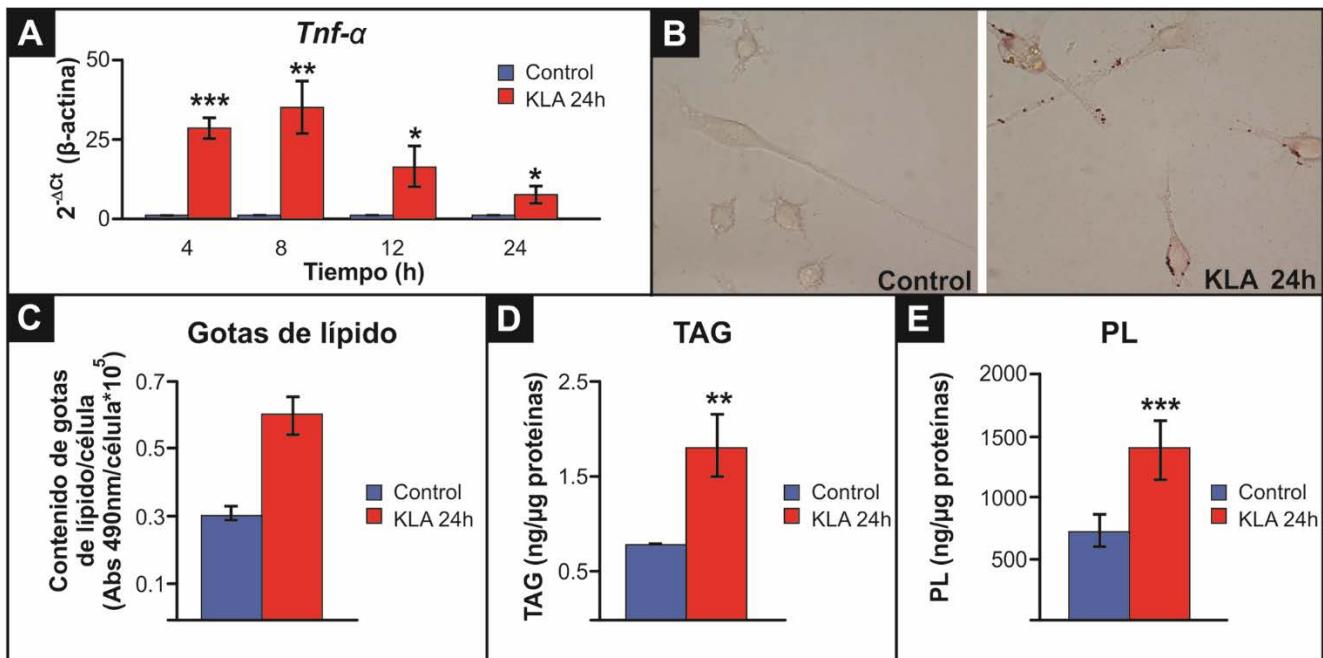


Figura 6. Activación y acumulación de glicerolípidos en BMDM tratados con KLA. Se realizó la extracción de médula ósea de ratones C57 y su diferenciación en macrófagos (BMDM) mediante el uso de M-CSF. Posteriormente, las células fueron tratadas con KLA 100ng/ml durante los tiempos que se indican. **A)** Se realizó la extracción de RNA y retrotranscripción seguida

de qPCR para cuantificar la expresión del marcador de diferenciación *Tnf- α* . **B-C)** Las células fueron fijadas y teñidas con Oil-Red O y se cuantificó el contenido de gotas de lípido por célula mediante la extracción del colorante incorporado con isopropanol. **D)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con KLA durante 24h. Se cuantificaron los TAG totales mediante el método enzimático de Trinder. **E)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con KLA durante 24h. Los lípidos fueron separados mediante TLC y los PL totales fueron cuantificados mediante comparación con curva estándar. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. *p <0,05, **p <0,01, ***p<0,001.

1.1.7. La activación de BMDM con KLA produce un incremento en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos

A fin de evaluar si en este modelo también se activa la síntesis de novo de glicerolípidos, se trataron BMDM con KLA durante 24h y en las últimas 3 hs de tratamiento se los incubó con [¹⁴C]-acetato o [¹⁴C]-ácido oleico (OA) y se observó su incorporación en distintas clases de lípidos. Los resultados mostraron un **aumento significativo (p<0,001) de un 30% en la incorporación de [¹⁴C]-acetato en lípidos totales** luego de 24h de tratamiento y al analizar la incorporación de marca en las distintas fracciones lipídicas, se observó un incremento significativo de aproximadamente el doble en las fracciones PL, FFA y TAG (Figura 7A). Por otro lado, no hubo diferencias en la incorporación de acetato en Cho o CE. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en las células RAW 264.7 (Figura 2A), ya que se aprecia un aumento en la síntesis de novo de FA los cuales son canalizados hacia la síntesis de novo de glicerolípidos y así mismo no se aprecian diferencias en la incorporación de los mismos en CE.

A diferencia de lo que ocurre en las células RAW 264.7, en este modelo sí **se observó un aumento significativo del 28% (p<0,01) en la incorporación de [¹⁴C]-OA exógeno en lípidos totales**. Además, si bien coincide con lo observado en esa línea celular, estos FA exógenos son incorporados en TAG y DAG, en donde se ve un aumento de 2.4 veces (p<0,001) y del 72% (p<0,05) respectivamente, en el caso de los BMDM el OA exógeno también se incorpora en PL y en particular, aumenta su incorporación un 45% en PI/PS (p<0,01), y un 83% en PC (p<0,001) (Figura 7B). Esto no ocurre en células RAW 264.7, en donde los FA exógenos son canalizados mayormente hacia la síntesis de TAG (Figura 2B).

Estos resultados además coinciden con los reportados por Huang, et al., 2013, que sostienen que luego de la activación de macrófagos primarios se produce una retención a largo plazo de reservas de TAG en gotas de lípido alimentado por un aumento en la captación y esterificación de FA exógenos en glicerolípidos, aumento en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos y disminución en la lipólisis y β -oxidación de lípidos reservados.

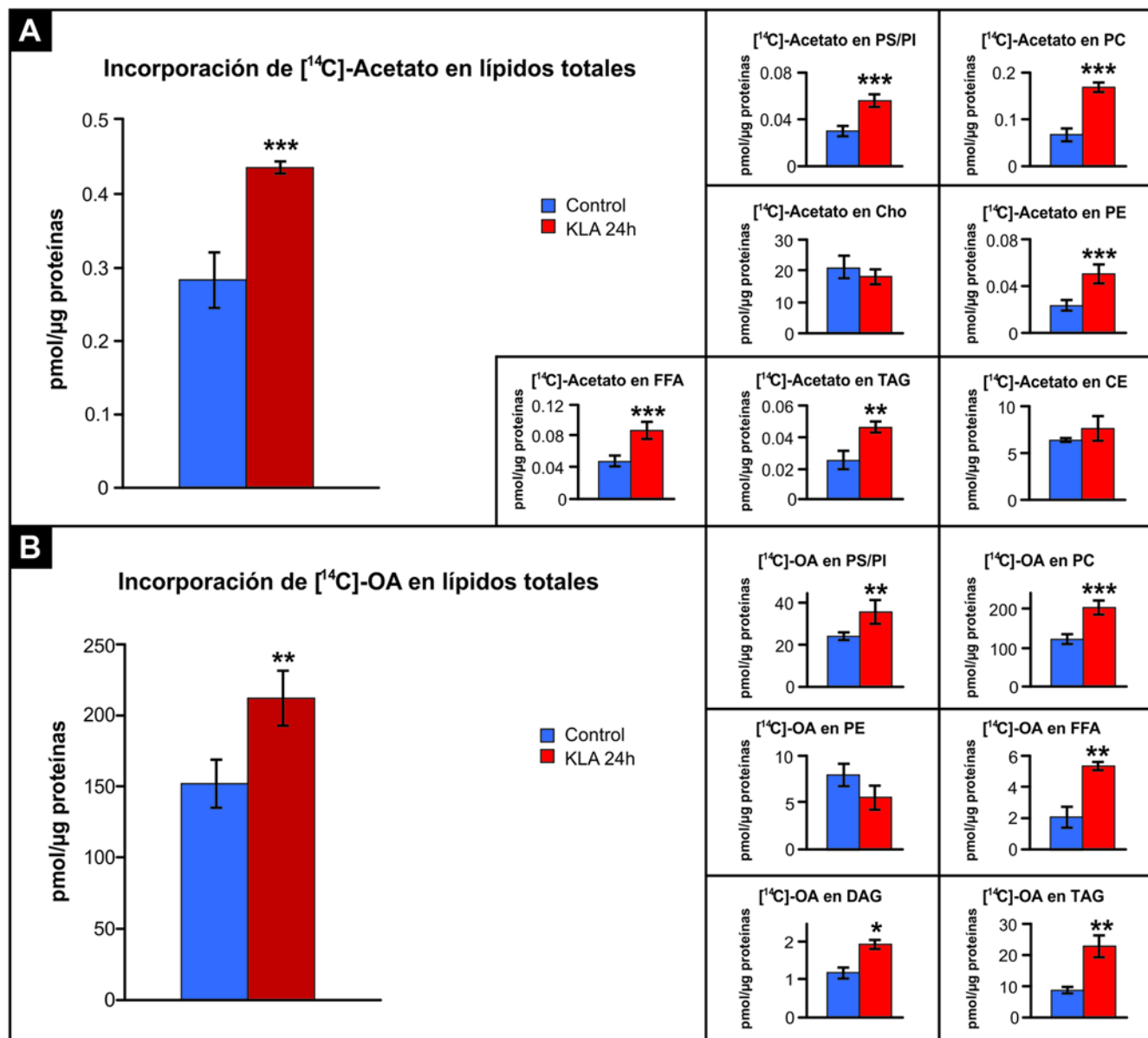


Figura 7. Incorporación de $[^{14}\text{C}]$ -acetato y $[^{14}\text{C}]$ -ácido oleico en glicerolípidos durante la activación de BMDM. BMDM fueron tratados durante 24hs con KLA y en las últimas 3hs de tratamiento se los incubó con **A)** $[^{14}\text{C}]$ -acetato o **B)** $[^{14}\text{C}]$ -ácido oleico (OA). Los lípidos totales fueron extraídos utilizando el método de Bligh y Dyer y separados por TLC. La marca incorporada en cada tipo de lípido fue cuantificada en un equipo Bioscan y analizada por comparación con estándares. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

1.1.8. La actividad GPAT3/4 aumenta tras la activación de BMDM con KLA pese a la disminución de la expresión del mRNA.

Con el objetivo de evaluar la expresión de los genes que codifican para GPATs durante la activación de BMDM, se midió mediante qPCR la cantidad de su mRNA en función del tiempo de tratamiento con KLA. Al igual que lo que ocurre tras la activación de células RAW 264.7 (Figura 3), la expresión de genes que codifican para enzimas que metabolizan FA en la mitocondria (*Gpat1* y *Cpt1*) disminuye, y en este caso también se produce un incremento

significativo de la expresión de *Gk*, aunque en este modelo es de mayor magnitud (15 veces a las 8 hs de tratamiento, $p < 0,001$) (Figura 8A). Por otra parte, inesperadamente, **los genes que codifican para GPATs microsomales no aumentaron su expresión sino que por el contrario disminuyeron.**

Por otra parte, se midió la actividad GPAT atribuible a GPAT1 (NEM resistente) y a GPAT3/4 (NEM sensible). Mientras que la actividad de GPAT1 se mantuvo constante durante todo el tratamiento, **la actividad atribuible a GPAT3/4 aumentó significativamente 3 veces a las 8 hs de tratamiento** ($p < 0,001$), retornando subsecuentemente a los niveles basales (Figura 8B). Estos resultados de aumento de actividad enzimática a pesar de la ausencia de un aumento a nivel de mRNA sugieren algún tipo de activación post-transcripcional para alguna o ambas isoformas microsomales con actividad NEM sensible.

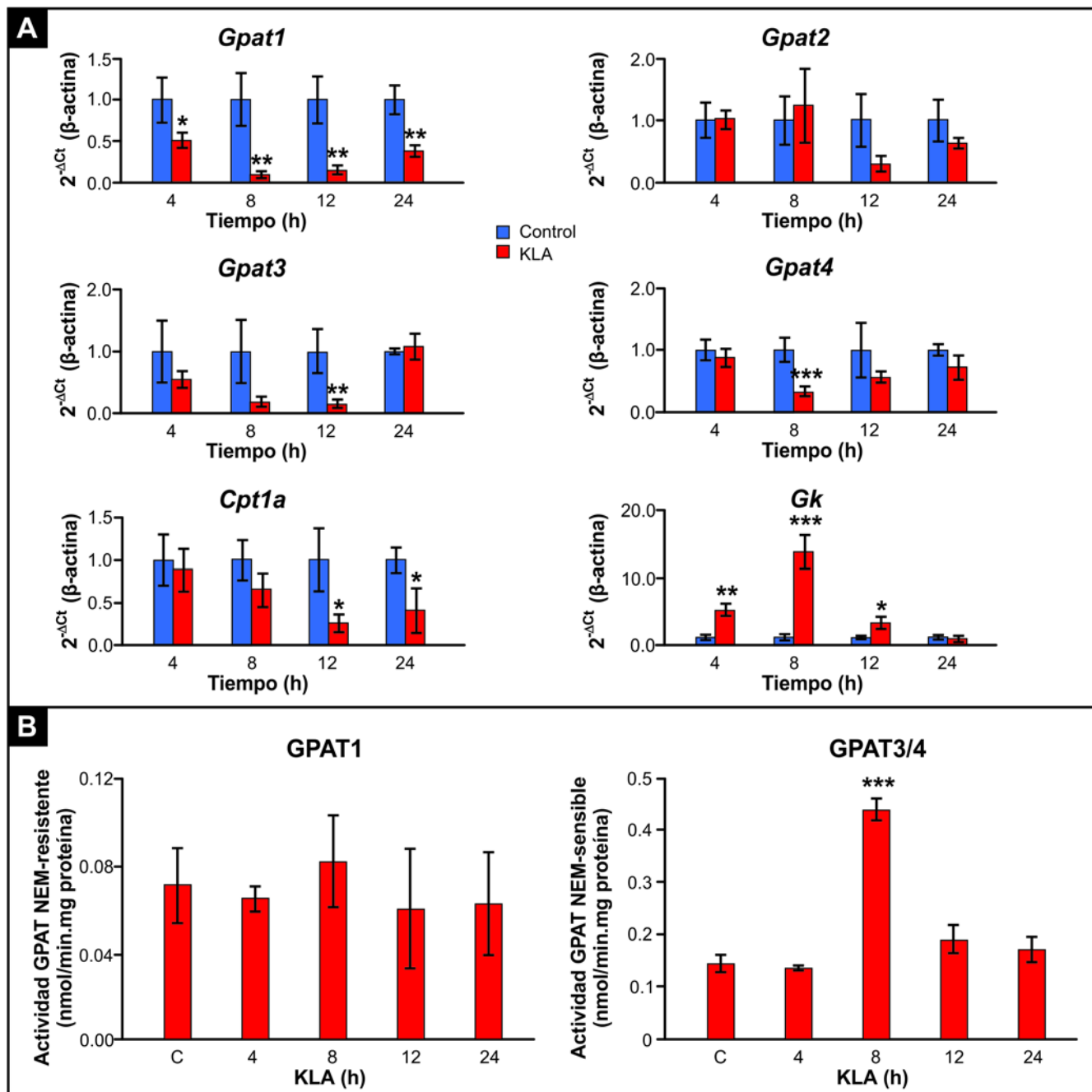


Figura 8. Expresión y actividad de enzimas relacionadas al metabolismo de glicerolípidos durante la activación de BMDM. **A)** Las células fueron tratadas con KLA durante 4, 8, 12 y 24hs y se cuantificó la expresión por qPCR de los genes indicados. Los resultados fueron normalizados por comparación con β -actina y son promedio de 3 experimentos independientes **B)** La actividad GPAT fue analizada en particulados totales de BMDM tratados con KLA durante diferentes tiempos en presencia o ausencia de NEM 2 mM . Los resultados son promedio de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

1.2. ROL DE GPAT3 Y GPAT4 EN EL METABOLISMO DE GLICEROLÍPIDOS Y SUS CONSECUENCIAS FUNCIONALES DURANTE LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS

1.2.1. El silenciamiento de *Gpat3* en células RAW 264.7 provoca una disminución en la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL.

Habiendo determinado que la síntesis de novo de glicerolípidos se ve incrementada tras la activación de macrófagos con KLA y que particularmente la actividad GPAT aumenta, se procedió a silenciar el gen que codifica para GPAT3 con el fin de analizar la contribución del mismo al aumento en la masa de glicerolípidos. Para ello, se obtuvo una línea celular derivada de la RAW 264.7 en la que se silenció *Gpat3* mediante el uso de un shRNA específico vehiculizado con partículas lentivirales (a partir de ahora sh*Gpat3*). Como control se utilizó una línea celular RAW scramble (SCR) que contiene un shRNA que no silencia ningún gen conocido. El silenciamiento produjo una reducción del 75% en la cantidad de RNA mensajero de *Gpat3* ($p < 0,001$) (Figura 9A). Las consecuencias fenotípicas del silenciamiento de *Gpat3* fueron contundentes: **el silenciamiento del gen abolió la capacidad de las células RAW 264.7 de responder con un aumento de la masa PL y de las gotas de lípido intracelulares frente al tratamiento con KLA** (Figura 9B-C), mientras que la masa de TAG luego de la activación resultó significativamente menor a la de células SCR, lo que demuestra que GPAT3 tiene un rol protagónico en la acumulación de glicerolípidos durante la activación de macrófagos.

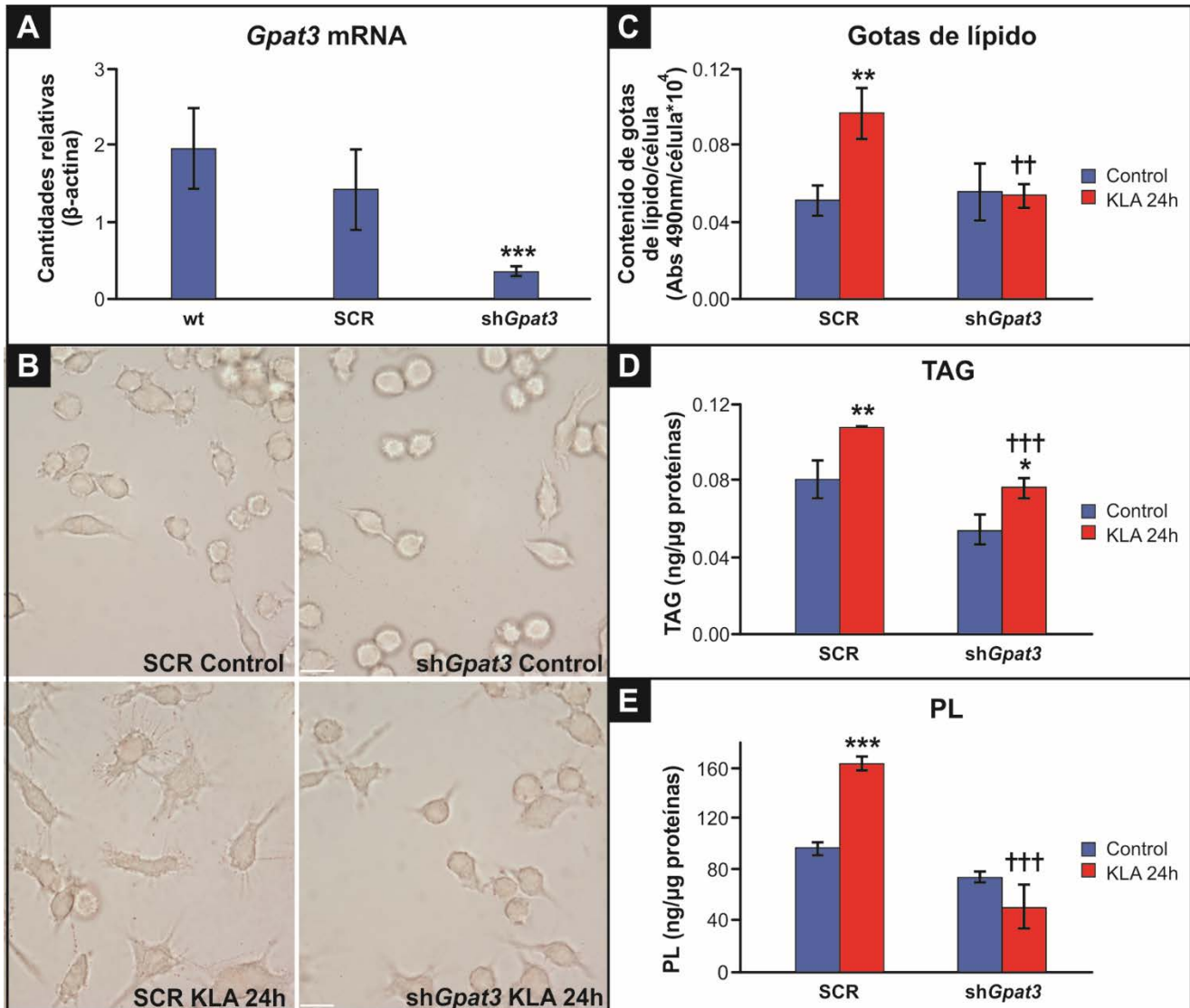


Figura 9. Efecto del silenciamiento de *Gpat3* sobre la acumulación de lípidos en células RAW264.7 tratadas con KLA. A) Análisis mediante qPCR del nivel de expresión de *Gpat3* en células RAW 264.7 (*wt*), SCR, y *shGpat3*. **B-C)** Células RAW 264.7 SCR y *shGpat3* fueron tratadas con KLA durante 24hs, fijadas y teñidas con Oil-Red O y se cuantificó el contenido de gotas de lípido por célula mediante el análisis de la incorporación del colorante. **D)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con KLA durante 24hs. Se cuantificaron los TAG totales mediante el método enzimático de Trinder. **E)** Los lípidos de células tratadas durante 24hs con KLA fueron extraídos y separados mediante TLC y los PL totales fueron cuantificados mediante comparación con curva estándar. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 respecto al control, †††*p* < 0,001, ††*p* < 0,01 con respecto al SCR+KLA.

1.2.2. El silenciamiento de *Gpat3* produce una disminución en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos en células RAW 264.7 activadas.

A fin de determinar con mayor profundidad el impacto del silenciamiento de GPAT3 en la síntesis de novo de glicerolípidos estimulada por tratamiento con KLA, se trataron células RAW 264.7 SCR y *shGpat3* con KLA durante 24h y en las últimas 3 hs de tratamiento se las incubó con [¹⁴C]-acetato o [¹⁴C]-OA y se analizó la incorporación de marca en cada una de las clases de lípidos como se describió con anterioridad. El tratamiento de las células SCR con KLA, produjo un incremento significativo del 28% en la incorporación de [¹⁴C]-acetato en lípidos

totales ($p < 0,05$) en coincidencia con lo reportado para las células RAW 264.7 *wt* (Figura 2A). Sin embargo, **el tratamiento de las células shGpat3 con KLA no produjo cambios estadísticamente significativos en la incorporación de [¹⁴C]-acetato en lípidos totales, así como tampoco en ninguna de las clases lipídicas analizadas.** Asimismo, en estado basal sin activar, las células shGpat3 incorporaron menos [¹⁴C]-acetato en PC y PE con respecto a las células control. Con respecto a la incorporación de [¹⁴C]-OA exógeno, las células SCR no muestran diferencias estadísticamente significativas entre células control y tratadas mientras que las células shGpat3 exhiben una disminución de casi el 50% en la incorporación al ser activadas ($p < 0,05$).

Estos resultados permiten concluir que la actividad de GPAT3 es fundamental para síntesis de novo de glicerolípidos, tanto de PL como de TAG, y que dicha isoforma contribuye de manera contundente a la acumulación de los mismos tras la activación con KLA. Asimismo, se puede inferir que el silenciamiento de *Gpat3* produce un efecto sobre la síntesis de novo de FA, ya que mientras que en las células SCR la incorporación de [¹⁴C]-acetato en FFA aumenta luego de la activación, en las células silenciadas no se ve una diferencia significativa con respecto al control. Esto sugiere que podría existir un acoplamiento de ambos procesos de forma tal que ante la disminución de GPAT3 y la incapacidad de esterificar los FA en glicerolípidos, el exceso de los mismos podría inhibir su síntesis de novo. Por último, la observación que la incorporación de [¹⁴C]-acetato aumenta en PL durante la activación pero no la de [¹⁴C]-OA, nos permite concluir que la fuente de FA para la síntesis de dichas biomoléculas no es exógena, sino que proviene de la síntesis de novo a partir de acetil-CoA.

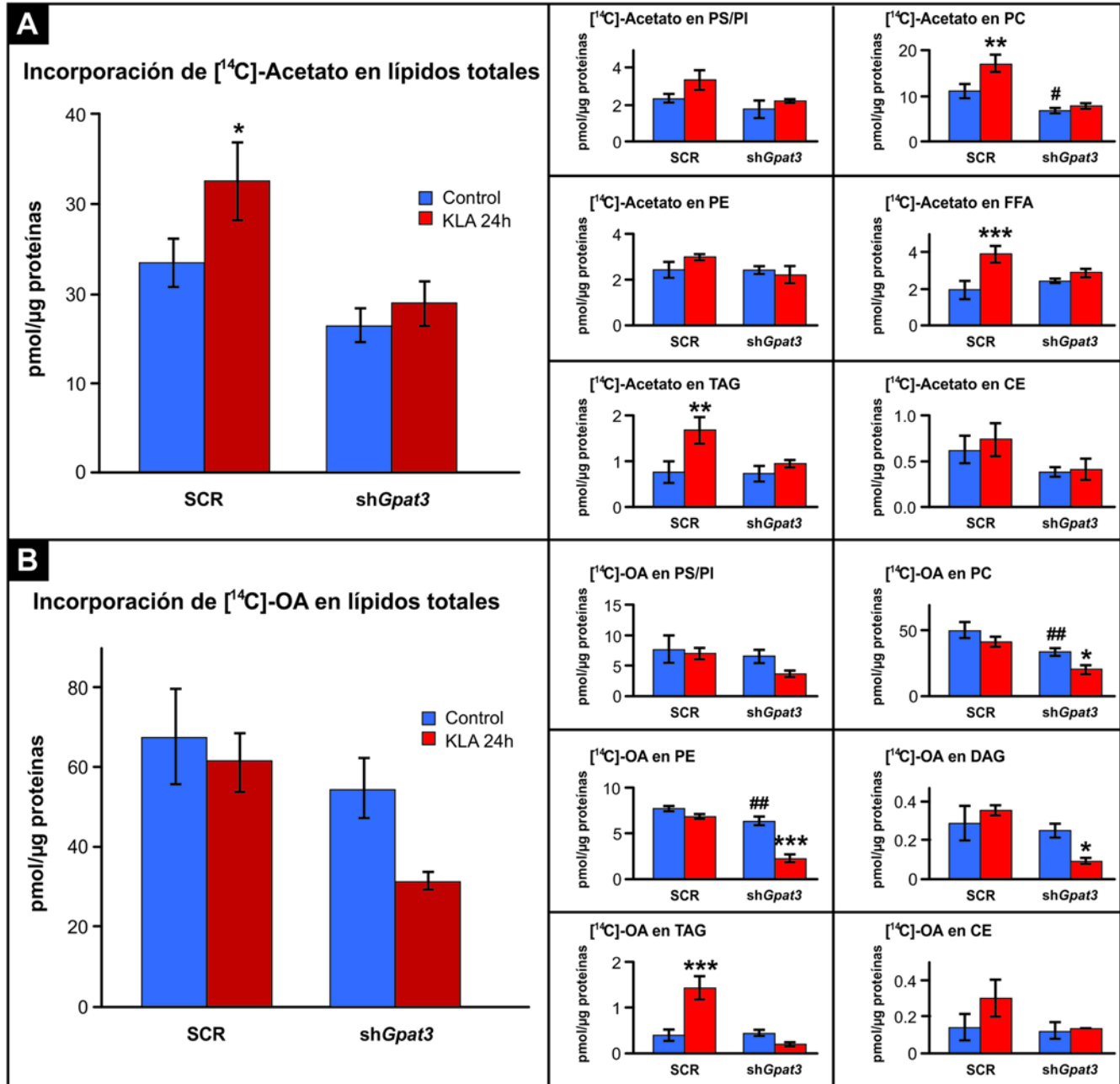


Figura 10. Efecto del silenciamiento de *Gpat3* sobre la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ -acetato y $[^{14}\text{C}]$ -AO en glicerolípidos durante la activación de células RAW 264.7. Células SCR y *shGpat3* fueron tratados durante 24hs con KLA y en las últimas 3hs de tratamiento se los incubó con **A**) $[^{14}\text{C}]$ -acetato o **B**) $[^{14}\text{C}]$ -ácido oleico (OA). Los lípidos totales fueron extraídos utilizando el método de Bligh y Dyer y separados por TLC. La marca incorporada en cada tipo de lípido fue cuantificada en un equipo Bioscan y analizada por comparación con estándares. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ con respecto al control sin tratar. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto al SCR control.

1.2.3. Los BMDM *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} poseen una menor actividad GPAT NEM-sensible y acumulan menos gotas de lípido, TAG y PL luego de su activación

A partir de los resultados obtenidos al trabajar con células RAW 264.7, se pudo observar que la actividad de GPAT3 resulta crucial para el aumento en la masa de glicerolípidos en

macrófagos activados. Con el objetivo de discernir si existe un rol diferencial en la actividad de GPAT3 y GPAT4, se utilizaron como modelos experimentales BMDM obtenidos a partir de ratones *knock-out Gpat3^{-/-}* y *Gpat4^{-/-}* y se procedió a estudiar el efecto de la ausencia total de cada isoforma durante la activación de macrófagos primarios.

En principio fue posible comprobar que el aumento de 3 veces en la actividad GPAT NEM-sensible correspondiente a GPAT3/4 que se ve en BMDM *wt* tratados con KLA a las 8h ($p < 0,001$), es significativamente menor en ambos macrófagos *knock-out*, siendo el efecto mucho más marcado en los BMDM *Gpat4^{-/-}* en donde se alcanza una reducción del 70% y se pierde completamente el pico de aumento a las 8hs, en comparación con los BMDM *Gpat3^{-/-}* en los que la disminución es del 44% con respecto al *wt* ($p < 0,001$) pero aún se conserva una diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a su control sin tratar (Figura 11A). Como se realizó en los demás modelos experimentales, se procedió a analizar el efecto de la ausencia de GPAT3 o GPAT4 sobre la acumulación de gotas de lípido a través de la tinción con Oil-Red O. El tratamiento de BMDM *wt* con KLA produjo un aumento significativo de casi el doble en las gotas de lípido, un aumento del 50% en la masa TAG y un aumento de aproximadamente un 70% en los PL totales tras 24h de tratamiento con KLA. Por el contrario, **los BMDM derivados de ratones *Gpat3^{-/-}* y *Gpat4^{-/-}*, acumularon menos gotas de lípido y estas fueron de menor tamaño, en concordancia con un aumento más discreto en la masa de TAG y una masa de PL que no se modificó** (Figura 11B-C). Estos resultados, junto con los observados en células RAW *shGpat3* confirman que GPAT3 posee un rol fundamental en la acumulación de ambos glicerolípidos, TAG y PL, durante la activación de macrófagos, pero que GPAT4 también es necesaria para este proceso.

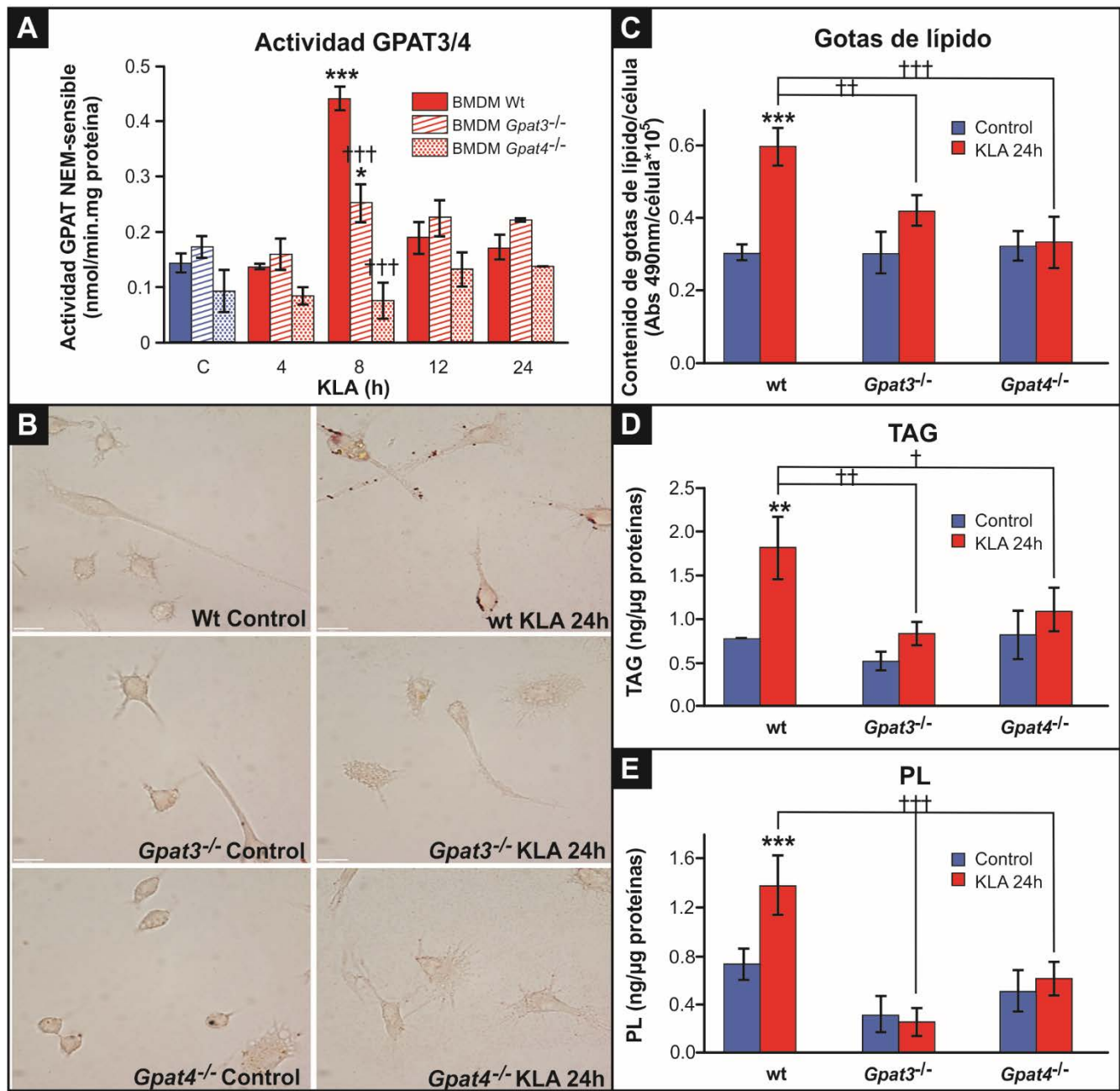


Figura 11. Efecto de la ausencia de *Gpat3* o *Gpat4* sobre la actividad GPAT NEM-sensible y la acumulación de lípidos en BMDM tratados con KLA. A) Se midió el nivel de actividad GPAT en presencia o ausencia de NEM en BMDM *wt*, *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} tratados con KLA durante los tiempos indicados. La actividad NEM-sensible se calculó por sustracción. B-C) BMDM *wt*, *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} fueron tratados con KLA durante 24hs, fijados y teñidos con Oil-Red O y se cuantificó el contenido de gotas de lípido por célula mediante el análisis de la incorporación del colorante. D) Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con KLA durante 24hs. Se cuantificaron los TAG totales mediante el método enzimático de Trinder. E) Los lípidos de células tratadas durante 24hs con KLA fueron extraídos y separados mediante TLC y los PL totales fueron cuantificados mediante comparación con curva estándar. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. **p <0,01, ***p<0,001, †p<0,05 con respecto al control WT+KLA, ††p<0,01 con respecto al control WT+KLA, †††p<0,001 con respecto al control WT+KLA.

1.2.4. La ausencia de GPAT3 o GPAT4 produce una disminución en la síntesis de novo de FA y glicerolípidos en BMDM activados.

A fin de determinar el efecto de la ausencia de GPAT3 o GPAT4, no sólo en la acumulación de glicerolípidos, sino particularmente en la síntesis de novo de los mismos, se incubaron BMDM de ratones *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} con KLA durante 24hs y en las últimas 3 hs de tratamiento se agregó [¹⁴C]-acetato o [¹⁴C]-OA y se analizó la incorporación de marca en cada una de las clases de lípidos como se describió con anterioridad. Al igual que lo observado en células RAW 264.7, los BMDM *wt* presentan un aumento del doble en la incorporación de [¹⁴C]-acetato en lípidos totales luego de 24hs de tratamiento con KLA (p<0,001). Este aumento se ve específicamente en PI/PS (96%), PC (2.5 veces), PE (2 veces), FFA (2 veces) y TAG (2 veces) (p<0,001 en todos los casos) (Figura 12A). **Los BMDM *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} activados incorporaron un 30 y 40% menos acetato marcado en lípidos totales respectivamente en comparación con los BMDM *wt*** (p<0,001). Al analizar la incorporación en cada lípido en particular, se puede ver que al igual de lo que sucede con las células RAW sh*Gpat3* (Figura 10A), los BMDM *Gpat3*^{-/-} activados presentaron una reducción del 62% en la incorporación de [¹⁴C]-acetato en PC (p<0,001), del 50% en PE (p<0,001) y del 24% en TAG (p<0,05) respecto de los BMDM *wt* activados, y además en estos casos, otra vez coincidiendo con lo observado en células RAW 264.7 sh*Gpat3*, la incorporación de acetato marcado en células tratadas no difiere significativamente de los controles, mostrando que **la ausencia de GPAT3 provoca una anulación en el aumento de la síntesis de novo de ambos PL y TAG durante la activación de macrófagos**. Los BMDM *Gpat4*^{-/-}, por otro lado, mostraron una disminución en la incorporación de [¹⁴C]-acetato del 45% en PC (p<0,001), del 24% en FFA (p<0,01) y del 51% en TAG (p<0,01) luego del tratamiento con KLA. En este caso, a diferencia de lo observado en BMDM *Gpat3*^{-/-}, si bien se producen reducciones en la incorporación de marca en los PL (PC y PE), éstas células activadas aún conservan diferencias significativas con respecto a sus controles (p<0,01), no así en el caso de la incorporación en TAG. Estas observaciones nos permitirían sugerir un comportamiento diferencial entre GPAT3 y GPAT4 en la síntesis de novo de glicerolípidos. Si bien la ausencia de ambos afecta en la síntesis de PL y TAG, al parecer, mientras GPAT3 es muy importante para la síntesis de ambos grupos de glicerolípidos, GPAT4 parece ser mucho más relevante para la síntesis de TAG en este contexto fisiológico.

En lo referente a **la incorporación de [¹⁴C]-OA** en lípidos totales, los BMDM *wt* mostraron un aumento significativo del 28% (p<0,05) luego de 24hs de tratamiento con KLA, mientras que la incorporación **en los BMDM de ratones *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-}** no exhibe diferencia significativa con respecto al control y **es un 30% y 24% menor a la registrada en BMDM *wt*** (p<0,01 y p<0,05 respectivamente) (Figura 12B). Analizando la incorporación de marca en cada clase de lípido se puede ver que los BMDM *wt* presentan un aumento significativo en la incorporación de [¹⁴C]-OA en PI/PS (45%, p<0,01), PC (83%, p<0,001), DAG (72%, p<0,05), y TAG (2.4 veces, p<0,001), observándose además, una incorporación de 3 veces mayor (p<0,001) de FA marcados exógenos una vez que los macrófagos son activados, mostrando nuevamente que en ingreso de FA exógenos a la célula aumenta cuando se produce esta estimulación. En los BMDM *Gpat3*^{-/-} en estado basal sin tratar, la incorporación de marca es significativamente menor en PI/PS (42%, p<0,01), PC (32%, p<0,05), PE (24%, p<0,05) y DAG (53%, p<0,05). En los BMDM *Gpat4*^{-/-} en estado basal, la incorporación de marca es significativamente menor en PI/PS (50%, p<0,01), PC (37%, p<0,01), PE (43%, p<0,01) y DAG

(52%, $p < 0,05$). Los *Gpat3*^{-/-} activados presentan una disminución en la incorporación de ácido graso radioactivo en PI/PS (47%, $p < 0,001$), PC (41%, $p < 0,001$), PE (50%, $p < 0,05$), DAG (29%, $p < 0,05$) y TAG (68%, $p < 0,001$) respecto a los BMDM *wt* activados, y sólo la incorporación en PC y la cantidad de FFA marcados muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) luego de la activación. Los BMDM *Gpat4*^{-/-}, por otro lado, también incorporan menos FA marcado que los *wt*: un 53% en PI/PS, 52% en PC, 60% en DAG y 69% en TAG ($p < 0,001$) luego de ser activados. Estos resultados nos permiten fortalecer la conclusión de que tanto GPAT3 como GPAT4 poseen un rol fundamental en la síntesis de novo de TAG que contribuyen a la acumulación de los mismos durante la activación de macrófagos, y basados en la incorporación de acetato marcado, también podemos concluir que GPAT3 sería la isoforma que actuaría específicamente en la síntesis de PL. Por último, al igual que lo observado en células RAW 264.7 sh*Gpat3*, y como puede evidenciarse en la incorporación de acetato en FFA, **la ausencia de alguna de las GPATs produce una disminución en la síntesis de novo de FA**, sugiriendo una interacción este proceso y la síntesis de glicerolípidos.

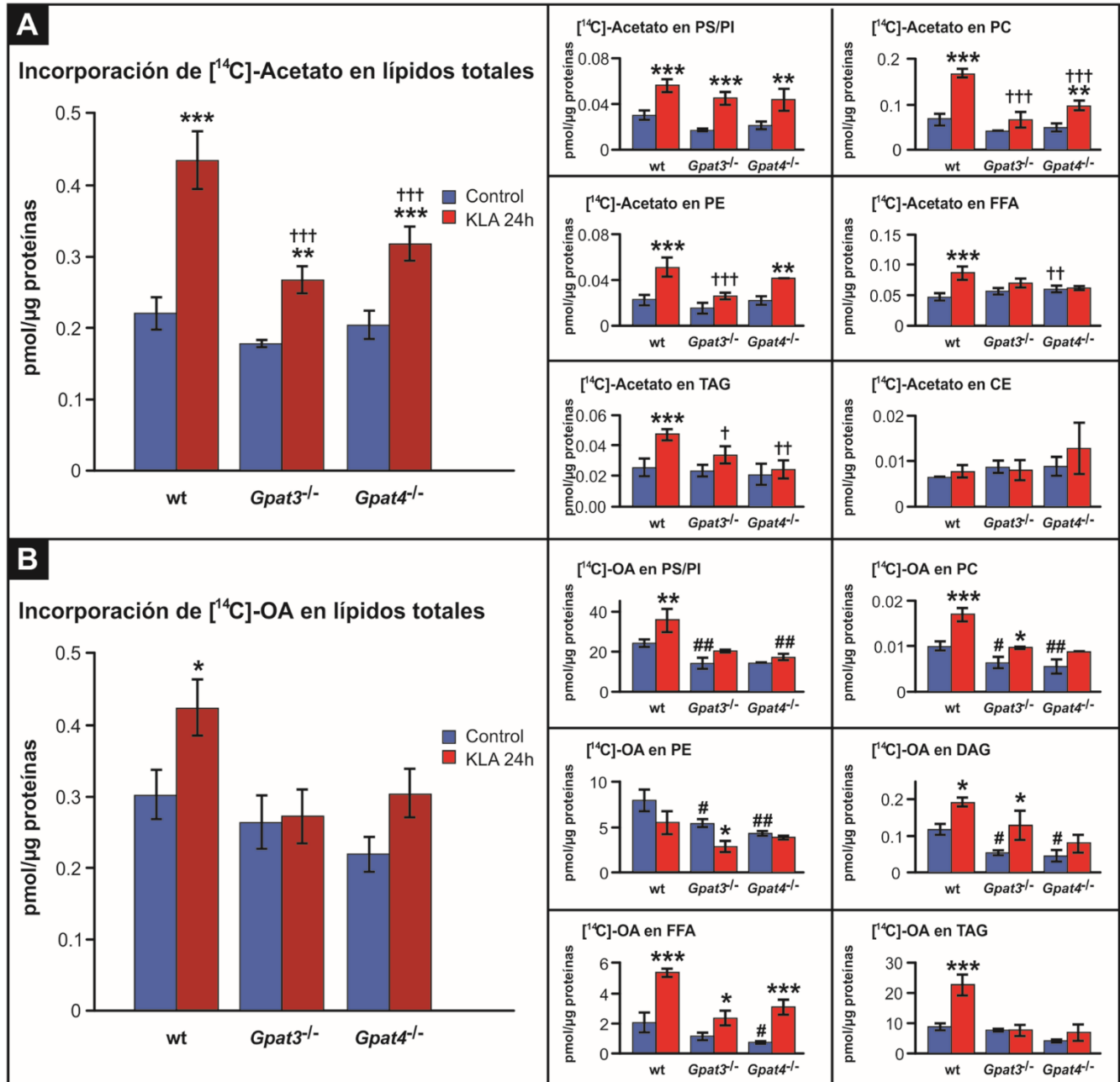


Figura 12. Efecto de la ausencia de GPAT3 o GPAT4 sobre la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ -acetato y $[^{14}\text{C}]$ -OA en glicerolípidos durante la activación de BMDM. BMDM wt, *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} fueron tratados durante 24hs con KLA y en las últimas 3hs de tratamiento se los incubó con **A)** $[^{14}\text{C}]$ -acetato o **B)** $[^{14}\text{C}]$ -OA. Los lípidos totales fueron extraídos utilizando el método de Bligh y Dyer y separados por TLC. La marca incorporada en cada tipo de lípido fue cuantificada en un equipo Bioscan y analizada por comparación con estándares. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 con respecto al control sin tratar. †*p* < 0,05 ††*p* < 0,01, †††*p* < 0,001 con respecto al WT+KLA. #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01 respecto al WT control.

1.2.5. El silenciamiento o la ausencia de *Gpat3* o *Gpat4* en células RAW 264.7 y/o BMDM afectan la capacidad fagocítica luego de la activación con KLA.

Luego de concluir que tanto GPAT3 como GPAT4 son fundamentales para lograr una

síntesis y acumulación de glicerolípidos normal durante la activación de macrófagos, se procedió a investigar cuál es la relevancia de estos glicerolípidos sintetizados por GPAT3 y GPAT4 en un aspecto funcional fundamental del macrófago: su capacidad de efectuar el proceso de fagocitosis una vez que se produce su activación. Para ello, los macrófagos se incubaron con BioPartículas *E. coli* conjugadas a una sonda sensible a pH que les permite fluorescer sólo luego de la fusión del fagosoma con el lisosoma una vez que las partículas fueron ya incorporadas en la célula. La capacidad fagocítica se midió en función de la fluorescencia por célula luego de 2hs de incubación y restando los blancos correspondientes. Más allá de la evaluación del efecto del silenciamiento o ausencia de *Gpat3* y *Gpat4* sobre la capacidad fagocítica, se decidió profundizar en el estudio de la influencia de los glicerolípidos acumulados en gotas de lípido en general sobre el proceso de fagocitosis de macrófagos y analizar de qué forma estos lípidos son necesarios para esta función primordial. En base a los antecedentes antes reportados que describen el requerimiento de la hidrólisis de TAG mediado por lipasas para que se lleve a cabo el proceso de fagocitosis en forma eficiente (Chandak, et al., 2010), hipotetizamos que los glicerolípidos acumulados en gotas de lípido podrían ejercer un rol fundamental para la fagocitosis como: A) fuente de energía a través de su consumo mediante β -oxidación y/o B) fuente de moléculas lipídicas señal iniciadoras del proceso fagocítico liberadas de las gotas de lípido a través de lipólisis (como eicosanoides sintetizados a partir del AA, PA o DAG). Para poner a prueba estas hipótesis los macrófagos fueron tratados con KLA durante 8hs y expuestos a las partículas de *E.coli* conjugadas durante las últimas 2hs de tratamiento. Esto se realizó en presencia y ausencia de Etamoxir (Inhibidor de la CPT1a y por lo tanto de la β -oxidación) o de Orlistat (Inhibidor general de la actividad lipasa). Los resultados en células RAW 264.7 SCR (Figura 13A, izquierda) mostraron que la capacidad fagocítica aumenta aproximadamente 2,5 veces luego de la activación con KLA. Cuando las células se trataron con KLA en presencia de Etamoxir (Et), la capacidad fagocítica sólo se duplicó y resultó ser significativamente menor a la alcanzada sólo con la activación con KLA, indicando que en parte, es necesaria la β -oxidación de FA para alcanzar un nivel de fagocitosis normal, pero que esta no es la fuente de energía primordial para dicho proceso. Cuando las células fueron tratadas con KLA en presencia de Orlistat (Ori), los niveles de fagocitosis fueron iguales a los del control, por lo que este compuesto bloqueó totalmente el incremento de la capacidad fagocítica que se da en forma característica durante la activación. Este resultado indicaría que es fundamental la actividad de ciertas lipasas para el normal funcionamiento de la fagocitosis. Esto resultaría coherente con la observación de Balestrieri et al., 2006 que describe que la ausencia de una fosfolipasa A2 secretoria afecta la capacidad fagocítica de macrófagos primarios. Este patrón de comportamiento fue observado en todas las células evaluadas, tanto en células RAW 264.7 (Figura 13A) como en BMDM (Figura 13B), sin embargo, **las células RAW sh*Gpat3* y los BMDM *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-}, presentaron una disminución significativa de la capacidad fagocítica tras la activación con KLA.** Esto podría deberse a que ante el silenciamiento o ausencia de *Gpat3* o *Gpat4* la célula tendría una capacidad disminuida para sintetizar y almacenar lípidos que posteriormente serían utilizados para activar o alimentar energéticamente el proceso de fagocitosis. Esta observación permite concluir que GPAT3 y GPAT4 son fundamentales para la síntesis de novo de glicerolípidos durante la activación de macrófagos y que esta acumulación de lípidos resulta fundamental para el proceso de fagocitosis de células activadas.

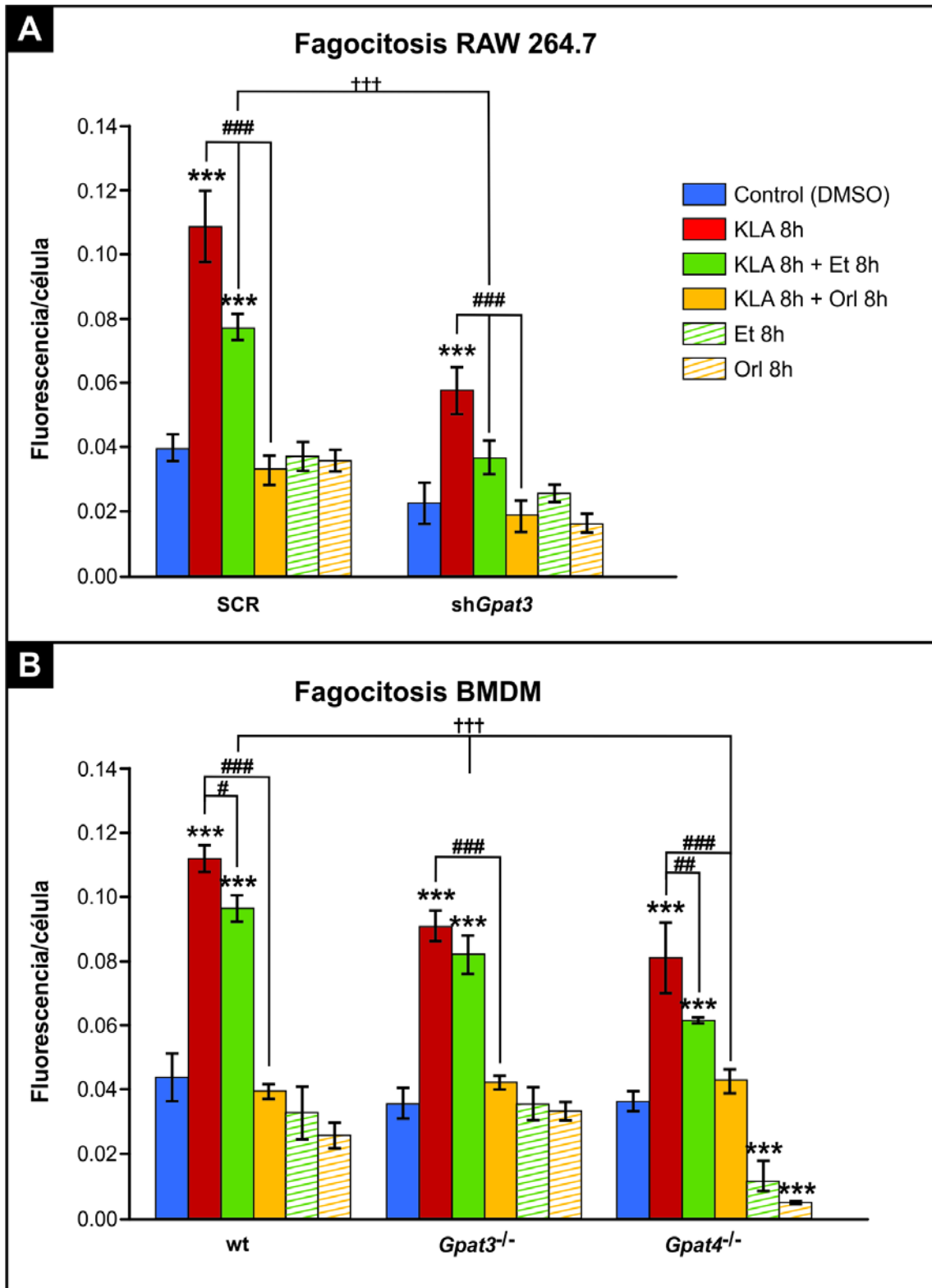


Figura 13. Efecto del silenciamiento o la ausencia de GPAT3 y/o de GPAT4 sobre la capacidad fagocítica de macrófagos. **A)** Células RAW 264.7 SCR y shGpat3 o **B)** BMDM wt, Gpat3^{-/-} y Gpat4^{-/-} fueron tratados durante 8hs con KLA, ayunados durante las últimas 4hs de tratamiento e incubados con *E.coli* conjugas con sonda fluorescente sensible a pH en las últimas 2hs de tratamiento. Las células se trataron además en presencia de Etamoxir (Et) (inhibidor de la β -activación) o de Orlistat (Orl) inhibidor de lipasas durante 8hs. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes. ***p<0,001 respecto al control, # p<0,05 respecto a las células con KLA ## p<0,01 respecto a las células con KLA, ### p<0,001 respecto a las células con KLA †p<0,05, ††p<0,001 con respecto al control SCR o wt.

1.2.6. La ausencia de *Gpat3* o *Gpat4* en BMDM afecta la expresión y liberación de citoquinas y quimioquinas al medio.

Teniendo en cuenta publicaciones previas en las que se propone que las gotas de lípido estarían asociadas a la producción de moléculas señalizadoras como eicosanoides y citoquinas (Silva, et al., 2009; Bozza, et al., 2009) y en particular la observación de que la liberación de ciertas citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α requieren de la síntesis de PC debido a que este PL resulta fundamental para la correcta remodelación de membranas del aparato de Golgi que media la formación de vesículas de liberación de dichas moléculas señal (Tian, et al., 2008), se procedió a estudiar la influencia de la ausencia de GPAT3 o GPAT4, y la consecuente deficiencia en la síntesis y acumulación de glicerolípidos en gotas de lípido sobre la expresión y liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (TNF α , MCP1 o CCL2, IL-1 β e IL-6) y citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) en BMDM. La expresión de citoquinas fue analizada mediante qPCR, mientras que la liberación de citoquinas al medio de cultivo fue evaluado a través de la técnica de inmunoensayo multiplex Luminex-MAGPIX. Al analizar los niveles de expresión de citoquinas, observamos aumento de varios órdenes de magnitud en las células tratadas con KLA con respecto al control, por lo cual los resultados se expresan como $2^{\Delta\Delta Ct}$, es decir como cantidad de veces que las muestras tratadas aumentan su expresión respecto al control. Se observó que la magnitud del aumento de la expresión de *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-6* e *Il-10* en BMDM *Gpat3*^{-/-}, fue menor al de los macrófagos *wt* y que sólo la expresión de *Mcp-1* fue similar (Figura 14A). Esta variación en la expresión de citoquinas debido a la disminución de *Gpat3* podría deberse a que esta enzima induce la vía del blanco de rapamicina de mamíferos (mTOR) (Tang, et al., 2006) y entre los efectos que caracterizan su función como promotor del crecimiento y proliferación celular, se encuentra la estimulación de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α (Vangan, et al., 2016). En cuanto a los resultados de liberación de citoquinas al medio en BMDM, se pudo observar que la liberación de la quimioquina MCP-1 y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 fue menor en *Gpat3*^{-/-} en comparación con los *wt* y no presentó diferencias significativas en el caso de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) (Figura 14B). Por otro lado, respecto de la expresión y la liberación de citoquinas en macrófagos *Gpat4*^{-/-} se observó un patrón opuesto a lo esperado en todas las citoquinas pro-inflamatorias, es decir, la magnitud del aumento de la expresión en estos macrófagos es mayor al observado en las células *wt* (Figura 13 A y B). La única citoquina que mostró un patrón diferente fue la citoquina anti-inflamatoria *Il-10*, cuyo aumento en el nivel de expresión fue menor que el de las células *wt* y la cantidad liberada al medio fue igual. Si bien los resultados de expresión y presencia de citoquinas liberadas en el medio no son totalmente coincidentes, y esta discrepancia entre nivel de mRNA y proteína es una observación que se produce con frecuencia, es posible observar ciertos patrones respecto a la liberación al medio, determinación que resulta más relevante teniendo en cuenta su función. Por un lado, **cuando el gen que codifica para GPAT3 está ausente, los niveles de liberación de citoquinas pro-inflamatorias al medio no cambian**, lo que indicaría que la disminución en la síntesis de glicerolípidos (TAG y PL) debido a la carencia de esta enzima no altera el circuito de señalización. Por el contrario, **la disminución en la síntesis de novo de glicerolípidos debido a la ausencia de GPAT4** (principalmente TAG), sí **produce un efecto claro: la exacerbación en la expresión y liberación de citoquinas pro-inflamatorias**. Se requieren de más estudios a fin de dilucidar el mecanismo por el cual se produce este efecto, pero si

tenemos en cuenta nuestros resultados que indican que GPAT4 sería fundamental para la síntesis de novo de TAG durante la activación de macrófagos, podemos hipotetizar que esta enzima desempeñaría un papel importante en la captación y almacenamiento de FA precursores de moléculas señal en los TAG almacenados en gotas de lípido, haciendo que estos no se encuentren disponibles para la síntesis de señales pro-inflamatorias. Esta característica de considerar a una enzima de la vía de síntesis de novo de glicerolípidos como “secuestradora” de señales pro-inflamatorias no es una idea nueva, ya que fue propuesta previamente para la DGAT1, enzima posterior a la GPAT en dicha vía (Koliwad, et al., 2013). Las causas de la diferencia en la respuesta ante la carencia de dos enzimas tan similares en función y estructura deben ser aún estudiadas, pero podemos hipotetizar que se podría deber a una diferencia en la capacidad de cada isoforma de GPAT para dirigir la síntesis de novo de TAG o PL utilizando diferentes FA y que como se ha planteado, una diferencia en la composición de gotas de lípido en macrófagos podría generar un cambio en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Persson, et al., 2006; Lammers, et al., 2011).

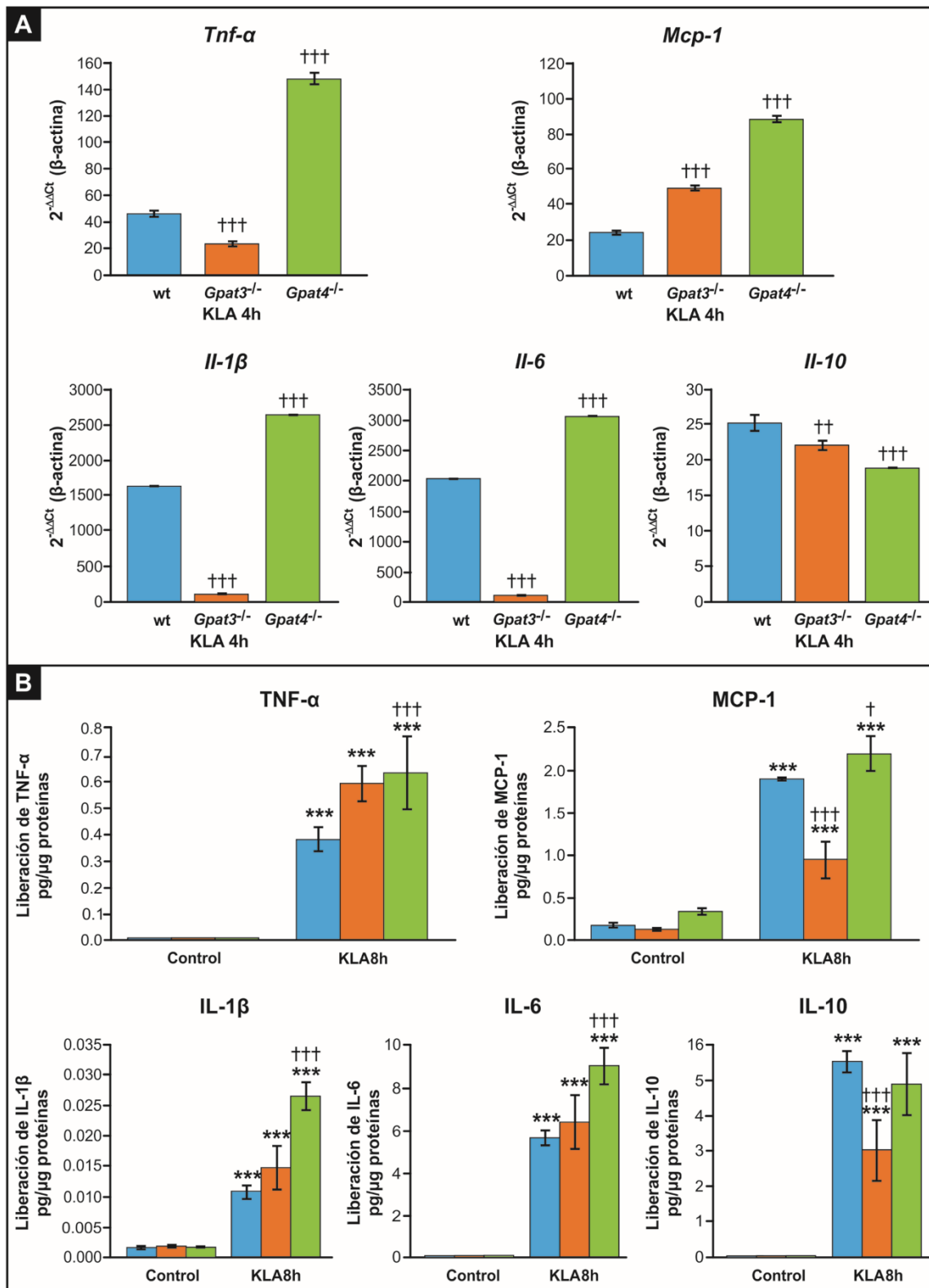


Figura 14. Efecto de la ausencia de *Gpat3* o de *Gpat4* sobre la expresión y liberación de citoquinas y quimioquinas en BMDM. **A)** BMDM wt, *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} tratados durante 4hs con KLA, se extrajo el RNA y se cuantificó la expresión por qPCR de los genes indicados. Los resultados se presentan como 2^{-ΔΔCt}, fueron normalizados por comparación con β-actina y son promedio de 4 ratones. **p<0,01, ***p<0,001 respecto a las células wt. **B)** BMDM wt, *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} fueron tratados durante 8 hs con KLA y se colectó su sobrenadante. Se determinó la concentración de las citoquinas liberadas al medio mediante inmunoensayo Luminex MAGPIX. *p<0,05, ***p<0,001 respecto al control, ††p<0,01, †††p<0,001 con respecto al SCR.

Conclusiones parciales:

- La síntesis de novo de glicerolípidos se induce y contribuye al aumento de la masa de PL, TAG y gotas de lípido durante la activación de macrófagos.
- GPAT3 y GPAT4 son las isoformas de la enzima limitante en el proceso de síntesis de novo de glicerolípidos que contribuyen a dicho aumento.
- La síntesis de novo de FA se induce durante la activación de macrófagos.
- El silenciamiento de GPAT3 o GPAT4 produce una disminución en la síntesis de novo de FA.
- Para la síntesis de novo de glicerolípidos durante la activación de macrófagos se utilizan tanto FA exógenos como sintetizados de novo.
- GPAT3 y GPAT4 son necesarias para que los macrófagos activados lleven a cabo el proceso de fagocitosis.
- Para alimentar energéticamente el proceso de fagocitosis, los macrófagos utilizarían la β -oxidación de lípidos almacenados en gotas, aunque esta no sería la fuente de energía mayoritaria.
- La fagocitosis en macrófagos activados es dependiente de la acción de lipasas, probablemente para la producción de alguna señal lipídica y/o para la biogénesis de las gotas de lípido.
- Se requiere de la presencia de GPAT3 y GPAT4 para que se produzca un patrón de expresión y liberación de citoquinas normal luego de la activación clásica de macrófagos.
- La ausencia de GPAT4 durante la activación del macrófago produce una exacerbación en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, por lo que GPAT4 actuaría como un atenuador de la respuesta inflamatoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

SECCIÓN 2: ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS Y SU FUNCIÓN DURANTE LA TRANSICIÓN MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA.

Durante el desarrollo de la placa aterogénica se produce un extenso proceso inflamatorio que da inicio luego del reclutamiento de monocitos circulantes a la zona de la lesión. Estos monocitos, después de diferenciarse a macrófagos por la acción del M-CSF incorporan lipoproteínas modificadas como acLDL u oxLDL. Mientras que en el resto de las células del organismo las LDLs son incorporadas por un receptor específico de acuerdo al contenido intracelular de Cho (Charlton-Menys and Durrington, 2007), en el macrófago estas partículas son endocitadas mediante un proceso no regulado por la concentración de Cho intracelular (Pennings, et al., 2006). La incorporación de estas lipoproteínas lleva a la transición de ésta célula a la denominada célula espumosa, caracterizada por poseer grandes gotas de lípido compuestas no sólo por CE, sino también por TAG (Babaei, et al., 2000). Las oxLDL son reconocidas y endocitadas principalmente por receptores basurero como el CD36 (Endemann, et al., 1993; Nozaki, et al., 1995; Febraio, et al., 2000). Estas lipoproteínas modificadas también son ligandos de los mismos receptores TLR4 que reconocen el LPS bacteriano, aunque este tipo de receptor no media la incorporación de la partícula completa (Tobias and Curtiss, 2005). Dado que durante la activación de macrófagos vía TLR4 se activa la síntesis de novo de glicerolípidos y que esta vía metabólica está implicada en la respuesta inflamatoria y en la capacidad fagocítica de los macrófagos (SECCIÓN 1), se propuso determinar si las oxLDL son capaces de activar la síntesis de novo de glicerolípidos y evaluar las consecuencias funcionales de esta activación.

Determinar las enzimas clave en las vías metabólicas que contribuyen a la transición de macrófago a célula espumosa e influyen en el desarrollo del proceso inflamatorio, constituye un conocimiento valioso en vistas a identificar dianas terapéuticas idóneas para una acción anti-aterogénica. Se hipotetiza que durante esta transición se produce una inducción de la síntesis de novo de glicerolípidos y que la activación de esta vía metabólica repercute en la respuesta inflamatoria.

2.1. SÍNTESIS DE NOVO DE GLICEROLÍPIDOS DURANTE LA TRANSICIÓN MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA

2.1.1. La incubación de células RAW 264.7 con oxLDL produce su transición a célula espumosa.

En la mayoría de los trabajos el estudio del metabolismo lipídico en el modelo de transición de macrófago-célula espumosa se ha focalizado en el análisis del metabolismo del Cho y sus ésteres (Rajamäki, et al., 2010; Xiao-Hua, 2013), mientras que el metabolismo de glicerolípidos ha sido prácticamente ignorado. Si bien se ha reportado un aumento en la masa de TAG y PL durante la formación de la célula espumosa, no se conocen aún las consecuencias funcionales de este incremento ni las vías metabólicas involucradas en el mismo (Tabas, et al., 2000; Guo, et al., 2009). Para validar el modelo experimental escogido en este trabajo (células RAW 264.7 tratadas con oxLDL) se evaluó la acumulación de glicerolípidos luego del tratamiento con 100µg/ml de oxLDL durante diferentes tiempos. La transición macrófago-célula espumosa en función del tiempo fue monitoreada estudiando la expresión del receptor basurero

CD36 mediante qPCR (Tontonoz, et al., 1998; Nagy, et al., 1998; Pou, et al., 2007). Se observó que la expresión de dicho marcador de célula espumosa se duplica luego de 8hs de tratamiento, aumentó 5 veces luego de 12hs y nuevamente fue 2 veces mayor luego de 24hs ($p < 0,001$) (Figura 15A). Las gotas de lípido aumentaron 7 veces a partir de las 8hs de tratamiento ($p < 0,001$) (Figura 15B-C). A las 24hs **se observó un aumento de 4 veces en la masa de CE ($p < 0,001$), del doble en la de TAG ($p < 0,01$) y 1.5 veces en la de PL ($p < 0,05$) con respecto al control** (Figura 15D). Estos resultados confirman que en este modelo experimental se produce la acumulación de glicerolípidos y CE. Es importante destacar que un aumento del doble en la masa de TAG en la célula espumosa no puede deberse únicamente a la incorporación de TAG presentes en las oxLDL, ya que estas lipoproteínas sólo poseen aproximadamente un 4-6% de TAG en su composición total (McNamara, et al., 1996).

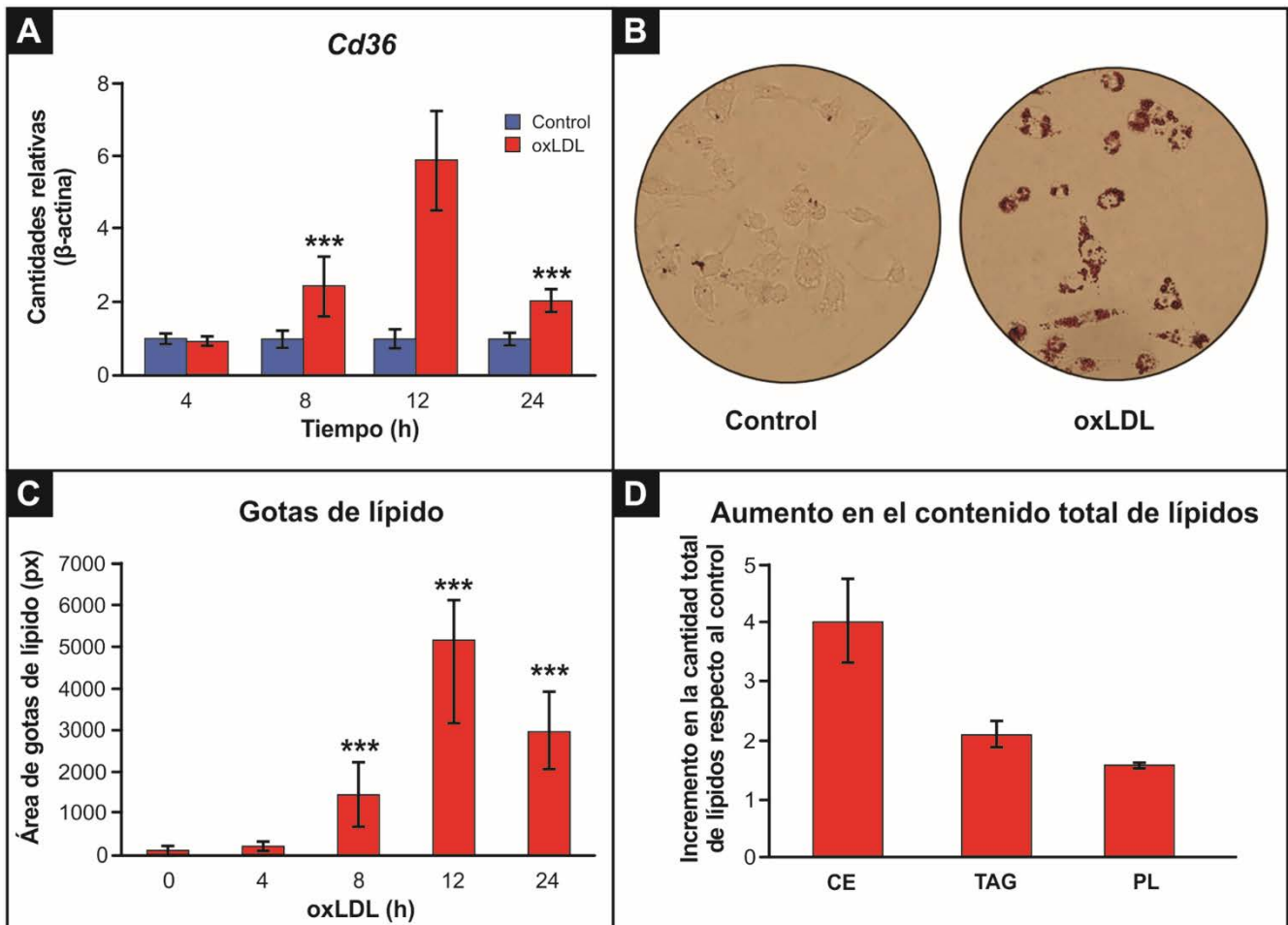


Figura 15. Transición macrófago-célula espumosa y acumulación de lípidos en células RAW264.7 tratadas con oxLDL. Células RAW 264.7 fueron tratadas con 100µg/ml de oxLDL durante los tiempos que se indican. **A-B)** Las células fueron fijadas y teñidas con Oil-Red O y el área de gotas de lípido por célula se cuantificó mediante análisis de imágenes **C)** Se realizó la extracción de RNA y retrotranscripción seguida de qPCR para cuantificar la expresión del marcador de célula espumosa *Cd36*. **D)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con oxLDL durante 24hs. Se cuantificaron los TAG totales mediante el método enzimático de Trinder y para la cuantificación de PL y CE, los lípidos fueron separados mediante TLC y la intensidad de cada mancha carbonizada fue cuantificada mediante comparación con curva estándar. Los resultados muestran la diferencia con respecto al control (TAG: 0,487 µg/µg de proteína, PL: 96,11 ng/µg de proteína). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.1.2. El tratamiento de células RAW 264.7 con oxLDL produce un aumento en la síntesis de novo de TAG.

A fin de evaluar si los lípidos acumulados durante el proceso de transición de macrófago-célula espumosa son sintetizados de novo, se incubaron células RAW 264.7 con [¹⁴C]-acetato o [¹⁴C]-OA en las últimas 3hs de tratamiento con oxLDL y se analizó su incorporación en lípidos totales y en las distintas clases lipídicas. **La incorporación de [¹⁴C]-acetato en lípidos totales disminuyó un 27% (p<0,05) tras el tratamiento con oxLDL** y esta disminución ocurrió a expensas de una disminución de la incorporación en PI/PS (22%, p<0,05), PC (49%, p<0,001), PE (32%, p<0,01), Cho (45%, p<0,05) y en FFA (50%, p<0,05). Por el contrario, **el tratamiento con oxLDL incrementó 5 veces la incorporación de [¹⁴C]-acetato en TAG (p<0,01)** (Figura 16A). Asimismo, se observó un patrón muy similar en la incorporación de [¹⁴C]-OA, la cual **disminuye (25%, p<0,05) en los lípidos totales** tras la incubación con oxLDL. Al desglosar la incorporación de [¹⁴C]-OA en cada lípido, también se observa una disminución en los PL (PI/PS y PC) (55%, p<0,05 y 60%, p<0,01 respectivamente), mientras que **en los TAG, y en este caso también en CE, la incorporación es significativamente mayor (10 veces, p<0,001 y 5 veces p<0,05 respectivamente)** (Figura 16B). Estos resultados permiten concluir que, en coincidencia con lo que ocurre en macrófagos activados con KLA, **durante la transición de macrófago-células espumosa hay un aumento en la síntesis de novo de TAG. Sin embargo en este caso se produce una disminución, y no un incremento, en la síntesis de novo de PL.**

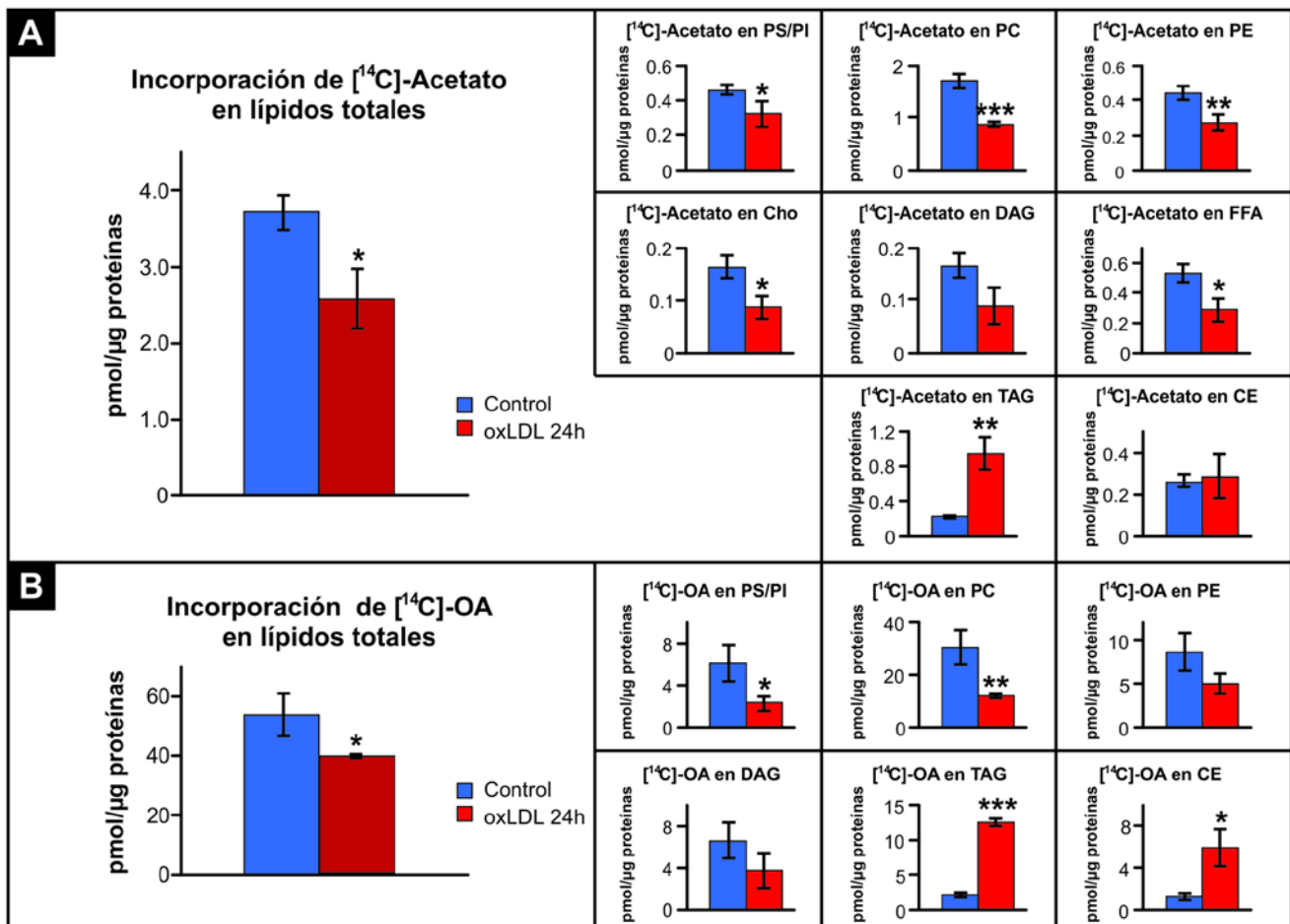


Figura 16. Incorporación de [¹⁴C]-acetato y [¹⁴C]-AO en glicerolípidos durante la transición célula RAW 264.7-célula espumosa. Células RAW 264.7 fueron tratadas durante 24h con oxLDL y en las últimas 3h de tratamiento se los incubó con **A)** [¹⁴C]-acetato o **B)** [¹⁴C]- OA. Los lípidos totales fueron extraídos utilizando el método de Bligh y Dyer y separados por TLC. La marca incorporada en cada tipo de lípido fue cuantificada en un equipo Bioscan y analizada por comparación con estándares. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes. *p <0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

2.1.3. Durante la transición célula RAW 264.7- célula espumosa aumenta la expresión de *Gpat3* y la actividad GPAT.

Con el objetivo de identificar a las enzimas que contribuyen al incremento en la síntesis de novo de TAG durante la transición macrófago- célula espumosa, se trataron células RAW 264.7 durante 4, 8, 12 y 24hs con oxLDL y se midió el nivel de mRNA de genes que codifican para distintas GPATs. Se observó que *Gpat1* disminuye en un 15% su expresión a las 8 y 12hs de tratamiento, *Gpat2* se expresó basalmente sin mostrar cambios (datos no mostrados), mientras que ***Gpat3* mostró un importante aumento en su expresión** (de 9 veces a las 4hs de tratamiento, 35 veces a las 8hs, 12 veces luego de 12hs y 3 veces a las 24hs de tratamiento). ***Gpat4* no presentó variaciones significativas** (Figura 17). Por otro lado, se analizó la expresión de *Cpt1a*, la cual **mostró un aumento significativo** luego de 4, 8 y 12hs de tratamiento (5, 7 y 3 veces respectivamente), sugiriendo una inducción en la β-oxidación durante la transición macrófago-célula espumosa en coincidencia con lo reportado anteriormente (Takahashi, et al., 2013). Por último, a diferencia de lo que ocurre durante la activación de macrófagos inducida por tratamiento con KLA, **la expresión de *Gk* no cambió durante la transición macrófago-célula espumosa.**

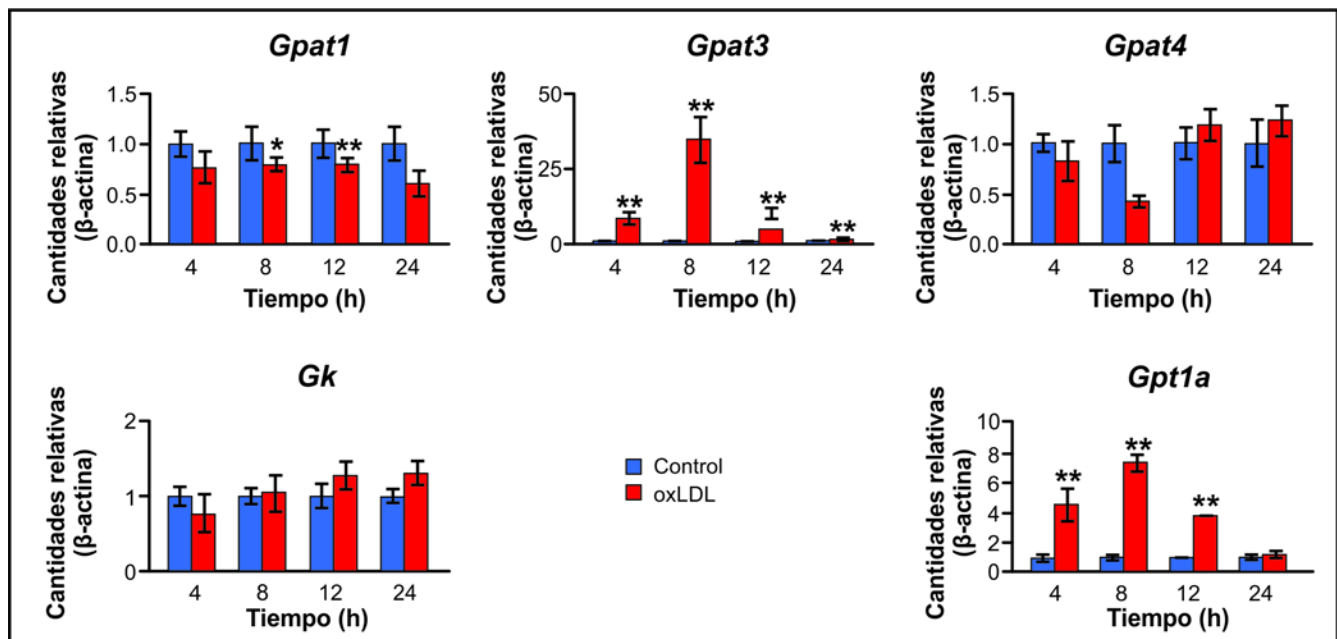


Figura 17. Expresión de genes relacionados al metabolismo de glicerolípidos durante la transición célula RAW 264.7-célula espumosa. Se realizó la extracción de RNA de células RAW tratadas durante 4, 8, 12 o 24hs con oxLDL y luego de realizada la retrotranscripción, se cuantificó la expresión por qPCR de los genes indicados. Los resultados fueron normalizados por comparación con β-actina y son promedio de 3 experimentos independientes. *p <0,05, **p<0,01.

A los mismos tiempos de tratamiento se cuantificó la actividad enzimática GPAT. La actividad NEM-resistente atribuible a GPAT1 bajó entre un 40 y un 60% a las 8 y las 24hs de tratamiento (p<0,01) (Figura 18), en coincidencia con los niveles de expresión del mRNA (Figura

16), mientras que **la actividad GPAT NEM sensible aumentó 3 y 5 veces luego de 12 y 24hs respectivamente** ($p < 0,01$). Estos resultados y los de expresión génica son coherentes con un rol de GPAT3 en la activación de la síntesis de novo de TAG que se produce durante la formación de la célula espumosa.

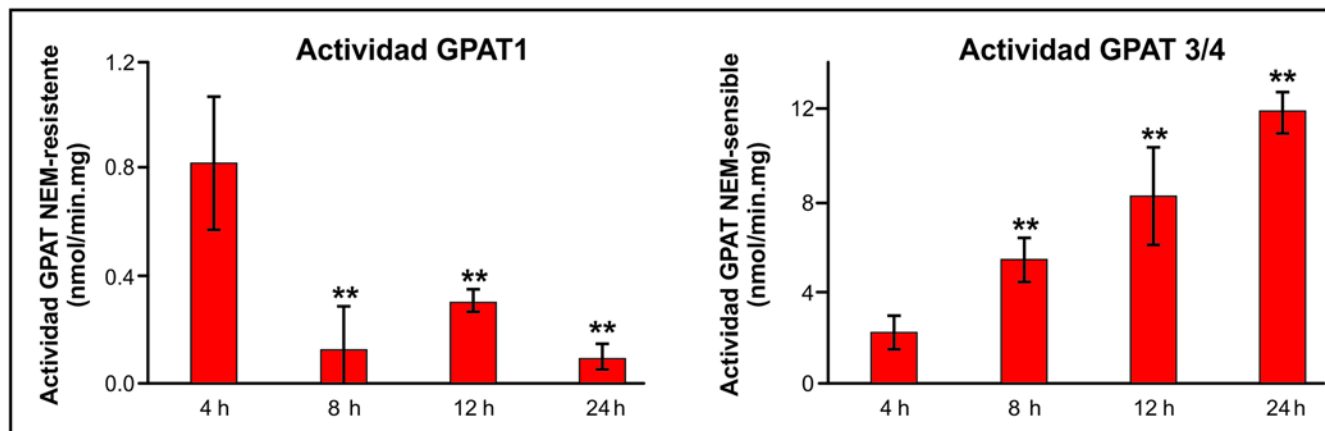


Figura 18. Actividad enzimática GPAT durante la transición célula RAW 264.7- célula espumosa. Las células fueron tratadas con oxLDL durante los tiempos indicados y la actividad GPAT fue analizada en particulados totales en presencia o ausencia de NEM 2 mM . Los resultados son promedio de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$ con respecto a las 4hs.

2.1.5. La incubación de BMDM con oxLDL produce su transición a célula espumosa.

De igual manera a lo realizado en el estudio de activación de macrófagos, se procedió a corroborar los resultados obtenidos en células RAW 264.7 utilizando BMDM. Estos macrófagos primarios se incubaron con oxLDL durante 24hs y se analizó la acumulación de lípidos. **Se observó un aumento de 2.5 veces en gotas de lípido** ($p < 0,001$) (Figura 19A-B), **de 27 veces en la masa de CE** ($p < 0,001$), **de 11 veces en TAG** ($p < 0,001$) **y los PL sólo se duplicaron** ($p < 0,001$) (Figura 19C). Es interesante destacar que los BMDM mostraron un mayor incremento en la masa de CE y TAG luego de su transición a célula espumosa en comparación a las células RAW 264.7. Esta mayor sensibilidad y mayor grado de respuesta a los tratamientos de los macrófagos primarios en comparación con la línea celular establecida, es coherente con observaciones propias anteriores y lo reportado previamente (Maurya, et al., 2013).

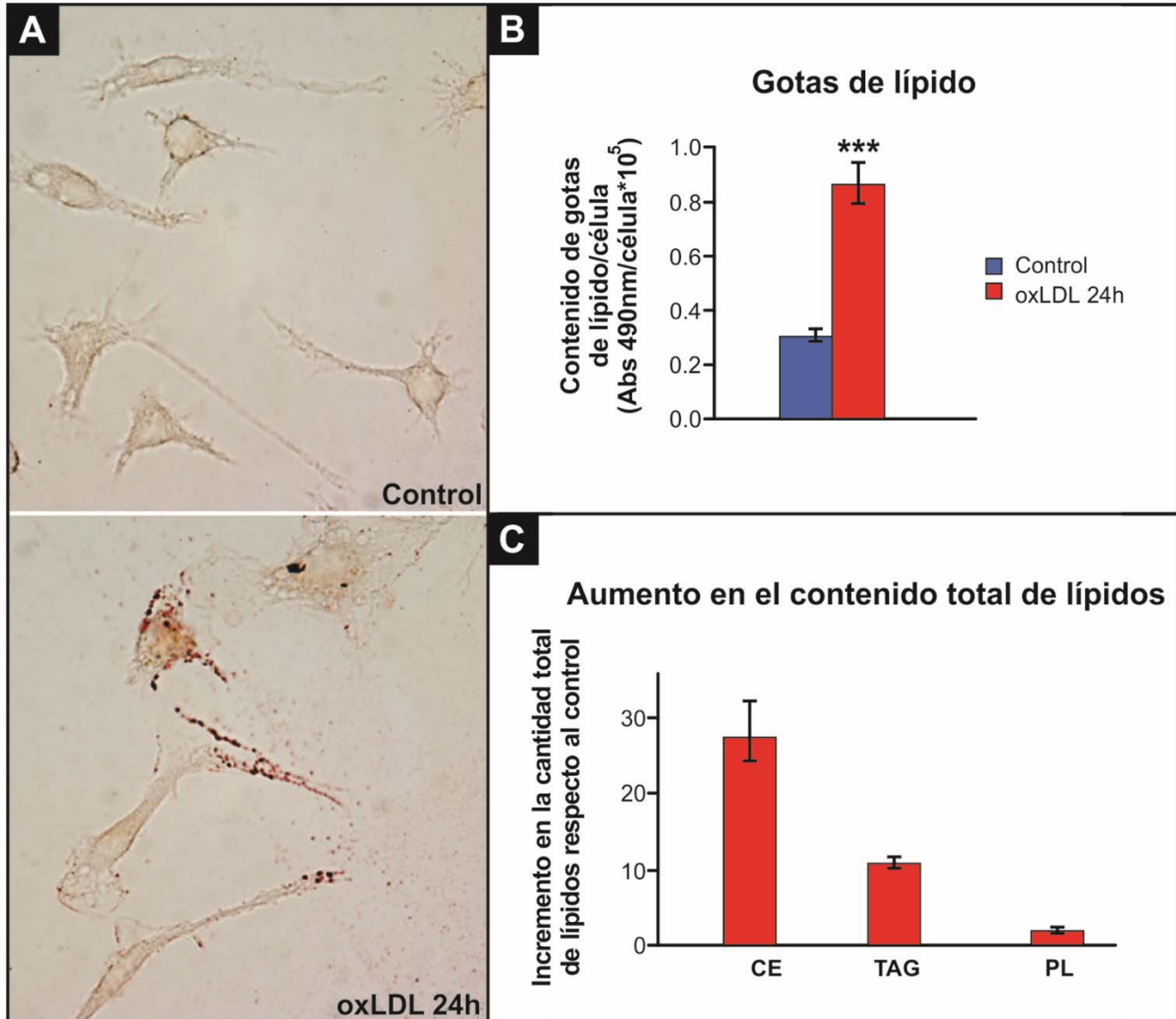


Figura 19. Acumulación de glicerolípidos en BMDM tratados con oxLDL. BMDM provenientes de ratones C57 wt fueron tratados con oxLDL durante 24hs. **A-B)** Las células fueron fijadas y teñidas con Oil-Red O y se cuantificó la cantidad de lípidos neutros por célula mediante extracción con isopropanol del colorante incorporado. **C)** Se realizó la extracción de lípidos totales utilizando la técnica de Bligh y Dyer. Los TAG fueron cuantificados utilizando el ensayo enzimático de Trinder, mientras que los PL y CE se cuantificaron separando los lípidos totales por TLC, carbonizando y determinando la intensidad de manchas mediante comparación con curva estándar. Los resultados se expresan como el incremento en la cantidad de cada lípido con respecto al control sin tratar (TAG: 0,77ng/μg de proteína, PL: 0,73 μg/μg de proteína). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. ***p<0,001.

2.1.6. La expresión de *Gpat3* aumenta durante la transición BMDM- célula espumosa.

Con el objetivo de cuantificar la variación en la expresión de genes involucrados en la síntesis de novo de TAG, se analizó por qPCR el mRNA de los genes que codifican para las 4 isoformas de GPAT en células tratadas con oxLDL. Se observó que *Gpat1* disminuyó su expresión 40% (p<0,05) y 30% (p<0,01) luego de 12 y 24hs de tratamiento respectivamente y que ***Gpat3* aumentó su expresión 4 veces** (p<0,01) luego de 24hs de tratamiento. ***Gpat2* y**

Gpat4 no mostraron variaciones significativas en su expresión (Figura 20). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en células RAW 264.7 (Figura 17).

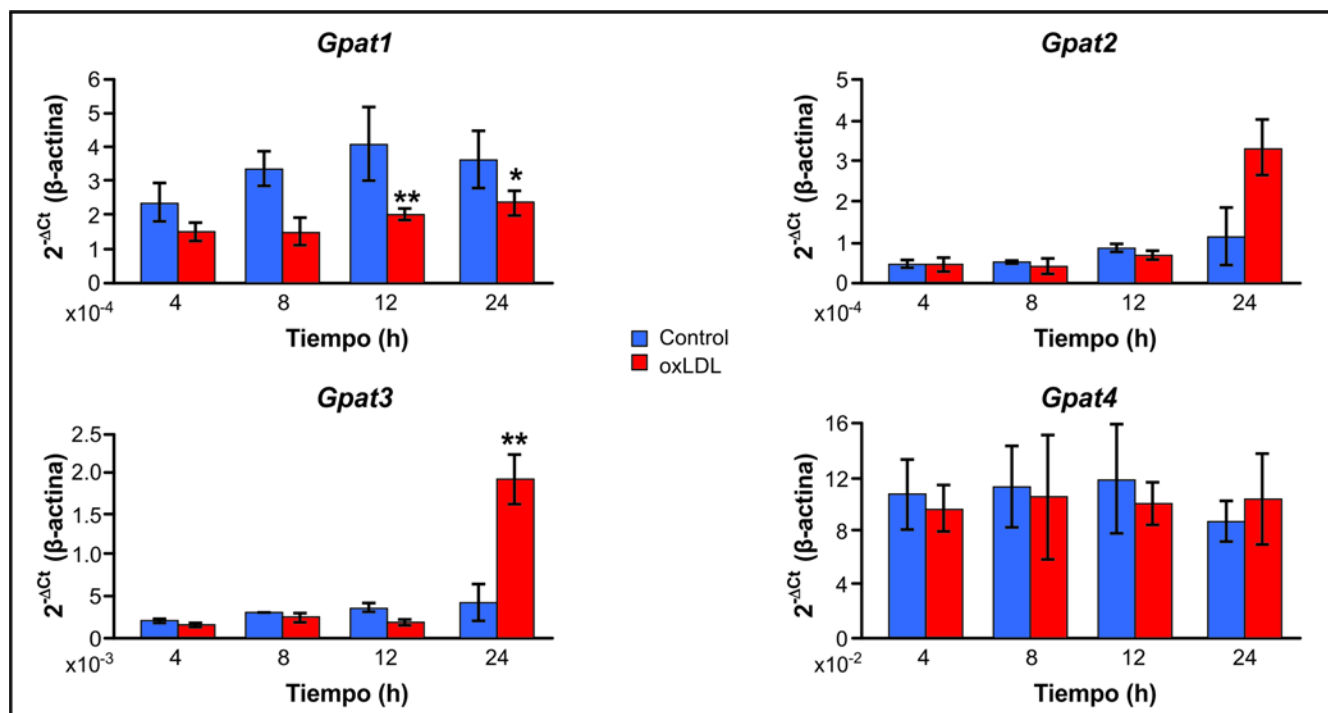


Figura 20. Análisis de la expresión de las 4 isoformas de GPAT durante la transición BMDM- célula espumosa. Se realizó la extracción de RNA de BMDM tratados durante 4, 8, 12 o 24h con oxLDL y luego de realizada la retrotranscripción, se cuantificó la expresión por qPCR de los genes indicados. Los resultados fueron normalizados por comparación con β -actina y son promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

2.2. ROL DE GPAT3 Y GPAT4 EN EL METABOLISMO DE GLICEROLÍPIDOS Y SUS CONSECUENCIAS DURANTE LA TRANSICIÓN MACRÓFAGO-CÉLULA ESPUMOSA.

2.2.1. El silenciamiento de Gpat3 en células RAW 264.7 atenúa la acumulación de gotas de lípido, TAG y PL tras su transición a célula espumosa.

A fin de determinar el rol de GPAT3 en la acumulación de lípidos durante la formación de la célula espumosa, se trataron células shGpat3 y SCR con oxLDL durante 24h y se analizó la acumulación de gotas de lípido, la masa de CE, TAG y de PL. **Mientras que el tratamiento de células SCR con oxLDL produjo un incremento del doble ($p < 0,001$) en las gotas de lípido, en las células silenciadas el aumento fue sólo de un 40% ($p < 0,05$)** y las gotas de lípido observadas en estas células fueron más escasas y pequeñas (Figura 21 A-B). Además, si bien el contenido de CE tras la incubación con oxLDL no varió entre las células SCR y shGpat3, **el contenido de TAG y PL disminuyó significativamente en las células silenciadas ($p < 0,05$)** (Figura 21C). Estos resultados, permiten concluir que Gpat3 es necesaria para el incremento en las gotas de lípido que se produce durante la transición macrófago-célula espumosa.

Previamente se ha descrito que los TAG son necesarios para la formación de gotas de lípido típicamente mixtas (TAG y CE) y que los macrófagos con bajo contenido de TAG presentan un cambio en el estado físico de los CE, lo que provoca una disminución en la

hidrólisis de los mismos y en el eflujo de Cho (Lada, et al., 2002). En este trabajo se ha determinado que GPAT3 es necesaria para que se produzca el incremento en la masa de TAG tras la incubación con oxLDL y por lo tanto se puede especular que la manipulación de la actividad de esta enzima podría influenciar el eflujo de Cho de los macrófagos.

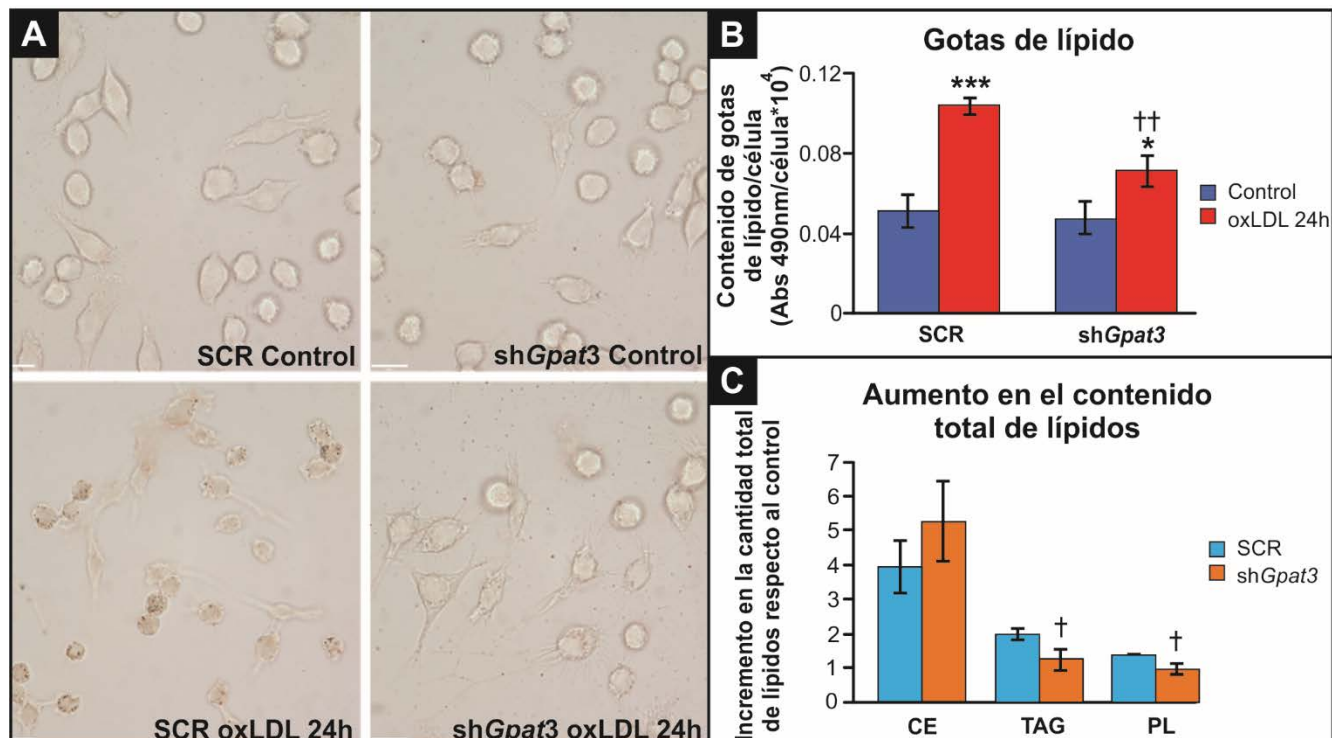


Figura 21. Efecto del silenciamiento de *Gpat3* sobre la acumulación de lípidos en células RAW264.7 tratadas con oxLDL. A-B) Células RAW 264.7 SCR y sh*Gpat3* fueron tratadas con oxLDL durante 24hs, fijadas y teñidas con Oil-Red O y se cuantificó el contenido de gotas de lípido. **C)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con oxLDL durante 24hs. Los TAG totales se cuantificaron mediante el método enzimático de Trinder, mientras que los PL y CE se midieron separando los lípidos totales por TLC, carbonizando y determinando la intensidad de manchas mediante comparación con curva estándar. Los resultados se expresan como incremento en la cantidad de cada lípido con respecto al control sin tratar (TAG SCR: 0,53 ng/μg de proteína, TAG sh*Gpat3*: 0,52 ng/μg de proteína PL SCR: 0,96 μg/μg de proteína, PL sh*Gpat3*: 0,97 μg/μg de proteína). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. ***p<0,001, respecto a las células sin tratar, ††p<0,01 con respecto a las células control+KLA y †p<0,05 con respecto a las células SCR.

2.2.2. El silenciamiento de *Gpat3* provoca una disminución en la síntesis de novo de TAG durante la transición células RAW 264.7- célula espumosa.

En el apartado anterior se demostró que el silenciamiento de *Gpat3* disminuyó la acumulación de glicerolípidos. A fin de comprobar si esta disminución se debe a una alteración en la síntesis de novo de TAG y PL, se analizó la incorporación de [¹⁴C]-acetato o [¹⁴C]-OA en lípidos totales y en las distintas clases lipídicas durante las últimas 3hs de tratamiento con oxLDL. Los resultados obtenidos al tratar células SCR con oxLDL fueron similares a los observados en células *wt* (Figura 16): La incorporación de marca en lípidos totales disminuyó a expensas de una disminución en la incorporación de marca en PL, mientras que **la única clase lipídica en la que se detectó un aumento de la incorporación [¹⁴C]-acetato fueron los TAG (3 veces, p<0,001)** (Figura 22A). En las células sh*Gpat3* tratadas con oxLDL se perdió el incremento en la incorporación de marca en TAG, mientras que se mantuvo la disminución en

la incorporación de [¹⁴C]-acetato en PL, Cho, DAG y FFA. En cuanto a la incorporación de [¹⁴C]-OA en células SCR se observó un patrón similar: una disminución en la incorporación en lípidos totales y PL mientras que **se detectó un aumento en la incorporación de [¹⁴C]-OA en TAG y en este caso también en CE** (6 veces, $p < 0,001$ y 5 veces $p < 0,01$ respectivamente) (Figura 22B). El silenciamiento de *Gpat3* afectó la síntesis de novo de PL en estado basal pero no así luego de la transición a célula espumosa. Por último, si bien las células silenciadas aumentaron la incorporación de marca en TAG luego de su transición a célula espumosa, este incremento fue significativamente menor en las células sh*Gpat3* tratadas en comparación con las SCR ($p < 0,001$).

Estos resultados permiten concluir que **GPAT3 es necesaria para el incremento en la masa de TAG sintetizados de novo tras la incubación con oxLDL.**

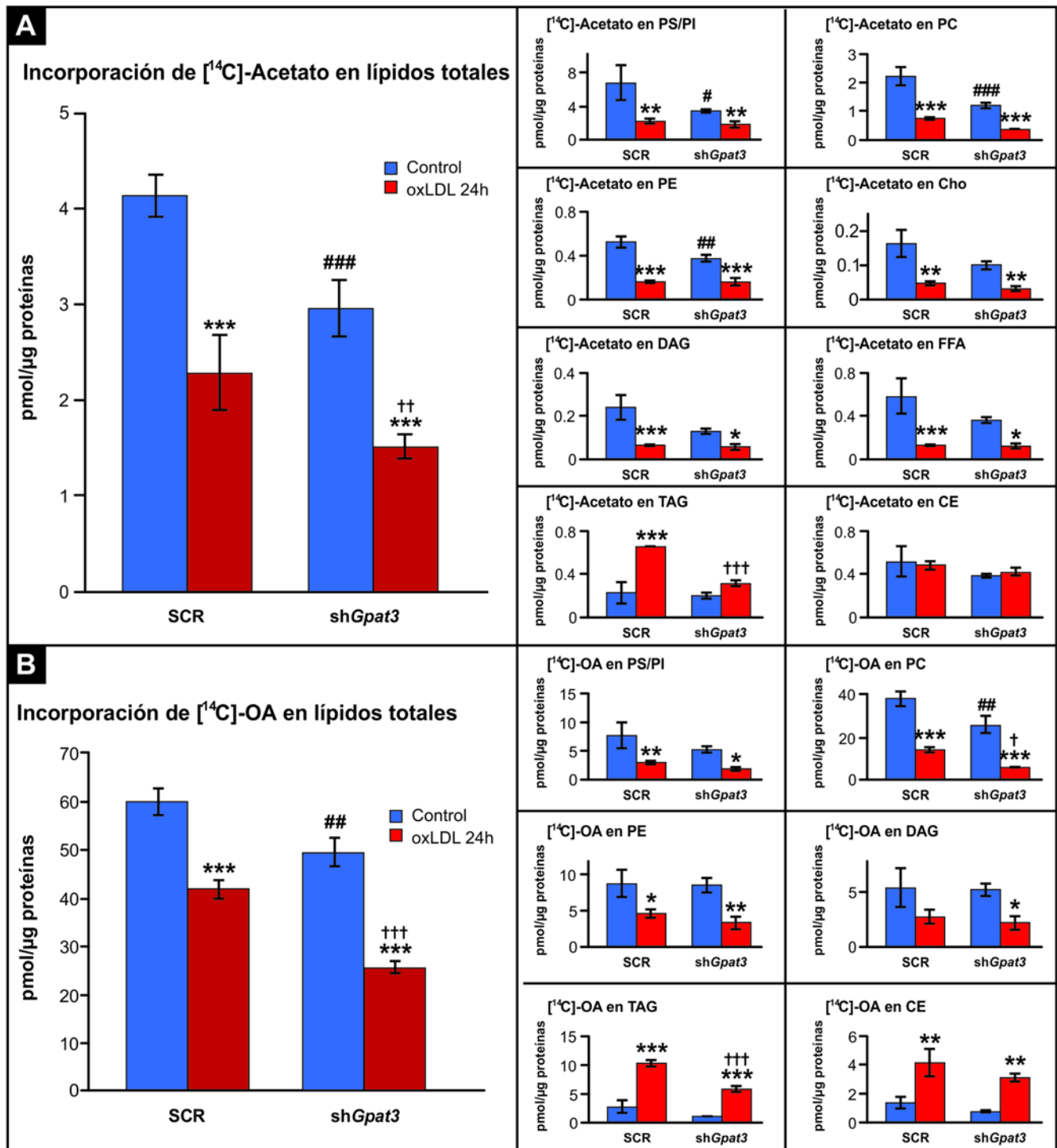


Figura 22. Efecto del silenciamiento de *Gpat3* sobre la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ -acetato y $[^{14}\text{C}]$ -ácido oleico en glicerolípidos durante la transición células RAW 264.7- célula espumosa. Células SCR y sh*Gpat3* fueron tratadas durante 24hs con oxLDL y en las últimas 3hs de tratamiento se los incubó con **A**) $[^{14}\text{C}]$ -acetato o **B**) $[^{14}\text{C}]$ - OA. Los lípidos totales fueron extraídos utilizando el método de Bligh y Dyer y separados por TLC. La marca incorporada en cada tipo de lípido fue cuantificada en un equipo Bioscan y analizada por comparación con estándares. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ con respecto al control sin tratar. † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$, ††† $p < 0,001$ con respecto al SCR + oxLDL, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto al SCR control.

2.2.3. Los BMDM *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} acumulan menos gotas de lípido, TAG y PL luego de su transición a célula espumosa.

Los mismos experimentos descritos en los apartados anteriores se realizaron utilizando BMDM de ratones *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-}. **El tratamiento con oxLDL produjo un aumento de aproximadamente 2.5 veces en las de gotas de lípido en los BMDM *wt* mientras que el aumento fue mucho menor en los BMDM *Gpat3*^{-/-} (40%) y BMDM *Gpat4*^{-/-} (26%),** resultando estas gotas mucho más numerosas pero más pequeñas (Figura 23A-B). Respecto a la acumulación de CE, al igual que lo observado en células RAW 264.7 (Figura 20), no se observaron diferencias significativas en los BMDM *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} con respecto a los *wt* (Figura 23C). **En cuanto a la acumulación de TAG, se vio que mientras que los BMDM presentan un aumento de 11 veces respecto al control, este aumento es significativamente menor en BMDM *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} (7 veces, $p < 0,05$ y poco más de 5 veces, $p < 0,01$ respectivamente). Por último, se observó un incremento de aproximadamente el doble en la masa de PL totales luego de 24hs de tratamiento con oxLDL en células *wt*, y este aumento fue prácticamente nulo en los BMDM *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-}.** Estos resultados permiten concluir que la expresión de ambas isoformas de GPAT es necesaria para la formación de gotas de lípido mixtas. La ausencia de estas enzimas en BMDM provoca la formación de gotas de lípido con una relación TAG: CE diferente lo cual podría alterar su tamaño y su funcionalidad.

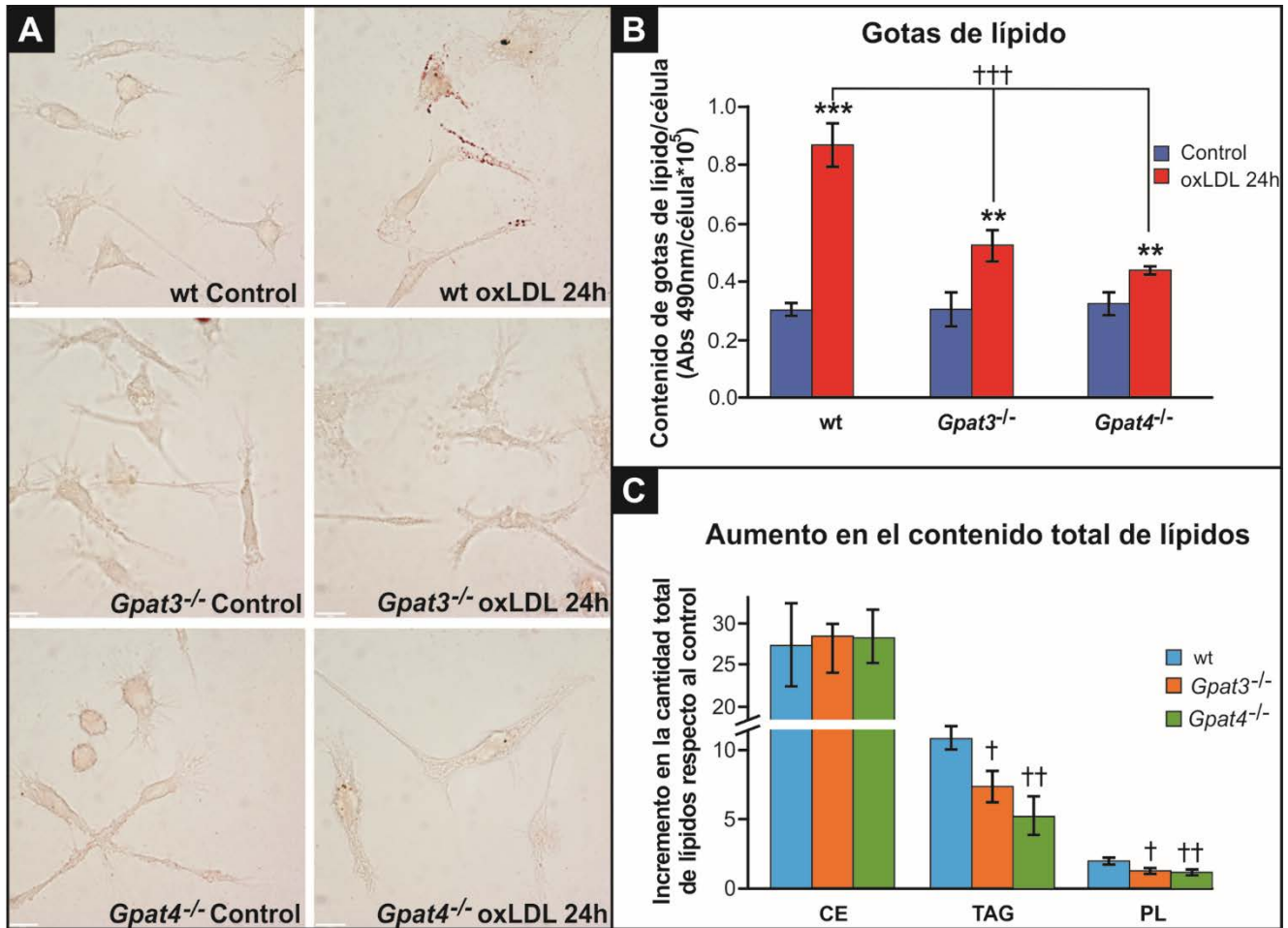


Figura 23. Efecto de la ausencia de *Gpat3* o *Gpat4* sobre la acumulación de lípidos en BMDM tratados con oxLDL. A-B) BMDM *wt*, *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} fueron tratados con oxLDL durante 24hs, fijados y teñidos con Oil-Red O y se cuantificó la cantidad de gotas de lípidos mediante análisis de liberación de colorante. **C)** Se realizó la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer de células tratadas con oxLDL durante 24hs. Los TAG totales se cuantificaron mediante el método enzimático de Trinder, mientras que los PL y CE se midieron separando los lípidos totales por TLC, carbonizando y determinando la intensidad de manchas mediante comparación con curva estándar. Los resultados se expresan como incremento en la cantidad de cada lípido con respecto al control sin tratar (TAG *wt*: 0,77 ng/μg de proteína, TAG *Gpat3*^{-/-}: 0,62 ng/μg de proteína, TAG *Gpat4*^{-/-}: 0,82 ng/μg de proteína, PL *wt*: 0,73 μg/μg de proteína, PL *Gpat3*^{-/-}: 0,32 μg/μg de proteína, PL *Gpat4*^{-/-}: 0,52 μg/μg de proteína). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. **p < 0,01, ***p < 0,001 respecto al control sin tratar, †p < 0,05, ††p < 0,01, †††p < 0,001 con respecto al control *wt*.

2.2.4. La ausencia de *Gpat4* en BMDM afecta la liberación de citoquinas y quimioquinas al medio durante su transición a célula espumosa.

A fin de evaluar el efecto de la ausencia de *Gpat3* o *Gpat4* y el consecuente defecto en la síntesis y acumulación de glicerolípidos en un aspecto funcional del macrófago durante su transición a célula espumosa, se procedió a evaluar la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (TNFα, MCP1 o CCL2, IL-1β e IL-6) y anti-inflamatorias (IL-10) en BMDM tratadas con oxLDL.

Se observó que los BMDM *Gpat3*^{-/-}, liberaron más TNF-α y menos MCP-1 respecto a los BMDM *wt* luego de su transición a célula espumosa. (Figura 24). **Los BMDM *Gpat4*^{-/-}, por otro lado, mostraron un incremento significativo en la liberación de todas las citoquinas analizadas luego del tratamiento.** Estos resultados indican que la ausencia de cualquiera de

las dos isoformas de GPAT produce una alteración en el perfil de liberación de citoquinas luego de la transición macrófago-célula espumosa. Si bien el efecto de la ausencia de GPAT3 no es del todo claro, se puede concluir que GPAT4 tendría un rol relevante en la atenuación de la liberación de citoquinas al medio durante la transición macrófago-célula espumosa, puesto que su ausencia provoca una exacerbación en la liberación de las mismas en concordancia con lo observado durante la activación de los macrófagos con KLA (Sección 1). Este efecto podría tener relación al rol que ejerce GPAT4 en la acumulación de TAG en gotas de lípido y el papel de éstas en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, puesto que, como se mencionó con anterioridad, se ha planteado que una disminución en la cantidad y diferencia en la composición de gotas de lípido en macrófagos produce un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Persson, et al., 2006; Lammers, et al., 2011). La comprensión de los mecanismos que conducen a este efecto requiere de un mayor número de estudios y resulta relevante considerando la potencialidad de GPAT4 como blanco terapéutico capaz de controlar el proceso inflamatorio en el contexto del desarrollo de la placa aterogénica.

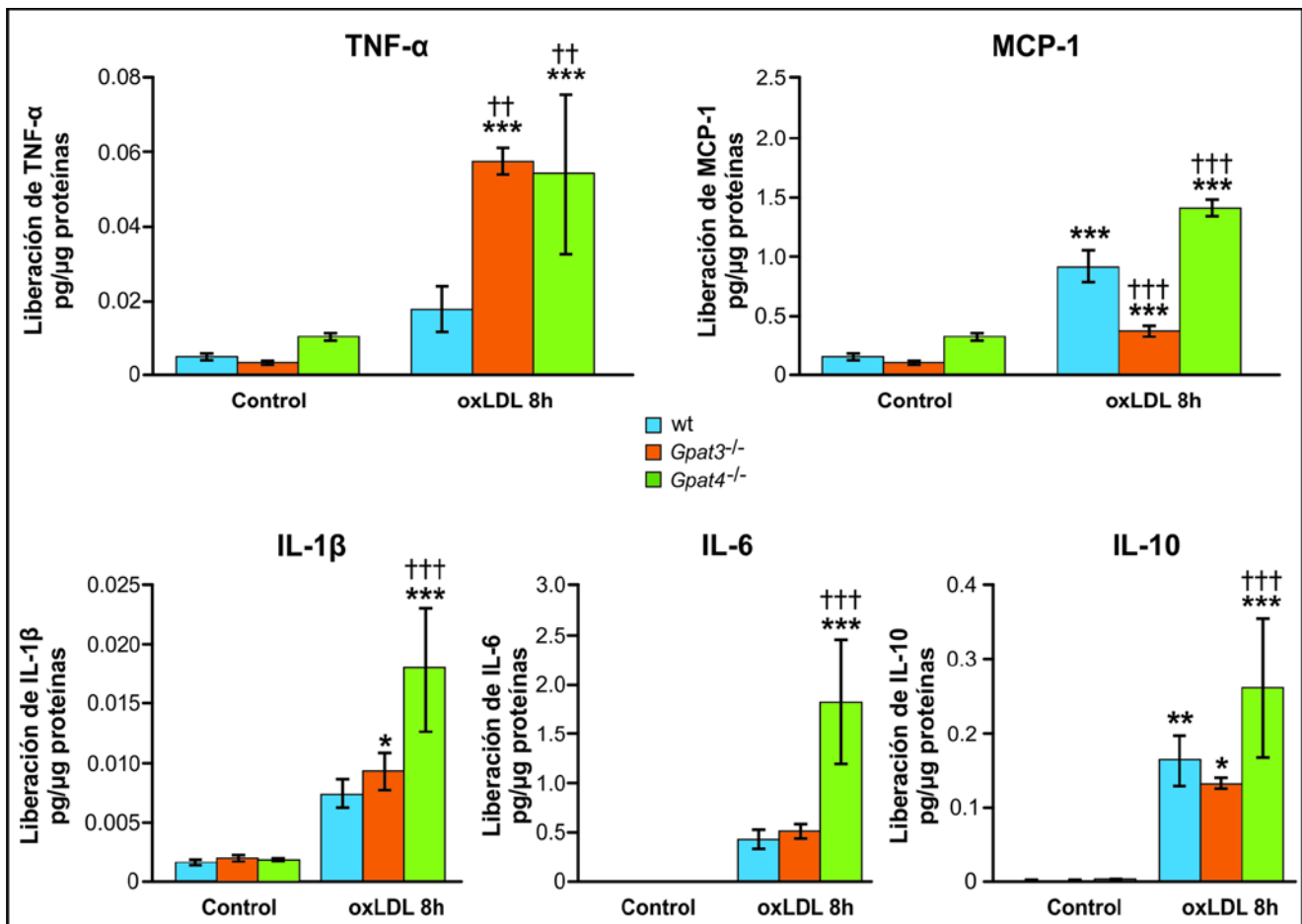


Figura 24. Efecto de la ausencia de *Gpat3* o *Gpat4* sobre la liberación de citoquinas y quimioquinas en BMDM. BMDM *wt*, *Gpat3*^{-/-} y *Gpat4*^{-/-} fueron tratados durante 8hs con oxLDL y se colectó su sobrenadante. Se determinó la concentración de las citoquinas liberadas al medio mediante inmunoensayo Luminex MAGPIX. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001 respecto al control, ††*p*<0,01, †††*p*<0,001 con respecto al *wt* tratado con oxLDL.

Conclusiones parciales:

- Durante la transición de macrófago a célula espumosa se induce la síntesis de novo de TAG y ésta contribuye a la acumulación de gotas de lípido.
- GPAT3 y GPAT4 son las isoformas de la enzima limitante en el proceso de síntesis de novo de TAG que contribuyen a dicha acumulación.
- Durante la transición de macrófago a célula espumosa los ácidos grasos sintetizados de novo se canalizan hacia la formación de TAG, mientras que los exógenos son utilizados tanto en la síntesis de TAG como de CE.
- Se requiere de la presencia de GPAT3 y GPAT4 para que se produzca un patrón de expresión y liberación de citoquinas normal luego de la transición de macrófago-célula espumosa.
- La ausencia de GPAT4 durante la transición de macrófago-célula espumosa produce una exacerbación en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, por lo que GPAT4 actuaría como un atenuador de la respuesta inflamatoria.

CONCLUSIÓN

Tanto durante la activación del macrófago como en su transición a célula espumosa se induce la síntesis de novo de TAG, con el consecuente incremento de las gotas de lípido intracelulares. Sin embargo, la síntesis de novo de PL sólo se induce en el modelo de activación con KLA. El primer paso de la síntesis de novo de glicerolípidos contribuye al incremento en estos lípidos, ya que la actividad GPAT aumenta durante los tratamientos con KLA y oxLDL. Los resultados indican que son las isoformas NEM-sensibles (GPAT3 y GPAT4) las que contribuyen a dicho aumento de actividad. El mecanismo mediante el cual se produce este aumento de actividad no puede ser dilucidado por completo en base a este trabajo, ya que en uno de los modelos experimentales utilizados (células RAW 264.7 activadas) se observó un aumento en la expresión de los genes que codifican para GPAT3 y GPAT4, mientras que en otros modelos (BMDM activados y transición a célula espumosa) la expresión de estos genes disminuyó o no mostró cambios, indicando que el aumento de actividad observado en ambos casos sería producto de múltiples mecanismos de regulación, probablemente a nivel post-transcripcional o post-traduccionales.

El rol de GPAT3 y GPAT4 en la activación de la síntesis de novo de glicerolípidos resulta evidente en los distintos modelos de silenciamiento utilizados. Ambas isoformas son necesarias para que se produzca la acumulación de gotas de lípido y el aumento en la masa de TAG y/o PL en respuesta a la exposición a KLA u oxLDL, sin embargo existen diferencias fundamentales tras el silenciamiento de uno u otro gen. Si bien el silenciamiento o ausencia de ambas isoformas altera la capacidad fagocítica de los macrófagos, sólo la carencia de GPAT4 exacerba la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, sugiriendo para esta isoforma un rol en la atenuación de las señales inflamatorias.

Por todo lo expuesto anteriormente se puede especular que mediante la manipulación de la expresión de GPAT4 en macrófagos, se podría atenuar la respuesta inflamatoria de estas células tanto en procesos de inflamación en un contexto fisiológico como patológico, constituyendo esta enzima un potencial blanco terapéutico.

A futuro se requieren de más estudios tendientes a dilucidar la cascada de señalización responsable de vincular la activación de los receptores TLR4, ya sea por el contacto con el KLA como con oxLDL, con la alteración en el metabolismo de lípidos reportado no sólo en este trabajo sino en múltiples publicaciones antes mencionadas. Por otro lado, también es imperativo conocer el mecanismo mediante el cual la actividad GPAT afecta la producción de moléculas pro-inflamatorias. Por último, sería de gran utilidad la producción de ratones doble *knock-out* GPAT4^{-/-} y ApoE^{-/-} (con mayor tendencia al desarrollo de placas aterogénicas) para evaluar *in vivo* el efecto del silenciamiento de GPAT4 sobre la probabilidad de desarrollar aterosclerosis, así como también estudiar el desarrollo de distintas infecciones virales y bacterianas en ratones libres de patógenos GPAT4^{-/-} y modelos en donde esta proteína se encuentre sobre expresada en forma estable.

BIBLIOGRAFÍA

- Aflaki, E., Radovic, B., Chandak, P.G., Kolb, D., Eisenberg, T., Ring, J., Fertschai, I., Uellen, A., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., Zechner, R., Levak-Frank, S., Sattler, W., Graier, W.F., Malli, R., Madeo, F. and Kratky D. (2011). Triacylglycerol accumulation activates the mitochondrial apoptosis pathway in macrophages. *J. Biol. Chem.* 286(9): 7418-7428.
- Andreyev, A.Y., Fahy, E., Guan, Z., Kelly, Z., Li, X., McDonald, J.G., Milne, S., Myers, D., Park, H., Ryan, A., Thompson, B.M., Wang, E., Zhao, Y., Brown, H.A., Merrill, A.H., Raetz, C.H.R., Russell, D.W., Subramaniam, S. and Dennis, E.A. (2010). Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J. Lipid Res.* 51: 2785-2797.
- Babaei, S., Picard, P., Ravandi, A., Monge, J.C., Lee, T.C., Cernacek, P. and Stewart, D.J. (2000). Blockade of endothelin receptors markedly reduces atherosclerosis in LDL receptor deficient mice: role of endothelin in macrophage foam cell formation. *Cardiovascular Res.* 48: 158-167.
- Balestrieri, B., Hsu, V.W., Gilbert, H., Leslie, C.C., Han, W.K., Bonventre, J.V. and Arm, J.P. (2006). Group V Secretory Phospholipase A2 Translocates to the Phagosome after Zymosan Stimulation of Mouse Peritoneal Macrophages and Regulates Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 281: 6691-6698.
- Beigneux, A.P., Vergnes, L., Qiao, X., Quatela, S., Davis, R., Watkins, S.M., Coleman, R.A., Walzem, R.L., Philips, M., Reue, K. and Young, S.G. (2006). Agpat6 -a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *J. Lipid Res.* 47: 734-744.
- Bell, R.M. and Coleman, R.A. (1980). Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 459-487.
- Beutler, B. (2003). Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the toll-like receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 609-628.
- Bhat, B.G., Wang, P., Kim, J.H., Black, T.M., Lewin, T.M., Fiedorek, F.T. and Coleman, R.A. (1999). Rat sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase: molecular cloning and characterization of the cDNA and expressed protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1439(3):

415-423.

- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Borkenhagen, L.F. and Kennedy, E.P. (1957). The enzymatic synthesis of cytidine diphosphate choline. *J. Biol. Chem.* 227: 951-962.
- Bozza, P.T., Magalhães, K.G. and Weller, P.F. (2009). Leukocyte lipid bodies-Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 540-551.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Cao, J., Li, J.L., Li, D., Tobin, J.F. and Gimeno, R.E. (2006). Molecular identification of microsomal acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103: 19695-19700.
- Cao, J., Perez, S., Goodwin, B., Lin, Q., Peng, H., Qadri, A., Zhou, Y., Clark, R.W., Perreault, M., Tobin, J.F. and Gimeno, R.E. (2014). Mice deleted for GPAT3 have reduced GPAT activity in white adipose tissue and altered energy and cholesterol homeostasis in diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306(10): 1176-1187.
- Chandak, P.G., Radovic, B., Aflaki, E., Kolb, D., Buchebner, M., Frohlich, E., Magnes, C., Sinner, F., Haemmerle, G., Zechner, R., Tabas, I., Levak-Frank, S. and Kratky, D. (2010). Efficient Phagocytosis Requires Triacylglycerol Hydrolysis by Adipose Triglyceride Lipase. *J. Biol. Chem.* 285(26): 20192-20201.
- Charlton-Menys, V. and Durrington, P.N. (2007). Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp. Phys.* 93: 27-42.
- Chawla, A., Nguyen, K.D. and Goh, Y.P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Rev. Immunol.* 11(11): 738-749.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1(2):581-585.
- Christie, W.W. (2003) *Lipid Analysis: isolation, identification and structural analysis of lipids - 3rd Edition.* The Oily Press, Bridgwater, England. ISBN 0-9531949-5-7.
- Coleman, R.A. and Lee, D.P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43: 134-176.

- Cooper, D.E., Grevengoed, T.J., Klett, E.L., Coleman, R.A. (2015). Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Isoform-4 (GPAT4) Limits Oxidation of Exogenous Fatty Acids in Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 24: 15112-15120.
- Dennis, E.A., Deems, R.A., Harkewicz, R., Quehenberger, O., Brown, H.A., Milne, S.B., Myers, D.S., Glass, C.K., Hardiman, G., Reichart, D., Merrill Jr, A.H., Sullards, M.C., Wang, E., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Garrett, T.A., Guan, Z., Ryan, A.C., Russell, D.W., McDonald, J.G., Thompson, B.M., Shaw, W.A., Sud, M., Zhao, Y., Gupta, S., Maurya, M.R., Fahy, E. and Subramaniam, S. (2010). A Mouse Macrophage Lipidome. *J. Biol. Chem.* 285: 39976-39985.
- Devlin, C.M., Kuriakose, G., Hirsch, E. and Tabas, I. (2002). Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6280-6285.
- Devlin, R.B. and Haskill, J.S. (1989). Differential production of tumor necrosis factor, macrophage colony stimulating factor, and interleukin 1 by human alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 45(4): 353-361.
- Dobrovolskaia, M.A. and Vogel, S.N. (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection* 4: 903-914.
- Ecker, J., Liebisch, G., Englmaier, M., Grandl, M., Robenek, H. and Schmitz, G. (2009). Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 107(17): 7817-7822.
- Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T. and Protter, A.A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268: 11811-11816.
- Febraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., and Silverstein, R.L. (2000). Targeted disruption in mice of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. *J. Clin. Invest.* 105: 1049-1056.
- Feingold, K.R., Shigenaga, J.K., Kazemi, M.R., McDonald, C.M., Patzek, S.M., Cross, A. S., Moser, A. and Grunfeld, C. (2012). Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *J Leukoc. Biol.* 92(4): 829-839.
- Flavell, R. A. (2002). The relationship of inflammation and initiation of autoimmune disease:

- role of TNF super family members. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 266: 1-9.
- Fung, J.L., Feingold, K.R., Moser, A.H., Grunfeld, C. (1993). Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atheroscler.* 98: 67-82.
- Garcia-Fabiani, M.B., Montanaro, M.A., Lacunza, E., Cattaneo, E.R., Coleman, R.A., Pellon-Maison, M. and Gonzalez-Baro, M.R. (2015). Methylation of the Gpat2 promoter regulates transient expression during mouse spermatogenesis. *Biochem. J.* 471(2): 211-220.
- Gargiulo, S., Gamba, P., Testa, G., Rossin, D., Biasi, F., Poli, G. and Leonarduzzi, G. (2015). Relation between TLR4/NF- κ B signaling pathway activation by 27-hydroxycholesterol and 4-hydroxynonenal, and atherosclerotic plaque instability. *Aging Cell* 14: 569-581.
- Glass, C.K. and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* 104: 503-516.
- Gonzalez-Baro, M.R., Granger, D.A. and Coleman, R.A. (2001). Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase contains two transmembrane domains with the active site in the N-terminal domain facing the cytosol. *J. Biol. Chem.* 276: 43182-43188.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5(12): 953-964.
- Greene, E.R., Huang, S., Serhan, C.N. and Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins other lipid mediat.* 96: 27-36.
- Guijasa, C., Rodríguez, J.P., Rubioa, J.M., Balboa, M.A., Balsinde, J. (2014). Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 1841(12): 1661-1671.
- Guo, Y., Cordez, K.R., Farese, R.V., J.R. and Walther, T.C. (2009). Lipid droplets at a glance. *J. Cell Sci.* 122: 749-752.
- Hadjidakis, D.J. and Androulakis, I.I. (2006). Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092: 385-396.
- Han, X., Kitamoto, S., Wang, H. and Boisvert, W.A. (2010). Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *FASEB J.* 24: 2869-2880.
- Hansson, G.K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352: 1685-1695.
- Hickey, W.F. (1999). Leukocyte Traffic in the Central Nervous System: The Participants and

- Their Roles. *Semin. Immunol.* 11(2): 125-137.
- Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S. and Martin, P. (1994). Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J. Cell Sci.* 107(5): 1159-1167.
- Hsu, H.Y. and Twu, Y.C. (2000). Tumor necrosis factor-alpha-mediated protein kinases in regulation of scavenger receptor and foam cell formation on macrophage. *J. Biol. Chem.* 275: 41035-41048.
- Huang, Y.L., Morales Rosado, J., Ray, J., Myers, T.G., Kho, T., Lu, M., and Munford, R.S. (2013). Toll-like Receptor Agonists Promote Prolonged Triglyceride Storage in Macrophages. *J. of Biol. Chem.* 289: 3001-3012.
- Huber, S.A., Sakkinen, P., Conze, D., Hardin, N. and Tracy, R. (1999). Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 2364-2367.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Johnson, A.M.F. and Olefsky, J.M. (2013). The Origins and Drivers of Insulin Resistance. *Cell* 152(4): 673-684.
- Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, H. and Nagata, S. (2006). Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature.* 443: 998-1002.
- Keidar, S., Heinrich, R., Kaplan, M., Hayek, T. and Aviram, M. (2001). Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized LDL: a possible role for interleukin-6. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1464-1469.
- Kennedy, E.P. (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Fed. Proc.* 20: 934-940.
- Kennedy, E.P. and Weiss, S.B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J. Biol. Chem.* 222: 193-214.
- Khatun, I., Clark, R.W., Vera, N.B., Kou, K., Erion, D.M., Coskran, T., Bobrowski, W.F., Okerberg, C., Goodwin, B. (2016). Characterization of a Novel Intestinal Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Pathway and Its Role in Lipid Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 291(6): 2602-2615.

- Kielian, T.L. and Blecha, F. (1995). CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. *Immunopharmacology*. 29: 187-205.
- Koh, T.J. and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* 13, e23. doi:10.1017/S1462399411001943.
- Koliwad, S.K., Streeper, R.S., Monetti, M., Cornelissen, I., Chan, L., Terayama, K., Naylor, S., Rao, M, Hubbard, B. and Farese, R.V. Jr. (2010). DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *J. Clin. Invest.* 120(3): 756-767.
- Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and Freeman, M.W. (2002). Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 277(51): 49982-49988.
- Lada, A.T., Willingham, M.C. and St. Clair, R.W. (2002). Triglyceride depletion in THP-1 cells alters cholesteryl ester physical state and cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 43: 618-628.
- Lammers, B., Chandak, P.G., Aflaki, E., Van Puijvelde, G.H.M., Radovic, B., Hildebrand, R.B., Meurs, I., Out, R., Kuiper, J., Van Berkel, T.J.C., Kolb, D. Haemmerle, G., Zechner, R., Levak-Frank, S., Van Eck, M. and Kratky, D. (2011). Macrophage Adipose Triglyceride Lipase Deficiency Attenuates Atherosclerotic Lesion Development in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 67-73.
- Lei, L., Xiong, Y., Chen, J., Yang, J.B., Wang, Y., Yang, X.Y., Chang, C.C., Song, B.L., Chang, T.Y. and Li, B.L. (2009). TNF-alpha stimulates the ACAT1 expression in differentiating monocytes to promote the CE-laden cell formation. *J. Lipid. Res.* 50: 1057-1067.
- Lewin, T.M., Schwerbrock, N.M., Lee, D.P., Coleman, R.A. (2004). Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279: 13488-95.
- Li, N., McLaren, J.E., Michael, D.R., Clement, M., Fielding, C.A. and Ramji, D.P. (2010). ERK is integral to the interferon-gamma-mediated activation of STAT1, the expression of key genes implicated in atherosclerosis, and the uptake of modified lipoproteins by human macrophages. *J. Immunol.* 185: 3041-3048.

- Liao, H.S., Matsumoto, A., Itakura, H., Doi, T., Honda, M., Kodama, T., Geng, Y.J. (1999). Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1872-1880.
- Libby, P. (2002). Fire Within. *Scientific American.* 47-55.
- Lu, Y.C., Yeh, W.C. and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145-151.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L. and Saltiel A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin.* 117:175-184.
- Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature.* 407: 233-241.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M.F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., Staels, B., Duverger, N., Scherman, D. and Tedgui, A. (1999). Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ. Res.* 85: 17-24.
- Mantovanil, A., Bonecchil, R., Martnez, F.O., Galliera, E., Perrier, P., Allavena, P. and Locati, M. (2003). Tuning of innate immunity and polarized responses by decoy receptors. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132: 109-115.
- Martinez, F.O. and Gordon, S.G. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep.* 6:13.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovia, A. and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13: 453-461.
- Maurya, M.R., Gupta, S., Li, X., Fahy, E., Dinasarapu, A.R., Sud, M., Brown, H.A., Glass, C.K., Murphy, R.C., Russell, D.W., Dennis, E.A. and Subramaniam, S. (2013). Analysis of Inflammatory and Lipid Metabolic Networks across RAW264.7 and Thioglycolate-elicited Macrophages. *J. Lipid Res.* 54: 2525-2542.
- McCusker, K., and Hoidal J. (1989). Characterization of Scavenger Receptor Activity in Resident Human Lung Macrophages. *Exp. Lung Res.* 15(4): 651-661.
- McLaren, J.E. and Ramji, D.P. (2009). Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20: 125-135.
- McNamara, J.R., Small, D.M., Li, Z. and Schaefer, E.J. (1996). Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. *J. Lipid Res.* 37: 1924-1935.

- Mosser, D.M. and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 958-969.
- Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D. and Cua, D.J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 198: 1951-1957.
- Murray, P.J. and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11(11): 723-737.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N., Wynn, T.A.. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41: 14-20.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., Evans, R.M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 93: 229-240.
- Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J. and Kameda-Takemura, K. (1995). Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J. Clin. Invest.* 96(4): 1859-1865.
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W. and Chawla, A. (2007). Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 447: 1116-1120.
- Panousis, C.G. and Zuckerman, S.H. (2000). Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon-gamma. *J. Lipid. Res.* 41: 75-83.
- Paulauskis and Sul (1988). Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 263: 7049-7054.
- Pearce, E. L. and Pearce, E. J. (2013). Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence. *Immunity* 38(4): 633-643.

- Pellon-Maison, M., Montanaro, M.A., Lacunza, E., Garcia-Fabiani, M.B., Soler-Gerino, M.C., Cattaneo, E.R., Quiroga, I.Y., Abba, M.C., Coleman, R.A. and Gonzalez-Baro, M.R. (2014). Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 behaves as a cancer testis gene and promotes growth and tumorigenicity of the breast cancer MDA-MB-231 cell line. *PLoS One* 9(6):e100896.
- Pennings, M., Meurs, I., Ye, D., Out, R., MHoekstra, M., Van Berkel, T.J.C., and Van Eck, M. (2006). Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Letters* 580: 5588-5596.
- Persson, J., Nilsson, J. and Lindholm, M.W. (2006). Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages. *Lipids Health Dis.* 5: 17.
- Persson, J., Nilsson, J. and Lindholm, M.W. (2008). Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha impede neutral lipid turnover in macrophage-derived foam cells. *BMC Immunol.* 9: 70.
- Pinderski, L.J., Fischbein, M.P., Subbanagounder, G., Fishbein, M.C., Kubo, N., Cheroutre, H., Curtiss, L.K., Berliner, J.A. and Boisvert, W.A. (2002). Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ. Res.* 90: 1064-1071.
- Pou, J., Rebollo, A. y Alegret, M. (2007). El monocito/macrófago como diana terapéutica en la aterosclerosis. *Clin. Invest. Arterioscl.* 19(2): 92-108.
- Raetz, C.R., Garrett, T.A., Reynolds, C.M, Shaw, W.A., Moore, J.D. , Smith, D.C., Ribeiro, Jr. A.A., Murphy, R.C. , Ulevitch, R.J., Fearn, C., Reichart, D., Glass, C.K., Benner, C., Subramaniam, S., Harkewicz, R., Bowers-Gentry, R.C., Buczynski, M.W., Cooper, J.A., Deems, R.A. and Dennis, E.A. (2006). Kdo2-Lipid A of *Escherichia coli*, a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4. *J. Lipid Res.* 47: 1097-1111.
- Rajamäki, K., Lappalainen, J., Öörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S., Kovanen, P.T. and Eklund, K.K. (2010). Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS ONE* 7: 1-9.
- Rajamäki, K., Lappalainen, J., Öörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S. and Kovanen, P. and Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am. Heart J.* 138: 419-

420.

- Reed, S.G. (1999). TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect.* 1: 1313-1325.
- Roberts, R.A., Ganey, P.E., Ju, C., Kamendulis, L.M., Rusyn, I., Klaunig, J.E. (2007). Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 96(1): 2-15.
- Romeo, G.R., Lee, J. and Shoelson, S.E. (2012). Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, and Roles of Inflammation – Mechanisms and Therapeutic Targets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* 32: 1771-1776.
- Rubic, T. and Lorenz, R.L. (2006). Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc. Res.* 69: 527-535.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory press; ISBN-10: 1936113422.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M. and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 421-452.
- Silva, A.R., Pacheco, P., Vieira de Abreu, A., Maya Monteiro, C.M., D'Alegria, B., Magalhães, K.G., de Assis, E.F., Bandeira-Melo, C., Faria Neto, H.C.C. and Bozza, P.T. (2009). Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1066-1075.
- Smith, A.M., Rahman, F.Z., Hayee, B., Graham, S.J., Marks, D.J., Sewell, G.W., Palmer, C.D., Wilde, J., Foxwell, B.M., Gloger, I.S., Sweeting, T., Marsh, M., Walker, A.P., Bloom, S.L. and Segal, A.W. (2009). Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 206: 1883-1897.
- Stout, R.D. and Suttles, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 76: 509-513.
- Tabas, I. (2000). Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1529: 164-171.
- Takahashi, M., Yagyu, H., Tazoe, F., Nagashima, S., Ohshiro, T., Okada, K., Osuga, J,

- Goldberg, I.J. and Ishibashi, S. (2013). Macrophage lipoprotein lipase modulates the development of atherosclerosis but not adiposity. *J. Lipid Res.* 54(4): 1124-1134.
- Takemura, R. and Werb, Z. (1984). Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.* 246: 1-9.
- Tian, Y., Pate, C., Andreolotti, A., Wang, L., Tuomanen, E., Boyd, K., Claro, E. and Jackowski, S. (2008). Cytokine secretion requires phosphatidylcholine synthesis. *J. Cell Biol.* 181(6): 945-957.
- Tobias, P. and Curtiss, L.K. (2005). Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis. *J. Lipid Res.* 46: 404-411.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 93: 241-252.
- Tsukamoto, K., Kinoshita, M., Kojima, K., Mikuni, Y., Kudo, M., Mori, M., Fujita, M., Horie, E., Shimazu, N. and Teramoto, T. (2002). Synergically Increased Expression of CD36, CLA-1 and CD68, but Not of SR-A and LOX-1, with the Progression to Foam Cells from Macrophages. *J. Atheroscler Thromb.* 9: 57-64.
- Vandanmagsar, B., Youm, Y.H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M. and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Med.* 17: 179-188.
- Vergnes, L., Beigneux, A.P., Davis, R., Watkins, S.M., Young, S.G. and Reue, K. (2006). *Agpat6* deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity. *The J. Lipid Res.* 47: 745-754.
- Vergnes, L., Beigneux, A.P., Davis, R.G., Watkins, S.M., Young, S.G. and Reue, K. (2006). *Agpat6* deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity. *J. Lipid Res.* 47: 745-754.
- Wendel, A.A., Cooper, D.E., Ilkayeva, O.R., Muoio, D.M. and Coleman, R.A. (2013). Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)-1, but not GPAT4, incorporates newly synthesized fatty acids into triacylglycerol and diminishes fatty acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 288(38): 27299-27306.

- Wendel, A.A., Lewin, T.M. and Coleman, R.A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Bioch. Biophys. Acta* 1791: 501-506.
- Yua, X., Fuc, Y.C., Zhangd, D.W. Kai Y. and Tang, C.K. (2013). Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 424: 245-252.