



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Papel del receptor nuclear PPAR β/δ en la respuesta metabólica a ácidos grasos de cadena media en macrófagos murinos

Paula Valentina Gaete Carrillo, MD

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Bogotá D.C., Colombia
2022

Papel del receptor nuclear PPAR β/δ en la respuesta metabólica a ácidos grasos de cadena media en macrófagos murinos

Paula Valentina Gaete Carrillo, MD

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para
optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director:

Carlos Olimpo Mendivil Anaya MD, PhD

Línea de Investigación:

Metabolismo

Grupo de Investigación:

Diabetes, Lípidos y Metabolismo UniAndes

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá D.C., Colombia

2022

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Paula Valentina Gaete Carrillo

Fecha:

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y a mis profesores de la maestría en bioquímica, que contribuyeron a mi proceso de análisis científico y a mi formación profesional.

A Patricia Liévano por ser siempre una persona muy amable, eficiente y dispuesta a ayudar y por ayudarme con todos los trámites administrativos relacionados con el desarrollo de la maestría.

Al grupo de Diabetes, Lípidos y Metabolismo UniAndes por ser un espacio de amistad, ciencia, colaboración y libertad.

A mis amigos del grupo de Diabetes, Lípidos y Metabolismo UniAndes, especialmente a Luz Dary Nieves y Valentina Guatibonza, quienes contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

A mi director de tesis, el Dr. Carlos O. Mendivil, por ser una guía y un referente en mi camino profesional y por hacerme pensar siempre más allá de lo evidente.

A mi esposo por ser el apoyo más grande en mi vida, por su amor incondicional, su bondad y su generosidad.

Resumen

Papel del receptor nuclear PPAR β/δ en la respuesta metabólica a ácidos grasos de cadena media en macrófagos murinos

Objetivo:

El objetivo de esta investigación es esclarecer la participación del receptor nuclear PPAR β/δ en la respuesta metabólica que desarrollan los macrófagos de ratón después de la exposición a ácidos grasos de cadena media (octanoico, C8:0 y decanoico, C10:0).

Metodología:

Se cultivaron macrófagos murinos J774A.1 en diferentes condiciones de tratamiento; en la mitad de las células se realizó un knock-down de la expresión para PPAR β/δ con un sistema de ácido ribonucleico pequeño de interferencia y el porcentaje de interferencia obtenido se verificó por RT-qPCR. El diseño experimental comparó 5 factores en las células a estudio:

- Knockdown de PPAR β/δ (sí o no)
- Exposición a ácido graso (cadena media vs cadena larga)
- Exposición a un agonista de PPAR β/δ (GW501516)
- Activación por lipopolisacárido (sí o no)
- Control negativo

En cada grupo de células se evaluó la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (Scarb1, Plin2, Npc1, Pltp, Cpt1, Abca1 y Abcg1) y con la función inmunitaria (Il6, Tnf, Ifng, Il10, Nos2, Ptgs2, Mcp1 y Mmp9) mediante RT-qPCR. La expresión de cada gen se cuantificó de forma relativa al gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa utilizando el método $\Delta\Delta Ct$.

Para evaluar el impacto funcional de la exposición a ácidos grasos de cadena media sobre la fagocitosis de lipoproteínas, un paso fundamental de la aterogénesis, se realizó en cada subgrupo de tratamientos un ensayo de captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) fluorescentemente marcadas.

Resultados y conclusiones:

Este estudio amplió el conocimiento sobre la respuesta a los ácidos grasos de cadena media en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y la función inmune en macrófagos murinos, y en qué medida este efecto está mediado por el receptor nuclear *PPAR β/δ* .

Palabras clave:

Ppard, metabolismo, lípidos, colesterol, aterosclerosis e inflamación.

Abstract

Role of the nuclear receptor PPAR β/δ in the metabolic response to medium-chain fatty acids in murine macrophages

Aim:

The aim of this investigation is to clarify the role of the nuclear receptor PPAR β/δ in the metabolic response that the murine macrophages develop after the exposition to medium-chain fatty acids (octanoic acid, C8:0 y decanoic acid, C10:0).

Methods:

J774A.1 murine macrophages were cultured under different treatment conditions; Half of the cells, had a *knock-down* against PPAR β/δ by using small interfering ribonucleic acids and the percentage of reduced expression was verified by RT-qPCR. The experimental design compared 5 factors in the cells under study:

- PPAR β/δ *knockdown* (yes or no)
- Exposure to fatty acid (medium chain vs. long chain)
- Exposure to a PPAR β/δ agonist (GW501516)
- Activation by lipopolysaccharide (yes or no)
- Negative control

The expression of genes related to lipid metabolism (*Scarb1*, *Plin2*, *Npc1*, *Pltp*, *Cpt1*, *Abca1* and *Abcg1*) and immune function (*Il6*, *Tnf*, *Ifng*, *Il10*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Mcp1* and *Mmp9*) was evaluated in each group of cells by RT-qPCR. The expression of each gene was quantified relative to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene using the $\Delta\Delta C_t$ method.

To assess the functional impact of medium-chain fatty acid exposure on lipoprotein phagocytosis, a critical step in atherogenesis, a fluorescently

labeled low-density lipoprotein (LDL) uptake assay was performed on each treatment subgroup.

Conclusions and results:

This study furthered our understanding of the response to medium-chain fatty acids in the expression of genes related to lipid metabolism and immune function in murine macrophages, and clarify the role of the nuclear receptor PPAR β/δ in this process.

Key words:

Ppard, metabolism, lipids, cholesterol, atherosclerosis and inflammation.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	Error! Bookmark not defined.
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVII
1. Marco conceptual	3
1.1 Enfermedad cardiovascular y aterosclerosis	3
1.2 Ácidos grasos de cadena media.....	6
1.3 Receptores activados por proliferadores peroxisomales	6
1.4 Receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR) β/δ	7
1.4.1 Estructura de PPAR β/δ	7
1.4.2 Ligandos de PPAR β/δ	9
1.4.3 Cardarina (GW501516)	10
2. Marco teórico	11
2.1 Genes modulados por PPAR β/δ con función en el metabolismo de lípidos.....	13
2.1.1 Genes relacionados con la captación de lipoproteínas.....	13
2.1.2 Genes relacionados con el eflujo de colesterol	13
2.1.3 Genes relacionados con la acumulación de lipoproteínas	14
2.1.4 Gen relacionado con la beta-oxidación de ácidos grasos	14
2.2 Genes relacionados con la función inmunitaria de los macrófagos.....	15
2.2.1 Citocinas proinflamatorias	15
2.2.2 Citocina antiinflamatoria	15
2.2.3 Proteínas importantes para la función fagocítica	16
2.2.4 Enzima involucrada la formación de leucotrienos	16
2.2.5 Quimiocina proinflamatoria	16
2.2.6 Colagenasa de matriz	17
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos	19

4. Metodología.....	21
4.1 Tipo de estudio:	21
4.2 Análisis estadístico:.....	21
4.3 Análisis de expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y con la función inmunitaria:	22
4.3.1 Descongelación de las células (macrófagos murinos de línea celular):.....	22
4.3.2 Pasaje celular:.....	22
4.3.3 Congelación de células:	23
4.3.4 Transfección de siRNA:	23
4.3.5 Extracción de RNA:	25
4.3.6 Verificación de la transfección usando RT-qPCR:	26
4.4 Ensayo de captación de lipoproteínas.....	27
4.4.1 Extracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL):.....	27
4.4.2 Electroforesis de lipoproteínas:	28
4.4.3 Tinción de las LDL y VLDL:	28
4.4.4 Ensayo de captación de lipoproteínas en un lector de placas:.....	29
4.4.5 Ensayo de captación de lipoproteínas en microscopio de fluorescencia:	29
5. Resultados	31
5.1 Efecto de los ácidos grasos de cadena media sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos:.....	31
5.1.1 Análisis de expresión de <i>PPARD</i> :	31
5.1.2 Análisis de expresión de genes relacionados con la captación de lipoproteínas.....	31
	32
5.1.3 Análisis de expresión de genes relacionados con el eflujo de colesterol:	36
5.1.4 Análisis de expresión de genes relacionados con la acumulación de lipoproteínas:	36
5.1.5 Análisis de expresión de genes relacionados con la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga:	36
5.2 Efecto de los ácidos grasos de cadena media sobre la expresión de genes relacionados con la función inmunitaria:	50
5.2.1 Análisis de expresión de genes relacionados con citocinas proinflamatorias:	50
5.2.2 Análisis de expresión de la principal citocina antiinflamatoria: ...	50
5.2.3 Análisis de expresión de un gen relacionado con la función fagocítica de macrófagos:	50
5.2.4 Análisis de la expresión de una enzima relacionada con la formación de leucotrienos:	61
5.2.5 Análisis de la expresión de una quimiocina proinflamatoria:	61

5.2.6	Análisis de la expresión de una colagenasa de matriz:.....	61
5.3	Análisis de captación de lipoproteínas	69
6.	Discusión	71
7.	Conclusiones y recomendaciones	73
7.1	Conclusiones	73
7.2	Recomendaciones	74
	Bibliografía.....	75

Lista de figuras

	Pág.
Ilustración 1	4
Ilustración 2	5
Ilustración 3	9
Ilustración 4	10
Ilustración 5	25
Ilustración 6	32
Ilustración 7	33
Ilustración 8	34
Ilustración 9	35
Ilustración 10	37
Ilustración 11	38
Ilustración 12	39
Ilustración 13	40
Ilustración 14	41
Ilustración 15	42
Ilustración 16	43
Ilustración 17	44
Ilustración 18	45
Ilustración 19	46
Ilustración 20	47
Ilustración 21	48
Ilustración 22	51
Ilustración 23	52
Ilustración 24	53
Ilustración 25	54
Ilustración 26	55
Ilustración 27	56
Ilustración 28	57
Ilustración 29	58
Ilustración 30	59
Ilustración 31	60
Ilustración 32	62
Ilustración 33	63
Ilustración 34	64

Ilustración 35	65
Ilustración 36	66
Ilustración 37	67
Ilustración 38	70
Ilustración 39	70

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.....	21
Tabla 2.....	27
Tabla 3.....	49
Tabla 4.....	49
Tabla 5.....	68
Tabla 6.....	68
Tabla 7.....	69

Lista de abreviaturas

(Clúster de diferenciación 36 [CD36], transportador dependiente de ATP subfamilia A miembro 1 [ABCA1] y transportador dependiente de ATP subfamilia G miembro 1 [ABCG1]) (Huangfu, et al., 2021).

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>LDL</i>	Lipoproteínas de baja densidad
<i>PPAR</i>	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
<i>RXR</i>	Receptor de ácido-9-cis-retinoico
<i>PPRE</i>	Elementos respondedores a PPAR
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>NFκB</i>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<i>LPS</i>	Lipopolisacáridos
<i>ATP</i>	Adenosina trifosfato
<i>TNF-α</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>IL-6</i>	Interleucina 6
<i>CD36</i>	Clúster de diferenciación 36
<i>ABCA1</i>	Transportador dependiente de ATP subfamilia A miembro 1
<i>ABCG1</i>	Transportador dependiente de ATP subfamilia G miembro 1
<i>VLDL</i>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<i>Scarb1</i>	Receptor basurero clase B, miembro 1
<i>Pltp</i>	Proteína de transferencia de fosfolípidos
<i>HDL</i>	Lipoproteínas de alta densidad
<i>Plin2</i>	Perilipina
<i>Npc1</i>	Proteína Niemann Pick C1
<i>Cpt1</i>	Carnitina palmitoil transferasa 1
<i>Il10</i>	Interleucina 10
<i>Ifng</i>	Interferón gamma
<i>Nos2</i>	Óxido nítrico sintetasa inducible
<i>Ptgs2</i>	Ciclo-oxigenasa 2

Abreviatura	Término
Mcp1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
Mmp9	Metalopeptidasa de matriz 9
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
SFB	Suero fetal bovino
rpm	Revoluciones por minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	RNA pequeño de interferencia
<i>Gapdh</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
NaCl	Cloruro de sodio
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
PBS	Buffer fosfato salino

1.Marco conceptual

1.1 Enfermedad cardiovascular y aterosclerosis

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de mortalidad en el mundo, se estima que en el año 2019 causó la muerte de 17.9 millones de personas a nivel global, lo que representa el 32% de todas las muertes (Nowbar, et al., 2019). La enfermedad cardiovascular incluye a un grupo de enfermedades que afecta el corazón y los vasos sanguíneos, las cuales son; la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad arterial periférica y el tromboembolismo venoso. La enfermedad isquémica cardíaca fue la primera causa de muerte en el mundo, mientras que el accidente cerebrovascular agudo fue la segunda (López & Murray, 2020).

La aterosclerosis es el proceso fisiopatológico subyacente más importante de la enfermedad cardiovascular (Hansson & Hermansson, 2011). La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, que se caracteriza por la acumulación de material fibroso y graso en la capa íntima de las arterias de pequeño y mediano calibre, formando lo que se denomina como placa aterosclerótica o ateroma (Libby, Buring & Badimon, 2019). Con el tiempo la placa aterosclerótica puede volverse más fibrosa y calcificada, lo que aumenta su inestabilidad, causando su ruptura y su liberación al lumen arterial, provocando obstrucción de los vasos sanguíneos e isquemia en diferentes tejidos y órganos (Kobiyama & Ley, 2018).

La alteración en el metabolismo del colesterol es uno de los factores determinantes de la formación de las lesiones ateroscleróticas (Libby, 2021). El atrapamiento de lipoproteínas ricas en colesterol en la pared endotelial es un evento clave en la aterogénesis, ya que la unión de las lipoproteínas a los proteoglicanos de la matriz extracelular de la íntima de los vasos sanguíneos causa la agregación de las partículas de lipoproteínas, daño endotelial, reclutamiento de leucocitos (principalmente monocitos y linfocitos) e inflamación (Vergallo & Crea, 2020). Adicionalmente, el desequilibrio entre el influjo y el eflujo de colesterol conlleva a un exceso

en la acumulación intracelular de colesterol (particularmente lipoproteínas de baja densidad o LDL) en los macrófagos y a la formación de células espumosas (Alahmadi & Ramji, 2022).

Las células espumosas son macrófagos diferenciados al interior de la íntima, que se forman después de fagocitar las lipoproteínas en exceso sobre la pared endotelial (Malekmohammad, Bezsonov & Rafieian-Kopaei, 2021). Las células espumosas contribuyen a todas las fases de la aterosclerosis, en las fases iniciales fomentan la progresión de la enfermedad causando un ambiente proinflamatorio (Figura 1), mientras que en la fase tardía liberan metaloproteinasas de matriz que promueven la ruptura de la placa (Figura 2). Además de los macrófagos, las células endoteliales y las células de músculo liso también pueden convertirse en células espumosas (Alahmadi & Ramji, 2022).

Un mayor número de células espumosas o un alto contenido de lípidos a nivel intracelular son marcadores de la severidad de la aterosclerosis inducida por lípidos. Una disminución en la captación de lipoproteínas, especialmente de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por parte de los macrófagos o su polarización hacia un fenotipo menos inflamatorio (M2) está relacionado con una menor progresión de la aterosclerosis (Liao, Zhu & Zhou, 2021).

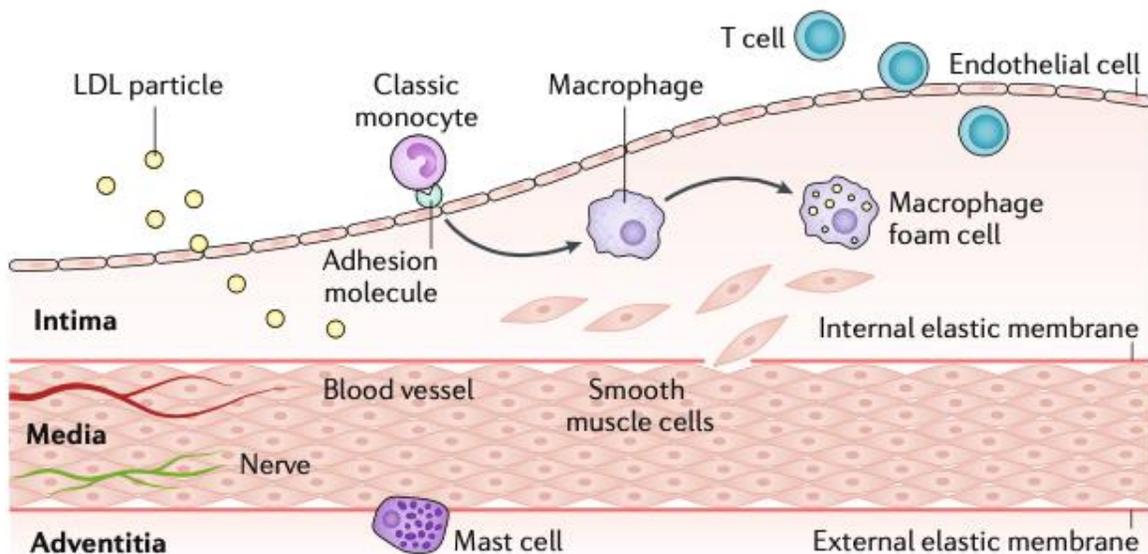


Ilustración 1

Iniciación y progresión de la aterosclerosis. La pared arterial cuenta con una estructura trilaminar (la adventicia, la media y la íntima). Las placas ateroscleróticas se forman en la capa más interna de las arterias, la íntima.

En la fase inicial, las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se acumulan en la íntima y son sometidas a cambios oxidativos y otras modificaciones, que promueven un ambiente proinflamatorio e inmunogénico. Los monocitos circulantes pueden penetrar la íntima y unirse a moléculas de adhesión expresadas por las células endoteliales activadas, mientras que las quimiocinas promueven su migración a la pared arterial. Una vez en la íntima, los monocitos pueden diferenciarse a macrófagos, que expresan receptores basurero (scavenger receptors), por lo que pueden captar a las LDL y convertirse en células espumosas. Cuando esto ocurre, aumenta la población de células inmunes, atrayendo también linfocitos T hacia la íntima. Los linfocitos T pueden regular funciones de la respuesta inmune innata y de las células endoteliales y de músculo liso presentes en la pared endotelial. Las células de músculo liso pueden migrar de la túnica media hacia la túnica íntima en respuesta a mediadores inflamatorios. *Figura tomada de: Libby, P., Buring, J.E., Badimon, L. et al (2019). Atherosclerosis. Nature Reviews Disease Primers 5 (56), 1-18.*

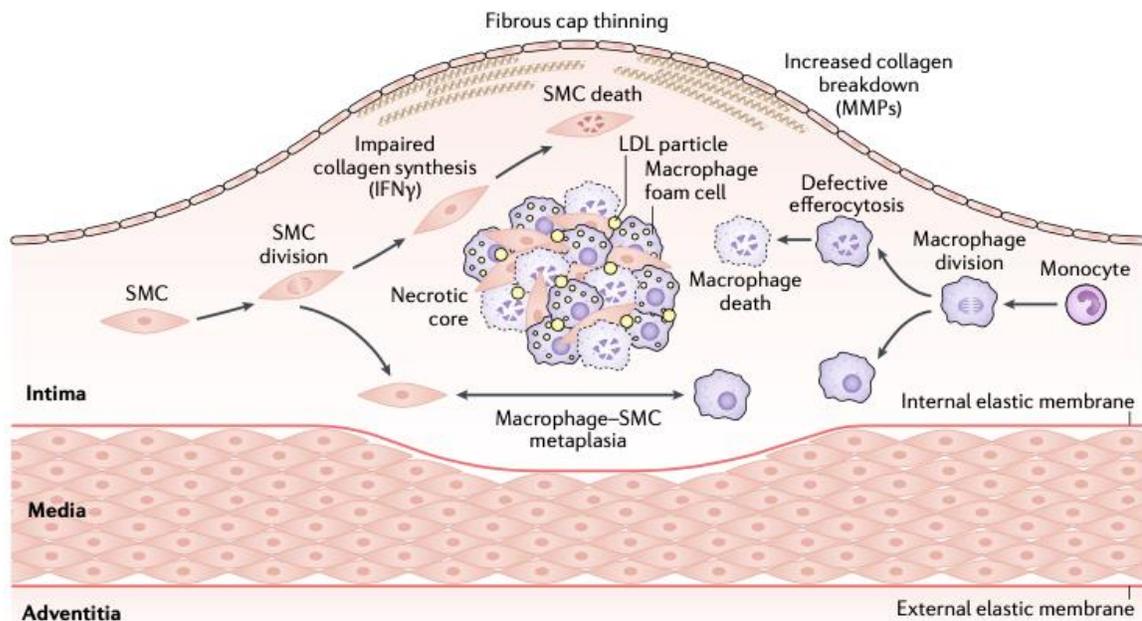


Ilustración 2

Fase tardía de la aterosclerosis. Una vez se ha formado la placa aterosclerótica y se han desencadenado todos los procesos inflamatorios

relacionados; las células de músculo liso empiezan a liberar diferentes moléculas de matriz extracelular como elastina, colágeno, proteoglucanos y glucosaminoglicanos; que contribuyen al engrosamiento de la túnica íntima. Sin embargo, el ambiente proinflamatorio, dado por la activación de los linfocitos T y de los macrófagos, altera la capacidad de las células de músculo liso de mantener la capa fibrosa que cubre el ateroma, volviéndola cada vez más delgada. Adicionalmente, los macrófagos activados empiezan a producir metaloproteinasas de matriz, que empiezan a degradar el colágeno presente en la capa fibrosa, causando la inestabilidad de la placa aterosclerótica. Este debilitamiento de la placa aumenta el riesgo de ruptura. Las células presentes al interior de la placa pueden sufrir apoptosis y necrosis, el proceso de aclaramiento de estas células muertas puede ser defectuoso, contribuyendo a la formación del centro necrótico de la placa, constituido por lipoproteínas de baja densidad, células muertas y detritos celulares. *Figura tomada de: Libby, P., Buring, J.E., Badimon, L. et al (2019). Atherosclerosis. Nature Reviews Disease Primers 5 (56), 1-18.*

1.2 Ácidos grasos de cadena media

Los ácidos grasos se pueden clasificar según la longitud de su cadena de carbonos en ácidos grasos de cadena corta (hasta 6 átomos de carbono), de cadena media (de 7 a 12 carbonos) y de cadena larga (>12 carbonos). Los ácidos grasos octanoico (8 carbonos) y decanoico (10 carbonos) se encuentran en baja concentración en la dieta habitual, e incluso en el aceite de coco, que es su principal alimento fuente (Pain, Shinhmar & Williams, 2021).

El consumo de los ácidos grasos de cadena media ha aumentado durante los últimos años, especialmente en el contexto de una dieta cetogénica. El consumo de estos ácidos grasos, particularmente de ácido octanoico (saturado, ocho carbonos de longitud) y decanoico (saturado, diez carbonos de longitud) se han asociado a un efecto anticonvulsivante (Wlaz, et al., 2012), neuroprotector (Chang, et al., 2015), anticarcinogénico (Wakana, et al., 2019) y antiinflamatorio (Narayanan, et al., 2015).

1.3 Receptores activados por proliferadores peroxisomales

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son factores de transcripción de la súper-familia de los receptores hormonales nucleares. Hasta el momento se han descrito tres tipos codificados por

genes diferentes: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . Después de la activación por medio de la unión al ligando, los PPARs se heterodimerizan con el receptor de ácido-9-cis-retinoico (RXR) y se unen a los elementos respondedores a PPARs (PPRE) en las regiones regulatorias de los genes diana. Las secuencias de los PPRE están compuestas por dos hexámeros (AGGTCA) separados por una secuencia espaciadora corta (Kahremany, et al., 2015) y los genes diana están involucrados en la organogénesis, proliferación y diferenciación celular, inflamación y en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Blunder, et al., 2021).

Se han descrito dos isoformas de PPAR γ ; PPAR γ 1 y PPAR γ 2, ambas presentes a nivel de proteína tanto en ratón como en humanos. PPAR γ 1 se expresa en una amplia gama de tejidos que incluyen: el corazón, el músculo esquelético, el colón, el intestino delgado, los riñones, el páncreas y el bazo. En tanto PPAR γ 2, que tiene treinta aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal debido a el uso de un promotor diferente y a splicing alternativo, se expresa principalmente en el tejido adiposo (Berger & Moller, 2002). Sin embargo, con una dieta alta en grasa puede haber expresión de PPAR γ 2 en un mayor número de tejidos. La activación de PPAR γ disminuye los lípidos circulantes, ya que es un facilitador de la adipogénesis y del almacenamiento de ácidos grasos. Además, PPAR γ también regula la inflamación y la respuesta inmune, reprimiendo la expresión de genes proinflamatorios (Chi, et al., 2021).

Por su parte, PPAR α se expresa principalmente en el tejido adiposo pardo, el músculo esquelético, el corazón, el hígado y la mucosa intestinal; donde regula la homeostasis del metabolismo de glucosa y lípidos, la inflamación, la respuesta inmune y la angiogénesis. El efecto sistémico en el metabolismo de lípidos después de la activación de PPAR α es la disminución de los triglicéridos y el aumento del colesterol de alta densidad (HDL) y de las cetonas circulantes (Tan, et al., 2021). Los fibratos, utilizados clínicamente para el manejo de la hipertrigliceridemia, son agonistas de PPAR α (Wagner & Wagner., 2020).

1.4 Receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR) β/δ

1.4.1 Estructura de PPAR β/δ

PPAR β/δ es expresado de forma ubicua en todos los tejidos. La estructura de PPAR β/δ consiste en cuatro dominios funcionales: el dominio N terminal,

el dominio de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) (que incluye dos dedos de zinc), el dominio bisagra y el dominio de unión a ligando (Zieleniak, Wójcik & Wozniak, 2008).

El dominio N terminal es el dominio más diferente entre los PPARs, y media la actividad independiente del ligando, promoviendo interacciones proteína-proteína con co-activadores y co-represores e induciendo cambios conformacionales que permiten interacciones alostéricas (Helsen & Claessens, 2014).

El dominio de unión al DNA es el más conservado entre los PPARs y está conformado por dos dedos de zinc que forman la estructura central. Una hélice- α presente en el primer dedo de zinc, promueve el reconocimiento de la secuencia específica de los PPRE en el DNA y el segundo dedo de zinc media la heterodimerización con RXR (Kahremany, et al., 2015). El dominio bisagra separa el dominio de unión al DNA y el dominio de unión al ligando y contiene una señal de localización nuclear y cadenas laterales de aminoácidos que están sujetas a diferentes modificaciones post-traduccionales (Anbalagan, et al., 2012).

El dominio de unión a ligando es muy similar entre los diferentes tipos de PPARs. Este dominio consiste en trece hélices- α y cuatro láminas- β , más del 80% de los aminoácidos presentes en este dominio es igual en los tres tipos de PPARs, por lo que la selectividad al ligando entre los diferentes PPARs está dada por modificaciones sutiles. Un cambio en un único aminoácido cambia dramáticamente la capacidad de reconocimiento del ligando por el receptor (Carrieri, et al., 2013). El brazo-1 en el receptor PPAR β/δ forma un túnel muy estrecho que restringe la unión de compuestos de gran tamaño en la cabeza polar (Figura 3), debido a esto muchos ligandos de los otros PPARs no son ligandos de PPAR β/δ , como por ejemplo las tiazolidinedionas (Batista, et al., 2012).

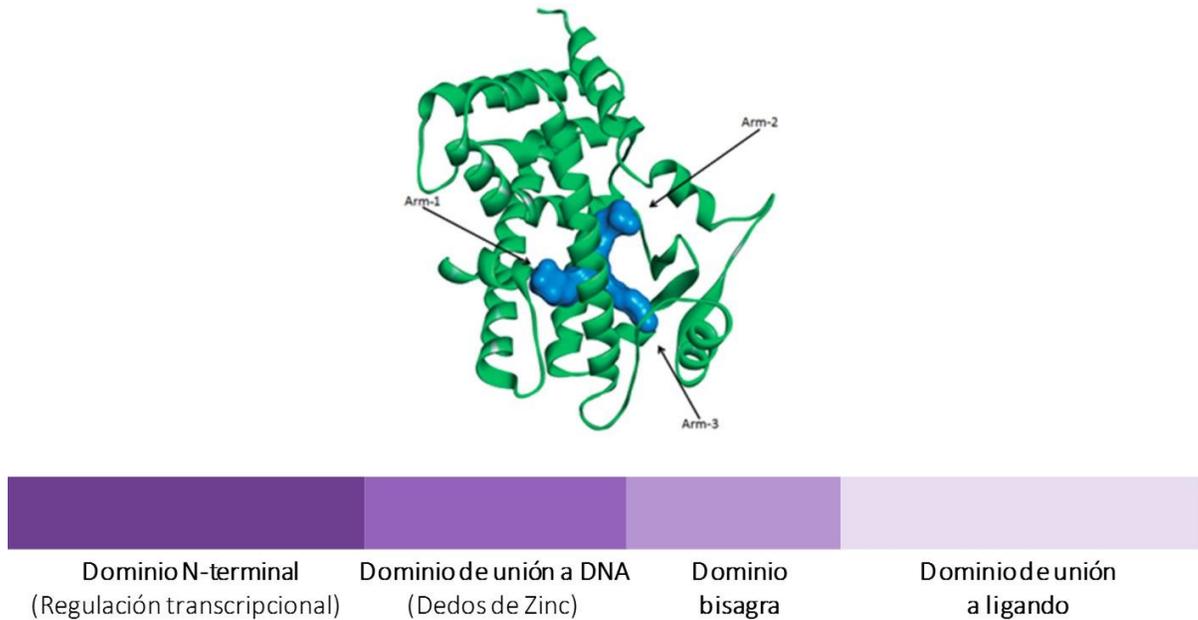


Ilustración 3

Figura 3: Estructura de PPAR β/δ Arriba: estructura del dominio de unión a ligando de PPAR β/δ por cristalografía de rayos X. Abajo: Distribución de los dominios en PPAR β/δ . Tomado de: Kahremany, S., Livne, A., Gruzman, A., Senderowitz, H., & Sasson, S. (2015). *Activation of PPAR δ : from computer modelling to biological effects*. *British journal of pharmacology*, 172(3), 754-770.

1.4.2 Ligandos de PPAR β/δ

Aunque algunos ácidos grasos son capaces de unirse a los tres tipos de PPARs, otros ácidos grasos se unen de forma específica a un tipo particular de PPAR. Los ácidos grasos que se unen de forma específica al PPAR β/δ son el ácido oleico, el ácido linoleico, el ácido araquidónico y el ácido eicosapentaenoico, todos ácidos grasos poliinsaturados. Algunos eicosanoides como la prostaglandina A1 y la prostaglandina D2 también tienen una gran afinidad por PPAR β/δ (Benetti, Patel & Collino, 2011).

Se conoce que los ácidos grasos de cadena media son activadores selectivos de PPAR γ y agonistas parciales de PPAR α y PPAR β/δ . El PPAR mayormente expresado en macrófagos es PPAR β/δ (Liberato, et al., 2012) y su activación se encuentra relacionada con cambios en la expresión de genes

relacionados con el metabolismo de lípidos y un fenotipo antiinflamatorio (Adhikary, et al., 2015).

Existen agonistas selectivos para PPAR β/δ (GW0742 y GW501516). Sin embargo, hasta ahora ninguno de los dos agonistas ha sido aprobado para su uso en humanos, esto debido a un potencial efecto carcinogénico (Blunder, et al., 2021) relacionado con un aumento en la producción en la angiogénesis y en las tasas de proliferación, así como una disminución en la apoptosis (Kahremany, 2015).

1.4.3 Cardarina (GW501516)

GW501516 es un agonista selectivo de PPAR β/δ desarrollado debido a sus potenciales efectos beneficiosos a nivel metabólico y cardiovascular. Este compuesto tiene un efecto sinérgico con el ejercicio, mejorando la resistencia muscular, aumentando la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis, disminuyendo la masa grasa y aumentando el consumo de oxígeno (Dressel, et al., 2003).

GW501516 tiene una alta afinidad ($K_m=1$ nM) para PPAR β/δ con una selectividad >1000 veces para PPAR β/δ sobre PPAR α y PPAR γ . Al unirse a PPAR β/δ recluta a su coactivador PGC-1 α . Es de administración oral y su estructura tiene 21 carbonos con tres estructuras cíclicas, 3 átomos de flúor y dos de azufre (Figura 4) (Iwashita, et al., 2007).

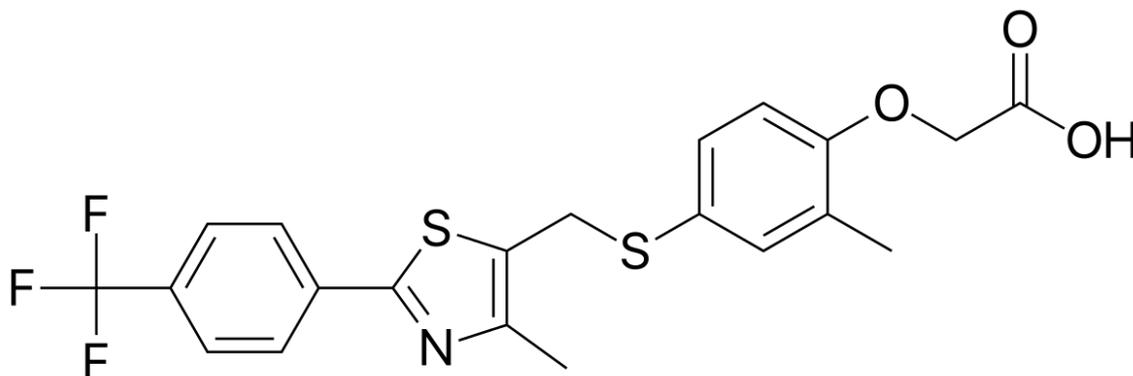


Ilustración 4

Figura 4: estructura del GW501516 (agonista específico de PPAR β/δ). Tomado de: Iwashita, A., Muramatsu, Y., Yamazaki, T., Muramoto, M., Kita, Y., Yamazaki, S., ... & Matsuoka, N. (2007). Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor δ -selective agonists in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(3), 1087-1096.

2.Marco teórico

Cómo se explicó anteriormente, la enfermedad cardiovascular es la primera causa de mortalidad en el mundo, causando el 32% de todas las muertes (Nowbar, et al., 2019). El aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, la disfunción endotelial y la hipercolesterolemia son unos de los principales factores de riesgo (Balta, et al., 2021).

Los ácidos grasos de cadena media tienen varios mecanismos de acción que pueden impactar positivamente sobre los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Los ácidos grasos de cadena media son activadores selectivos de PPAR γ y agonistas parciales de PPAR α y PPAR β/δ . El PPAR mayormente expresado en macrófagos es PPAR β/δ (Liberato, et al., 2012), por lo que tiene un efecto importante como regulador del sistema inmune.

El efecto de PPAR β/δ en la regulación de la respuesta inmune se debe a sus efectos en las células inmunitarias, principalmente en los macrófagos. La activación de PPAR β/δ promueve un fenotipo más antiinflamatorio en los macrófagos (M2). Debido a esto, estudios en ratones han demostrado que la ausencia de PPAR β/δ puede llevar a una disfunción hepática y resistencia a la insulina o a una enfermedad renal autoinmune. Adicionalmente, PPAR β/δ suprime los efectos inflamatorios inducidos por el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B), limitando la activación de linfocitos e inhibiendo la diferenciación y proliferación de células inmunitarias (Adhikary, et al., 2015). También se ha demostrado que su función antiinflamatoria inhibe el desarrollo de aterosclerosis y previene la disfunción endotelial al reducir el estrés oxidativo (Wagner & Wagner., 2020).

Existen una serie de efectos generales de PPAR β/δ , modulados por los genes diana comunes en todos los tipos celulares y órganos, estos genes en su mayoría están relacionados con el metabolismo de lípidos, principalmente con la captación y oxidación de ácidos grasos y la respiración mitocondrial (la acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena muy larga, la acil-CoA oxidasa 1, la acil-CoA aciltransferasa 2, la catalasa, la enoil-CoA hidratada 1, la piruvato deshidrogenasa quinasa 4, el transportador de

solutos de la familia 25 miembro 20, la proteína similar a Niemann-Pick C1 tipo 1, la proteína similar a la angiopoietina tipo 4, la proteína de unión a ácidos grasos 3-5, la perilipina 2 y la proteína adipocitaria 2) (Blunder, et al., 2021).

Un estudio en ratones con diabetes inducida por estreptozocina (un modelo de diabetes tipo 1), demostró que los ácidos grasos de cadena media disminuyen la glucemia, el peso corporal, el porcentaje de grasa y mejoran el perfil lipídico (Sung, Liao & Chien, 2018). Otro estudio en ratones halló que la suplementación de ácidos grasos de cadena media en la dieta disminuye la esteatohepatitis no alcohólica inducida por una dieta alta en grasa, al disminuir alteraciones en la autofagia y la lipotoxicidad hepática (Wang, et al., 2017). La activación de PPAR β/δ también ha demostrado mejorar el perfil lipídico tanto en humanos, como en primates (aumenta el HDL, disminuye los triglicéridos y disminuye la absorción intestinal de colesterol) y ha disminuido la obesidad inducida por una dieta alta en grasa en roedores (Kahremany, 2015). Adicionalmente, la activación de PPAR β/δ mejora la homeostasis de la glucosa en sangre y la sensibilidad a la insulina, disminuyendo los síntomas del síndrome metabólico en ratones y primates (Kahremany, 2015).

Los macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) o interferón gama (IFN-g), además de aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias y polarizarse hacia un fenotipo M1, tienen cambios en el metabolismo energético. Mientras que los macrófagos M1 tienen un aumento en la oxidación de ácidos grasos, un ciclo de Krebs normal y una alta tasa de fosforilación oxidativa y síntesis de adenosina trifosfato (ATP), los macrófagos M1 aumentan la actividad de la glucólisis aeróbico, tienen un ciclo de Krebs alterado (con acumulación intracelular de citrato y succinato), tienen una menor síntesis de ATP en la mitocondria y una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (Bahiraii, et al., 2022).

Un estudio en ratones y macrófagos murinos demostró que al inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), se inhibe la formación de células espumosas y se previene el desarrollo de aterosclerosis (Tan, et al., 2021). La disminución en la secreción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos se encontró relacionada con una disminución en la expresión de diferentes transportadores de ácidos grasos, tanto hacia adentro de la célula, como hacia afuera de la célula (Clúster de diferenciación 36 [CD36], transportador dependiente de ATP subfamilia A miembro 1 [ABCA1] y

transportador dependiente de ATP subfamilia G miembro 1 [ABCG1]) (Huangfu, et al., 2021).

Actualmente se desconoce el efecto directo de los ácidos grasos de cadena media sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y con la inflamación en macrófagos. Teniendo en cuenta que los ácidos grasos de cadena media pueden activar a los factores de transcripción PPARs y que el tipo de PPAR mayormente expresado en macrófagos es PPAR β/δ , es probable que el efecto de los ácidos grasos octanoico y decanoico sobre la modulación de la expresión de genes asociados con el metabolismo de lípidos esté mediado por PPAR β/δ .

Al evaluar el impacto de ácidos grasos de cadena media sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y la inflamación, además de su impacto sobre la captación de LDL y VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), y en qué medida este efecto está mediado por PPAR β/δ , esta investigación permitirá expandir el conocimiento sobre nuevas dianas terapéuticas para prevenir la enfermedad cardiovascular.

2.1 Genes modulados por PPAR β/δ con función en el metabolismo de lípidos

2.1.1 Genes relacionados con la captación de lipoproteínas

***Scarb1* (Receptor basurero clase B, miembro 1):** es una glucoproteína de membrana expresada en macrófagos y otras células mieloides que se une a lipoproteínas y permite que sean fagocitadas. También está involucrada en el desarrollo de apoptosis inducida por el estrés al retículo endoplásmico, la diferenciación de macrófagos y la adhesión celular. Un aumento en la expresión de este gen se relaciona con un aumento en el riesgo de aterosclerosis (Irene, et al., 2021).

2.1.2 Genes relacionados con el eflujo de colesterol

***Pltp* (proteína de transferencia de fosfolípidos):** proteína liberada hacia afuera de la célula que transfiere fosfolípidos desde las lipoproteínas ricas en triglicéridos hacia las lipoproteínas de alta densidad (HDL), regulando así el tamaño de las HDL. La actividad sérica aumentada de Pltp es un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular. Por contraste, la deficiencia de Pltp en ratones disminuyó el desarrollo de aterosclerosis, la respuesta trombótica y la incidencia de aneurismas de aorta abdominal. En estudios

de asociación genómica (GWAS), los niveles plasmáticos de esta proteína se han relacionado con un aumento en los niveles de triglicéridos y de apolipoproteína B en sangre (Jiang & Yu., 2021).

***Abca1* (transportador A1 con cassette de unión al ATP):** es un transportador localizado en la membrana celular que promueve el eflujo celular de colesterol y fosfolípidos. Se combina con apolipoproteínas extracelulares para formar HDL nacientes, que son el primer paso del transporte reverso de colesterol. Un aumento en la expresión de este gen se relaciona con un menor riesgo de aterosclerosis (Shim, et al., 2021).

***Abcg1* (transportador G1 con cassette de unión al ATP):** promueve el eflujo de colesterol y suprime la generación de células espumosas (Zhang, et al., 2021).

2.1.3 Genes relacionados con la acumulación de lipoproteínas

***Plin2* (perilipina):** proteína de unión a lípidos que rodea las vacuolas grasas en la célula y participa en el almacenamiento de lípidos dentro de la célula (Zhao, et al., 2021). Variantes de pérdida de función en este gen se relacionan con un menor riesgo de aterosclerosis y con un menor grosor del complejo íntima-media de la carótida en humanos (Saliba-Gustafsson, et al., 2019).

***Npc1* (proteína Niemann Pick C1):** coopera con proteína Niemann Pick C2 (Npc2) en el transporte de colesterol hacia el interior de las células y participa en el eflujo del colesterol lisosomal. Alteraciones en esta proteína conllevan a la acumulación anormal de colesterol en los lisosomas y en general, en el interior de las células (Gu, et al., 2021). Un estudio realizado en ratones mostró que alterar la función de esta proteína conlleva a un mayor riesgo de aterosclerosis (Zhang, et al., 2008)

2.1.4 Gen relacionado con la beta-oxidación de ácidos grasos

***Cpt1* (carnitina palmitoil transferasa 1):** enzima mitocondrial que cataliza el paso limitante para el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial, de tal forma que estos puedan ser oxidados (Nohara, 2001). Un aumento en la expresión de esta enzima se relaciona con la inhibición de la progresión de la aterosclerosis (Nomura, et al., 2019).

2.2 Genes relacionados con la función inmunitaria de los macrófagos

2.2.1 Citocinas proinflamatorias

***Il6* (interleucina 6):** es una citocina proinflamatoria que estimula la maduración de las células B hacia células productoras de anticuerpos y promueve la proliferación, activación y diferenciación de las células T. Adicionalmente, también es un factor quimioatrayente de macrófagos y neutrófilos. Los niveles circulantes de esta proteína aumentan con la edad en los humanos, y se han relacionado con un aumento en el riesgo de mortalidad por todas las causas. Un aumento en la expresión de esta proteína se ha relacionado con un aumento en la aterosclerosis, y en personas con un evento coronario previo, es un factor de mal pronóstico, ya que se correlaciona con un aumento en la recurrencia del evento cardiovascular y con un aumento en el crecimiento de la placa aterosclerótica en las arterias coronarias (Reiss, Siegert & De Leon, 2017).

***Tnf* (factor de necrosis tumoral):** es una citocina proinflamatoria que se une al receptor del factor de necrosis tumoral y estimula la vía inflamatoria del factor nuclear κ B (NF κ B). La activación de esta vía promueve la transcripción de genes relacionados con la inmunidad innata y adaptativa. Un aumento en los niveles circulantes de esta proteína se relacionan con un mayor riesgo de inicio y de progresión de la aterosclerosis (Gao, et al., 2016).

***Ifng* (interferón gamma):** es una citocina proinflamatoria altamente expresada en las placas ateroscleróticas. Su función es muy importante para la inmunidad innata y adaptativa, ya que está involucrada en la activación de macrófagos y linfocitos. Un aumento en la expresión de esta proteína se relaciona con una mayor captación de lipoproteínas por parte de los macrófagos y a una mayor formación de células espumosas, conllevando a un aumento en la progresión de la aterosclerosis (Voloshyna, Littlefield & Reiss, 2014).

2.2.2 Citocina antiinflamatoria

***Il10* (interleucina 10):** es una citocina antiinflamatoria que inhibe la activación de los macrófagos. Un aumento en la expresión de esta proteína se correlaciona con una menor expresión de metaloproteinasas de matriz, y por tanto, con un menor riesgo de progresión de la aterosclerosis y de la ruptura por inestabilidad de la placa aterosclerótica. Estudios en ratones

han demostrado que la deficiencia de esta proteína promueve el desarrollo rápido del ateroma (Caligiuri, et al., 2003).

2.2.3 Proteínas importantes para la función fagocítica

Nos2 (óxido nítrico sintetasa inducible): es una enzima independiente al calcio, cuya expresión es inducida por citocinas, estrés oxidativo y el factor de transcripción NF-kB. Su expresión en macrófagos es proporcional al estado inflamatorio oxidativo de la célula y se sintetiza como respuesta en contra de patógenos virales y microbianos. En ciertas enfermedades, como en la aterosclerosis, la expresión de esta enzima se encuentra aumentada y exacerba la inflamación y el progreso de la enfermedad (Chojnacka & Lewandowska, 2021).

2.2.4 Enzima involucrada la formación de leucotrienos

Ptgs2 (Endoperóxido de prostaglandina sintetasa 2 o ciclo-oxigenasa 2): es una enzima miembro de la familia de sintetasas de prostaglandinas, que convierte el ácido araquidónico en endoperóxido de prostaglandina H₂, un paso clave en la biosíntesis de prostaglandinas. La expresión de esta enzima aumenta durante la inflamación y su sobreexpresión se encuentra asociada con un aumento en el riesgo de eventos cardiovasculares. La expresión de esta enzima es inducida por factores de crecimiento y estímulos proinflamatorios, como los lipopolisacáridos (Eliopoulos, et al., 2002).

2.2.5 Quimiocina proinflamatoria

Mcp1 (Proteína quimioatrayente de monocitos 1): es una proteína perteneciente a la familia de quimiocinas C-C, llamadas de esta forma debido a la presencia de dos residuos de cisteína adyacentes. Estas proteínas ejercen su función quimioatrayente a través de la unión a receptores acoplados a proteínas G y está implicada en el reclutamiento de monocitos hacia los focos de inflamación. Un aumento en la expresión de esta enzima en sangre, se ha relacionado con un aumento en los eventos cardiovasculares, especialmente los relacionados con aterosclerosis. Estudios animales en los que se eliminaba la expresión de esta proteína, disminuyeron la acumulación de lípidos en la capa íntima de las arterias. Se ha demostrado que esta proteína tiene un papel importante en la formación de ateromas, ya que al aumentar la concentración de monocitos en la pared endotelial, estimula la formación de células espumosas (Ren, et al., 2022).

2.2.6 Colagenasa de matriz

***Mmp9* (metalopeptidasa de matriz 9):** es una proteína degradadora de la matriz extracelular, involucrada en procesos de remodelamiento tisular, cicatrización de heridas, progresión de la aterosclerosis e invasión tumoral. Se expresa como una preproteína activada mediante proteólisis, que una vez activada y por un proceso dependiente de zinc, degrada la elastina y los colágenos tipos IV, V y XI. Alteraciones en el funcionamiento de esta proteína se relacionan con anomalías en el desarrollo del tejido esquelético y con una menor invasión tumoral y progresión de la aterosclerosis. En humanos, es un biomarcador de disfunción endotelial y de las enfermedades cardiovasculares relacionadas con la obesidad, incluyendo a la aterosclerosis, la hipertensión arterial y el síndrome metabólico (Zhang, 2022).

3.Objetivos

3.1 Objetivo general

Esclarecer la participación del receptor nuclear PPAR β/δ en la respuesta metabólica e inflamatoria que desarrollan los macrófagos de ratón después de la exposición a ácidos grasos de cadena media (octanoico, C8:0 y decanoico, C10:0).

3.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de los ácidos grasos de cadena media (octanoico y decanoico) sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico y en la respuesta inmune en macrófagos murinos y determinar en qué medida dicho efecto está mediado por el receptor nuclear PPAR β/δ .

Evaluar el efecto de la activación de macrófagos murinos con lipopolisacáridos sobre la expresión de mediadores del metabolismo de lípidos y en la respuesta inmune.

Observar el efecto de los ácidos grasos de cadena media (octanoico y decanoico) sobre la captación de LDL y VLDL en macrófagos murinos.

Evaluar el efecto de la activación de macrófagos murinos con lipopolisacáridos sobre la captación de LDL y VLDL en macrófagos murinos.

4. Metodología

4.1 Tipo de estudio:

Estudio experimental llevado a cabo en macrófagos murinos.

Tabla 1

	siRNA para Ppard			
	Si		No	
	LPS+	LPS-	LPS+	LPS-
Control	*	*	*†	*†
Octanoato	*	*	*†	*†
Decanoato	*	*	*†	*†
Palmitato	*	*	*†	*†
GW501516	*	*	*†	*†

* Expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y la función inmunitaria

† Ensayo de captación de LDL

Tabla 1: diseño experimental del estudio

4.2 Análisis estadístico:

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Statistics v24. Se compararon las medias grupales utilizando un modelo lineal general (ANOVA) a tres vías, teniendo como efectos fijos los criterios: 1. Knockdown de PPARb/d (Si/No), 2. Activación con LPS (Si/No) y 3. Tratamiento (control, octanoato, decanoato, palmitato o GW501516). El nivel de significancia (α) para todas las pruebas será 0.05.

4.3 Análisis de expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y con la función inmunitaria:

4.3.1 Descongelación de las células (macrófagos murinos de línea celular):

Se descontaminó la cabina de flujo con etanol al 70% y se encendió la luz UV durante 15 minutos. Después se descongelaron los reactivos al baño de maría y se extrajo el vial con las células congeladas del tanque de nitrógeno líquido y se colocó en agua a 37°C, luego se pasó el contenido del criovial a un falcon de 15 mL y se adicionaron 4 mL del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 20% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico y 2 mM de L-Glutamina. Se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer y con azul de tripan (dilución 1:2) y se sembraron las células en un frasco T-25 con 5-7 mL del medio anteriormente descrito. Las células se dejaron incubando a 37°C y 5% CO₂. Se cambió el medio cada 24 horas.

4.3.2 Pasaje celular:

A los tres días, las células se pasaron a dos frascos de cultivo T-25, cada uno con aproximadamente 800mil a 1 millón 200 mil células. Previo a la realización del procedimiento, se descontaminó la cabina de flujo con etanol al 70% y se encendió la luz UV durante 15 minutos. Primero, se pasó el medio de cultivo con las células a un falcon de 15 mL. Luego, se rasparon las células adherentes con un raspador, se verificó que todas las células se hubieran desprendido usando el microscopio invertido, y se resuspendieron en 2 mL de medio de mantenimiento (DMEM al 10% de SFB, 1% de antibiótico y 2mM de L-Glutamina) y se combinaron con las células en el falcon de 15 mL.

El contenido del falcon se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 1 mL de medio de mantenimiento, anteriormente descrito. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y con azul de tripan (dilución 1:2) y se sembraron las células en 2 frascos T-25 con 5 mL de medio de mantenimiento. Las células se dejaron incubando a 37°C y 5% CO₂. Se cambió el medio cada 24 horas.

A los cuatro días aproximadamente se repitió el procedimiento del pasaje celular, pero en este caso las células se sembraron en 6 frascos T-25, cada

uno con 800mil a 1 millón 200 mil células y 5 mL de medio de mantenimiento.

4.3.3 Congelación de células:

Se congelaron las células de 4 frascos T-25 en diferentes crioviales, cada uno con un millón a un millón 500 mil células en 1 mL de medio de congelación (DMEM con 20% de SFB, 1% de antibiótico, 2 mM de L-Glutamina y dimetilsulfóxido (DMSO)). Los crioviales con las células fueron conservados a -80°C durante un día y luego se pasaron al tanque de nitrógeno líquido.

En los dos frascos T-25 que no se congelaron, se repitió el procedimiento del pasaje celular, solo que en este caso se sembraron en cuatro placas de 6 pozos a una densidad de 200mil células por pozo aproximadamente, con 3 mL de medio de mantenimiento (DMEM con 10% de SFB, 1% de antibiótico y L-Glutamina 2mM). A dos placas de cuatro se les realizó el tratamiento con los siRNA al día siguiente.

4.3.4 Transfección de siRNA:

Se realizó un knock-down de la expresión de PPAR β/δ en la línea celular de macrófagos murinos empleando un sistema de ácido ribonucleico (RNA) pequeño de interferencia (siRNA) (Santa Cruz Biotechnology, CAT SC-36306). Esta técnica utiliza tres moléculas de RNA de doble cadena, cada una con una longitud entre diecinueve a veinticinco pares de bases, correspondientes a tres secuencias diferentes presentes en el RNA mensajero de PPAR β/δ .

La transfección del sistema de siRNA a la línea celular se realizó mediada por lípidos. Posterior al ingreso del siRNA, éste se une a RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA), el cual degrada una de las hebras y forma un complejo con la hebra complementaria al RNA mensajero de PPAR β/δ . El complejo siRNA de cadena simple-RISC se une al RNA mensajero de PPAR β/δ y recluta a la proteína argonauta, que se encargará después de la degradación del RNA mensajero de PPAR β/δ .

Se siguieron las instrucciones del fabricante para la preparación de la solución A con los siRNA y el medio de transfección. La solución A con los siRNA y el medio de transfección se incubaron durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, se lavaron las células con medio de cultivo de mantenimiento (anteriormente descrito) y se aspiró el medio. Se

agregaron 800 μ L de la mezcla de la solución A con los siRNA y el medio de transfección a cada pozo.

Se mezcló suavemente y se dejó incubando durante 5 a 7 horas a 37 grados centígrados con CO₂ al 5%. Al día siguiente se aspiró el medio y se reemplazó por medio de mantenimiento (DMEM con 10% de SFB, 1% de antibiótico y 2mM de L-Glutamina) y después de 24 a 72 horas, se comprobó el knock-down de la expresión de PPAR β/δ por medio de PCR cuantitativa de RNA obtenido de las células transfectadas.

A los tres días aproximadamente, se cosecharon las células de las cuatro placas de 6 pozos (las que fueron transfectadas y las que no). Para esto, se colocó el medio con las células en un falcon de 15 mL (por separado las que fueron transfectadas y las que no), se rasparon y se añadieron a la mezcla las células adherentes que quedaron en el pozo con un scraper. Se verificó que todas las células se hubieran desprendido observando en el microscopio invertido.

Se centrifugó el contenido de cada falcon a 2500 rpm durante tres minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 1 mL de medio de mantenimiento (DMEM con 10% de SFB, 1% de antibiótico y 2mM de L-Glutamina). Se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer empleando azul de tripan (con dilución 1:2).

Se tomó una alícuota de volumen de las células transfectadas para la extracción de RNA y el resto de células (transfectadas y no transfectadas) se sembraron en dos placas de 12 pozos a una densidad de 100.000 células por pozo con medio de mantenimiento, siguiendo la distribución observada en la figura 5 (se muestra una pareja de placas, todos los tratamientos se realizarán en triplicado, para un total de 3 parejas de placas - 6 placas).

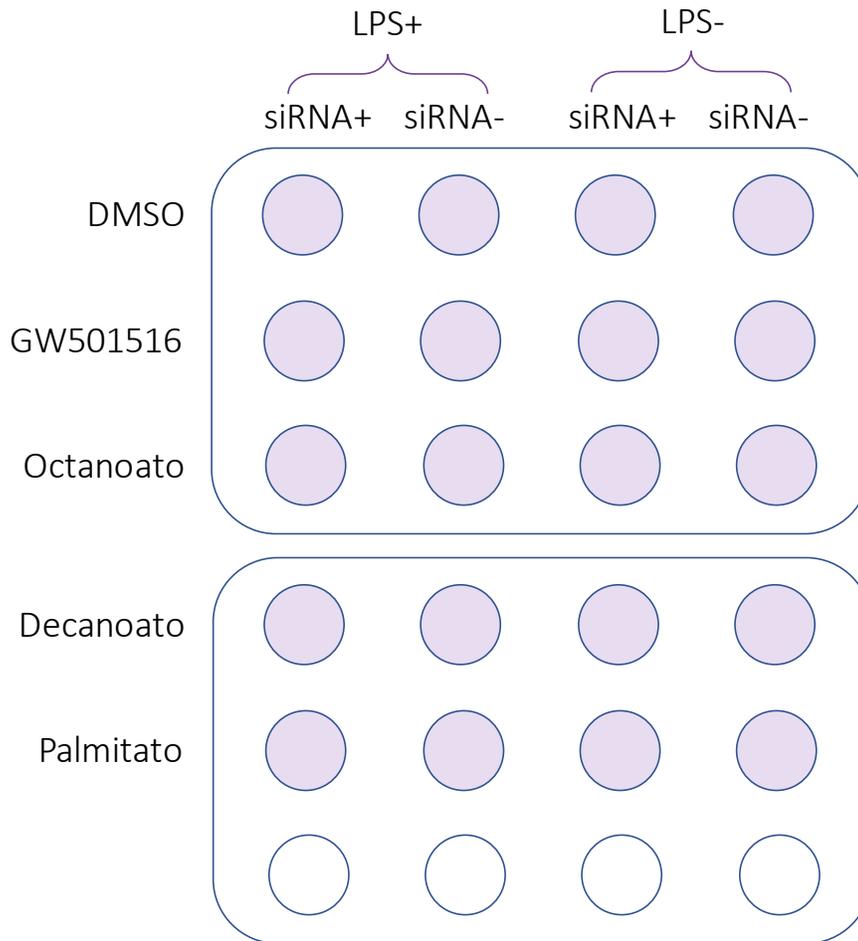


Ilustración 5

Figura 5: distribución de las condiciones de tratamiento en placas de 12 pozos

4.3.5 Extracción de RNA:

Se mezcló la alícuota de células separada para la extracción de RNA con TRIzol (1 mL de reactivo por cada 5-10 millones de células) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 14mil rpm durante diez minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Luego, se agregaron al sobrenadante 100 μ L de BCP por cada mL de reactivo TRIzol y se mezcló bien. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 a 15 minutos. Después, se centrifugó a 14mil rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se agregó 1 mL de etanol al 75% por cada mL de TRIzol, se centrifugó a 12mil rpm durante 5 minutos, se retiró el etanol y se secó al aire el sedimento de RNA en la cámara de

extracción. El RNA se disolvió en 50 μ L de agua libre de nucleasas. Se verificó la calidad y se cuantificó el RNA extraído usando NanoDrop.

4.3.6 Verificación de la transfección usando RT-qPCR:

Se utilizaron unos primers de hexámeros al azar (1X) para la transcripción reversa. El volumen final para cada reacción fue de 20 μ L, del cual la mitad del volumen fue RNA y las concentraciones de los otros reactivos fueron: RT Buffer a 1X, dNTPs a 4 mM, transcriptasa reversa a 2.5 U/ μ L e inhibidor de RNAsas a 1U/ μ L. Las condiciones del termociclador fueron 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos y 85°C durante 5 minutos. Para la PCR cuantitativa se usó un volumen final por reacción de 5 μ L en un tubo de 0.2 mL libre de DNAsas y RNAsas. A cada tubo se le agregó cada uno de los primers a 1.5 μ M, SYBR Green PCR Master Mix a 1X, el DNA a una concentración de 50 ng/ μ L y el volumen restante con agua libre de nucleasas. Tanto el control, como el gen diana, se realizarán por triplicado. Los primers utilizados para PPAR β/δ fueron: Forward: 5'-GCACATCTACAACGCCTACC-3' y Reverse: 5'-GTGGATGACAAAGGGTGCG-3'. Como gen canónico se usó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) con los siguientes primers: Forward: 5'-TCAGGAGAGTGTTCCTCGT-3' y Reverse: 5'-CCAATACGGCCAAATCCGTT-3'. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, anillaje a 60°C durante 60 segundos y extensión a 70°C durante 30 segundos, asegurándose de incluir la lectura de fluorescencia al final del paso de extensión.

Una vez se verificó el éxito de la transfección con los siRNA para PPAR β/δ , se retiró el medio de cultivo de mantenimiento de cada uno de los pozos y se añadieron 2 mL de medio de cultivo con LPS a 2 μ g/mL (Berlato, et al., 2002) o de medio de cultivo sin LPS (siguiendo la distribución descrita en la Figura 5). El medio de mantenimiento con LPS es medio DMEM con SFB al 5%, 2 mM de L-Glutamina y 2 μ g/mL de LPS, mientras que el medio de mantenimiento sin LPS es medio DMEM con SFB al 5%, 1% de antibiótico y 2mM de L-Glutamina. Las células se dejaron incubando toda la noche.

Al día siguiente las células fueron incubadas en medio con los tratamientos de ácidos grasos. Para esto, se retiró el medio de todos los pozos y se adicionaron 2 mL de cultivo con el tratamiento correspondiente a las siguientes concentraciones: GW501516 a una concentración de 100nM (Díaz-Gandarilla, et al., 2013) y los ácidos octanoico, decanoico y palmítico a una concentración de 250 μ M (Esta concentración se encuentra dentro de lo reportado en plasma de pacientes humanos sometidos a una dieta rica

en ácidos grasos de cadena media (Haidukewych, et al., 1982)). Todos los medios tenían SFB al 5%, antibiótico al 1% y L-Glutamina a 2 mM. Todos los tratamientos se dejarán incubando durante tres días.

Después de los tres días de incubación con los tratamientos, las células de cada pozo se cosecharon de forma individual, de la misma forma que se describió anteriormente y se extrajo el RNA utilizando TRIzol. Después se realizó la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA) complementario y el RNA se almacenó hasta su uso a -70°C . Se realizó una PCR cuantitativa para medir la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de lípidos y con la función inmunitaria, utilizando los primers nombrados en la Tabla 2. Nuevamente se utilizó como gen canónico, el gen Gapdh (con los siguientes primers: Forward: 5'- TCAGGAGAGTGTTTCCTCGT -3' y Reverse: 5'- CCAATACGGCCAAATCCGTT-3') y se calculó la expresión relativa de cada gen, utilizando el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. La expresión de cada gen, para cada una de las condiciones de tratamiento, se realizó por triplicado.

Tabla 2

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Longitud del amplicón (pb)
<i>Ppard</i>	GCACATCTACAACGCCTACC	GTGGATGACAAAGGGTGCG	103
<i>Scarb1</i>	TTTGGAGTGGTAGTAAAAAGGGC	TGACATCAGGGACTCAGAGTAG	71
<i>Plin2</i>	GTCCCTCAGCTCTCCTGTTA	CTCATCACCACGCTCTGTG	91
<i>Npc1</i>	GTCACCTACGTGGCATTCT	CACAAAGTACCGCCTTCTGT	78
<i>Pltp</i>	CAATATCTCGGACGTGAGGG	TTCAGCAGCAGATCTTGGTC	84
<i>Abca1</i>	GTGGAATCGTCCCTCAGTTC	CTGAGAAACTGTCTCTCTTT	78
<i>Abcg1</i>	AAGGTTGCCATAGCTTCTCG	CAGATGTGTCAGGACCGAGT	101
<i>Cpt1</i>	GACTCCGCTCGCTCATT	TCTGTTTGAGGGCTTCATGG	145
<i>Il6</i>	GACAAAGCCAGAGTCTTCTCAG	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTG	76
<i>Tnf</i>	CCCTCACACTCACAAACCAC	TTTGAGATCCATGCCGTTGG	92
<i>Ifng</i>	TCAAGTGGCATAGATGTGGA	TTTCATGTACCATCCTTTTGC	78
<i>Il10</i>	CTGTCATCGATTTCTCCCTG	CACCTTGGTCTTGGAGCTTATTA	86
<i>Nos2</i>	AGCGCTCTAGTGAAGCAAAG	AGGGATTCTGGAACATTCTGTG	107
<i>Ptgs2</i>	TCCAACCTCTCTACTACACC	AGGAAGCTCCTTATTTCCCTTC	90
<i>Mcp1</i>	TTCACCAGCAAGATGATCCC	TGAGCTTGGTGACAAAACTAC	100
<i>Mmp9</i>	AGCCGACTTTTGTGGTCTTC	GCGGTACAAGTATGCCTCTG	83
<i>Gapdh</i>	TCAGGAGAGTGTTTCCTCGT	CCAATACGGCCAAATCCGTT	70

Tabla 2: primers utilizados para la cuantificación de la expresión relativa de genes relacionados con metabolismo de lípidos y con función inmunitaria en macrófagos murinos

4.4 Ensayo de captación de lipoproteínas

4.4.1 Extracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL):

Se recolectó sangre de un voluntario sano por medio de venopunción en un tubo con EDTA, se mezcló la sangre por inversión y se sumergió en hielo. Después, se pasó la sangre a un tubo falcon de 15 mL, se centrifugó a 5914 rpm durante 20 minutos a 4 grados centígrados y se recolectó el plasma en un tubo nuevo. Mientras el plasma se encontraba sumergido en hielo, se realizó un gradiente de densidad discontinuo con cloruro de sodio (NaCl) y sacarosa (en el fondo del tubo se agregaron 200 μ L de una solución de sacarosa al 48%, luego 285 μ L de suero con NaCl a 4M y 514 μ L de una solución de NaCl 0.67M y EDTA al 0.5%) en un tubo de ultracentrífuga. El tubo de ultracentrífuga con el gradiente discontinuo con NaCl y sacarosa se centrifugó en un rotor S140-AT a 86,260 rpm durante una hora y 45 minutos a 10 grados centígrados y se recolectaron las primeras 20 fracciones de 44, que correspondían a los primeros 454 μ L de la superficie del tubo, obtenidos sin perturbar el gradiente. Este procedimiento se repitió 40 veces y se recolectó la solución de lipoproteínas en un falcon de 50 mL.

4.4.2 Electroforesis de lipoproteínas:

Se verificó la adecuada extracción de LDL y VLDL mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE, para esto se sembraron 3 mL de lipoproteínas con 3 μ L de buffer de carga y se realizó la electroforesis a 100V durante 60 minutos. Una vez terminada la electroforesis, se removió el gel y se agregó en una bolsa plástica con solución de fijación (75% de etanol y 5% de ácido acético) y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 15 minutos y se descartó la solución de fijación. Después, se incubó el gel con solución de Sudan al 0.5% en etanol al 60% y se dejó agitando suavemente a temperatura ambiente durante 120 minutos. Se descartó la solución de Sudan y se dejó el gel hasta que se destiñera en una solución al 50% de etanol en un contenedor oscuro a 4 grados centígrados. Finalmente. Se analizó el gel en un foto documentador.

4.4.3 Tinción de las LDL y VLDL:

Se incubó la solución de lipoproteínas con BODIPY a 2 μ M a 37 grados centígrados durante toda la noche en un falcon cubierto con papel aluminio. Al siguiente día, para eliminar el fluoróforo no unido a lipoproteínas, la solución de lipoproteínas con BODIPY se centrifugó en un filtro para centrifugado 10K agregando 1 mL de la solución y 10 mL de PBS a 5000 rpm hasta que el volumen de la canastilla fue de 1 mL. Se repitió este procedimiento 3 veces. Antes de cada centrifugación se mezcló por pipeteo suave el contenido de la canastilla con una punta de 20-200 μ L.

4.4.4 Ensayo de captación de lipoproteínas en un lector de placas:

Se sembraron 10 mil células por pozo en 300 μ L de medio, en 30 pozos de una caja de 96 pozos con medio de mantenimiento y se dejaron incubando durante 24 horas. Se cambió el medio normal por el medio con o sin LPS y se dejaron incubando durante 16 horas. Después, se cambió el medio con o sin LPS, por medio con el ácido graso específico (control, octanoato, decanoato, palmitato o agonista GW501516) y se dejaron incubando durante 24 horas.

Luego, se cambió el medio por una mezcla de 150 μ L de la solución del tratamiento y 150 μ L del medio con el ácido graso específico y se dejó incubando durante 36 horas en una incubadora a 37 grados centígrados con CO₂ al 5%. Se aspiró cuidadosamente el medio y se sembró en otro pozo y se midió la fluorescencia en el medio (valores basales) y en las células a una longitud de onda de excitación a 495 nm y de emisión a 507 nm. Para calcular el porcentaje de captación de lipoproteínas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Fluorescencia en las células} / (\text{Fluorescencia en las células} + \text{Fluorescencia en el medio})$$

4.4.5 Ensayo de captación de lipoproteínas en microscopio de fluorescencia:

Se sembraron 300 mil células en 10 pozos de dos cajas de 6 pozos, en 2 mL de medio normal y se dejaron incubando durante 24 horas. A las 48 horas, se cambió el medio por el medio con o sin LPS y se dejó incubando durante 16 horas, luego se cambió el medio por el medio con el ácido graso específico (control, octanoato, decanoato, palmitato y agonista) y se dejó incubando durante 24 horas. Luego, se cambió el medio por una mezcla de 1 mL con la solución de lipoproteínas y 1 mL del medio específico. Se dejaron las células incubando durante 36 horas y luego se lavaron 3 veces con PBS. Se fijaron las células con 1 mL de solución de formaldehído al 3% en PBS durante 20 minutos y luego se lavaron tres veces con PBS. Después, se incubó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (2 μ g/mL en PBS) durante 10 minutos y se visualizó en un microscopio confocal.

5. Resultados

5.1 Efecto de los ácidos grasos de cadena media sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos:

5.1.1 Análisis de expresión de *PPARD*:

Se tomó como grupo de referencia a los macrófagos murinos no expuestos a ningún tratamiento con ácido graso ni agonista, no estimulados con LPS y sin el *knockdown* para *Ppard*. El tratamiento con octanoato o decanoato no causó cambios en la expresión del receptor nuclear *PPARD* en los macrófagos estimulados con LPS (figura 6) y no estimulados con LPS (Figura 7). Por otro lado, el tratamiento con el agonista GW501516 aumento la expresión de este gen. Adicionalmente, se logró un adecuado *knockdown* del gen de *Ppard* en los macrófagos murinos, que se puede evidenciar con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,043$) en la expresión de *Ppard* en las células que fueron sometidas al tratamiento con los siRNA, comparadas con las que no (Figura 6).

5.1.2 Análisis de expresión de genes relacionados con la captación de lipoproteínas

El octanoato y el decanoato no causaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de *Scarb1* en los macrófagos estimulados (Figura 8) y no estimulados con LPS (Figura 9), aunque sí hubo una tendencia del decanoato a aumentar la expresión de este gen, aunque esta tendencia se dió principalmente en los macrófagos con el *knockdown* para *Ppard*, lo que indica que probablemente el decanoato se une al receptor PPARD y tiene una función represora sobre la transcripción de *Scarb1*. De forma interesante, la unión del palmitato a PPARD parece tener una función inductora sobre la transcripción de este gen, sobre todo en los macrófagos no estimulados con LPS (Figura 8).

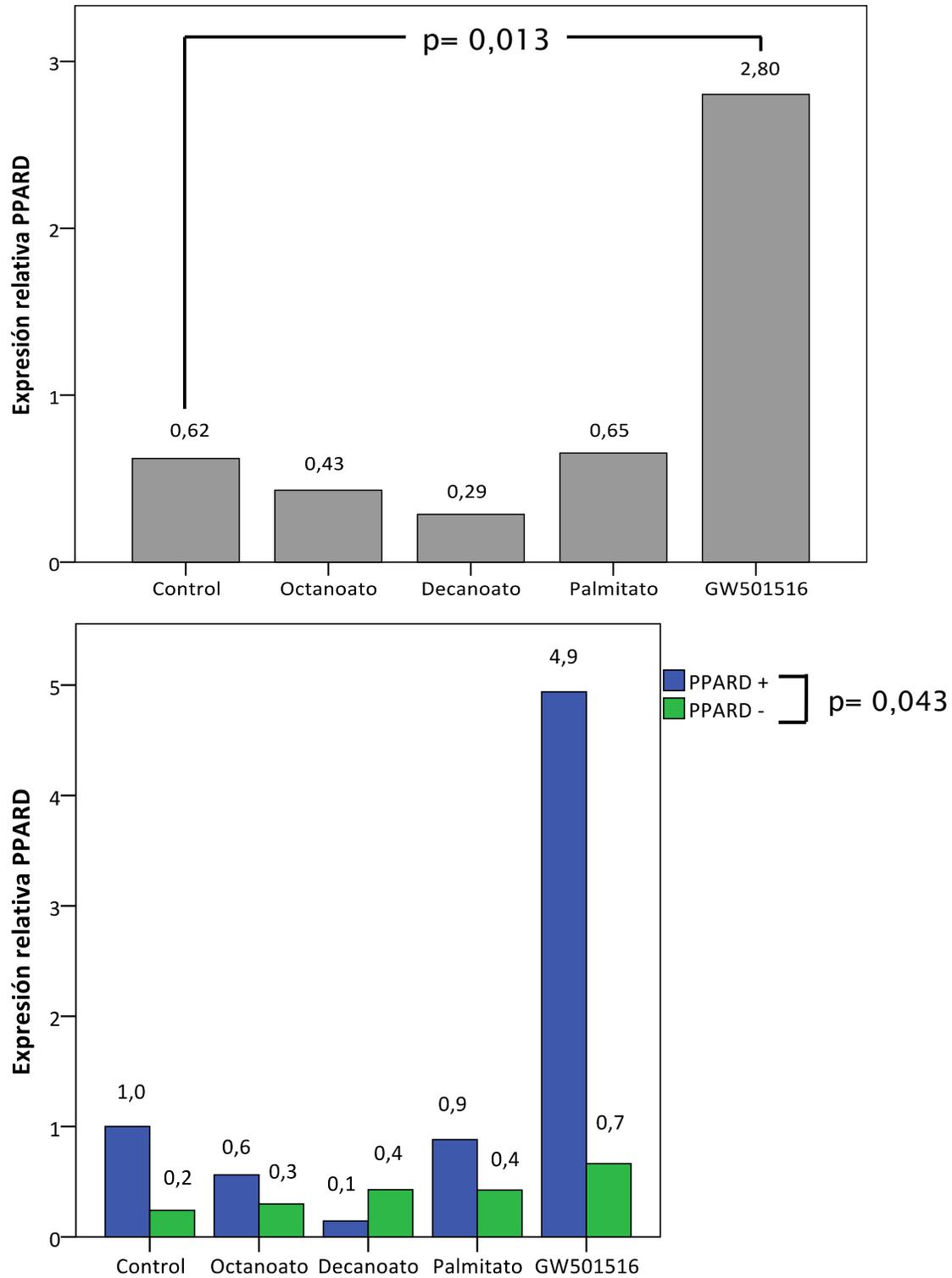


Ilustración 6

Figura 6: expresión relativa de Ppard en macrófagos no estimulados con LPS

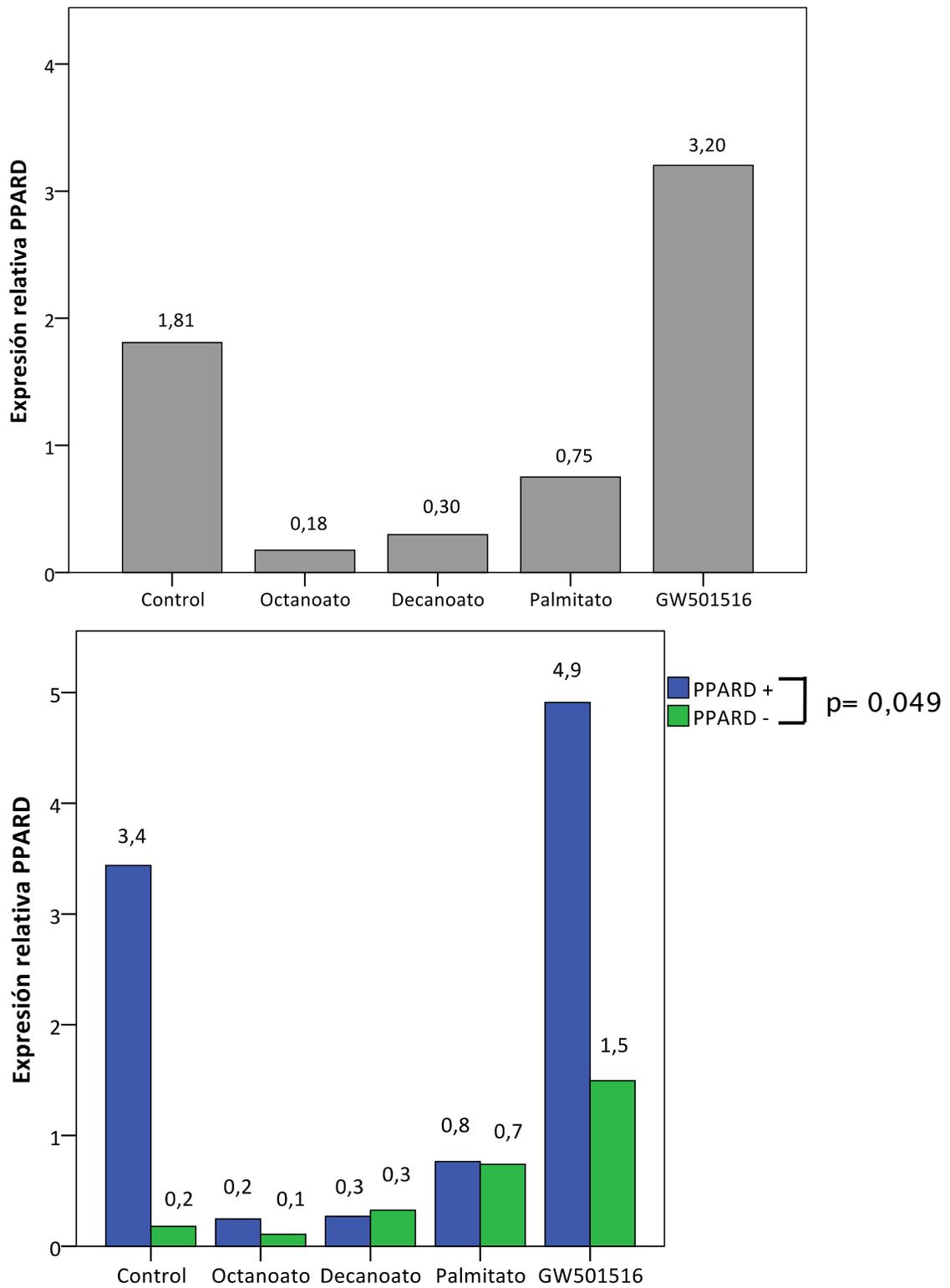


Ilustración 7

Figura 7: expresión relativa de *Ppard* en macrófagos estimulados con LPS]

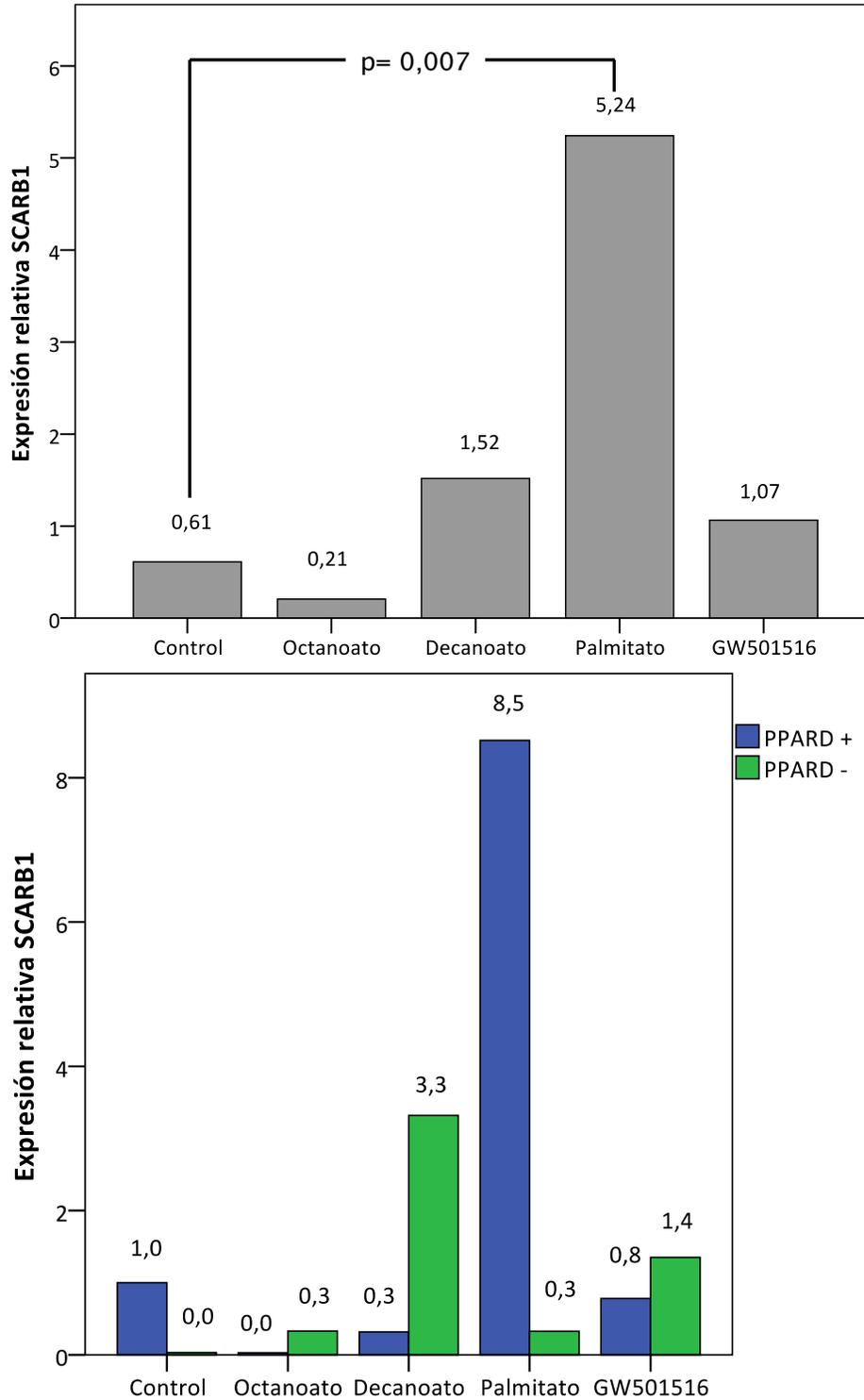


Ilustración 8

Figura 8: expresión relativa de *Scarb1* en macrófagos no estimulados con LPS

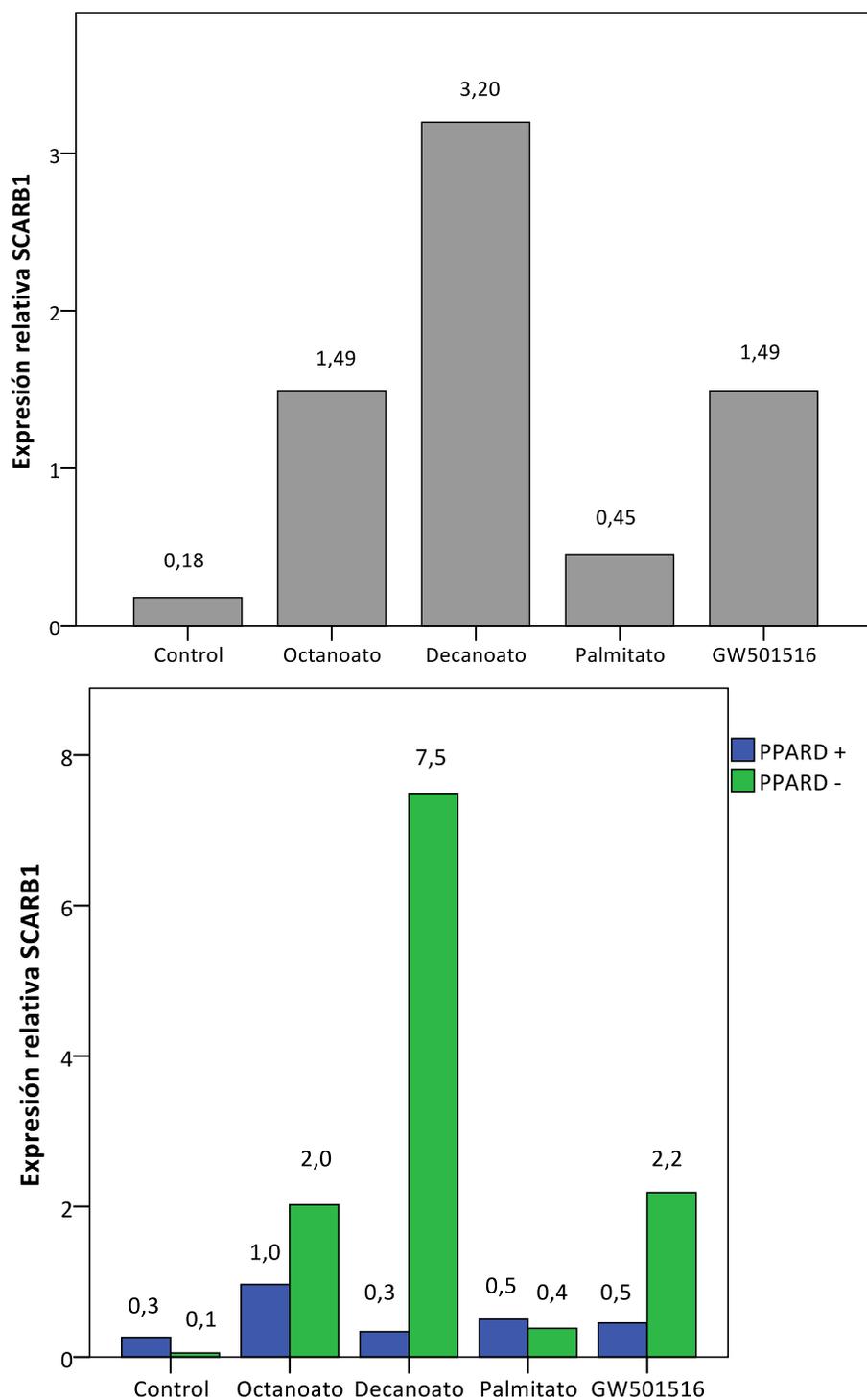


Ilustración 9

Figura 9: expresión relativa de *Scarb1* en macrófagos estimulados con LPS

5.1.3 Análisis de expresión de genes relacionados con el eflujo de colesterol:

Mientras que el aumento en la expresión de *Abca1* y *Abcg1* se ha asociado con una disminución en el riesgo de enfermedad cardiovascular y aterosclerosis, la expresión de PLTP se ha relacionado con un aumento en el riesgo de estas enfermedades. El octanoato causó un aumento en la expresión de *Abca1* en los macrófagos estimulados con LPS (Figura 11) y de *PLTP* en los macrófagos no estimulados con LPS (Figura 14), aunque también hubo una tendencia a aumentar la expresión de *Abcg1* tanto en los macrófagos estimulados, como en los no estimulados con LPS (Figuras 12 y 13). El efecto del octanoato fue parcialmente dependiente de PPARD sobre la expresión de *Abca1* y *Abcg1* e independiente de PPARD sobre la expresión de *PLTP*. El decanoato aumentó la expresión de *Abca1* tanto en los macrófagos estimulados, como los no estimulados, con LPS (Figuras 10 y 11), aunque este efecto fue más marcado en los macrófagos con el *knockdown* para *Ppard*, lo que podría indicar que la unión del decanoato al receptor nuclear PPARD tiene un efecto represor sobre la transcripción de *Abca1*. El palmitato aumentó la expresión del gen *PLTP* en los macrófagos estimulados con LPS, de una forma parcialmente dependiente de PPARD (Figuras 14 y 15).

5.1.4 Análisis de expresión de genes relacionados con la acumulación de lipoproteínas:

Tanto el octanoato, como el decanoato, aumentaron la expresión de *Plin2* en los macrófagos no estimulados con LPS, de forma parcialmente dependiente de PPARD (Figuras 16 y 17). El palmitato aumentó la expresión de *Plin2* en los macrófagos estimulados con LPS y de *Npc1* en los macrófagos no estimulados con LPS, en ambos casos de forma dependiente de PPARD (Figuras 18 y 19).

5.1.5 Análisis de expresión de genes relacionados con la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga:

Relacionado con su función fisiológica, el palmitato y no otro tratamiento, aumentó la expresión de *Cpt1* de forma independiente de PPARD en los macrófagos no estimulados con LPS (Figura 20). No se encontraron cambios en la expresión de *Cpt1* relacionados con ningún tratamiento en los macrófagos estimulados con LPS (Figura 21).

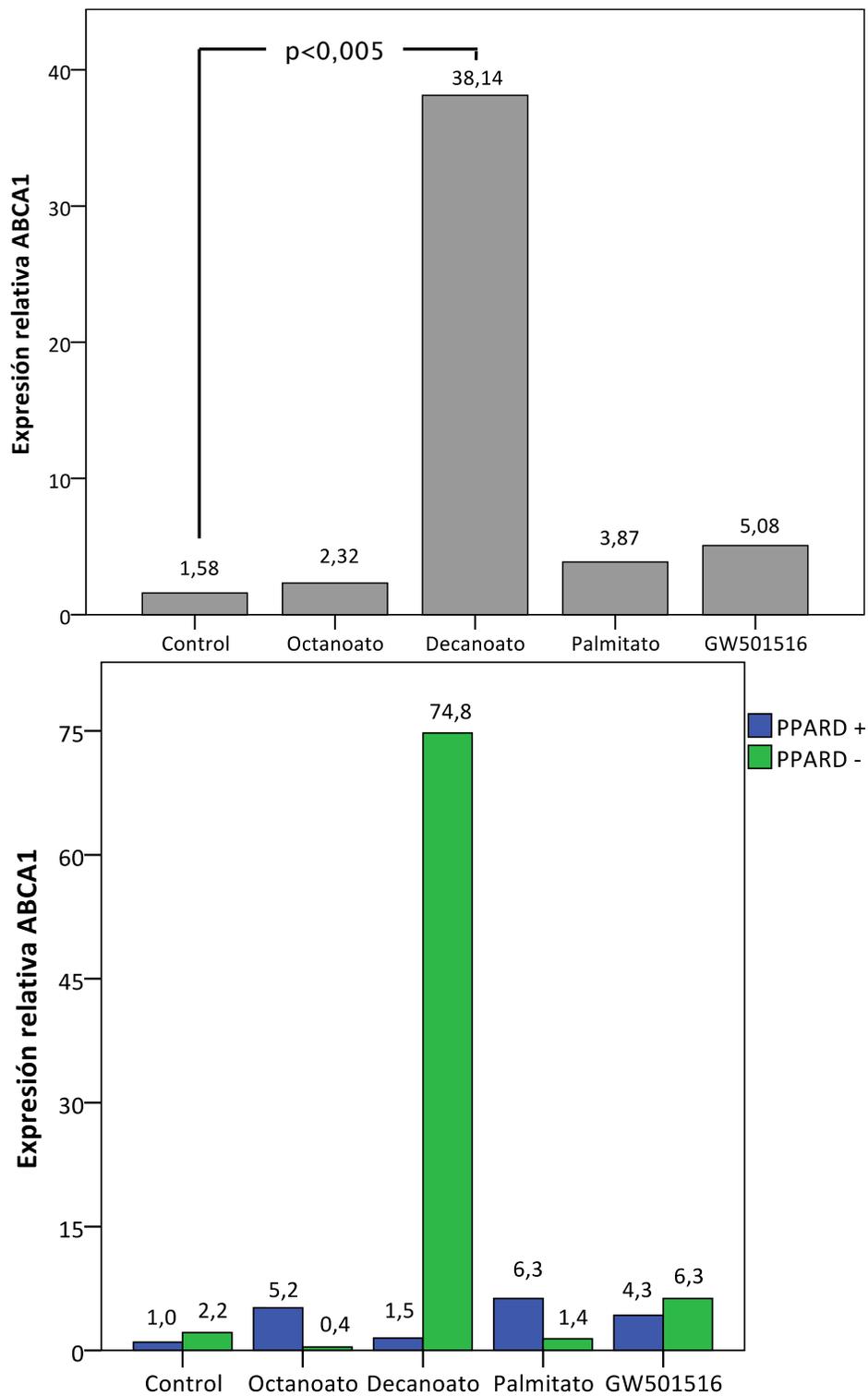


Ilustración 10

Figura 10: expresión relativa de *Abca1* en macrófagos no estimulados con LPS

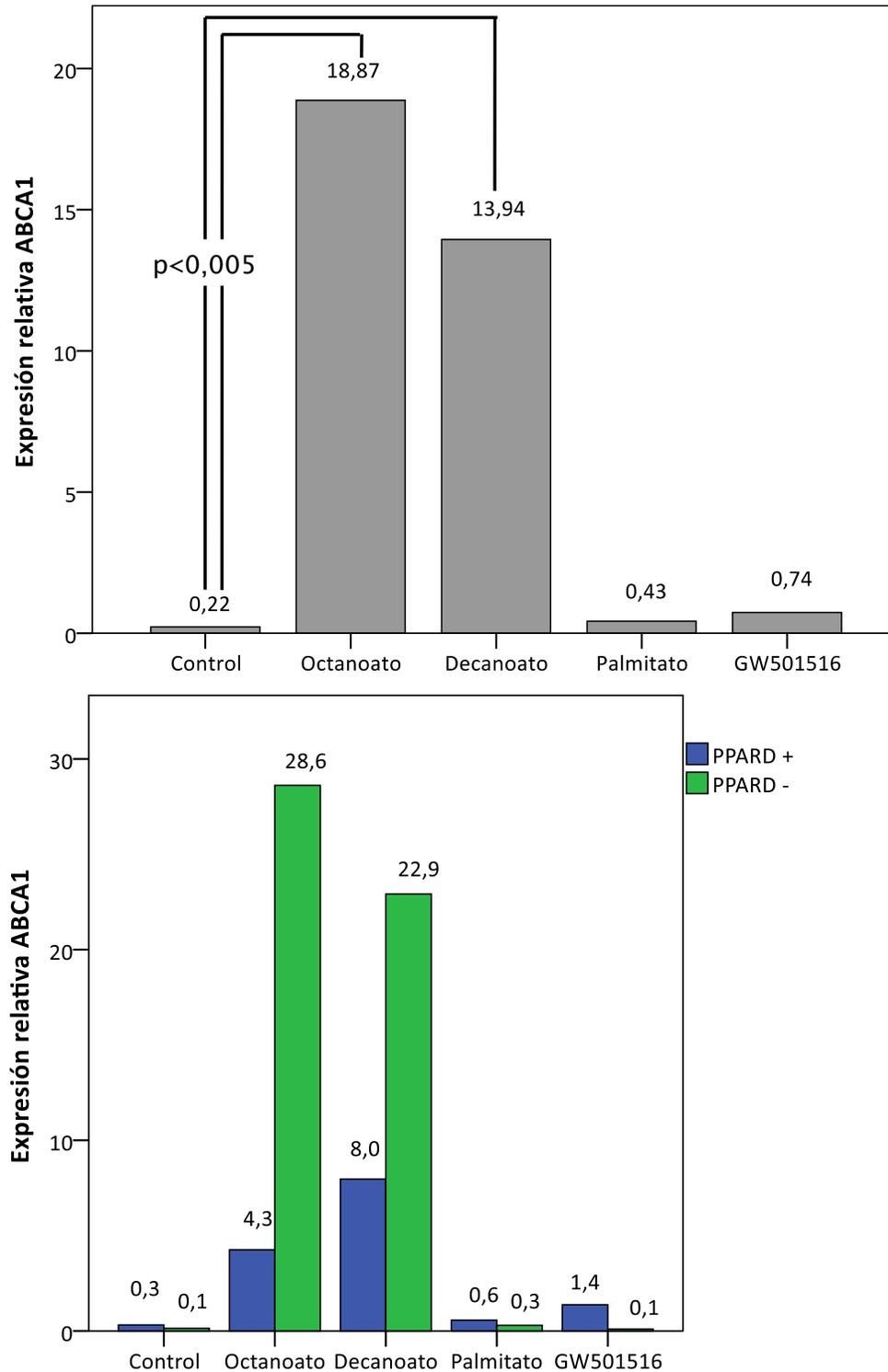


Ilustración 11

Figura 11: expresión relativa de *Abca1* en macrófagos estimulados con LPS

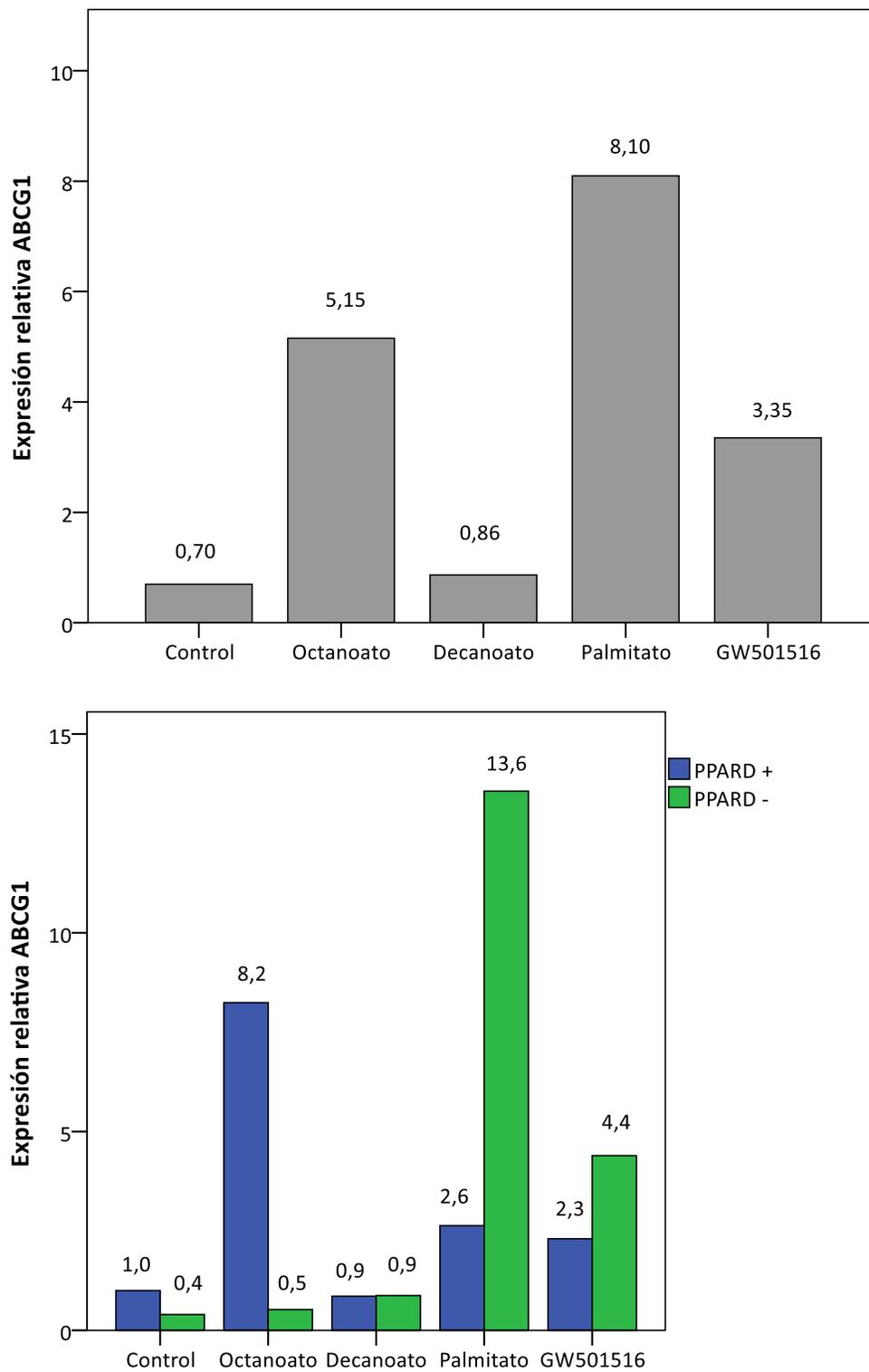


Ilustración 12

Figura 12: expresión relativa de *Abcg1* en macrófagos no estimulados con LPS

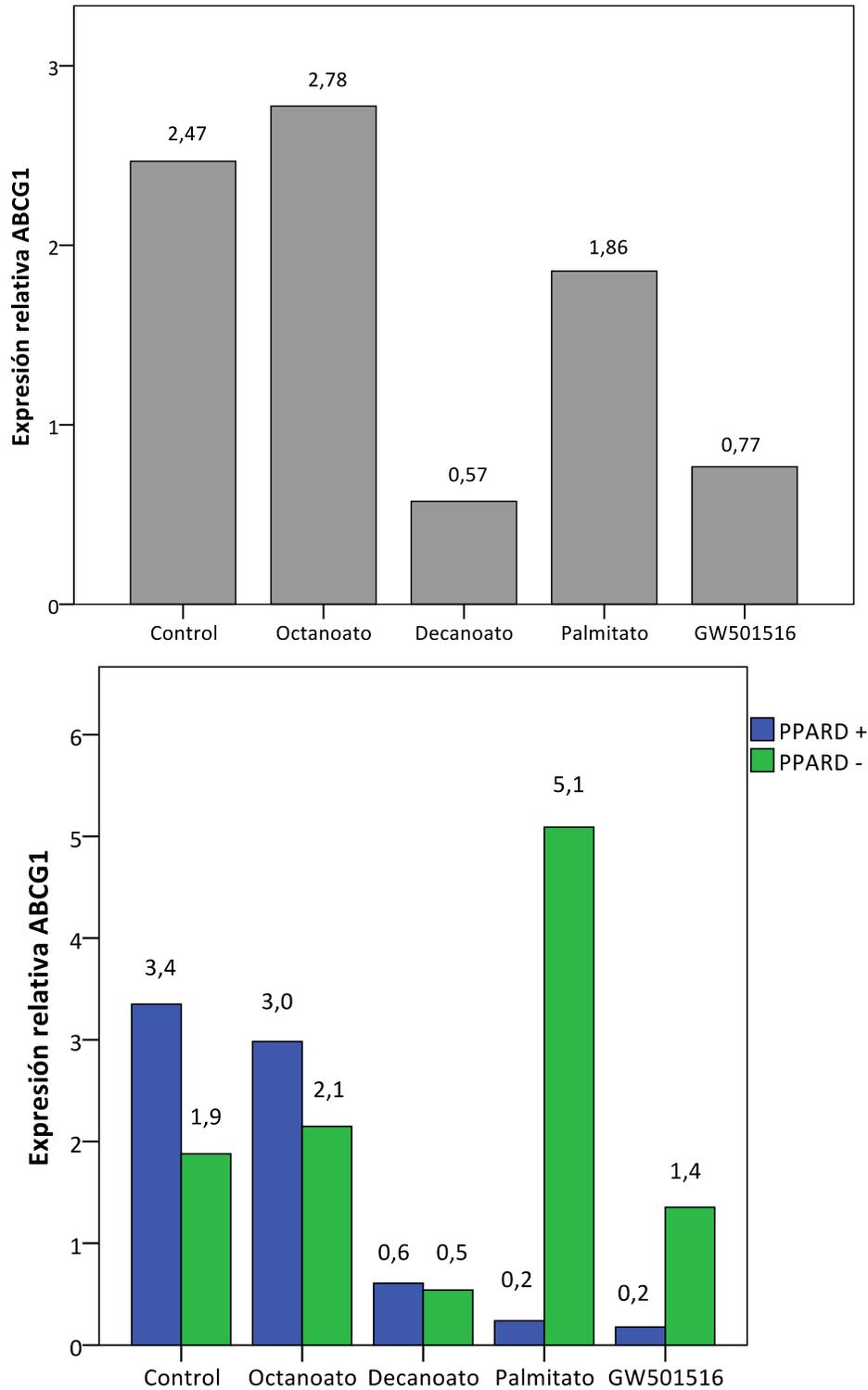


Ilustración 13

Figura 13: expresión relativa de *Abcg1* en macrófagos estimulados con LPS

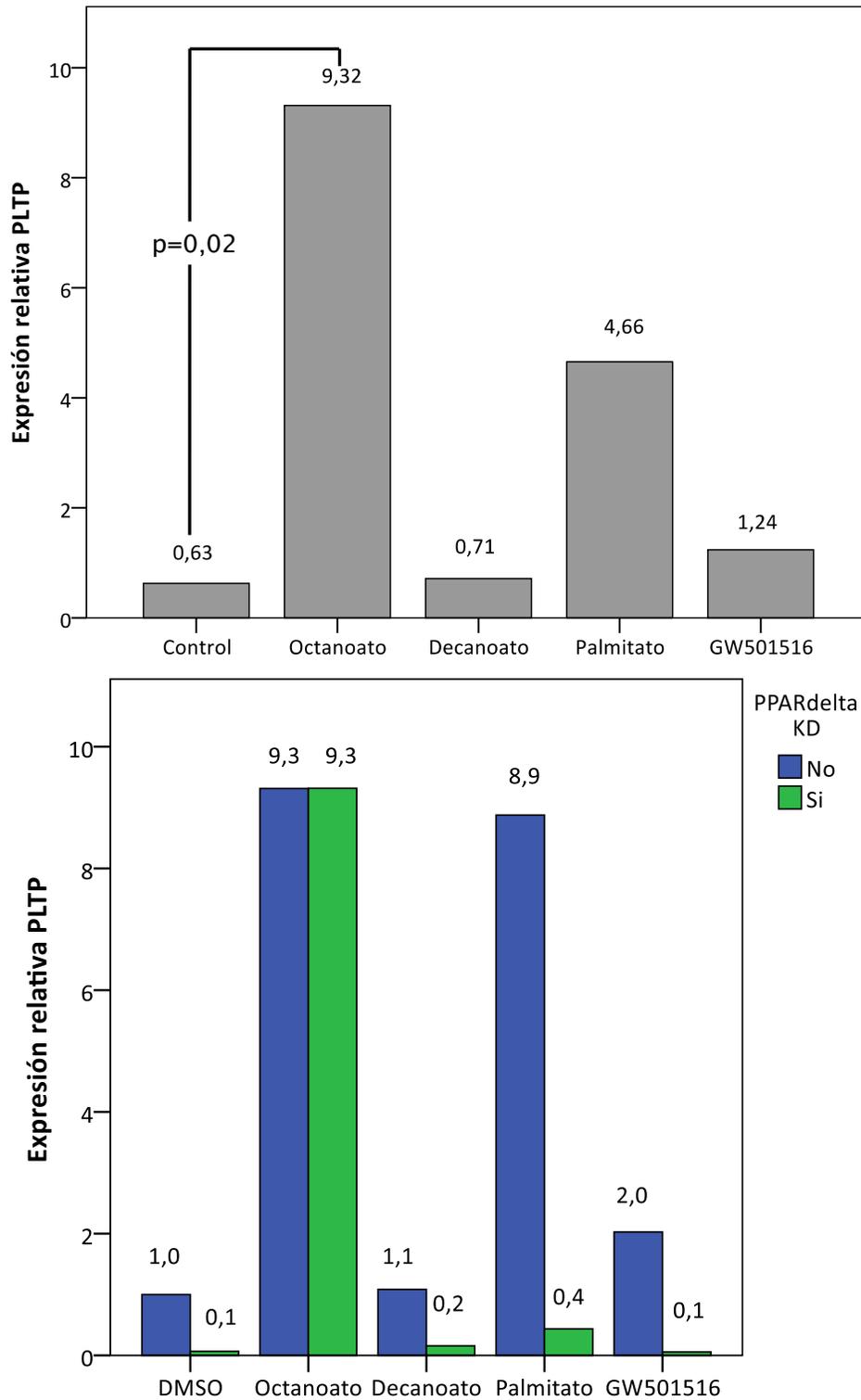


Ilustración 14

Figura 14: expresión relativa de *Pltp* en macrófagos no estimulados con LPS

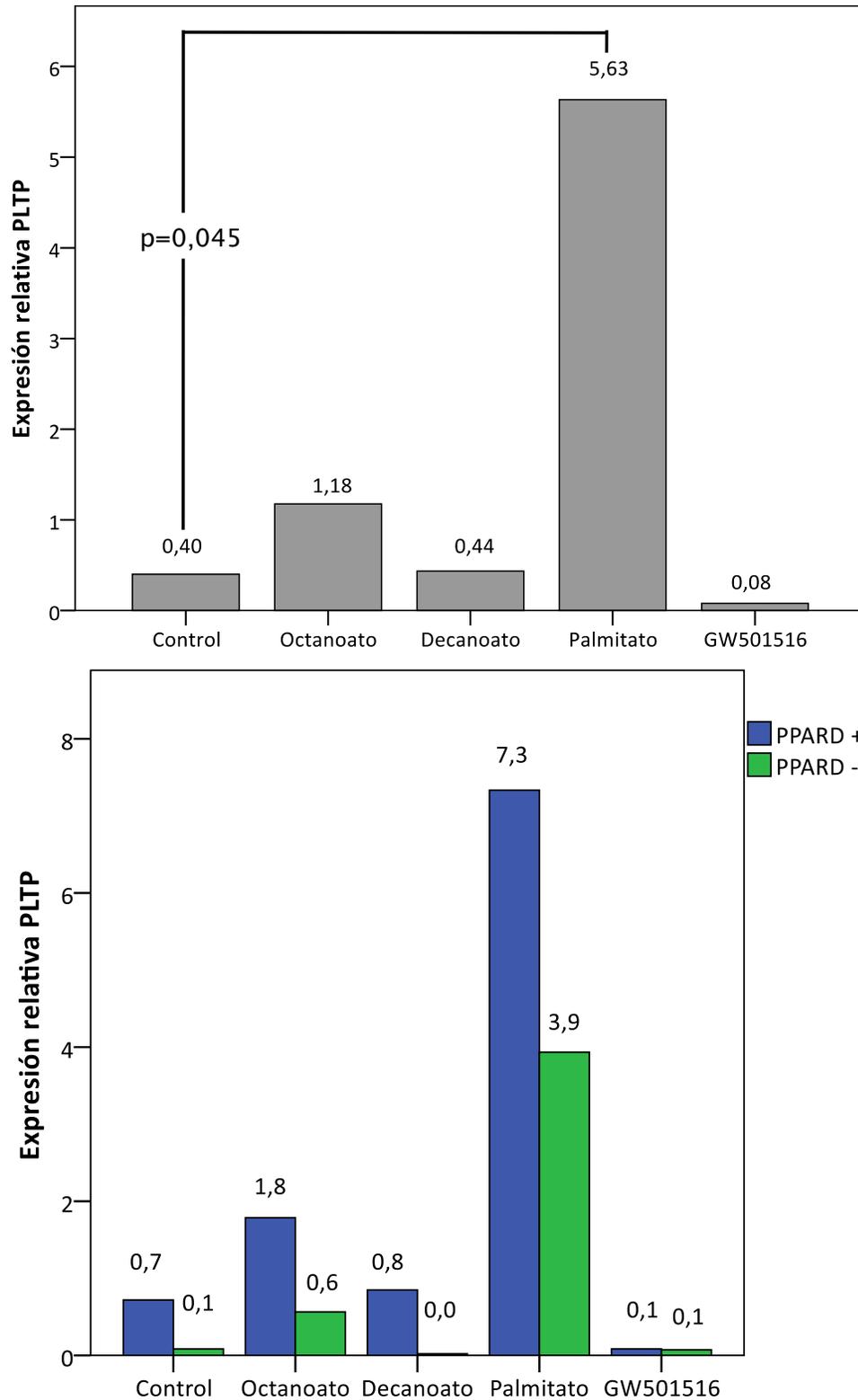


Ilustración 15

Figura 15: expresión relativa de *Pltp* en macrófagos estimulados con LPS

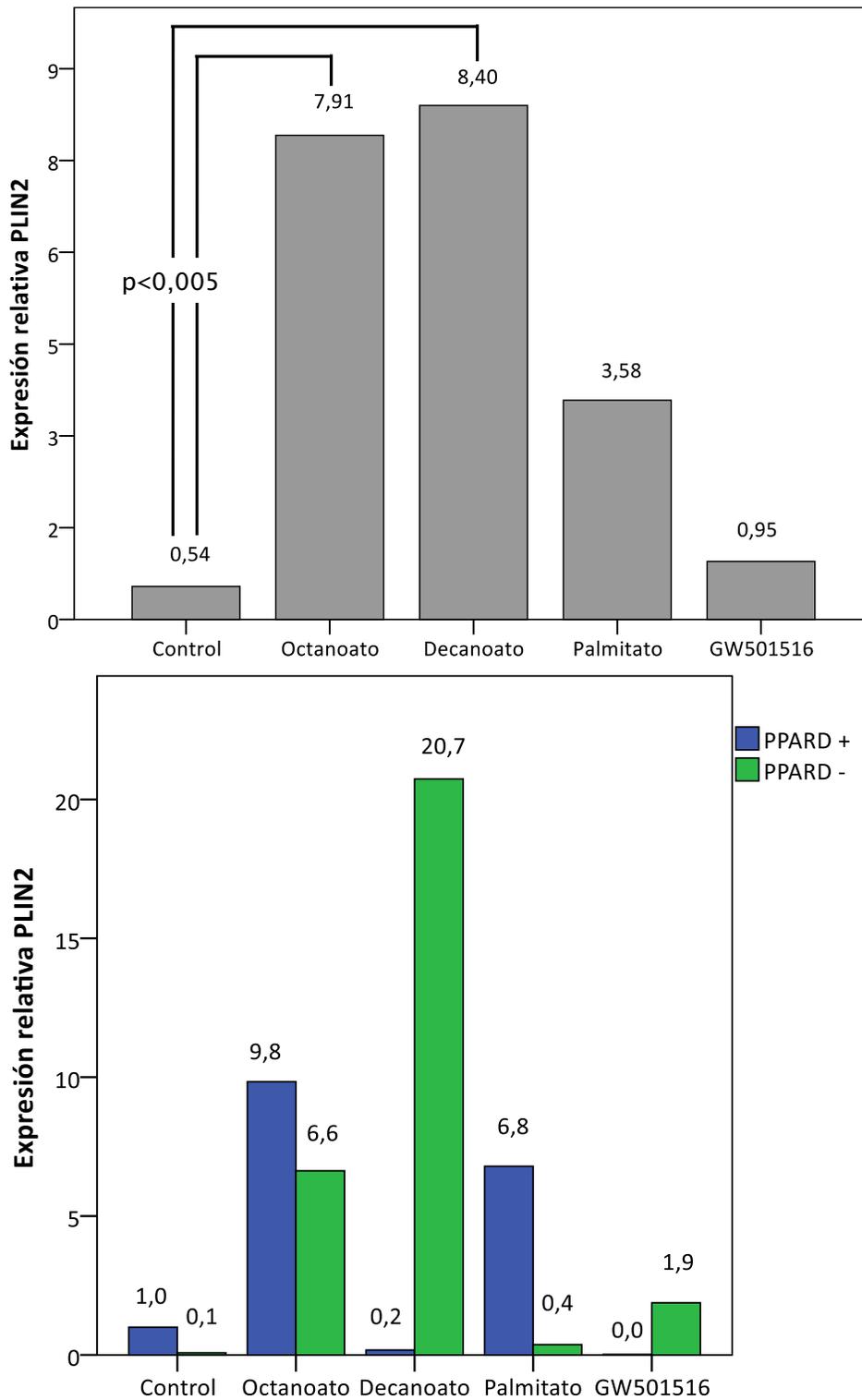


Ilustración 16

Figura 16: expresión relativa de Plin2 en macrófagos no estimulados con LPS

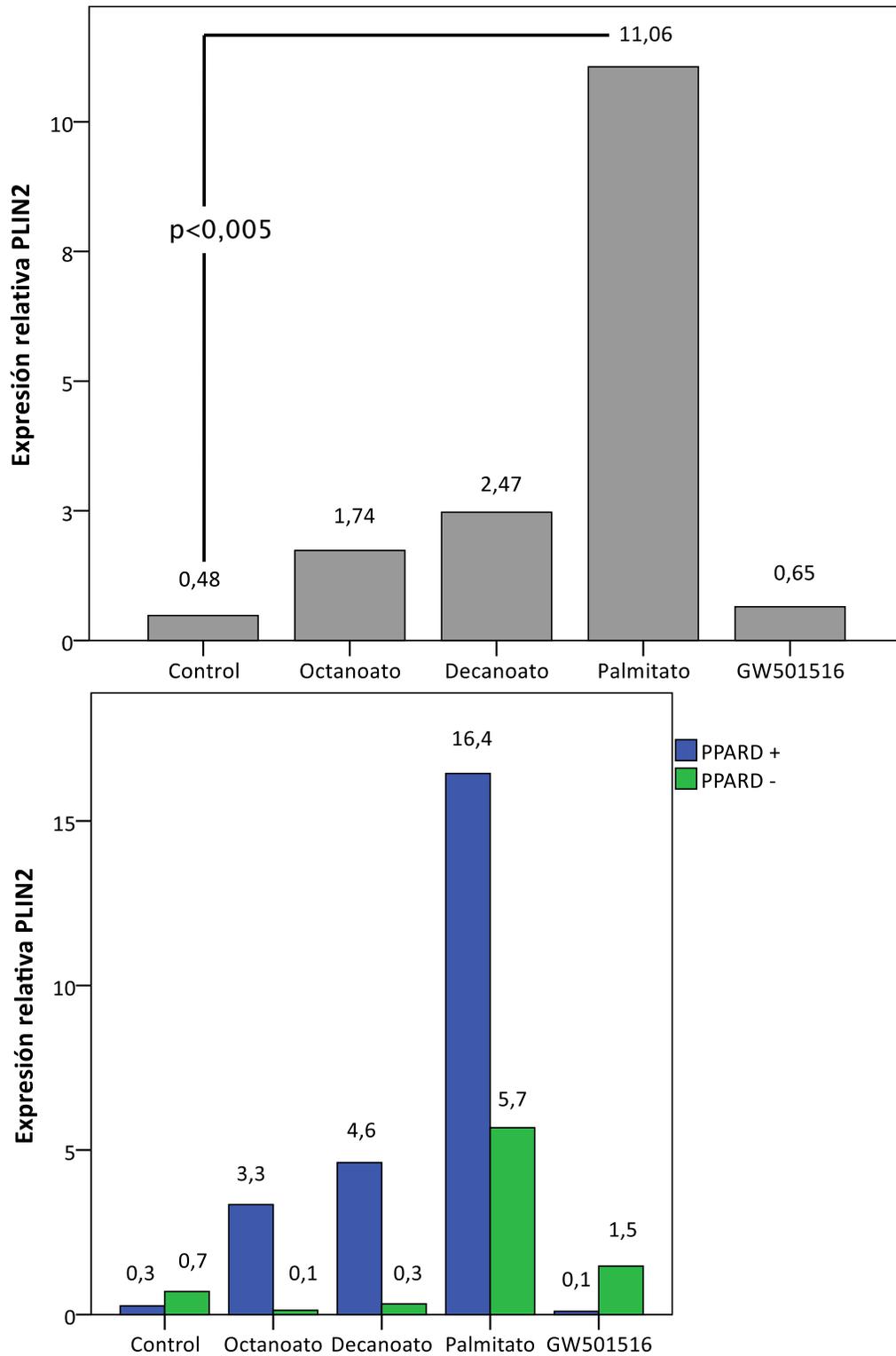


Ilustración 17

Figura 17: expresión relativa de Plin2 en macrófagos estimulados con LPS

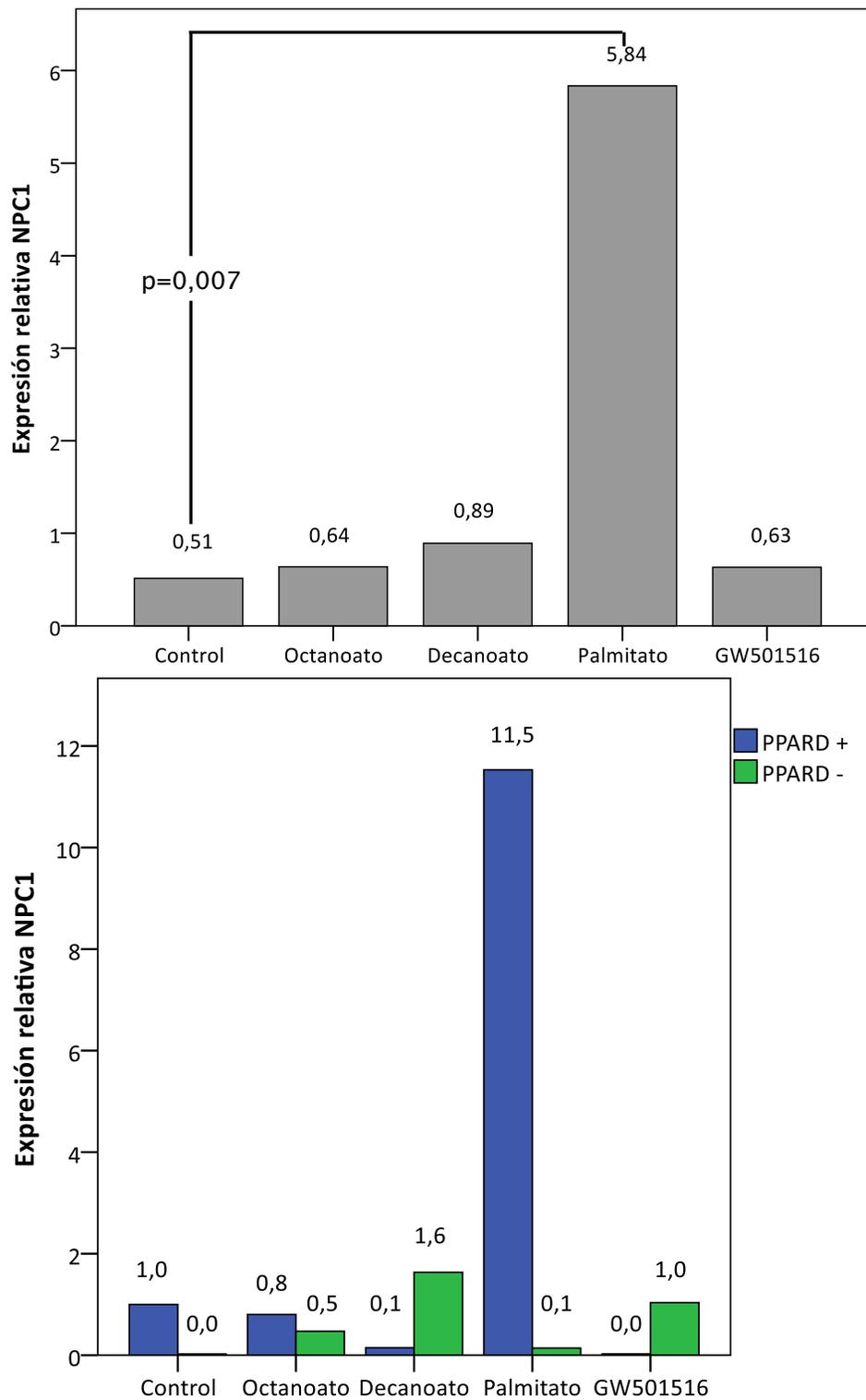


Ilustración 18

Figura 18: expresión relativa de *Npc1* en macrófagos no estimulados con LPS

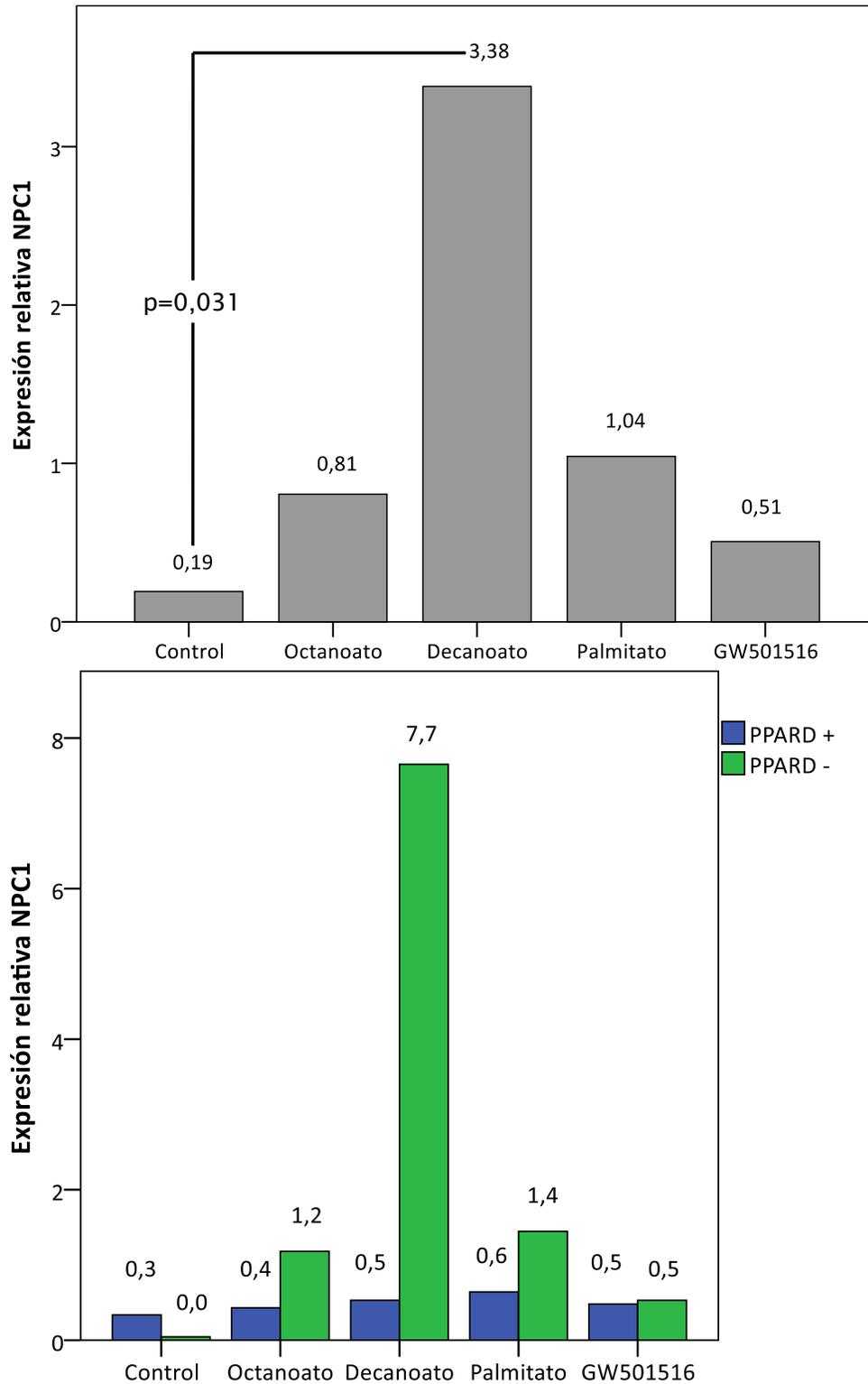


Ilustración 19

Figura 19: expresión relativa de *Npc1* en macrófagos estimulados con LPS

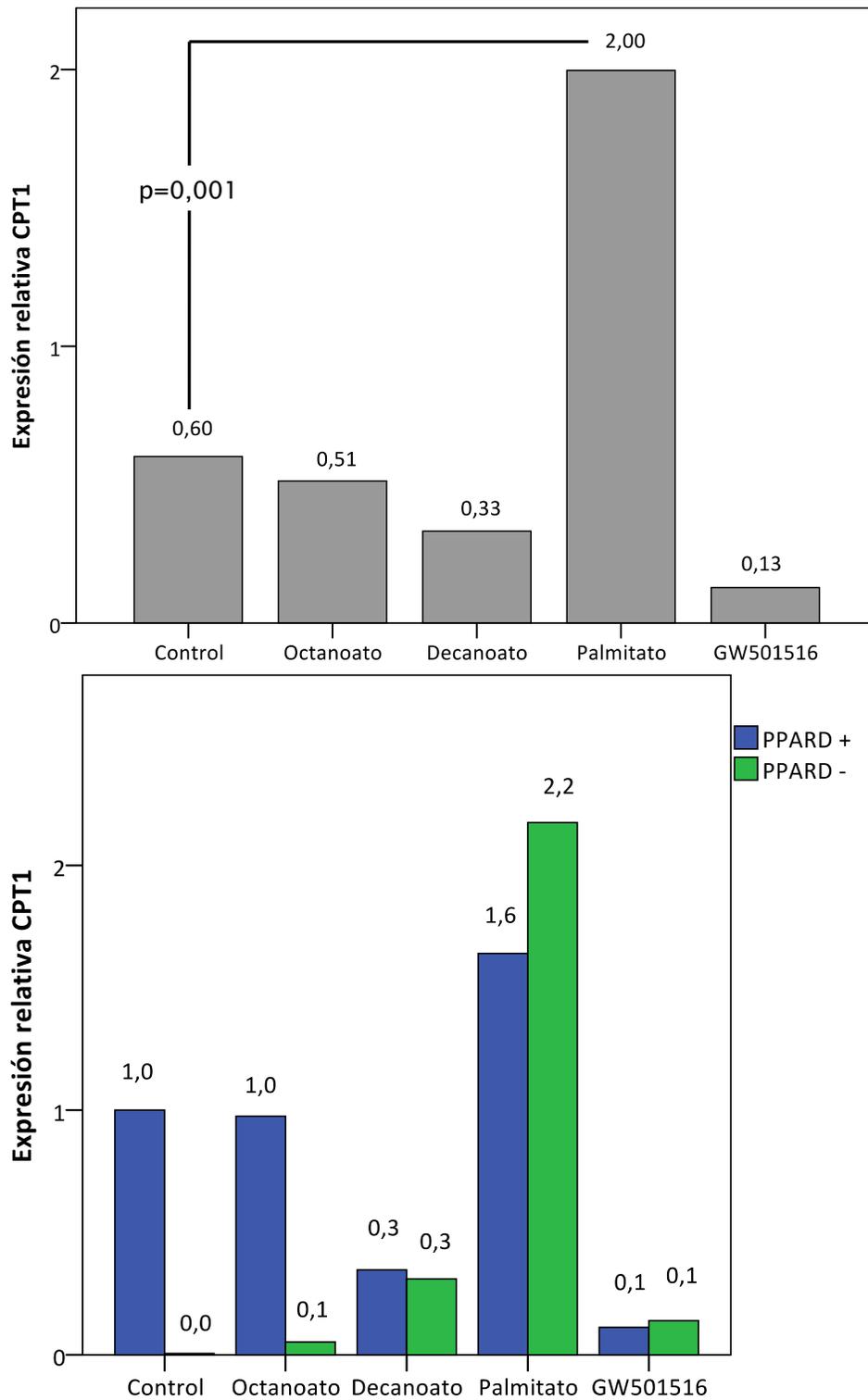


Ilustración 20

Figura 20: expresión relativa de *Cpt1* en macrófagos no estimulados con LPS

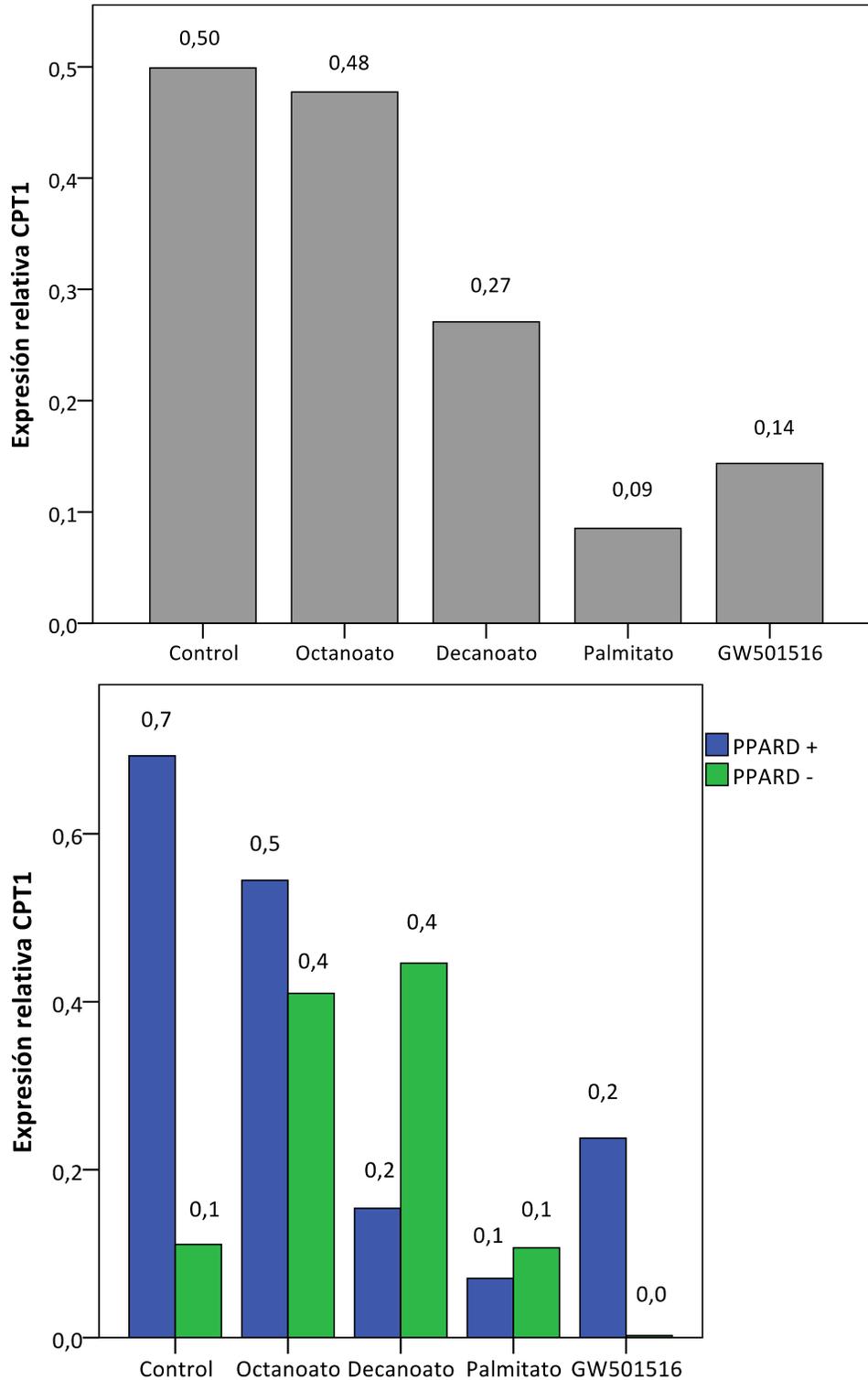


Ilustración 21

Figura 21: expresión relativa de *Cpt1* en macrófagos estimulados con LPS. En las tablas 3 y 4 se observa un resumen de los cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos en macrófagos estimulados y no estimulados con LPS, en respuesta al tratamiento con

octanoato, decanoato, palmitato y el agonista específico de PPARD GW501516.

Tabla 3

Gen	Octanoato	Decanoato	Palmitato	Agonista
<i>Ppard</i>	=	=	=	↑
<i>Scarb1</i>	=	=	↑	=
<i>Plin2</i>	↑	↑	=	=
<i>Npc1</i>	=	=	↑	=
<i>Pltp</i>	↑	=	=	=
<i>Abca1</i>	=	↑	=	=
<i>Abcg1</i>	=	=	=	=
<i>Cpt1</i>	=	=	↑	=

Tabla 3: Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en respuesta al tratamiento con octanoato, decanoato, palmitato y el agonista específico para PPARD GW501516 en macrófagos no estimulados con LPS

Tabla 4

Gen	Octanoato	Decanoato	Palmitato	Agonista
<i>Ppard</i>	=	=	=	=
<i>Scarb1</i>	=	=	=	=
<i>Plin2</i>	=	=	↑	=
<i>Npc1</i>	=	↑	=	=
<i>Pltp</i>	=	=	↑	=
<i>Abca1</i>	↑	↑	=	=
<i>Abcg1</i>	=	=	=	=
<i>Cpt1</i>	=	=	=	=

Tabla 4: Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en respuesta al tratamiento con octanoato, decanoato, palmitato y el agonista específico para PPARD GW501516 en macrófagos estimulados con LPS

5.2 Efecto de los ácidos grasos de cadena media sobre la expresión de genes relacionados con la función inmunitaria:

5.2.1 Análisis de expresión de genes relacionados con citocinas proinflamatorias:

El estímulo con LPS aumentó la expresión de las citocinas proinflamatorias Il6, Tnf e Ifng de forma generalizada, lo que no permitió encontrar diferencias entre los tratamientos (Figuras 23, 25 y 27). Mientras que el palmitato aumentó la expresión de estas citocinas proinflamatorias en los macrófagos no estimulados con LPS, el octanoato y el decanoato no generaron ningún cambio comparando con el grupo control (Figuras 22, 24 y 26). El efecto en todos los casos fue parcialmente dependiente de PPARD. De forma interesante, el agonista GW501516 aumentó la expresión de *Tnf* en los macrófagos no estimulados con LPS de forma dependiente de PPARD.

5.2.2 Análisis de expresión de la principal citocina antiinflamatoria:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *Il10* con ninguno de los tratamientos en los macrófagos estimulados y en los no estimulados con LPS (Figuras 28 y 29). Es importante denotar que los macrófagos con el *knockdown* para PPARD tendieron a tener un aumento en la expresión de *Il10* en los macrófagos estimulados con LPS (Figura 29).

5.2.3 Análisis de expresión de un gen relacionado con la función fagocítica de macrófagos:

Se encontró una tendencia al aumento en la expresión de *Nos2* con el tratamiento con el agonista y el palmitato de forma dependiente a la expresión de PPARD, en los macrófagos no estimulados con LPS, la cual no se observó con el tratamiento con el octanoato ni con el decanoato (Figura 30). No se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de *Nos2* con ninguno de los tratamientos en los macrófagos estimulados con LPS (Figura 31).

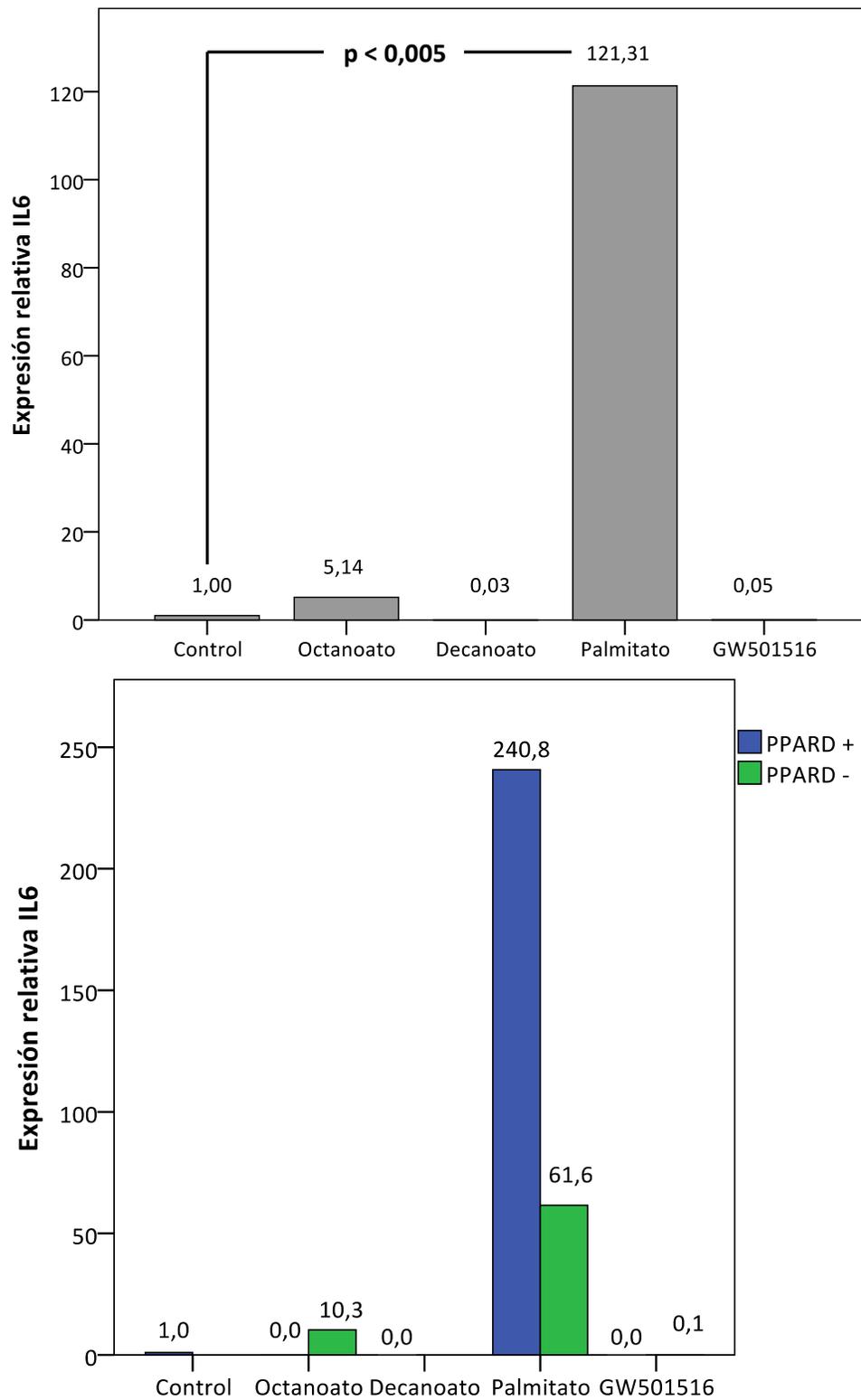


Ilustración 22

Figura 22: expresión relativa de IL6 en macrófagos no estimulados con LPS

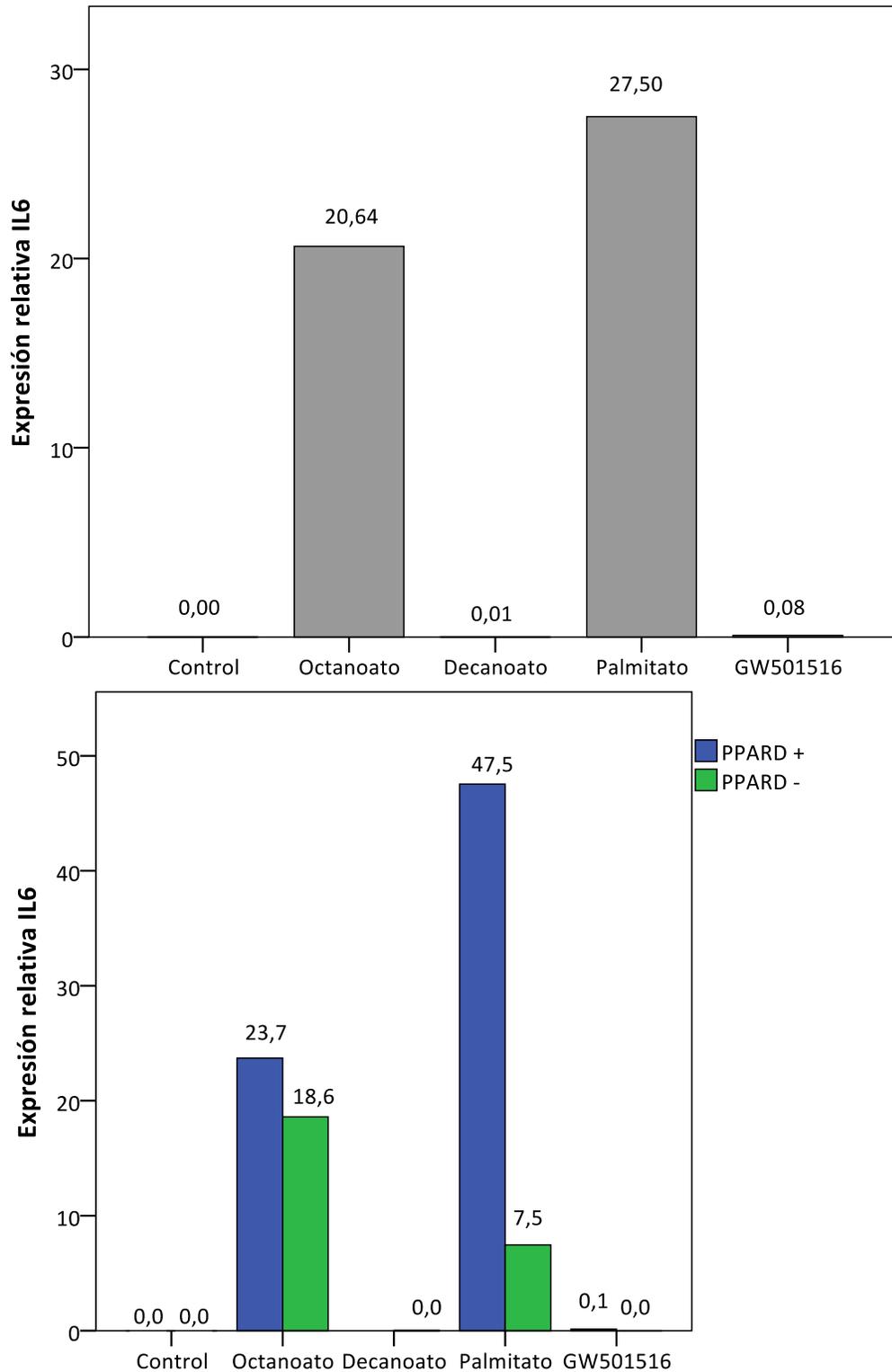


Ilustración 23

Figura 23: expresión relativa de IL6 en macrófagos estimulados con LPS

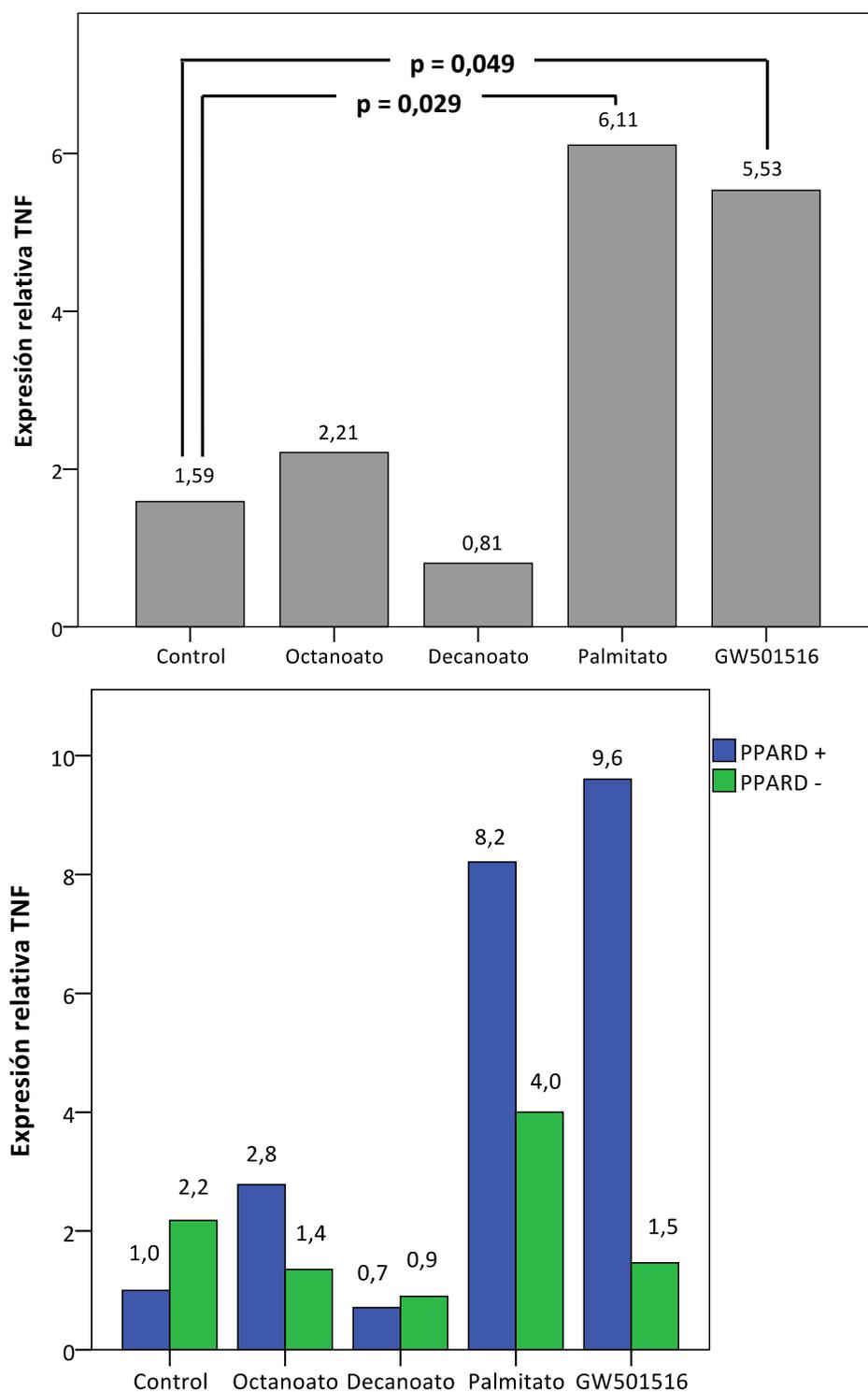


Ilustración 24

Figura 24: expresión relativa de *Tnf* en macrófagos no estimulados con LPS

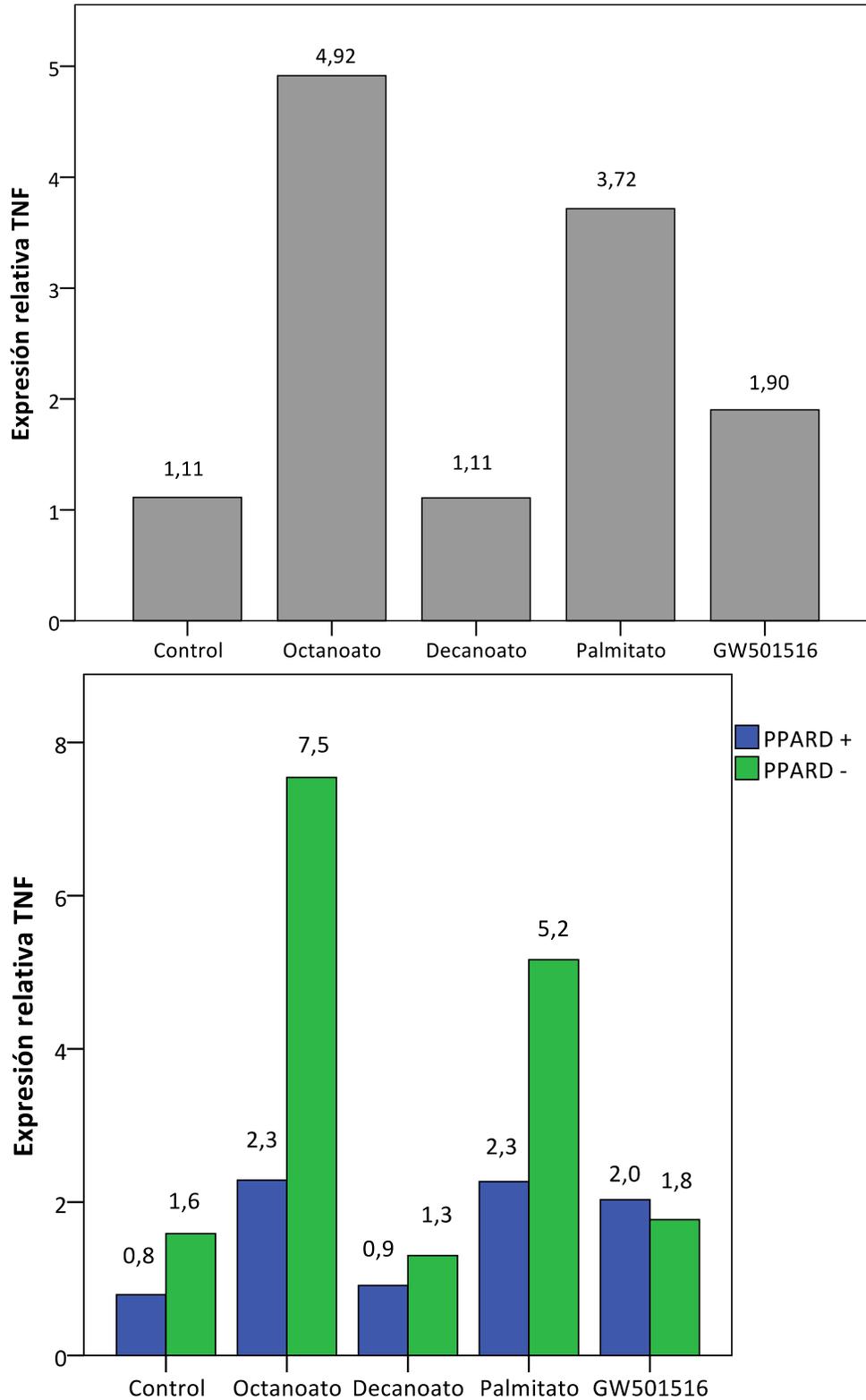


Ilustración 25

Figura 25: expresión relativa de *Tnf* en macrófagos estimulados con LPS

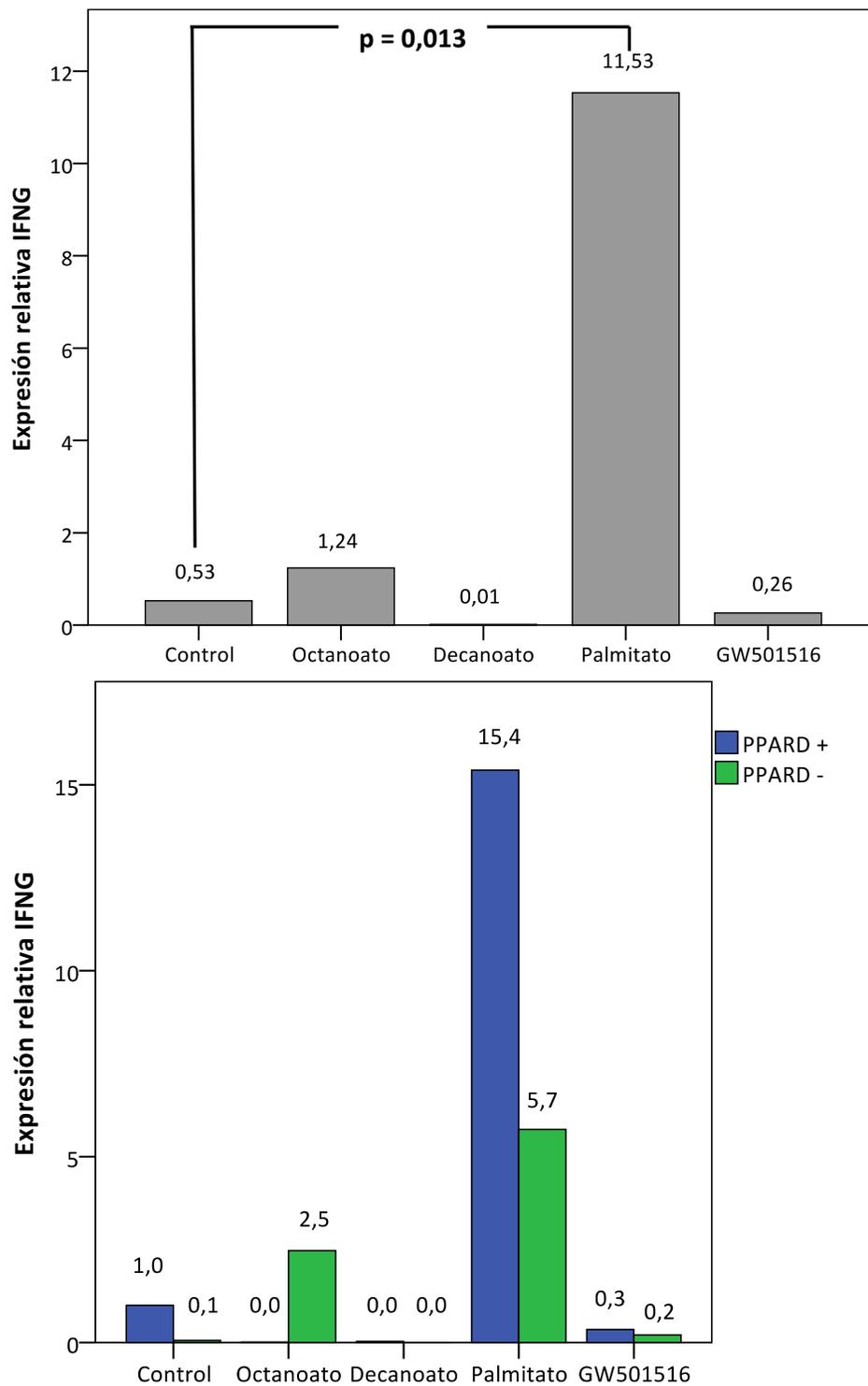


Ilustración 26

Figura 26: expresión relativa de *Ifng* en macrófagos no estimulados con LPS

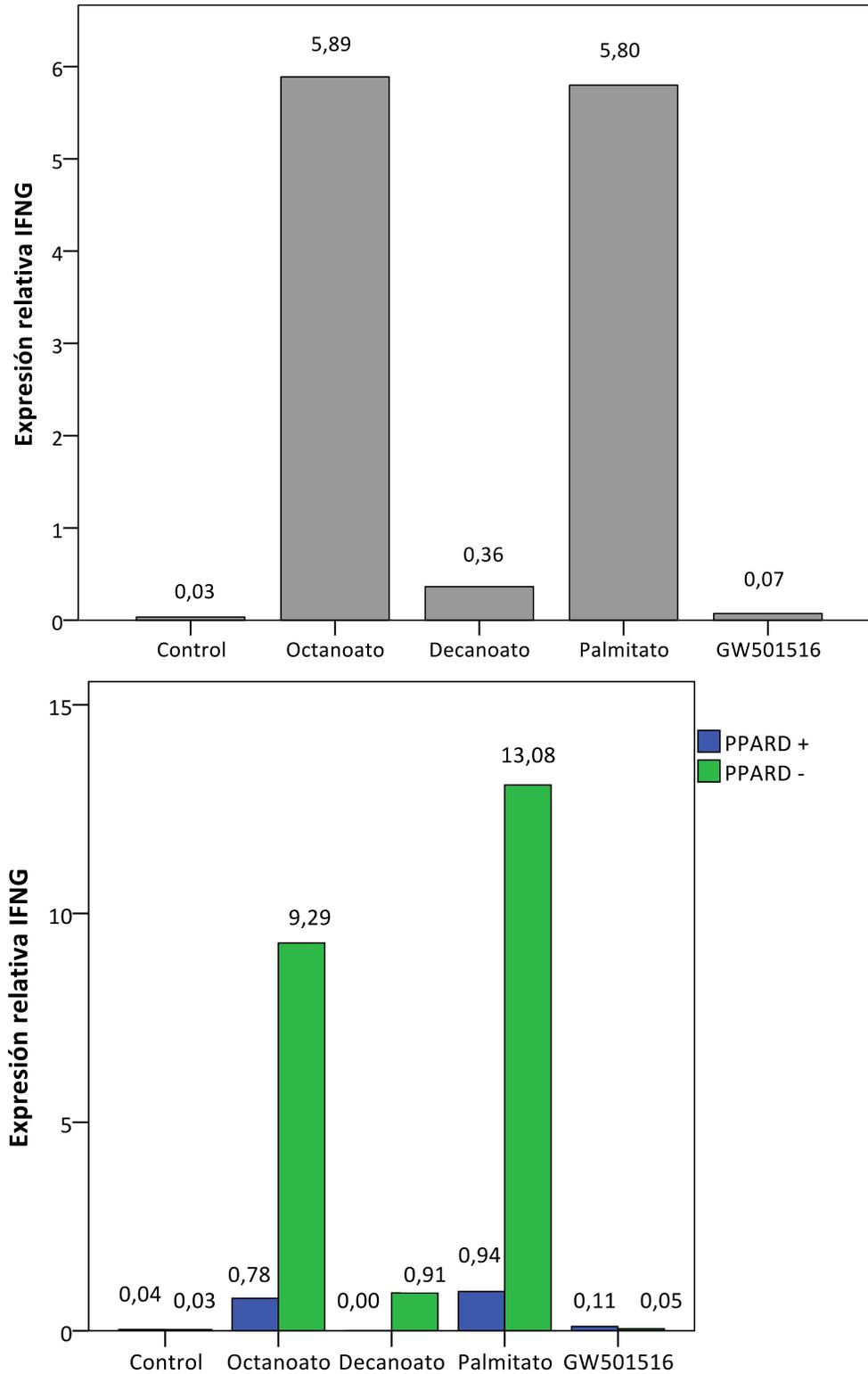


Ilustración 27

Figura 27: expresión relativa de *Ifng* en macrófagos estimulados con LPS

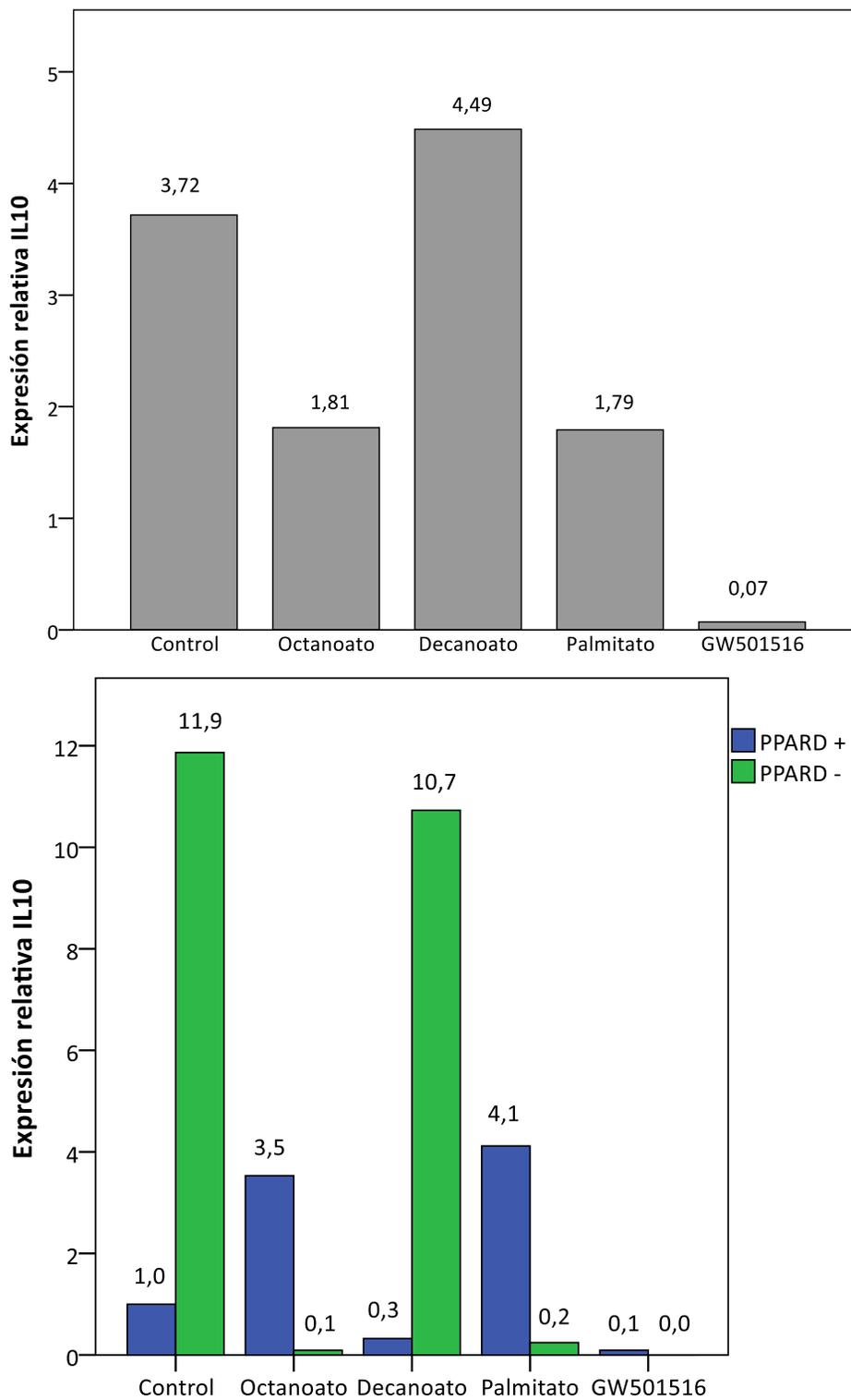


Ilustración 28

Figura 28: expresión relativa de IL10 en macrófagos no estimulados con LPS

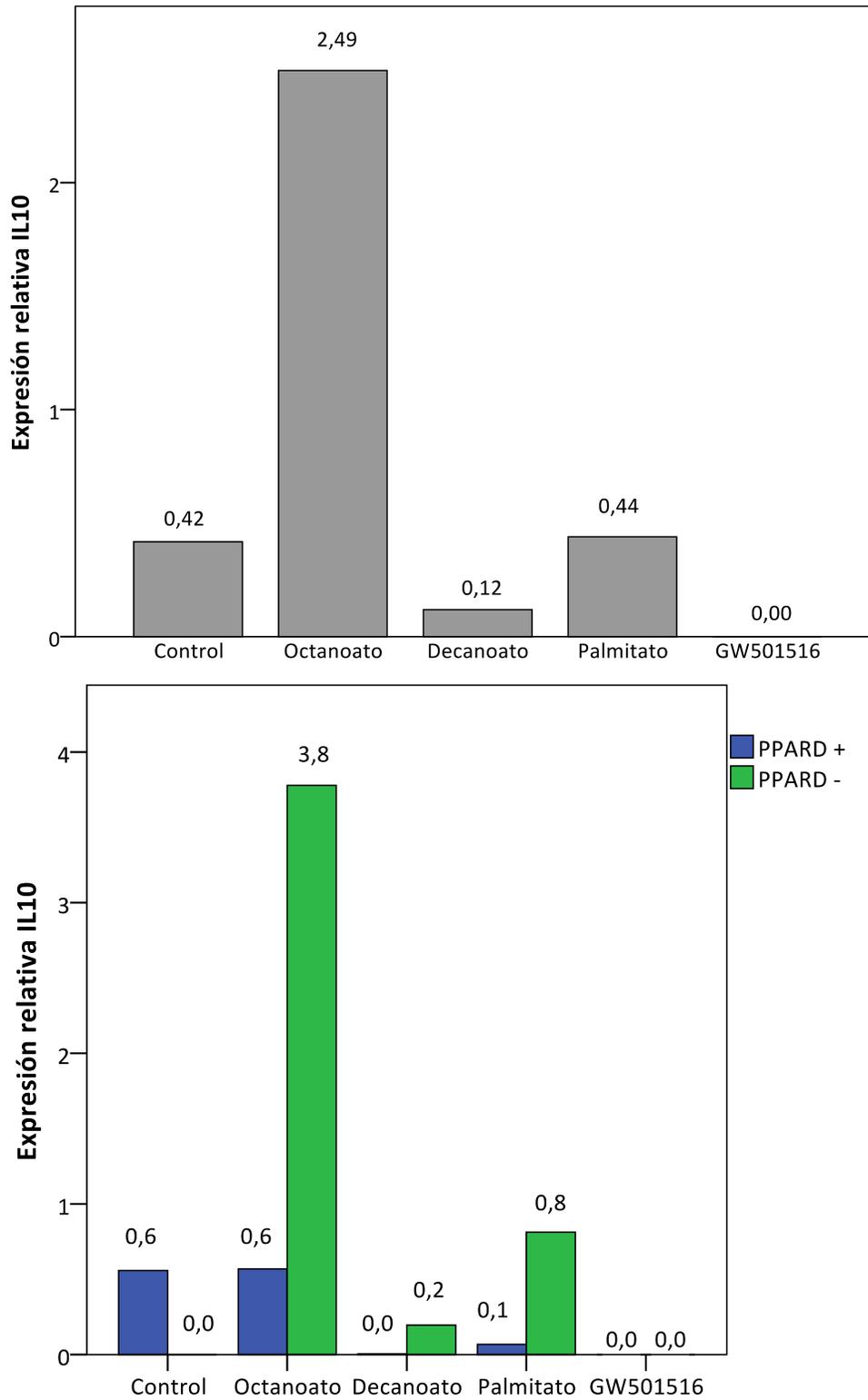


Ilustración 29

Figura 29: expresión relativa de IL10 en macrófagos estimulados con LPS

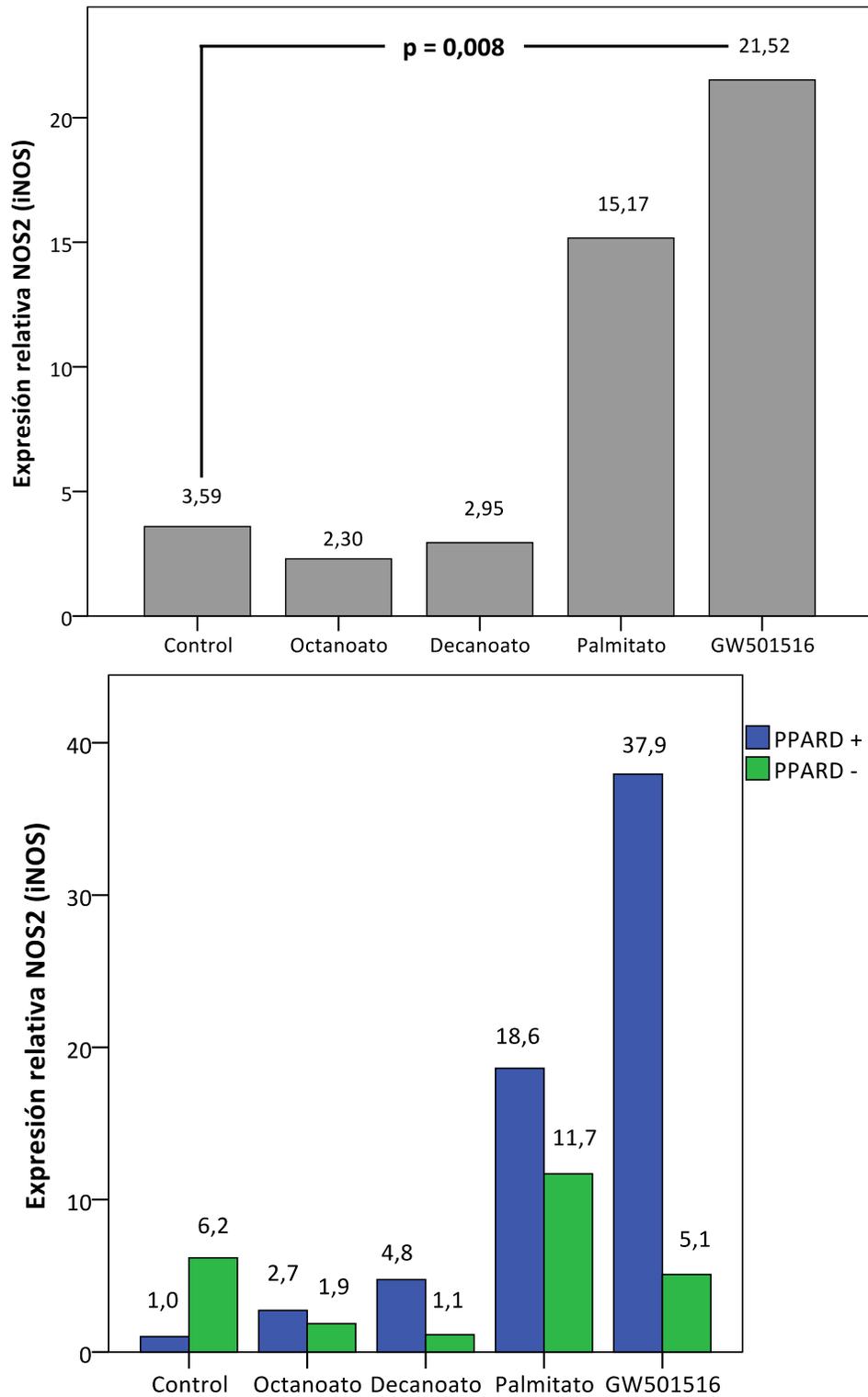


Ilustración 30

Figura 30: expresión relativa de *Nos2* en macrófagos no estimulados con LPS

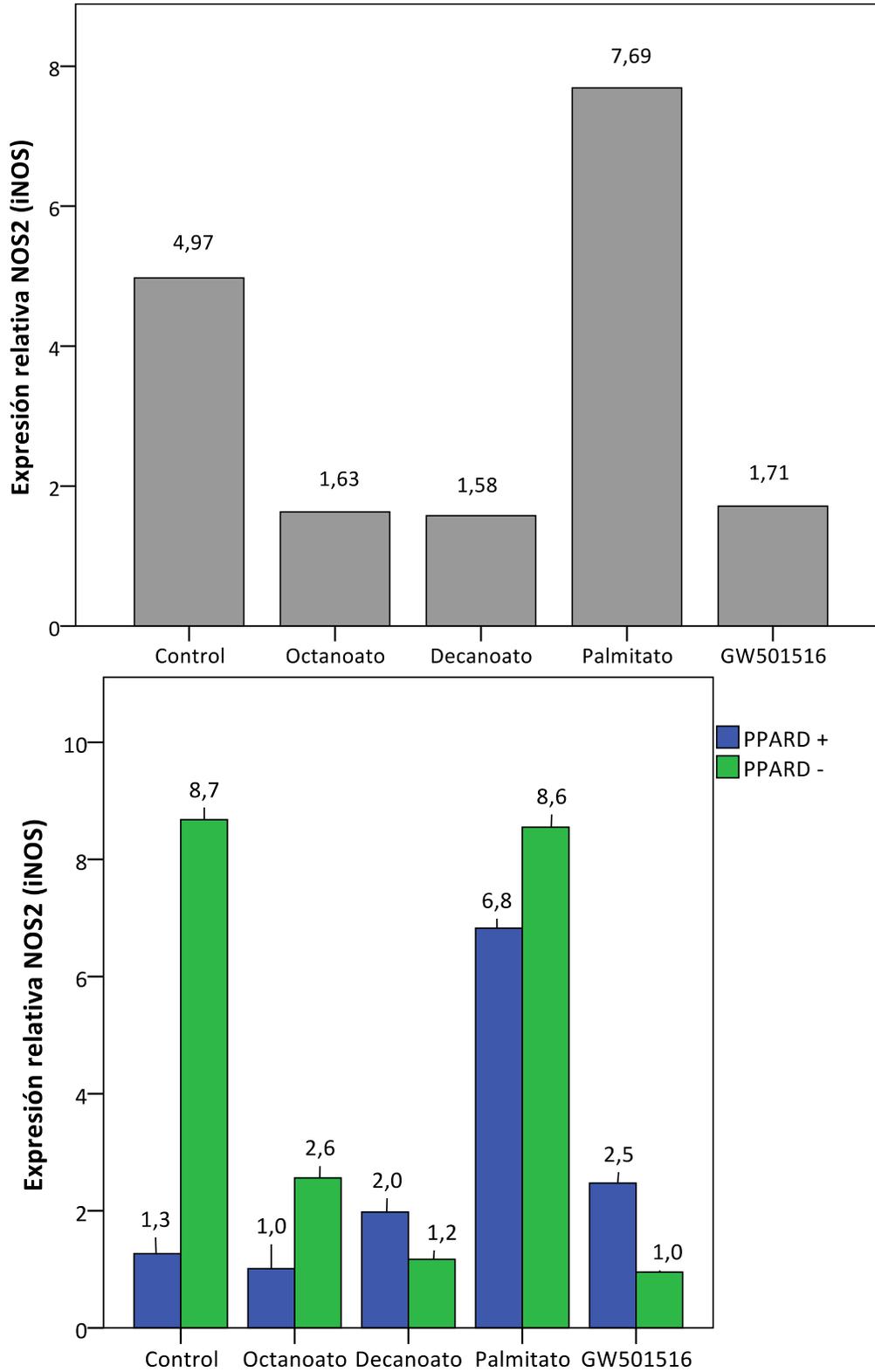


Ilustración 31

Figura 31: expresión relativa de *Nos2* en macrófagos estimulados con LPS

5.2.4 Análisis de la expresión de una enzima relacionada con la formación de leucotrienos:

En los macrófagos no estimulados con LPS, mientras que el octanoato y el palmitato aumentaron la expresión de la *Ptgs2*, este efecto no se observó con el decanoato. Algo interesante es que la expresión de *Ptgs2* se mantuvo similar en los macrófagos con y sin *knockdown* para *PPARD*, lo que indica que el efecto del decanoato sobre la expresión de este gen es independiente de la expresión de *PPARD*. El efecto del octanoato y el palmitato sobre el aumento en la expresión de *Ptgs2* fue dependiente de la expresión de *PPARD* (Figura 32). En los macrófagos estimulados con LPS no se observaron cambios en la expresión de *Ptgs2* con ninguno de los tratamientos, aunque la expresión fue mayor en los macrófagos con el *knockdown* para *PPARD* (Figura 33).

5.2.5 Análisis de la expresión de una quimiocina proinflamatoria:

No se observaron cambios en la expresión de *Mcp1* en los macrófagos estimulados y no estimulados con LPS, aunque el palmitato sí tendió a aumentar la expresión de *Mcp1* en los macrófagos no estimulados con LPS de forma dependiente de *PPARD* (Figuras 34 y 35).

5.2.6 Análisis de la expresión de una colagenasa de matriz:

Mientras que el octanoato y el decanoato mantuvieron una expresión de *Mmp9* similar a la del control, el palmitato aumentó la expresión de este gen principalmente en los macrófagos no estimulados con LPS, pero también en los estimulados con LPS, en los macrófagos no estimulados con LPS, el efecto del palmitato sobre la expresión de *Mmp9* fue dependiente de *PPARD* (Figuras 36 y 37).

En las tablas 5 y 6 se observa un resumen de los cambios en la expresión de genes relacionados con la función inmunitaria en macrófagos estimulados y no estimulados con LPS, en respuesta al tratamiento con octanoato, decanoato, palmitato y el agonista específico de *PPARD* GW501516.

La tabla 7 muestra un resumen del *Log₂ fold change* en la expresión de los genes del metabolismo de lípidos y de la función inmunitaria, en cada uno de los grupos de tratamiento.

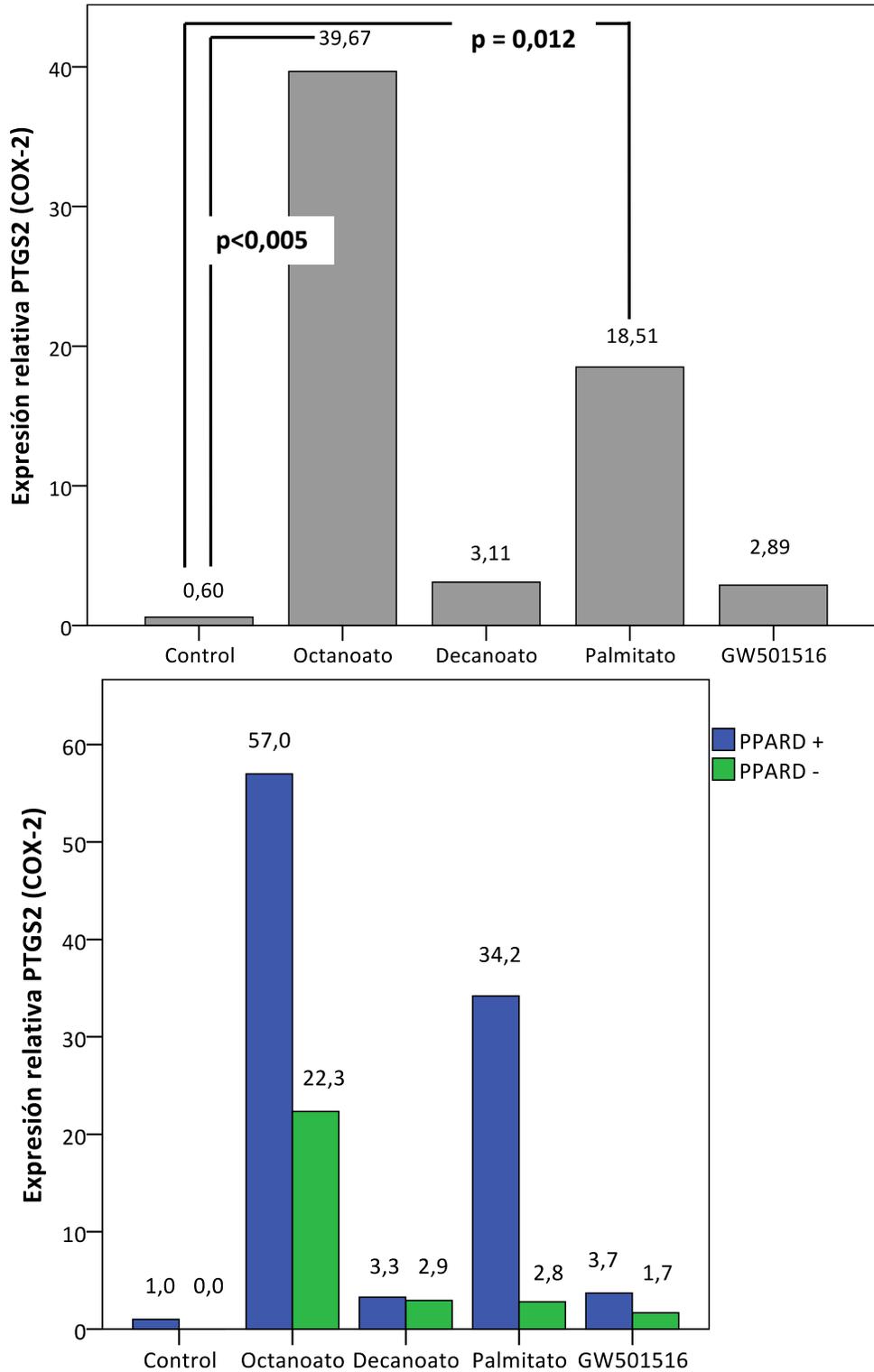


Ilustración 32

Figura 32: expresión relativa de *Ptgs2* en macrófagos no estimulados con LPS

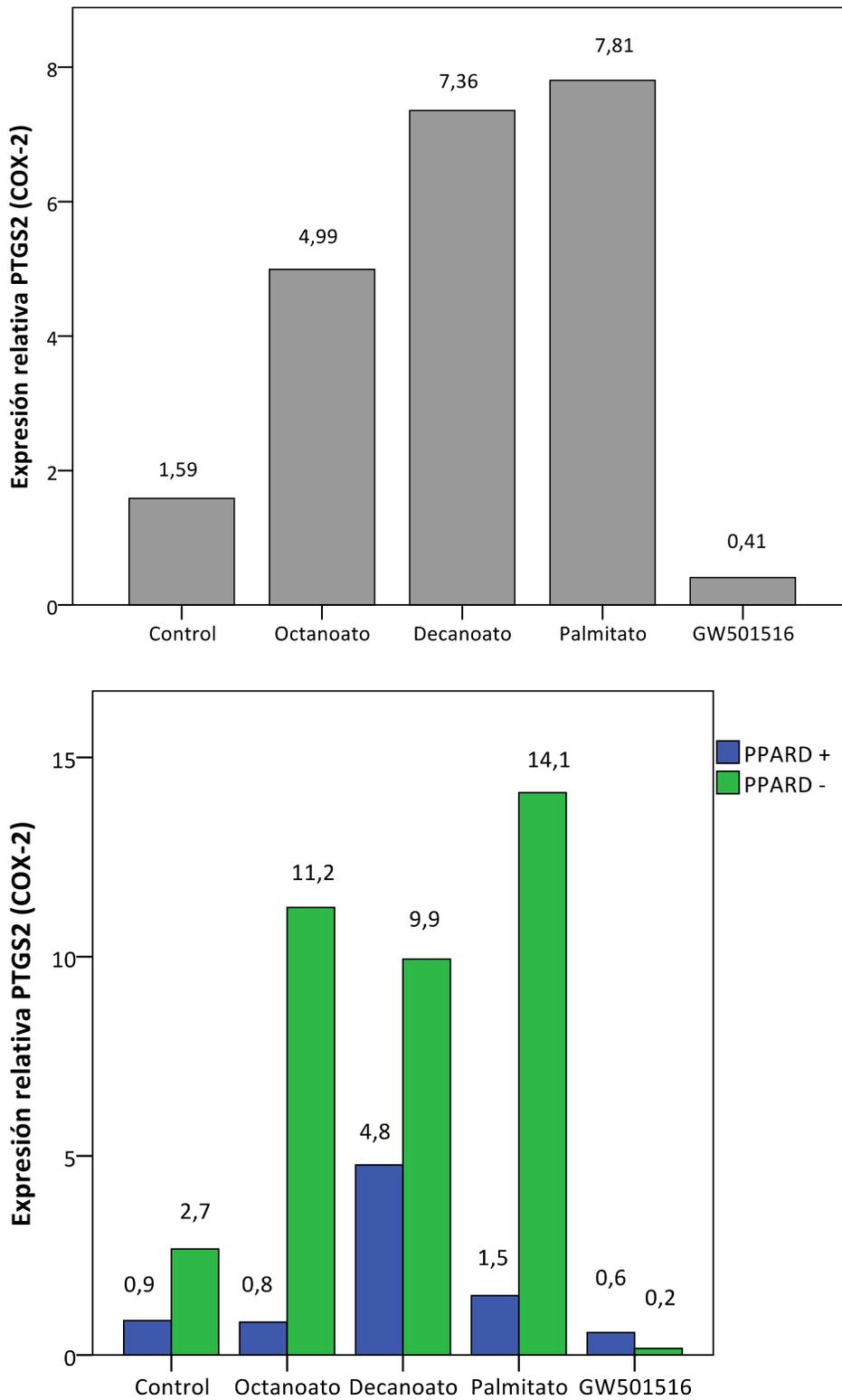


Ilustración 33

Figura 33: expresión relativa de *Ptgs2* en macrófagos estimulados con LPS

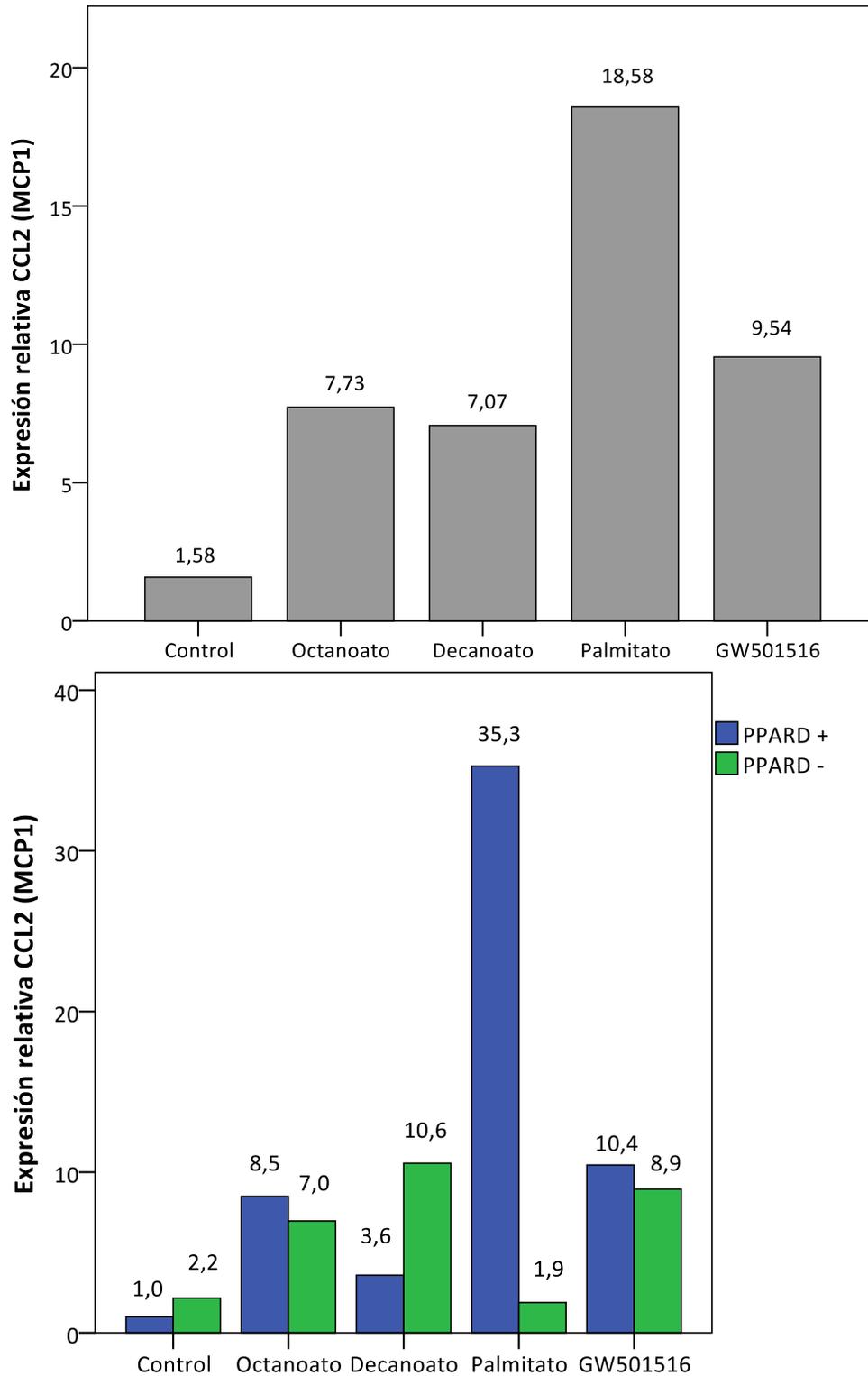


Ilustración 34

Figura 34: expresión relativa de *Mcp1* en macrófagos no estimulados con LPS

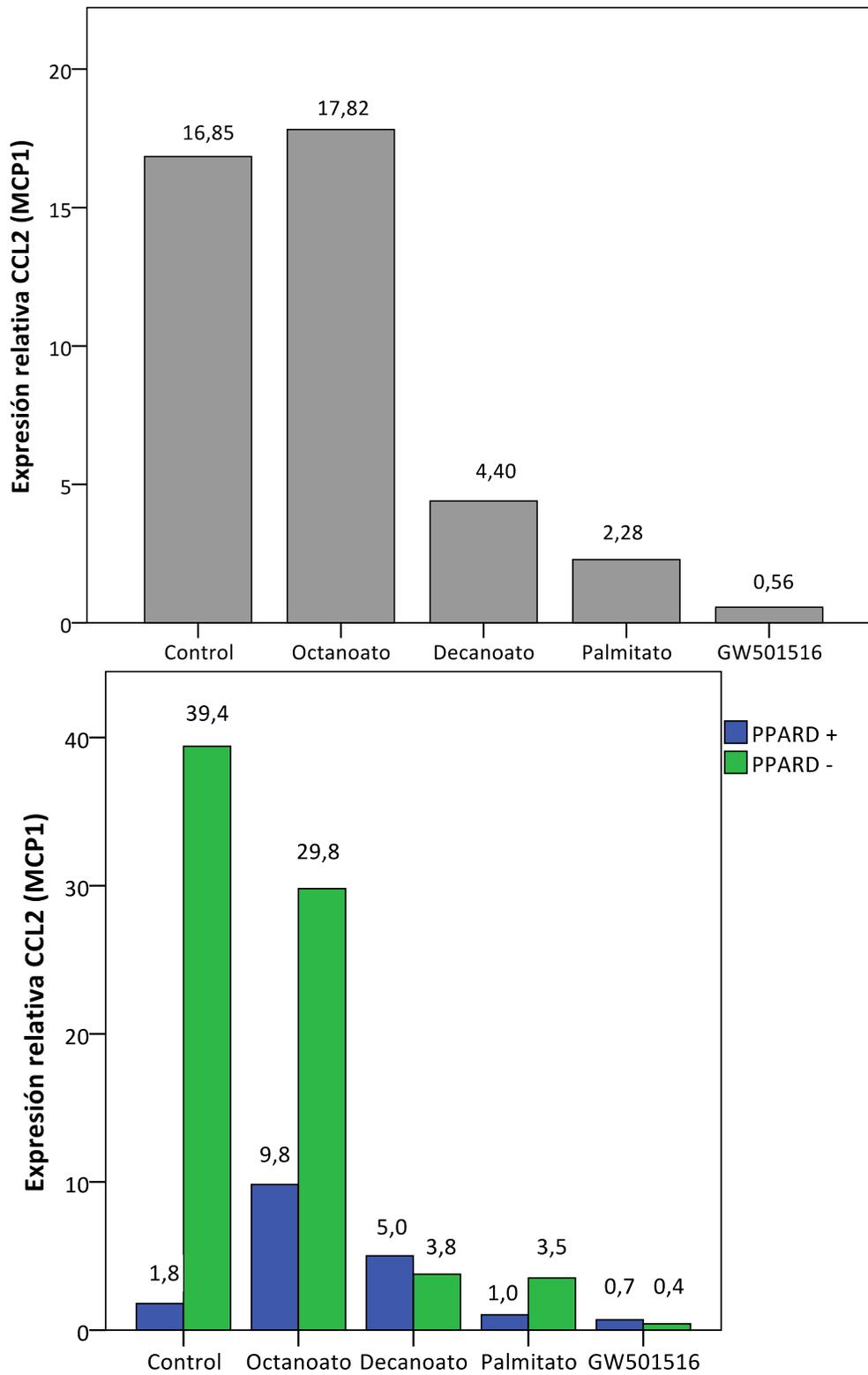


Ilustración 35

Figura 35: expresión relativa de *Mcp1* en macrófagos estimulados con LPS

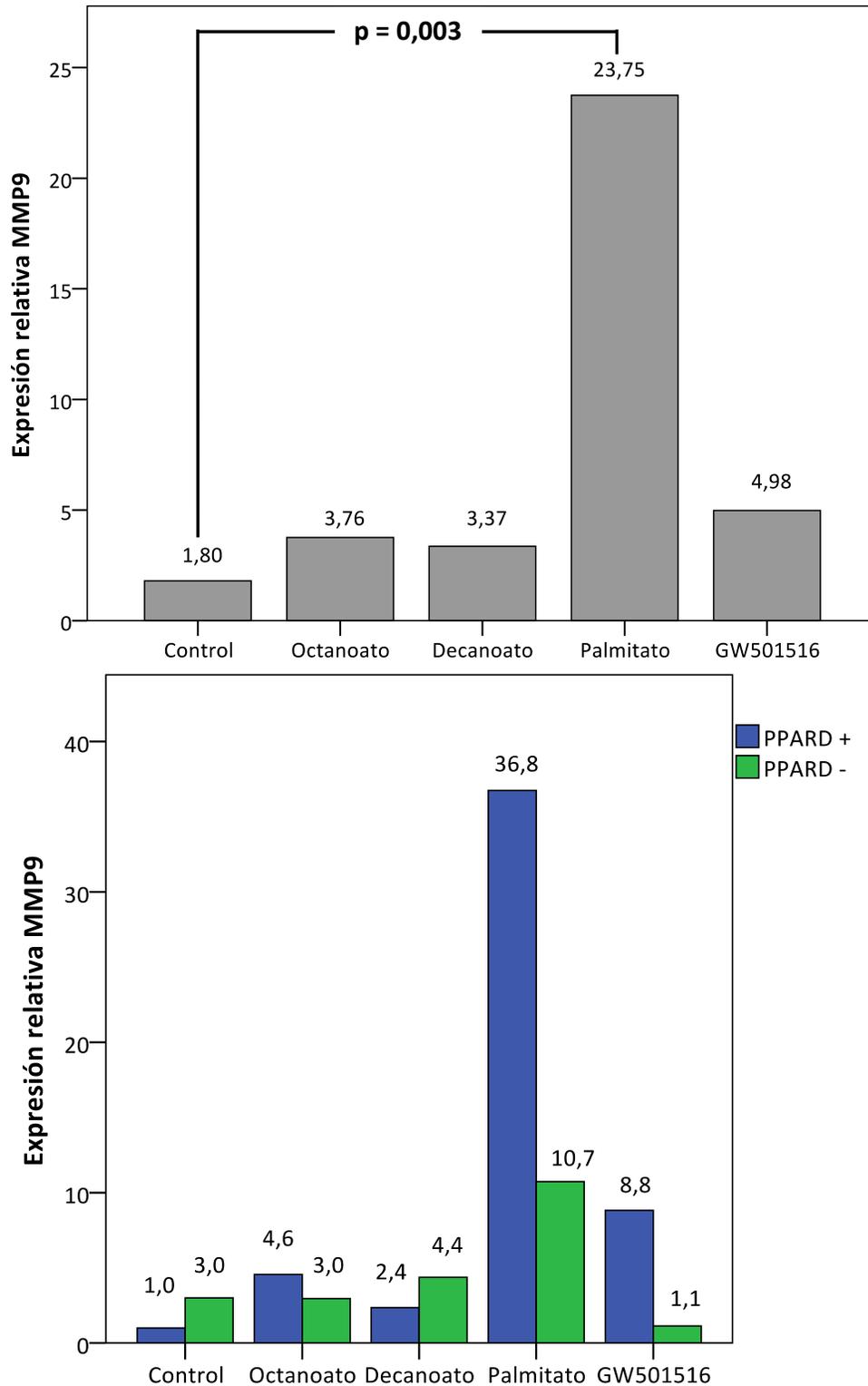


Ilustración 36

Figura 36: expresión relativa de *Mmp9* en macrófagos no estimulados con LPS

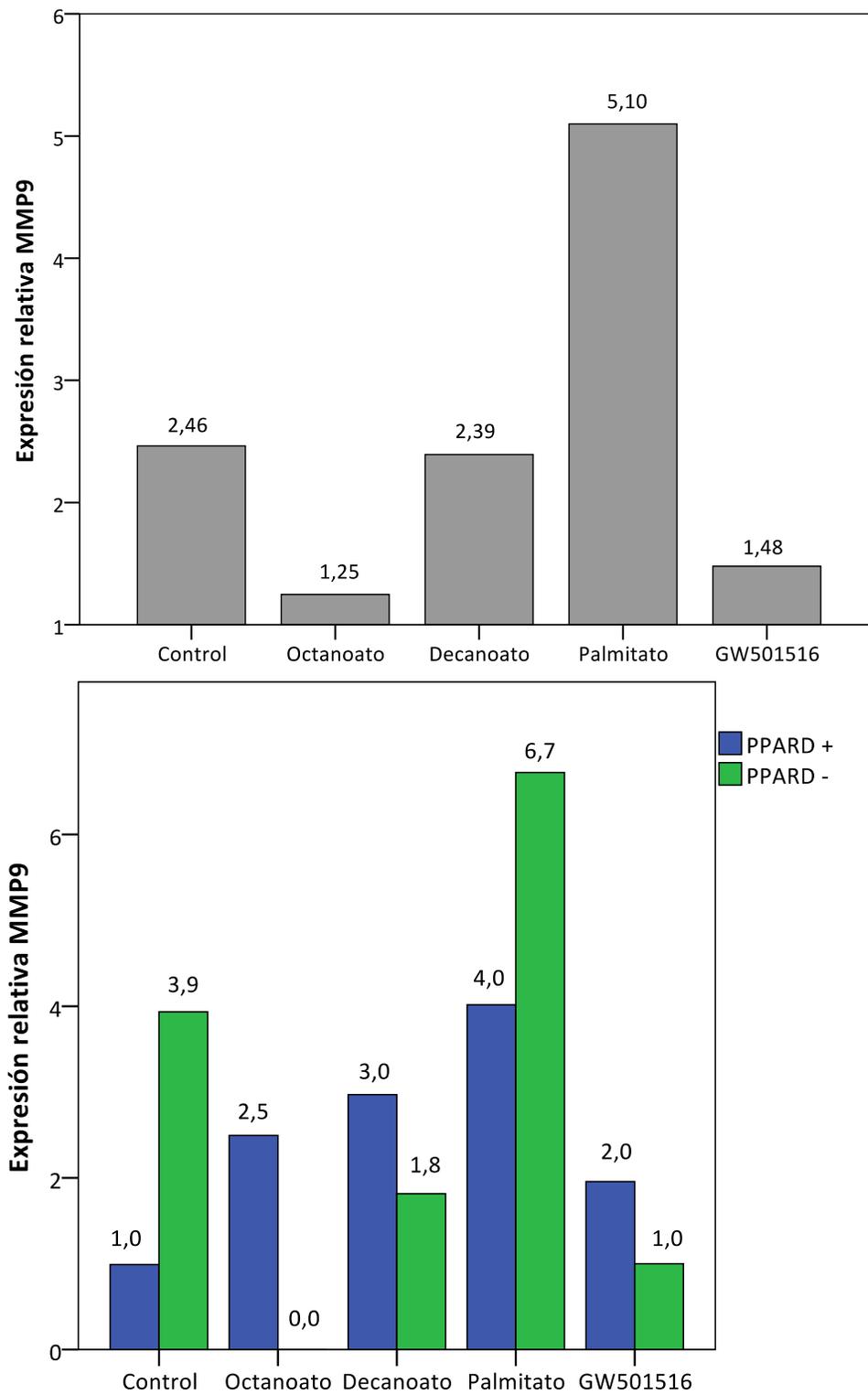


Ilustración 37

Figura 37: expresión relativa de *Mmp9* en macrófagos estimulados con LPS

Tabla 5

Gen	Octanoato	Decanoato	Palmitato	Agonista
<i>Il6</i>	=	=	↑	=
<i>Tnf</i>	=	=	↑	↑
<i>Ifng</i>	=	=	↑	=
<i>Il10</i>	=	=	=	=
<i>Nos2</i>	=	=	=	↑
<i>Ptgs2</i>	↑	=	↑	=
<i>Mcp1</i>	=	=	=	=
<i>Mmp9</i>	=	=	↑	=

Tabla 5: Análisis de la expresión de genes relacionados con la función inmunitaria en respuesta al tratamiento con octanoato, decanoato, palmitato y el agonista específico para PPAR α GW501516 en macrófagos no estimulados con LPS

Tabla 6

Gen	Octanoato	Decanoato	Palmitato	Agonista
<i>Il6</i>	=	=	=	=
<i>Tnf</i>	=	=	=	=
<i>Ifng</i>	=	=	=	=
<i>Il10</i>	=	=	=	=
<i>Nos2</i>	=	=	=	=
<i>Ptgs2</i>	=	=	=	=
<i>Mcp1</i>	=	=	=	=
<i>Mmp9</i>	=	=	=	=

Tabla 5: Análisis de la expresión de genes relacionados con la función inmunitaria en respuesta al tratamiento con octanoato, decanoato, palmitato y el agonista específico para PPAR α GW501516 en macrófagos estimulados con LPS.

Tabla 7

<i>Plin2</i>	1,00	0,10	9,80	6,60	0,20	20,70	6,80	0,40	0,00	1,90	0,30	0,70	3,30	0,10	4,60	0,30	16,40	5,70	0,10	1,50
<i>Npc1</i>	1,00	0,00	0,80	0,50	0,10	1,60	11,50	0,10	0,00	1,00	0,30	0,00	0,40	1,20	0,50	7,70	0,60	1,40	0,50	0,50
<i>Pltp</i>	1,00	0,10	9,30	9,30	1,10	0,20	8,90	0,40	2,00	0,10	0,70	0,10	1,80	0,60	0,80	0,00	7,30	3,90	0,10	0,10
<i>Abca1</i>	1,00	2,20	5,20	0,40	1,50	74,80	6,30	1,40	4,30	6,30	0,30	0,10	4,30	28,60	8,00	22,90	0,60	0,30	1,40	0,10
<i>Abcg1</i>	1,00	0,40	8,20	0,50	0,90	0,90	2,60	13,60	2,30	4,40	3,40	1,90	3,00	2,10	0,60	0,50	0,20	5,10	0,20	1,40
<i>Cpt1</i>	1,00	0,00	1,00	0,10	0,30	0,30	1,60	2,20	0,10	0,10	0,70	0,10	0,50	0,40	0,20	0,40	0,10	0,10	0,20	0,00
<i>Il6</i>	1,00	0,00	0,00	10,30	0,00	0,00	240,80	61,60	0,00	0,10	0,00	0,00	23,70	18,60	0,00	0,00	47,50	7,50	0,10	0,00
<i>Tnf</i>	1,00	2,20	2,80	1,40	0,70	0,90	8,20	4,00	9,60	1,50	0,80	1,60	2,30	7,50	0,90	1,30	2,30	5,20	2,00	1,80
<i>Ifng</i>	1,00	0,10	0,00	2,50	0,00	0,00	15,40	5,70	0,30	0,20	0,04	0,03	0,78	9,29	0,00	0,91	0,94	13,08	0,11	0,05
<i>Il10</i>	1,00	11,90	3,50	0,10	0,30	10,70	4,10	0,20	0,10	0,00	0,60	0,00	0,60	3,80	0,00	0,20	0,10	0,80	0,00	0,00
<i>Nos2</i>	1,00	6,20	2,70	1,90	4,80	1,10	18,60	11,70	37,90	5,10	1,30	8,70	1,00	2,60	2,00	1,20	6,80	8,60	2,50	1,00
<i>Ptgs2</i>	1,00	0,00	57,00	22,30	3,30	2,90	34,20	2,80	3,70	1,70	0,90	2,70	0,80	11,20	4,80	9,90	1,50	14,10	0,60	0,20
<i>Mcp1</i>	1,00	2,20	8,50	7,00	3,60	10,60	35,30	1,90	10,40	8,90	1,80	39,40	9,80	29,80	5,00	3,80	1,00	3,50	0,70	0,40
<i>Mmp9</i>	1,00	3,00	4,60	3,00	2,40	4,40	36,80	10,70	8,80	1,10	1,00	3,90	2,50	0,00	3,00	1,80	4,00	6,70	2,00	1,00

Tabla 7: Resumen de los cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y la función inmune en macrófagos, en respuesta al tratamiento con octanoato, decanoato, palmitato y agonista GW501516, en macrófagos con y sin *knockdown* para *Ppard* y activados o no con LPS.

5.3 Análisis de captación de lipoproteínas

Para medir el efecto global de los tratamientos sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, se midió el porcentaje de captación de lipoproteínas LDL y VLDL, en un ensayo que midió la fluorescencia de las lipoproteínas fluoromarcadas en un lector de placas.

Aunque no se observaron cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de captación de lipoproteínas por parte de los macrófagos no activados con LPS, sí se observó una tendencia en los macrófagos tratados con octanoato y decanoato a mantener porcentajes más bajos de captación (y similares al control), mientras que los tratamientos con palmitato y con el agonista se asociaron con un mayor porcentaje de captación de lipoproteínas, lo que aumentaría el riesgo en estos macrófagos, de convertirse en células espumosas (Figura 38).

En los macrófagos activados con LPS se observó un aumento estadísticamente significativo en la captación de lipoproteínas por parte del octanoato y no con el decanoato u otro tratamiento. Este resultado no es muy concordante con los datos obtenidos de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, ya que en este grupo de macrófagos, no se encontraron cambios en la expresión de genes relacionados con la captación y la acumulación de lipoproteínas en las células, mientras que sí se encontró un aumento en la expresión de *Abca1*, que es un transportador que participa en el eflujo de colesterol. Estos datos podrían representar un falso positivo, ya que la activación con LPS pudo haber aumentado la captación de lipoproteínas de forma significativa en las células y haber afectado su viabilidad, por lo que se observa que al comparar

el porcentaje de captación con cada uno de los tratamientos, hay una menor captación de lipoproteínas en los macrófagos activados con LPS comparados con los no tratados con LPS (Figura 39).

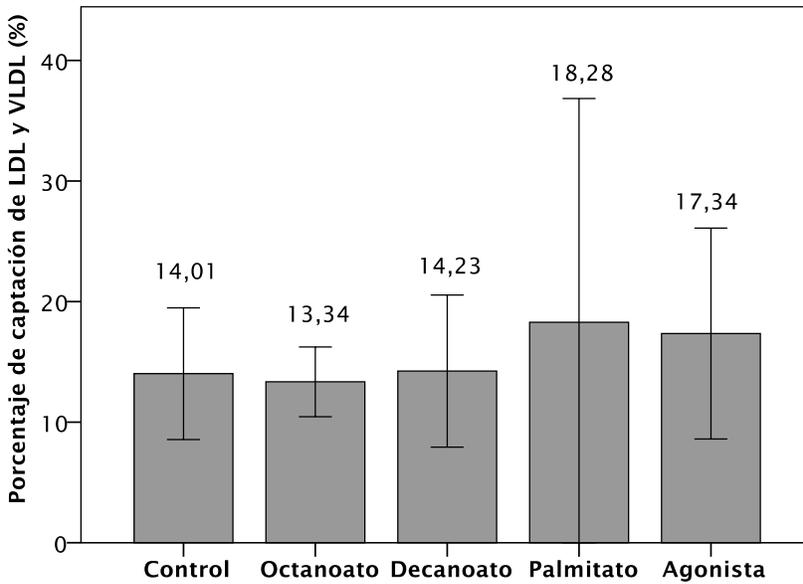


Ilustración 38

Figura 38: porcentaje de captación de lipoproteínas LDL y VLDL en macrófagos murinos no activados con LPS

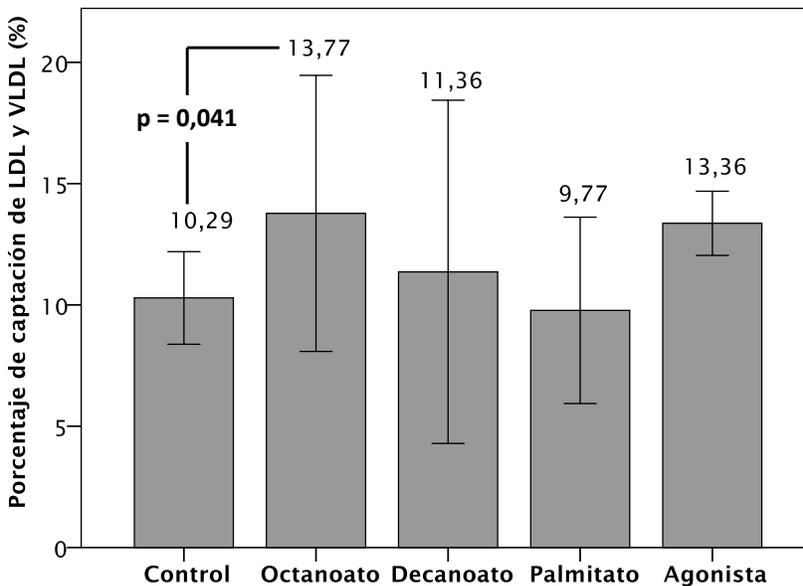


Ilustración 39

Figura 39: porcentaje de captación de lipoproteínas LDL y VLDL en macrófagos murinos activados con LPS

6. Discusión

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de mortalidad en el mundo (Nowbar, et al., 2019) e incluye a; la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad arterial periférica y el tromboembolismo venoso (López & Murray, 2020). La aterosclerosis es el proceso fisiopatológico subyacente más importante de la enfermedad cardiovascular (Hansson & Hermansson, 2011), por lo que el estudio sobre las vías fisiopatológicas de este proceso es de gran importancia, tanto en la bioquímica, como en la salud pública.

Recientemente, el papel de los macrófagos sobre la fisiopatología de la aterosclerosis, ha cobrado mayor importancia. Ya que el aumento en la inflamación y la formación de células espumosas, son procesos indispensables para la formación, la progresión, la vulnerabilidad y la ruptura de la placa aterosclerótica (Libby, Buring & Badimon, 2019). Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que los macrófagos, dependiendo de su estado de activación, también podrían disminuir la inflamación, así como la progresión de la aterosclerosis, lo que convierte a los cambios transcripcionales en los macrófagos, en posibles blancos terapéuticos de la enfermedad cardiovascular (Cheng, et al., 2022).

Los receptores PPAR regulan un amplio espectro de procesos biológicos, incluyendo el metabolismo de lípidos, la diferenciación celular, la migración celular y la inflamación, por lo que su modulación es de interés para el tratamiento de la aterosclerosis y otras enfermedades metabólicas (Enayati, et al., 2022).

PPAR β/δ es uno de los receptores PPAR menos estudiado y su activación se ha relacionado con un aumento en la captación y el gasto de ácidos grasos por parte de las células y una reducción en la inflamación en células del sistema inmune (Zieleniak, Wójcik & Wozniak, 2008). Este receptor se expresa de forma ubicua en todos los tejidos y es el receptor PPAR mayormente expresado en los macrófagos (Adhikary, et al., 2015). Los ácidos grasos de cadena media son agonistas parciales de PPAR β/δ (Liberato, et al., 2012), por lo que entender su efecto sobre la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y con la función inmune en macrófagos, abre las puertas a nuevos blancos y agentes terapéuticos.

Un estudio realizado en el 2010 describió el efecto del tratamiento con el agonista de PPAR β/δ (GW501516) sobre la expresión de RNA en miofibroblastos, usando microarreglos, y encontró que este agonista

aumentó la expresión de 91 genes relacionados principalmente con vías regulatorias de la inflamación (Kaddatz, et al., 2010). Más adelante, otro estudio publicado en el 2021, demostró que el tratamiento con el agonista de PPAR β/δ en ratones, disminuyó la incidencia de osteoporosis, mediante el aumento de la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo menos proinflamatorio (M2), principalmente a través del aumento en la expresión de *Angptl4* y la consecuente disminución en la activación de la vía de señalización NF κ B (Chen, et al., 2021).

En cuanto al efecto de los ácidos grasos de cadena media, un estudio publicado en el 2016, describió que el tratamiento con estos ácidos grasos en un modelo murino disminuyó la masa corporal y mejoró el metabolismo de colesterol, además de disminuir la progresión de la aterosclerosis, incluso en ratones bajo una dieta alta en grasa, principalmente mediante un aumento en la activación de las vías relacionadas con el eflujo de colesterol (Zhang, et al., 2016).

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios anteriormente descritos, surgió la hipótesis de que los ácidos grasos de cadena media, al ser agonistas parciales del receptor PPAR β/δ , podrían disminuir la captación de lipoproteínas a través de un aumento en la transcripción de genes relacionados con el eflujo de colesterol y a la disminución de la expresión de genes relacionados con inflamación.

Aunque el receptor PPAR β/δ , es el receptor PPAR mayormente expresado en macrófagos, no es el único receptor de ácidos grasos presente en estas células. Se ha descrito la expresión de otros receptores de ácidos grasos acoplados a proteína G, dentro de los cuales se encuentran: el FFAR1, FFAR2, FFAR3, FFAR4, GPR84, GPR109A, GPR170, GPR31, GPR132 y GPR119; y la activación de estos receptores también ha demostrado modular la respuesta inflamatoria en células inmunes (Kieppura, Stachyra & Olszanecki, 2021). Adicionalmente, se especula que los ácidos grasos también podrían tener efectos sobre la regulación de la transcripción, de forma independiente a la unión a receptores (Jump, Tripathy & Depner, 2013).

Aunque en los resultados de este estudio, el efecto del tratamiento con ácidos grasos de cadena media, no mostró diferencias estadísticamente significativas sobre la captación de lipoproteínas, sí se observó una tendencia hacia un efecto protector del tratamiento con octanoato y con decanoato, ya que el porcentaje de captación fue menor que el observado con el palmitato y con el agonista GW501516. Esto podría deberse a que estos tratamientos no aumentaron la expresión de genes relacionados con la captación de lipoproteínas ni de genes de citocinas proinflamatorias,

mientras que sí aumentaron la expresión de *Abca1*, un transportador relacionado con el eflujo de colesterol.

Mediante la base de datos *PPARgene*, que permite predecir posibles genes diana de PPAR β/δ por medio de un método basado en *Machine Learning*, se encontró que los genes respondedores a PPAR β/δ son; *Scarb1*, *Plin2*, *Pltp*, *Abca1*, *Cpt1*, *Il6* y *Nos2*, y en todos se predice un efecto de sobreexpresión (Fang, et al., 2016). En los resultados de esta investigación se encontró que las células respondieron de forma diferente al octanoato y al decanoato, lo que puede deberse a que los receptores interactúan de forma diferente con el DNA, dependiendo del ligando específico que se una al receptor. Incluso se ha descrito que el efecto del receptor no solo es diferente dependiendo del ligando, sino también dependiendo del tipo de célula (Park, Vogelstein & Kinzler, 2001).

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

El octanoato aumentó la expresión de *Plin2*, *Pltp* y *Ptgs2* en los macrófagos sin LPS y de *Abca1* en los macrófagos con LPS.

El decanoato aumentó la expresión de *Plin2* en los macrófagos sin LPS, de *Npc1* en los macrófagos con LPS y de *Abca1* en los macrófagos activados o no activados con LPS.

La unión del octanoato a PPAR β/δ mostró un efecto represor sobre la expresión de *Scarb1*, *Abca1* y *Mcp1*.

La unión del octanoato a PPAR β/δ mostró un efecto inductor sobre la expresión de *Abcg1*, *Plin2*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Ptgs2* y *Mmp9*.

El octanoato aumentó la expresión de *Pltp* por medio de un mecanismo independiente a la unión al receptor PPAR β/δ .

La unión del decanoato a PPAR β/δ mostró un efecto represor sobre la expresión de *Scarb1*, *Abca1*, *Plin2*, *Npc1*, *Il10*, *Ptgs2*, y *Mcp1*.

La unión del decanoato a PPAR β/δ mostró un efecto inductor sobre la expresión de *Nos2*.

La activación de los macrófagos con LPS aumentó la expresión de *Ppard*, *Abcg1* y *Mcp1*.

Los macrófagos tratados con octanoato y decanoato mostraron una menor captación de lipoproteínas que los macrófagos tratados con palmitato y similar a los macrófagos control.

Los macrófagos activados con LPS mostraron una menor captación de lipoproteínas en general, aunque dentro de este grupo, los macrófagos tratados con octanoato mostraron una mayor captación de lipoproteínas que los macrófagos tratados con decanoato, palmitato o con el agonista. Sin embargo, esto podría ser debido a que muchas células murieron después de la activación con LPS.

Este estudio amplió el conocimiento sobre la respuesta a los ácidos grasos de cadena media en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y la función inmune en macrófagos murinos, y en qué medida este efecto está mediado por el receptor nuclear PPAR β/δ .

7.2 Recomendaciones

Teniendo en cuenta los resultados del ensayo de captación de lipoproteínas, podría ser interesante medir la viabilidad celular en macrófagos activados con LPS, expuestos a diferentes dosis de lipoproteínas y a diferentes tiempos.

Para obtener otros genes que podrían ser diana del receptor PPAR β/δ , podría ser interesante realizar un experimento de RNA-Seq en los mismos grupos de tratamiento que se utilizaron en este estudio.

Bibliografía

Adhikary, T., Wortmann, A., Schumann, T., Finkernagel, F., Lieber, S., Roth, K., ... & Müller, R. (2015). The transcriptional PPAR β/δ network in human macrophages defines a unique agonist-induced activation state. *Nucleic acids research*, 43(10), 5033-5051.

Alahmadi, A., & Ramji, D. P. (2022). Monitoring modified lipoprotein uptake and macropinocytosis associated with macrophage foam cell formation. In *Atherosclerosis* (pp. 247-255). Humana, New York, NY.

Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., & Rowan, B. G. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nuclear receptor signaling*, 10(1), nrs-10001.

Bahiraii, S., Brenner, M., Yan, F., Weckwerth, W., & Heiss, E. H. (2022). Sulforaphane diminishes moonlighting of pyruvate kinase M2 and interleukin 1 β expression in M1 (LPS) macrophages. *Frontiers in immunology*, 13.

Balta, I., Stef, L., Pet, I., Iancu, T., Stef, D., & Corcionivoschi, N. (2021). Essential fatty acids as biomedicines in cardiac health. *Biomedicines*, 9(10), 1466.

Batista, F. A., Trivella, D. B., Bernardes, A., Gratieri, J., Oliveira, P. S., Figueira, A. C. M., ... & Polikarpov, I. (2012). Structural insights into human peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR-delta) selective ligand binding. *PloS one*, 7(5), e33643.

Benetti, E., SA Patel, N., & Collino, M. (2011). The role of PPAR β/δ in the management of metabolic syndrome and its associated cardiovascular complications. *Endocrine, metabolic & immune disorders-drug targets*, 11(4), 273-284.

Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*, 53(1), 409-435.

Berlato, C., Cassatella, M. A., Kinjyo, I., Gatto, L., Yoshimura, A., & Bazzoni, F. (2002). Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *The journal of immunology*, 168(12), 6404-6411.

Blunder, S., Pavel, P., Minzaghi, D., & Dubrac, S. (2021). PPARdelta in affected atopic dermatitis and psoriasis: A possible role in metabolic reprogramming. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7354.

Caligiuri, G., Rudling, M., Ollivier, V., Jacob, M. P., Michel, J. B., Hansson, G. K., & Nicoletti, A. (2003). Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Molecular medicine*, 9(1), 10-17.

Carrieri, A., Giudici, M., Parente, M., De Rosas, M., Piemontese, L., Fracchiolla, G., ... & Liodice, F. (2013). Molecular determinants for nuclear receptors selectivity: Chemometric analysis, dockings and site-directed mutagenesis of dual peroxisome proliferator-activated receptors α/γ agonists. *European journal of medicinal chemistry*, 63, 321-332.

Chang, P., Zuckermann, A. M., Williams, S., Close, A. J., Cano-Jaimez, M., McEvoy, J. P., ... & Williams, R. S. (2015). Seizure control by derivatives of

medium chain fatty acids associated with the ketogenic diet show novel branching-point structure for enhanced potency. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 352(1), 43-52.

Chen, M., Lin, W., Ye, R., Yi, J., & Zhao, Z. (2021). PPAR β/δ Agonist Alleviates Diabetic Osteoporosis via Regulating M1/M2 Macrophage Polarization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3349.

Cheng, R., Xu, X., Yang, S., Zhao, Y., Yu, F., & Ren, X. (2022). The underlying molecular mechanisms and biomarkers of plaque vulnerability based on bioinformatics analysis. *European Journal of Medical Research*, 27(1), 1-10.

Chi, T., Wang, M., Wang, X., Yang, K., Xie, F., Liao, Z., & Wei, P. (2021). PPAR- γ modulators as current and potential cancer treatments. *Frontiers in oncology*, 11.

Chojnacka, K., & Lewandowska, U. (2021). The influence of polyphenol-rich extracts on the production of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 72(2).

Díaz-Gandarilla, J. A., Osorio-Trujillo, C., Hernández-Ramírez, V. I., & Talamás-Rohana, P. (2013). PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA2-COX-2 inhibition, activating ROS production against *Leishmania mexicana*. *BioMed research international*, 2013.

Dressel, U., Allen, T. L., Pippal, J. B., Rohde, P. R., Lau, P., & Muscat, G. E. (2003). The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism

and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Molecular endocrinology*, 17(12), 2477-2493.

Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J., & Tschlis, P. N. (2002). Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *The EMBO journal*, 21(18), 4831-4840.

Enayati, A., Ghojoghnejad, M., Roufogalis, B. D., Maollem, S. A., & Sahebkar, A. (2022). Impact of Phytochemicals on PPAR Receptors: Implications for Disease Treatments. *PPAR research*, 2022.

Fang, L., Zhang, M., Li, Y., Liu, Y., Cui, Q., & Wang, N. (2016). PPARgene: a database of experimentally verified and computationally predicted PPAR target genes. *PPAR research*, 2016.

Gao, W., Liu, H., Yuan, J., Wu, C., Huang, D., Ma, Y., ... & Ge, J. (2016). Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(12), 2318-2327.

Gu, J., Geng, M., Qi, M., Wang, L., Zhang, Y., & Gao, J. (2021). The role of lysosomal membrane proteins in glucose and lipid metabolism. *The FASEB Journal*, 35(10), e21848.

Haidukewych, D., Forsythe, W. I., & Sills, M. (1982). Monitoring octanoic and decanoic acids in plasma from children with intractable epilepsy treated with medium-chain triglyceride diet. *Clinical chemistry*, 28(4), 642-645.

Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*, 12(3), 204-212.

Helsen, C., & Claessens, F. (2014). Looking at nuclear receptors from a new angle. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 97-106.

Huangfu, N., Wang, Y., Xu, Z., Zheng, W., Tao, C., Li, Z., ... & Chen, X. (2021). TDP43 Exacerbates Atherosclerosis Progression by Promoting Inflammation and Lipid Uptake of Macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1705.

Irene, G. R., César, M., Fernando, C., & Ana, C. (2021). SR-B1, a Key Receptor Involved in the Progression of Cardiovascular Disease: A Perspective from Mice and Human Genetic Studies. *Biomedicines*, 9(6), 612.

Iwashita, A., Muramatsu, Y., Yamazaki, T., Muramoto, M., Kita, Y., Yamazaki, S., ... & Matsuoka, N. (2007). Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor δ -selective agonists in vitro and in vivo. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320(3), 1087-1096.

Jiang, X. C., & Yu, Y. (2021). The role of phospholipid transfer protein in the development of atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, 23(3), 1-9.

Jump, D. B., Tripathy, S., & Depner, C. M. (2013). fatty acid-regulated transcription factors in the liver. *Annual review of nutrition*, 33, 249.

Kaddatz, K., Adhikary, T., Finkernagel, F., Meissner, W., Müller-Brüsselbach, S., & Müller, R. (2010). Transcriptional Profiling Identifies Functional Interactions of TGF β and PPAR β/δ Signaling: SYNERGISTIC INDUCTION OF ANGPTL4 TRANSCRIPTION [S]. *Journal of Biological Chemistry*, 285(38), 29469-29479.

Kahremany, S., Livne, A., Gruzman, A., Senderowitz, H., & Sasson, S. (2015). Activation of PPAR δ : from computer modelling to biological effects. *British journal of pharmacology*, 172(3), 754-770.

Kieपुरa, A., Stachyra, K., & Olszanecki, R. (2021). Anti-atherosclerotic potential of free fatty acid receptor 4 (FFAR4). *Biomedicines*, 9(5), 467.

Kobiyama, K., & Ley, K. (2018). Atherosclerosis: A chronic inflammatory disease with an autoimmune component. *Circulation Research*, 123(10), 1118-1120. Lopez, A. D., & Murray, C. C. (2020). The global burden of disease, 1990–2020. *Nature medicine*, 4(11), 1241-1243.

Liao, Y., Zhu, E., & Zhou, W. (2021). Ox-LDL Aggravates the Oxidative Stress and Inflammatory Responses of THP-1 Macrophages by Reducing the Inhibition Effect of miR-491-5p on MMP-9. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8.

Libby, P. (2021). The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*, 592(7855), 524-533.

Libby, P., Buring, J.E., Badimon, L. et al (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers* 5 (56), 1-18.

Liberato, M. V., Nascimento, A. S., Ayers, S. D., Lin, J. Z., Cvoró, A., Silveira, R. L., ... & Polikarpov, I. (2012). Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. *PloS one*, 7(5), e36297.

Malekmohammad, K., Bezsonov, E. E., & Rafieian-Kopaei, M. (2021). Role of Lipid Accumulation and Inflammation in Atherosclerosis: Focus on molecular and cellular mechanisms. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8.

Narayanan, A., Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A. R., & Venkitanarayanan, K. (2015). Anticarcinogenic properties of medium chain fatty acids on human colorectal, skin and breast cancer cells in vitro. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5014-5027.

Nohara, R. (2001). Lipid metabolism in the heart—Contribution of BMIPP to the diseased heart—. *Annals of nuclear medicine*, 15(5), 403-409.

Nomura, M., Liu, J., Yu, Z. X., Yamazaki, T., Yan, Y., Kawagishi, H., ... & Finkel, T. (2019). Macrophage fatty acid oxidation inhibits atherosclerosis progression. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 127, 270-276.

Nowbar, A. N., Gitto, M., Howard, J. P., Francis, D. P., & Al-Lamee, R. (2019). Mortality from ischemic heart disease: Analysis of data from the World Health Organization and coronary artery disease risk factors From NCD Risk Factor Collaboration. *Circulation: cardiovascular quality and outcomes*, 12(6), e005375.

Pain, E., Shinhmar, S., & Williams, R. S. (2021). Using Dictyostelium to advance our understanding of the role of medium chain fatty acids in health and disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2515.

Park, B. H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2001). Genetic disruption of PPAR δ decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2598-2603.

Reiss, A. B., Siegart, N. M., & De Leon, J. (2017). Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective?. *Clinical Lipidology*, 12(1), 14-23.

Ren, Y., Zhao, H., Yin, C., Lan, X., Wu, L., Du, X., ... & Gao, D. (2022). Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Frontiers in Endocrinology*, 13.

Saliba-Gustafsson, P., Pedrelli, M. A. T. T. E. O., Gertow, K., Werngren, O., Janas, V., Pourteymour, S., ... & Schillaci, G. (2019). Subclinical atherosclerosis and its progression are modulated by PLIN2 through a feed-forward loop between LXR and autophagy. *Journal of internal medicine*, 286(6), 660-675.

Shim, S. Y., Yoon, H. Y., Yee, J., Han, J. M., & Gwak, H. S. (2021). Association between ABCA1 Gene Polymorphisms and Plasma Lipid Concentration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of personalized medicine*, 11(9), 883.

Sung, M. H., Liao, F. H., & Chien, Y. W. (2018). Medium-chain triglycerides lower blood lipids and body weight in streptozotocin-induced type 2 diabetes rats. *Nutrients*, 10(8), 963.

Tan, L., Lu, J., Liu, L., & Li, L. (2021). Fatty acid binding protein 3 deficiency limits atherosclerosis development via macrophage foam cell formation inhibition. *Experimental Cell Research*, 407(1), 112768.

Tan, Y., Wang, M., Yang, K., Chi, T., Liao, Z., & Wei, P. (2021). PPAR- α modulators as current and potential cancer treatments. *Frontiers in oncology*, 11, 707.

Vergallo, R., & Crea, F. (2020). Atherosclerotic plaque healing. *New England journal of medicine*, 383(9), 846-857.

Voloshyna, I., Littlefield, M. J., & Reiss, A. B. (2014). Atherosclerosis and interferon- γ : new insights and therapeutic targets. *Trends in cardiovascular medicine*, 24(1), 45-51.

Wagner, N., & Wagner, K. D. (2020). PPAR beta/delta and the hallmarks of cancer. *Cells*, 9(5), 1133.

Wakana, H., Kono, H., Fukushima, H., Nakata, Y., Akazawa, Y., Maruyama, S., ... & Ichikawa, D. (2019). Effects of medium-chain triglycerides administration in chemically induced carcinogenesis in mice. *Anticancer research*, 39(12), 6653-6660.

Wang, M. E., Singh, B. K., Hsu, M. C., Huang, C., Yen, P. M., Wu, L. S., ... & Chiu, C. H. (2017). Increasing dietary medium-chain fatty acid ratio mitigates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by regulating autophagy. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Właź, P., Socąła, K., Nieoczym, D., łuszczki, J. J., Źarnowska, I., Źarnowski, T., ... & Gasior, M. (2012). Anticonvulsant profile of caprylic acid, a main constituent of the medium-chain triglyceride (MCT) ketogenic diet, in mice. *Neuropharmacology*, 62(4), 1882-1889.

Zieleniak, A., Wójcik, M., & Woźniak, L. A. (2008). Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 56(5), 331-345.

Zhang, J. (2022). Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 23(2), 73.

Zhang, J. R., Coleman, T., Langmade, S. J., Scherrer, D. E., Lane, L., Lanier, M. H., ... & Ory, D. S. (2008). Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking. *The Journal of clinical investigation*, 118(6), 2281-2290.

Zhang, S., Li, L., Wang, J., Wang, S., Xing, D., & Chen, W. (2021). Recent advances in the regulation of ABCA1 and ABCG1 by lncRNAs. *Clinica Chimica Acta*.

Zhang, X., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, J., Xu, Q., Yu, X., ... & Xue, C. (2016). Medium-chain triglycerides promote macrophage reverse cholesterol transport and improve atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed a high-fat diet. *Nutrition Research*, 36(9), 964-973.

Zhao, X., Wang, J., Deng, Y., Liao, L., Zhou, M., Peng, C., & Li, Y. (2021). Quercetin as a protective agent for liver diseases: A comprehensive descriptive review of the molecular mechanism. *Phytotherapy Research*, 35(9), 4727-4747.