



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**  
**Doctor Fernando Monckeberg Barros**

**“EFECTO DIFERENCIAL DEL ÁCIDO GRASO SATURADO PALMITATO Y  
DEL INSATURADO OLEATO SOBRE LA MORFOLOGÍA E INTERACCIÓN  
GOTA LIPÍDICA-MITOCONDRIA Y LA FUNCIÓN OXIDATIVA  
MITOCONDRIAL EN CÉLULAS HEPÁTICAS HEPG2”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS MENCIÓN  
NUTRICIÓN HUMANA

**Andrea Eynaudi Cáceres**

**Director de Tesis: Dr. Rodrigo Troncoso Cotal**  
**Co-Directora de Tesis: Dra. Valentina Parra Ortiz**

---

2022

Santiago, Chile

## AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Proyecto de Tesis por la Estudiante Andrea Eynaudi Cáceres ha sido revisado y aprobado por nosotros como Directores de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora que designará el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



---

**Prof. Rodrigo Troncoso Cotal**



---

**Prof. Valentina Parra Ortiz**

Santiago de Chile, Mayo de 2022



## COMISIÓN DE TESIS

Dr. Roberto Bravo Sagua, Profesor Asistente INTA, Universidad de Chile.

Dr. Jorge Martínez Winkler, Profesor Titular INTA, Universidad de Chile.

Dr. Luis Valladares Boasi, Profesor Titular INTA, Universidad de Chile.

Esta tesis de Magíster se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA, dirigido por el Dr. Rodrigo Troncoso, y el Laboratorio de Diferenciación Celular y Metabolismo, dirigido por la Dra. Valentina Parra, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Proyecto FONDECYT 1191078 (RT)

Proyecto FONDECYT 1190743 (VP)

La presente tesis de magíster ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

a) Publicación:

Eynaudi A, Díaz-Castro F, Bórquez JC, Bravo-Sagua R, Parra V\*, Troncoso R\*. Differential effects of Oleic and Palmitic Acids on Lipid Droplet-Mitochondria interaction in the hepatic cell line HepG2. Front. Nutr. 2021 <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.775382>.

b) Presentaciones a congresos:

Eynaudi A, Bórquez JC, Parra V, Troncoso R. Differential effects of Palmitic and Oleic acid on Lipid Droplet-Mitochondria interaction in HepG2 cells. FASEB Conference: The Lipid Droplets Conference. 6-7 de Julio 2020, Virtual.

Eynaudi A, Donoso C, Parra V, Troncoso R. Differential effects of palmitic and oleic acid on morphology and interaction between lipid droplet and mitochondria in HepG2 human cells. XLII ANNUAL MEETING OF THE CHILEAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY. XIV ANNUAL MEETING OF THE CHILEAN SOCIETY OF PLANT BIOLOGISTS. 8 al 11 de Octubre 2019. Iquique, Chile.

## AGRADECIMIENTOS

Para empezar, quiero darles las gracias a mis padres Patricia y Héctor por tanto cariño, preocupación y apoyo en todo sentido. Gracias a Sergio, gran compañero, por tolerar años de estrés y de encierro.

Desde pregrado que siempre quise ingresar al Magíster de Nutrición Humana en el INTA, tantos años pasaron hasta que pude dar al salto. Agradecida estoy de este instituto que me aceptó, de los profesores con gran experiencia y conocimiento que me enseñaron y actualizaron en nutrición. Muchas gracias a mis directores de tesis, Dr. Rodrigo Troncoso y Dra. Valentina Parra; ambos por su apoyo, tiempo, tolerancia, preocupación y enseñanza. Les agradezco especialmente a mis compañeros de laboratorio Francisco Díaz, Juan Carlos Bórquez, Francisco Pino, Camila Donoso y Camila Sanhueza, por los consejos y ayuda técnica en los experimentos. También, a todos mis compañeros de magíster y doctorado que forman y formaron parte de LABINAF, sin ellos nada hubiese sido igual.

Estoy agradecida por mis buenas amigas y amigos de siempre y por las buenas personas que conocí en el magíster, todas personas que me han inspirado a iniciar y continuar mis estudios. También debo un reconocimiento a mi amiga, compañera de pre y post grado Claudia Carrasco, por tantas palabras de apoyo y fuerza que hemos compartido día a día. A mis compañeras de magíster y laboratorio: Alejandra Montaña y Pamela Pino, tantos Western blots juntas, que finalmente me regalaron una amistad, apoyo y varios mojitos. Gracias por las tertulias anti estrés cerca del INTA y ahora por los zoom debido a las distancias.

Estos años de magíster en el INTA y estadía en LABINAF, me entregaron muchos conocimientos académicos y especialmente, la posibilidad de explorar nuevas áreas tan diferentes y fascinantes que marcaron un hito en mi formación profesional e incluso, como persona. Un privilegio.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AUTORIZACIÓN.....	2
COMISIÓN DE TESIS.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
Hipótesis del trabajo.....	18
Objetivo general y Objetivos específicos.....	18
METODOLOGÍA.....	19
RESULTADOS.....	25
Objetivo N°1: Determinar el efecto del tratamiento del AG saturado palmitato o del AG insaturado oleato sobre la morfología de la LD en células hepáticas.....	25
Objetivo N°2: Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la interacción física de la LD con la mitocondria y nivel de las proteínas PLIN2, PLIN5 y Mfn2 en células hepáticas.....	28
Objetivo N°3: Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la función oxidativa mitocondrial en células hepáticas.....	31
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	40
REFERENCIAS.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Imágenes de Microscopía Confocal de hepatocitos luego de 2, 6, 18 y 24 h de tratamiento con 200 $\mu$ M de ácido oleico o palmítico.....	26
FIGURA 2. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la morfología de la gota lipídica.....	27
FIGURA 3. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la morfología mitocondrial.....	28
FIGURA 4. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la interacción física entre la gota lipídica y mitocondria en células HepG2.....	29
FIGURA 5. Efecto del tratamiento del ácido oleico y palmítico sobre el nivel de las proteínas PLIN2 y PLIN5 de la gota lipídica y Mfn2 de la membrana mitocondrial.....	31
FIGURA 6. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la función oxidativa mitocondrial.....	34
FIGURA 7. Efecto del ácido oleico y pamítico sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) de mitocondrias asociadas a LDs y no asociadas a LDs.....	35
FIGURA 8. Esquema de los efectos diferenciales de OA o PA en la morfología, interacción LD-mitocondria y función oxidativa mitocondrial.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	: Ácidos Grasos
ANOVA	: Análisis de Varianzas, en inglés <i>Analysis of Variances</i>
ATP	: Adenosin trifosfato
BSA	: Albúmina de suero bovino
DGAT1	: Diacilglicerol aciltransferasa 1
DGAT2	: Diacilglicerol aciltransferasa 2
DMEM	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
GPAT4	: Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 4
NASH	: <i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
LDs	: Gotas lipídicas, en inglés <i>Lipid Droplets</i>
OA	: Ácido Oleico
PA	: Ácido Palmítico
PLIN	: Perilipina
RE	: Retículo endoplásmico
SREBP-1c	: <i>Sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
TG	: Triglicéridos

## RESUMEN

**Introducción:** La esteatosis hepática se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en organelos especializados llamados gotas lipídicas (LDs). La sobrecarga de ácidos grasos ya sean saturados como el ácido palmítico (PA) o insaturados como el ácido oleico (OA) produce esteatosis. Sin embargo, solo el tratamiento con PA provoca daños en el hígado asociado a disfunción mitocondrial. En la actualidad, se desconoce si estos resultados están relacionados a un efecto diferencial entre PA y OA en la dinámica e interacción entre las LDs y mitocondrias. **Objetivo:** Evaluar el efecto de una sobrecarga lipídica a través del tratamiento de PA o OA en la morfología e interacción física entre LD-mitocondria y en la bioenergética mitocondrial en células HepG2. **Métodos:** Los hepatocitos de la línea HepG2 fueron expuestos por 2, 6, 18 y 24 h a PA 200  $\mu$ M o OA 200  $\mu$ M conjugado a albumina de suero bovino (BSA). BSA fue utilizado como control. Las células fueron incubadas con BODIPY 493/503 y MitoTracker Orange para la tinción de LDs y de mitocondrias, respectivamente. Se analizó el número, volumen y colocalización de las LDs y mitocondrias por medio de imágenes obtenidas por microscopia confocal, las que luego fueron cuantificadas con el software ImageJ, NIH. Los niveles de proteína de PLIN2, PLIN5 y Mfn2 se evaluaron mediante Western Blot. La función oxidativa mitocondrial se determinó a través de las mediciones de potencial de membrana mitocondrial, consumo de oxígeno y niveles de ATP. **Resultados:** La sobrecarga de OA promueve una mayor acumulación en el número y tamaño de LDs comparado con PA. La evaluación del consumo de oxígeno reveló que ambos tratamientos estimularon la respiración mitocondrial. Sin embargo, OA promovió una acumulación general del potencial mitocondrial mientras que PA favoreció la fragmentación mitocondrial, concomitante con un metabolismo orientado hacia la generación de ATP. En relación con la colocalización LD-mitocondria, si bien PA indujo menor proximidad entre los organelos, las LDs se asociaron a subgrupo de mitocondrias altamente activas, sugiriendo que su interacción media la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de ATP. Por el contrario, la sobrecarga de OA parece estimular la interacción LD-mitocondrias principalmente para el crecimiento de estas últimas. **Conclusión:** Las diferencias observadas indican que OA se

acumula fácilmente en las LDs, lo que probablemente reduce su toxicidad, mientras que el PA estimula preferentemente el metabolismo oxidativo mitocondrial, lo que puede contribuir a la progresión del daño hepático.

## ABSTRACT

**Background:** Fatty liver disease is characterized by the accumulation of triglycerides into specialized organelles called lipid droplets (LDs). Fatty acid overload, either of the saturated palmitic acid (PA) or the unsaturated oleic acid (OA) produces steatosis. However, only PA overload leads to liver damage mediated by mitochondrial dysfunction. To date, it is unknown if these divergent outcomes are related to a differential effect between PA and OA on the dynamics and interaction between LDs and mitochondria. **Objectives:** To evaluate the effect of lipid overload by the treatment of PA or OA on the LD morphology, their physical interaction with mitochondria, and mitochondrial bioenergetics in HepG2 cells. **Methods:** HepG2 cells were exposed for 2, 6, 18, and 24 h to 200  $\mu$ M PA or 200  $\mu$ M OA conjugated to bovine serum albumin (BSA), BSA was used as control. LD number, volume, and colocalization with mitochondria were measured in cells incubated with BODIPY 493/503 and MitoTracker Orange for LD and mitochondria staining, respectively. HepG2 cells were later fixed and mounted for imaging by Confocal microscopy and then analyzed using the ImageJ software, NIH. Western blot was used to evaluate protein levels of PLIN2, PLIN5, and Mfn2. The mitochondrial oxidative function was assessed in terms of the mitochondrial membrane potential, the oxygen consumption rate (OCR), and ATP levels. **Results:** OA overload promotes more and bigger LD accumulation than PA. OCR indicated that both treatments stimulated mitochondrial respiration; however, OA favored an overall build-up of the mitochondrial potential, while PA evoked a mitochondrial fragmentation, concomitant with an ATP-oriented metabolism. Even though PA-induced a lesser increase in LD-mitochondria proximity than OA, those LD associated with highly active mitochondria suggesting that they interact mainly to fuel fatty acid oxidation and ATP synthesis. On the contrary, OA overload seemingly stimulated LD-mitochondria interaction mainly for LD growth. **Conclusion:** In sum, these differences point out that OA readily accumulates in LD, likely reducing their toxicity, while PA preferably stimulates mitochondrial oxidative metabolism, which may contribute to liver damage progression.

## INTRODUCCIÓN

### Hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, *Non Alcoholic Fatty Liver Diseases*) corresponde a la acumulación anormal de triglicéridos (TG) a nivel hepático o esteatosis, pero también abarca los estadios progresivos de la enfermedad como son la esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis y cirrosis (1,2).

La NAFLD es la mayor causa de enfermedad hepática mundial. Según un reciente meta-análisis, la prevalencia mundial de la patología en población adulta es de un 25,24%, siendo Sudamérica una de las regiones con mayor prevalencia estimada junto con el Medio Oriente, con un 30,45% y 31,79%, respectivamente (3). La prevalencia de comorbilidades metabólicas en individuos con NAFLD es de un 51,34% para la obesidad, un 69,16% y 40,74% para hiperlipidemia e hipertrigliceridemia, respectivamente. Además, un 42,54% para el síndrome metabólico, un 39,34% en el caso de la hipertensión y un 22,51% para la diabetes tipo 2 (3).

La etiopatogenia de la NAFLD se puede explicar a través de la teoría de múltiples impactos, en donde distintos factores (genéticos, epigenéticos, alimentarios) actúan de forma sinérgica desarrollando obesidad central con proliferación y disfunción de los adipocitos, con el consecuente desequilibrio en la secreción de adipoquinas y citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-6. La disbiosis intestinal también contribuye a la patogénesis, al aumentar la permeabilidad y absorción de ácidos grasos (AG) hacia la circulación. Finalmente, la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, muscular y hepático, es un aspecto clave en el desarrollo y progresión de la enfermedad, al favorecer la inflamación, lipotoxicidad, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (2,4).

La insulinoresistencia provoca en el tejido adiposo un aumento de la lipólisis y liberación de AG libres hacia el hígado; en el tejido hepático aumenta la lipogénesis *de novo* debido a hiperinsulinemia (y activación de SREBP-1c) y por ende los AG son esterificados a TG dentro de las gotas lipídicas (LDs, *lipid droplets*) (2). Por tanto, una mayor acumulación de

LDs resulta del desbalance entre la síntesis y utilización de los TG presentes en el tejido hepático.

### **Gotas lipídicas o “*Lipid Droplets*” (LD)**

Las LDs son organelos celulares dinámicos presentes en casi todas las células eucariontes. Son estructuras formadas por una monocapa de fosfolípidos que presentan proteínas específicas unidas a su superficie y en cuyo interior se almacenan TG o ésteres de colesterol formando un centro de lípidos neutros (5–8). Se les han reconocido diferentes funciones celulares, como de reservorio energético eficiente, síntesis o reposición de membranas biológicas (aportando ésteres o fosfolípidos), y de protección contra la lipotoxicidad celular al tener la capacidad de esterificar e incorporar los AG libres. Sin embargo, se ha observado que en el caso de la NAFLD, donde hay una acumulación excesiva de TG, puede existir una desregulación del ciclo de vida de las LDs, pero su rol exacto en la progresión de la patología aún no ha sido dilucidado (5,6,9).

El tamaño de las LDs puede cambiar rápidamente según diferentes estímulos, según tipo celular, y dentro de la misma célula, existiendo LDs con diámetros que varían desde los 100 nm hasta 100  $\mu$ m de diámetro (5). Así, la formación de LDs gigantes en los hepatocitos es el sello de la esteatosis (10). Esta acumulación de TG en el tejido hepático proviene en un 60% de AG libres, a partir de la lipólisis del tejido adiposo; 25% de la lipogénesis *de novo* y 15% de la dieta (4,11).

Respecto a la dieta, los AG más abundantes en la alimentación occidental corresponden al palmitato (PA, C16:0), en el grupo de ácidos grasos saturados, y el oleato (OA, C18:1 n-9), en el grupo compuesto por los ácidos grasos monoinsaturados (12). Está descrito que tanto el PA como el OA promueven la acumulación de TG en los hepatocitos (13,14). Sin embargo, el tratamiento con PA produce lipotoxicidad en hepatocitos e hígados de ratas, induciendo estrés oxidativo y estrés del RE, disfunción mitocondrial con menor potencial de membrana mitocondrial y menor producción de ATP, favoreciendo la mitofagia; todo lo cual conduce finalmente a la apoptosis de los hepatocitos (13–15). En cambio, la estimulación con OA en cultivos primarios de hepatocitos de ratón, a pesar de desarrollar esteatosis, no produce un

aumento significativo en la generación de radicales libres de oxígeno (ROS), ni en la actividad de capasa-3, ni cambios en el potencial de membrana mitocondrial respecto a células control. Además, en hepatocitos de la línea celular HepG2, OA es capaz de prevenir la lipotoxicidad hepática inducida por PA (14, 15).

- *Formación de LDs:* Su biogénesis, aún no es descifrada por completo, comprende distintos pasos y se inicia en la membrana del retículo endoplásmico con la síntesis de lípidos neutros, por ende, los AG son esterificados secuencialmente por las enzimas de síntesis lipídica, hasta la formación y acumulación de TG formando lentes lipídicas que al crecer, deforman la bicapa de membrana del RE y provocan que la gota brote hacia el citoplasma formando un LD inicial o naciente.

La maduración de estas LD está dada por la incorporación de proteínas en la superficie de la monocapa, correspondientes a proteínas de Clase I que incluyen enzimas de hidrólisis o síntesis de TG como la GPAT4 y DGAT2 que favorecen la expansión de la gota, y/o proteínas de Clase II correspondientes a la familia de las perilipinas (PLIN 1 a 5), confiriéndoles a las LDs distintas funciones dinámicas (6,10).

Cabe mencionar, que en los hepatocitos y adipocitos las LDs suelen ser de mayor tamaño al tener la capacidad de fusionarse entre ellas o de crecer, mediante un mecanismo de difusión donde se transfieren los lípidos neutros, desde gotas pequeñas a las más grandes (6,10).

- *Utilización de LDs:* La movilización de los TG presentes en las LDs, para su posterior utilización como energía, se realiza a través de lipasas que actúan directamente en la superficie de las LDs o por medio del mecanismo de lipofagia en los lisosomas. Las lipasas que son reclutadas hacia la superficie de las LDs corresponden a la Lipasa adiposa de triglicéridos o ATGL, Lipasa sensible a hormonas o HSL y Monoglicérido lipasa o MGL, hidrolizando TG, diglicéridos y monoglicéridos consecutivamente hasta obtener glicerol y AG libres (10). Los AG liberados durante la lipólisis a partir de TG se utilizan principalmente en la mitocondria para  $\beta$ -oxidación y luego, para la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa.

- *Interacción de LDs con otros organelos celulares:* recientemente se ha descrito que las LDs se pueden asociar con el RE, lisosomas, aparato de Golgi, peroxisomas y mitocondrias (16). La función de estas interacciones, como también la estructura y dinámicas de los sitios de contacto aún está por definir.

### **Mitocondrias**

Las mitocondrias en los hepatocitos son abundantes: aproximadamente existen unas 800 en cada una de estas células, ocupando el 18% del volumen celular (17). Este organelo cumple la función de generar ATP para los distintos procesos celulares, a partir de sustratos derivados de lípidos y glucosa. En el hígado, bajo ciertas condiciones (como ayuno prolongado o actividad física), la mitocondria permite la oxidación de AG libres en su matriz mitocondrial, para luego en el ciclo de ácido cítrico a partir del acetyl-CoA, producir agentes reductores que favorecen la síntesis de ATP durante el proceso de fosforilación oxidativa en la membrana interna mitocondrial (17).

La lipotoxicidad en NAFLD, inducida por el suministro excesivo de AG libres al tejido hepático, conduce a un aumento compensatorio de la función oxidativa mitocondrial con una sobreproducción de ROS (18,19). Cuando los mecanismos antioxidantes se ven sobrepasados ante el exceso de especies reactivas, se genera un deterioro en la función mitocondrial (19). Se ha descrito que el desarrollo de disfunción mitocondrial provoca una menor  $\beta$ -oxidación, cambios morfológicos del organelo, una disminución del número de mitocondrias y menor actividad en la cadena respiratoria mitocondrial, generando mayor estrés oxidativo. Estas alteraciones promueven la disfunción y muerte hepatocelular y por tanto, la progresión de la enfermedad (17,20,21).

### **Mitocondria y LDs**

Se ha reportado que la mitocondria se asocia a las LDs en tejidos con alta capacidad de oxidación y almacenamiento de AGs como lo son el hígado, corazón, tejido adiposo pardo y el músculo esquelético (22–25).

La evidencia disponible muestra que las proteínas perilipinas (PLIN), presentes en la superficie de las LDs, son proteínas de tipo andamio que intervienen en la dinámica espacial y metabólica entre ambos organelos. Es así que PLIN1 y PLIN4 se encuentran en el tejido adiposo, PLIN2 y PLIN3 son ubicuos y PLIN5 se encuentra en tejidos con mayores niveles de oxidación de AG, como el hígado (8).

Respecto a la interacción física LD-mitocondria, se ha descrito que PLIN5 es capaz de regular este contacto al reclutar mitocondrias hacia las LDs a través de su región C-terminal (22,25). En adipocitos, se ha sugerido que la unión LD-mitocondria podría también estar mediada por la interacción de PLIN1 y Mitofusina-2, proteína presente en la membrana externa mitocondrial (26).

Adicionalmente, se ha observado que una sobreexpresión de PLIN5 promueve la expansión de LDs en células hepáticas de ratón AML12 (25) y en tejido cardiaco de ratones, aumentando la interacción LD-mitocondria, disminuyendo la oxidación de AG y con ello, una mayor acumulación de LDs (27). A su vez, en tejido adiposo pardo de ratón se observó una dinámica similar entre las LDs asociadas a la mitocondria, donde estas presentaron una menor capacidad de oxidación de AG, favoreciendo la síntesis de TG y por ende una mayor expansión de las LDs, además de reportarse la existencia de subpoblaciones de mitocondrias con una distinta mecánica metabólica: las mitocondrias citoplasmáticas (no asociadas a la LD) y las mitocondrias asociadas a las LDs (24). Cabe mencionar que el rol fisiológico de esta interacción mitocondria-LD en hepatocitos aún no ha sido descrita, pero la evidencia sugiere que la expansión de LDs es un mecanismo para evitar el daño hepático por lipotoxicidad frente a un exceso de nutrientes (24).

A pesar de la literatura disponible sobre la patogenia de la enfermedad hepática, poco se sabe sobre los efectos de los AG más abundantes de la dieta: palmitato y oleato como compuestos que forman parte de esta estructura dinámica llamada LD, y cómo éstas pueden afectar diferencialmente la morfología e interacción con las mitocondrias, organelo relevante tanto para la homeostasis energética, como para la adecuada funcionalidad del hepatocito. De esta manera, resulta necesario aportar información que permita descifrar el papel de la interacción LD-mitocondria en la bioenergética mitocondrial y cómo ésta se asocia con el desarrollo del



NAFLD. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el efecto de la sobrecarga lipídica del AG saturado palmitato o insaturado oleato sobre la morfología de las LDs, su interacción física con la mitocondria y la función oxidativa mitocondrial en un modelo *in vitro* en la línea celular HepG2.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

### **Pregunta de investigación**

¿Pueden los ácidos grasos de distinto grado de saturación afectar diferencialmente la morfología e interacción LD-mitocondria y la función oxidativa mitocondrial de células hepáticas HepG2?

### **Hipótesis**

La sobrecarga lipídica por el AG saturado palmitato aumenta la interacción LD-mitocondria y disminuye la función oxidativa mitocondrial en células hepáticas HepG2.

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la sobrecarga lipídica por el tratamiento de AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la interacción LD-mitocondria y la función oxidativa mitocondrial en células HepG2.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar el efecto del tratamiento del AG saturado palmitato o del AG insaturado oleato sobre la morfología de las LDs en células hepáticas.
2. Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la interacción física de las LDs con la mitocondria y nivel de las proteínas PLIN2 y PLIN5 en células hepáticas.
3. Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la función oxidativa mitocondrial en células hepáticas.

## METODOLOGÍA

- **Definición de muestra**

Se utilizó la línea celular HepG2, que corresponde a hepatocitos derivados de un carcinoma hepatocelular humano, el cual ha sido utilizado como modelo de estudio sobre el metabolismo de los lípidos en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (28–30).

La estimación del tamaño muestral fue de al menos 3 experimentos independientes, según la variabilidad que presente cada tipo de ensayo.

- **Diseño de investigación**

El diseño de estudio fue experimental *in vitro*, en donde los hepatocitos HepG2 fueron tratados con una sobrecarga de ácido graso saturado palmitato o ácido graso monoinsaturado oleato para determinar variaciones en la morfología de la gota lipídica, en su interacción física con la mitocondria y sobre la función oxidativa mitocondrial.

- **Definición de variables**

Variable independiente	Tipo de Variable
Presencia de palmitato	Categórica
Presencia de oleato	Categórica

Variable dependiente	Tipo de Variable	Unidad de medida
Volumen de gotas lipídicas	Cuantitativa continua	$\mu\text{m}^3$
Número de gotas lipídicas	Cuantitativa discreta	Número
Colocalización mitocondria-LD	Cuantitativa continua	Fracción de pixeles de LD en contacto con la mitocondria
Niveles de proteínas de superficie de la gota lipídica	Cuantitativa continua	Valores relativos
Respiración mitocondrial	Cuantitativa continua	$\text{mg O}_2 / (\text{L} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{g prot})$
Niveles intracelulares de ATP	Cuantitativa continua	Valores relativos
Potencial de membrana mitocondrial	Cuantitativa continua	Valores relativos

- **Procedimientos y Técnicas**

### **Cultivo Celular**

La línea celular HepG2 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC HB-8065). Estos hepatocitos se cultivaron en medio DMEM (11965-092, Thermo Fisher Scientific; glutamina 4 mM, glucosa 25 mM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) y antibióticos al 1% en placas de cultivo de 100 mm, a temperatura de 37°C, con atmósfera controlada al 95% de oxígeno y al 5% de dióxido de carbono, cambiando el medio cada 2 a 3 días hasta lograr una confluencia aproximada de un 90% que permitiese desarrollar los diferentes procedimientos.

**Tratamiento:** Los hepatocitos fueron expuestos por 2, 6, 18 y 24 h a BSA libre de ácidos grasos (A8806, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), o a 200  $\mu$ M de ácido palmítico (P0500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) conjugado con BSA libre de ácidos grasos o a 200  $\mu$ M de ácido oleico (P1383, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) conjugado con BSA libre de ácidos grasos.

**Objetivo N°1: Determinar el efecto del tratamiento del AG saturado palmitato o del AG insaturado oleato sobre la morfología de la LD en células hepáticas.**

### ***Microscopía Confocal***

Antes de sembrar las células, se trataron los cubreobjetos de las placas de cultivo con colágeno durante 30 min a 37°C para promover la adherencia celular, luego se aspiró el colágeno y se lavó con buffer PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; pH 7,4), para luego proceder a la esterilización con luz UV. Los hepatocitos fueron sembrados en placas de 12 pocillos a una confluencia entre 20-40%. Luego, fueron tratados con los ácidos grasos en tiempos de 2, 6, 18 y 24 h. Al finalizar los estímulos, las muestras se incubaron con el fluoróforo BODIPY 493/503 (D3922, Invitrogen) 2  $\mu$ M en BSA

libre de ácidos grasos durante 25 min a 37°C. Antes y después de este paso, se lavó con PBS. Luego, las células se fijaron en 300  $\mu$ L de PBS paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente y transcurrido 30 min, las muestras se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min. Finalmente, se realizó el montaje de las muestras (Dako Fluorescence Mounting Medium; S3023, Dako-Agilent) sobre un portaobjetos y se llevaron a la Unidad de Microscopía Confocal (Nikon C2 Plus-SiR) para su visualización y proceder a la obtención de imágenes, las cuales fueron luego cuantificadas en términos del número y volumen de la gota lipídica con el plug-in *3D Object Counter* del software ImageJ, NIH (28).

**Objetivo N°2: Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la interacción física de la LD con la mitocondria y nivel de las proteínas PLIN2, PLIN5 y Mfn2 en células hepáticas.**

### ***Microscopía Confocal***

Esta técnica se desarrolló en conjunto con el objetivo número 1 de microscopía y fue realizada para determinar la colocalización de las gotas lipídicas y las mitocondrias al marcar las LDs con la sonda fluorescente BODIPY 493/503 y las mitocondrias con el fluoróforo MitoTracker Orange (M7510, Invitrogen).

La metodología se llevó a cabo de igual forma que el procedimiento descrito en el objetivo anterior, sin embargo, al finalizar los estímulos los hepatocitos fueron co-incubados con la sonda MitoTracker Orange 400 nM y con el fluoróforo BODIPY 493/503 2  $\mu$ M en BSA libre de ácidos grasos durante 25 min a 37°C. Antes y después de este paso, se lavó con PBS. Luego, las células se fijaron en 300  $\mu$ L de PBS paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente y transcurrido 30 min, las muestras se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min. Finalmente, se realizó el montaje de las muestras y se llevaron a la Unidad de Microscopía Confocal (Nikon C2 Plus-SiR) para su visualización y proceder a la obtención de imágenes, las cuales luego fueron cuantificadas en términos de la colocalización LD-mitocondria con el plug-in *Colocalization Finder* del software ImageJ, NIH.

### ***Western Blot***

El nivel de las proteínas de la superficie de las LDs PLIN2 y PLIN5 fueron determinados por inmunoblot, como también la proteína de la membrana externa mitocondrial Mfn-2. Para ello, las células HepG2 fueron sembradas en placas de 60 mm a una confluencia de 80-90%. Luego de someterlas al tratamiento de ácidos grasos por tiempos de 2, 6, 18 y 24 h, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X frío y se realizó la extracción de contenido proteico con la solución de lisis T-PER (78510, Thermo Fisher). Las muestras fueron centrifugadas a 14,500 G por 10 min a 4 C° y la concentración de proteínas del sobrenadante fue determinada mediante el Kit de análisis de proteínas BCA (23227, Thermo Scientific, Thermo Fisher, USA). Posteriormente, se cargaron 50 µg de extracto de proteínas, estas últimas, las cuales se separaron según su tamaño por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Luego, las proteínas se electrotransferieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) activada con metanol, durante 15 min a 25 V en tampón de transferencia TransBlot (10026938, Bio-Rad). Al finalizar la electrotransferencia, la membrana fue incubada en solución de bloqueo (5% de leche descremada en TBS-Tween-20 1X) durante 1 h a temperatura ambiente y luego con anticuerpo primario a 4 C° durante toda la noche. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios *Anti-PLIN2* (1:1000, MA5-24797, Thermo Fisher Scientific); *Anti-PLIN5* (1:1000; GP31, Progen) y *Anti-Mfn2* (1:1000, ab50838, Abcam). A continuación, la membrana se lavó 3 veces por 10 min y se incubó durante 1 h con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1:5000; 402335, Calbiochem); anti-IgG de cobaya (1:5000; ab6908, Abcam) y anti-IgG de conejo (1:5000; 401315, Calbiochem) respectivamente. Las proteínas de interés se determinaron utilizando la solución quimioluminiscente EZ-ECL (DW1029, Biological Industries), el equipo C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR, USA) y el software Image Studio versión 3.1. Este último se utilizó para la cuantificación de densitometría. GAPDH (1:5000; #MAB374, Sigma) fue utilizado como control de carga.

**Objetivo N°3: Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la función oxidativa mitocondrial en células hepáticas.**

***Oxigrafía con electrodo de Clark***

El consumo de oxígeno se determinó utilizando un oxígrafo con electrodo de Clark (Oxygraph Plus, Hansatech). Las células fueron sembradas en placas de 60 mm a una confluencia entre 50-70%, luego estimuladas con ácido palmítico, ácido oleico o BSA durante 2 y 6 h. Al finalizar el tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con 1 mL de tripsina-EDTA por 3 min a 37°C. Esta reacción se detuvo al agregar 100 µL de suero fetal bovino. Posteriormente, las células se trasladaron a un tubo eppendorf para ser centrifugadas a 200 G por 5 min a T ambiente. Luego, el pellet celular se resuspendió en 100 µL de PBS, el cual fue depositado en la cámara del oxígrafo, junto con 200 µL de PBS, obteniendo un volumen final de 300 µL. Se registró el consumo de oxígeno en forma basal, la respiración no asociada a la síntesis de ATP (Oligomicina 400 µM) y la respiración desacoplada (FCCP 20 µM) durante intervalos de 3 min, a 25°C. Finalmente, se utilizaron las pendientes de las curvas obtenidas en cada medición (intervalo de tiempo) y los resultados se expresaron como promedios de las mediciones normalizadas con respecto al control (células con BSA) y a su vez estandarizadas al contenido proteico de las células, obtenido mediante el Kit de análisis de proteínas BCA (23227, Thermo Scientific, USA).

***Ensayo de luminiscencia con luciferasa***

Los niveles intracelulares de ATP fueron determinados mediante el ensayo de luciferasa con el kit Cell Titer-Glo (TB288, Promega, Madison, WI, USA). Este ensayo se basa en que la enzima luciferasa, utilizando el ATP intracelular cataliza la oxidación de la luciferina, emitiendo con ello luminiscencia. Los hepatocitos fueron sembrados en placas de 96 pocillos a una confluencia entre 70-90%. Después del tratamiento con los ácidos grasos o control (BSA) durante 2 y 6 h, las células se lavaron 2 veces con 50 µL de medio Krebs tibio (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES y 5,6 mM de glucosa) y se dejaron los pocillos con 20 µL de medio Krebs tibio. Luego, se añadieron 20 µL de

reactivo Cell Titer-Glo y se incubó a T ambiente por 2 min en agitación. Después, se trasladó el contenido total (40  $\mu$ L) de células y reactivo a una placa opaca, y se incubó durante 10 min a T ambiente. Finalmente, la medición de luminiscencia se realizó con el luminómetro de placa Synergy 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) Se utilizó Oligomicina 5  $\mu$ g/mL en BSA libre de ácidos grasos por 3 horas como control negativo.

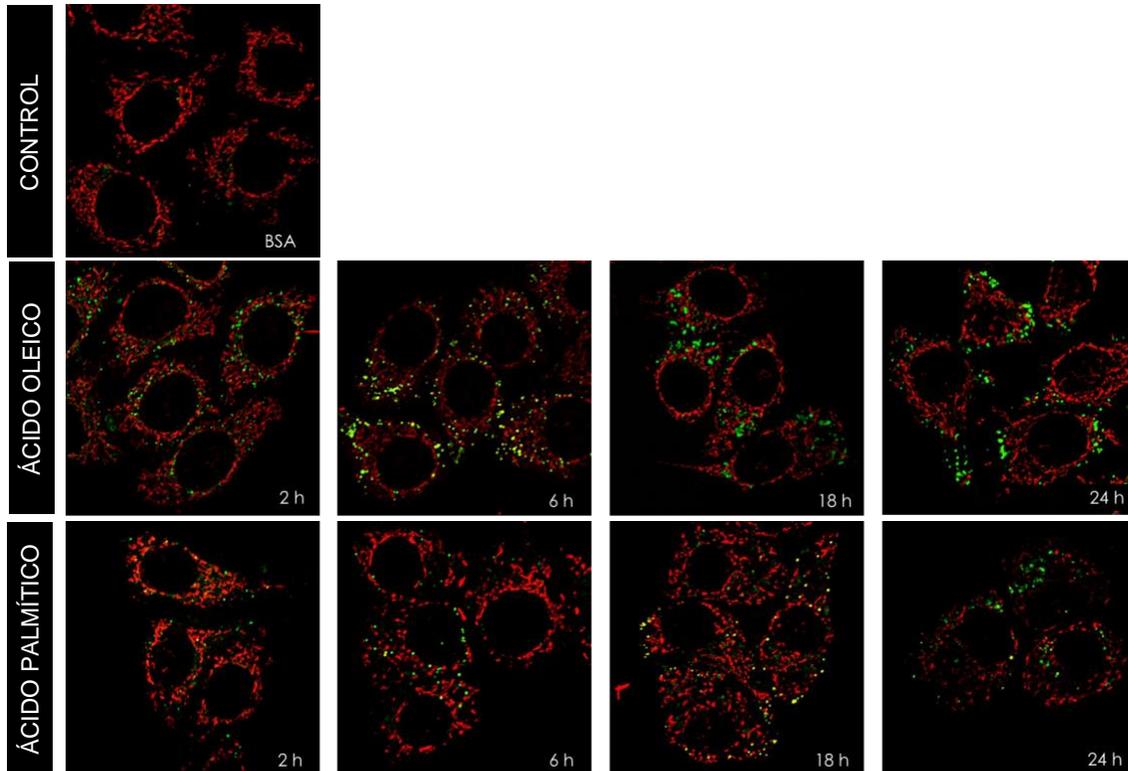
### ***Potencial de membrana mitocondrial por microscopía confocal***

El potencial de membrana fue determinado a través de las imágenes de microscopía confocal obtenidas para el desarrollo del objetivo 1 y parte del objetivo 2, ya que la sonda fluorescente MitoTracker Orange (MTO), es un compuesto catiónico que se acopla a las mitocondrias utilizando su potencial de membrana negativo. Así, el potencial mitocondrial se definió como la intensidad de fluorescencia de MTO. Las imágenes fueron analizadas con el plug-in *Analyze Particles* del software ImageJ, NIH. Para el análisis del potencial mitocondrial de las LDs asociadas y no asociadas a las mitocondrias, se realizó la construcción de un *compartimento* compuesto por 10 planos z de los sitios donde las mitocondrias colocalizan con las LDs. Luego se cuantificó la fluorescencia mitocondrial del compartimento y la fluorescencia excluida del *compartimento* o zona donde no hay colocalización. Las intersecciones de las imágenes se obtuvieron utilizando el comando *Image Calculator* de ImageJ, NIH (operador "AND").

## RESULTADOS

### **Objetivo N°1: Determinar el efecto del tratamiento del AG saturado palmitato o del AG insaturado oleato sobre la morfología de la LD en células hepáticas.**

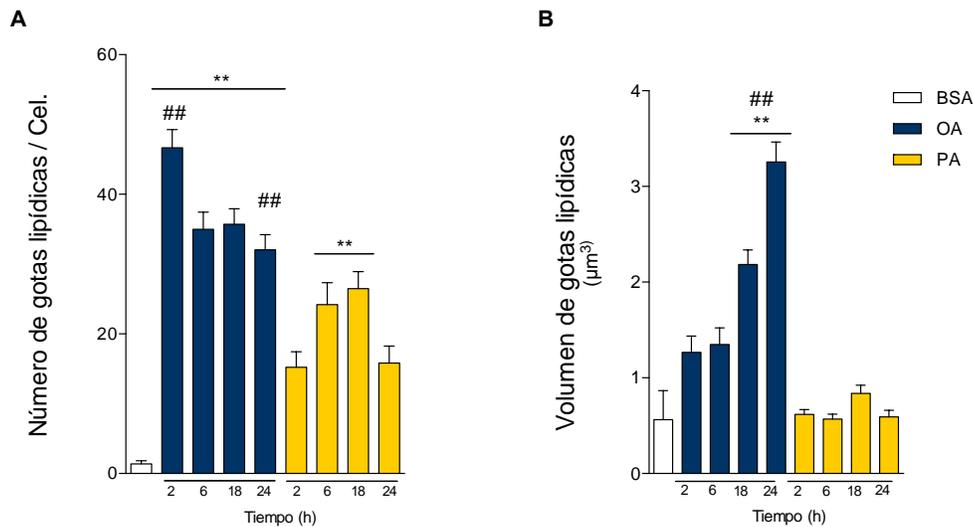
Para visualizar la morfología de las LDs, se utilizó la sonda fluorescente verde Bodipy 493/503 y para describir la morfología de la red mitocondrial la sonda fluorescente MitoTracker Orange. La **Figura 1** corresponde a las imágenes representativas obtenidas mediante una reconstrucción tridimensional (3D) usando microscopía confocal, donde se observan en verde la presencia de LDs y en rojo las mitocondrias luego de la incubación con 200  $\mu$ M de OA o 200  $\mu$ M de PA conjugado a BSA libre de AG a las 2, 6, 18 y 24 h. Como se esperaba, en ambos tratamientos hubo un aumento del número de LDs en comparación con el control. Sin embargo, la estimulación con OA incrementó el tamaño de éstas de manera tiempo dependiente (**Fig. 1 y 2**). En cuanto a la morfología mitocondrial con OA se observaron mitocondrias más alargadas mientras que a las 24 h de tratamiento con PA las mitocondrias presentaron un tamaño menor (**Fig. 1 y 3**).



**Figura 1.** Imágenes de Microscopía Confocal de hepatocitos luego de 2, 6, 18 y 24 h de tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de ácido oleico o palmítico. Las gotas lipídicas y las mitocondrias fueron incubadas con las sondas fluorescentes Bodipy 493/503 (verde) y MitoTracker Orange, respectivamente. Escala gráfica de 10  $\mu\text{m}$ . Imagen representativa de N = 6–20 células analizadas a partir de 3 experimentos independientes. BSA, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos.

La **Figura 2A** muestra que el número promedio de LDs por célula luego de la sobrecarga de OA varió entre 30 a 48 siendo significativamente mayor en todos los tiempos respecto al control-BSA ( $P < 0.01$ ). Más aún, a las 2 h hubo una cantidad de LDs 3 veces mayor que con PA y a las 24 h de  $\sim 1.9$  veces más comparado con PA 24 h ( $P < 0.01$ ). En cambio, el número de LDs con PA fue entre 14 y 26 gotas. Este último parámetro, sólo aumentó de manera significativa a las 6 y 18 h y luego a las 24 h disminuyó a valores similares al control. Respecto al tamaño de las LDs (**Fig. 2B**), OA promovió un crecimiento gradual de gotas con volúmenes entre 1.3 a 3.1  $\mu\text{m}^3$ . En particular, durante los tiempos más prologados OA determinó la aparición significativa de LDs de mayor tamaño: 3.5 y 5 veces

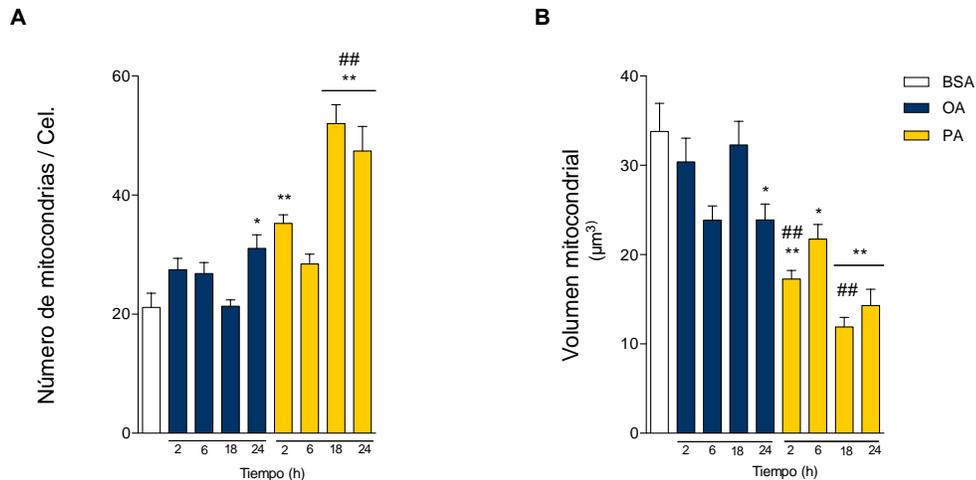
más que el control a las 18 y 24 h, respectivamente. Cuando se comparó el volumen de las gotas observadas frente al tratamiento con OA versus el tratamiento con PA; las gotas fueron 2.3 y 6 veces más grandes en los tiempos 18 y 24 ( $P < 0.01$ ). Con PA las LDs no aumentaron su tamaño en función del tiempo de exposición, en efecto, mostraron una variación similar al control, con valores entre  $0.5$  a  $0.9 \mu\text{m}^3$ .



**Figura 2. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la morfología de la gota lipídica.** (A) Cuantificación del número de LDs por célula y (B) volumen individual de LDs luego del tratamiento por 2, 6, 18 y 24 h de OA o PA en células HepG2. Datos expresados como media  $\pm$  EEM;  $N = 6-20$  células analizadas a partir de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$  vs BSA, #  $p < 0.05$  vs OA o PA, ##  $p < 0.01$  vs OA o PA; ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. BSA, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos; OA, ácido oleico; PA, ácido palmítico.

Adicionalmente, se realizó el análisis de la morfología mitocondrial, observándose que desde las 2 h de tratamiento con PA hubo un incremento en el número y disminución del volumen de las mitocondrias (**Fig. 3A, B**), sugiriendo el desarrollo del proceso de fisión mitocondrial. Así, la incubación por 24 h con este AG duplicó el número de mitocondrias mientras que su volumen disminuyó a la mitad en comparación al control ( $P < 0.01$ ). En cambio, la sobrecarga con OA no exhibió diferencias significativas sobre la morfología mitocondrial, excepto a las 24 h ( $P < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que luego del tratamiento con PA, las LDs presentan menor número y tamaño mientras que, OA promueve un mayor

número de gotas las cuales, con el transcurso del tiempo se fusionan entre sí y aumentan su volumen. Por otra parte, PA desde tiempos tempranos (2 h) compromete la morfología mitocondrial, en otras palabras, PA gatilla el proceso de fragmentación más rápido comparado con OA.

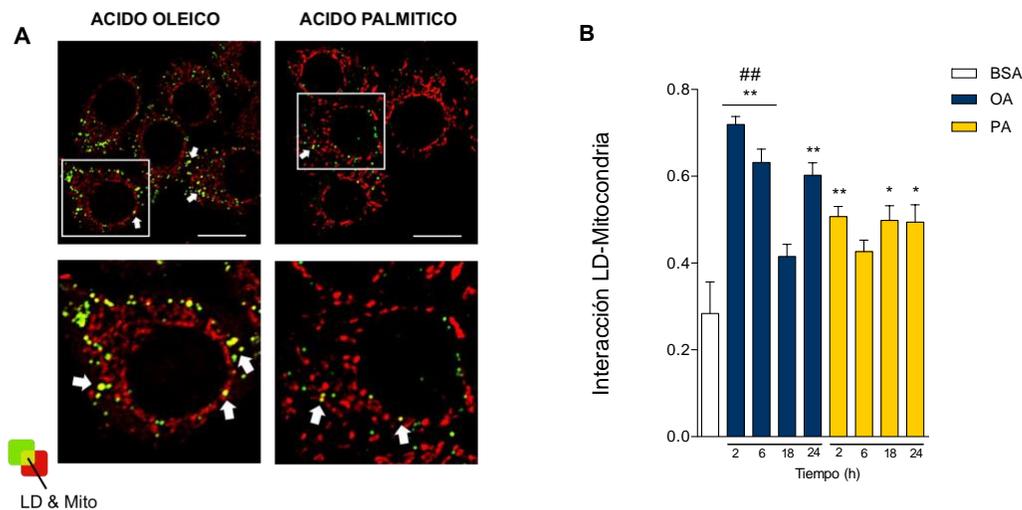


**Figura 3. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la morfología mitocondrial.** (A) Cuantificación del número mitocondrial por célula y (B) volumen individual de mitocondrias luego del tratamiento por 2, 6, 18 y 24 h de OA o PA en células HepG2. Datos expresados como media  $\pm$  EEM; N = 6–20 células analizadas a partir de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0,01$  vs BSA, #  $p < 0,05$  vs OA o PA, ##  $p < 0,01$  vs OA o PA; ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. BSA, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos; OA, ácido oleico; PA, ácido palmítico.

**Objetivo N°2: Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la interacción física de la LD con la mitocondria y nivel de las proteínas PLIN2, PLIN5 y Mfn2 en células hepáticas.**

Luego de describir la morfología de las LDs y de las mitocondrias en las células HepG2 expuestas a OA y PA, se investigó si estas diferencias pueden estar asociadas a la interacción física entre los dos organelos. Así, la colocalización LD-mitocondria se visualizó por medio de imágenes obtenidas por microscopía confocal, observándose a las 6 h de incubación con OA una mayor presencia de regiones de color en amarillo, producto de la

colocalización de los marcadores fluorescentes verde con el rojo, por tanto, sugiriendo una mayor interacción LD-Mitocondria (**Fig. 4A**). Las imágenes se analizaron mediante el coeficiente de Manders, que mide la fracción de co-compartimentalización entre dos canales fluorescentes; en este caso particular de la fracción de LDs que colocalizan con mitocondrias, observándose que tanto en el tratamiento con OA como con PA, hubo un aumento significativo en la interacción física LD-mitocondria en relación al control (**Fig. 4B**). Durante las primeras 6 horas con OA el contacto no sólo aumentó más de 2 veces al comparar con BSA, sino también fue un 45% más que con la sobrecarga de PA a los mismos tiempos ( $P < 0,01$ ). Asimismo con OA, un ~60-75% de las LDs a las 2 y 6 h mantuvieron proximidad con la red mitocondrial; relación que luego disminuyó con el tiempo. La exposición con PA, en cambio, consiguió que el ~50% de las LDs colocalizara con las mitocondrias de manera relativamente estable con el transcurso de las horas.

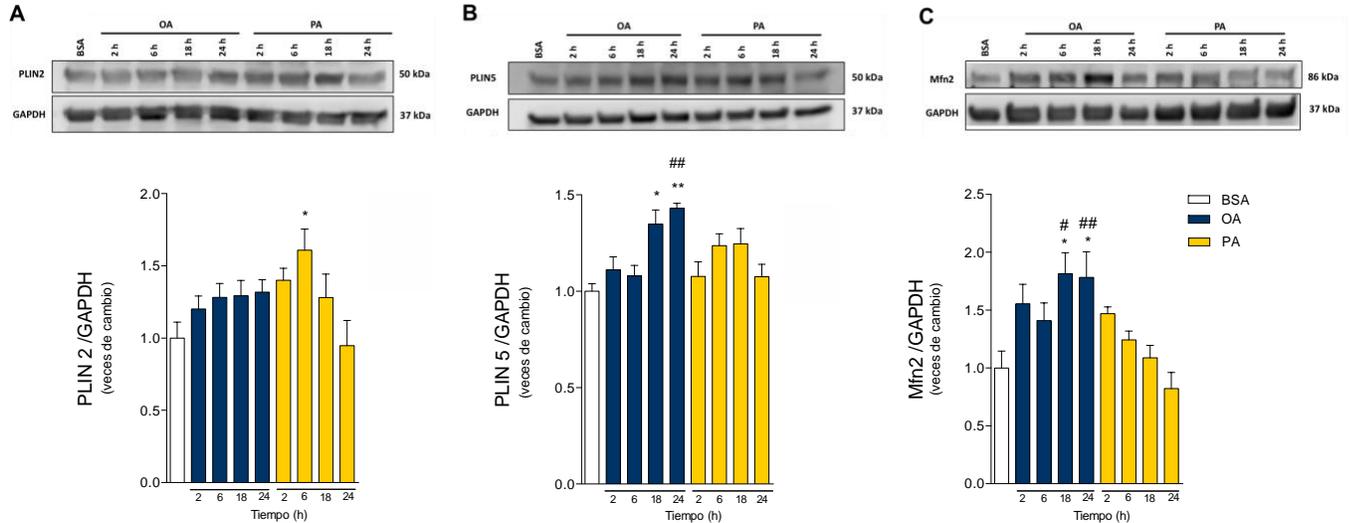


**Figura 4. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la interacción física entre la gota lipídica y mitocondria en células HepG2.** (A) Imágenes fusionadas de Microscopía Confocal a las 6 h de tratamiento con OA o PA muestran las áreas de colocalización entre LDs y mitocondrias en amarillo. (B) La colocalización LD-mitocondria luego de un tratamiento de 2, 6, 18 y 24 h con oleato o palmitato fue analizada con el coeficiente de Manders. Escala gráfica de 10  $\mu$ m. Datos expresados como media  $\pm$  EEM; N = 6–20 células analizadas a partir de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0,01$  vs BSA, #  $p < 0,05$  vs OA o PA, ##  $p < 0,01$  vs OA o PA;

ANOVA de una vía con post hoc de Tukey. BSA, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos; OA, ácido oleico; PA, ácido palmítico.

Como se mencionó anteriormente, las Perilipinas (PLIN) corresponden a las principales proteínas estructurales de la gota, de las cuales PLIN2 y PLIN5 se expresan en el tejido hepático. Se ha observado que PLIN5 puede aumentar el contacto LD-mitocondria y con ello regular la oxidación de AGs. Por otro lado, Mitofusina-2 (Mfn2) es una proteína presente en la membrana externa de las mitocondrias y recientemente se ha reportado que al unirse a PLIN1 facilita la interacción entre mitocondrias y las LDs en el tejido adiposo (26).

La abundancia relativa de PLIN2, PLIN5 y Mfn2 luego del tratamiento con OA o PA, se evaluó por inmunoblot. En la **Figura 5A** se puede observar que el tratamiento de PA incrementó los niveles de PLIN2 en los tiempos iniciales, aumentando a las 6 h 1,6 veces respecto al control ( $P < 0,05$ ). Con OA, los niveles de esta proteína tendieron a aumentar gradualmente en función del tiempo, sin embargo, estas observaciones no presentan significancia estadística. Respecto a PLIN5 (**Fig. 5B**), los niveles relativos de esta proteína fueron mayores en los tiempos más prologados de exposición a OA, aumentando 1,3 y 1,4 veces a las 18 y 24 h respectivamente. Más aún, la concentración de PLIN5 a las 24 h con OA fue de un ~30% más que con la incubación de PA a igual hora ( $P < 0,01$ ). Por otro lado, el tratamiento con PA no logró cambios significativos en los niveles de PLIN5. La **Figura 5C** muestra que OA incrementó la presencia de Mfn2 alrededor de 1,8 veces a las 18 y 24 h en comparación al control ( $P < 0,05$ ). En cambio, los niveles de Mfn2 luego de la sobrecarga de PA tendieron a disminuir a mayor tiempo de exposición con el AG. Estos resultados sugieren que los distintos AGs promueven una interacción física diferente y que OA favorece un mayor contacto LD-mitocondria el cual puede estar mediado por el incremento en la expresión de la proteínas PLIN5 y Mfn2.



**Figura 5. Efecto del tratamiento del ácido oleico y palmítico sobre el nivel de las proteínas Perilipina 2 y Perilipina 5 de la gota lipídica y Mitofusina-2 de la membrana mitocondrial.** (A,B) Las proteínas asociadas a la interacción LD-mitocondria PLIN2 y PLIN5 fueron analizadas por Western blot luego del tratamiento con los ácidos grasos. (C) Western blot y su cuantificación para Mfn2 luego de una sobrecarga con ácidos grasos durante 2, 6, 18 y 24 h en la línea celular HepG2. Datos expresados como media  $\pm$  EEM; N = 7; N = 4; N = 4 respectivamente. \* $p < 0,05$  vs BSA, \*\*  $p < 0,01$  vs BSA, #  $p < 0,05$  vs OA o PA, ##  $p < 0,01$  vs OA o PA; ANOVA de una vía con post hoc de Tukey.

**Objetivo N°3: Determinar el efecto del tratamiento con el AG saturado palmitato o el AG insaturado oleato sobre la función oxidativa mitocondrial en células hepáticas.**

Se ha descrito el rol central de la mitocondria en el metabolismo celular y su disfunción ha sido asociada a la patogénesis de NAFLD. Por tanto, se analizó la bioenergética mitocondrial luego de la sobrecarga con ambos AGs a través del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) por microscopía confocal, del consumo de oxígeno por oxígrafía de Clark y de los niveles de ATP mediante el ensayo de luminiscencia con luciferasa.

El potencial mitocondrial se midió por medio de microscopía confocal y fue definido como la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda MitoTracker Orange, fluoróforo que

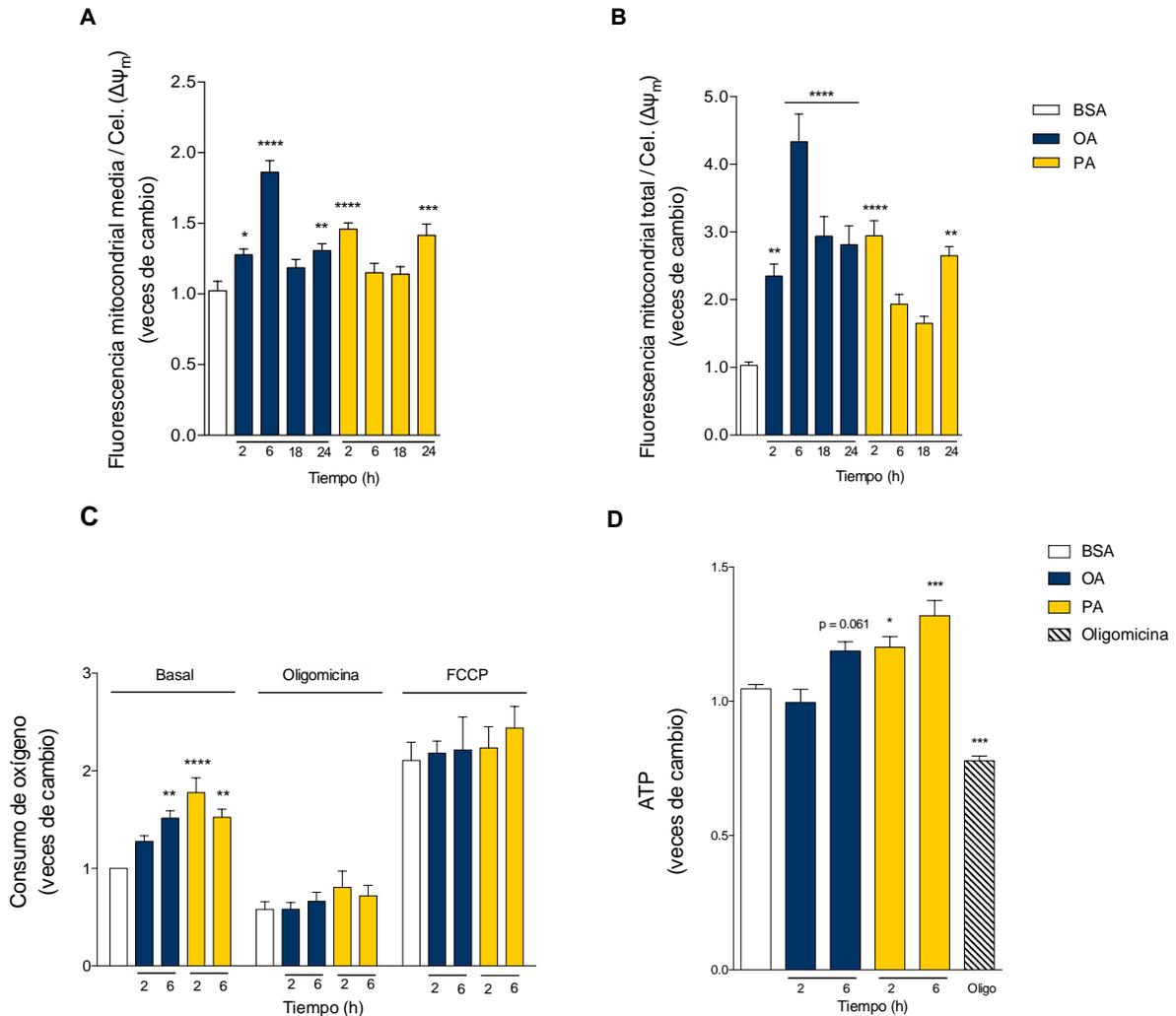
marca mitocondrias de forma dependiente a su potencial de membrana. Utilizando esta estrategia, se observó un incremento del  $\Delta\psi_m$  medio y total (**Fig. 6A,B**) con ambos tratamientos de AGs, donde a las 6 h con OA alcanzó su punto máximo para luego a las 18 y 24 h descender. Con PA, tanto a las 2 como a las 24 h aumentó el  $\Delta\psi_m$  a niveles similares.

Respecto al consumo de oxígeno, la **Figura 6C** muestra la respiración basal, no asociada a ATP (Oligomicina 400  $\mu\text{M}$ ) y la respiración desacoplada (FCCP 20  $\mu\text{M}$ ) de las células HepG2 de acuerdo con el tratamiento control con BSA y a la exposición de 2 y 6 h con OA o PA. Se puede observar que los hepatocitos tratados con PA presentaron un incremento temprano del consumo de oxígeno basal, ya que a las 2 y 6 h la respiración aumentó 1,7 y 1,5 veces, respectivamente. En cambio, a las 2 h con OA no hubo un aumento significativo en la velocidad de consumo de oxígeno sino hasta las 6 h, donde el consumo incrementó un 50%, al igual que la exposición de 6 h con PA ( $P < 0.01$ ). Por otro lado, no hubo cambios en la respiración no asociada a la producción de ATP, ni en la respiración máxima.

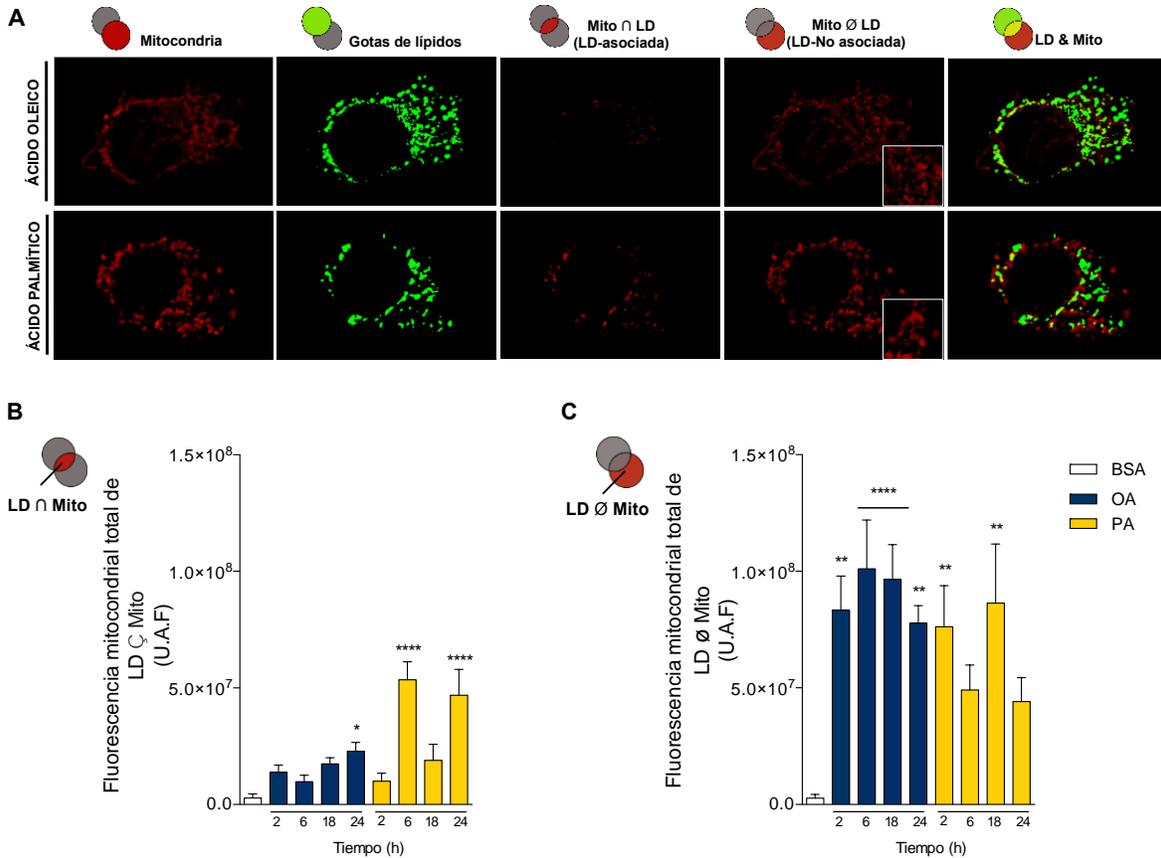
La **Figura 6D** describe la cuantificación de los niveles intracelulares de ATP luego del tratamiento con BSA como vehículo, OA o PA, observándose que los hepatocitos expuestos a PA en el tiempo de 2 y 6 h aumentaron en un 20 y 30% el contenido de ATP respecto al control ( $P < 0.05$  y  $P < 0.001$  respectivamente). Los niveles de ATP luego de la sobrecarga con OA no incrementaron a las 2 h, sin embargo, a las 6 h se observó un aumento no significativo del 19% ( $P = 0,061$ ). Estos incrementos diferenciales conforme al tipo de AG presentan similar temporalidad a los observados con el consumo de oxígeno. Los resultados sugieren que luego del tratamiento con PA las LDs son metabolizadas tempranamente en comparación con aquellas a partir de OA, incrementando la función oxidativa mitocondrial de las células HepG2 desde las 2 h.

En relación a las mitocondrias, recientemente se han identificado 2 subtipos: las mitocondrias asociadas a las LDs (PDM) que promueven el almacenamiento de lípidos y las mitocondrias citoplasmáticas (CM) que favorecen a la oxidación de AGs (22). Por tanto, se quiso investigar

por medio del potencial mitocondrial si los distintos tratamientos de AGs podrían afectar diferencialmente a las subpoblaciones de mitocondrias presentes en los hepatocitos. Para ello, se construyó a partir de las imágenes de microscopía confocal un *compartimento* que representa los sitios donde colocalizan las LDs y las mitocondrias. Para determinar cada  $\Delta\psi_m$  se cuantificó la fluorescencia emitida por la sonda MitoTracker Orange de las mitocondrias que conforman el *compartimento* (PDM) y luego de aquellas excluidas del *compartimento* (CM) (**Fig. 7A**). Se puede observar en las gráficas (**Fig. 7B-C**) que el tratamiento con PA incrementó de manera robusta el  $\Delta\psi_m$  de ambas subpoblaciones: a las 6 y 24 h en las PDM, mientras que en las mitocondrias no asociadas aumentó a las 2 y 18 h. De manera interesante, después de la exposición con OA las mitocondrias asociadas a las gotas no exhibieron cambios en su potencial sino hasta las 24 h con un aumento moderado pero significativo ( $P < 0.05$ ). A su vez, las CM elevaron más de 3 veces su  $\Delta\psi_m$  en comparación con las PDM. Estos datos sugieren que luego de la exposición con PA los AGs son oxidados en ambos subtipos mitocondriales, en cambio, con OA la actividad oxidativa se realiza principalmente en aquellas mitocondrias no asociadas a la gota.



**Figura 6. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre la función oxidativa mitocondrial.** (A, B) Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) medio y total luego del tratamiento con OA o PA a las 2, 6, 18 y 24 h. N = 6–20 células analizadas a partir de 3 experimentos independientes. (C) Consumo de oxígeno luego de 2 y 6 h de tratamiento con los AG. Respiración basal, no asociada a la síntesis de ATP (Oligomycin, 400  $\mu$ M) y desacoplada (FCCP, 20  $\mu$ M). N = 6-9 experimentos independientes. (D) Niveles de ATP intracelular luego de una sobrecarga con OA o PA por 2 y 6 h. Oligomycin (5  $\mu$ g/mL) por 3 horas fue utilizada como control negativo. N = 5 experimentos independientes, en quintuplicado. Datos expresados como media  $\pm$  EEM; \* $p$  < 0.05 vs BSA, \*\* $p$  < 0,01 vs BSA, \*\*\* $p$  < 0,001 vs BSA, \*\*\*\* $p$  < 0,0001 vs BSA; ANOVA de una vía con post hoc de Dunnett. BSA, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos; OA, ácido oleico; PA, ácido palmítico; FCCP, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona; Oligo, oligomycin.



**Figura 7. Efecto del ácido oleico y palmítico sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) de mitocondrias asociadas a LDs y no asociadas a LDs.** (A) Imágenes representativas de M. Confocal de las células HepG2 tratadas con 200  $\mu$ M de OA o PA por 6 h y luego incubadas con Bodipy 493/503 (verde) y MitoTracker Orange (rojo) para marcar las LDs y mitocondrias respectivamente. (B) Análisis cuantitativo del potencial mitocondrial total por célula en las mitocondrias asociadas a LDs y (C) mitocondrias no asociadas a LDs luego del tratamiento con OA o PA durante 2, 6, 18 y 24 h. Datos expresados como media  $\pm$  EEM; \* $p < 0.05$  vs BSA, \*\* $p < 0,01$  vs BSA, \*\*\* $p < 0,001$  vs BSA, \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs BSA; ANOVA de una vía con post hoc de Dunnett. BSA, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos; OA, ácido oleico; PA, ácido palmítico; U.A.F, unidades arbitrarias de fluorescencia.

## DISCUSIÓN

En términos generales, el exceso de AG libres hacia el hígado conduce a NAFLD. Adicionalmente, se ha demostrado que la lipotoxicidad junto con la disfunción mitocondrial son clave en la progresión de la enfermedad hepática. Sin embargo, la dinámica entre las LDs, organelo capaz de almacenar AGs libres en TG y las mitocondrias ha sido poco estudiada en esta patología. Este proyecto investigó los dos AGs con mayor presencia en el organismo y la dieta, mostrando que el AG saturado PA y el monoinsaturado OA, regulan diferencialmente la morfología, interacción física LD-mitocondria y la función oxidativa mitocondrial en las células HepG2.

Para evaluar tanto la morfología como la interacción LD-mitocondria se realizó una tinción vital de ambos organelos, visualizándose a través de microscopia confocal una diferencia morfológica según la exposición del AG. Luego, al cuantificar se observó que el tratamiento con OA obtuvo mayor número de LDs comparado con el control y también con PA a las 2 y 24 h. Resultado similar se encontró en células de ovario de hámster chino (CHO cells), donde el tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de OA e incluso una co-suplementación de 500  $\mu\text{M}$  PA + 200  $\mu\text{M}$  OA por 6 h logró aumentar el almacenamiento de lípidos neutros, no así con PA (31). En células HepG2, oleato duplicó el número de LDs en comparación con palmitato luego de 6 h (32) y también se observó a las 24 h un comportamiento similar (13). Estos datos concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, evidenciando la mayor capacidad de OA en promover el almacenamiento de TGs en los hepatocitos. Si bien se utilizaron las mismas concentraciones de AGs, ¿por qué con el tratamiento de PA no se pudo observar un incremento significativo de LDs en todos los tiempos como en la incubación de OA? Un trabajo en células N2a de neuroblastoma de ratón que utilizó 300  $\mu\text{M}$  de OA y/o PA por 24 h, observó que mientras OA incrementó la formación de TG, PA aumentó la síntesis de diacilglicerol (DAG) y la co-incubación de ambos AG bloquearon la síntesis de DAG inducida por PA (33). Esto nos sugiere que PA se incorpora en menor cuantía a las LDs como

lípidos neutros, favoreciendo la formación de lípidos bioactivos como DAG, los cuales se asocian a RI y lipotoxicidad.

Con relación al volumen de las gotas, éstas aumentaron con OA de manera tiempo dependiente, con valores significativamente mayores en los tiempos de 18 y 24 h al comparar con el control y también con PA. Sin embargo, con PA no hubo cambios significativos en el volumen. Cabe señalar que, mientras el volumen de gotas con OA aumentó, el número de LDs disminuyó a mayor tiempo de exposición con este AG. Esto nos podría indicar que la suplementación con OA favorece la fusión entre las gotas provocando un aumento del tamaño y no así con PA. La literatura ha descrito diversos factores que pueden modificar el tamaño de las LDs, como el tipo de fosfolípidos y la presencia de ciertas proteínas en su superficie. (33). Los fosfolípidos que principalmente se encuentran en la monocapa corresponden a fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE). La presencia de PC y PE pueden determinar la capacidad de coalescencia entre las gotas y por tanto regular su tamaño debido a propiedades biofísicas distintas. Un estudio en cultivo primario de células epiteliales mamarias observó que al cultivar con 100  $\mu\text{M}$  de OA, las LDs presentaron mayor tamaño y concentración del fosfolípido PE mientras que con PA las gotas se visualizaron más pequeñas y la composición de fosfolípidos de la membrana fue principalmente de PC (35).

Sobre la morfología mitocondrial, se sabe que estos organelos son dinámicos y que están en constante fusión y fisión. En nuestro trabajo pudimos observar que PA promueve una fisión temprana de las mitocondrias, al aumentar el número y disminuir su volumen prácticamente desde el inicio de la incubación con este AG. Distinto fue con OA, donde no hubo cambios morfológicos sino hasta las 24 h, protegiendo durante las primeras horas de un desequilibrio en la dinámica mitocondrial. Estos resultados avalan la idea de que los AG saturados e insaturados afectan diferencialmente el equilibrio de fusión-fisión mitocondrial. En donde la alteración de esta dinámica afecta la calidad del organelo y la bioenergética celular (36). En células C2C12, 200  $\mu\text{M}$  de PA indujo la fragmentación mitocondrial la cual se asoció a un incremento en la producción de ROS, alteración en la producción de ATP y

disminución de la captación de glucosa dependiente de insulina (37). Todos los cuales son elementos que promueven una disfunción mitocondrial y que están relacionados con la patogénesis de NAFLD.

Respecto a la interacción física, se observó que en ambos tratamientos con AGs las LDs interactuaron de manera significativa con la red mitocondrial. Con la sobrecarga de OA se observó una mayor colocación LD-mitocondria en ~60% de las gotas, incluso aumentando a 75% a tiempos tempranos, en cambio, con PA solo la mitad de las gotas mantuvo proximidad con las mitocondrias. Este hallazgo señala la existencia de una dinámica diferente entre los dos organelos de acuerdo con el AG que sea suplementado.

Una forma de las LDs para regular la interacción con las mitocondrias, es a través de las proteínas de la familia PLINs. Mediante inmunoblot pudimos notar que OA aumentó significativamente los valores de PLIN5 como Mfn2, sin embargo, la incubación con PA solo logró niveles basales. Como se ha mencionado anteriormente, PLIN5 se expresa en tejidos con un elevado metabolismo de lípidos como el hígado, músculo esquelético y cardíaco (38). En células hepáticas AML12 transfectadas con PLIN5-YFP o PLIN2-YFP y un pulso de 400  $\mu$ M de OA durante la noche, solo PLIN5 indujo un contacto físico LD-mitocondria (25). Además, hepatocitos de ratón con knockout hepático específico de PLIN5 mostraron una menor proximidad LD-mitocondria (39). Por otro lado, ratones PLIN5  $-/-$  alimentados con HFD mostraron un menor almacenamiento de TG hepáticos junto con la presencia de marcadores de inflamación celular y daño hepático. Además, la incubación de OA en hepatocitos primarios PLIN5  $-/-$  mostró un menor número y tamaño de LDs comparados con el control (40). Estos resultados están en línea con los nuestros donde OA se asoció a mayor expresión proteica de PLIN5, con mayor interacción LD-mitocondria y también mayor número y tamaño de las LDs. Por otro lado, falta esclarecer si PLIN5 regula la proximidad con las mitocondrias uniéndose directamente al organelo o una proteína de unión. Se ha descrito en la literatura que la proteína Mfn2, además de promover fusión mitocondrial, en tejido adiposo marrón de ratones interactuó específicamente con PLIN1 favoreciendo la

asociación LD-mitocondria. Más aun, la delección específica de Mfn2 logró reducir esta interacción (26). Aquí, en este trabajo, pudimos observar que al incubarse con OA hubo un incremento tanto de Mfn2 como de PLIN5, sugiriendo que estas proteínas en presencia del AG monoinsaturado pueden estar involucradas en la interacción física LD-mitocondria en los hepatocitos. En cambio, PA solamente logró un aumento de los niveles de PLIN2 y no de MFN2, por tanto se desconoce si posee un rol en la interacción LD-mitocondria. Además otros estudios mostraron que la presencia de ROS, incrementó la expresión proteica de PLIN2 en células HepG2 (41) y que PLIN2 promovió la formación de esteatosis y progresión a NASH en ratones (42).

En cuanto a la función oxidativa mitocondrial, observamos que el tratamiento con PA desencadenó una fragmentación mitocondrial más rápida y pronunciada que OA, correspondiente con niveles de consumo de oxígeno, ATP y potencial mitocondrial superiores en ambas subpoblaciones mitocondriales. Esto es concordante con el modelo propuesto por Bendor et al. en donde existen dos subtipos de mitocondrias que pueden trabajar en la misma célula al mismo tiempo, las más pequeñas especializadas en la oxidación de AGs y aquellas más grandes en contacto con LDs especializadas en la esterificación de AGs a TGs para la expansión de las LDs (22,24). De manera que estos datos, respaldan la idea de que los ácidos grasos saturados e insaturados presentan perfiles metabólicos distintos, con un equilibrio fusión/fisión y bioenergética mitocondrial diferente.

Respecto a las limitaciones del estudio, debemos mencionar que éste corresponde a un modelo in vitro, con una línea celular aislada en condiciones controladas. Lo que limita la extrapolación de los resultados al carecer de la complejidad fisiológica que un organismo vivo tiene. Otro aspecto sobre el diseño de investigación, es que se demostró de manera independiente cada uno de los efectos mediados por OA o por PA.

Con relación a la metodología, no fue posible realizar microscopía electrónica, técnica que complementaría la información sobre la interacción LD-mitocondria, como se había propuesto al inicio del proyecto.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados avalan el rol protector de OA frente a la lipotoxicidad hepática inducida por PA. Esto es al demostrar la presencia de dos patrones de interacción LD-mitocondria en respuesta al tratamiento con dos AGs de diferente composición química. De modo que OA favoreció el almacenamiento de lípidos en LDs y a una mayor proximidad LD-mitocondria. Esta mayor interacción física se asoció a LDs “pasivas” o con menor oxidación mitocondrial de AGs, posiblemente protegiendo la integridad de la función mitocondrial. Por otro lado, PA indujo a un leve aumento de LDs, las cuales se comportaron como LDs "activas": asociadas a mitocondrias con mayor consumo de oxígeno, potencial mitocondrial y producción de ATP. Lo que sugiere una sobrecarga inicial de la función mitocondrial.

Por tanto, estos hallazgos señalan la relevancia en la composición de los ácidos grasos y probablemente en la composición de las LDs como elementos reguladores del metabolismo lipídico en los hepatocitos, donde el AG saturado palmitato altera la bioenergética mitocondrial y función hepatocelular, lo que se asocia con la disfunción mitocondrial en NAFLD.

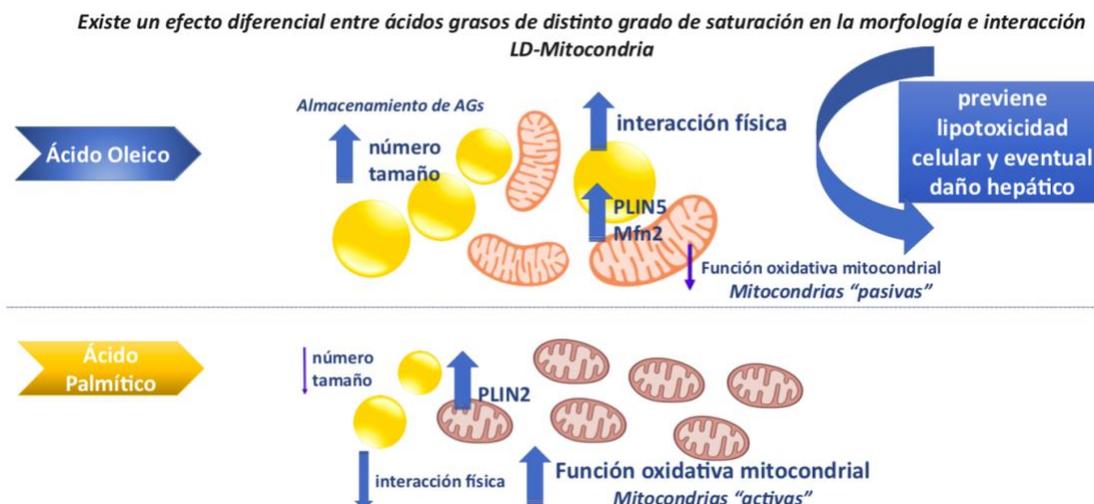


Figura 8. Esquema de los efectos diferenciales de OA o PA en la morfología, interacción LD-mitocondria y función oxidativa mitocondrial.

## REFERENCIAS

1. Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221–31.
2. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038–48.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
4. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2018;13(1):321–50.
5. Walther TC, Farese R V, Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:687–714.
6. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):137–55.
7. Cohen S. Lipid Droplets as Organelles. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;337:83–110.
8. Varghese M, Kimler VA, Ghazi FR, Rathore GK, Perkins GA, Ellisman MH, et al. Adipocyte lipolysis affects Perilipin 5 and cristae organization at the cardiac lipid droplet- mitochondrial interface. *Sci Rep*. 2019;9(1):4734.
9. Farese R V, Walther TC, Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*. 2009;139(5):855–60.
10. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese R V, Jr. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jun;14(6):343–55.
11. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism*. 2016;65(8):1096–108.
12. FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos 91 ESTUDIO FAO ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012.
13. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential

- effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(5):830–40.
14. Chen X, Li L, Liu X, Luo R, Liao G, Li L, et al. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci*. 2018;203:291–304.
  15. Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H. The Effect of Oleic and Palmitic Acid on Induction of Steatosis and Cytotoxicity on Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Physiol Res*. 2015;64:627–36.
  16. Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, et al. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature*. 2017 Jun 24;546(7656):162–7.
  17. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2008;14(2):193–9
  18. Malhi H, Gores GJ. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2008;28(4):360–9.
  19. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015;21(5):739–46.
  20. Cusi K. Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-725.e6.
  21. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2010;1801(3):299–310.
  22. Benador IY, Veliova M, Mahdavian K, Petcherski A, Wikstrom JD, Assali EA, et al. Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab*. 2018;27(4):869-885.e6.
  23. Aon MA, Bhatt N, Cortassa SC. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Front Physiol*. 2014;5:282.
  24. Benador IY, Veliova M, Liesa M, Shirihai OS. Mitochondria Bound to Lipid Droplets:

- Where Mitochondrial Dynamics Regulate Lipid Storage and Utilization. *Cell Metab.* 2019;1959:1–9.
25. Wang H, Sreenivasan U, Sreenevasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2159–68.
  26. Boutant M, Kulkarni SS, Joffraud M, Ratajczak J, Valera-Alberni M, Combe R, et al. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function. *EMBO J.* 2017;36(11):1543–58.
  27. Wang H, Sreenivasan U, Gong D-W, O’Connell KA, Dabkowski ER, Hecker PA, et al. Cardiomyocyte-specific perilipin 5 overexpression leads to myocardial steatosis and modest cardiac dysfunction. *J Lipid Res.* 2013;54(4):953–65.
  28. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O’Connor J-E. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 2007;165(2):106–16.
  29. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;77–93.
  30. Sefried S, Häring H-U, Weigert C, Eckstein SS. Suitability of hepatocyte cell lines HepG2, AML12 and THLE-2 for investigation of insulin signalling and hepatokine gene expression. *Open Biol.* 2018;8(10).
  31. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3077-82.
  32. Mei S, Ni HM, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, Copple BL, Ding WX. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(2):487-98.
  33. Kwon B, Lee HK, Querfurth HW. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(7):1402-13.

34. Thiam AR, Farese RV Jr, Walther TC. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(12):775-786.
35. Cohen BC, Shamay A, Argov-Argaman N. Regulation of lipid droplet size in mammary epithelial cells by remodeling of membrane lipid composition-a potential mechanism. *PLoS One.* 2015;10;10(3):e0121645.
36. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, Abeywardena M, O'Callaghan N, Lionetti L, Luscombe-Marsh N. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet. *Front Physiol.* 2019;3;10:532.
37. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, Chang CR, Tsai YS. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* 2012;32(2):309-19.
38. Mason RR, Watt MJ. Unraveling the roles of PLIN5: linking cell biology to physiology. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(3):144-52.
39. Keenan SN, Meex RC, Lo JCY, Ryan A, Nie S, Montgomery MK, Watt MJ. Perilipin 5 Deletion in Hepatocytes Remodels Lipid Metabolism and Causes Hepatic Insulin Resistance in Mice. *Diabetes.* 2019;68(3):543-555.
40. Wang C, Zhao Y, Gao X, Li L, Yuan Y, Liu F, Zhang L, Wu J, Hu P, Zhang X, Gu Y, Xu Y, Wang Z, Li Z, Zhang H, Ye J. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology.* 2015;61(3):870-82.
41. Jin Y, Tan Y, Chen L, Liu Y, Ren Z. Reactive Oxygen Species Induces Lipid Droplet Accumulation in HepG2 Cells by Increasing Perilipin 2 Expression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3445.
42. Orlicky DJ, Libby AE, Bales ES, McMahan RH, Monks J, La Rosa FG, McManaman JL. Perilipin-2 promotes obesity and progressive fatty liver disease in mice through mechanistically distinct hepatocyte and extra-hepatocyte actions. *J Physiol.* 2019;597(6):1565-1584.