

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Dpto. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLOGÍA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

*Papel de las fosfolipasas A_2 en la liberación
de ácido araquidónico y la expresión de
ciclooxigenasa-2 en macrófagos de ratón*

TESIS DOCTORAL

Violeta Ruipérez Prádanos

Valladolid, 2008

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Dpto. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLOGÍA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

*Papel de las fosfolipasas A_2 en la liberación
de ácido araquidónico y la expresión de
ciclooxigenasa-2 en macrófagos de ratón*

Memoria presentada por Violeta Ruipérez Prádanos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid, bajo la dirección del Dr. Jesús Balsinde y la Dra. María A. Balboa en el Instituto de Biología y Genética Molecular (CSIC-UVA)

Valladolid, 2008



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Y GENÉTICA MOLECULAR

D. Jesús Balsinde Rodríguez, doctor en Ciencias Químicas y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y D^a. M^a Ángeles Balboa García, doctora en Biología y Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, certifican:

Que D^a. Violeta Ruipérez Prádanos, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección los estudios y experimentos necesarios para la elaboración de la memoria titulada:

Papel de las fosfolipasas A₂ en la liberación de ácido araquidónico y la expresión de ciclooxigenasa-2 en macrófagos de ratón

Que presenta para la obtención del Grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda firman la presente en Valladolid, a 6 de octubre de 2008.

Fdo: Jesús Balsinde Rodríguez

M^a Ángeles Balboa García

Mi agradecimiento al Dr. Jesús Balsinde y a la Dra. M^a Ángeles Balboa que con su dirección han hecho posible la realización de este trabajo.

A todos los compañeros de laboratorio y amigos que me han ayudado durante estos años.

A mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana, a los que dedico este trabajo.

1	RESUMEN	1
2	ABREVIATURAS	3
3	INTRODUCCIÓN	7
3.1	INFLAMACIÓN: FOSFOLIPASAS A ₂ Y RESPUESTA INMUNE INNATA	8
3.1.1	<i>Respuesta inmune innata: receptores Toll-like</i>	9
3.1.1.1	Reconocimiento de ligandos y transducción de señales	10
3.2	REACILACIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	12
3.2.1	<i>Acil-CoA sintetasas</i>	13
3.2.2	<i>Aciltransferasas dependientes de CoA</i>	14
3.3	LA FAMILIA DE LAS FOSFOLIPASAS A ₂	15
3.3.1	<i>Clasificación y descripción</i>	15
3.3.1.1	Fosfolipasas secretadas dependientes de Ca ²⁺ (sPLA ₂)	18
3.3.1.2	Fosfolipasas citosólicas dependientes de Ca ²⁺ (cPLA ₂)	20
3.3.1.3	Fosfolipasas citosólicas independientes de Ca ²⁺ (iPLA ₂)	21
3.3.1.4	Acetilhidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH)	22
3.3.1.5	Fosfolipasas A ₂ lisosomales (LPLA ₂)	22
3.3.2	<i>Papel de las PLA₂ en la liberación de ácido araquidónico</i>	23
3.3.2.1	Liberación de ácido araquidónico en condiciones de activación	23
3.3.2.2	Liberación de ácido araquidónico en condiciones basales	24
3.3.2.3	<i>Cross-talk</i> entre fosfolipasas A ₂	25
3.4	PAPELES BIOLÓGICOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	27
3.4.1	<i>Eicosanoides</i>	27
3.4.2	<i>Apoptosis, ciclo celular y proliferación</i>	32
3.4.3	<i>Interacción con proteínas</i>	33
3.4.4	<i>Regulación de la translocación de enzimas</i>	34
4	OBJETIVOS	36
5	MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1	MATERIAL BIOLÓGICO	39
5.1.1	<i>Células</i>	39
5.1.2	<i>Anticuerpos</i>	39
5.1.3	<i>Plásmidos</i>	39

5.2	MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO.....	40
5.2.1	<i>Tampones y soluciones usadas</i>	40
5.2.2	<i>Inhibidores</i>	41
5.2.3	<i>Agonistas de receptores Toll-like</i>	43
5.2.4	<i>Oligonucleótidos y RNA de interferencia</i>	43
5.3	CULTIVO CELULAR.....	44
5.3.1	<i>Medios de cultivo</i>	44
5.3.2	<i>Ensayos de estimulación</i>	44
5.4	DNA Y RNA	45
5.4.1	<i>Transfección</i>	45
5.4.1.1	Transfección de siRNA y oligonucleótidos antisentido.....	45
5.4.1.2	Transfección de plásmidos y producción de estables expresando GFP-GV	45
5.4.2	<i>Extracción de RNA y síntesis del cDNA</i>	45
5.4.2.1	Método del Trizol	45
5.4.2.2	<i>Kit de extracción</i>	46
5.4.2.3	Síntesis de cDNA.....	46
5.4.3	<i>Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR y RT-PCR)</i>	46
5.4.3.1	PCR y electroforesis en geles de agarosa.....	46
5.4.3.2	RT-PCR.....	47
5.5	PROTEÍNAS.....	48
5.5.1	<i>Preparación de fracciones celulares</i>	48
5.5.2	<i>Cuantificación de proteínas</i>	48
5.5.3	<i>Electroforesis en geles de acrilamida e inmunodetección</i>	48
5.6	OTRAS TÉCNICAS	49
5.6.1	<i>Medida de la liberación de ácidos grasos</i>	49
5.6.2	<i>Ensayos de actividad</i>	49
5.6.2.1	Preparación de sustratos	49
5.6.2.2	Actividad cPLA ₂ , sPLA ₂ e iPLA ₂	49
5.6.3	<i>Análisis de factores de transcripción</i>	50

6	RESULTADOS	51
6.1	FOSFOLIPASAS A_2 EN MACRÓFAGOS DE RATÓN.....	52
6.1.1	<i>Expresión de fosfolipasas A_2 en P388D₁ y RAW 264.7.....</i>	52
6.1.2	<i>Validación de los inhibidores de fosfolipasas</i>	53
6.1.2.1	Pirrofenona	53
6.1.2.2	Escalaradial	54
6.1.2.3	BEL.....	56
6.2	PERFIL FARMACÓLOGICO EN MACRÓFAGOS.....	57
6.2.1	<i>Papel de las fosfolipasas A_2 en la liberación de ácido araquidónico</i>	57
6.2.1.1	Liberación de ácido araquidónico	57
6.2.1.2	Efecto de la inhibición de las fosfolipasas A_2 sobre la liberación de ácido araquidónico	59
6.2.1.3	Sobreexpresión de sPLA ₂ -V.....	63
6.2.2	<i>Inducción de COX-2 a través de receptores Toll-like.....</i>	66
6.3	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2.....	68
6.3.1	<i>Efecto de la inhibición de la sPLA₂-V por siRNA.....</i>	70
6.3.2	<i>Expresión de COX-2 en macrófagos peritoneales de ratón.....</i>	73
6.3.3	<i>Efecto del escalaradial sobre la liberación de ácidos grasos en P388D₁ estimuladas con LPS.....</i>	74
6.3.4	<i>Identificación del metabolito derivado de la sPLA₂-V implicado en la producción de COX-2.....</i>	75
6.3.4.1	Ácidos grasos y metabolitos derivados de ciclooxigenasas o lipoxigenasas	75
6.3.4.2	Recuperación de la expresión de COX-2.....	76
6.3.4.3	Factores de transcripción implicados en la expresión de COX-2 dependiente de sPLA ₂	81
6.4	FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y CPLA ₂ α DURANTE LA ACTIVACIÓN A TRAVÉS DE TLRs.....	86
6.4.1	<i>OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE FOSFORILACIÓN.....</i>	86
6.4.1.1	Fosforilación de ERK1/2 con agonistas de TLRs	87
6.4.2	<i>Papel de la sPLA₂-V en la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α.....</i>	87
6.4.3	<i>Fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α en células P388D₁ estimuladas a través de TRLA.....</i>	90

7	DISCUSIÓN	92
7.1	PERFIL FARMACOLÓGICO EN MACRÓFAGOS.....	93
7.2	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2.....	96
7.3	REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD CPLA ₂ α POR FOSFORILACIÓN.....	101
8	CONCLUSIONES.....	104
9	BIBLIOGRAFÍA.....	106

La activación de macrófagos de ratón a través de receptores Toll-like (TLRs) produce la liberación de ácido araquidónico mediada por la activación de las fosfolipasas A_2 . Durante este proceso se induce la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) dando lugar a la generación de eicosanoides.

En este trabajo se utilizan 10 agonistas de receptores Toll-like para definir el papel de las fosfolipasas A_2 en este proceso. El tratamiento de P388D₁ y RAW 264.7 con pirrofenona, inhibidor selectivo de la $cPLA_2\alpha$ y escalaradial, inhibidor de la $sPLA_2$, muestran que la contribución de estas fosfolipasas a la liberación de ácido araquidónico depende del TLR a través del que se está produciendo la activación. No se observan cambios en la liberación de ácido araquidónico cuando se utiliza BEL, inhibidor de la $iPLA_2$.

La activación de macrófagos por LPS bacteriano a través de TLR4 provoca una fase retardada de biosíntesis de prostaglandinas que parece estar mediada completamente por la COX-2. En trabajos previos, se comprobó que la fosfolipasa A_2 secretada de grupo V catalíticamente activa era necesaria para la inducción de COX-2, pero la naturaleza del metabolito de la $sPLA_2$ -V implicado no estaba definida. En este estudio, se identifica la lisofosfatidilcolina (lisoPC) como el mediador de la $sPLA_2$ -V implicado en la inducción de COX-2 en macrófagos estimulados con LPS. La inhibición de la $sPLA_2$ -V con RNA de interferencia o con escalaradial bloquea la expresión de COX-2 inducida por LPS, y esta inhibición se recupera incubando las células con un análogo no hidrolizable de lisoPC. Además, la inhibición de la $sPLA_2$ -V con escalaradial impide la activación del factor de transcripción c-Rel, y esta inhibición se recupera selectivamente por el análogo de lisoPC.

Adicionalmente, el escalaradial evita la fosforilación de ERK1/2 y $cPLA_2\alpha$ en respuesta a la activación a través de TLRs, mecanismo que depende del receptor a través del que se produce esta activación, lo que indica un mecanismo de regulación de la $sPLA_2$ -V y $cPLA_2\alpha$ dependiente de TLR.

Estos resultados sugieren un modelo en el que la $cPLA_2\alpha$ es la principal responsable de la liberación de ácido araquidónico en macrófagos. La $sPLA_2$ -V contribuye amplificando este proceso mediante la hidrólisis de los fosfolípidos y la regulación de la fosforilación secuencial de ERK1/2 y $cPLA_2\alpha$. Por otro lado, la $sPLA_2$ -V tras estimulación con LPS, participa en la generación de eicosanoides mediante la regulación de COX-2. En este modelo, la $sPLA_2$ -V hidroliza los fosfolípidos generando lisoPC, la cual regula la expresión de COX-2 por un mecanismo que implica la actividad transcripcional de c-Rel.

AA	Ácido araquidónico
Act. esp.	Actividad específica
AAS	Ácido acetilsalicílico
ATP	Adenosina trifosfato
Baic	Baicaleína
BEL	Bromoenuol lactona
BSA	Albúmina de suero bovino
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1 propanosulfónico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
cPLA₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica dependiente de calcio
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
Ebs	Ébselen
ECL	Sistema de aumento de quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EGFP o GFP	Proteína verde fluorescente
ET-18-OCH₃	1-O-octadecil-2-O-metil- <i>rac</i> -glicero-3-fosforilcolina (metil-lisoPC)
FA	Ácido graso
FBS	Suero fetal bovino
H₂O DEPC	Agua tratada con dietilpirocarbonato

HEPES	Ácido (N-[2-hidroxiethyl]piperacina-N'-[2-etanosulfónico])
HETE	Ácido hidroxieicosatetranoico
Indo	Indometacina
iPLA₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica independiente de calcio
LDs	Cuerpos lipídicos
LisoPC	Lisofosfatidilcolina
LisoPE	Lisofosfatidiletanolamina
LisoPL	Lisofosfolípido
LO	Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
MAFP	Metil araquidonil fluorofosfonato
Mano	Manoalide
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
OA	Ácido oleico
PAF	Factor activador de plaquetas
PAF-AH	Acetilhidrolasas del factor activador de plaquetas
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Prostaglandina
Pir	Pirrofenona
PL	Fosfolípido
PLA₂	Fosfolipasas A ₂
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Poli IC	Ácido poliinosínico-policitidílico

PS	Fosfatidilserina
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptasa reversa
Scal	Escalaradial
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico
siRNA	RNA de interferencia
sPLA₂	Fosfolipasa A ₂ secretada
TAE	Tampón para electroforesis en geles de agarosa
TAG	Triacilglicerol
TEMED	N, N, N,'N,' Tetrametiletilendiamina
TLC	Cromatografía en capa fina
TLR	Receptor Toll-like

3 INTRODUCCIÓN

3.1 INFLAMACIÓN: FOSFOLIPASAS A₂ Y RESPUESTA INMUNE INNATA

La inflamación es la respuesta del organismo a un daño o agresión externa que se desencadena para controlar el daño y comenzar los procesos de reparación. Los síntomas característicos de la inflamación (calor, rubor, dolor, hinchazón y pérdida de función), se producen debido a mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico denominados eicosanoides.

El ácido araquidónico (AA) se genera por acción de las fosfolipasas A₂ (PLA₂) sobre los fosfolípidos de la membrana celular (figura 1). Además, estas enzimas pueden liberar otros compuestos que también participan en los procesos inflamatorios.

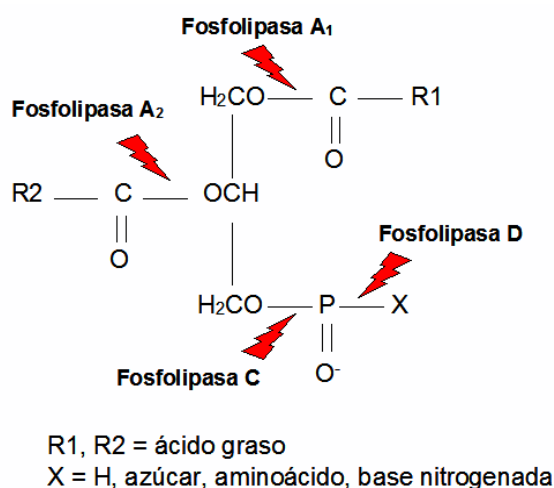


Fig. 1. Sitios de acción de las fosfolipasas en el fosfolípido. Clasificación de las fosfolipasas en función de su sitio de acción en la estructura del fosfolípido.

Las fosfolipasas A₂ participan en el desarrollo de numerosas patologías y juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (McGeer y McGeer, 1999; Balboa *et al.*, 2001, 2002; Sun *et al.*, 2004, 2005), como Alzheimer o Parkinson. Diversos estudios con inhibidores de la actividad PLA₂ indican que la liberación de ácidos grasos por estas enzimas está asociada a desordenes neurológicos, por lo que estos inhibidores podrían ser utilizados como agentes neuroprotectores y antiinflamatorios (Farooqui *et al.*, 2006).

El desarrollo de ratones deficientes en enzimas claves del metabolismo lipídico ha ayudado al esclarecimiento del efecto de la alteración del metabolismo del AA, relacionándolo con enfermedades neurológicas (Bosetti, 2007), por lo que el estudio de su mecanismo de acción supone un avance para la cura de estas enfermedades.

Los macrófagos, componentes del sistema inmune innato y una de las células inflamatorias por excelencia, son un sistema ideal para la identificación de nuevas dianas moleculares en la cascada de producción de eicosanoides, ya que presentan una gran cantidad de AA esterificado en sus membranas y además responden a numerosos estímulos proinflamatorios liberando este ácido graso.

3.1.1 RESPUESTA INMUNE INNATA: RECEPTORES TOLL-LIKE

El reconocimiento de patógenos por células del sistema inmune innato se produce a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), debido a que los patógenos poseen estructuras específicas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). A este tipo de receptores pertenecen los receptores Toll, cuyo papel en la respuesta inmune innata se describió por primera vez en *Drosophila*, y los receptores Toll-like (TLRs), una familia de proteínas en mamíferos estructuralmente relacionadas con los receptores Toll en *Drosophila*.

Los TLRs son receptores transmembrana de clase I (figura 2). Los dominios extracelulares de estos receptores, denominados ectodominios, consisten en bloques de repeticiones de motivos de 24 aminoácidos ricos en leucina (LRR). Poseen una única hélice α transmembrana y un dominio citoplasmático denominado dominio de receptor Toll/interleuquina-1 (TIR), con el que interaccionan las proteínas adaptadoras (Gay *et al.*, 2006).

Cada TLR es capaz de distinguir entre los diferentes patógenos, diferenciando entre lo propio y lo ajeno. El TLR4 reconoce LPS procedente de bacterias Gram-negativas principalmente, pero también puede reconocer otros ligandos como proteínas *heat shock* o componentes de la matriz extracelular. El TLR2 reconoce diferentes componentes bacterianos y puede formar dímeros con el TLR1 y el TLR6, lo que le permite distinguir entre triacil y diacil lipopéptidos. El TLR5 reconoce la flagelina procedente de bacterias. Los ligandos naturales concretos del TLR10 y el TLR11 (ratón) aún no se conocen, aunque se ha encontrado que el TLR11 es sensible a componentes bacterianos (Takeda *et al.*, 2003).

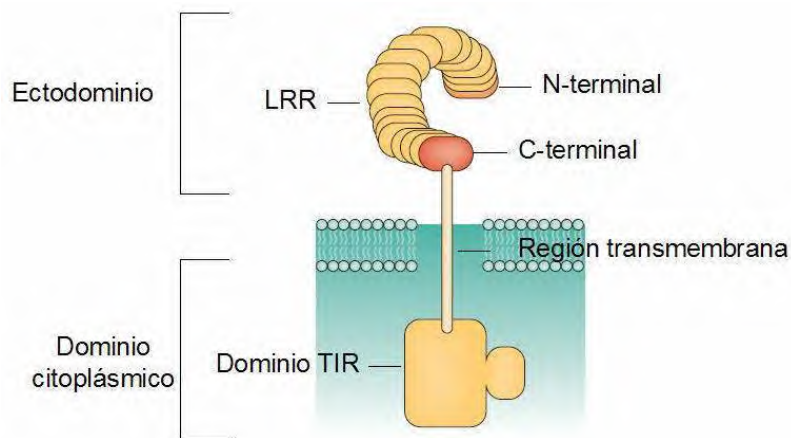


Fig. 2. Estructura de receptores Toll-like. (Adaptada de Gay *et al.*, 2006).

Los TLR3, 7, 8 y 9 se encuentran en endosomas, por lo que reconocen las moléculas una vez que el patógeno ha sido fagocitado. El TLR3 reconoce RNA de doble cadena procedente de virus, el TLR7 agonistas sintéticos y RNA de cadena sencilla y el TLR9 DNA bacteriano y viral con motivos CpG. El TLR8 reconoce imidazoquinolinas y RNA de cadena sencilla en humanos, pero en ratón este receptor tiene gran similitud con el TLR7 y parece no ser funcional (figura 3).

3.1.1.1 Reconocimiento de ligandos y transducción de señales

Los agonistas son capaces de producir la formación de dímeros de los receptores. Dos estudios recientes revelan el mecanismo por el que los TLRs reconocen los ligandos. Existen dos modos de reconocimiento del ligando a través de estos receptores (Brodsky y Medzhitov, 2007). En el primer modelo de reconocimiento, la unión de LPS al TLR4 supone la unión de dos moléculas de MD-2, una proteína soluble que se requiere para la señalización a través de TLR4, a dos moléculas de LPS, provocando la dimerización del receptor. En el segundo modelo una sola molécula provoca la dimerización del receptor, como en el caso del Pam₃CSK₄.

La transducción de señales a través de estos receptores depende de la unión de diferentes adaptadores con el dominio TIR de los receptores. La molécula adaptadora MyD88 participa en la señalización de todos los receptores excepto en el caso del TLR3. A continuación se acoplan a diversas proteínas adaptadoras, dependiendo del receptor, induciendo genes que codifican para proteínas inflamatorias (Kawai y Akira, 2005, 2006).

Las señales mediadas por TLRs son diferentes dependiendo del tipo celular y del estímulo. Recientemente se ha establecido que existe un *cross-talk* entre las diferentes rutas, sugiriendo un papel regulatorio (Gay y Gangloff, 2007).

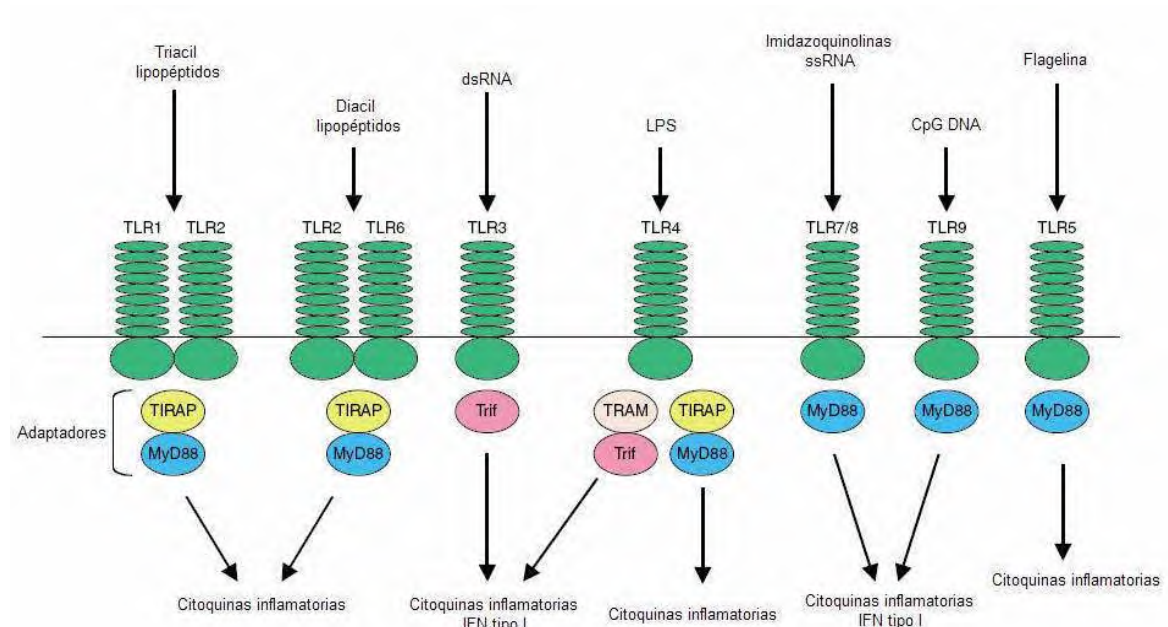


Fig. 3. Respuesta inmune mediada por receptores Toll-like. (Adaptada de Kawai y Akira, 2006).

El reconocimiento de patógenos a través de estos receptores, además de la activación de la respuesta inmune innata, está acoplado a la inducción de la respuesta inmune adaptativa (Medzhitov, 2007). Estudios recientes indican que la respuesta inmune adaptativa es necesaria para controlar la producción de citoquinas debida a la respuesta innata, de manera que si se suprime la respuesta adaptativa, la superproducción de citoquinas produce la muerte celular (Palm y Medzhitov, 2007). Estos estudios indican que la acción coordinada de ambas es necesaria para la resolución de la inflamación.

En macrófagos, la activación a través de TLRs produce la fosforilación de MAP quinasas activando diversos factores de transcripción (Rao, 2001). Adicionalmente, la activación de TLRs da lugar a la inducción de la producción de numerosas citoquinas proinflamatorias, al aumento en la expresión de COX-2 y a la generación de eicosanoides a tiempos largos de estimulación (Buczynski *et al.*, 2007).

3.2 REACILACIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

El AA forma parte del ciclo de Lands, por el que se reacila y se desacila de los fosfolípidos de la membrana (figura 4). En este ciclo, el AA se libera de los fosfolípidos por acción de las fosfolipasas A_2 y se reincorpora por las aciltransferasas. Este ácido graso tiene que ser previamente esterificado, proceso que llevan a cabo las acil-CoA sintetetas. Además, mediante la acción de las transacilasas, puede transferirse de un fosfolípido a otro, proceso conocido como remodelación lipídica. La disponibilidad de aceptores lisofosfolipídicos, particularmente lisofosfatidilcolina (lisoPC), es un factor limitante para la incorporación de AA. Los niveles de lisoPC se mantienen en células en reposo debido a la acción de la fosfolipasa A_2 independiente de calcio de grupo VIA (Balsinde, 2002).

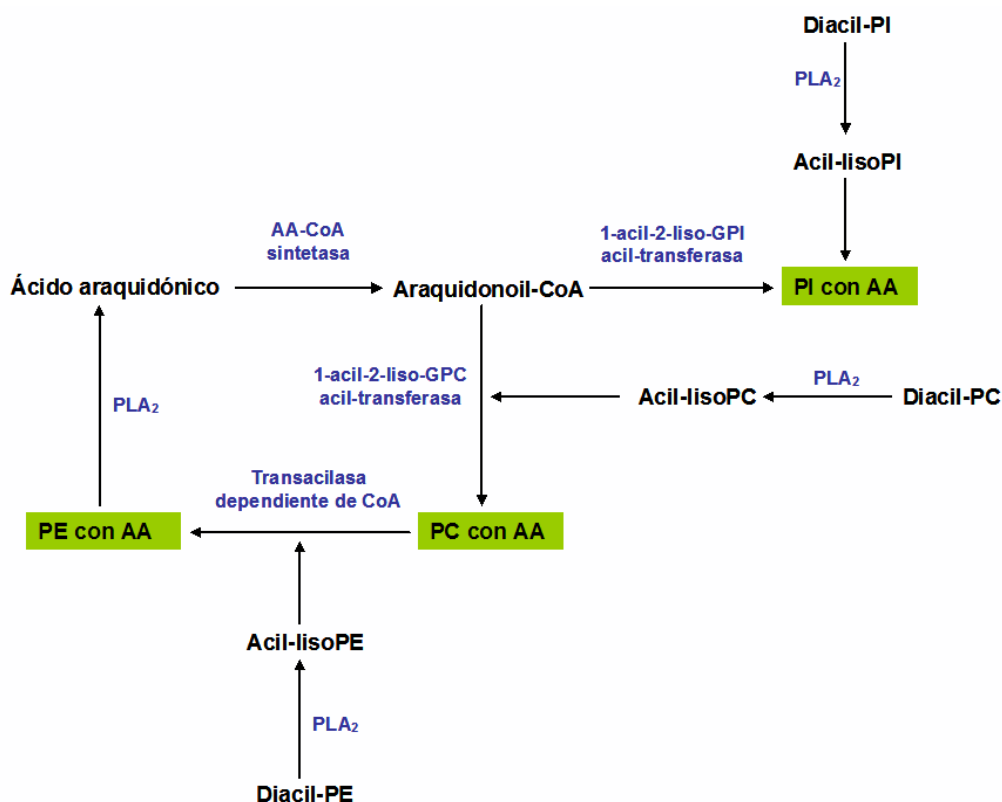
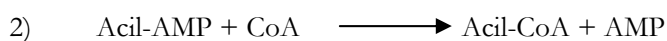


Fig. 4. Esquema de reacilación/desacilación y remodelación de ácido araquidónico.

3.2.1 ACIL-CoA SINTETASAS

Las acil-CoA sintetasas catalizan la tioesterificación de los ácidos grasos con CoA, siendo enzimas esenciales para la remodelación de fosfolípidos de membrana y para la síntesis lipídica *de novo*. En función de la longitud del ácido graso que esterifican se diferencian acil-CoA sintetasas de cadena corta, media y larga. Hasta el momento se han identificado 5 subfamilias de acil-CoA sintetasas de cadena larga en mamíferos en función de la especificidad del ácido graso que utilizan como sustrato, que depende principalmente de la longitud de este (Soupene y Kuypers, 2008).

Las acil-CoA sintetasas catalizan una reacción multisustrato dependiente de magnesio y ATP que implica dos pasos: 1) la formación de una molécula intermediaria, acil-AMP y 2) la formación del producto final, acil-CoA. La estructura cristalizada de esta enzima procedente de *Thermus thermophilus* HB8 indica que en la proteína está presente un residuo hidrofóbico en la zona donde se va a unir el ácido graso que determina la longitud de la cadena y, por tanto, la especificidad del sustrato (Hisanaga *et al.*, 2004). La unión a ATP produce la apertura del sitio de unión del ácido graso, cerrado por el residuo de indol del Trp²³⁴, mediante cambios conformacionales producidos por la formación de puentes de hidrógeno entre el fosfato y el nitrógeno del triptófano.



Un estudio reciente revela que estas enzimas tienen la capacidad de atrapar los ácidos grasos necesarios para las células del cerebro que ellas mismas no pueden sintetizar mediante la adición de CoA, evitando que estos ácidos grasos difundan fuera de estas células (Hamilton y Brunaldi, 2007).

La importancia de estas enzimas en la regulación de la apoptosis causada por la acumulación de AA se pone de manifiesto en un estudio reciente en la línea celular promonocítica U937. Cuando se añade ácido araquidónico exógeno a las células es rápidamente esterificado e incorporado a PC. Si, adicionalmente, se bloquea esta incorporación a través de la araquidonoil-CoA sintetasa mediante inhibidores específicos, se incrementan los niveles de AA libre en la célula, produciéndose externalización de PS, condensación de cromatina y fragmentación de PARP, procesos indicativos de apoptosis (Pérez *et al.*, 2006).

3.2.2 ACILTRANSFERASAS DEPENDIENTES DE CoA

Las aciltransferasas catalizan las reacciones de reacilación mediante la adición de cadenas de ácidos grasos a los diferentes fosfolípidos.

La actividad acil-CoA:lisofosfolípido aciltransferasa (LPAT) ha sido caracterizada en diferentes tejidos. Esta enzima tiene preferencia por ácidos grasos poliinsaturados, particularmente C18:1, C18:2 y C20:4. La reacilación de lisoPC a PC está catalizada por la 1-acilglicerofosfocolina aciltransferasa (LPCAT), enzima importante en la remodelación de fosfatidilcolina de la membrana. La LPCAT en plaquetas tiene una alta afinidad por el ácido linoleico, seguido por el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido araquidónico. En células fagocíticas, como los neutrófilos, se ha encontrado que la activación produce una remodelación fosfolipídica rápida, mediada principalmente por esta enzima (Jackson *et al.*, 2008).

El AA puede incorporarse a una gran variedad de fosfolípidos. El fosfolípido al que se va a incorporar depende en gran medida de la concentración de AA presente en la célula. En función de la concentración de AA se diferencian dos vías de incorporación: alta concentración (baja afinidad) en la que el AA se incorpora en primer lugar a triacilglicerol, y baja concentración (alta afinidad) donde el primer aceptor son especies fosfolipídicas aciladas en posición *sn*-1 (Chilton *et al.*, 1996). Esto indica que la concentración del AA en la célula es decisiva para la actuación de las diferentes aciltransferasas.

Por tanto, cuando las células están en reposo, el AA se incorpora en los fosfolípidos lentamente, manteniendo los niveles de este en las células, mientras que en células activadas la actividad aciltransferasa aumenta significativamente. Estudios realizados bloqueando estas enzimas demuestran que en ausencia de actividad se reduce la capacidad para producir PAF y otros mediadores lipídicos en la célula, lo que indica que la remodelación lipídica es necesaria para la biosíntesis de estos mediadores (Chilton *et al.*, 1996).

La actividad aciltransferasa ha sido documentada en monocitos y macrófagos en respuesta a LPS. Estudios realizados con inhibidores sugieren que la inhibición de esta enzima afecta a la ruta de señalización de LPS entre la activación del receptor y la transcripción génica. Por lo tanto, las aciltransferasas en monocitos y macrófagos controlan las respuestas inflamatorias mediante la regulación de la disponibilidad de AA libre y la respuesta al estímulo controlando la composición del entorno lipídico (Jackson y Parton, 2004).

3.3 LA FAMILIA DE LAS FOSFOLIPASAS A₂

3.3.1 CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN

La superfamilia de las fosfolipasas A₂ consiste en una amplia variedad de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster en posición *sn*-2 de los fosfolípidos liberando un ácido graso y un lisofosfolípido (figura 5).

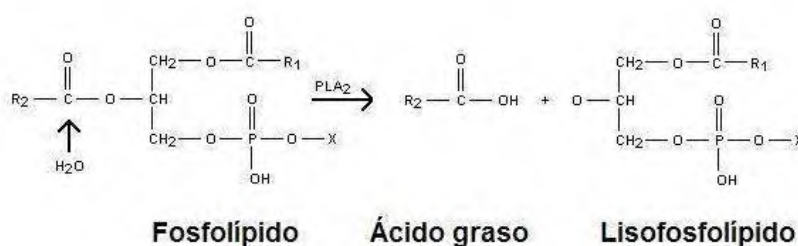


Fig. 5. Reacción de hidrólisis lipídica catalizada por las fosfolipasas A₂.

Los ácidos grasos liberados por acción de las fosfolipasas A₂, como el ácido araquidónico y el ácido oleico, tienen función como segundos mensajeros. Esta reacción es especialmente importante cuando el ácido graso liberado es ácido araquidónico, ya que es precursor de los eicosanoides.

Los lisofosfolípidos liberados por las fosfolipasas participan en la señalización celular, remodelación de fosfolípidos y cambios en la membrana y pueden utilizarse para producir factor activador de plaquetas (PAF), un potente mediador inflamatorio.

Las fosfolipasas se clasifican basándose en su secuencia nucleotídica según el criterio establecido por Six y Dennis, (2000). Para que una fosfolipasa sea clasificada dentro de un grupo de PLA₂:

1. Debe hidrolizar el enlace éster de la posición *sn*-2 de un sustrato fosfolipídico, siendo su actividad PLA₂ la mayoritaria aunque puede poseer otras actividades.
2. Debe conocerse la secuencia aminoacídica completa de la proteína madura.
3. Cada grupo debe incluir enzimas que tengan una secuencia homóloga. A cada

parólogo se le asignará una letra de subgrupo pero a los ortólogos no se les asignará una letra diferente.

4. Las variantes de procesamiento alternativo catalíticamente activas serán clasificadas dentro del mismo grupo y subgrupo y distinguidas con números arábigos.

Se han realizado varias clasificaciones de las PLA₂ a medida que se han ido descubriendo nuevas fosfolipasas (Dennis, 1994; Dennis, 1997; Six y Dennis, 2000; Schaloske y Dennis, 2006). Atendiendo a sus propiedades bioquímicas, las PLA₂ se clasifican en cinco familias, fosfolipasas secretadas dependientes de Ca²⁺ (sPLA₂) (tabla 1), fosfolipasas citosólicas dependientes de Ca²⁺ (cPLA₂) e independientes de Ca²⁺ (iPLA₂) (tabla 2), acetilhidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH) y fosfolipasas A₂ lisosomales (LPLA₂) (tabla 3).

TABLA 1. Fosfolipasas A₂ secretadas (sPLA₂)

Grupo	Origen	Tamaño (kDa)	Puentes disulfuro
IA	Veneno de cobra y crótalo	13-15	7
IB	Páncreas humano y porcino	13-15	7
IIA	Líquido sinovial humano, serpiente de cascabel	13-15	7
IIB	Veneno de víbora del Gabón	13-15	6
IIC	Testículos de rata y ratón	15	8
IID	Bazo y páncreas humano y de ratón	14-15	7
IIE	Cerebro, corazón y útero humano y de ratón	14-15	7
IIF	Testículos y embrión humano y de ratón	16-17	6
III	Humano, ratón, abeja y lagartija	15-18 55 (humano y ratón)	8
V	Corazón humano y de ratón, hígado y macrófagos	14	6
IX	Veneno de caracol (conodipina-M)	14	6
X	Bazo, timo y leucocitos humanos	14	8
XIA	Brotes verdes de arroz (PLA ₂ -I)	12,4	6
XIB	Brotes verdes de arroz (PLA ₂ -II)	12,9	6
XII	Humano y ratón	19	7
XIII	Parvovirus	<10	0
XIV	Hongos simbióticos y bacteria	13-19	2

Se ha identificado, recientemente, una nueva PLA₂ que podría ser el primer miembro de un nuevo grupo de fosfolipasas A₂, grupo XVI (Duncan *et al.*, 2008). Esta enzima se encuentra expresada fuertemente en tejido adiposo, por lo que se la ha denominado AdPLA₂ (Adipose PLA₂). Es una enzima de 18 kDa, intracelular, que se encuentra asociada a membrana y está activada por Ca²⁺, aunque este no es esencial para su actividad.

La AdPLA₂ tiene preferencia por sustratos que poseen una cabeza polar de colina frente a serina, etanolamina o inositol. Además, posee baja actividad lisofosfolipasa, su actividad fosfolipasa es 4 veces superior a la actividad lisofosfolipasa.

En el sitio catalítico tiene His/Cys pero, a pesar de tener características comunes con las PLA₂ que poseen histidina en su sitio catalítico, no se la puede encuadrar en ninguna de las categorías existentes. AdPLA₂ es inhibida, al igual que las sPLA₂, por AACOCF₃, pero también es inhibida por MAFP, lo que indica la presencia de una cisteína activa fundamental para su actividad. Además, carece del dominio conservado en el sitio catalítico de las sPLA₂, lo que la hace diferente a otras enzimas con histidina.

TABLA 2. Fosfolipasas A₂ citosólicas de grupo IV (cPLA₂) y VI (iPLA₂)

Grupo	Otros nombres	Origen	Tamaño (kDa)
IVA	cPLA ₂ α	Humano y ratón	85
IVB	cPLA ₂ β	Humano	114
IVC	cPLA ₂ γ	Humano	61
IVD	cPLA ₂ δ	Humano y ratón	92-93
IVE	cPLA ₂ ε	Ratón	100
IVF	cPLA ₂ ζ	Ratón	96
VIA-1	iPLA ₂	Humano y ratón	84-85
VIA-2	iPLA ₂ β	Humano y ratón	88-90
VIB	iPLA ₂ γ	Humano y ratón	88-91
VIC	iPLA ₂ δ, NTE	Humano y ratón	146
VID	iPLA ₂ ε, adiponutrina	Humano	53
VIE	iPLA ₂ ζ, TTS-2.2	Humano	57
VIF	iPLA ₂ η, GS2	Humano	28

TABLA 3. PAF-AH y fosfolipasas A_2 lisosomales

Grupo	Otros nombres	Origen	Tamaño (kDa)
VIIIA	Lp-PLA ₂	Humano, ratón, porcino y bovino	45
VIIIB	PAF-AH II	Humano y bovino	40
VIIIA	PAF-AH Ib (subunidad $\alpha 1$)	Humano	26
VIIIB	PAF-AH Ib (subunidad $\alpha 2$)	Humano	26
XV	ACS, LPLA ₂ , LLPL	Humano, ratón y bovino	45 (desglicosilada)

3.3.1.1 Fosfolipasas secretadas dependientes de Ca^{2+} (sPLA₂)

Las fosfolipasas A_2 secretadas son enzimas de bajo peso molecular, 14-18 kDa, excepto el grupo III, cuyo peso molecular es de 55 kDa, con una estructura terciaria rígida, debido a la presencia de 5-8 puentes disulfuro que les confiere estabilidad y les permite mantener su actividad en los fluidos extracelulares. Requieren Ca^{2+} en cantidades milimolares para su actividad catalítica.

El centro activo está formado por una histidina catalítica y próximo a ella se encuentra un aspartato conservado. Se han propuesto dos mecanismos de catálisis basados en los resultados obtenidos por cristalografía de rayos X. En ambos mecanismos la histidina funciona como base sobre una molécula de agua y el calcio estabiliza el oxoanión. En el primer mecanismo participaría una sola molécula de agua mientras que el segundo implicaría dos moléculas de agua (una de ellas coordinada a Ca^{2+}), pero aún no hay suficientes datos para determinar que mecanismo es el que realmente está teniendo lugar (Lambeau y Gelb, 2008). Entre las sPLA₂ humanas, se han determinado por cristalografía de rayos X la sPLA₂ IB, IIA (Scott y Sigler, 1994) y X (Pan *et al.*, 2002), proteínas que poseen una estructura similar. Basándose en estos datos estructurales y mediante programas de alineamiento de secuencias, se ha determinado que las sPLA₂ IB, IIA, IIC, IIE, IIF, V y X, comparten una misma estructura tridimensional.

Las sPLA₂ no tienen preferencia por el ácido graso que hidrolizan, pero muestran preferencia por los fosfolípidos aniónicos y sólo las de grupo V y X son capaces de hidrolizar PC. Estas enzimas son secretadas al medio extracelular, pudiendo actuar durante la secreción de manera autocrina o paracrina y posteriormente son reinternalizadas en la célula. Estudios previos en macrófagos P388D₁ indican que esta internalización de la

sPLA₂-V se produce en gránulos que llevan a la enzima a la membrana perinuclear, donde colocaliza con la cPLA₂ α y la COX-2 (Balboa *et al.*, 2003c).

Diferentes tipos de fosfolipasas A₂ secretadas se han relacionado con desarrollo de aterosclerosis debido a la hidrólisis lipídica (Rosengren *et al.*, 2006; Oestvang y Johansen, 2006; Kimura-Matsumoto *et al.*, 2008). Estudios recientes muestran que estas enzimas poseen actividad bactericida, en especial la sPLA₂ IIA es la más potente frente a bacterias Gram-positivas (Nevalainen *et al.*, 2008). Ratones transgénicos que sobreexpresan la sPLA₂-V confirman el papel de esta enzima en afecciones pulmonares, ya que estos ratones mueren durante el periodo neonatal debido a disfunciones pulmonares (Ohtsuki *et al.*, 2006).

La sPLA₂-V fue identificada por primera vez en humanos por Chen y colaboradores en 1994 y ese mismo año en ratón y rata por los mismos autores. El gen de la sPLA₂-V se encuentra en el cromosoma 1 en humanos y 4 en ratones. Contiene 5 exones, el sitio de unión a calcio se encuentra en el exón 3 y el catalítico en el exón 4, y se expresa en diferentes tejidos y líneas celulares. A esta enzima se le han asignado recientemente, además de las ya clásicas funciones, un papel importante en la aterogénesis mediante la formación de células *foam*, propiedades bactericidas tras el proceso fagocítico (Balestrieri y Arm, 2006) y participación en la maquinaria fagocítica en macrófagos donde es necesaria para una fagocitosis eficiente (Balestrieri *et al.*, 2006).

Los ratones *knockout* han permitido el estudio de la función de las fosfolipasas *in vivo*. Estos ratones se han generado mediante mutaciones en el gen diana, espontáneas o dirigidas, que causan una pérdida de función de la fosfolipasa. Actualmente, se han obtenido ratones *knockout* de sPLA₂ GIIA, GV, GIB y X. La mutación de la GIIA se produjo espontáneamente en ratones C57BL/6 (Kennedy *et al.*, 1995), estos ratones muestran un desarrollo normal y no hay cambios aparentes en el fenotipo. Los ratones *knockout* en GV presentan una fagocitosis reducida y una disminución en la producción de eicosanoides (Satake *et al.*, 2004), indicando el papel de esta enzima en el proceso de fagocitosis. Los ratones carentes de GIB (Huggins *et al.*, 2002) muestran protección frente a la obesidad producida por la dieta o resistencia a insulina, por lo que esta enzima se ha considerado como posible diana para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo 2. Los deficientes en sPLA₂ de grupo X presentan disminución de los síntomas alérgicos, por lo que esta enzima se considera clave en la patogénesis del asma (Henderson *et al.*, 2007).

3.3.1.2 Fosfolipasas citosólicas dependientes de Ca^{2+} (cPLA₂)

Las cPLA₂ son enzimas citosólicas de alto peso molecular que requieren calcio para translocar a membranas intracelulares. Son enzimas ubicuas que se expresan a niveles constantes. En el centro activo tienen Ser/Asp y requieren una arginina para su actividad catalítica. Además, estas enzimas también poseen actividad lisofosfolipasa y transacilasa.

La cPLA₂α, clonada en 1991 simultáneamente por Clark y colaboradores (Clark *et al.*, 1991) y Sharp y colaboradores (Sharp *et al.*, 1991), es la única enzima de esta familia que presenta especificidad por los fosfolípidos que contienen AA en la posición *sn*-2 (figura 6). Esta enzima se regula por diferentes mecanismos postraduccionales, como son la localización subcelular, respuesta a calcio intracelular, fosforilación por MAP quinasas o interacción con fosfolípidos y proteínas (Clark *et al.*, 1995). En respuesta a incrementos en la concentración de calcio intracelular se produce la translocación de la cPLA₂α del citosol a la región perinuclear (Golgi, retículo endoplásmico y membrana nuclear), donde facilita la conversión de ácido araquidónico a eicosanoides al colocalizar con otras enzimas (Hirabayashi *et al.*, 2004).

En numerosos tipos celulares se ha demostrado que se produce incremento en la actividad de la cPLA₂α en respuesta a agonistas capaces de fosforilar ERK1/2, efecto que puede revertirse mediante el uso de fosfatasas. La fosforilación de esta enzima junto con la translocación en respuesta a incrementos de calcio intracelulares actúan en conjunto para la completa activación de la enzima (Leslie, 1997). Estudios realizados en células P388D₁ sugieren que la fosforilación de la cPLA₂α incrementa la actividad específica de la enzima pero no es suficiente por si sola para liberar ácido araquidónico, requiriéndose señales adicionales a la fosforilación e incremento de calcio (Balboa *et al.*, 2000).

Esta enzima posee diferentes serinas que pueden fosforilarse y a través de las que se regula su actividad. Se ha descrito en diversos tipos celulares que la fosforilación de la cPLA₂α en la serina 505 aumenta la actividad de esta enzima (Qiu *et al.*, 1993). Recientemente se ha descrito mediante el uso de diferentes mutantes en serina que la fosforilación de la Ser⁷²⁷ de la cPLA₂α modula la actividad de la enzima, favoreciendo la ruptura con el heterotetrámero de p11 y anexina A2 y permitiendo su unión a la membrana para la hidrólisis de fosfolípidos (Tian *et al.*, 2007).

Los ratones *knockout* en GIVA se desarrollaron paralelamente en dos laboratorios (Uozumi *et al.*, 1997; Bonventre *et al.*, 1997). Aunque los ratones tienen un desarrollo normal, la delección de esta enzima provoca problemas en la fertilidad y el parto, daño cerebral y la carencia de mediadores inflamatorios como prostaglandina E₂ y leucotrienos. Estos ratones presentan disminución de los síntomas alérgicos por lo que esta enzima está implicada en reacciones alérgicas. Los síntomas en ratones *knockout* en varios modelos de enfermedades inflamatorias están atenuados con respecto a aquellos que poseen la enzima (Kita *et al.*, 2006).

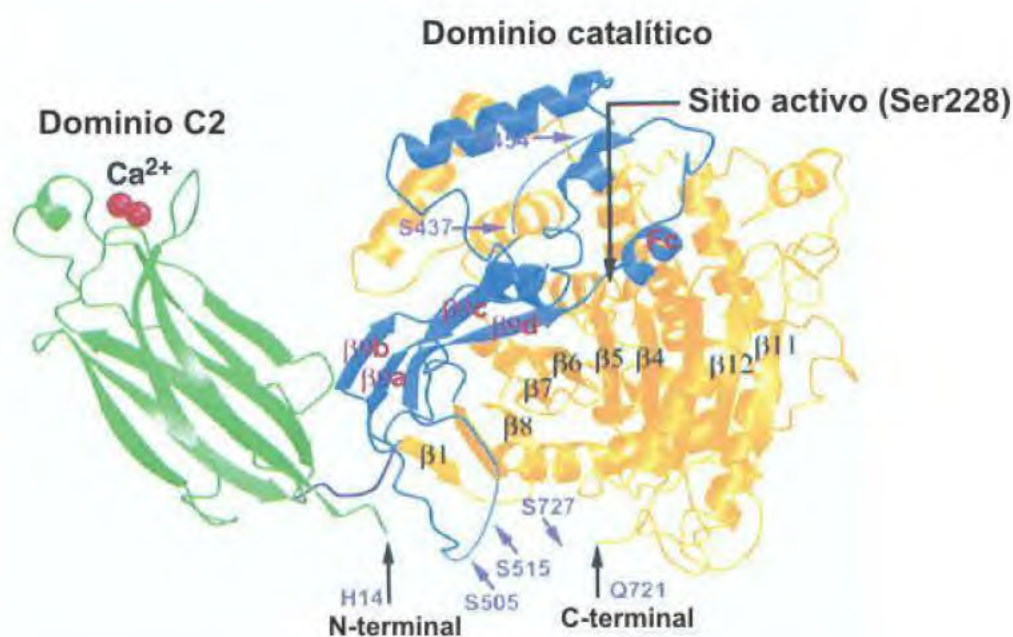


Fig. 6. Estructura tridimensional de la cPLA₂α. (Adaptada de Hirabayashi *et al.*, 2004).

3.3.1.3 Fosfolipasas citosólicas independientes de Ca²⁺ (iPLA₂)

Las iPLA₂ son enzimas citosólicas con alto peso molecular que no requieren Ca²⁺ y poseen una serina en su sitio catalítico. No son específicas del ácido graso que van a hidrolizar ni tienen preferencia por la cabeza polar del fosfolípido. Estas enzimas se expresan en todos los tipos celulares.

La iPLA₂-VIA fue clonada en 1997 por Tang y colaboradores (Tang *et al.*, 1997) y posee al menos 5 diferentes variantes de procesamiento. Se ha demostrado que dos de ellas, la VIA-1 y VIA-2, poseen actividad enzimática (Balsinde y Balboa, 2005). Además de la actividad fosfolipasa, la iPLA₂ VIA posee actividad lisofosfolipasa y actividad transacilasa. Otra característica de esta enzima es que puede hidrolizar PAF, imitando la acción de las PAF-AH (Winstead *et al.*, 2000; Balsinde y Balboa, 2005).

Esta enzima tiene un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis de la membrana celular regulando los niveles de fosfatidilcolina, por lo que está implicada en procesos de crecimiento celular, ya que alteraciones en la actividad y expresión de la iPLA₂-VIA se han asociado con un cambio en el metabolismo de fosfolípidos que afecta al crecimiento celular. También se ha asociado, entre otros, con procesos de secreción, apoptosis, quimiotaxis y regulación transcripcional de algunos genes (Balsinde y Balboa, 2005).

En ratones deficientes en GVIA (Bao *et al.*, 2004) aparece una movilidad reducida de los espermatozoides lo que dificulta la fertilización, mientras que en ratones hembra no se produce efecto sobre la capacidad de reproducción.

3.3.1.4 *Acetilhidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH)*

Las PAF-AH catalizan la hidrólisis de un grupo acetilo de la posición *sn*-2 del factor activador de plaquetas y productos de oxidación lipídicos. Estas enzimas degradan sólo fosfolípidos solubles en agua ya que actúan sobre sus sustratos en fase acuosa. Son enzimas independientes de calcio.

Las PAF-AH han sido implicadas en procesos de aterosclerosis, pero su papel como anti o proaterogénicas no se ha dilucidado (Karabina y Ninio, 2006; Karasawa, 2006).

Los ratones mutantes en GVIII (Koizumi *et al.*, 2003) son estériles, indicando el papel de esta enzima en el proceso de espermatogénesis y además los niveles de LIS1, proteína implicada en la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro, aparecen disminuidos.

3.3.1.5 *Fosfolipasas A₂ lisosomales (LPLA₂)*

Esta enzima, purificada de cerebro bovino (Abe y Shayman, 1998), tiene un peso molecular de 40 kDa y muestra un motivo lipasa con una serina conservada esencial para la catálisis, junto con residuos histidina y aspartato conservados.

El pH óptimo de esta enzima es 4,5 y se localiza en los lisosomas. Además de actividad PLA₂ presenta actividad transacilasa. El Ca²⁺ y Mg²⁺ incrementan la actividad transacilasa de esta enzima pero no son esenciales. Tiene preferencia por la hidrólisis de PC y PE (Schaloske y Dennis, 2006). También se ha generado el *knockout* de GXV (Hiraoka *et al.*, 2006). Los ratones carentes de esta enzima presentan fosfolipidosis, formación de células espumosas, acumulación de lípidos, principalmente PC y PE, e incremento del tamaño del páncreas.

3.3.2 PAPEL DE LAS PLA₂ EN LA LIBERACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

3.3.2.1 Liberación de ácido araquidónico en condiciones de activación

En condiciones de activación la concentración de calcio intracelular aumenta y la cPLA₂α es la enzima que predomina en la liberación de ácido araquidónico, produciéndose una acumulación en la célula y sirviendo como sustrato para la síntesis de eicosanoides. Cuando esta activación es intensa, se produce una amplificación de la liberación de araquidónico mediada por las sPLA₂, amplificando la producción de eicosanoides (Fitzpatrick y Soberman, 2001).

Actualmente, la cPLA₂α está considerada como la principal enzima implicada en la liberación de ácido araquidónico. La actividad de esta enzima es fundamental en las fases iniciales de la generación de eicosanoides como principal fuente de ácido araquidónico y para la generación de prostaglandina D₂, mediante la producción de sustrato y la regulación de la inducción de la ciclooxigenasa-2 (Fujishima *et al.*, 1999).

La participación de las sPLA₂ en la liberación de ácido araquidónico y la generación de eicosanoides además de depender de las características bioquímicas de la enzima, depende del tipo celular. Esta diferencia se debe a la presencia de caveolas con glipicano en la célula diana, que permiten la internalización de la enzima y la colocalización con otras enzimas para la producción de eicosanoides. La gran cantidad de PLA₂ de bajo peso molecular induce a pensar en una redundancia en la función, pero estas enzimas presentan diferentes características bioquímicas y de distribución en los diferentes tejidos y dentro de la célula, indicando que desempeñan papeles diferentes. Ensayos realizados transfectando células HEK 293 muestran diferentes modos de acción de estas enzimas. Las sPLA₂ de grupo IIA, IID y V poseen afinidad por los proteoglicanos, estas enzimas son secretadas al medio extracelular y posteriormente se unen a glipicano, siendo reinternalizadas para la

producción de eicosanoides. Las sPLA₂ de grupo V y X se unen a fosfatidilcolina de la membrana celular externa, liberando ácido araquidónico y produciendo PGD₂. La sPLA₂ IIE de ratón no presenta actividad cuando se transfecta en estas células, mientras que la IIF se une a la membrana por el carboxilo terminal para liberar AA. Las sPLA₂ IIA y X se unen con gran afinidad a receptores similares a los de manosa produciendo diversos eventos de señalización (Diaz y Arm, 2003).

Mientras que la cPLA₂α es la principal enzima en la liberación del ácido araquidónico, la sPLA₂-V participa amplificando este proceso de dos maneras: 1) mediante la hidrólisis de fosfolípidos y liberación de ácido araquidónico (Balboa *et al.*, 1996) y 2) mediante la regulación de la actividad de la cPLA₂α a través de la fosforilación de la Ser⁵⁰⁵ (Kikawada *et al.*, 2007). Estudios recientes en macrófagos peritoneales y mastocitos procedentes de ratones deficientes en estas enzimas han confirmado su papel en la liberación de ácido araquidónico y la producción de eicosanoides. La ausencia de cPLA₂α provoca una disminución en la producción de eicosanoides casi completa, mientras que la falta de sPLA₂-V produce una disminución del 35-50 % (Gijón *et al.*, 2000; Satake *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2006).

3.3.2.2 Liberación de ácido araquidónico en condiciones basales

En condiciones basales la iPLA₂ es la principal fosfolipasa implicada en la liberación de ácido araquidónico y ácidos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana.

Esta enzima juega un papel crucial en la regulación de la remodelación de ácido araquidónico suministrando aceptores 2-lisofosfolípidicos (Balsinde *et al.*, 1997), ya que la disponibilidad de lisoPC es esencial para la incorporación del ácido araquidónico. Estudios realizados en células U937 demuestran que la inhibición enzimática de la iPLA₂ disminuye los niveles celulares de lisoPC y lisoPE, afectando principalmente a la incorporación de ácido araquidónico a fosfolípidos (Balsinde, 2002; Balsinde *et al.*, 2002).

La iPLA₂, por tanto, actúa en condiciones de reposo celular manteniendo la homeostasis de la membrana, pero se ha documentado que esta enzima puede incrementar su actividad aumentando los niveles de ácido araquidónico en ciertas ocasiones. En respuesta a estrés oxidativo, la iPLA₂ puede liberar ácido araquidónico de las membranas para la formación de prostaglandinas (Akiba y Sato, 2004).

Estudios realizados en células U937, utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante para inducir peroxidación lipídica, han demostrado que la acumulación de peróxidos lipídicos en las membranas celulares las hace más susceptibles a la hidrólisis por la iPLA₂-VIA (Pérez *et al.*, 2004; Balboa y Balsinde, 2006).

3.3.2.3 *Cross-talk entre fosfolipasas A₂*

Durante los procesos de liberación de AA las fosfolipasas cPLA₂α y sPLA₂-V actúan de manera coordinada. Esto se ha documentado en diferentes tipos celulares y en respuesta a diversos estímulos. Estudios realizados en células mesangiales de ratón muestran que en respuesta a H₂O₂ se produce liberación de ácido araquidónico por la activación de la sPLA₂ IIA y V, siendo necesaria la activación previa de la cPLA₂α (Han *et al.*, 2003). La coordinación entre estas enzimas para liberar AA también se ha descrito en macrófagos P388D₁ en respuesta a LPS y PAF (Balsinde *et al.*, 1998) y en células promonocíticas U937 en respuesta a 12/15-HPETE (Balboa *et al.*, 2003a).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar el *cross-talk* entre la cPLA₂α y la sPLA₂-V. Dependiendo del estímulo, la regulación de la sPLA₂-V por la cPLA₂α ocurre a nivel de la actividad enzimática, en respuestas a corto plazo, o a nivel de la inducción génica, en repuestas a largo plazo (Balsinde *et al.*, 2002).

Algunos autores sugieren que la sPLA₂-V regula la actividad de la cPLA₂α mediante la regulación de los niveles de calcio (Kim *et al.*, 2002a) mientras que otros sugieren que esta regulación se produce durante la secreción mediante la unión a proteoglicanos o fosfatidilcolina (Han *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002b; Muñoz *et al.*, 2003).

Estudios realizados en macrófagos de ratón P388D₁ demuestran mediante el uso de inhibidores específicos de fosfolipasas A₂ que la activación de la cPLA₂α precede a la actuación de la sPLA₂-V (Balsinde y Dennis, 1996). Adicionalmente, se ha observado que la actividad sPLA₂-V es clave en la producción de PGE₂ a tiempos largos de inducción y que además la inhibición de la actividad cPLA₂α también inhibe esta síntesis. Estos resultados indican que durante la fase retardada de síntesis de prostaglandinas la activación de la sPLA₂-V está regulada por la activación de la cPLA₂α (Shinohara *et al.*, 1999).

Estudios realizados en neutrófilos humanos sugieren que el principal papel de la sPLA₂-V exógena durante la activación de neutrófilos y la síntesis de leucotrieno B₄ es la activación

de la cPLA₂α y la 5-lipoxigenasa. Esta activación se produce en primer lugar mediante la liberación de lisofosfatilcolina, que induce incrementos de la concentración de calcio y la fosforilación de cPLA₂α. La síntesis de leucotrieno B₄ mediada por la sPLA₂-V aumenta debido a la activación de la cPLA₂α mediante retroalimentación positiva (Kim *et al.*, 2002a). Como excepción, estudios realizados en eosinófilos humanos mediante inhibición farmacológica y confirmados en ratones deficientes en cPLA₂α indican que la sPLA₂-V puede sintetizar leucotrienos de manera completamente independiente de la activación de cPLA₂α (Muñoz *et al.*, 2003).

Recientemente se ha demostrado que la sPLA₂-V endógena regula la actividad de la cPLA₂α mediante la fosforilación de la Ser⁵⁰⁵. Ensayos realizados en mastocitos activados vía TLR2 con el agonista de este receptor, Pam₃CSK₄, indican que la fosforilación de ERK1/2, cPLA₂α y por tanto la generación de leucotrieno C₄ y prostaglandina D₂, se inhiben mediante U0126, inhibidor de MEK. El mismo efecto se observa en ratones deficientes en sPLA₂-V, lo que confirma que la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α está regulada por la sPLA₂-V (Kikawada *et al.*, 2007). Adicionalmente, estos autores sugieren que la regulación de la fosforilación de cPLA₂α por la sPLA₂-V depende del receptor a través del que se produce la activación.

Las fosfolipasas A₂, además de suministrar el sustrato necesario para la producción de mediadores inflamatorios, controlan la inducción génica de la ciclooxigenasa-2 mediante la sPLA₂ de grupo V y la cPLA₂α. En macrófagos P388D₁ se ha observado que la sPLA₂-V regula la expresión de ciclooxigenasa-2 en respuesta a la activación por LPS. Durante este proceso la expresión de sPLA₂-V está regulada por la activación de la cPLA₂α, existiendo una coordinación entre las tres enzimas que da lugar a la generación de prostaglandinas en macrófagos activados (Balsinde *et al.*, 1999b).

3.4 PAPELES BIOLÓGICOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

3.4.1 EICOSANOIDES

La mayor parte de los efectos biológicos del ácido araquidónico se debe a los eicosanoides, productos derivados del metabolismo de este ácido que poseen múltiples funciones biológicas en el desarrollo de enfermedades asociadas a procesos inflamatorios. La producción de eicosanoides está mediada principalmente por tres grupos de enzimas: ciclooxigenasas, lipoxigenasas y citocromos P450 (figura 7).

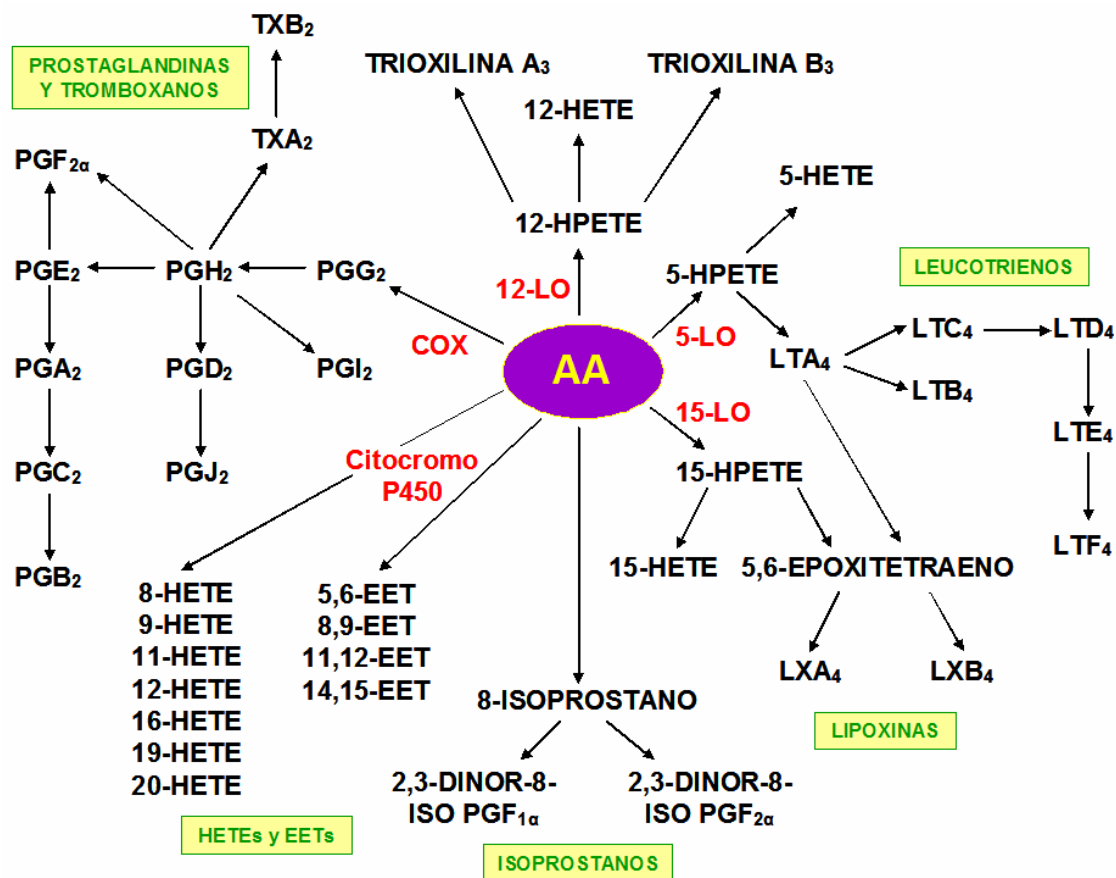


Fig. 7. Metabolismo del ácido araquidónico para la producción de eicosanoides.

Las prostaglandinas son derivados de la acción de las ciclooxigenasas que median en los signos característicos de los procesos inflamatorios. Las ciclooxigenasas (COX) catalizan la reacción de oxigenación en la que el ácido araquidónico se convierte en PGG₂ y la reacción de peroxidación por la que PGG₂ se convierte en prostaglandina H₂. COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos mientras que COX-2 tiene una expresión mínima en la mayoría de las células, induciéndose en respuesta a numerosos estímulos proinflamatorios.

Las estructuras de los genes de COX-1 y COX-2 están altamente conservadas (Appleby *et al.*, 1994). COX-2 se expresa en muchos organismos como tres transcritos poliadenilados diferentes de 4,2, 3,8 y 2,2 kb. Las isoenzimas de COX contienen series en tándem de cuatro hélices anfipáticas que crean una superficie hidrofóbica y sufren modificaciones postraduccionales de glicosilación de asparaginas, de manera que pueden penetrar en la membrana lipídica (Simmons *et al.*, 2004).

La transcripción de COX-2 en ratón está controlada por diferentes elementos reguladores que se encuentran en la secuencia del promotor. El promotor de COX-2 contiene sitios de unión de factores de transcripción como NF-κB, c/EBP, CREB, AP-1 y NFAT, los cuales actúan como reguladores positivos de la transcripción de COX-2 en diversos tipos celulares (Tazawa *et al.*, 1994; Vila-del Sol y Fresno, 2005).

La ciclooxigenasa-2 es un homodímero de 72 kDa, cuyos monómeros se mantienen unidos por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes salinos entre los dominios de dimerización (figura 8). Los sitios activos de peroxidación y ciclooxigenación se encuentran separados físicamente. En el sitio activo de peroxidación se encuentra un grupo hemo coordinado a través de una histidina. En el sitio activo de ciclooxigenación se encuentra una diferencia clave entre COX-1 y COX-2, la sustitución de la isoleucina 509 de COX-1 por una valina en COX-2. Debido a esta diferencia existen drogas que inhiben selectivamente a la ciclooxigenasa-2 (Smith *et al.*, 1996).

La ciclooxigenasa-2 juega un papel fundamental en los procesos inflamatorios al convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas. Actúa en la iniciación de la respuesta inflamatoria, como enzima proinflamatoria, y en la fase de resolución de la inflamación, como enzima antiinflamatoria (Gilroy *et al.*, 1999). Esta enzima tiene también papeles en diferentes procesos fisiológicos, como en procesos de proliferación, transformación celular y oncogénesis (Smith y Langenbach, 2001). La expresión de COX-2 se encuentra altamente

incrementada en la enfermedad de Alzheimer, en la isquemia cerebral y la epilepsia, lo que sugiere la inducción de genes inflamatorios en respuesta a daño cerebral y la idea de que las ciclooxigenasas juegan un papel fundamental en el mecanismo de enfermedades neurodegenerativas (Bazán *et al.*, 2002; Tuppo y Arias, 2005).



Fig. 8. Estructura tridimensional del homodímero de COX-2. (Adaptada de Simmons *et al.*, 2004). Dominios funcionales: dominio de unión a membrana (amarillo), dominio de dimerización (verde), dominio catalítico (azul) y hemo (rojo).

La sPLA₂ en mastocitos de ratón participa en la síntesis de prostaglandinas D₂ y E₂ en las fases tempranas de activación, a los pocos minutos, y en las fases tardías pasadas varias horas (Bingham *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1997). Tras la generación de ratones deficientes en sPLA₂ de grupo V, se ha confirmado que esta enzima regula la producción de eicosanoides (PGD₂ y LTC₄) en células mastocíticas procedentes de estos ratones (Diaz *et al.*, 2006). El hecho de que este proceso se observe en ratones C57BL/6 pero no en BALB/c indica que la regulación de la producción de eicosanoides por la sPLA₂-V depende de la base genética de los ratones. Adicionalmente, esta regulación en la producción de eicosanoides se corresponde con diferencias en la regulación de ciclooxigenasa-2, donde la expresión de esta enzima es menor en ratones C57BL/6 deficientes en sPLA₂-V con respecto al control y permanece invariable en ratones BALB/c.

La producción de eicosanoides en células P388D₁ en respuesta a LPS/PAF y zimósán se determinó mediante HPLC, encontrándose que la prostaglandina D₂ es el producto mayoritario, aunque también se produce, en menor cantidad, prostaglandina E₂ y F_{2α}. La cantidad de ácido araquidónico no metabolizado en respuesta a estos estímulos es diferente debido, en parte, a que la cantidad de prostaglandina D₂ en células estimuladas con zimósán es muy elevada (Schaloske *et al.*, 2005).

Estudios realizados en respuesta a infecciones virales indican que, en estas circunstancias, se produce un aumento de la producción de prostaglandina E₂. La adición exógena de esta prostaglandina da lugar a un aumento de la replicación en la mayoría de los virus analizados. El mecanismo por el que la prostaglandina E₂ es capaz de regular la replicación vírica no se conoce (Steer y Corbett, 2003). Estudios recientes en células RAW 264.7 demuestran que en respuesta a la estimulación con poli IC, un análogo sintético de RNA viral, la prostaglandina E₂ producida por COX-2 regula la inducción de la expresión de otra enzima inflamatoria, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). En este modelo, la inhibición de la inducción de iNOS mediante el bloqueo de COX-2 por siRNA se recupera por adición de prostaglandina E₂ exógena (Pindado *et al.*, 2007).

Los tromboxanos son derivados de la prostaglandina H₂ que poseen propiedades vasoconstrictoras y regulan la agregación plaquetaria. Estudios recientes en ratones deficientes en cPLA₂α indican que la deficiencia heredada de la cPLA₂α está directamente relacionada con disfunción plaquetaria y la biosíntesis de eicosanoides, encontrándose disminuidos los niveles de tromboxanos, efecto que puede revertirse con ácido araquidónico (Adler *et al.*, 2008). Además, los tromboxanos regulan la contracción del músculo liso y participan en procesos alérgicos, aterogénesis y metástasis de células cancerígenas (Nakahata, 2008).

La 5-lipoxigenasa es la primera enzima de la ruta que da lugar a la síntesis de leucotrienos, los cuales participan en procesos de inflamación y parecen tener diferentes efectos sobre la salud y las enfermedades. Esta ruta es abundante en macrófagos, células *foam* y células inflamatorias como mastocitos, neutrófilos y células dendríticas. Esta enzima introduce un oxígeno activo en el carbono 5 del ácido araquidónico, dando lugar a 5-HPETE que se reduce a 5-HETE o se convierte en LTA₄ que puede servir como intermediario para la síntesis de leucotrieno B₄ por acción de la LTA₄ hidrolasa o la síntesis de LTC₄ mediante la LTC₄ sintasa (Osher *et al.*, 2006).

Diferentes autores han asociado la producción de leucotrienos con el desarrollo de procesos alérgicos, en concreto, la ruta de síntesis de leucotrieno B₄ se considera una posible diana para el tratamiento del asma bronquial (Miyahara, *et al.*, 2006). Estas moléculas participan en la acumulación leucocitaria, ingestión y muerte de microorganismos, así como en la generación de otros mediadores proinflamatorios. Diferentes estados de inmunodeficiencia se caracterizan por una deficiencia en la síntesis de leucotrienos (Peters-Golden *et al.*, 2004).

Las 12 y 15-lipoxigenasas catalizan una reacción bimolecular que requiere la presencia de un sustrato lipídico y oxígeno. Esta reacción lleva asociada la formación de intermedios radicalarios que permanecen unidos a la enzima pero, bajo ciertas condiciones de pH o concentración de oxígeno, pueden liberarse produciendo reacciones radicalarias en cadena. La especificidad por el sustrato depende de la isoforma de lipoxigenasa. La 5-LO humana tiene preferencia por los ácidos grasos con 20 carbonos pero las 12/15-LO oxigenan una gran variedad de ácidos grasos sin importar la longitud de la cadena. Los primeros productos de las 12/15-LO, HPETEs, se reducen para formar hidroxilípidos, ácidos hidroxieicosatetranoicos y, adicionalmente, pueden convertirse en hepoxilinas, que son moléculas señalizadoras en diversas rutas y precursoras de las trioxilinas o lipoxinas, con importantes funciones pro y antiinflamatorias (Kühn y O'Donnell, 2006). Las lipoxinas se han asociado con patologías respiratorias como el asma, donde se ha descrito que la lipoxina A₄ bloquea las respuestas asmáticas (Levy, 2005).

El citocromo P450 comprende una familia de enzimas que catalizan la formación de ácidos hidroxieicosatetranoicos (HETEs) y epoxieicosatrienoicos (EETs) a partir del AA. Estos metabolitos están implicados en enfermedades cardiovasculares regulando múltiples rutas de señalización. Así, por ejemplo, el 20-HETE media respuestas vasoconstrictoras, incrementa los niveles de calcio y potasio intracelular y activa la cascada de las MAPK (Elbekai y El-Kadi, 2006). Los EETs tienen diversos efectos biológicos en la regulación de la fisiopatología cardiovascular y se ha descrito que contribuyen a la predisposición de isquemia miocárdica (Gauthier *et al.*, 2007).

Los isoprostanos, compuestos similares a las prostaglandinas, que se forman a partir de la peroxidación no enzimática del AA por acción de radicales libres, se han considerado desde su descubrimiento en 1990 marcadores de daño oxidativo y peroxidación lipídica en la patogénesis de enfermedades del sistema nervioso central (Greco y Minghetti, 2004).

Adicionalmente, el AA forma parte de la estructura de moléculas que participan en señalización, como los endocannabinoides (Hansen y Artmann, 2008), que modulan la liberación de neurotransmisores, regulando procesos biológicos como el apetito, el aprendizaje o la memoria.

3.4.2 APOPTOSIS, CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN

El ácido araquidónico produce apoptosis cuando su concentración en el interior de la célula alcanza ciertos niveles. La acumulación de ácido araquidónico que se produce por la activación de las fosfolipasas A_2 en la célula, debida a la respuesta frente a agentes externos o la inhibición de enzimas que participan en el metabolismo de este ácido, constituye una señal para la inducción de apoptosis (Balsinde *et al.*, 2006).

Estudios realizados en células endoteliales indican que el ácido araquidónico liberado por mediación de la $iPLA_2$ -VIA está asociado a la regulación de la proliferación. Estos estudios demuestran que la inhibición de esta enzima con BEL bloquea el crecimiento celular inhibiendo la síntesis de DNA y por tanto, la progresión de la fase S del ciclo celular. La inhibición de la síntesis de DNA celular puede revertirse mediante la adición de ácido araquidónico exógeno, mientras que la adición de otros metabolitos derivados de la $iPLA_2$, como la lisofosfatilcolina o el diacilglicerol, no son capaces de revertir el efecto antiproliferativo del BEL. En mamíferos es necesaria la actividad del complejo ciclina A/cdk2 para la síntesis de DNA y la actividad $iPLA_2$ para la expresión de este complejo, ya que en presencia de BEL su expresión es muy reducida. El mecanismo por el que el ácido araquidónico regula la proliferación celular aún no ha sido descrito (Herbert y Walker, 2006).

Recientemente, un estudio realizado en la línea celular promonocítica U937 confirma el papel de la $iPLA_2$ en el crecimiento celular. En este estudio se determina el papel de la $cPLA_2\alpha$ y la $iPLA_2$ -VIA en la proliferación celular. La inhibición de la $cPLA_2\alpha$ con pirrofenona no tiene efecto sobre la proliferación de estas células mientras que la inhibición de la $iPLA_2$ -VIA con BEL, MAFP u oligonucleótidos antisentido bloquea el crecimiento celular produciendo la parada del ciclo celular en las fases S y G_2/M . Ensayos de unión de anexina-V y marcaje con azul tripán confirman que la disminución del crecimiento celular no se debe a la pérdida de viabilidad celular. En este estudio, la adición de ácido araquidónico exógeno no recupera el efecto producido por la inhibición de la $iPLA_2$ -VIA y el efecto antiproliferativo no se debe tampoco a metabolitos derivados de la oxigenación

del ácido araquidónico, indicando que en este caso sería la disminución del sustrato de la $iPLA_2$, la fosfatidilcolina, la responsable del efecto antiproliferativo, debido posiblemente a su papel estructural en la membrana celular (Balboa *et al.*, 2008). Estos resultados indican que el mecanismo a través del que se regula el ciclo celular por la $iPLA_2$ es diferente dependiendo del tipo celular.

3.4.3 INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

Una de las funciones biológicas que recientemente ha sido descrita para el ácido araquidónico es su papel en la interacción con proteínas celulares, especialmente proteínas implicadas en señalización sináptica y enfermedades neuronales.

La syntaxina 3, una proteína de membrana, tiene un papel importante en el crecimiento neuronal y recientemente se ha identificado como diana del ácido araquidónico, lo que indica que este ácido graso podría funcionar en el cerebro incrementando el crecimiento neuronal (Darios y Davletov, 2006). Los ácidos grasos insaturados participan en procesos de exocitosis mediante la inducción del cambio conformacional de proteínas implicadas en este proceso como la syntaxina. El ácido araquidónico se intercala en la estructura de la proteína (figura 9), permitiendo que esta se despliegue para formar el complejo SNARE, el cual permite la fusión vesicular (Darios *et al.*, 2007; Connell *et al.*, 2007).



Fig. 9. Activación de la syntaxina 3 por acción del ácido araquidónico.
Adaptada de Connell *et al.*, 2007.

La α -sinucleína es una proteína citosólica que tiene un papel importante en la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas. La acumulación de esta proteína debida a cambios conformacionales que dan lugar a la formación de agregados se ha relacionado con la patogénesis de la enfermedad. Se ha descrito que los cambios conformacionales en esta proteína se producen cuando interacciona con los fosfolípidos de membrana, de manera que adopta una estructura α -helicoidal produciendo fibras similares a las amiloides en la enfermedad de Alzheimer. Recientemente se ha descrito que este cambio conformacional es debido a la interacción con ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico, ácidos grasos mayoritarios en los fosfolípidos de la corteza cerebral (Broersen *et al.*, 2006).

3.4.4 REGULACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DE ENZIMAS

Estudios recientes indican que el ácido araquidónico actúa como molécula señalizadora para la translocación de enzimas a sitios concretos de la célula.

Los cuerpos lipídicos (LDs) son orgánulos celulares compuestos de triacilglicerol y ésteres de colesterol que poseen una composición de ácido grasos única (Tauchi-Sato *et al.*, 2002) y son importantes para la generación de membranas celulares, generación de energía y reserva de numerosas proteínas e importantes en enfermedades relacionadas con la acumulación de grasas. La cPLA₂ α se ha relacionado recientemente con la formación de estos cuerpos lipídicos. La inhibición farmacológica de la cPLA₂ α y con siRNA muestra una disminución en la biogénesis de LDs. La fosforilación de la Ser⁵⁰⁵ es necesaria para la formación de cuerpos lipídicos, como se demuestra mediante estudios realizados transfectando células con mutantes en este residuo, en los que la generación de LDs es notablemente menor a la encontrada en las células transfectadas con la construcción nativa (Gubert *et al.*, 2008).

Se ha propuesto recientemente que el ácido araquidónico actúa como señal independiente de los niveles de calcio intracelulares para la translocación de la cPLA₂ α a cuerpos lipídicos, siendo estos una diana habitual de la cPLA₂ α en respuesta a estímulos. Estos estudios se realizaron usando proteínas fluorescentes unidas a cPLA₂ α , comprobando que en respuesta a ácido araquidónico se producía translocación al retículo endoplasmático y a los cuerpos lipídicos. El tratamiento con inhibidores de la síntesis de eicosanoides y mecanismos de reacilación indican que el producto principal de la activación de la cPLA₂ α en este sistema,

el ácido araquidónico, produce la translocación de la enzima a los cuerpos lipídicos contribuyendo a la síntesis de mediadores lipídicos (Wooten *et al.*, 2008).

Otra enzima que recientemente se ha descrito que transloca en respuesta a ácido araquidónico es la 5-lipoxigenasa (5-LO). Estudios realizados en neutrófilos humanos indican que la translocación de la 5-LO a la membrana nuclear está regulada por ácido araquidónico. La inhibición de la liberación de ácido araquidónico al bloquear la cPLA₂α con pirrofenona evita la translocación de la 5-LO y la síntesis de leucotrienos en neutrófilos activados, efecto que se previene con la adición de ácido araquidónico exógeno, lo que confirma la relación funcional entre la cPLA₂α y el ácido araquidónico. Inhibidores redox y competitivos de la 5-LO indican que el sitio de regulación de la translocación debida al ácido araquidónico se encuentra en el sitio catalítico de la enzima (Flamand *et al.*, 2006).

El objetivo principal de este trabajo es identificar el papel de las fosfolipasas A_2 en la respuesta inflamatoria de células inmunocompetentes como los macrófagos, centrándose en caracterizar el metabolismo del ácido araquidónico en macrófagos activados vía receptores Toll-like, regulación de la ciclooxigenasa de tipo 2 y posibles mecanismos de regulación de dos enzimas claves en estos procesos: $cPLA_2\alpha$ y $sPLA_2-V$. De forma más específica los objetivos perseguidos son:

- Perfil farmacológico y papel de las fosfolipasas en la liberación de ácido araquidónico y generación de eicosanoides durante la activación a través de diferentes receptores Toll-like.
- Identificación de los metabolitos implicados en la inducción génica de COX-2 durante la activación de macrófagos en respuesta a lipopolisacárido, enzimas que los producen y la diana sobre la que estos mediadores ejercen su acción.
- Regulación de la actividad $cPLA_2\alpha$ por fosforilación durante la activación vía receptores Toll-like: *cross-talk* entre la $sPLA_2-V$ y la $cPLA_2\alpha$.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1 CÉLULAS

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo han sido macrófagos de ratón P388D₁ (clon MAB) (Shinohara *et al.*, 1999), cedida por el Dr. E. Dennis (Universidad de California en San Diego, La Jolla, CA, EE.UU.) y RAW 264.7 de American Type Culture Collection (Rockville, MD).

Los macrófagos peritoneales se extrajeron de ratones machos C57BL/6 procedentes del animalario de la Universidad de Valladolid.

5.1.2 ANTICUERPOS

Los anticuerpos usados en este trabajo se enumeran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Anticuerpos

Nombre	Descripción	Origen
COX-2	Anticuerpo policlonal de conejo (1:2000 para inmunodetección)	Cayman (Ann Arbor, MI)
c-Rel	Anticuerpo policlonal de conejo (1:1000 para inmunodetección)	Santa Cruz Biotechnology, Inc (Heidelberg, Germany)
Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Anticuerpo policlonal de conejo (1:2000 para inmunodetección)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
Fosfo-cPLA ₂ (Ser505)	Anticuerpo policlonal de conejo (1:1000 para inmunodetección)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
Anti-conejo	Anticuerpo secundario unido a peroxidasa (1:2000 para inmunodetección)	GE Healthcare (Barcelona)

5.1.3 PLÁSMIDOS

Los plásmidos empleados en este trabajo han sido pEGFPN1 (Clontech) y GFP-V, pEGFPN1 que contiene la sPLA₂ de grupo V humana cedido por el Dr. Yasuhito Shirai (Shirai *et al.*, 2005).

5.2 MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO

5.2.1 TAMPONES Y SOLUCIONES USADAS

En la siguiente tabla se resume la composición de las soluciones utilizadas en este trabajo.

Tabla 5. Tampones y soluciones

Nombre	Composición	Uso
PBS 1X	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4	Lavados y preparación de otros tampones
Tampón de lisis	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 % Triton X-100, 1 mM PMSF, 100 μM Na ₃ VO ₄ e inhibidor de proteasas	Lisis celular
Tampón de lisis nuclear	420 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA, 25 % glicerol y NaCl 5 M	Lisis de la membrana nuclear
Tampón de ruptura de BD™ TransFactor WholeCell Extraction Kit	20 mM HEPES pH 7,9, 20 % glicerol, 1 % Nonidet P-40, 1 mM de MgCl ₂ , 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM PMSF, DTT e inhibidor de proteasas	Lisis completa de la célula para preparar fracción total
TAE 1X	40 mM Tris-base, 0,1 % acético glacial, 1 mM EDTA pH 8,8	Corrida de geles de agarosa
Tampón de Laemmli	60 mM Tris, 10 % glicerol (v/v), 2 % SDS (p/v), 0,002 % azul de bromofenol (p/v) pH 6,8 y 2,5 % de β-mercaptoetanol	Preparación de muestras para su análisis por SDS-PAGE
Tampón <i>running</i> 1X	25 mM Tris-base, 0,2 M glicina, 0,01 % SDS	Corrida de geles de acrilamida
Tampón de transferencia	2,2 g/l de CAPS pH 11	Transferencia de proteínas a membranas de PVDF
Tampón de bloqueo	PBS 1X + 5 % leche desnatada	Bloqueo de membranas para inmunodetección
Tampón de lavado	PBS 1X + 0,1 % Tween 20	Lavado de membranas en inmunodetección

5.2.2 INHIBIDORES

Los inhibidores usados en este trabajo se describen a continuación.

Tabla 6. Inhibidores

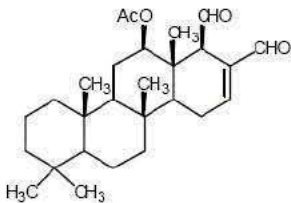
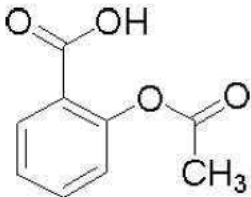
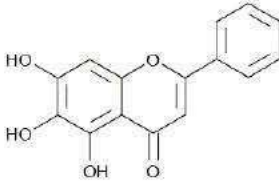
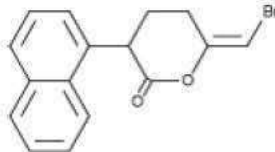
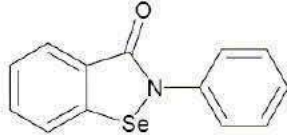
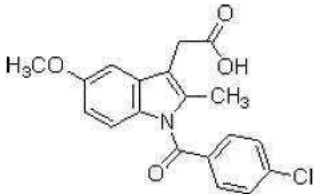
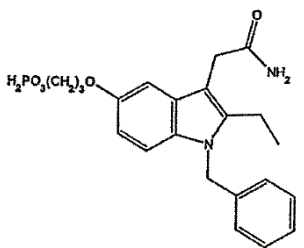
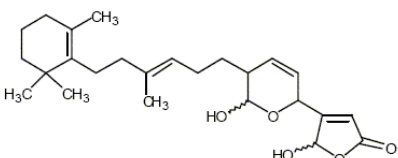
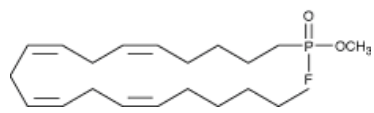
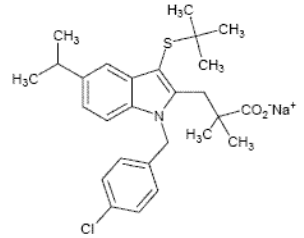
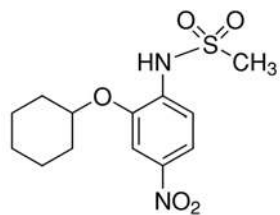
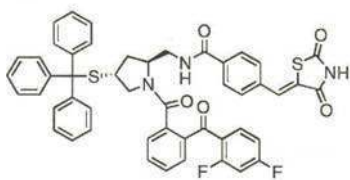
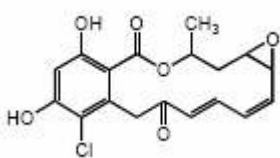
Nombre	Descripción	Estructura	Origen
12-epi-escalaradial (Scal)	Inhibidor de sPLA ₂		Biomol
Ácido acetilsalicílico (AAS)	Inhibidor de COX		Sigma
Baicaleína (Baic)	Inhibidor de lipoxigenasa		Biomol
Bromoenol lactona (BEL)	Inhibidor de iPLA ₂		Cayman
Ébselen (Ebs)	Inhibidor de COX-2 y 5-lipoxigenasa		Biomol
Indometacina (Indo)	Inhibidor de COX		Sigma

Tabla 6. Continuación

Nombre	Descripción	Estructura	Origen
LY311727	Inhibidor de sPLA ₂		Dr. E. Mihelich, Lilly
Manoalide (Mano)	Inhibidor de sPLA ₂		Biomol
Metil araquidonil fluorofosfonato (MAFP)	Inhibidor de iPLA ₂ y cPLA ₂ α		Cayman
MK-886	Inhibidor la proteína activadora de 5-lipoxigenasa (FLAP)		Biomol
NS-398	Inhibidor de COX-2		Sigma
Pirrofenona (Pir)	Inhibidor de cPLA ₂ α		Dr. T. Ono, Japón
Radicol	Inhibidor de COX-2 y c-Rel		Calbiochem

5.2.3 AGONISTAS DE RECEPTORES TOLL-LIKE

Los agonistas de TLRs usados en este trabajo son LPS y poli IC (Sigma), Pam₃CSK₄, HKLM, LTA, flagelina, FSL-1, imiquimod, gardiquimod y ODN 1826 (Invivogen).

5.2.4 OLIGONUCLEÓTIDOS Y RNA DE INTERFERENCIA

A continuación se detallan los oligonucleótidos usados en este trabajo. Todos provienen de Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania).

Tabla 7. Oligonucleótidos para PCR

Nombre	Secuencia <i>forward</i>	Secuencia <i>reverse</i>
GIB	5'-CAC CCC AGT GGA CGA CTT AG-3'	5'-CCC GGA GCA TGA GTA GGA GT-3'
GIIA	5'-TGC CTT CTA TGG ATG CCA CT-3'	5'-CCA CTT TTC TCC AGG CTC TTG-3'
GIIC	5'-ATT GTC AAT GGG ACG GTG AC-3'	5'-TAG GTGGCCAGG TTC TCC TT-3'
GIID	5'-ATT GTT GCT ATG CCC ACC TG-3'	5'-GCA CAC AGT TGC CTT TCA CA-3'
GIIE	5'-CCC CAA GCT GGA AAA GTA CC-3'	5'-GTT GTG GCG AAA GCA AAG AG-3'
GIIF	5'-CTC AGG GCC TCT CCC TCT AA-3'	5'-CCA TGG ACT TCA GGT TCA GC-3'
GIII	5'-CTGTGT GGC TTG GAA CTG GT-3'	5'-GGG GCT GGG AGT ATA TGA GG-3'
GV	5'-GAC CGT TGT TAT GGG CAA CT-3'	5'-GAG CCT CAT TGG ACA GAA GG-3'
GX	5'-AGA CCG CTA CCC ATG GAA GT-3'	5'-AGG CAG TAA GCC AGC TCC TC-3'
GXII	5'-CCA CTG TTT GGC GTT CAT CT-3'	5'-GGA ACT CCT CGT CAC AGT CG-3'
GIVA	5'-GAG GGG CTT TAT TCC ACA CG -3'	5'-GTC CAA AAT CCC CGA CTC AT-3'
GVIA	5'-ATG GGA AAG CAG GAG ATG GT-3'	5'-TCA TTT CAG CAC ACC CCT TC-3'

Tabla 8. Oligonucleótidos antisentido y siRNA

Nombre	Secuencia
Sense GV PLA ₂	5'-GGC TTG CTA GAA CTC AAG TCC-3'
Antisense GV PLA ₂	5'-GGA CTT GAG TTC TAG CAA GCC-3'
Control negativo	5'-AGG TAG TGT AAT CGC CTT CTT-3'
siRNA sPLA ₂ -V	5'-CAC GAC UCC UUC UGU CCA ATT-3'

5.3 CULTIVO CELULAR

5.3.1 MEDIOS DE CULTIVO

Las líneas celulares P388D₁ y RAW 264.7 se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 5 % o 10 % (v/v) de suero fetal bovino (Gibco) respectivamente, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) a 37 °C en atmósfera humificada de CO₂/O₂.

Los macrófagos peritoneales de ratón se extrajeron como previamente fue descrito por Cohn y Benson, (1965) y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los macrófagos se plaquearon y se incubaron durante 2 h antes de realizar los ensayos.

5.3.2 ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN

Las células se plaquearon (10⁶ células/ml), se dejaron adherir durante la noche y se usaron en los experimentos al día siguiente. Se lavaron dos veces con medio libre de suero y se incubaron durante 1 h antes de realizar los ensayos. Todos los experimentos se llevaron a cabo en medio sin suero.

Cuando se requirió marcaje radiactivo, las células fueron incubadas durante el periodo de adherencia con 0,25 µCi/ml de [³H]AA (act. esp. 214 Ci/mmol, GE Healthcare) o 0,1 µCi/ml de [¹⁴C]OA (53 mCi/mmol, GE Healthcare). El ácido graso marcado no incorporado se eliminó lavando con medio libre de suero y 0,5 mg/ml de albúmina. Cuando se utilizaron inhibidores se preincubó 30 minutos antes de añadir los estímulos. En los ensayos de fosforilación, las células se preincubaron 24 h en medio libre de suero antes de la estimulación.

5.4 DNA Y RNA

5.4.1 TRANSFECCIÓN

5.4.1.1 *Transfección de siRNA y oligonucleótidos antisentido*

Para la transfección con siRNA se plaquearon 10^6 células/ml en medio libre de suero y se transfectaron con oligonucleótido (5-20 nM) en presencia de lipofectamina (Invitrogen) 10 µg/ml durante 6 h. Tras este tiempo se añadió suero al 5 % y las células se cultivaron durante 20 h antes de realizar los ensayos. Como control negativo se usó un siRNA inespecífico.

Para los ensayos de fosforilación, las células se transfectaron por electroporación con siRNA 20 nM, utilizando un *kit* de nucleofección (Amaxa Biosystems).

La transfección con oligonucleótidos antisentido se realizó en presencia de 5 µg/ml de lipofectamina y con 1 µM del oligonucleótido en medio libre de suero durante 6 h antes de tratar las células con estímulos (Barbour y Dennis, 1993).

5.4.1.2 *Transfección de plásmidos y producción de estables expresando GFP-GV*

Aproximadamente 3 µg de plásmido se transfectaron en P388D₁ y RAW 264.7 (2×10^6 células) por electroporación, utilizando un *kit* de nucleofección (Amaxa Biosystems). Para seleccionar las células transfectadas se incubaron con 0,3 mg/ml de geneticina (Gibco).

La transfección se comprobó mediante citometría de flujo (Coulter EpicsXL-MCL citofluorómetro) analizando la fluorescencia verde de la EGFP en FL1 (505-545 nm) y mediante microscopía usando un microscopio de fluorescencia (Bio-Rad) con cámara Nikon.

5.4.2 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DEL cDNA

5.4.2.1 *Método del Trizol*

La extracción del RNA total de las células se llevo a cabo siguiendo el protocolo descrito por Chomezynski y Sacchi, (1987), utilizando Trizol (Ambion). Las células se resuspendieron en 1 ml de Trizol hasta conseguir una solución homogénea. Se añadieron 200 µl de cloroformo, y tras agitar vigorosamente, se centrifugaron a 12000 x g durante 10

minutos a 4 °C, separándose las fases acuosa y orgánica.

En la fase acuosa, en la que se encuentra el RNA, se añadieron 0,5 ml de isopropanol. Se centrifugó la fase, se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70 % en H₂O DEPC (Ambion). Una vez lavado, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en H₂O DEPC.

La cantidad de RNA se determinó por espectrofotometría midiendo las absorbancias a 260 y 280 nm, longitudes a las que los ácidos nucleicos y las proteínas presentan la máxima absorbancia. El cociente A_{260}/A_{280} indica la pureza del RNA. Se considera que las muestras son adecuadas cuando los valores de este cociente están comprendidos entre 1,8 y 2.

La concentración de RNA en µg/µl se calcula con la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 \text{ (factor de absorbancia del RNA)} \times 1/1000$$

5.4.2.2 *Kit de extracción*

El RNA usado en la PCR cuantitativa se extrajo usando el *kit* de Ambion RNAqueous-4PCR kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Ambion Inc, Austin TX).

5.4.2.3 *Síntesis de cDNA*

Se diluyó 1 µg de RNA hasta un volumen de 40 µl en H₂O DEPC en presencia de primers aleatorios y se calentó a 65 °C durante 5 min. Las muestras se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente y se añadieron dNTPs (4 mM), tampón de la transcriptasa reversa, inhibidor de RNasa (0,8 U/µl), y transcriptasa reversa (1 U/µl), hasta un volumen final de 50 µl, incubándolo a 37 °C durante 1 h. Después se calentó a 90 °C durante 5 minutos.

5.4.3 AMPLIFICACIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR Y RT-PCR)

5.4.3.1 *PCR y electroforesis en geles de agarosa*

Para la amplificación del DNA se utilizó 1U de DNA polimerasa de *T. aquaticus* (Biotools) con el tampón suministrado por la casa comercial, 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de una mezcla de dNTPs y 20 ng de cada oligonucleótido, en un volumen final de 50 µl. El molde utilizado fue cDNA.

Para la amplificación de las fosfolipasas se usó el siguiente programa:

15 minutos a 95 °C

40 ciclos: 15 segundos a 95 °C

30 segundos a 61 °C

30 segundos a 72 °C

10 minutos a 72 °C

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa (Biotools) al 2 % (p/v), preparados y corridos en tampón TAE 1X (tabla 5).

5.4.3.2 RT-PCR

La expresión de la sPLA₂-V se determinó mediante un ensayo Taqman basado en la técnica de PCR a tiempo real. Para cuantificar los niveles de mRNA de la enzima se usaron sondas Taqman específicas (Applied Biosystems, Foster City, CA). Como gen de referencia se usó actina. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo usando la solución de Taqman (Taqman Universal Master Mix). Se usó el detector Chromo4 Detector PTI-200 (MJ Research) con las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. El análisis de cuantificación se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

5.5 PROTEÍNAS

5.5.1 PREPARACIÓN DE FRACCIONES CELULARES

Los extractos celulares para el análisis de proteínas por inmunodetección se obtuvieron incubando las células con tampón de lisis (tabla 5). Se incubó 40 minutos en hielo, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

Los núcleos se lisaron con el tampón de lisis nuclear descrito por Beg *et al.*, (1993) y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos para recoger el sobrenadante.

La fracción total se obtuvo tratando las células con el *kit* comercial BDTM TransFactor Whole Cell Extraction Kit (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

5.5.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La proteína total en los extractos celulares se determinó mediante el método Bradford, (1976), que se basa en el desplazamiento del máximo de absorción (de 465 a 595 nm) del azul de Coomassie en presencia de proteína. La recta patrón se hizo con albúmina de suero bovino (Sigma).

5.5.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA E INMUNODETECCIÓN

La separación electroforética se realizó mediante geles de SDS-poliacrilamida discontinuos al 10 %. La proteína cargada en los geles depende de la proteína analizada: 4 µg de proteína para la detección de COX-2 y c-Rel y 50 µg de proteína para p-ERK1/2 y p-cPLA₂. Las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas 5 minutos con tampón de Laemmli (tabla 5). La inmovilización se realizó sobre membranas de PVDF (Millipore) mediante transferencia húmeda (Bio-Rad) durante 1 h a 200 mA en tampón de transferencia (tabla 5).

Las membranas se incubaron, posteriormente, con tampón de bloqueo (tabla 5) durante 1 h. Se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS-Tween 0,1 % durante 1 h. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno, se incubó con anticuerpo secundario o proteína A unida a peroxidasa diluidos en PBS-Tween 0,1 % durante 1 h. Tras los lavados, el reconocimiento de los anticuerpos se detectó con el sistema ECL (Enhancer Chemi Luminiscence).

5.6 OTRAS TÉCNICAS

5.6.1 MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Las células marcadas con [^3H]AA o [^{14}C]OA se incubaron con medio libre de suero durante 1 h antes de añadir los estímulos en presencia o ausencia de inhibidores y en presencia de 0,5 mg/ml de albúmina. Tras el tiempo de estimulación indicado en cada ensayo, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron 5 minutos a 1400 rpm para eliminar las células despegadas. La radiactividad se midió mediante contaje radiactivo en un contador de centelleo (Beckman Coulter LS 6500).

5.6.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD

5.6.2.1 Preparación de sustratos

Las membranas se prepararon marcando $1,5 \times 10^6$ células U937 con $0,75 \mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]AA durante 18 h. Tras lavar 3 veces con PBS, se resuspendieron con HEPES 100 mM, pH 7,5 a 4°C . Después de sonicar 1 minuto se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se centrifugó a 30000 rpm 1 hora, las membranas se resuspendieron en PBS y se contó la radiactividad incorporada.

Las micelas se prepararon mezclando 100000 cpm de dipalmitoil fosfatidilcolina tritiada (act. esp. 60 Ci/mmol, GE Healthcare) con el mismo compuesto sin marcar para obtener una concentración $100 \mu\text{M}$ en un volumen final de $150 \mu\text{l}$ (Ackermann *et al.*, 1994). Se evaporó con N_2 , se añadió Triton X-100 para tener una concentración $400 \mu\text{M}$ y tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 (con 5 mM de EDTA para iPLA₂). Se agitó, se calentó 1 minuto a 40°C y se sonicó en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos.

5.6.2.2 Actividad cPLA₂, sPLA₂ e iPLA₂

La actividad cPLA₂ y sPLA₂ en homogeneizados celulares se determinó mediante un ensayo con membranas descrito previamente por Diez *et al.*, (1994). Alícuotas de $100 \mu\text{g}$ de proteína se incubaron durante 1 h para la cPLA₂ o 2 h para la sPLA₂ a 37°C con HEPES 100 mM (pH 7,5) en presencia de $1,3 \text{ mM}$ de CaCl_2 y 100000 dpm de membranas marcadas con [^3H]AA. Cuando se determinó la actividad cPLA₂ se usó $25 \mu\text{M}$ de LY311727 y $25 \mu\text{M}$ de BEL y para la actividad sPLA₂ se añadió $1 \mu\text{M}$ de pirrofenona y $25 \mu\text{M}$ de BEL.

En los ensayos con sPLA₂ purificada (cedida por A. Aarsman, Universidad de Utrecht, Holanda) se usaron 50 ng de proteína.

La actividad sPLA₂ en sobrenadante se determinó usando como sustrato micelas (Ackermann *et al.*, 1994), en HEPES 100 mM (pH 7,5), durante 2 h a 37 °C y en presencia de CaCl₂ 1,3 mM.

La actividad iPLA₂ se determinó en alícuotas de 100 µg de proteína durante 2 h a 37 °C con HEPES 100 mM (pH 7,5) que contenía 5 mM de EDTA y 100 µM de micelas (Pérez *et al.*, 2004).

La extracción de lípidos se hizo por el método descrito por Bligh & Dyer, (1959) y se separaron por cromatografía en capa fina (TLC), usando como fase móvil hexano/dietil éter/ácido acético (70:30:1). Los ácidos grasos libres se rasparon y se midió la radiactividad en un contador de centelleo.

5.6.3 ANÁLISIS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Las células se incubaron con los estímulos durante 6 h antes de su lisis con tampón de ruptura de BD™ TransFactor WholeCell Extraction Kit (tabla 5). La determinación de la activación de los diferentes factores de transcripción se realizó mediante un *kit* comercial basado en la técnica de ELISA, BD™ TransFactor Profiling Kit (Inflammation 1).

6.1 FOSFOLIPASAS A₂ EN MACRÓFAGOS DE RATÓN

6.1.1 EXPRESIÓN DE FOSFOLIPASAS A₂ EN P388D₁ Y RAW 264.7

Los macrófagos, una de las células inflamatorias por excelencia, constituyen un sistema ideal para la identificación de nuevas dianas moleculares en la cascada de producción de prostaglandinas, ya que presentan una gran cantidad de ácido araquidónico esterificado en sus membranas y además responden a numerosos estímulos proinflamatorios liberando este ácido graso.

Para estos estudios se dispone de líneas celulares macrofágicas procedentes de distintas cepas de ratón, las células P388D₁ procedentes de ratones DBA/2 y las células RAW 264.7 de ratones BALB/c.

La expresión de fosfolipasas depende del tipo celular y del tejido, por lo que se analizaron los niveles de mRNA de fosfolipasas A₂ presentes en las líneas celulares P388D₁ y RAW 264.7. Se extrajo el RNA y mediante PCR convencional se analizó la expresión de cPLA₂ α , iPLA₂-VIA y de diferentes grupos de la familia de las fosfolipasas A₂ secretadas. En ambas líneas celulares se expresan la cPLA₂ α , la iPLA₂-VIA y las fosfolipasas A₂ secretadas IB, IID, V y XII. Además, en las células RAW 264.7 se expresa la IIE (figura 10).

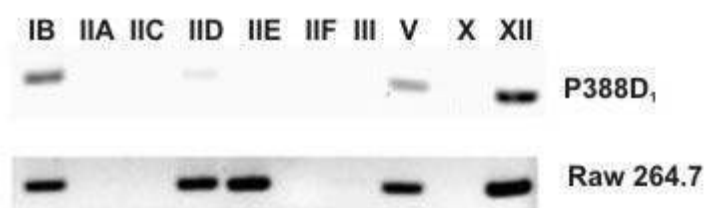


Fig. 10. Fosfolipasas A₂ secretadas en macrófagos de ratón. Determinación mediante PCR de la expresión de las fosfolipasas A₂ secretadas en P388D₁ y RAW 264.7.

En la liberación de ácido araquidónico están implicadas dos tipos de fosfolipasas dependientes de calcio en respuesta a diferentes estímulos, la cPLA₂ de grupo IV y algunos miembros de la familia de las fosfolipasas secretadas, particularmente, los grupos IIA, V y

X (Murakami *et al.*, 1998; Balsinde *et al.*, 2002). El hecho de que en las líneas celulares P388D₁ y RAW 264.7 no se expresen las sPLA₂ de grupo IIA ni X, facilita el estudio de la implicación de la sPLA₂-V en los procesos celulares que llevan a la liberación de ácido araquidónico por esta enzima.

6.1.2 VALIDACIÓN DE LOS INHIBIDORES DE FOSFOLIPASAS

La aproximación más directa para estudiar el papel de las fosfolipasas A₂ en un proceso es la inhibición de su actividad mediante inhibidores químicos (Balsinde *et al.*, 1999a). Actualmente se dispone de inhibidores específicos de las diferentes familias de PLA₂.

La pirrofenona es un inhibidor reversible selectivo de la actividad de la cPLA₂α (Ono *et al.*, 2002), la afinidad de este inhibidor por la cPLA₂α es dos órdenes de magnitud superior a la afinidad por fosfolipasas A₂ secretadas. El escalaradial, un sesterpenoide tetracíclico marino aislado de *C. Mollitor* que posee propiedades antiinflamatorias *in vivo* e *in vitro*, es un inhibidor irreversible de la actividad sPLA₂ (Monti *et al.*, 2005, 2007). El BEL es un inhibidor irreversible de la actividad iPLA₂ que ejerce su acción mediante unión covalente a la enzima. Este inhibidor tiene una especificidad 1000 veces superior por las PLA₂ independientes de calcio con respecto a las dependientes (Hazen *et al.*, 1991).

6.1.2.1 Pirrofenona

La validación del uso de la pirrofenona se realizó en células RAW 264.7 mediante ensayos de actividad para esta enzima en presencia o ausencia del inhibidor. Además, se utilizaron inhibidores de las fosfolipasas A₂ secretadas, escalaradial y LY311727, para comprobar que la inhibición de las sPLA₂ no disminuye la actividad cPLA₂α y que estos inhibidores tampoco afectan directamente a esta actividad.

La medida de la actividad cPLA₂α se determinó usando como sustrato membranas celulares marcadas con [³H]AA, midiéndose el ácido araquidónico liberado mediante conteo radiactivo. En la figura 11 se observa que la pirrofenona bloquea casi por completo la actividad enzimática de la cPLA₂, mientras que el escalaradial y el LY311727, a una concentración a la que la actividad sPLA₂ está inhibida en células activadas con LPS, no afectan a la actividad cPLA₂.

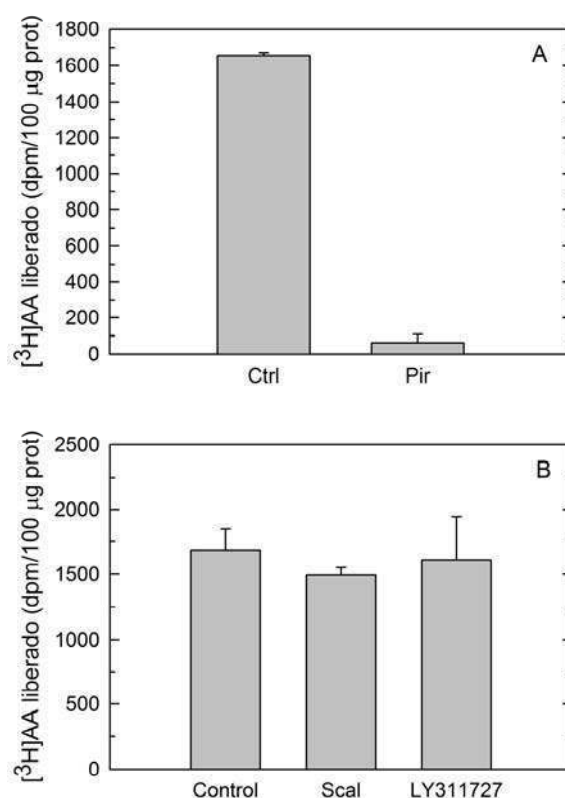


Fig. 11. Actividad cPLA₂ en RAW 264.7. (A), la actividad cPLA₂ se midió en células sin tratar en presencia o ausencia de pirrofenona 1 μM. (B), las células fueron tratadas con 100 ng/ml de LPS durante 20 h y se midió la actividad cPLA₂ en presencia de escalaradial 4 μM o LY311727 25 μM.

6.1.2.2 Escalaradial

El escalaradial es un inhibidor de sPLA₂ que ha sido utilizado en el estudio de la implicación de estas enzimas en diversas funciones celulares, incluyendo la liberación de ácido araquidónico (Barnette *et al.*, 1994; Marshall *et al.*, 1994). Sin embargo, los estudios con este inhibidor son complicados debido a los potenciales efectos inhibitorios de este compuesto sobre la actividad de la cPLA₂, particularmente cuando se usan concentraciones superiores a 10 μM (Marshall *et al.*, 1994).

Para validar el uso del escalaradial se evaluó en primer lugar la concentración de esta droga a la que se bloqueaba la actividad de la sPLA₂ sin afectar a la actividad de la cPLA₂. Para ello se trataron las células con LPS para inducir la expresión y actividad de la sPLA₂, se prepararon los homogeneizados y se midieron distintas actividades PLA₂ en presencia de diferentes concentraciones de escalaradial, usando membranas como sustrato.

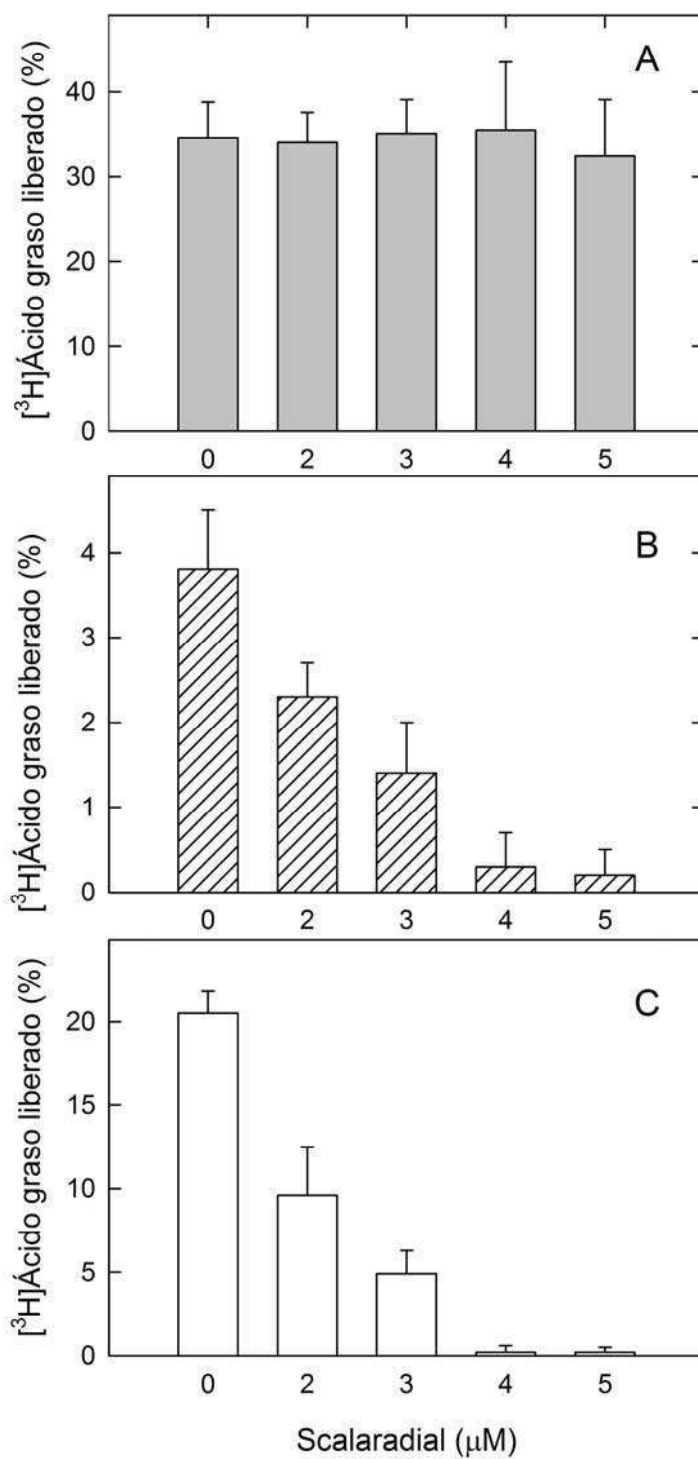


Fig. 12. Efecto del escalaradial en la actividad PLA₂. Las células fueron expuestas a LPS (100 ng/ml). Después de 20 h de incubación, se prepararon los homogeneizados y se analizó el efecto del escalaradial en la actividad cPLA₂ (A) y sPLA₂ (B). El efecto del escalaradial en la actividad sPLA₂ en proteína pura de rata (50 ng/ensayo) se muestra en (C).

La actividad cPLA₂ se determinó en presencia de BEL y LY311737, para asegurar que la actividad de la iPLA₂ y la sPLA₂ endógenas no contribuye a la actividad medida. La actividad sPLA₂ se realizó en presencia de pirrofenona y BEL para eliminar las interferencias de la actividad de la cPLA₂ y la iPLA₂, respectivamente. Como se muestra en las figuras 12A y 12B, cuando se utilizan concentraciones hasta 5 μ M, el escalaradial no afecta a la actividad cPLA₂ mientras que la actividad sPLA₂ se inhibe de manera dependiente de la dosis de esta droga. Por encima de 3 μ M se observa una inhibición de la actividad casi completa.

Para validar la especificidad del ensayo, los experimentos se realizaron también con proteína purificada. La cantidad de enzima usada fue de 50 ng/ensayo. La figura 12C muestra como el escalaradial inhibe la sPLA₂-V pura de manera dependiente de la concentración, de forma similar a la inhibición observada cuando la fuente de enzima son los homogenizados celulares.

6.1.2.3 BEL

En trabajos previos se ha descrito que el BEL produce apoptosis a concentraciones elevadas en determinadas líneas celulares (Fuentes *et al.*, 2003). Para evitar estos efectos, se utilizó una concentración baja de BEL, 5 μ M. Para determinar el efecto del BEL a esta concentración sobre la actividad iPLA₂ en células RAW 264.7, se hicieron homogeneizados de células sin tratar o tratadas con BEL 5 μ M durante 30 minutos y se determinó la actividad iPLA₂. Como se muestra en la figura 13, la actividad iPLA₂ está parcialmente inhibida con BEL 5 μ M.

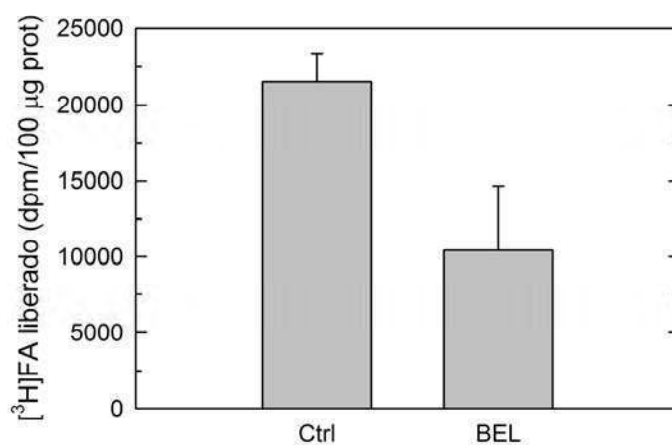


Fig. 13. Inhibición de la iPLA₂ con BEL. Las células RAW 264.7 se trataron con BEL 5 μ M y se determinó la actividad iPLA₂ en los homogeneizados.

6.2 PERFIL FARMACÓLOGICO EN MACRÓFAGOS

6.2.1 PAPEL DE LAS FOSFOLIPASAS A₂ EN LA LIBERACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

En trabajos previos se ha demostrado que en diversos tipos celulares la activación a través de receptores Toll-like produce la activación de fosfolipasas A₂. Sin embargo, los efectores implicados y los mecanismos de señalización desencadenados por la activación a través de cada receptor no han sido descritos.

6.2.1.1 Liberación de ácido araquidónico

Para describir el papel de las fosfolipasas A₂ en la ruta de señalización vía receptores Toll-like, se estudió el efecto de la activación vía TLR en la liberación de ácido araquidónico en P388D₁ y RAW 264.7 utilizando 10 agonistas diferentes de TLRs. Las células, marcadas con [³H]AA, se trataron con los agonistas de TLRs durante 20 h y el ácido araquidónico liberado se estimó en el sobrenadante mediante conteo radiactivo.

Tabla 9. Agonistas de TLRs

Nombre	Descripción	TLR
LPS	Lipopolisacárido procedente de <i>E. coli</i> 0111:B4	4
Poli IC	Ácido poliinosínico-policitidílico (dsRNA)	3
Pam ₃ CSK ₄	Lipoproteína sintética bacteriana	2/1
HKLM	Preparado de <i>L. monocytogenes</i> muerta por calor	2
LTA	Ácido lipoteitoico purificado de <i>S. aureus</i>	2
Flagelina	Componente mayoritario de los flagelos de <i>S. typhimurium</i>	5
FSL-1	Lipoproteína sintética diacilada	2/6
Imiquimod	Pequeña molécula antiviral sintética	7
Gardiquimod	Compuesto de imidazoquinolina	7
ODN 1826	Oligonucleótido sintético 5'-TCCATGACGTTCCTGACGTT-3'	9

En ambas líneas celulares se encontró que, a las concentraciones usadas, la estimulación a través de los receptores Toll-like daba lugar a la liberación de AA, excepto cuando las células eran estimuladas vía TLR5 (flagelina) o TLR9 (ODN 1826). Como se muestra en la figura 14, la estimulación vía TLR3 (poli IC) y TLR4 (LPS) produce la liberación de gran cantidad de ácido araquidónico en P388D₁ y RAW 264.7, 5 y 8 veces más respectivamente, en relación con las células sin estimular. Cuando la estimulación ocurre vía TLR2/1 (Pam₃CSK₄), TLR2 (HKLM y LTA) y TLR2/6 (FSL-1), el incremento en la liberación de AA es de 3 veces el control, mientras que vía TLR7 (imiquimod y gardiquimod) la respuesta es casi dos veces el basal en RAW 264.7 y muy baja en P388D₁.

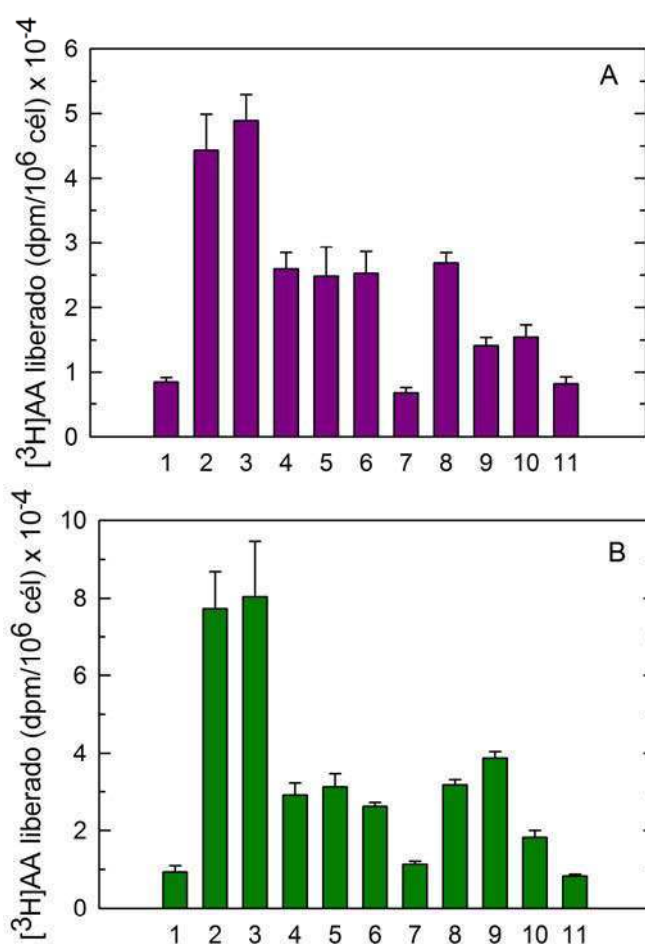


Fig. 14. Liberación de ácido araquidónico por agonistas de TLRs en P388D₁ y RAW 264.7. Las células, P388D₁ (A) o RAW 264.7 (B), se marcaron con [³H]AA antes del tratamiento con los agonistas durante 20 h y la liberación de AA se estimó mediante contaje radiactivo. 1. Ctrl, 2. LPS (100 ng/ml), 3. Poli IC (25 µg/ml), 4. Pam₃CSK₄ (1 µg/ml), 5. HKLM (10⁸ cél/ml), 6. LTA (1 µg/ml), 7. Flagelina (50 ng/ml), 8. FSL-1 (1 µg/ml), 9. Imiquimod (5 µg/ml), 10. Gardiquimod (1 µg/ml), 11. ODN 1826 (1 µM).

Estos resultados indican que la estimulación vía TLR está asociada a la activación de las fosfolipasas A_2 , siendo la cantidad de ácido araquidónico en respuesta a los agonistas diferente en función del TLR a través del que se produce la activación. Cuando la estimulación se produce vía TLR3 o TLR4, la liberación de ácido araquidónico es muy elevada, lo que sugiere una alta producción de eicosanoides en los macrófagos en respuesta a infecciones virales o bacterianas.

6.2.1.2 Efecto de la inhibición de las fosfolipasas A_2 sobre la liberación de ácido araquidónico

En trabajos previos se ha descrito que cada PLA_2 presente en macrófagos P388D₁ tiene un papel diferente en la activación celular y transducción de señales. Para estudiar la implicación de la $cPLA_2\alpha$, $sPLA_2$ e $iPLA_2$ en la liberación de AA mediada por TLRs, se usaron inhibidores específicos de la actividad de estas enzimas. Las células P388D₁ y RAW 264.7, marcadas con 0,25 μ Ci de [³H]AA, se incubaron con pirrofenona 1 μ M (figura 15), escalaradial 4 μ M (figura 16) o BEL 5 μ M (figura 17) durante 30 minutos antes de añadir los correspondientes estímulos. Tras incubar durante 20 h, se determinó la liberación de ácido araquidónico.

En células P388D₁, la pirrofenona inhibe fuertemente la liberación de AA, indicando que la contribución de la $cPLA_2\alpha$ es clave en este proceso (figura 15A). La contribución de la $sPLA_2$ a la liberación de AA es dependiente del agonista utilizado (figura 16A). Cuando los receptores TLR2, TLR2/1, TLR2/6 y TLR7 son activados, la contribución de la $sPLA_2$ es muy similar a la de la $cPLA_2\alpha$, pero vía TLR3 y TLR4, la contribución de esta familia de enzimas es menor que la de la $cPLA_2\alpha$.

En RAW 264.7 la liberación de AA se bloquea completamente en todos los casos cuando la $cPLA_2\alpha$ es inhibida (figura 15B). La inhibición de la $sPLA_2$ reduce la liberación de AA en menor grado que la inhibición de la $cPLA_2\alpha$, pero su contribución a este proceso es importante a través de los receptores TLR2, TLR2/1, TLR2/6 y TLR7 (figura 16B). La contribución de la $sPLA_2$ en la liberación de AA a través del TLR3 y TLR4 es menor que a través de los otros receptores, siendo similar a la contribución en P388D₁.

A diferencia de la $cPLA_2\alpha$ y la $sPLA_2$, la inhibición de la $iPLA_2$ no tiene efectos significativos en la liberación de ácido araquidónico en ninguna de las dos líneas celulares durante la activación a través de los receptores Toll-like (figura 17).

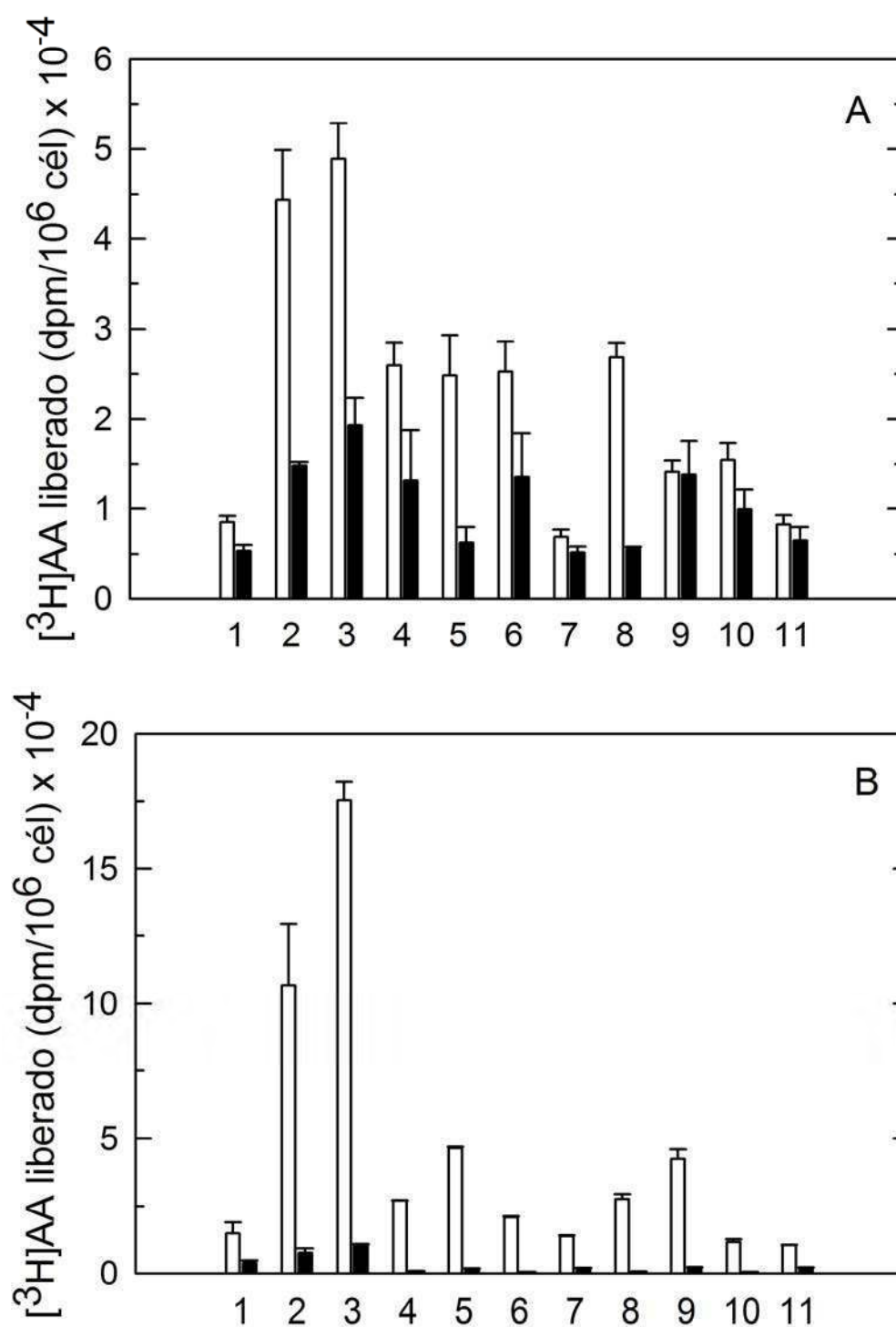


Fig. 15. Efecto de la inhibición de cPLA₂α en la liberación de ácido araquidónico. Las células P388D₁ (A) y RAW 264.7 (B), marcadas con [³H]AA, se incubaron durante 30 min en ausencia (□) o presencia de pirrofenona 1 µM (■) antes de la exposición a los agonistas de TLRs durante 20 h. La liberación de AA se midió en el sobrenadante. 1. Ctrl, 2. LPS (100 ng/ml), 3. Poli IC (25 µg/ml), 4. Pam₃CSK₄ (1 µg/ml), 5. HKLM (10⁸ cél/ml), 6. LTA (1 µg/ml), 7. Flagelina (50 ng/ml), 8. FSL-1 (1 µg/ml), 9. Imiquimod (5 µg/ml), 10. Gardiquimod (1 µg/ml), 11. ODN 1826 (1 µM).

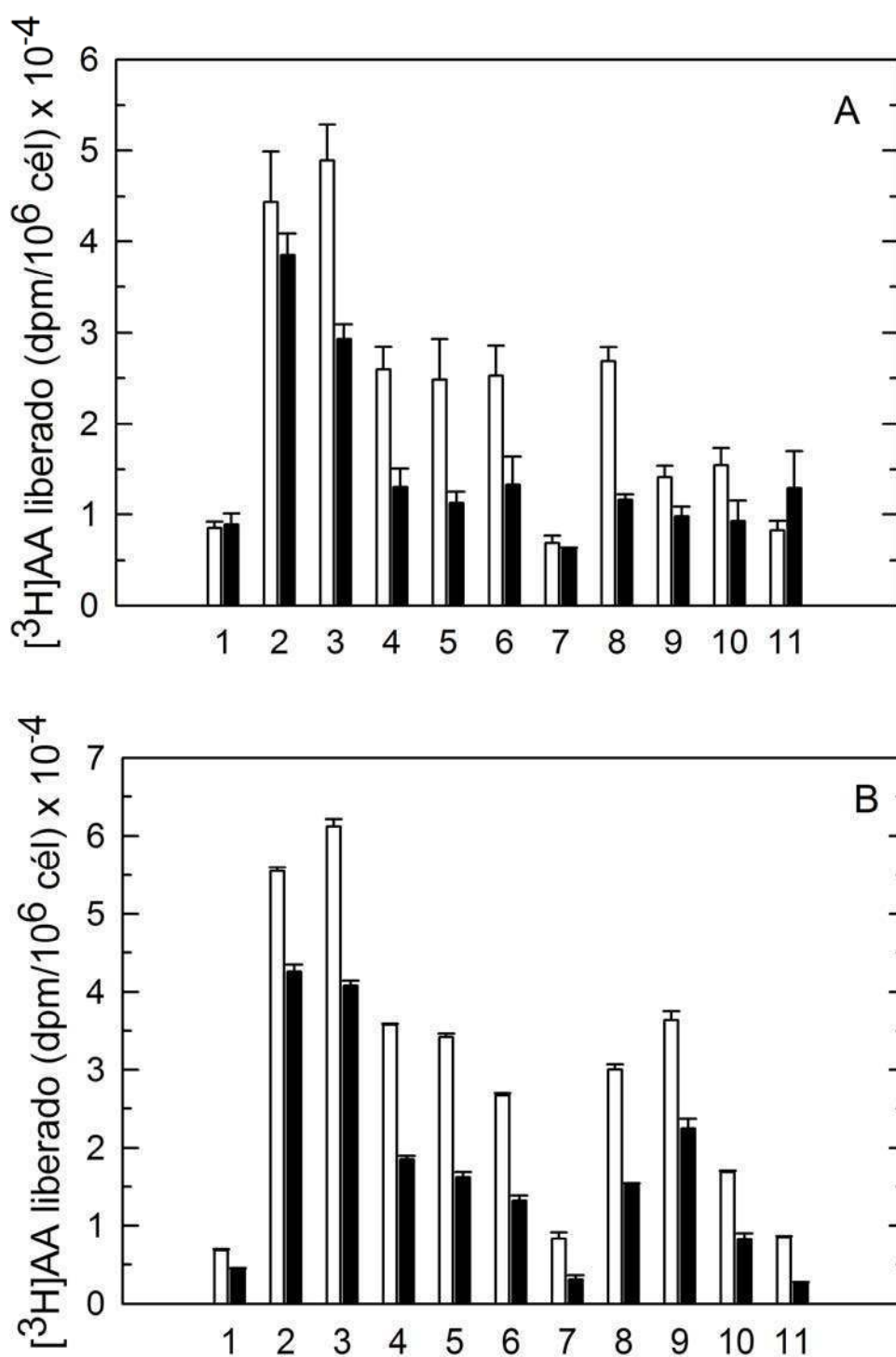


Fig. 16. Efecto de la inhibición de sPLA₂ en la liberación de ácido araquidónico. Las células P388D₁ (A) y RAW 264.7 (B), marcadas con [³H]AA, se incubaron durante 30 min en ausencia (□) o presencia de escaradial 4 µM (■) antes de la exposición a los agonistas de TLRs durante 20 h. La liberación de AA se midió en el sobrenadante. 1. Ctrl, 2. LPS (100 ng/ml), 3. Poli IC (25 µg/ml), 4. Pam₃CSK₄ (1 µg/ml), 5. HKLM (10⁸ cél/ml), 6. LTA (1 µg/ml), 7. Flagelina (50 ng/ml), 8. FSL-1 (1 µg/ml), 9. Imiquimod (5 µg/ml), 10. Gardiquimod (1 µg/ml), 11. ODN 1826 (1 µM).

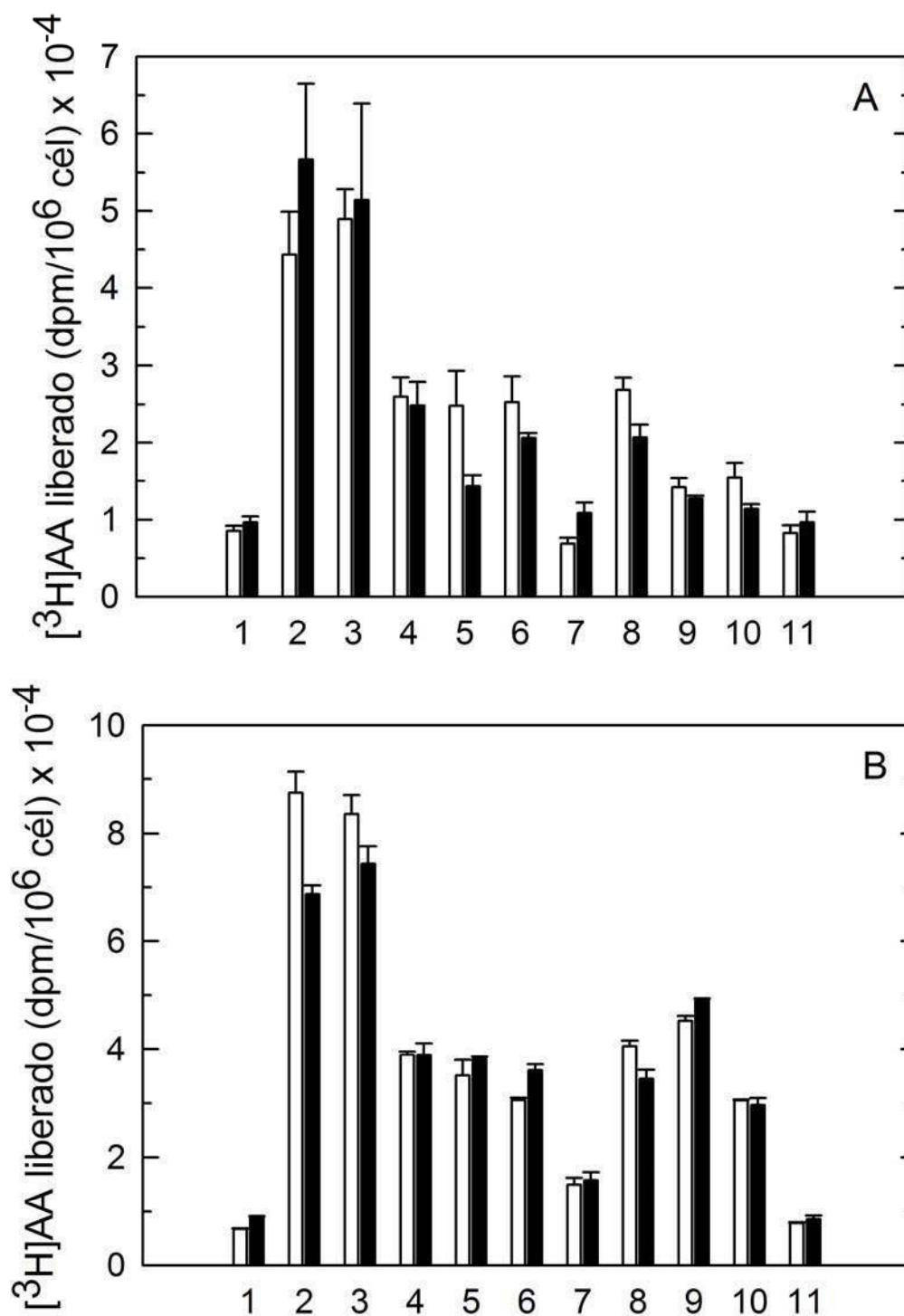


Fig. 17. Efecto de la inhibición de iPLA₂ en la liberación de ácido araquidónico. Las células P388D₁ (A) y RAW 264.7 (B), marcadas con [³H]AA, se incubaron durante 30 min en ausencia (□) o presencia de BEL 5 μM (■) antes de la exposición a los agonistas de TLRs durante 20 h. La liberación de AA se midió en el sobrenadante. 1. Ctrl, 2. LPS (100 ng/ml), 3. Poli IC (25 μg/ml), 4. Pam₃CSK₄ (1 μg/ml), 5. HKLM (10⁸ cél/ml), 6. LTA (1 μg/ml), 7. Flagelina (50 ng/ml), 8. FSL-1 (1 μg/ml), 9. Imiquimod (5 μg/ml), 10. Gardiquimod (1 μg/ml), 11. ODN 1826 (1 μM).

6.2.1.3 Sobreexpresión de sPLA₂-V

Los ensayos utilizando inhibidores químicos tienen limitación para discriminar entre los diferentes tipos de sPLA₂s, por lo que se sobreexpresó la sPLA₂-V mediante la transfección celular de un plásmido que contiene su secuencia. La implicación de la sPLA₂-V en la liberación de AA y producción de prostaglandinas en la línea P388D₁ se ha documentado previamente en respuesta a diversos estímulos. Para estudiar la implicación de la sPLA₂-V en la liberación de ácido araquidónico en procesos de estimulación a través de receptores Toll-like, las células P388D₁ y RAW 264.7 se transfectaron con un plásmido que contiene la sPLA₂ de grupo V unida a GFP o con el plásmido que contiene sólo la GFP como control.

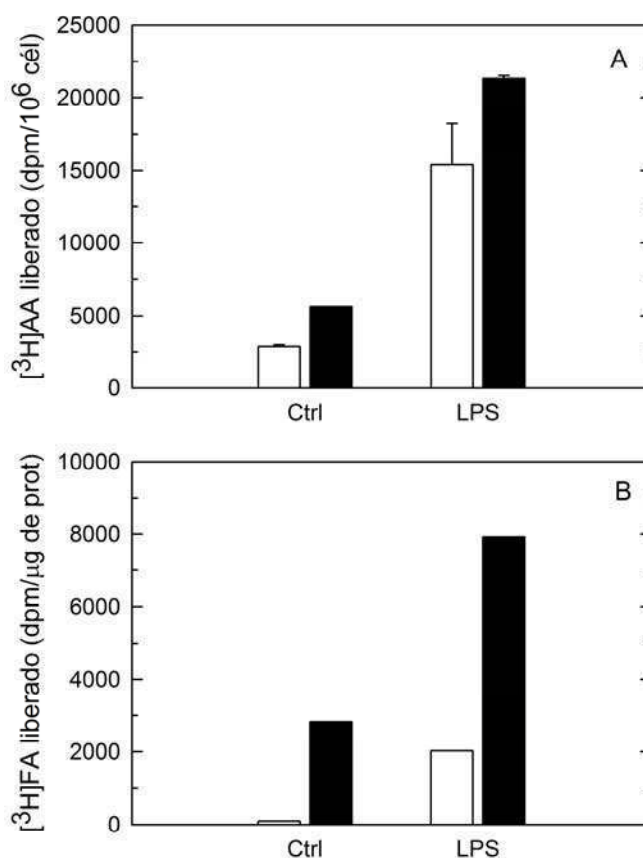


Fig. 18. Sobreexpresión de sPLA₂-V en P388D₁. Las células, transfectadas con GFP (□) o GFP-V (■), se trataron con LPS durante 20 h y se midió la liberación de ácido araquidónico (A) y la actividad sPLA₂ en el sobrenadante (B).

En células P388D₁ se produce un aumento en la liberación de ácido araquidónico y en la actividad enzimática de la sPLA₂-V en el medio extracelular en respuesta a LPS. Este efecto es mucho mayor en células que han sido transfectadas con el plásmido que contiene la sPLA₂-V, confirmando que la enzima transfectada es funcional y puede secretarse al medio extracelular (figura 18).

Debido a que el LPS es capaz de liberar gran cantidad de ácido araquidónico, se analizó esta respuesta en función del tiempo de estimulación en células transfectadas con sPLA₂-V. Las células marcadas con [³H]AA fueron expuestas a 100 ng/ml de LPS durante distintos tiempos y se analizó la liberación de AA en los sobrenadantes. Como se observa en la figura 19, las células que sobreexpresan la sPLA₂-V liberan más ácido araquidónico, especialmente a tiempos largos de estimulación.

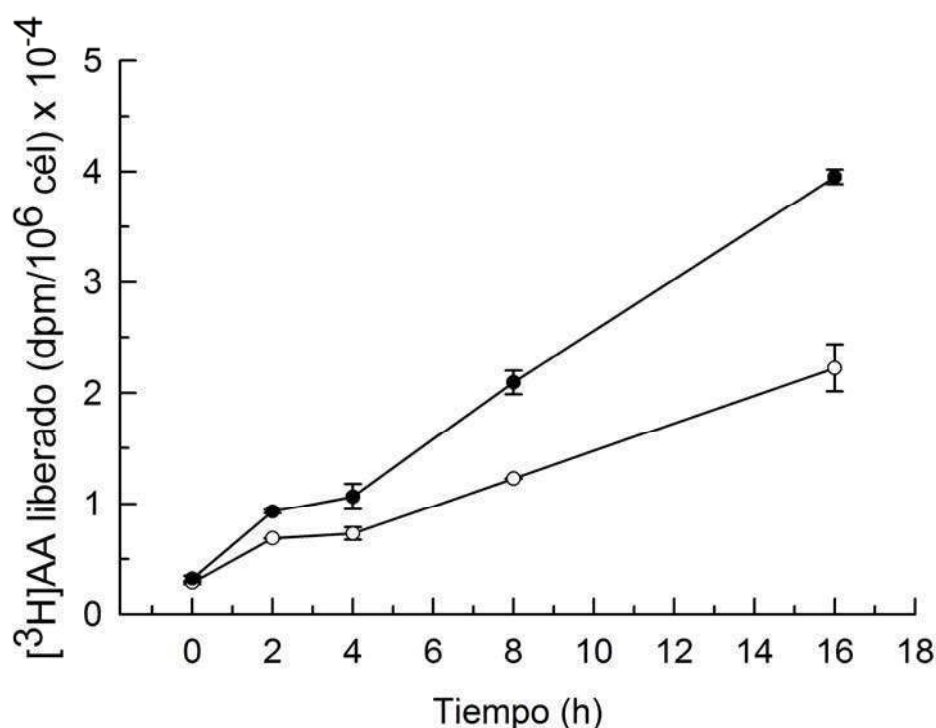


Fig. 19. Efecto de la sobreexpresión de sPLA₂-V en la liberación de AA en P388D₁ estimuladas con LPS. Las células transfectadas con plásmidos conteniendo GFP (□) o GFP-V (■) se marcaron con [³H]AA y se trataron con 100 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados.

También se estudió si este efecto tenía lugar tras estimulación a través del resto de los TLRs. La liberación de ácido araquidónico se midió tras estimulación con los agonistas de TLRs en células control y células que sobreexpresan la sPLA₂-V durante 20 h. Como se muestra en la tabla 10, las células P388D₁ que sobreexpresan la sPLA₂-V presentan un aumento en la liberación de AA con respecto a las células que no sobreexpresan la enzima.

TABLA 10. Incremento de AA liberado en P388D₁ que sobreexpresan sPLA₂-V

Agonista	Concentración	% incremento de AA liberado respecto al control
LPS	100 ng/ml	35
Poli IC	25 µg/ml	38
Pam ₃ CSK ₄	1 µg/ml	38
HKLM	10 ⁸ cél/ml	20
LTA	1 µg/ml	33
Flagelina	50 ng/ml	28
FSL-1	1 µg/ml	31
Imiquimod	5 µg/ml	33
Gardiquimod	1 µg/ml	48
ODN 1826	1 µM	56

Para confirmar el papel de la actividad sPLA₂-V, las células RAW 264.7, control y transfectadas con sPLA₂-V, fueron tratadas con LPS en presencia o ausencia de escalaradial. Las células que sobreexpresan la sPLA₂-V liberan mayores niveles de AA y este efecto puede revertirse pretratando las células con escalaradial 4 µM (figura 20).

En conjunto, los resultados de la sobreexpresión de la sPLA₂-V en ambas líneas celulares implican a esta enzima en la liberación de ácido araquidónico en respuesta a la estimulación a través de receptores Toll-like, asignándole un papel como amplificador en la liberación de AA durante este proceso.

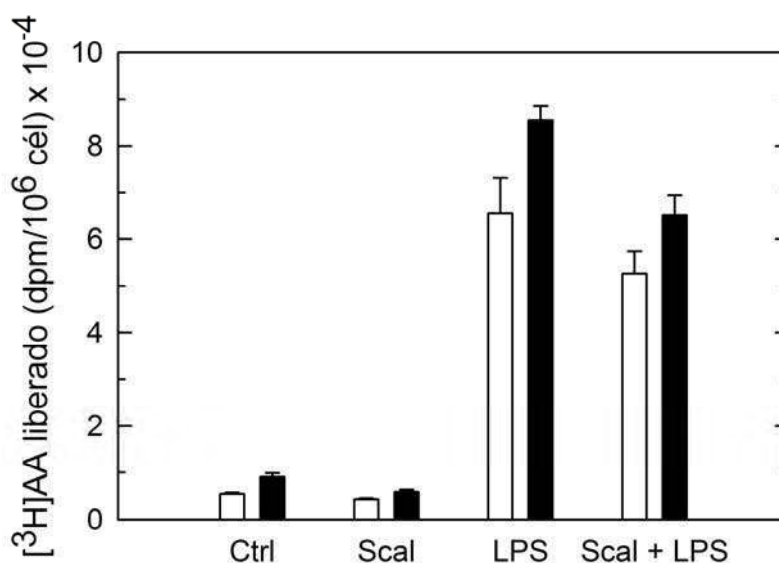


Fig. 20. Efecto de la sobreexpresión de sPLA₂-V en la liberación de AA en RAW 264.7. Las células se transfectaron con el plásmido con GFP (□) o GFP-V (■) y se analizó la liberación de AA en células tratadas con 100 ng/ml de LPS (LPS), escalaradial 4 μM (Scal) o ambos (Scal + LPS).

6.2.2 INDUCCIÓN DE COX-2 A TRAVÉS DE RECEPTORES TOLL-LIKE

En trabajos previos se ha documentado que la expresión de COX-2 se induce en respuesta a estímulos y que las fosfolipasas A₂ juegan un papel importante en esta inducción (Balsinde *et al.*, 1999b). Aunque ambas líneas celulares son macrófagos procedentes de ratón, presentan algunas diferencias respecto a la inducción de COX-2. Como se muestra en la figura 21, en P388D₁, la inhibición de la sPLA₂ produce la inhibición de la expresión de la ciclooxigenasa-2 en respuesta a LPS. Por el contrario, la inhibición de esta enzima en RAW 264.7 no afecta a la expresión de COX-2, lo que indica una regulación diferente de la misma.

Se estudió el efecto de los agonistas de TLRs en la expresión de COX-2 en P388D₁ y RAW 264.7. En la figura 22 se muestra que la expresión de COX-2 se induce en respuesta a la activación vía TLR, aunque el nivel de expresión de esta enzima es distinto dependiendo del agonista utilizado. Los agonistas de TLR5 y TLR9 no indujeron la expresión de COX-2, lo que concuerda con los datos previos obtenidos en la medida de liberación de AA.

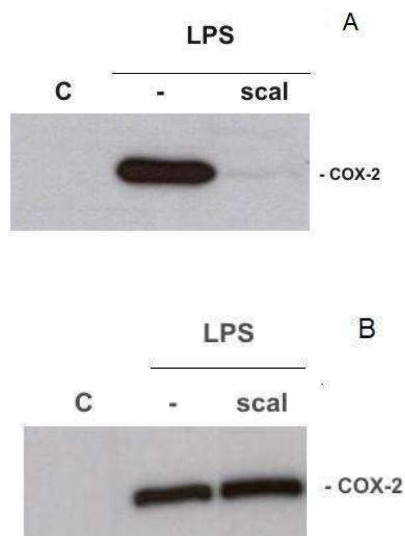


Fig. 21. Expresión de COX-2 en P388D₁ y RAW 264.7. Las células, P388D₁ (A) o RAW 264.7 (B), fueron tratadas con escalaradial 4 μ M en presencia o ausencia de LPS y la expresión de COX-2 se determinó mediante inmunodetección.

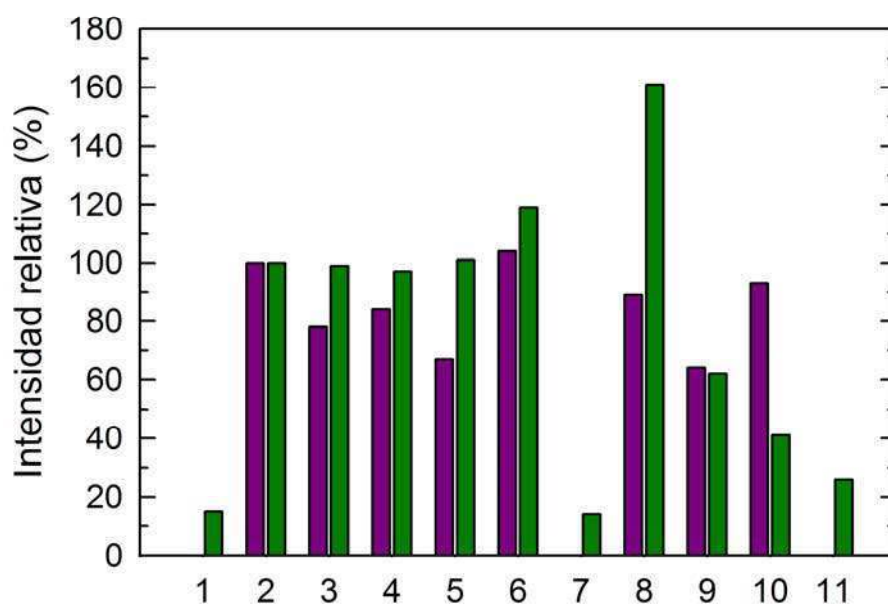


Fig. 22. Inducción de COX-2 a través de receptores Toll-like. Las células, P388D₁ (■) o RAW 264.7 (■), fueron tratadas con agonistas de TLRs durante 20 h y se analizó la expresión de COX-2 por inmunodetección. Los niveles de COX-2 se representan como cuantificación densitométrica de las bandas. 1. Ctrl, 2. LPS (100 ng/ml), 3. Poli IC (25 μ g/ml), 4. Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml), 5. HKLM (10⁸ cél/ml), 6. LTA (1 μ g/ml), 7. Flagelina (50 ng/ml), 8. FSL-1 (1 μ g/ml), 9. Imiquimod (5 μ g/ml), 10. Gardiquimod (1 μ g/ml), 11. ODN 1826 (1 μ M).

6.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2

Estudios previos sugieren que la inducción de COX-2 está regulada por un metabolito derivado de la sPLA₂-V (Bingham *et al.*, 1996; Balsinde *et al.*, 1999b; Shinohara *et al.*, 1999). Para el estudio de la regulación de la expresión de la COX-2 en macrófagos se utilizó la línea P388D₁, estimulando con LPS (TLR4) y poli IC (TLR3), ya que estos estímulos liberan gran cantidad de ácido araquidónico y la expresión de COX-2 se induce fuertemente.

Ensayos previos en P388D₁ establecen que hay un efecto dosis-respuesta en la expresión de COX-2 en respuesta a LPS con un máximo de expresión entre las 12 y 18 horas (Shinohara *et al.*, 1999). Para comprobar el papel de la sPLA₂-V en esta respuesta se midieron los niveles de mRNA de la sPLA₂-V en respuesta a LPS a distintos tiempos mediante PCR cuantitativa, observándose un incremento de la expresión de la sPLA₂-V de manera dependiente del tiempo (figura 23).

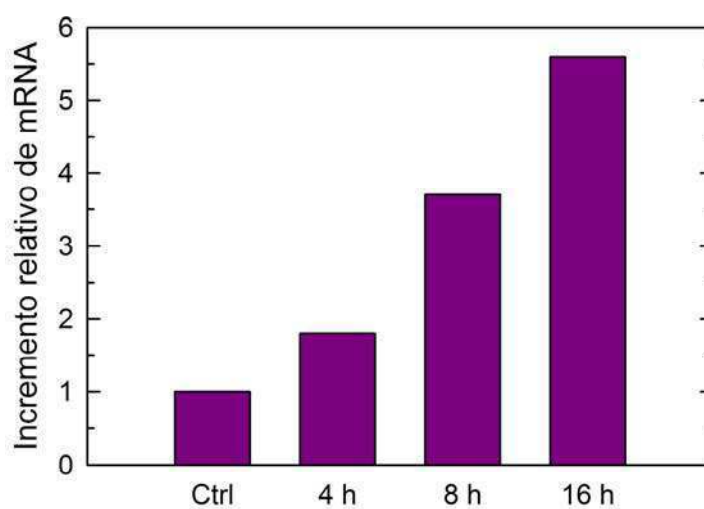


Fig. 23. Incremento de los niveles de mRNA de sPLA₂-V con LPS. El incremento de sPLA₂-V se determinó mediante PCR cuantitativa en células P388D₁ estimuladas con 100 ng/ml de LPS a diferentes tiempos.

La expresión de COX-2 en P388D₁ estimuladas con poli IC se determinó mediante inmunodetección. En este caso también se observa una inducción de COX-2 dependiente de la concentración y del tiempo (figura 24).

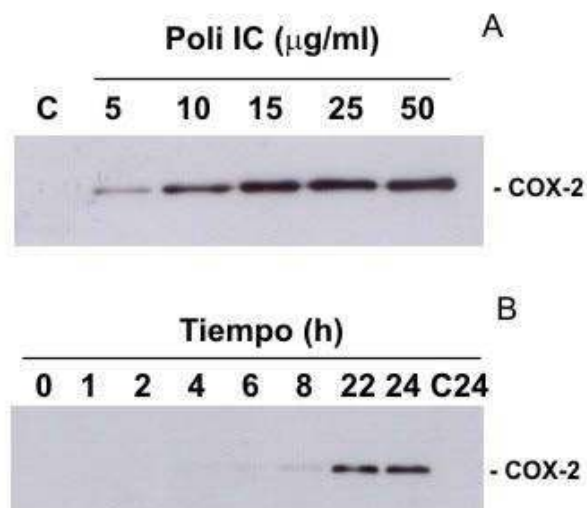


Fig. 24. Efecto del poli IC en la expresión de COX-2. (A), las células P388D₁ fueron tratadas con las concentraciones de poli IC indicadas. La expresión de COX-2 se analizó por inmunodetección. (B), las células fueron tratadas con 25 µg/ml de poli IC durante los tiempos indicados. La expresión de COX-2 se analizó por inmunodetección.

Datos recientes demuestran que, además o en lugar de actuar extracelularmente, algunas sPLA₂s podrían hidrolizar fosfolípidos intracelularmente antes de secretarse al medio extracelular (Ni *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta estos datos se probó el efecto de un inhibidor permeable de la sPLA₂, el escalaradial, en la expresión de COX-2.

Los efectos del escalaradial en la expresión de COX-2 en macrófagos tratados con LPS se muestran en la figura 25. El escalaradial bloquea la expresión de COX-2 de manera dependiente de la concentración. La buena correspondencia entre los efectos del escalaradial en la actividad sPLA₂ (figura 12) y la expresión de COX-2, junto con el hecho de que la actividad de la cPLA₂ no se ve afectada a las concentraciones indicadas, sugiere que la inhibición por escalaradial de COX-2 está relacionada directamente con la inhibición de la actividad celular de la sPLA₂ celular.

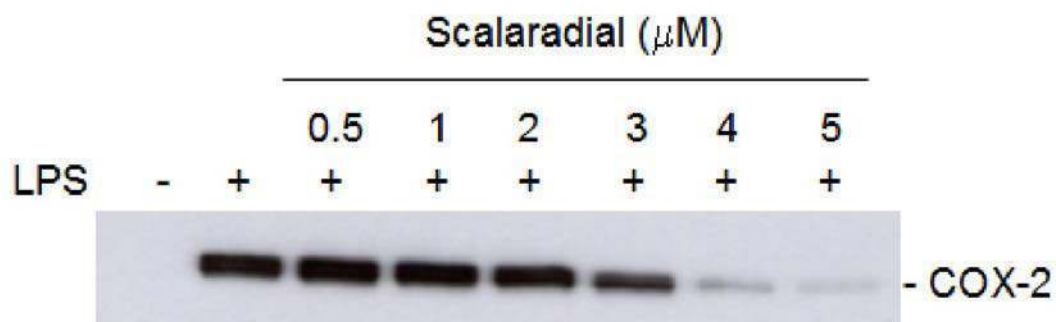


Fig. 25. Efecto del escalaradial en la expresión de COX-2. Las células P388D₁ fueron incubadas con LPS (100 ng/ml) en presencia de distintas concentraciones de escalaradial. Después de 20 h de incubación se analizó la expresión de COX-2 por inmunodetección.

6.3.1 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA sPLA₂-V POR siRNA

Las aproximaciones farmacológicas no permiten distinguir entre diferentes sPLA₂s, por lo que se han probado nuevas estrategias para tratar de bloquear la sPLA₂-V celular de manera más específica, como la inhibición mediante siRNA.

Las células P388D₁ fueron transfectadas con siRNA de sPLA₂-V y expuestas a LPS analizando posteriormente el contenido de COX-2. Al no disponer de un anticuerpo específico para la sPLA₂-V, la eficiencia de la transfección se evaluó mediante ensayos enzimáticos de actividad. El tratamiento con diferentes concentraciones de siRNA inhibe la expresión de COX-2 de manera dependiente de la dosis (figura 26A). La inhibición parcial de la expresión podría deberse a que el siRNA sólo bloquea parcialmente la expresión de sPLA₂, existiendo aún una fracción importante de actividad a 20 nM, la concentración más alta de siRNA utilizada sin pérdida de la viabilidad celular (figura 26B).

Aunque estos resultados sugieren un papel regulador de la sPLA₂-V en la expresión de COX-2, la inhibición mediante siRNA no produce mejora en la inhibición de la expresión con respecto a otros métodos probados anteriormente.

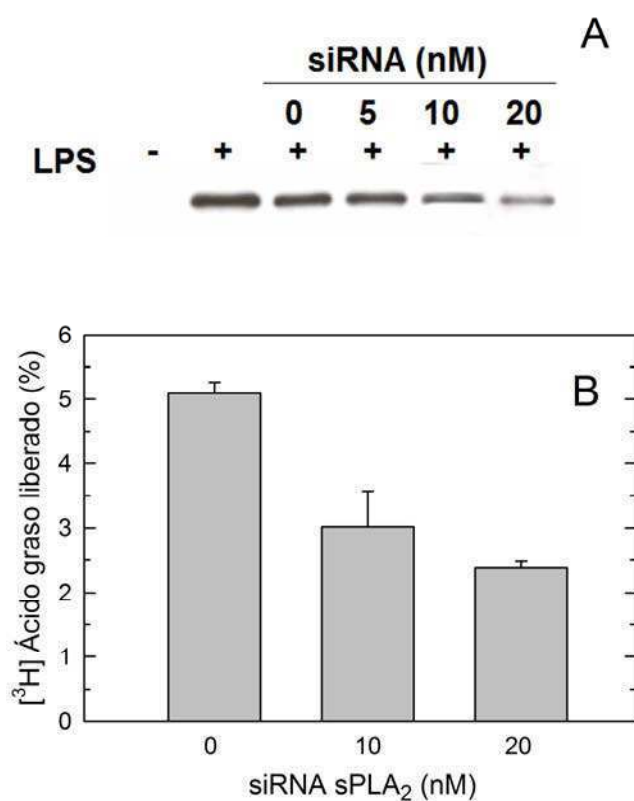


Fig. 26. Inhibición de sPLA₂-V con siRNA. Las células P388D₁ fueron tratadas con las concentraciones indicadas de siRNA contra sPLA₂-V, expuestas a LPS y se analizó la expresión de COX-2 (A). La actividad sPLA₂ en los homogeneizados fue medida como se describe en *Materiales y métodos* (B).

La acción específica del escalaradial se estudió mediante un ensayo en el que las células previamente tratadas con siRNA de sPLA₂-V y, por lo tanto, expresando una menor cantidad de la enzima, fueron expuestas a escalaradial 3 μ M, una concentración que produce poco efecto sobre los niveles de expresión de COX-2 en las células que expresan niveles normales de sPLA₂-V. Como se muestra en la figura 27A, la expresión de COX-2 en respuesta a LPS en células deficientes en sPLA₂-V por el tratamiento con siRNA contra esta enzima disminuye aún más por tratamiento con escalaradial. Por lo tanto, las células que expresan menores niveles de sPLA₂-V requieren menor cantidad de escalaradial para inhibir la expresión de COX-2. Estos datos demuestran que el efecto del escalaradial sobre la expresión de COX-2 ocurre vía sPLA₂-V.

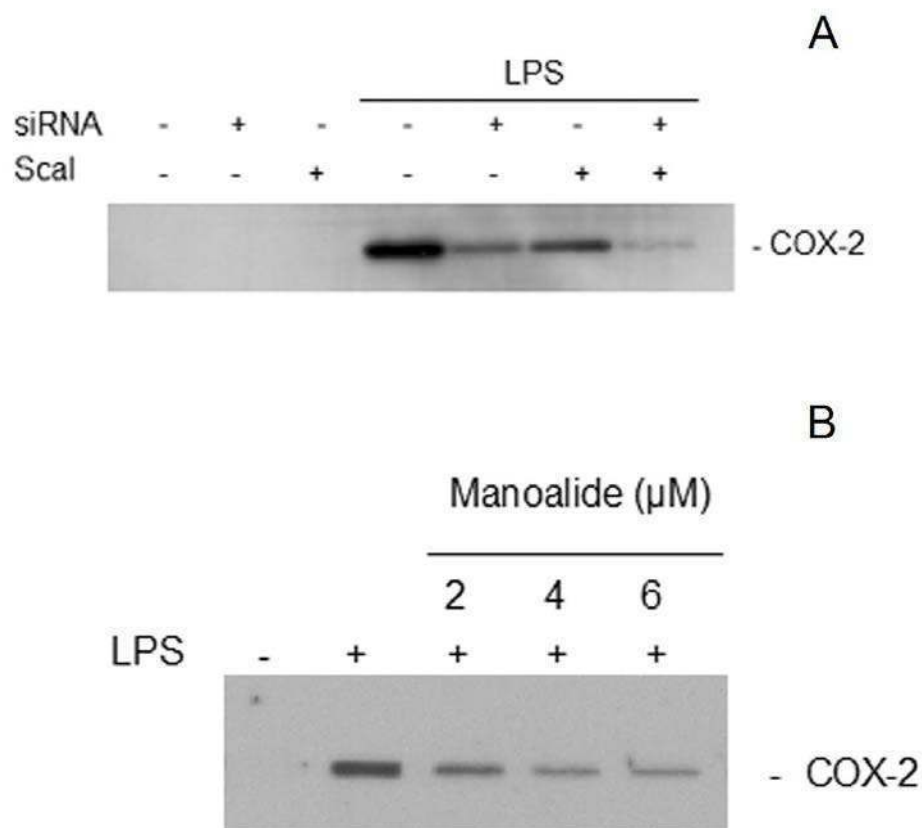


Fig. 27. Inhibición de la expresión de COX-2 con siRNA y escalaradial y manoalide. (A), las células fueron tratadas con siRNA de sPLA₂-V (20 nM) y expuestas a LPS (100 ng/ml) en ausencia o presencia de escalaradial 3 μ M. La expresión de COX-2 se analizó por inmunodetección. (B), las células fueron tratadas con LPS (100 ng/ml) en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de manoalide. La expresión de COX-2 se analizó por inmunodetección.

También se evaluó el efecto del manoalide, otro inhibidor de la sPLA₂ (Lombardo y Dennis, 1985) en la producción de COX-2 inducida por LPS (figura 27B). Este compuesto, a concentraciones que no interfieren con la actividad celular de la cPLA₂, promueve una inhibición de la expresión de COX-2 de manera dependiente de la concentración. Debido a que la estructura del manoalide no tiene relación con la del escalaradial, estos datos dan una evidencia adicional del papel de la sPLA₂ en la regulación de la inducción de COX-2 en respuesta al LPS.

6.3.2 EXPRESIÓN DE COX-2 EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN

Para comprobar que el efecto del escalaradial en la inducción de COX-2 en macrófagos P388D₁ tratados con LPS es relevante fisiológicamente, y no sólo una peculiaridad de la línea celular usada, se realizaron estudios en macrófagos peritoneales de ratón C57BL/6. De acuerdo con los datos obtenidos en P388D₁, el escalaradial inhibe la expresión de COX-2 en macrófagos de ratón tratados con LPS de manera dependiente de la concentración (figura 28A).

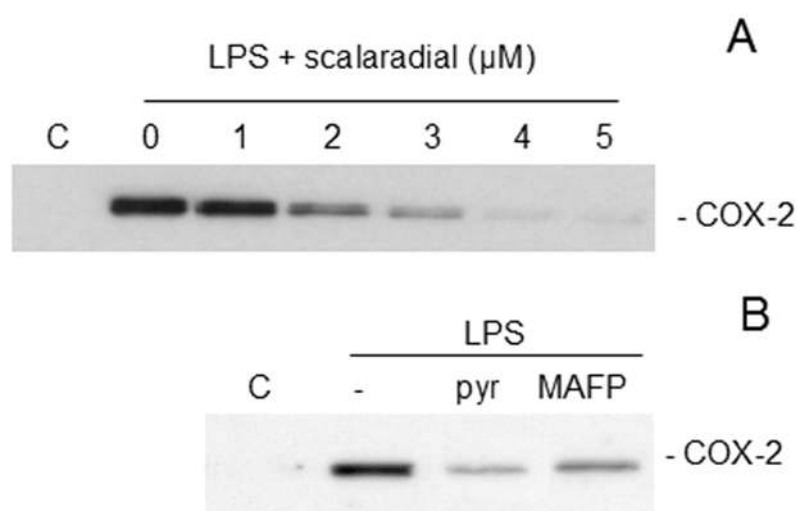


Fig. 28. Expresión de COX-2 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Los macrófagos fueron tratados con LPS (100 ng/ml) durante 20 h en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de escalaradial (A), pirrofenona 1 μM o MAFP 10 μM (B). La expresión de COX-2 fue analizada por inmunodetección.

También se estudió el efecto de la inhibición de la cPLA₂α en la inducción de COX-2 en macrófagos peritoneales de ratón mediante el uso de los inhibidores MAFP y pirrofenona. Aunque el MAFP es un inhibidor dual de cPLA₂/iPLA₂ (Lio *et al.*, 1996), la pirrofenona inhibe específicamente la cPLA₂α. Como se muestra en la figura 28B, ambos inhibidores, usados a una concentración a la que se inhibe completamente la actividad de la cPLA₂, bloquean la producción de COX-2 en macrófagos estimulados con LPS. Esto concuerda con los resultados obtenidos en P388D₁, en los que se necesita una cPLA₂α funcionalmente activa para la inducción de sPLA₂-V y producción de COX-2 en respuesta a LPS (Balsinde *et al.*, 1999b).

6.3.3 EFECTO DEL ESCALARADIAL SOBRE LA LIBERACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN P388D₁ ESTIMULADAS CON LPS

A diferencia de la cPLA₂ α , la sPLA₂-V no hidroliza preferentemente los fosfolípidos que contienen ácido araquidónico, siendo capaz de liberar significativamente otros ácidos grasos como el ácido oleico (Balsinde *et al.*, 2000). Por esta razón, se analizó el efecto de la inhibición de la cPLA₂ α por pirrofenona y de la sPLA₂ por escalaradial sobre la liberación de AA y OA en P388D₁.

La liberación de ácido oleico en P388D₁ inducida por LPS se inhibe utilizando escalaradial, lo que confirma la participación de la sPLA₂. La liberación de ácido araquidónico también se inhibe en estas condiciones con escalaradial en un menor grado, 20-30 % (figura 29). Este nivel de inhibición concuerda con el reciente estudio de Arm y colaboradores en ratones deficientes en sPLA₂-V, que estima que la contribución de la sPLA₂-V a la producción de eicosanoides es de un 35 % (Diaz *et al.*, 2006).

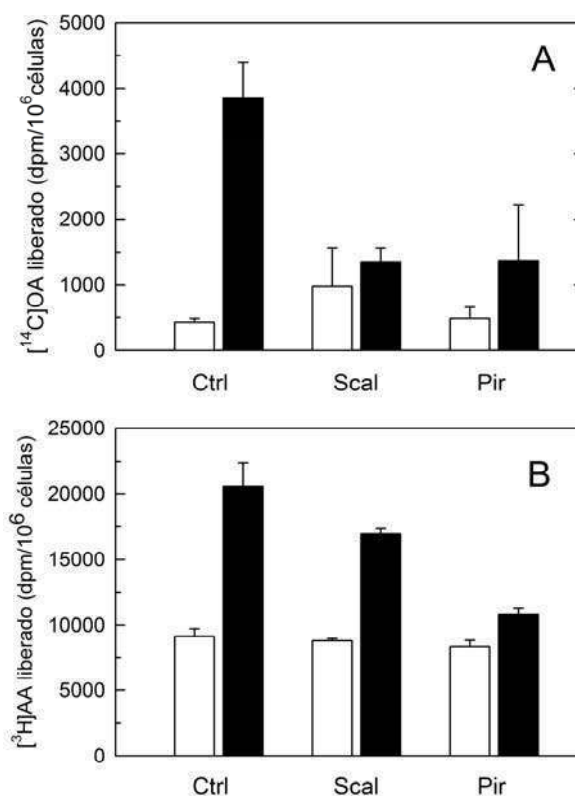


Fig. 29. Efecto del escalaradial y la pirrofenona en la liberación de OA y AA en células estimuladas con LPS. Las células P388D₁ marcadas con [¹⁴C]OA (A) o [³H]AA (B), fueron incubadas durante 20 h en ausencia (□) o presencia (■) de LPS (100 ng/ml), y en ausencia (Ctrl) o presencia de escalaradial 4 μ M (Scal) o pirrofenona 1 μ M (Pir). El contenido en ácido graso libre fue medido en el sobrenadante por conteo radiactivo.

Como se esperaba, la inhibición de la cPLA₂ α por pirrofenona inhibe fuertemente la liberación de ambos ácidos, lo que apoya el hecho de que esta enzima tiene un papel regulador sobre la liberación de ácido oleico y que es el principal efector en la liberación de ácido araquidónico (Han *et al.*, 2003).

6.3.4 IDENTIFICACIÓN DEL METABOLITO DERIVADO DE LA sPLA₂-V IMPLICADO EN LA PRODUCCIÓN DE COX-2

6.3.4.1 Ácidos grasos y metabolitos derivados de ciclooxigenasas o lipoxigenasas

Los resultados anteriores indican que en células P388D₁ estimuladas con LPS se produce la hidrólisis de fosfolípidos mediada por sPLA₂-V y la inhibición de sPLA₂ por escalaradial bloquea la liberación de ácidos grasos y la inducción de COX-2. Para estudiar la posible relación entre los ácidos grasos libres y la expresión de COX-2, se estudió el efecto del tratamiento celular con ácido araquidónico u oleico en la producción de COX-2. La incubación de las células con diferentes concentraciones de estos ácidos (hasta 100 μ M) y durante distinto tiempo (hasta 24 h) no indujo la expresión de COX-2 en células P388D₁ (datos no mostrados).

A continuación se estudió si el efecto inhibitorio del escalaradial sobre COX-2 en P388D₁ estimuladas con LPS podía ser revertido con ácido araquidónico o ácido oleico. Para esto las células fueron incubadas con OA o AA exógeno (hasta 100 μ M), tratadas con LPS, en presencia o ausencia de escalaradial y se analizó la producción de COX-2 mediante inmunodetección. Los ácidos grasos se añadieron 1 h antes o a la vez que el LPS. No se observó reversión de la inhibición por escalaradial de la producción de COX-2 bajo ninguna de las condiciones. Estos resultados indican que los ácidos grasos no son los metabolitos derivados de acción de la sPLA₂-V responsables de la producción de COX-2 (datos no mostrados).

Para estudiar la posible implicación de un metabolito oxigenado del ácido araquidónico, la producción de COX-2 inducida por LPS fue estudiada en presencia de diferentes inhibidores de ciclooxigenasa y lipoxigenasa, indometacina, MK-886, baicaleína, NS-398, ébselen y aspirina (figura 30). Estos compuestos se usaron a diferentes concentraciones y se añadieron 30 minutos antes de la adición del LPS. Ninguno de los inhibidores probados ejercieron efecto sobre la expresión de COX-2, descartando la participación de un metabolito derivado del ácido araquidónico en el proceso.

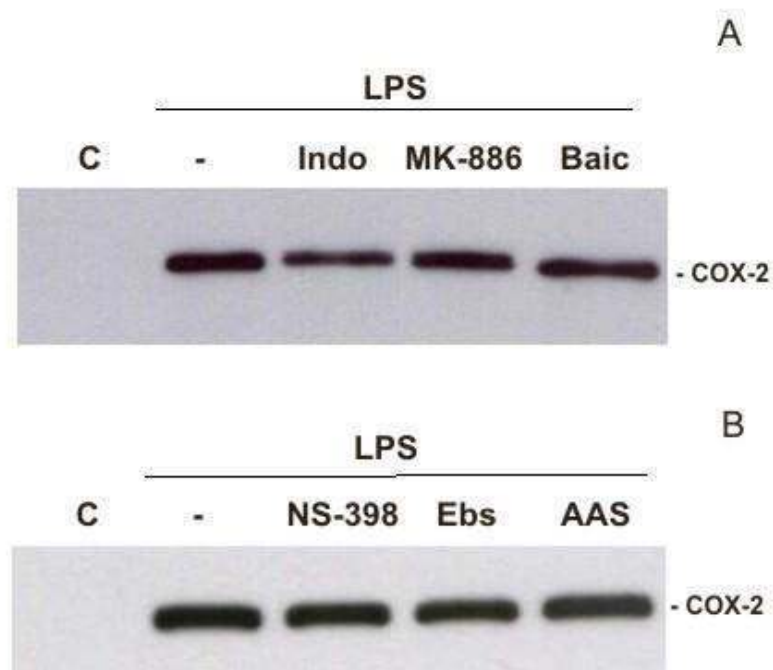


Fig. 30. Efecto de inhibidores de lipoxigenasa y ciclooxigenasa sobre la expresión de COX-2. Las células fueron pretratadas con indometacina 25 μ M, MK-886 10 μ M y baicaleína 10 μ M (A) y con NS-398 5 μ M, ébselen 10 μ M y aspirina 25 μ M (B) durante 30 min y posteriormente expuestas a LPS (100 ng/ml) durante 20 h. El efecto en la expresión de COX-2 se analizó por inmunodetección.

6.3.4.2 Recuperación de la expresión de COX-2

Excluida la participación de ácidos grasos libres o derivados oxigenados del AA en la producción de COX-2 inducida por LPS, se centró la atención en el otro producto de la hidrólisis de fosfolípidos catalizada por sPLA₂, los lisofosfolípidos. Experimentos iniciales indicaron que añadiendo lisofosfolípidos exógenos a las P388D₁ estos eran rápidamente metabolizados por reacciones de acilación o hidrólisis. Para solventar este problema, se utilizó un análogo estable de lisoPC, metil-lisoPC, el cual, debido a sus enlaces éter en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2, no puede ser hidrolizado a glicerofosfocolina o acilado para formar fosfatidilcolina (figura 31).

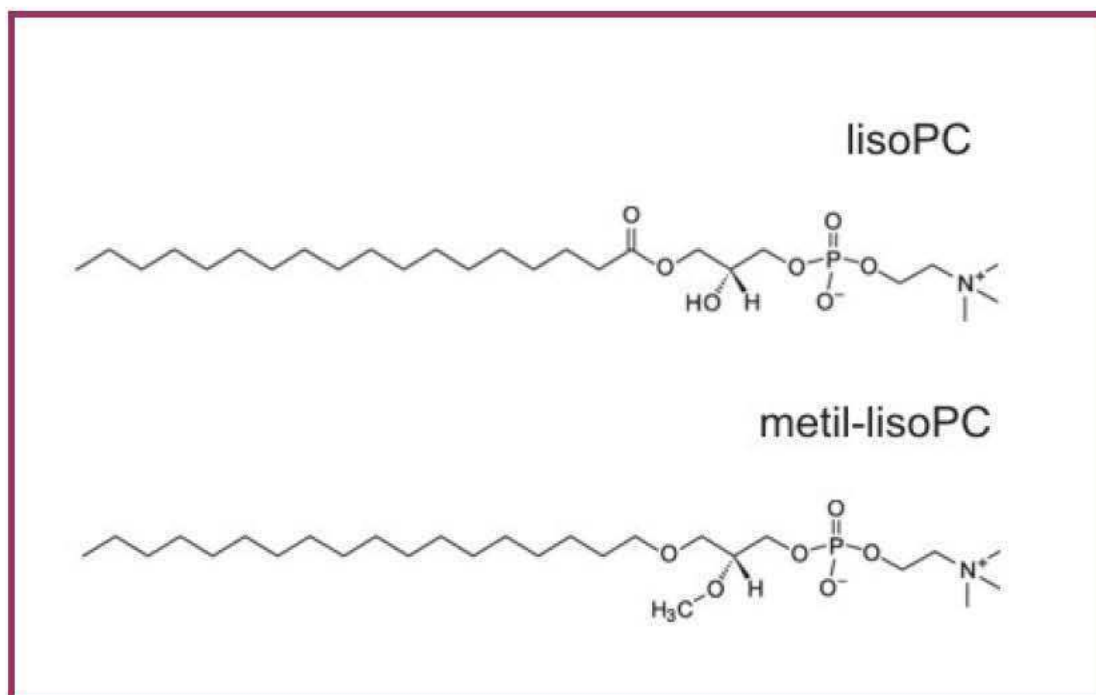


Fig. 31. Estructura de la lisofosfatidilcolina y la metil-lisofosfatidilcolina.

Usando este compuesto, fue posible revertir la acción inhibitoria del escalaradial en la producción de COX-2 inducida por LPS. Como se muestra en la figuras 32A y 32B, a una concentración de 8 μ M, la metil-lisoPC recuperaba la producción de COX-2 inhibida por escalaradial en un 80 %.

Para comprobar que la metil-lisoPC no tiene efectos estimulatorios por sí misma y tampoco es capaz de incrementar la expresión de COX-2 inducida por LPS en ausencia de escalaradial, las células se trataron con LPS en presencia o ausencia de distintas concentraciones de metil-lisoPC y se analizó el efecto sobre la expresión de COX-2. Como se observa en la figura 32C, la metil-lisoPC no induce la expresión de COX-2 por sí misma, ni hay un efecto sinérgico cuando las células se tratan con metil-lisoPC en presencia de LPS.

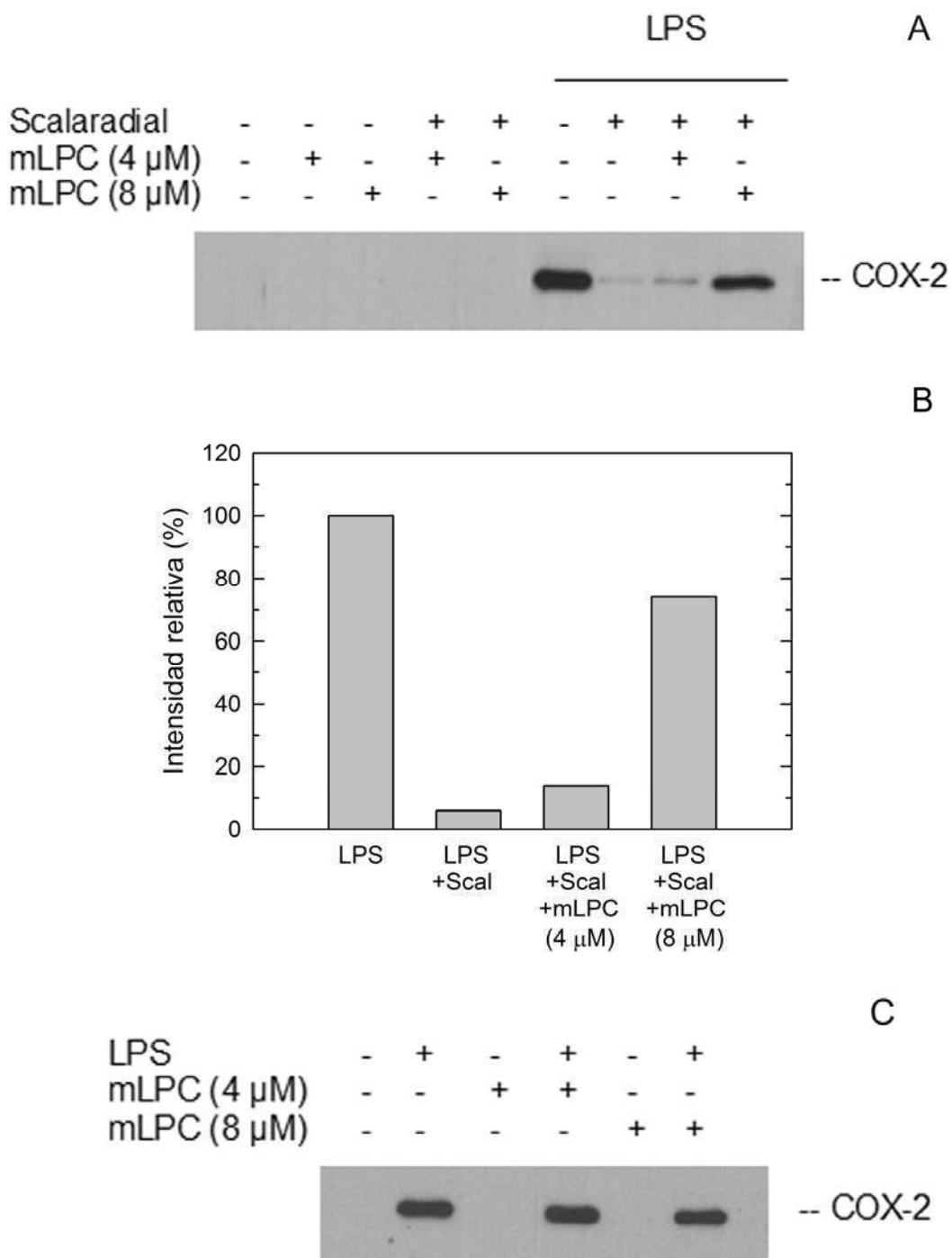


Fig. 32. Recuperación con metil-lisoPC de los efectos inhibitorios del escalaradial sobre la expresión de COX-2 inducida por LPS. (A), las células fueron pretratadas durante 30 min con escalaradial (4 μ M). Se añadió LPS (100 ng/ml) y las concentraciones indicadas de metil-lisoPC y las células fueron incubadas durante 20 h. La producción de COX-2 se determinó por inmunodetección. (B), cuantificación densitométrica de las bandas de A. (C), las células fueron expuestas a LPS (100 ng/ml) y las concentraciones indicadas de metil-lisoPC durante 20 h. La expresión de COX-2 se determinó por inmunodetección.

Para estudiar la acción específica de la metil-lisoPC, se ensayó la capacidad de este compuesto para recuperar la inhibición de COX-2 producida por la pirrofenona al actuar sobre la cPLA₂α en células estimuladas con LPS. A diferencia del escalaradial, la inhibición de COX-2 producida por la pirrofenona no se recupera con metil-lisoPC (figura 33). Estos resultados demuestran que es la lisoPC generada por la sPLA₂-V, y no la producida por la cPLA₂α, la que está específicamente relacionada con la producción de COX-2.

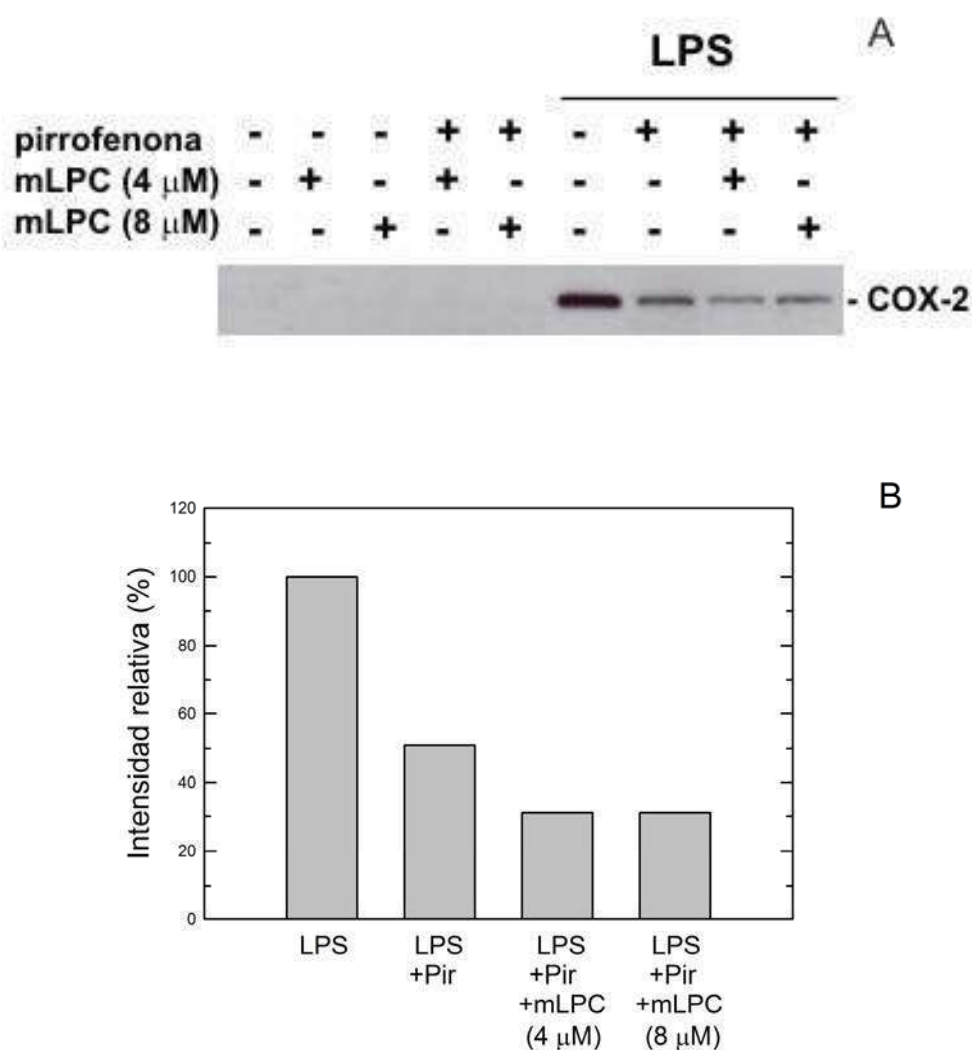


Fig. 33. Recuperación con metil-lisoPC de los efectos inhibitorios de la pirrofenona sobre la expresión de COX-2 inducida por LPS. (A), las células fueron pretratadas durante 30 min con pirrofenona (1 μM). Se añadieron las concentraciones indicadas de metil-lisoPC y LPS (100 ng/ml) y las células fueron incubadas durante 20 h. La producción de COX-2 fue determinada por inmunodetección. (B), cuantificación densitométrica de las bandas en A.

Este ensayo se realizó de la misma manera usando poli IC como estímulo celular para inducir COX-2. En este caso, no hay recuperación de la expresión tras la inhibición de la sPLA₂ ni de la cPLA₂ (figura 34).

Para explorar la posibilidad de que la sPLA₂ generase lisofosfolípidos actuando extracelularmente, los niveles de lisoPC se midieron en el sobrenadante de células estimuladas con LPS, en presencia y ausencia de escalaradial. Para esto, las células se marcaron con 0,5 µCi/ml de [³H]colina durante 2 días (Balboa *et al.*, 2003b; Pérez *et al.*, 2004). Después de los diferentes tratamientos, los lípidos de los sobrenadantes se extrajeron con n-butanol a 4 °C y se separaron mediante cromatografía en capa fina. No se detectaron cantidades significativas de [³H]lisoPC en los sobrenadantes tratados con LPS frente a los no tratados, indicando que la lisoPC no se acumula extracelularmente en estas condiciones (datos no mostrados).

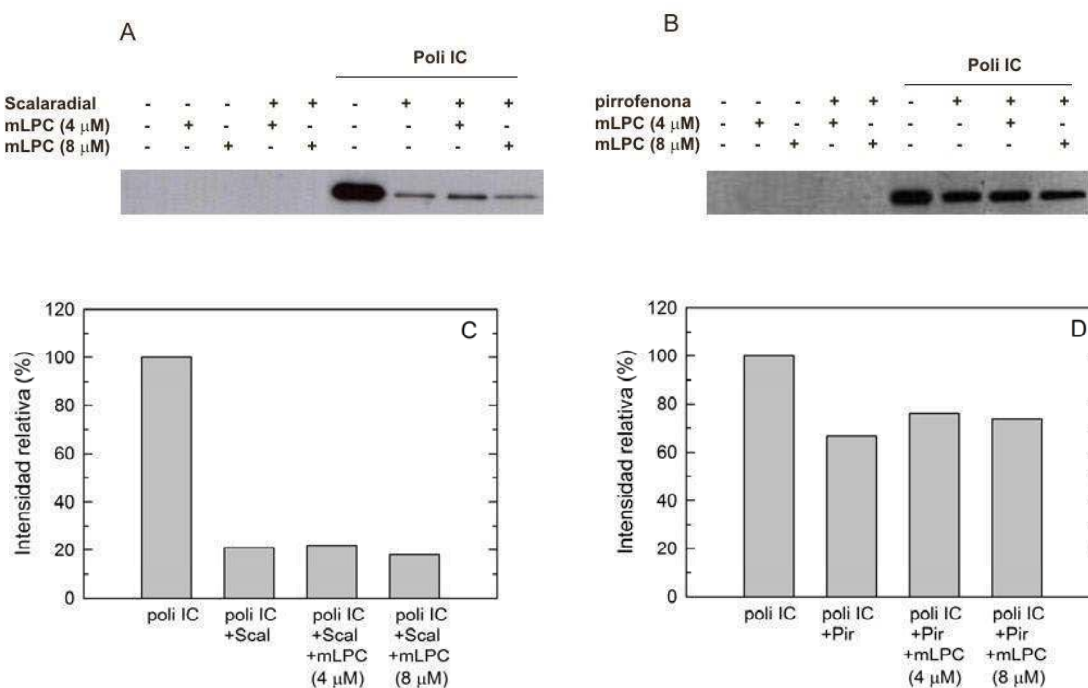


Fig. 34. Recuperación con metil-lisoPC de los efectos inhibitorios del escalaradial y la pirrofenona sobre la expresión de COX-2 inducida por poli IC. Las células fueron pretratadas durante 30 min con escalaradial 4 µM (A) o pirrofenona 1 µM (B). Se añadió poli IC (25 µg/ml) y las concentraciones indicadas de metil-lisoPC y las células fueron incubadas durante 20 h. La producción de COX-2 se determinó por inmunodetección. (C) y (D), cuantificación densitométrica de las bandas en A y B.

Los resultados obtenidos sugieren que la lisofosfatidilcolina está implicada en la ruta de activación de COX-2 a través de la sPLA₂ cuando se activan las células con LPS pero no con poli IC. Por lo tanto, la ruta de activación de la expresión de COX-2 debe ser diferente dependiendo del receptor a través del que se produce la activación.

6.3.4.3 Factores de transcripción implicados en la expresión de COX-2 dependiente de sPLA₂

La regulación de la transcripción de COX-2 en ratón está mediada por diferentes elementos regulatorios distribuidos en la secuencia del promotor de COX-2. El promotor de COX-2 contiene una TATA box clásica, una E-box y sitios de unión para factores de transcripción como NF- κ B, C/EBP, CREB, AP-1 y NF-AT, los cuales se ha demostrado que actúan como elementos reguladores positivos para la transcripción de COX-2 en diferentes tipos celulares (Tazawa *et al.*, 1994; Appleby *et al.*, 1994).

Para estudiar cual de estos elementos está regulando la sPLA₂ en la estimulación de P388D₁ con LPS, se analizó la inhibición de la actividad de factores de transcripción por escalaradial. Mediante un ensayo basado en la técnica de ELISA para factores de transcripción, se midió la actividad de factores de transcripción relacionados con la inflamación, ATF2, CREB-1, c-fos, c-Rel, NF- κ B p65 y NF- κ B p50 en P388D₁ estimuladas y sin estimular y en presencia o ausencia de escalaradial durante 6 h. NF- κ B p65, c-fos y c-Rel se activaron con LPS, pero sólo la actividad de c-Rel se inhibía en células pretratadas con escalaradial 4 μ M y se recuperaba cuando la estimulación con LPS se realizaba en presencia de metil-lisoPC 8 μ M (figura 35).

Estos resultados sugieren que en respuesta a LPS se produce la activación de c-Rel y este factor de transcripción está implicado en la regulación de la expresión de COX-2. El metabolito a través del que se produce la activación de c-Rel es la lisofosfatidilcolina derivada de la acción de la sPLA₂ sobre los fosfolípidos de la membrana celular, ya que tras el tratamiento de las células con el análogo de lisoPC, metil-lisoPC, se produce la recuperación de la actividad de c-Rel previamente bloqueada por escalaradial. En conjunto, estos resultados indican que la sPLA₂ juega un papel clave en la regulación de la expresión de COX-2.

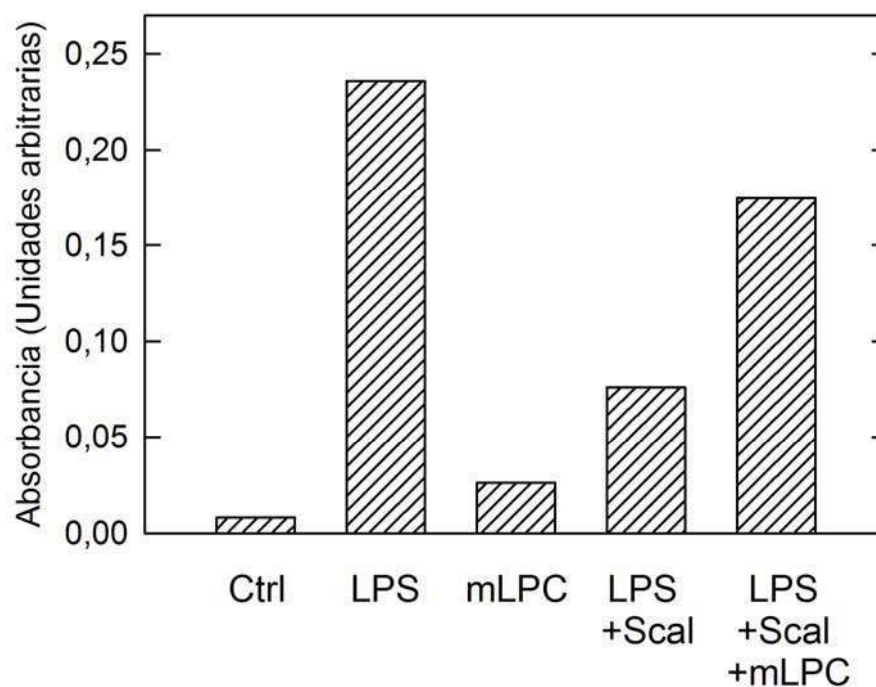


Fig. 35. Recuperación con metil-lisoPC de la actividad transcripcional de c-Rel inhibida por escalaradial en células estimuladas con LPS. Las células fueron pretratadas durante 30 min con escalaradial (4 μ M) y se añadió LPS (100 ng/ml) y metil-lisoPC (8 μ M), manteniendo las células en cultivo durante 6 h. La actividad transcripcional de c-Rel fue medida con un método comercial, como se describe en *Materiales y métodos*.

La expresión de c-Rel se analizó mediante inmunodetección. Tras el tratamiento de las células (pretratadas o no con escalaradial) con LPS solo o en presencia de metil-lisoPC durante 6 h, la expresión de c-Rel se determinó en la fracción celular total en células P388D₁. Los niveles de expresión de este factor de transcripción se inducen por LPS y esa inducción se inhibe con escalaradial. Además, la metil-lisoPC recupera los niveles de expresión inducidos por LPS en célula pretratadas con escalaradial (figura 36).

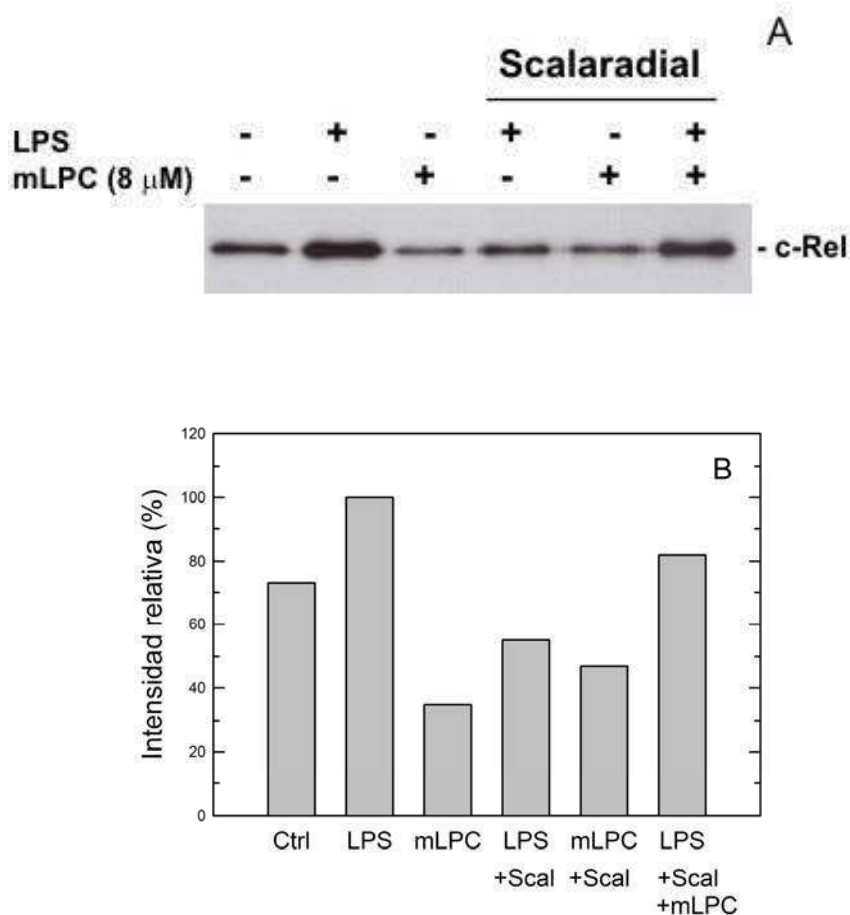


Fig. 36. Efecto del esclaradial en la expresión de c-Rel en la fracción celular total. (A), las células fueron pretratadas durante 30 min con esclaradial (4 μ M). Se añadió metil-lisoPC (8 μ M) y LPS (100 ng/ml) y las células fueron incubadas durante 6 h. La producción de c-Rel fue determinada por inmunodetección. (B), cuantificación de la intensidad de las bandas de A.

Puesto que los factores de transcripción actúan en el núcleo celular se analizó la presencia de c-Rel en esta fracción. Para comprobar el incremento del factor de transcripción c-Rel en la fracción nuclear en respuesta a LPS se separó esta fracción y se analizaron los niveles de c-Rel mediante inmunodetección. Las células se trataron con LPS durante los tiempos indicados, se lisaron y se centrifugó para precipitar los núcleos. Se lisaron los núcleos y se analizó el contenido de c-Rel en ambas fracciones. Como se muestra en la figura 37, los niveles de expresión de c-Rel aumentan en el núcleo en respuesta a LPS y este aumento es dependiente del tiempo.

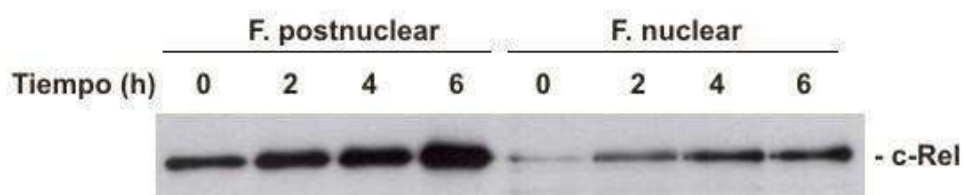


Fig. 37. Expresión de c-Rel en P388D₁ tratadas con LPS. Las células se trataron con 100 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados y se separó la fracción nuclear. La expresión de c-Rel se analizó mediante inmunodetección.

Para comprobar que la expresión de COX-2 y c-Rel está relacionada temporalmente, se determinaron los niveles de expresión de COX-2 y c-Rel en respuesta a LPS en función del tiempo de activación mediante inmunodetección. En la figura 38 se muestra como la expresión de ambas proteínas aumenta, siendo la expresión de c-Rel máxima a partir de las 4 h mientras que la expresión de COX-2 sigue aumentando hasta las 24 h.

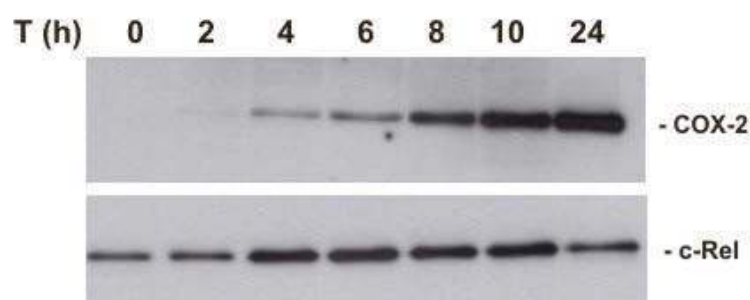


Fig. 38. Tiempo-respuesta de COX-2 y c-Rel con LPS. Las células se trataron con 100 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados y la expresión de COX-2 y c-Rel se midió en la fracción celular total.

Para confirmar que existe una relación entre ambas proteínas se estudió el efecto del radicicol en la expresión de COX-2. El radicicol es un metabolito fúngico que inhibe la actividad transcripcional de c-Rel en macrófagos tratados con LPS, reduciendo la expresión de c-Rel (Jeon *et al.*, 2000). Como se muestra en la figura 39, el radicicol inhibe la producción de c-Rel y COX-2 en paralelo en P388D₁ tratadas con LPS, sugiriendo que ambos procesos están relacionados.

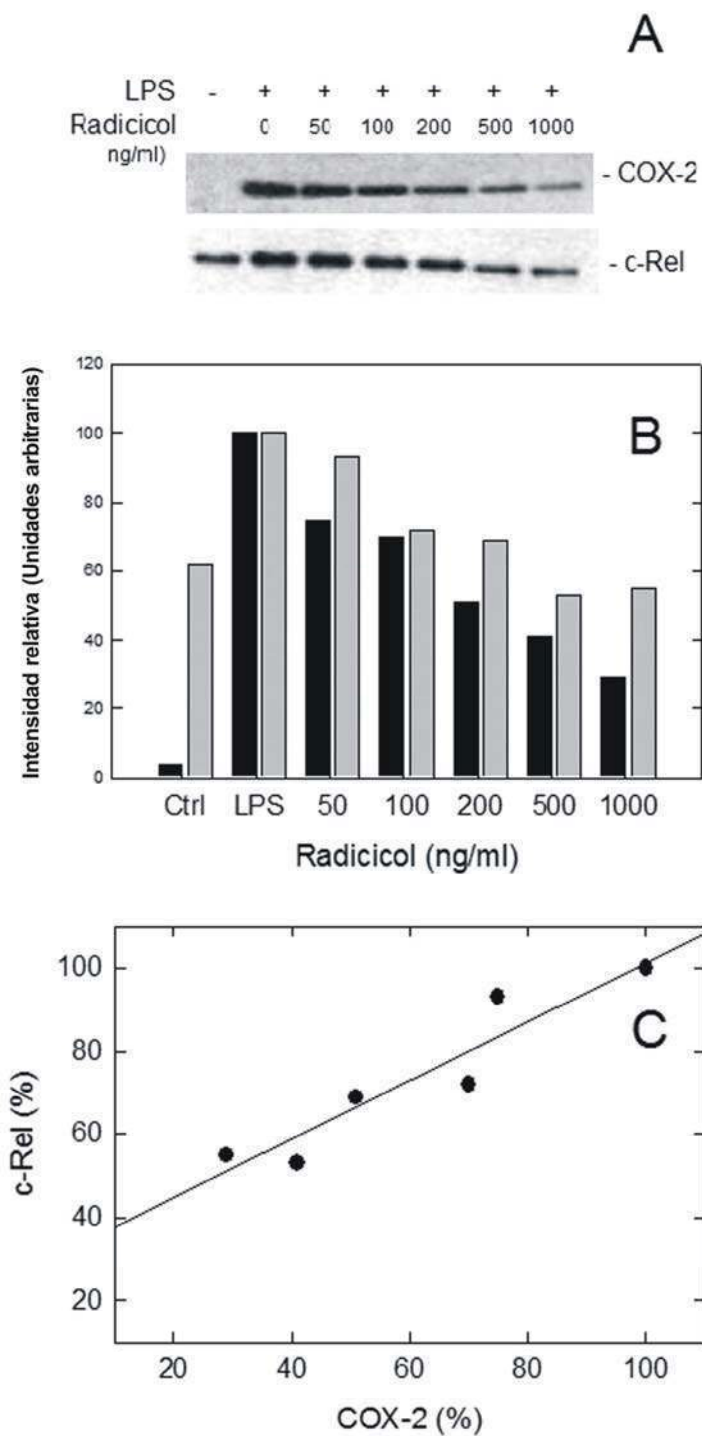


Fig. 39. Efecto del radicalol en la producción de c-Rel y COX-2 en células estimuladas con LPS. Las células fueron tratadas con LPS (100 ng/ml) durante 6 h en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de radicalol. La expresión de COX-2 y c-Rel se determinó por inmunodetección (A). (B), cuantificación densiométrica de las bandas de A, COX-2 (■) y c-Rel (▣). (C), contenido en c-Rel vs. COX-2 a las diferentes concentraciones de radicalol.

6.4 FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y cPLA₂α DURANTE LA ACTIVACIÓN A TRAVÉS DE TLRs

6.4.1 OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE FOSFORILACIÓN

En trabajos previos se ha mostrado que la fosforilación de cPLA₂α es necesaria para la liberación de ácido araquidónico en macrófagos P388D₁, y que esta fosforilación incrementa la actividad específica de la enzima (Balboa *et al.*, 2000). Esta fosforilación se debe a la acción de las MAP quinasas, un grupo de proteínas que fosforilan residuos serina y treonina y que se activan a través de una cascada de fosforilación secuencial en respuesta a estímulos externos. En concreto, se ha descrito que la activación de la ruta de ERK, a través de la que se fosforilan ERK1/2, da lugar a la fosforilación de la cPLA₂α.

En primer lugar, se determinó el tiempo óptimo al que la fosforilación de cPLA₂α y ERK1/2 es máxima en células P388D₁ y RAW 264.7 tratadas con LPS. Las células se preincubaron en medio libre de suero durante 24 h antes de la estimulación para permitir la desfosforilación completa de la cPLA₂α. Los niveles de fosforilación se midieron mediante inmunodetección. Como se muestra en la figura 40, la fosforilación de estas enzimas alcanza su máximo a los 30 minutos de estimulación en ambos tipos celulares.

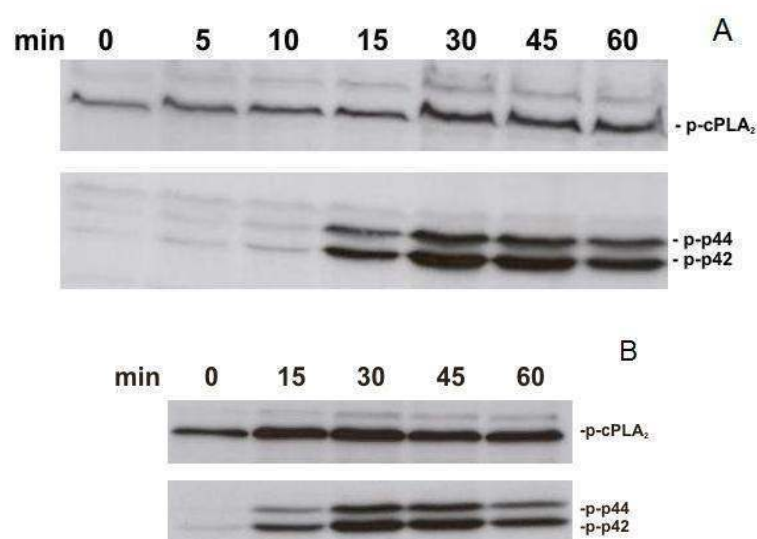


Fig. 40. Fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α en respuesta a activación a través de TLR4. Las células se trataron con 100 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados y la fosforilación se analizó mediante inmunodetección en P388D₁ (A) y RAW 264.7 (B).

6.4.1.1 Fosforilación de ERK1/2 con agonistas de TLRs

Para estudiar la acción específica de la estimulación por TLRs en la activación de ERK1/2, se analizó la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a agonistas de receptores Toll-like. Como se muestra en la figura 41, la activación de TLR2, 3, 4, 2/1, 2/6 y 7 da lugar a la fosforilación de ERK1/2 mientras que los agonistas de TLR5 y TLR9, de acuerdo con los datos obtenidos en la liberación de ácido araquidónico y la expresión de COX-2, no indujeron la fosforilación de estas enzimas.

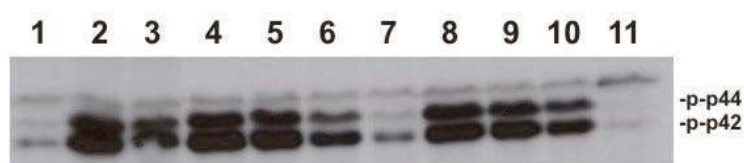


Fig. 41. Fosforilación de ERK1/2 en respuesta a agonistas de TLRs.

Las células P388D₁ se trataron con agonistas de TLRs durante 30 minutos y se analizó la expresión de COX-2 por inmunodetección. 1. Ctrl, 2. LPS (100 ng/ml), 3. Poli IC (25 µg/ml), 4. Pam₃CSK₄ (1 µg/ml), 5. HKLM (10⁸ cél/ml), 6. LTA (1 µg/ml), 7. Flagelina (50 ng/ml), 8. FSL-1 (1 µg/ml), 9. Imiquimod (5 µg/ml), 10. Gardiquimod (1 µg/ml), 11. ODN 1826 (1 µM).

6.4.2 PAPEL DE LA sPLA₂-V EN LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y cPLA₂α

Para investigar el papel de la sPLA₂-V en la estimulación vía TLRs se usó el inhibidor específico de sPLA₂ escalaradial. Como se muestra en la figura 42, la fosforilación de ERK1/2 se inhibe acusadamente por escalaradial y, como se esperaba, los niveles de fosforilación de cPLA₂α decrecen cuando la fosforilación de ERK1/2 esta inhibida. La inhibición de la fosforilación de la cPLA₂α depende del estímulo, 78 % para LPS (TLR4), 100 % para poli IC (TLR3), 66 % para Pam₃CSK₄ (TLR2/1), 95 % para HKLM (TLR2) y 52 % para LTA (TLR2). Aunque los resultados mostrados en las figuras 42A y 42B inducen a pensar que la activación de ERK1/2 está bajo el mismo tipo de regulación, se encontró que la activación de P388D₁ a través de TLR2/6 y TLR7 llevaba a la fosforilación de ERK1/2 pero el escalaradial no era capaz de bloquear esta fosforilación (figura 42C), por lo que parece que esta fosforilación no es dependiente de la actividad sPLA₂.

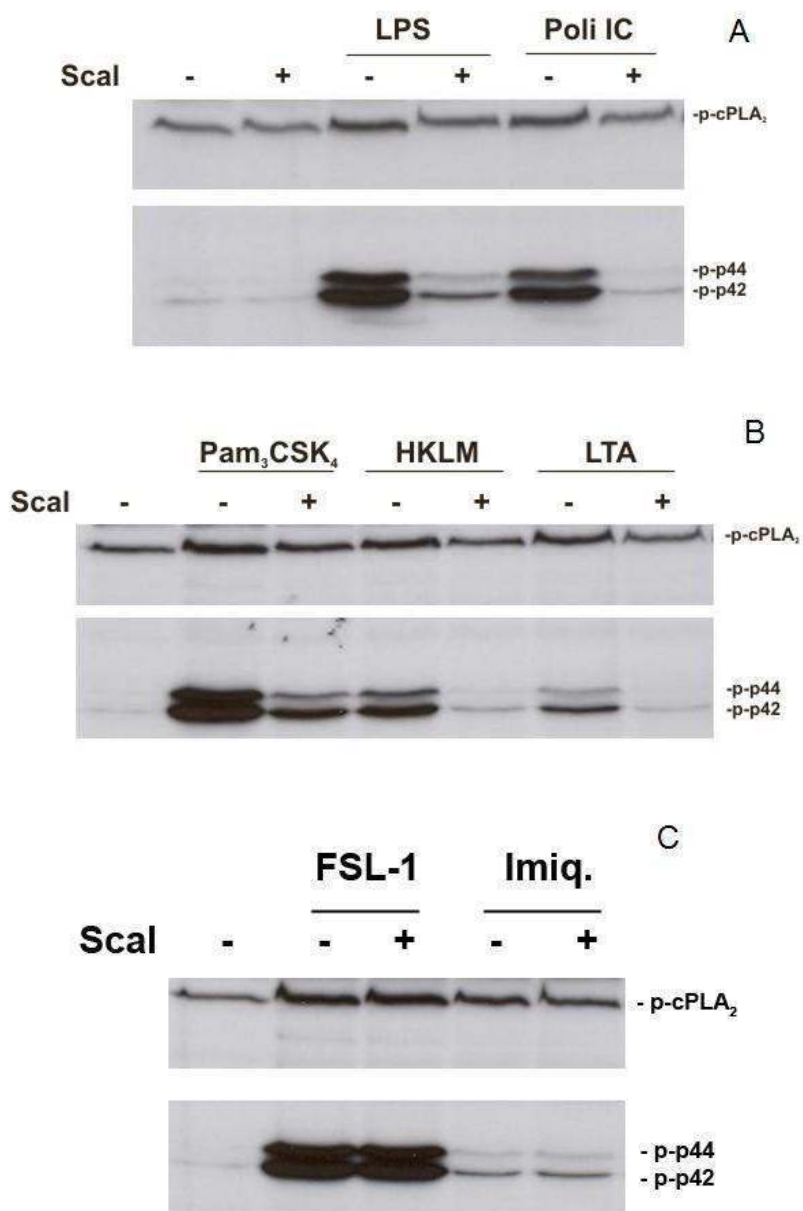


Fig. 42. Efecto de la inhibición de sPLA₂ en la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α. Las células P388D₁ se trataron con escalaradial 4 μM durante 30 minutos antes de añadir los agonistas de TLRs. Los efectos en la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂ se analizaron por inmunodetección.

Para confirmar que este efecto se debe a la inhibición de la actividad sPLA₂, las células se trataron con otro inhibidor de la sPLA₂, manoalide, y un inhibidor específico de la cPLA₂α, pirrofenona. Como se muestra en la figura 43, la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α se bloquea con manoalide.

En resumen, en macrófagos estimulados a través de los TLRs 2, 3, 4, y 2/1, la fosforilación de $cPLA_2\alpha$ está regulada por la fosforilación de ERK1/2 y, durante esta activación, la $sPLA_2$ controla la fosforilación de ERK1/2. Esto no ocurre en el caso del TLR7 y TLR2/6, lo que sugiere otra posible ruta de señalización a través de estos receptores.

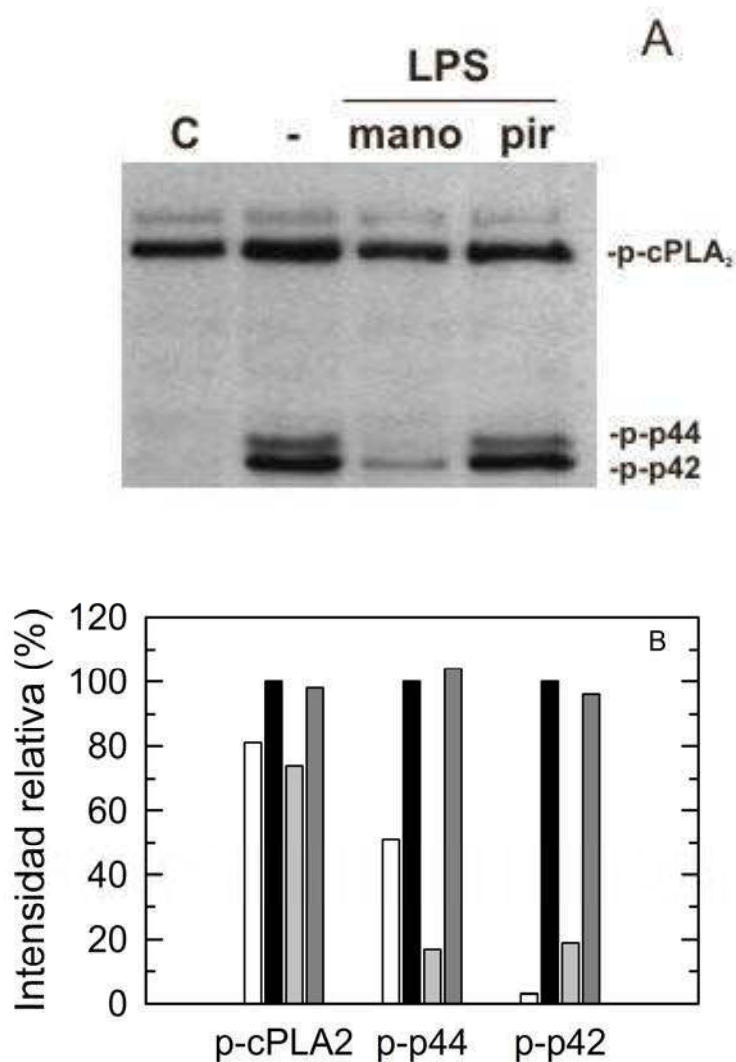


Fig. 43. Efecto de la inhibición de PLA_2 en la fosforilación de ERK1/2 y $cPLA_2\alpha$. (A), las células P388D₁ se trataron con manoalide 4 μ M o pirrofenona 1 μ M, expusieron a 100 ng/ml de LPS durante 30 minutos y se detectó la fosforilación por inmunodetección. (B), cuantificación densitométrica de las bandas en (A), Ctrl (□), LPS (■) manoalide + LPS (▒) y pirrofenona + LPS (■).

6.4.3 FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y cPLA₂ α EN CÉLULAS P388D₁ ESTIMULADAS A TRAVÉS DE TLR4

La implicación de la sPLA₂-V en la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂ α se confirmó mediante la inhibición de la expresión de esta enzima por oligonucleótido antisentido y RNA de interferencia. En primer lugar, las células se transfectaron con oligonucleótido antisentido contra la sPLA₂-V, se estimularon con LPS y se analizaron los niveles de fosforilación de ERK1/2 mediante inmunodetección.

Se realizaron diferentes ensayos, modificando la concentración del oligonucleótido, la densidad celular y otros parámetros que influyen en la eficiencia de transfección. Seguidamente se determinaron las condiciones óptimas para la inhibición de la sPLA₂-V mediante PCR cuantitativa (datos no mostrados).

Como se observa en la figura 44, la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 tras la inhibición de la sPLA₂-V es muy baja, debido a la baja eficiencia de transfección. Aún así, estos resultados sugieren que la sPLA₂-V está regulando la fosforilación de ERK1/2 cuando los macrófagos se activan a través del TLR4 con LPS, confiriendo a esta enzima un papel regulador de la actividad de la cPLA₂ α .

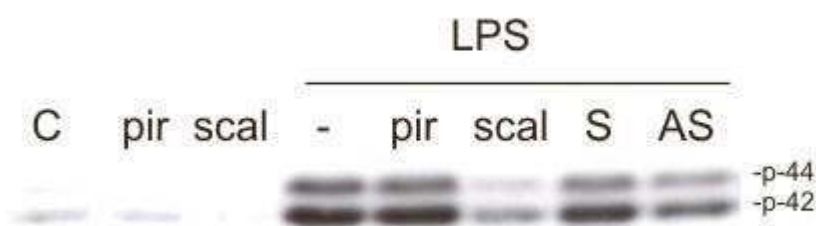


Fig. 44. Inhibición de la fosforilación de ERK1/2 por oligonucleótido antisentido en P388D₁ estimuladas vía TLR4. Las células P388D₁ se transfectaron con oligonucleótido antisentido control (S) o contra sPLA₂-V (AS) y se estimularon con 100 ng/ml de LPS. La fosforilación de ERK1/2 se detectó por inmunodetección.

La inhibición de los niveles de fosforilación de $cPLA_2\alpha$ no se pudo detectar por este método por lo que se analizó la fosforilación de ERK1/2 y $cPLA_2\alpha$ en células transfectadas por nucleofección con siRNA frente a $sPLA_2-V$. La inhibición de la expresión de esta enzima produce una disminución en la fosforilación de ERK1/2, siendo la eficiencia de transfección mayor que cuando se transfectó con oligonucleótido antisentido. Se encontró, además, una inhibición en la fosforilación de $cPLA_2\alpha$ que, mediante cuantificación densitométrica de las bandas se determinó que corresponde a aproximadamente un 20-25 % con respecto a las células estimuladas con LPS (figura 45). Estos resultados confirman el papel de la $sPLA_2-V$ en la regulación secuencial de la fosforilación de ERK1/2 y $cPLA_2\alpha$ en respuesta a la estimulación a través del TLR4.

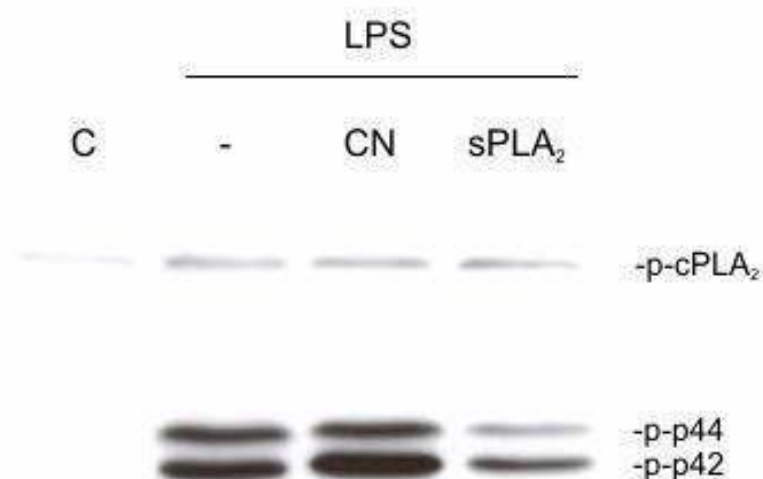


Fig. 45. Inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y $cPLA_2\alpha$ por siRNA en P388D₁ estimuladas vía TLR4. Las células P388D₁ se transfectaron con siRNA 20 nM control (CN) o contra $sPLA_2-V$ ($sPLA_2$) y se estimularon con LPS durante 30 minutos. La fosforilación de ERK1/2 y $cPLA_2\alpha$ se detectó por inmunodetección.

7.1 PERFIL FARMACOLÓGICO EN MACRÓFAGOS

La respuesta inmune innata en células como los macrófagos está asociada con la activación de complejas redes de señalización. Los macrófagos utilizan receptores de reconocimiento de patrones como los receptores Toll-like para desencadenar respuestas antimicrobianas que combaten la infección. El reclutamiento de los TLRs a los fagosomas provee un mecanismo por el que la fagocitosis y las respuestas inflamatorias se pueden asociar (Underhill y Ozinsky, 2002). En macrófagos peritoneales de ratón se ha establecido que, en respuesta a un estímulo fagocítico, la sPLA₂ de grupo V también es reclutada al fagosoma (Balestrieri *et al.*, 2006). En P388D₁ ha sido descrito que la sPLA₂-V colocaliza con la cPLA₂ α y COX-2 durante la estimulación vía TLRs para facilitar la producción de eicosanoides (Balboa *et al.*, 2003c).

En este trabajo se han utilizado 10 agonistas diferentes de receptores Toll-like para definir el papel de las fosfolipasas A₂ en la liberación de ácido araquidónico a través de los distintos receptores. En respuesta a activación a través de TLR2, TLR2/1, TLR2/6, TLR3, TLR4 y TLR7 en P388D₁ y RAW 264.7 se produce liberación de ácido araquidónico en ambas líneas celulares, confirmando el papel de las fosfolipasas A₂. La cantidad de ácido araquidónico liberado y la contribución de cada fosfolipasa A₂ a este proceso pueden variar en función del agonista que produce la activación, lo que sugiere diferentes rutas de activación a través de los distintos receptores. En células de mamífero, diferentes PLA₂ actúan en distintas localizaciones celulares y sobre diferentes reservas de ácido araquidónico (Murakami *et al.*, 1998; Bingham *et al.*, 1999). Aunque existe una regulación separada de estas enzimas hay una interacción funcional que confiere al sistema una eficiente regulación del metabolismo del ácido araquidónico (Shirai *et al.*, 2005). Además, la diferencia en la señalización mediada por la activación a través de TLRs puede modificarse dependiendo del tipo celular y de otros estímulos presentes en el entorno (Gay y Gangloff, 2007). Los agonistas de TLR5 y TLR9 no producen liberación de ácido araquidónico en ninguna de las líneas celulares empleadas. Los resultados obtenidos coinciden con estudios previos en células RAW 264.7 que demuestran la inducción de la generación de eicosanoides en macrófagos con agonistas de TLRs, excepto a través de TLR5, donde no se encontró un aumento en la producción de eicosanoides (Buczynski *et al.*, 2007).

El papel de la flagelina en la activación de la respuesta inmune ha sido descrita en macrófagos peritoneales, implicándola en la producción de citoquinas. En estos estudios, en respuesta a la activación a través de TLR5, se produce una disminución de los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 inducidos por la activación de otros TLRs, mientras que los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-12 incrementan (Vicente-Suárez *et al.*, 2007). Aunque se ha documentado que en respuesta a oligonucleótidos CpG se produce liberación de ácido araquidónico en macrófagos (Lee *et al.*, 2008), no se observó liberación en estos ensayos realizados en P388D₁ y RAW 264.7. Esto podría deberse a diferencias en las líneas celulares o en las condiciones experimentales.

La aproximación más directa para estudiar la implicación de las fosfolipasas A₂ en un proceso es la inhibición de su actividad mediante inhibidores químicos (Balsinde *et al.*, 1999a). El tratamiento de P388D₁ y RAW 264.7 con el inhibidor selectivo de cPLA₂α, pirrofenona, y el inhibidor permeable de sPLA₂, escalaradial, mostró que la contribución de estas fosfolipasas a la liberación de ácido araquidónico depende del TLR activado. No se observaron cambios en la liberación de ácido araquidónico cuando se usó BEL, inhibidor de iPLA₂. El tratamiento con inhibidores de la cPLA₂α, sPLA₂ e iPLA₂ indica que, en estas condiciones, la cPLA₂α es el principal efector en la liberación de ácido araquidónico y la contribución de las fosfolipasas A₂ secretadas es dependiente del agonista de TLR a través del que se produce la activación. Su contribución a la liberación de ácido araquidónico sugiere un papel amplificador de las PLA₂ secretadas en este proceso.

La sobreexpresión enzimática se ha utilizado para dilucidar el papel de la sPLA₂-V en la liberación de ácido araquidónico ya que los inhibidores químicos no permiten diferenciar entre las distintas clases de sPLA₂. La sobreexpresión de sPLA₂-V en P388D₁ y RAW 264.7 produce un aumento en la liberación de ácido araquidónico, confirmando el papel de esta enzima en el proceso.

Como se ha descrito en trabajos previos, la iPLA₂ no participa en la liberación de ácido araquidónico, incluso, se encuentra que los niveles de ácido araquidónico liberado aumentan con la inhibición de la iPLA₂. Hay que destacar que el ácido graso libre puede generarse también por rutas alternativas independientes de iPLA₂ que puede ser significativo en algunos casos, como en el caso de la inhibición de la reutilización de ácidos grasos (Balboa y Balsinde, 2006).

En este estudio, se ha analizado la expresión de ciclooxigenasa-2 en respuesta a la activación a través de TLRs, y como se esperaba, cuando hay liberación de ácido araquidónico, hay un incremento de la expresión de COX-2, lo que sugiere que se induce la expresión de esta enzima para la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico liberado.

En conjunto estos resultados sugieren un modelo de activación de macrófagos a través de receptores Toll-like que implica la activación de la cPLA₂ α y la sPLA₂-V. La activación con agonistas de TLR2, 2/1, 2/6, 3, 4 y 7 induce la liberación de ácido araquidónico mediada principalmente por la cPLA₂ α y donde la sPLA₂-V participa amplificando esta señal de manera dependiente del TLR a través del que se produce la activación. Adicionalmente, esta activación lleva asociada la inducción de la expresión de ciclooxigenasa-2 (figura 46).

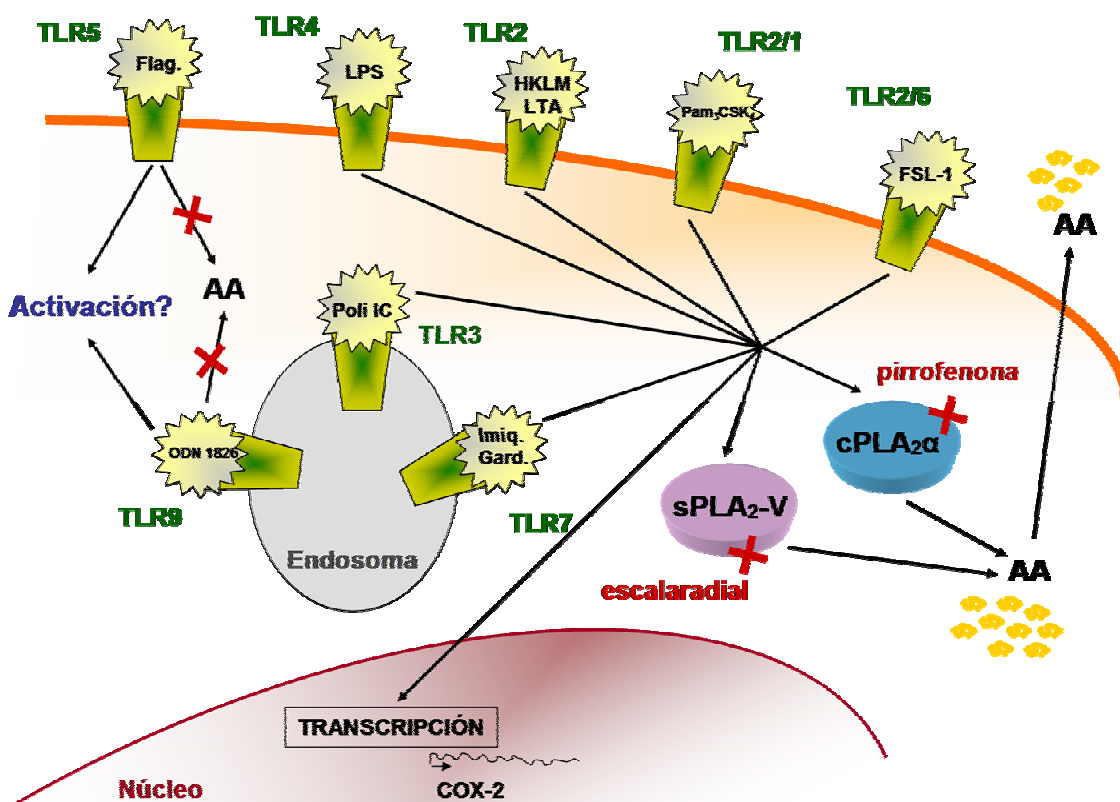


Fig. 46. Esquema de liberación de ácido araquidónico e inducción de COX-2 en P388D₁ y RAW 264.7 a través de receptores Toll-like.

7.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2

En estudios previos se ha demostrado que la generación tardía de eicosanoides en respuesta a LPS en la línea celular P388D₁ lleva varias horas e implica la síntesis *de novo* de las dos enzimas reguladoras implicadas, sPLA₂-V y COX-2 (Shinohara *et al.*, 1999; Balsinde *et al.*, 1999b). La expresión elevada de estos dos efectores puede prevenirse inhibiendo la actividad cPLA₂ α , lo que indica el papel clave que la cPLA₂ α juega como regulador principal de la producción de eicosanoides en macrófagos tratados con LPS.

La expresión de COX-2 también se bloquea si se inhibe la actividad sPLA₂-V. Por lo tanto, la sPLA₂-V tiene dos papeles diferentes durante la respuesta de generación de eicosanoides tardía: incrementa los niveles de ácido araquidónico libres hidrolizando los fosfolípidos que contienen araquidónico, lo que deriva en la formación de eicosanoides y, alternativamente, amplifica la liberación de eicosanoides regulando directamente la producción de COX-2.

En los estudios realizados en este trabajo, en células P388D₁ el inhibidor permeable escalaradial inhibe fuertemente la expresión de COX-2 y la liberación de ácido oleico, y bloquea en menor grado la liberación de ácido araquidónico. Estos datos sugieren que, bajo estas condiciones, la sPLA₂-V amplifica la respuesta tardía de eicosanoides mediada por LPS, debido principalmente a su efecto sobre la expresión de COX-2. En ensayos realizados con escalaradial en RAW 264.7 se observa que la inhibición de la sPLA₂-V en esta línea celular no inhibe la expresión de COX-2. Estos datos coinciden con los obtenidos en estudios recientes por Arm y colaboradores (Diaz *et al.*, 2006), donde la sPLA₂-V endógena regula la expresión de COX-2 y la generación de PGD₂ de forma diferente dependiendo de la cepa de ratón. Estos ensayos se realizaron en mastocitos de ratones en los que el gen que codifica para la sPLA₂-V está interrumpido. Por lo tanto, estos resultados proporcionan una sólida evidencia de que, dependiendo de la base genética, existen dos fenotipos atendiendo a la implicación de la sPLA₂-V en la generación de eicosanoides.

Las pruebas farmacológicas y genéticas (oligonucleótidos antisentido) en estudios previos indicaban que se requiere la actividad enzimática de la sPLA₂-V para la inducción de COX-2 (Balsinde *et al.*, 1999b), sugiriendo la participación de un metabolito derivado de la sPLA₂-V en este proceso.

Un problema en estos estudios es el hecho de que estas estrategias sólo inhiben parcialmente la sPLA₂. Esto añade complejidad a la búsqueda del metabolito implicado, ya que los niveles restantes del metabolito también podrían producir efectos biológicos, como sugiere el hecho de que la inhibición de COX-2 en estas condiciones es siempre incompleta.

Para solventar este problema, se utilizaron nuevas estrategias para bloquear la actividad sPLA₂-V. Se utilizó RNA de interferencia contra la sPLA₂-V. El uso del siRNA no produce una inhibición completa de la sPLA₂-V y, aunque se observa una disminución en la expresión de COX-2, no se consigue la inhibición total de esta enzima, por lo que, en este caso, la tecnología del siRNA no produce ninguna mejora sobre los anteriores métodos.

Trabajos recientes han dado lugar a la posibilidad de que la sPLA₂-V actúe en el interior de las células durante la secreción en lugar de actuar fuera de la célula cuando la secreción ha ocurrido (Mounier *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos autores sugieren que el papel de la sPLA₂-V en la movilización de ácido araquidónico debe ser investigado antes o durante la secreción de la enzima. En estudios previos se utilizó un derivado impermeable en la célula, LY311727, inhibidor que no produjo efectos cuantitativos en la inducción de COX-2, por lo que se supuso que podría actuar solamente en la fracción de sPLA₂ que se encontraba fuera de la célula pero no en la enzima que actuaba dentro, antes o durante la secreción (Balsinde *et al.*, 1999b). Para comprobar esta hipótesis se usó el inhibidor permeable escalaradial. Este compuesto a concentraciones bajas, 4 µM, es capaz de bloquear completamente la actividad de la sPLA₂ e inducir una fuerte inhibición de la expresión de COX-2 (aprox. 90 %). En conjunto, estos resultados coinciden con el papel intracelular de la sPLA₂ en la inducción de COX-2.

Como recientemente se ha discutido (Ni *et al.*, 2006), los investigadores han asumido que la sPLA₂ funciona fuera de la célula. Esta asunción se debe principalmente a los descubrimientos que mostraron niveles altos de sPLA₂ en exudados inflamatorios y las propiedades bioquímicas de la proteína, en particular su alto contenido en puentes disulfuro. Los fagocitos circulantes secretan cantidades significativas de sPLA₂ (Balsinde *et al.*, 1988; Degousee *et al.*, 2002), las cuales eventualmente se pueden asociar con las membranas celulares de las células de origen o vecinas, y/o ser reinternalizadas para ejercer acciones hidrolíticas en diversos sitios celulares (Balboa *et al.*, 2003c; Murakami *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2002). La habilidad de la sPLA₂-V para actuar en células vecinas hidrolizando

los fosfolípidos en condiciones fisiológicas ha sido demostrada sin ninguna ambigüedad (Kim *et al.*, 2002a; Wijewickrama *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006).

La sPLA₂-V extracelular puede promover la movilización de ácido araquidónico en células carentes de cPLA₂ α , lo cual indica que, a pesar de los efectos secundarios en cPLA₂ α , la sPLA₂-V hidroliza fosfolípidos y produce lisoPC directamente (Muñoz *et al.*, 2003). Estos resultados demuestran la acción intracelular de la sPLA₂-V antes de la secreción, dando lugar al concepto de que existen múltiples sitios y modos de acción para la sPLA₂-V en las células. El hecho de que la sPLA₂-V funcione en células vecinas a través de un mecanismo paracrino o actúe en las células originarias por un mecanismo autocrino o simplemente funcione intracelularmente antes de la secreción dependería en último término del tipo celular y de la naturaleza de los estímulos.

Recientemente se ha encontrado que en los macrófagos P388D₁ tratados con LPS, la sPLA₂-V se localiza en grandes gránulos citoplásmicos que contienen caveolina (Balboa *et al.*, 2003c). Esta localización se correlaciona con la presencia de COX-2, sugiriendo una relación causa-efecto (Shinohara *et al.*, 1999). En estos estudios, la localización de la sPLA₂-V en gránulos citoplásmicos se previene parcialmente tratando las células con heparina, un polisacárido que secuestra algunas enzimas sPLA₂ en el medio de cultivo y, de esta manera, bloquea sus efectos en las células. Por lo tanto, estos estudios sugieren un papel autocrino para la sPLA₂-V en P388D₁ donde la enzima, después de secretarse al medio extracelular, se reinternaliza en las células para ejercer su papel biológico en un compartimento intracelular.

Aunque el escalaradial es un inhibidor selectivo de sPLA₂, este compuesto también puede inhibir a otras enzimas, ya que a concentraciones altas el escalaradial también afecta la actividad cPLA₂ (Marshall *et al.*, 1994, 2000). Sin embargo, el escalaradial a concentraciones que inhibe la actividad sPLA₂ y la expresión de COX-2 (<5 μ M), no afecta la actividad cPLA₂, como se ha demostrado en ensayos *in vitro*.

Hay evidencias adicionales para apoyar que la inhibición de la actividad sPLA₂-V por escalaradial es responsable de la inhibición de la expresión de COX-2: 1) el hecho de que, a concentraciones que ejercen poco efecto sobre la expresión de COX-2, el escalaradial es capaz de producir un bloqueo cuantitativo de la expresión de COX-2 en células que expresan menores niveles de sPLA₂-V mediante tratamiento con siRNA y 2) la habilidad de la metil-lisoPC, un análogo del producto de la sPLA₂-V, para recuperar completamente los

efectos inhibitorios del escalaradial en la expresión de COX-2 inducida por LPS.

Además, la metil-lisoPC no recupera la expresión de COX-2 en células tratadas con pirrofenona, sugiriendo que es la lisoPC producida por la sPLA₂-V la que está específicamente implicada en la expresión de COX-2. El mecanismo intracelular de señalización por el que la lisoPC derivada de la sPLA₂-V media en la expresión de COX-2 está asociado con la activación transcripcional del factor c-Rel.

Mediante un ensayo de actividad transcripcional basado en la técnica de ELISA se midió simultáneamente el efecto de la inhibición de la sPLA₂-V sobre 6 factores de transcripción. La activación de c-fos y c-Rel está inhibida por escalaradial y, de estos, sólo la inhibición de c-Rel se recupera tratando las células con metil-lisoPC. Además, en células tratadas con radicicol se observa inhibición de la expresión de c-Rel y COX-2.

Estos resultados, junto con resultados previos (Balsinde *et al.*, 1999b; Shinohara *et al.*, 1999), sugieren un modelo para la inducción de COX-2 en P388D₁ estimuladas, donde el LPS induce primero la expresión de sPLA₂-V de manera dependiente de cPLA₂ α . La sPLA₂-V cataliza la hidrólisis de fosfolípidos dando lugar a una acumulación de lisoPC que produce la activación de c-Rel dando lugar a la inducción de COX-2 (figura 47). En conjunto, estos resultados resaltan la complejidad de la respuesta en macrófagos a LPS respecto a la expresión de COX-2 y sugieren un papel clave de las fosfolipasas A₂ intracelulares en la regulación de este proceso.

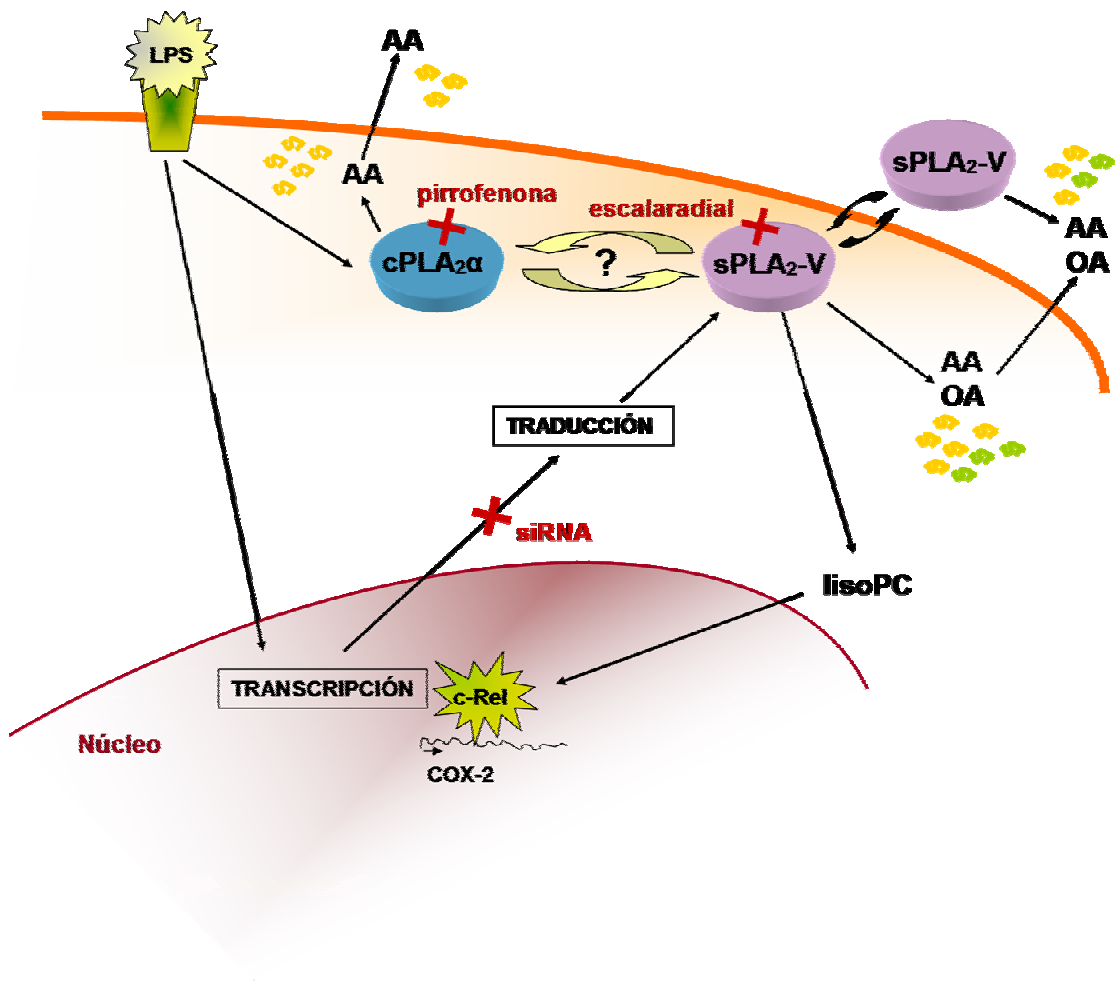


Fig. 47. Esquema de regulación de la expresión de COX-2 en P388D₁ activadas a través de TLR4 con LPS.

7.3 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD cPLA₂α POR FOSFORILACIÓN

La cPLA₂α puede fosforilarse en múltiples residuos de serina, como la Ser⁴⁵⁴, Ser⁴³⁷, Ser⁵⁰⁵ y Ser⁷²⁷. El aumento de la actividad cPLA₂α por fosforilación en la serina 505 a través de ERK1/2 ha sido descrita por numerosos autores. En macrófagos peritoneales de ratón se ha descrito que entre los diversos mecanismos a través de los que esta enzima está regulada para incrementar la liberación de ácido araquidónico se encuentra la fosforilación de la Ser⁵⁰⁵ (Qui et al., 1993), aumentando la liberación de ácido araquidónico con diversos estímulos.

La fosforilación en la Ser⁷²⁷ se ha descrito recientemente como mecanismo de regulación de la actividad de esta enzima. A diferencia de la regulación a través de la Ser⁵⁰⁵, estos estudios revelan que el aumento de la actividad se debe a que esta fosforilación permite la ruptura de puentes de hidrógeno entre la cPLA₂α y A2t, permitiendo la interacción de la cPLA₂α con la membrana y la hidrólisis de fosfolípidos (Tian *et al.*, 2007).

En primer lugar, se estudió el efecto de diferentes agonistas de TLRs sobre la fosforilación secuencial de ERK1/2 y cPLA₂α. La estimulación a través de los TLR2, TLR2/1, TLR2/6, TLR3, TLR4 y TLR7 en P388D₁ y RAW 264.7 da lugar a la fosforilación de las MAP quinasas ERK1/2 y de la cPLA₂α. Sin embargo, el tratamiento de P388D₁ y RAW 264.7 con agonistas de TLR5 y TLR9 no induce fosforilación de ERK1/2. Estudios previos de fosforilación de ERK1/2 en macrófagos muestran como la flagelina no es capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2, disminuyendo los niveles de fosforilación de estas enzimas inducidos por LPS, lo que sugiere un papel de regulador negativo de este proceso (Vicente-Suárez *et al.*, 2007). Por otro lado, la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α en macrófagos ha sido descrita previamente en respuesta a oligonucleótidos CpG (Lee *et al.*, 2008). Esta discrepancia podría deberse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas con respecto a las utilizadas en este trabajo, lo que puede dar lugar a diferentes resultados en la fosforilación.

El papel de la sPLA₂-V en la regulación de la fosforilación de la cPLA₂α en respuesta a agonistas de TLR2 ha sido recientemente documentado en mastocitos de ratón (Kikawada *et al.*, 2007). Este estudio realizado en células procedentes de ratones deficientes en sPLA₂-V muestran como tras la activación con Pam₃CSK₄ la producción de leucotrieno C₄ y

prostaglandina D_2 es mucho menor que en células procedentes de ratones control. Además, la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂ α disminuye, por lo que la actividad de la sPLA₂-V endógena se relaciona con la regulación de la amplificación de la actividad cPLA₂ α mediante fosforilación.

A partir de estos resultados, se analizó el efecto que produce la inhibición de sPLA₂ por escalaradial en la fosforilación de cPLA₂ α durante la activación celular por los diversos agonistas que inducen la fosforilación de ERK1/2 en P388D₁ y RAW 264.7. Los resultados obtenidos indican que la inhibición de la sPLA₂ da lugar a una inhibición en la fosforilación de ERK1/2, seguida de la inhibición en la fosforilación de cPLA₂ α , pero este efecto es dependiente del TLR a través del que se produce la activación, ya que no se observa cuando se estimula a través de los TLRs 2/6 y 7.

Estos resultados coinciden con los datos obtenidos por Arm y colaboradores (Kikawada *et al.*, 2007) en mastocitos procedentes de ratones deficientes en sPLA₂-V, en los que se confirma que el efecto observado a través de TLR2 es específico para esta ruta de señalización y no se observa cuando usan otros estímulos. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren la posibilidad de que la activación a través de distintos TLRs ocurra a través de diferentes rutas de activación.

El uso de otro inhibidor de la sPLA₂ en presencia de LPS, el manoalide, confirma que la inhibición de la actividad de esta enzima reduce los niveles de fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂ α . Adicionalmente, se analizó el efecto de la inhibición de la sPLA₂-V por oligonucleótido antisentido diseñado para bloquear la expresión de esta enzima. Los datos obtenidos muestran que la inhibición de la expresión de la sPLA₂-V da lugar a una reducción de los niveles de ERK1/2 fosforiladas. Debido a la baja eficiencia que esta técnica produce en la inhibición de la expresión de sPLA₂-V, la disminución de los niveles de cPLA₂ α fosforilada no es apreciable. Cuando la transfección se realiza con RNA de interferencia contra la sPLA₂-V la eficiencia es mayor y se observa una inhibición de la fosforilación de cPLA₂ α de aproximadamente un 20-25 %.

En conclusión, estos datos sugieren que la activación a través de diferentes receptores Toll-like lleva asociada diferentes rutas de señalización. La activación a través de TLR2, 2/1, 3 y 4 implica la activación de sPLA₂-V y cPLA₂ α y, adicionalmente, la amplificación de actividad cPLA₂ α mediante fosforilación. Este proceso de fosforilación está regulado por la actividad de la sPLA₂-V, que controla la fosforilación secuencial de ERK1/2 y cPLA₂ α .

Por otro lado, la activación a través de TLR2/6 y 7 también activa la cPLA₂α y la sPLA₂-V dando lugar a la liberación de ácido araquidónico, pero la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α es independiente de la actividad de la sPLA₂-V (figura 48). Estos resultados atribuyen a la sPLA₂-V endógena un papel en la respuesta inmune innata amplificando la respuesta de la cPLA₂α, bien mediante el abastecimiento de ácido araquidónico o mediante regulación secuencial de la fosforilación de cPLA₂α y ERK1/2.

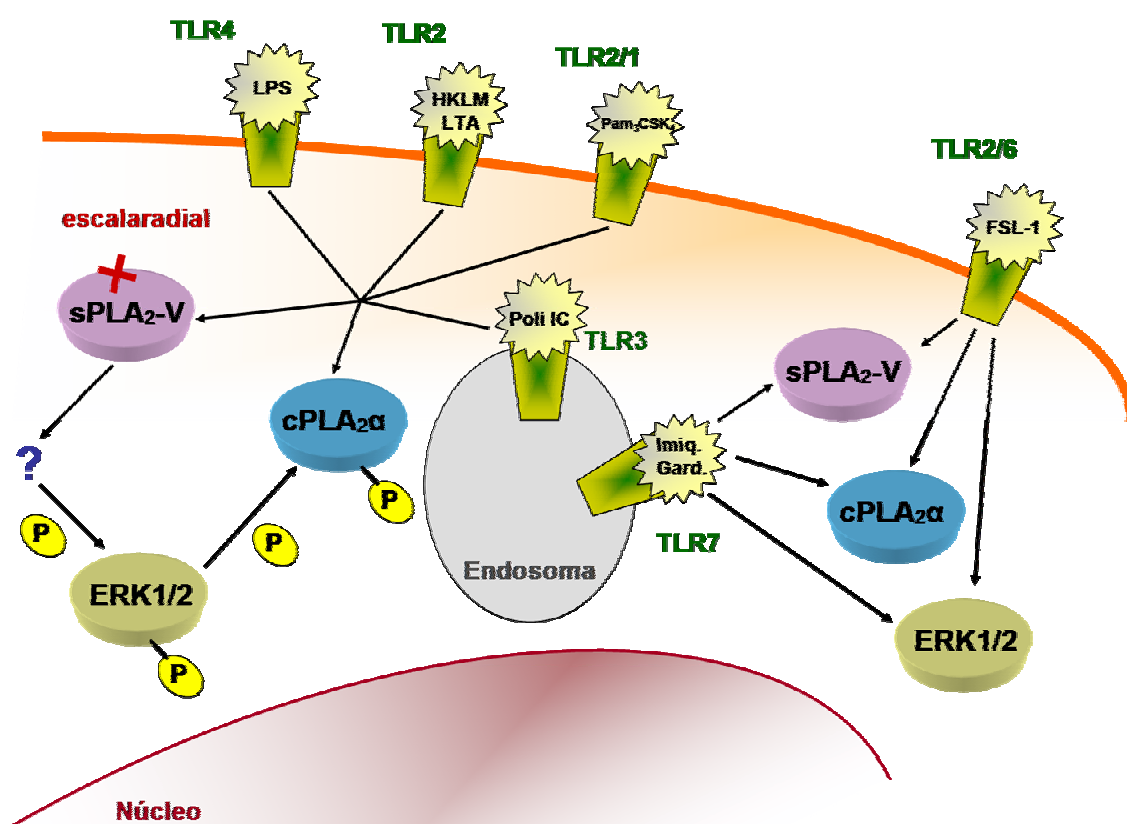


Fig. 48. Esquema de regulación secuencial de la fosforilación de ERK1/2 y cPLA₂α por la sPLA₂-V.

1. La contribución de cada fosfolipasa A_2 a la liberación de ácido araquidónico en macrófagos P388D₁ y RAW 264.7 en respuesta a estímulos a través de receptores Toll-like es variable en función del TLR a través del que se produce la activación, pero en todos casos está mediada, principalmente, por la acción de la cPLA₂ α , mientras que la sPLA₂-V amplifica este proceso.
2. La sPLA₂-V contribuye a la activación de la cPLA₂ α mediante la regulación de la fosforilación secuencial de ERK1/2 y cPLA₂ α , siendo este efecto dependiente del receptor a través del que se produce la activación.
3. La expresión de ciclooxigenasa-2 en P388D₁ y macrófagos de ratón C57BL/6 en respuesta a LPS está regulada por la actividad de la sPLA₂-V de manera dependiente de la concentración.
4. La lisofosfatidilcolina derivada de la hidrólisis de fosfolípidos por sPLA₂-V en respuesta a LPS controla la inducción génica de ciclooxigenasa-2 en macrófagos y este efecto es dependiente del receptor a través del que se produce la activación.
5. La inhibición de la sPLA₂-V por escalaradial impide la activación transcripcional de c-Rel, efecto que puede revertirse mediante la adición de lisofosfatidilcolina, por lo que el efector a través del que la lisofosfatidilcolina ejerce su acción sobre la ciclooxigenasa-2 en respuesta a LPS es el factor de transcripción c-Rel.

- Abe, A., Shayman, J. A. (1998). Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase, a novel phospholipase A₂ with transacylase activity. *J. Biol. Chem.* 273: 8467-74.
- Ackermann, E. J., Kempner, E. S., Dennis, E. A. (1994). Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D₁ cells. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 269: 9227-33.
- Aderem, A., Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 406: 782-7.
- Adler, D. H., Cogan, J. D., Phillips, J. A. 3rd, Schnetz-Boutaud, N., Milne, G. L., Iverson, T., Stein, J. A., Brenner, D. A., Morrow, J. D., Boutaud, O., Oates, J. A. (2008). Inherited human cPLA₂α deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction. *J. Clin. Invest.* 118: 2121-31.
- Akiba, S., Sato, T. (2004). Cellular function of calcium-independent phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1174-8.
- Appleby, S. B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K., Hla, T. (1994). Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem. J.* 302: 723-7.
- Balboa, M. A., Balsinde, J. (2006). Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 385-91.
- Balboa, M. A., Balsinde, J., Winstead, M. V., Tischfield, J. A., Dennis, E. A. (1996). Novel group V phospholipase A₂ involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* 271: 32381-4.
- Balboa, M. A., Balsinde, J., Dennis, E. A. (2000). Phosphorylation of cytosolic group IV phospholipase A₂ is necessary but not sufficient for arachidonic acid release in P388D₁ macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 145-8.
- Balboa, M. A., Balsinde, J., Dennis, E. A. (2001). Inflammatory activation of prostaglandin production by microglial cells antagonized by amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19; 280: 558-60.
- Balboa, M. A., Varela-Nieto, I., Killerman, K., Dennis, E. A. (2002). Expression and function of phospholipase A₂ in brain. *FEBS Lett.* 531: 12-17.
- Balboa, M. A., Pérez, R., Balsinde, J. (2003a). Amplification mechanisms of inflammation:

- paracrine stimulation of arachidonic acid mobilization by secreted phospholipase A₂ is regulated by cytosolic phospholipase A₂-derived hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *J. Immunol.* 171: 989-94.
- Balboa, M. A., Sáez, Y., Balsinde, J. (2003b). Calcium-independent phospholipase A₂ is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J. Immunol.* 170: 5276-5280.
- Balboa, M. A., Shirai, Y., Gaietta, G., Ellisman, M. H., Balsinde, J., Dennis, E. A. (2003c). Localization of group V phospholipase A₂ in caveolin-enriched granules in activated P388D₁ macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* 278: 48059-65.
- Balboa, M. A., Pérez, R., Balsinde, J. (2008). Calcium-independent phospholipase A₂ mediates proliferation of human promonocytic U937 cells. *FEBS J.* 275: 1915-1924.
- Balestrieri, B., Arm, J. P. (2006). Group V sPLA₂: classical and novel functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1280-8.
- Balestrieri, B., Hsu, V. W., Gilbert, H., Leslie, C. C., Han, W. K., Bonventre, J. V., Arm, J. P. (2006). Group V secretory phospholipase A₂ translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 281: 6691-8.
- Balsinde, J. (2002). Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* 364: 695-702.
- Balsinde, J., Dennis, E. A. (1996). Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* 271: 6758-65.
- Balsinde, J., Balboa, M. A. (2005). Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cell. Signal.* 17: 1052-1062.
- Balsinde, J., Diez, E., Schüller, A., Mollinedo, F. (1988). Phospholipase A₂ activity in resting and activated human neutrophils: substrate specificity, pH dependence, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 263: 1929-1936.
- Balsinde, J., Barbour, S. E., Bianco, I. D., Dennis, E. A. (1994). Arachidonic acid mobilization in P388D₁ macrophages is controlled by two distinct calcium-dependent

- phospholipase A₂ enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11060-11064.
- Balsinde, J., Balboa, M. A., Dennis, E. A. (1997). Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* 272: 29317-21.
- Balsinde, J., Balboa, M. A., Dennis, E. A. (1998). Functional coupling between secretory phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7951-6.
- Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., Dennis, E. A. (1999a). Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:175-89.
- Balsinde, J., Shinohara, H., Lefkowitz, L. J., Johnson, C. A., Balboa, M. A., Dennis, E. A. (1999b). Group V phospholipase A₂-dependent induction of cyclooxygenase-2 macrophages. *J. Biol. Chem.* 274: 25967-25970.
- Balsinde, J., Balboa, M. A., Yedgar, S., Dennis, E. A. (2000). Group V phospholipase A₂-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* 275: 4783-6.
- Balsinde, J., Winstead, M. V., Dennis, E. A. (2002). Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2-6.
- Balsinde, J., Pérez, R., Balboa, M. A. (2006). Calcium-independent phospholipase A₂ and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1344-50.
- Bao, S., Miller, D. J., Ma, Z., Wohltmann, M., Eng, G., Ramanadham, S., Moley, K., Turk, J. (2004). Male mice that do not express group VIA phospholipase A₂ produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 279: 38194-200.
- Barbour, S. E, Dennis E. A. (1993). Antisense inhibition of group II phospholipase A₂ expression blocks the production of prostaglandin E₂ by P388D₁ cells. *J. Biol. Chem.* 268: 21875-82.
- Barnette, M. S., Rush, J., Marshall, L. A., Foley, J. J., Schmidt, D. B., Sarau, H. M. (1994). Effects of scalaradial, a novel inhibitor of 14 kDa phospholipase A₂, on human neutrophil function. *Biochem. Pharmacol.* 47: 1661-7.
- Bazán, N. G., Colangelo, V., Lukiw, V. J. (2002). Prostaglandins and other lipid mediators

- in Alzheimer's disease. *Prostaglandins*. 68: 197-210.
- Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V., Baldwin, A. S. Jr. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3301-10.
- Bingham, C. O. III, Murakami, M., Fujishima, H., Hunt, J. E., Austen, K. F., Arm, J. P. (1996). A heparin-sensitive phospholipase A₂ and prostaglandin endoperoxide synthase-2 are functionally linked in the delayed phase of prostaglandin D₂ generation in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Biol. Chem.* 271: 25936-44.
- Bingham, C. O. III, Fijneman, R. J., Friend, D. S., Goddeau, R. P., Rogers, R. A., Austen, K. F., Arm, J. P. (1999). Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A₂ enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Biol. Chem.* 274: 31476-84.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-7.
- Bonventre, J. V., Huang, Z., Taheri, M. R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M. A., Sapirstein, A. (1997). Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂. *Nature*. 390: 622-5.
- Bosetti, F. (2007). Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models. *J. Neurochem.* 102: 577-86.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Brodsky, I., Medzhitov, R. (2007). Two modes of ligand recognition by TLRs. *Cell*. 130: 979-81.
- Broersen, K., van den Brink, D., Fraser, G., Goedert, M., Davletov, B. (2006). α -Synuclein Adopts an α -Helical Conformation in the Presence of Polyunsaturated Fatty Acids To Hinder Micelle Formation. *Biochemistry*. 45: 15610-6.
- Buczynski, M. W., Stephens, D. L., Bowers-Gentry, R. C., Grkovich, A., Deems, R. A., Dennis, E. A. (2007). TLR-4 and sustained calcium agonists synergistically produce eicosanoids independent of protein synthesis in RAW264.7 cells. *J. Biol. Chem.* 282:

22834-47.

- Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., Tischfield, J. A. (1994a). Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca^{2+} -dependent phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 269: 2365-8.
- Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., Tischfield, J. A. (1994b). Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca^{2+} -dependent phospholipase A_2 s containing 16 cysteines. *J. Biol. Chem.* 269: 23018-24.
- Chilton, F. H., Fonteh, A. N., Surette, M. E., Triggiani, M., Winkler, J. D. (1996). Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1299: 1-15.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-9.
- Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N., Knopf, J. L. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA_2 contains a Ca^{2+} -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell.* 65: 1043-51.
- Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A., Lin, L. L. (1995). Cytosolic phospholipase A_2 . *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 12: 83-117.
- Cohn, Z. A., Benson, B. (1965). The differentiation of mononuclear phagocytes: morphology, cytochemistry, and biochemistry. *J. Exp. Med.* 121: 153-70.
- Connell, E., Darios, F., Broersen, K., Gatsby, N., Peak-Chew, S. Y., Rickman, C., Davletov, B. (2007). Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin–Munc18. *EMBO.* 8: 414-9.
- Darios, R., Davletov, B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature.* 440: 813-7.
- Darios, F., Connell, E., Davletov, B. (2007). Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J. Physiol.* 585: 699-704.
- Degousee, N., Ghomashchi, F., Stefanski, E., Singer, A., Smart, B. P., Borregaard, N., Reithmeier, R., Lindsay, T. F., Lichtenberger, C., Reinisch, W., et al. (2002). Groups IV, V, and X phospholipases A_2 s in human neutrophils: role in eicosanoid production and Gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 277: 5061–5073.

- Dennis, E. A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269: 13057-60.
- Dennis, E. A. (1997). The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 22: 1-2.
- Diaz, B. L., Arm, J. P. (2003). Phospholipase A₂. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids.* 69: 87-97.
- Diaz, B. L., Satake, Y., Kikawada, E., Balestrieri, B., Arm, J. P. (2006). Group V secretory phospholipase A₂ amplifies the induction of cyclooxygenase-2 and delayed prostaglandin D₂ generation in mouse bone marrow culture-derived mast cells in a strain-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1489-97.
- Diez, E., Chilton, F. H., Stroup, G., Mayer, R. J., Winkler, J. D., Fonteh, A. N. (1994). Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A₂ enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate. *Biochem. J.* 301: 721-6.
- Duncan, R. E., Sarkadi-Nagy, E., Jaworski, K., Ahmadian, M., Sul, H. S. (2008). Identification and functional characterization of AdPLA - An adipose-specific phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 283: 25428-36.
- Elbekai, R. H., El-Kadi, A. O. (2006). Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol. Ther.* 112: 564-87.
- Farooqui, A. A., Ong, W. Y., Horrocks, L. A. (2006). Inhibitors of brain phospholipase A₂ activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol. Rev.* 58: 591-620.
- Fitzpatrick, F. A., Soberman, R. (2001). Regulated formation of eicosanoids. *J. Clin. Invest.* 107: 1347-51.
- Flamand, N., Lefebvre, J., Surette, M. E., Picard, S., Borgeat, P. (2006). Arachidonic acid regulates the translocation of 5-lipoxygenase to the nuclear membranes in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 281: 129-36.
- Fuentes, L., Perez, R., Nieto, M. L., Balsinde, J., Balboa, M. A. (2003). Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 278: 44683-90.
- Fujishima, H., Sánchez-Mejía, R., Bingham, C. O., Lam, B. K., Sapirstein, A., Bonventre, J.

- V., Austen, K. F., and Arm, J. P. (1999). Cytosolic phospholipase A₂ is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 4803-4807.
- Gauthier, K. M., Yang, W., Gross, G. J., Campbell, W. B. (2007). Roles of epoxyeicosatrienoic acids in vascular regulation and cardiac preconditioning. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50: 601-8.
- Gay, N. J., Gangloff, M. (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 141-65.
- Gay, N. J., Gangloff, M., Weber, A. N. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 693-8.
- Gijón, M. A., Spencer, D. M., Siddiqi, A. R., Bonventre, J. V., Leslie, C. C. (2000). Cytosolic phospholipase A₂ is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that do and do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A₂ regulation. *J. Biol. Chem.* 275: 20146-56.
- Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J., Willoughby, D. A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* 5: 698-701.
- Greco, A., Minghetti, L. (2004). Isoprostanes as biomarkers and mediators of oxidative injury in infant and adult central nervous system diseases. *Curr. Neurovasc. Res.* 1: 341-54.
- Gubern, A., Casas, J., Barceló, M., Barneda, D., de la Rosa, X., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M. A., & Claro, E. (2008). Group IVA phospholipase A₂ is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J. Biol. Chem.* (in press).
- Hamilton, J. A., Brunaldi, K. (2007). A model for fatty acid transport into the brain. *J. Mol. Neurosci.* 33: 12-7.
- Han, S. K., Kim, K. P., Koduri, R., Bittova, L., Muñoz, N. M., Leff, D. C., Wilton, M. H. Gelb, and W. Cho. (1999). Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 274: 11881-11888.
- Han, W. K., Sapirstein, A., Hung, C. C., Alessandrini, A., Bonventre, J. V. (2003). Cross-

- talk between cytosolic phospholipase A₂ alpha (cPLA₂α) and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA₂ regulates cPLA₂α activity that is responsible for arachidonic acid release. *J. Biol. Chem.* 278: 24153-24163.
- Hansen, H. S., Artmann, A. (2008). Endocannabinoids and nutrition. *J. Neuroendocrinol.* 1: 94-9.
- Hazen, S. L., Zupan, L. A., Weiss, R. H., Getman, D. P., Gross, R. W. (1991). Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A₂. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* 266: 7227-32.
- Henderson, W. R. Jr., Chi, E. Y., Bollinger, J. G., Tien, Y. T., Ye, X., Castelli, L., Rubtsov, Y. P., Singer, A. G., Chiang, G. K., Nevalainen, T., Rudensky, A. Y., Gelb, M. H. (2007). Importance of group X-secreted phospholipase A₂ in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 204: 865-77.
- Herbert, S. P., Walker, J. H. (2006). Group VIA calcium-independent phospholipase A₂ mediates endothelial cell S phase progression. *J. Biol. Chem.* 281: 35709-16.
- Hirabayashi, T., Murayama, T., Shimizu, T. (2004). Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1168-73.
- Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R. W., Shayman, J. A. (2006). Lysosomal phospholipase A₂ and phospholipidosis. *Mol. Cell Biol.* 26: 6139-48.
- Hisanaga, Y., Ago, H., Nakagawa, N., Hamada, K., Ida, K., Yamamoto, M., Hori, T., Arai, Y., Sugahara, M., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Miyano, M. (2004). Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J. Biol. Chem.* 279: 31717-26.
- Huggins, K. W., Boileau, A. C., Hui, D. Y. (2002). Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in Group 1B PLA₂-deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: 994-1001.
- Jackson, S. K., Parton, J. (2004). Lysophospholipid acyltransferases in monocyte inflammatory responses and sepsis. *Immunobiology.* 209: 31-8.
- Jackson, S. K., Abate, W., Tonks, A. J. (2008). Lysophospholipid acyltransferases: Novel

- potential regulators of the inflammatory response and target for new drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 119: 104-14.
- Jeon, Y. J., Kim, Y. K., Lee M., Park, S. M., Han, S. B., Kim, H. M. (2000). Radicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear factor-kappaB/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 548-54.
- Kawai, T., Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 338-44.
- Kawai, T., Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13: 816-25.
- Kennedy, B. P., Payette, P., Mudgett, J., Vadas, P., Pruzanski, W., Kwan, M., Tang, C., Rancourt, D. E., Cromlish, W. A. (1995). A natural disruption of the secretory group II phospholipase A₂ gene in inbred mouse strains. *J. Biol. Chem.* 270: 22378-85.
- Kikawada, E., Bonventre, J. V., Arm, J. P. (2007). Group V secretory PLA₂ regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA₂α activation. *Blood.* 110: 561-7.
- Kim, Y. J., Kim, K. P., Han, S. K., Munoz, N. M., Zhu, X., Sano, H., Leff, A. R., Cho, W. (2002a). Group V phospholipase A₂ induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 277: 36479-88.
- Kim, Y. J., Kim, K. P., Rhee, H. J., Das, S., Rafter, J. D., Oh, Y. S., Cho, W. (2002b). Internalized group V secretory phospholipase A₂ acts on the perinuclear membranes. *J. Biol. Chem.* 277: 9358–9365.
- Kimura-Matsumoto, M., Ishikawa, Y., Komiyama, K., Tsuruta, T., Murakami, M., Masuda, S., Akasaka, Y., Ito, K., Ishiguro, S., Morita, H., Sato, S., Ishii, T. (2008). Expression of secretory phospholipase A₂s in human atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 196: 81-91.
- Kita, Y., Ohto, T., Uozumi, N., Shimizu, T. (2006). Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A₂s. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1317-22.
- Koizumi, H., Yamaguchi, N., Hattori, M., Ishikawa, T. O., Aoki, J., Taketo, M. M., Inoue,

- K., Arai, H. (2003). Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 278: 12489-94.
- Kühn, H., O'Donnell, V. B. (2006). Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* 45: 334-56.
- Lambeau, G., Gelb, M. H. (2008). Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 495-520.
- Lee, J. G., Lee, S. H., Park, D. W., Lee, S. H., Yoon, H. S., Chin, B. R., Kim, J. H., Kim, J. R., Baek, S. H. (2008). Toll-like receptor 9-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 is mediated via JNK-cytosolic phospholipase A₂-ROS signaling. *Cell. Signal.* 20: 105-11.
- Leslie, C. C. (1997). Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 272: 16709-12.
- Levy, B. D. (2005). Lipoxins and lipoxin analogs in asthma. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 73: 231-7.
- Lio, Y. C., Reynolds, L. J., Balsinde, J., Dennis, E. A. (1996). Irreversible inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302: 55-60.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25: 402-8.
- Lombardo, D., Dennis, E. A. (1985). Cobra venom phospholipase A₂ inhibition by manoalide. A novel type of phospholipase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 260: 7234-40.
- Marshall, J., Krump, E., Lindsay, T., Downey, G., Ford, D. A., Zhu, P., Walker, P., Rubin, B. (2000). Involvement of cytosolic phospholipase A₂ and secretory phospholipase A₂ in arachidonic acid release from human neutrophils. *J. Immunol.* 164: 2084-2091.
- Marshall, L. A., Winkler, J. D., Griswold, D. E., Bolognese, B., Roshak, A., Sung, C. M., Webb, E. F., Jacobs, R. (1994). Effects of scalaradial, a type II phospholipase A₂ inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 709-17.
- McGeer, P. L., McGeer, E. G. (1999). Inflammation of the brain in Alzheimer's disease:

- implications for therapy. *J. Leukoc. Biol.* 65: 409-15.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449: 819-26.
- Miyahara, N., Miyahara, S., Takeda, K., Gelfand, E. W. (2006). Role of the LTB₄/BLT1 pathway in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Allergol. Int.* 55: 91-7.
- Monti, M. C., Casapullo, A., Riccio, R., Gomez-Paloma, L. (2005). The inactivation of phospholipase A₂ by scalaradial: a biomimetic study by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 303-8.
- Monti, M. C., Casapullo, A., Cavasotto, C. N., Napolitano, A., Riccio, R. (2007). Scalaradial, a dialdehyde-containing marine metabolite that causes an unexpected noncovalent PLA₂ Inactivation. *Chembiochem.* 8: 1585-91.
- Mounier, C. M., Ghomashchi, F., Lindsay, M. R., James, S., Singer, A. G., Parton, R. G., Gelb, M. H. (2004). Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A₂ occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A₂-alpha. *J. Biol. Chem.* 279: 25024-38.
- Muñoz, N. M., Kim, Y. J., Meliton, A. Y., Kim, K. P., Han, S. K., Boetticher, E., O'Leary, E., Myou, S., Zhu, X., Bonventre, J. V., et al. (2003). Human group V phospholipase A₂ induces group IVA phospholipase A₂-independent cysteinyl leukotriene synthesis in human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 278: 38813–38820.
- Muñoz, N. M., Meliton, A. Y., Lambertino, A., Boetticher, E., Learoyd, J., Sultan, F., Zhu, X., Cho, W., Leff, A. R. (2006). Transcellular secretion of group V phospholipase A₂ from epithelium induces β₂-integrin-mediated adhesion and synthesis of leukotriene C₄ in eosinophils. *J. Immunol.* 177: 574–582.
- Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M. V., Tischfield, J. A., Kudo, I. (1998). The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂S in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A₂S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 273: 14411-23.

- Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., Yamamoto, S., Kuwata, H., Kudo, I. (1999). Functional association of type IIA secretory phospholipase A₂ with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 29927–29936.
- Murakami, M., Koduri, R. S., Enomoto, A., Shimbara, S., Seki, M., Yoshihara, K., Singer, A., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lambeau, G., et al. (2001). Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A₂s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparin sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276: 10083–10096.
- Murakami, M., K. Yoshihara, S. Shimbara, G. Lambeau, A. Singer, M. H. Gelb, M. Sawada, N. Inagaki, H. Nagai, and I. Kudo. (2002). Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 689–696.
- Nakahata, N. (2008). Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 118: 18-35.
- Nevalainen, T. J., Graham, G. G., Scott, K. F. (2008). Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. *Biochim. Biophys. Acta.* 1781: 1-9.
- Ni, Z., Okeley, N. M., Smart, B. P., Gelb, M. H. (2006). Intracellular actions of group IIA secreted phospholipase A₂ and group IVA cytosolic phospholipase A₂ contribute to arachidonic acid release and prostaglandin production in rat gastric mucosal cells and transfected human embryonic kidney cells. *J. Biol. Chem.* 281: 16245-55.
- Oestvang, J., Johansen, B. (2006). Phospholipase A₂: a key regulator of inflammatory signalling and a connector to fibrosis development in atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1309-16.
- Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Arata, S., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Yamamoto, K., Kudo, I., Murakami, M. (2006). Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A₂ in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J. Biol. Chem.* 281: 36420-33.
- Ono, T., Yamada, K., Chikazawa, Y., Ueno, M., Nakamoto, S., Okuno, T., Seno, K. (2002). Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A₂α, pyrrophenone.

- Biochem. J. 363: 727-35.
- Osher, E., Weisinger, G., Limor, R., Tordjman, K., Stern, N. (2006). The 5 lipoxygenase system in the vasculature: emerging role in health and disease. *Mol. Cell Endocrinol.* 252: 201-6.
- Palm, N. W., Medzhitov, R. (2007). Not so fast: adaptive suppression of innate immunity. *Nat Med.* 13: 1142-4.
- Pan, Y. H., Yu, B. Z., Singer, A. G., Ghomashchi, F., Lambeau, G., Gelb, M. H., Jain, M. K., Bahnson, B. J. (2002). Crystal structure of human group X secreted phospholipase A₂. Electrostatically neutral interfacial surface targets zwitterionic membranes. *J. Biol. Chem.* 277: 29086-93.
- Pérez, R., Melero, R., Balboa, M. A., Balsinde, J. (2004). Role of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 279: 40385-91.
- Pérez, R., Matabosch, X., Llebaria, A., Balboa, M. A., Balsinde, J. (2006). Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J. Lipid Res.* 47: 484-91.
- Peters-Golden, M., Canetti, C., Mancuso, P., Coffey, M. J. (2004). Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J. Immunol.* 174: 589-94.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- Pindado, J., Balsinde, J., Balboa, M. A. (2007). TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A₂/cyclooxygenase-2 pathway. *J. Immunol.* 179: 4821-8.
- Qiu, Z. H., de Carvalho, M. S., Leslie, C. C. (1993). Regulation of phospholipase A₂ activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 268: 24506-13.
- Rao, K. M. (2001). MAP kinase activation in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 69: 3-10.
- Reddy, S. T., Winstead, M. V., Tischfield, J. A., Herschman, H. R. (1997). Analysis of the secretory phospholipase A₂ that mediates prostaglandin production in mast cells.

- J.Biol.Chem. 72: 3591-6.
- Rosengren, B., Jönsson-Rylander, A. C., Peilot, H., Camejo, G., Hurt-Camejo, E. (2006). Distinctiveness of secretory phospholipase A₂ group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1301-8.
- Satake, Y., Diaz, B. L., Balestrieri, B., Lam, B. K., Kanaoka, Y., Grusby, M. J., Arm, J. P. (2004). Role of group V phospholipase A₂ in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J. Biol. Chem.* 279: 16488-94.
- Schaloske, R. H., Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1246-59.
- Schaloske, R. H., Provins, J. W., Kessen, U. A., Dennis, E. A. (2005). Molecular characterization of the lipopolysaccharide/platelet activating factor- and zymosan-induced pathways leading to prostaglandin production in P388D₁ macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1687: 64-75.
- Scott, D. L., Sigler, P. B. (1994). The structural and functional roles of calcium ion in secretory phospholipases A₂. *Adv. Inorg. Biochem.* 10:139-55.
- Sharp, J. D., White, D. L., Chiou, X. G., Goodson, T., Gamboa, G. C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P. L., Sportsman, J. R., et al. (1991). Molecular cloning and expression of human Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 266: 14850-3.
- Shinohara, H., Balboa, M. A., Johnson, C. A., Balsinde, J., Dennis, E. A. (1999). Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D₁ macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A₂s. *J. Biol. Chem.* 274: 12263-12268.
- Shirai, Y., Balsinde, J., Dennis, E. A. (2005). Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V, and Ca²⁺-independent Group VI phospholipase A₂s in P388D₁ macrophages using GFP/RFP constructs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1735: 119-29.
- Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56: 387-437.
- Six, D. A., Dennis, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes:

- classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1488: 1-19.
- Smith, W. L., Langenbach, R. (2001). Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J. Clin. Invest.* 107: 1491-1495.
- Smith, W. L., Garavito, R. M., DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271: 33157-60.
- Soupeine, E., Kuypers, F. A. (2008). Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp. Biol. Med.* 233: 507-21.
- Steer, S. A., Corbett, J. A. (2003). The role and regulation of COX-2 during viral infection. *Viral Immunol.* 16: 447-60.
- Sun, G. Y., Xu, J., Jensen, M.D., and Simonyi, A. (2004). Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J. Lipid Res.* 45: 205-213.
- Sun, G. Y., Xu, J., Jensen, M. D., Yu, S., Wood, W. G., Gonzalez, F. A., Simonyi, A., Sun, A. Y., Weisman, G. A. (2005). Phospholipase A₂ in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Mol. Neurobiol.* 31 (1-3): 27-41.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335-76.
- Tang, J., Kriz, R. W., Wolfman, N., Shaffer, M., Seehra, J., Jones, S. S. (1997). A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ contains eight ankyrin motifs. *J. Biol. Chem.* 272: 8567-75.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* 277: 44507-12.
- Tazawa, R., Xu, X. M., Wu, K. K., Wang, L. H. (1994). Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 190-9.
- Tian, W., Wijewickrama, G. T., Kim, J. H., Das, S., Tun, M. P., Gokhale, N., Jung, J. W., Kim, K. P., Cho, W. (2008). Mechanism of regulation of group IVA phospholipase A₂ Activity by Ser⁷²⁷ phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283: 3960-71.

- Tuppo, E. E., Arias, H. R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37: 289-305.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 825-52.
- Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., Shimizu, T. (1997). Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature.* 390: 618-22.
- Vicente-Suarez, I., Takahashi, Y., Cheng, F., Horna, P., Wang, H. W., Wang, H. G., Sotomayor, E. M. (2007). Identification of a novel negative role of flagellin in regulating IL-10 production. *Eur. J. Immunol.* 37: 3164-75.
- Vila-del Sol, V., Fresno, M. (2005). Involvement of TNF and NF-kappaB in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN-gamma in macrophages. *J. Immunol.* 174: 2825-33.
- Wijewickrama, G. T., Kim, J. H., Kim, Y. J., Abraham, A., Oh, Y., Ananthanarayanan, B., Kwatia, M., Ackerman, S. J., Cho, W. (2006). Systematic evaluation of transcellular activities of secretory phospholipases A₂: high activity of group V phospholipases A₂ to induce eicosanoid biosynthesis in neighboring inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* 281: 10935–10944.
- Winstead, M. V., Balsinde, J., Dennis, E. A. (2000). Calcium-independent phospholipase A₂. Structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 28-39.
- Wooten, R. E., Willingham, M. C., Daniel, L. W., Leslie, C. C., Rogers, L. C., Sergeant, S., O'Flaherty, J. T. (2008). Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A₂α fluorescent proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783: 1544-50.