

TESIS DOCTORAL

Papel de la fosfolipasa A₂ citosólica de grupo VIA en la diferenciación adipocítica y en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta alta en grasa*

María Lucía Peña Moreno

*Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
Universidad de Valladolid, 47003 Valladolid, España*

Fecha de defensa: 25 julio 2014

**Esta es una versión condensada y sin gráficos de la tesis doctoral presentada por María Lucía Peña Moreno para la obtención del título de doctor por la Universidad de Valladolid.*

1. INTRODUCCION

El estilo de vida actual, caracterizado por abundancia calórica, sedentarismo y una mayor esperanza de vida, ha producido un aumento de la incidencia de la obesidad en las últimas décadas, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud de las sociedades desarrolladas. La obesidad lleva asociada un conjunto de anomalías metabólicas entre las que se incluyen la resistencia a insulina y diabetes tipo II, la dislipidemia y las enfermedades cardiovasculares, conocidas en su conjunto como síndrome metabólico. El conocimiento de los mecanismos que desencadenan el desarrollo de la obesidad y de las anomalías metabólicas asociadas es de vital importancia, pues nos permitirá en un futuro desarrollar procedimientos encaminados al tratamiento y prevención de su aparición.

El control y mantenimiento del peso corporal está regulado por la ingesta dietética, el gasto energético y la adipogénesis. Los mediadores lipídicos tienen la capacidad de modular tanto la diferenciación adipocítica, regulando los factores de transcripción que participan en la adipogénesis, como la acumulación de triglicéridos (TAG) en el tejido adiposo, por lo que son

importantes en el control y mantenimiento del peso corporal. Entre los mediadores lipídicos se encuentran los eicosanoides derivados del ácido araquidónico (AA), liberado de los fosfolípidos de membrana por acción de las fosfolipasas A₂ (PLA₂s). La fosfolipasa A₂ citosólica de grupo IVA o cPLA₂[±], a diferencia de otras PLA₂s, hidroliza preferentemente los fosfolípidos de membrana con AA en la posición sn-2, siendo la principal productora de eicosanoides. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el papel que desempeña la cPLA₂[±] en el metabolismo lipídico celular, especialmente en células del sistema inmune, donde participa en la patogénesis de muchas enfermedades, especialmente en aquellas con un importante componente inflamatorio. Sin embargo, se ha descrito poco en la literatura sobre la importancia de esta enzima en células típicamente metabólicas, como los adipocitos.

La presente memoria de tesis doctoral se centra en el estudio del papel de la cPLA₂[±] tanto en el proceso de diferenciación adipocítica *in vitro* como en los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de la obesidad inducida por dieta alta en grasa (HF del inglés, high-fat) en ratones.

1.1. Tejido adiposo blanco

Existen dos tipos de tejido adiposo, dependiendo de su estructura celular, localización, vascularización y función: el tejido adiposo pardo o marrón (TAM) y el tejido adiposo blanco (TAB).

1.1.1. Características generales

El TAB está formado principalmente por adipocitos, que representan 2/3 del tejido. El resto, que forman la fracción del estroma vascular (SVF, del inglés stromal vascular fraction), está constituido principalmente por células madre mesenquimales y precursores de adipocitos en distintos grados de diferenciación (fibroblastos, preadipocitos, células mesenquimales pobremente diferenciadas y células grasas muy pequeñas), células endoteliales, pericitos y en menor medida macrófagos y células T reguladoras (1). Tanto las células que forman la SVF como los adipocitos son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo, participando en la alteración del metabolismo y en la liberación de adipoquinas.

El TAB se presenta en localizaciones específicas, denominadas depósitos adiposos, debajo de la piel (subcutáneo) y alrededor de los órganos (visceral) (2). La distribución de ambos tipos de depósitos es diferente según el sexo, predominando en los hombres la acumulación de tejido adiposo visceral mientras que las mujeres presentan una mayor proporción del tejido adiposo subcutáneo (3). Estudios epidemiológicos han demostrado que el aumento del tejido adiposo visceral es un factor de riesgo en el desarrollo del síndrome metabólico, resistencia a la insulina y diabetes tipo II, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares (4).

La función principal y mejor conocida del TAB es almacenar energía en forma de TAG cuando la ingesta energética excede al gasto y liberarla en forma de ácidos grasos y glicerol, que son transportados hasta otros tejidos para su utilización en periodos de restricción calórica (5, 6). Durante años, el tejido adiposo se ha considerado un tejido pasivo encargado del almacenaje energético con funciones aislantes y de soporte mecánico de otras estructuras del cuerpo (7).

Sin embargo, durante las últimas décadas se han llevado a cabo investigaciones que han demostrado que el tejido adiposo juega un papel importante en el metabolismo lipídico a través de señales endocrinas, paracrinas y autocrinas (8), que regulan el metabolismo tanto del tejido adiposo como de otros órganos (hígado, cerebro, páncreas y músculo) y en último término, la homeostasis energética de todo el organismo. El descubrimiento de la producción de leptina por los adipocitos (9) es el primer indicio de que el tejido adiposo también funciona como un órgano endocrino. De hecho hoy se sabe que el tejido adiposo secreta un gran número de adipoquinas (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, enzimas, factores del complemento, proteínas de la matriz,...) que participan en la regulación del metabolismo glucídico y lipídico, la presión arterial (angiotensina y PAI-1), la inmunidad (TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1), la función reproductora (estrógenos), la angiogénesis, el apetito (leptina) y la homeostasis del peso corporal (adiponectina, adiposina, resistina) entre otras (10) (figura 1).

Se requiere un control estricto de la secreción de estas adipoquinas, pues variaciones en su concentración plasmática causan importantes modificaciones en la homeostasis energética corporal. Así, se han observado alteraciones importantes en la secreción de estas adipoquinas en la obesidad y en las anomalías metabólicas asociadas (12).

1.1.2. Desarrollo del tejido adiposo

En la mayoría de las especies la formación del TAB es un proceso que comienza antes del nacimiento y continúa a lo largo de toda la vida (13-15). El crecimiento del TAB se produce como resultado del aumento del número (hiperplasia) y del tamaño (hipertrofia) de los adipocitos (16) (figura 2). El reclutamiento de células madre multipotentes de linaje adipocítico para producir preadipocitos nuevos, así como la expansión mitótica clonal de los preadipocitos existentes durante la adipogénesis, son procesos que contribuyen a la hiperplasia del tejido adiposo (17, 18). El aumento de la lipogénesis y del almacenamiento de TAG y/o la disminución de la lipólisis causan la

hipertrofia de los adipocitos maduros (19). En el estado adulto el incremento de la masa de tejido adiposo es debido principalmente al aumento de tamaño de los adipocitos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en el estado adulto persiste la capacidad de generar nuevos adipocitos, tanto en individuos delgados como obesos (20). Además, se han aislado precursores de adipocitos de TAB adulto de diferentes especies, con capacidad para diferenciarse in vitro en adipocitos maduros (21-24).

1.1.2.1. Hiperplasia: diferenciación adipocítica

El uso de modelos celulares in vitro para el estudio de la diferenciación adipocítica ha permitido la caracterización de los procesos moleculares y celulares que tienen lugar durante la transición desde preadipocitos indiferenciados de tipo fibroblástico hasta adipocitos maduros. Las líneas celulares utilizadas se dividen en tres categorías (25) (figura 3):

- células embrionarias pluripotenciales, con capacidad de generar todos los linajes celulares, como las células madre embrionarias.
- células multipotenciales con capacidad para producir miocitos, adipocitos, osteocitos y condrocitos: fibroblastos embrionarios de ratón primarios, immortalizados como las líneas celulares C3H10T1/2 y NIH/3T3 y células madre de tejido adiposo (ASCs) y de médula ósea.
- células determinadas a adipocito, como los preadipocitos primarios o la línea celular 3T3-L1.

Tanto las líneas celulares como los preadipocitos primarios son morfológicamente similares a fibroblastos, pero una vez que alcanzan la confluencia y tras el tratamiento con los inductores de diferenciación adecuados, se convierten en células que progresivamente acumulan lípidos y adquieren las características morfológicas y bioquímicas propias de los adipocitos maduros. Estos inductores de diferenciación son diferentes dependiendo del modelo celular (26).

La diferenciación adipocítica es un proceso complejo en el que los preadipocitos deben interrumpir su crecimiento y salir del ciclo celular previamente a su

conversión terminal en adipocitos. Este proceso supone cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes, adquiriéndose genes característicos de adipocitos y reprimiéndose aquellos que impiden la adipogénesis o no son necesarios para que lleven a cabo sus funciones. Todos estos cambios en la expresión y función de estos genes conducen finalmente a la adquisición del fenotipo característico del adipocito (27).

Para explicar el proceso de diferenciación adipocítica se utilizará como ejemplo la línea 3T3-L1, uno de los modelos mejor caracterizados y utilizados para el estudio de la conversión de los preadipocitos en adipocitos. El proceso de diferenciación de la línea celular 3T3-L1 puede dividirse en varias etapas (figura 4):

a. Interrupción del crecimiento - Inicialmente, los preadipocitos proliferantes alcanzan la confluencia y sufren una inhibición de su crecimiento al entrar en la fase G0 del ciclo celular o fase de “secuestro proliferativo” (28).

b. Expansión clonal - Para inducir la diferenciación, se lleva a cabo la estimulación hormonal con inductores adipogénicos, cuya naturaleza dependerá de las células empleadas. En el caso de los preadipocitos 3T3-L1 consiste en una mezcla de insulina, IBMX (inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc) y el glucocorticoide dexametasona. Estos inductores promueven que los preadipocitos entren de nuevo en el ciclo celular y lleven a cabo una o dos rondas de replicación del ADN y duplicación celular. Esta expansión mitótica clonal de células comprometidas es esencial para completar la diferenciación terminal en adipocitos maduros (29).

c. Diferenciación terminal - Finalmente se produce una inhibición permanente del crecimiento y la diferenciación terminal a adipocito como consecuencia de la expresión coordinada de genes específicos que determinan el fenotipo adipocítico (30, 31).

Los cambios morfológicos y de expresión génica que ocurren durante el proceso de diferenciación adipogénica están regulados por un determinado número de factores de transcripción que se van

reprimiendo y activando secuencialmente a lo largo del proceso (figura 5). Los preadipocitos son mantenidos en un estado indiferenciado por el factor del preadipocito PREF-1, que disminuye su expresión a lo largo del proceso de diferenciación (32). PREF-1 es una proteína transmembrana que contiene repeticiones en tándem similares al factor de crecimiento epidérmico (33) y que reprime la maduración adipocítica cuando se activa al escindirse enzimáticamente en una forma soluble, estimulando la señalización vía ERK (34) que aumenta la expresión de SRY-box 9 (Sox9), un inhibidor de la adipogénesis. Durante la fase inicial de la diferenciación adipocítica, los primeros factores de transcripción que se inducen de forma transitoria en respuesta a la estimulación hormonal son C/EBP \pm y C/EBP', que responden al IBMX y a la dexametasona respectivamente (35). El aumento de AMPc debido al IBMX produce la activación de la proteína quinasa A (PKA), que fosforila a la proteína de unión a CRE (CREB), permitiendo su unión al elemento de respuesta a AMPc (CRE) del promotor de C/EBP 2 y llevando a cabo su transcripción durante las primeras horas de la diferenciación. A pesar de que su expresión alcanza los máximos niveles durante las primeras horas, C/EBP 2 no adquiere su actividad hasta las 16-20 horas de haber comenzado el proceso de diferenciación (36). La actividad de C/EBP 2 está regulada mediante fosforilaciones secuenciales mediadas por ERK, Cdk2/Ciclina A y GSK3 2 . La primera fosforilación, en la Thr188 por acción de ERK y posteriormente por Cdk2/Ciclina A (37) es necesaria para que la GSK3 2 pueda fosforilar la Thr179 y la Ser184. Estas fosforilaciones inducen un cambio conformacional de C/EBP 2 que permite su dimerización a través de su dominio de cremallera de leucina C-terminal (38), facilitando la adquisición de su actividad de unión al ADN y de transcripción (39). Por su parte, la activación transcripcional de C/EBP' se ve facilitada por la presencia de glucocorticoides y por el propio C/EBP 2 (40). Estos factores de transcripción, a su vez, son los responsables del inicio de la segunda fase mediante la activación de los factores de transcripción

C/EBP \pm , PPAR 3 (41, 42) y SREBP-1c (43), que se expresarán hasta el final del proceso de diferenciación.

La aparición de C/EBP \pm , PPAR 3 y SREBP-1c activa la expresión de la mayoría de los genes que confieren y mantienen el fenotipo adipocítico (44-46), como son la LPL (lipoproteína lipasa) (47), la FAS (sintasa de ácidos grasos), la PEPCK (fosfoenol-piruvato carboxikinasa) (48) y la ACC (acetil-CoA carboxilasa), enzimas implicadas en la lipogénesis de novo. Además aumentan la sensibilidad a insulina, debido al incremento de los receptores de insulina y de los transportadores de glucosa dependientes de insulina como el GLUT4 (45, 49). También se expresan otros genes y productos específicos de adipocitos como la traslocasa de ácido graso CD36/FAT, la proteína de unión a ácido graso FABP4/aP2 (50) y proteínas asociadas a las gotas lipídicas, como las proteínas Perilipina, ADRP y TIP47, conocidas como la familia PAT (51). Debido a la expresión de estos genes, en el citoplasma de la célula van apareciendo gotas lipídicas que a lo largo del tiempo irán incrementando y fusionándose hasta formar una o dos grandes gotas lipídicas que ocuparán gran parte del citoplasma.

C/EBP \pm y PPAR 3 corregulan su expresión durante la diferenciación adipocítica (52) y C/EBP \pm , además, mantiene su expresión por autoactivación durante la adipogénesis (53, 54). SREBP-1c también actúa durante la diferenciación adipocítica regulando PPAR 3 , activando tanto su transcripción por interacción directa con elementos de respuesta en su promotor (55), como produciendo ligandos de PPAR 3 que aumentan su acción (56, 57).

La expresión forzada de C/EBP 2 en células 3T3-L1 puede promover la diferenciación de los adipocitos, incluso en ausencia de los inductores hormonales necesarios (35). La sobreexpresión de C/EBP', por otra parte, acelera el proceso de diferenciación después de que se active por estos agentes (35). Aunque la expresión de C/EBP 2 y C/EBP' aparece antes que PPAR 3 durante la progresión de la diferenciación de los adipocitos, parece que estos dos factores no son absolutamente necesarios para el desarrollo del TAB.

Ratones deficientes en el gen *Cebpb* tienen una masa de TAB reducida, pero los MEFs derivados de estos ratones son todavía capaces de diferenciarse a adipocitos in vitro, aunque con una eficiencia reducida (58).

PPAR³ juega un papel crítico en el control de la adipogénesis y se ha demostrado que es necesario y suficiente para la diferenciación adipocítica. De hecho, la expresión forzada de PPAR³ es suficiente para inducir la diferenciación adipocítica de fibroblastos no adipogénicos (59). Por el contrario, la pérdida de la función de PPAR³ reduce o elimina la adipogénesis tanto in vivo como in vitro (60-62). PPAR³ también parece ser necesario para el mantenimiento del estado diferenciado de los adipocitos, pues la expresión de un dominante negativo de PPAR³ en adipocitos 3T3-L1 induce la desdiferenciación con pérdida de la acumulación de lípidos y la disminución de la expresión de marcadores de adipocitos (63).

El factor de transcripción C/EBP± también parece ser esencial para la diferenciación de adipocitos in vitro. Los MEFs derivados de ratones deficientes del gen *Cebpa* pierden su capacidad de diferenciarse en adipocitos. Curiosamente, aunque la expresión forzada de PPAR³ en estas células restaura su capacidad adipogénica, estas células presentan varios defectos en el almacenamiento de triglicéridos y la capacidad de transporte de glucosa estimulada por insulina. Además, mientras que la sobreexpresión forzada de PPAR³ en MEFs *Cebpa*^{-/-} puede restaurar la diferenciación adipocítica, la expresión forzada de C/EBP± en MEFs *Pparg*^{-/-} es incapaz de restaurarla, lo que sugiere que PPAR³ es el factor dominante que controla la diferenciación de los adipocitos.

Existen diversos factores con capacidad de modular la diferenciación adipocítica (figura 6), entre los que se encuentran los mediadores lipídicos, que regulan los factores de transcripción que participan en la adipogénesis. Los eicosanoides son un tipo de mediadores lipídicos derivados del AA liberado de los fosfolípidos de membrana por acción de las PLA2s. Los eicosanoides están formados por las

prostaglandinas (PGE₂, PGF_{2±}, PGD₂ y su derivado PGJ₂), la prostaciclina (PGI₂) y el tromboxano A₂ (TXA₂) a través de la acción de Ciclooxygenasas (COX); los leucotrienos (LT), las lipoxinas (LX) y las hepoxilinas (HX) a través de la acción de Lipoxigenasas (LOX); los ácidos epoxieicosatetraenoicos (ETT) por acción de las proteínas de la familia del Citocromo P450 (CYP450) y los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE) a través de la acción de LOX y de las proteínas de la familia del CYP450 (64, 65).

Existen dos isoformas de COX, COX-1 y COX-2, que son las enzimas limitantes en la biosíntesis de las prostaglandinas (PG) (66). COX-1 se expresa de forma constitutiva en los preadipocitos y adipocitos, mientras que la expresión de COX-2 es inducida de forma transitoria en las fases tempranas de la adipogénesis, disminuyendo su expresión en el adipocito maduro (67). Los productos del AA vía COX tienen efectos opuestos sobre la adipogénesis. Así, la PGD₂ producida por la PGD₂ sintasa tipo lipocalina aumenta la diferenciación adipocítica (68). Derivados de la PGJ₂, como la 15-d-PGJ₂ actúan como ligandos activadores de PPAR³, induciendo la diferenciación adipocítica (69-71). La PGI₂ también es capaz de estimular la adipogénesis uniéndose al receptor IP de la membrana de los preadipocitos, activando la AC (adenilato ciclasa) y aumentando la cantidad de AMPc que promueve la inducción de C/EBP² y C/EBP' (72). Sin embargo, la PGF_{2±} inhibe la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 vía receptor FP, a través de la activación de MAPK que fosforilan PPAR³ inhibiendo su acción (73). La PGE₂ suprime la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 a través del receptor EP4 que produce aumentos de AMPc (74), suprimiendo la expresión de PPAR³ y C/EBP± (75). La PGF_{2±} y la PGE₂ suprimen de forma sinérgica la etapa temprana de la diferenciación adipogénica a través de su propia amplificación, desencadenada por los acoplamientos con sus receptores PGF_{2±}-FP y PGE₂-EP4 y la activación de la expresión de COX-2 en células 3T3-L1 (76, 77). Además la PGE₂ inhibe la lipólisis en los adipocitos mediada por el receptor EP3 unido a proteínas G

inhibidoras (Gi) que disminuyen los niveles de AMPc (5, 78, 79).

Se conoce menos sobre la participación de los derivados de LOX y de la familia del CYP450 en la diferenciación adipocítica. Se ha descrito que la actividad LOX es necesaria para la diferenciación adipocítica de los preadipocitos 3T3-L1 (80). La eLOX3 es la única lipoxigenasa expresada en los preadipocitos 3T3-L1 y participa en las etapas tempranas produciendo HX que podrían funcionar como activadores de PPAR³ promoviendo la diferenciación adipocítica (81). El LTB4 a través del receptor BLT también acelera la diferenciación adipocítica de los preadipocitos 3T3-L1, por un mecanismo independiente del aumento de la expresión de PPAR³ y C/EBP \pm (82). El 8(S)-HETE, producto de la 8-LOX, induce la diferenciación adipocítica de los preadipocitos 3T3-L1 (83). También se ha demostrado que el 20-HETE, añadido de forma exógena, estimula la acumulación lipídica en adipocitos derivados de células madre mesenquimales humanas. Parece que este efecto se debe a la conversión a OH-PGE2 por la acción de COX-2 (84).

Además de los eicosanoides existen diferentes hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes que regulan tanto positiva como negativamente el proceso de diferenciación, influyendo en los cambios dinámicos relacionados con la masa de tejido adiposo. Entre los factores que favorecen la adipogénesis se encuentra la insulina, necesaria para una eficiente diferenciación in vitro de los adipocitos, pues activa el factor transcripcional SREBP-1c, aumentando el porcentaje de células que se diferencian y la cantidad de lípidos acumulados en el adipocito (85). La insulina aumenta la síntesis de triglicéridos e inhibe la lipólisis en los adipocitos disminuyendo la cantidad del AMPc mediante la activación de la PDE3B (fosfodiesterasa-3B). Además promueve la lipogénesis activando las enzimas lipogénicas y controlando el transporte de glucosa al interior del adipocito, pues induce la traslocación de los transportadores de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática (86). El factor de crecimiento insulínico-1

(IGF-1) es producido por varios tejidos, entre ellos el tejido adiposo. Tanto IGF-1 como su receptor IGF-1R, están implicados en la regulación de la diferenciación adipocítica y la acumulación lipídica in vitro. En las células 3T3-L1, la activación de IGF-1R, tanto por IGF-1 como por insulina, conduce a la modulación de varias rutas de trasducción de señales, incluyendo PKB/Akt, que estimula el crecimiento celular y la lipogénesis. Descubrimientos recientes indican que la señal mediada por IGF-1R en adipocitos no es necesaria para el desarrollo y diferenciación del tejido adiposo in vivo (87). Los glucocorticoides son potentes inductores de la adipogénesis in vitro. La dexametasona es el glucocorticoide más utilizado en diferenciación adipocítica in vitro y regula la expresión del factor de transcripción C/EBP'. Además, el hipercortisolismo (síndrome de Cushing) se asocia con obesidad y alteraciones en la distribución del tejido adiposo (88). El ácido lisofosfatídico (LPA), producido por deacilación del ácido fosfatídico (PA) (89, 90) o por hidrólisis del lisofosfolípido (liso-PL) generado por la acción de las PLA2s (91-93), tiene una función doble en la diferenciación de adipocitos actuando tanto como ligando extracelular para los receptores del gen de diferenciación endotelial EDG (94, 95), como ligando intracelular nuclear para el regulador transcripcional adipocítico PPAR³ (96). Algunas citoquinas proinflamatorias como el TNF \pm , la IL-1 y la IL-6, también regulan negativamente la adipogénesis (97). La IL-6, además de inhibir la adipogénesis reduciendo la actividad de la LPL in vitro (98), induce la lipólisis (99, 100). El TNF \pm también estimula la lipólisis, regula la secreción de leptina y participa en el desarrollo de la resistencia a insulina (11).

1.1.2.2. Hipertrofia: lipogénesis y formación de TAG/lipólisis

El TAB es el mayor reservorio energético del organismo. La energía es almacenada en los adipocitos en forma de TAG, cuya principal fuente procede de los quilomicrones y las VLDL circulantes. Los TAG de estas lipoproteínas son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y glicerol por la LPL que se encuentra en la pared de los capilares del tejido adiposo. Estos ácidos

grasos libres, junto con los ácidos grasos plasmáticos que circulan unidos a la albúmina, son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de ácidos grasos. Además los ácidos grasos también pueden formarse en el adipocito a partir de precursores como la glucosa (lipogénesis de novo) (101, 102). Una vez en el interior de la célula, principalmente en el RE, el ácido graso unido a CoA (acil-CoA) es esterificado en el glicerol-3-fosfato por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) generando LPA, que posteriormente esterifica otro acil-CoA por la acilglicerol fosfato aciltransferasa (AGPAT) generando ácido fosfatídico (PA). El PA por acción de la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP), también denominada lipina, elimina el fosfato produciendo diacilglicerol (DAG), que en último lugar esterifica otro acil-CoA produciendo TAG por acción de la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (figura 7). Además, tanto el PA como el DAG pueden entrar en la ruta de síntesis de fosfolípidos (103).

Se han descrito dos tipos de enzimas con actividad PAP, PAP1 dependiente de Mg^{2+} y PAP2 independiente de Mg^{2+} , pero sólo PAP1 parece estar implicada en la síntesis de TAG (104). En mamíferos la actividad PAP1 esta determinada por las proteínas de la familia lipina, Lipina-1, Lipina-2 y Lipina-3, con un patrón de expresión diferente según el tejido (105). Además en ratones el procesamiento alternativo del gen *Lpin1* da lugar a dos proteínas conocidas como Lipina-1 \pm y Lipina-1 2 . En diferenciación adipocítica, la Lipina-1 \pm y la Lipina-1 2 ejercen papeles complementarios, induciendo la primera la expresión de factores adipogénicos y la segunda la expresión de genes implicados en síntesis lipídica, como la FAS o la DGAT (106). La Lipina-1 es esencial para la actividad PAP1 en el tejido adiposo y fue identificada por primera vez por el estudio de una mutación espontánea en ratones conocida como distrofia de hígado graso (fld, del inglés fatty liver dystrophy) (107). Estos ratones, además de otros defectos como resistencia a insulina (107-109), alteración de la homeostasis lipídica hepática durante el periodo neonatal y neuropatía periférica en adultos (110-112), presentan

una lipodistrofia severa con reducción de los depósitos de TAG en los adipocitos, indicativa del importante papel que juega la Lipina-1 en la síntesis de TAG en el tejido adiposo. También se ha demostrado que la Lipina-1, además de su actividad PAP1, actúa como un cofactor transcripcional para varios factores de transcripción, entre ellos PPAR \pm , PPAR', PPAR 3 , HNF4 \pm y el receptor de glucocorticoides (113). Los MEFs de ratones fld presentan defectos en la expresión de los genes PPAR 3 y C/EBP \pm claves en la adipogénesis, sugiriendo que la Lipina-1 juega un papel importante en la regulación de la diferenciación adipocítica (114). Asimismo, la Lipina-1 es requerida para el mantenimiento de los adipocitos y se ha demostrado que es específicamente reclutada a los elementos de respuesta a PPAR 3 del gen de la PEPCK a través de una interacción física con PPAR 3 (115).

El principal papel de la lipólisis es obtener ácidos grasos y glicerol del TAG almacenado en el TAB para proveer a otros tejidos en caso de demanda energética. El TAG de la gota lipídica es hidrolizado en primer lugar por la triglicérido lipasa adiposa (ATGL) o desnitrina (116-118), liberando diacilglicerol (DAG) y un ácido graso (AG). Posteriormente el DAG es hidrolizado secuencialmente por la lipasa sensible a hormonas (HSL) (119) y la lipasa de monoacilglicerol (MGL), liberándose dos AGs y una molécula de glicerol (120). El glicerol a través del transportador Acuaporina 7 (121) y los AGs libres unidos a FABP4/aP2 (122) que facilitan su movimiento fuera del adipocito, se liberan al torrente sanguíneo (figura 7).

En condiciones basales la Perilipina A que recubre la gota lipídica impide la lipólisis del TAG al estar unida a CGI-58/ABHD5, un coactivador de la proteína ATGL (123). El glucagón y las catecolaminas, actuando sobre el receptor β -adrenérgico acoplado a proteínas G activadoras, provocan la fosforilación mediada por PKA de la Perilipina A, permitiendo la disociación del CGI-58/ABHD5 y su unión con la ATGL, activando la hidrólisis de los TAG acumulados en la gota lipídica (124-127). La PKA también fosforila la HSL, que se trasloca del citoplasma a la gota

lipídica, donde lleva a cabo la hidrólisis del DAG (128). Esto provoca la movilización de AGs desde el adipocito a la circulación, donde se unen a la albúmina y son transportados al músculo, hígado, corazón y otros órganos para su oxidación o reesterificación (129). La lipólisis mediada por glucagón y catecolaminas puede ser inhibida por la unión a receptores ± 2 -adrenérgicos, que se unen a proteínas G_i que inactivan la AC disminuyendo los niveles de AMPc (128) y por la insulina, que activa la PDE3B, disminuyendo la concentración de AMPc (130). También se ha descrito una acción antilipolítica para la PGE2 mediada por el receptor EP3, que se une a proteínas G_i disminuyendo los niveles de AMPc (5, 78, 79).

1.1.3. Obesidad

En las últimas décadas se ha producido un importante aumento de la incidencia de la obesidad en los países desarrollados (132). La obesidad es el resultado de un aumento anormal de la masa del TAB como resultado de la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos y conduce a alteraciones globales en el almacenamiento y utilización de la energía del organismo (26, 133, 134). Estas alteraciones en la homeostasis lipídica del organismo están relacionadas con el síndrome metabólico, que se acompaña de resistencia a insulina y diabetes tipo II, hipertensión y aterosclerosis (26, 133-135). En los últimos años, se ha demostrado que el aumento del tejido adiposo asociado a la obesidad puede causar hipoxia y la activación de distintas respuestas celulares entre las que se incluyen el estrés oxidativo, el estrés de retículo endoplasmático y la inflamación (figura 8) (136-143).

En relación a la inflamación se ha descrito que la expansión del tejido adiposo no solo aumenta el grado de infiltración de macrófagos en el tejido, sino que además provoca un cambio en la polarización de los macrófagos que pasarían de ser de tipo M2, con un perfil secretor antiinflamatorio, a tipo M1, con un perfil secretor proinflamatorio (144-146). Estos últimos serían los responsables de la expresión de la mayoría de las citoquinas proinflamatorias (TNF- \pm , IL-1², IL-6...) que se producen en el tejido adiposo y de las

moléculas implicadas en el reclutamiento de más monocitos (MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1), estableciéndose un círculo vicioso que amplificaría la activación de las vías inflamatorias, manteniendo un estado inflamatorio de bajo grado, que en último término provocaría un deterioro progresivo de la señalización de la insulina (147, 148). Además, estudios recientes han propuesto que los linfocitos T son claves en el inicio del proceso inflamatorio durante la obesidad, reclutando y activando macrófagos al tejido adiposo (149).

Aunque los mecanismos implicados en el reclutamiento y cambio de polarización de los macrófagos no están completamente elucidados, sí se sabe que MCP-1, una proteína quimioatrayente de monocitos producida por los macrófagos y el tejido adiposo, juega un papel importante en el proceso (150). Esta proteína actúa a través de su receptor CCR2 y ambos están incrementados en tejido adiposo de animales obesos (151).

Por otro lado, los mecanismos moleculares que explicarían la acción inhibitoria de las citoquinas proinflamatorias sobre la acción de la insulina parecen situarse interfiriendo la vía de señalización de la insulina en pasos posteriores a la unión de la insulina con su receptor. Las citoquinas proinflamatorias como el TNF- \pm estimulan la fosforilación en la serina del IRS-1 (sustrato del receptor de insulina-1), producen defectos en la actividad tirosina kinasa del IR (receptor de insulina) y disminuyen la actividad de IRS-1 y PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa), inhibiendo de esta forma la vía de señalización de la insulina (152, 153). Entre las serina/treonina kinasas que se activan por las vías inflamatorias cabría señalar a JNK, IKK²/NF- κ B y la PKC. Es más, alguna de estas kinasas, como JNK, también se pueden activar en respuesta a otras señales de alarma como el estrés oxidativo o el estrés de retículo endoplasmático (146, 154). Por otro lado, los ácidos grasos libres también podrían contribuir a la inhibición de la señal de insulina activando los TLRs (del inglés toll-like receptors) que también activarían las vías de señalización como JNK o IKK²/NF- κ B y éstas a su vez interferirían con la señal de insulina

como se ha señalado anteriormente. Existen datos que demuestran que determinados ácidos grasos, especialmente los saturados de cadena media como palmitato o estearato, pueden funcionar como agonistas de los TLRs y, por tanto, explicar así el efecto deletéreo de los ácidos grasos respecto a la acción de insulina (145, 155-157). Alternativamente, también se ha propuesto que los ácidos grasos tienen un papel indirecto actuando como precursores de las ceramidas y esfingolípidos, cuyas acciones inhibitorias sobre la acción de la insulina también han sido descritas (158). Así, bien de forma directa o indirecta, el aumento de los ácidos grasos libres, consecuencia de la expansión del tejido adiposo junto con el aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias, serían los responsables del desarrollo de la resistencia a insulina, no sólo en el tejido adiposo sino en otros tejidos periféricos, donde estas moléculas también pueden ejercer su acción inhibitoria sobre la acción de la insulina.

1.2.Ciclo celular

La proliferación y la diferenciación son dos procesos biológicos estrechamente interconectados. Durante el desarrollo del tejido adiposo, la adipogénesis incluye un paso proliferativo seguido de una fase de diferenciación, en la que se inducen los marcadores específicos de adipocitos (160). Además la adipogénesis requiere una estrecha relación entre la regulación del ciclo celular y el control metabólico. El ciclo celular de los organismos eucariotas se divide en cuatro etapas: G1, S, G2 y M. G1 es la etapa durante la cual las células se preparan para el proceso de replicación del ADN. La fase S se define como la etapa en la que se produce la síntesis de ADN. G2 es la etapa durante la cual la célula se prepara para el proceso de división. M, sinónimo de mitosis, la fase en la que los cromosomas replicados son segregados en núcleos separados y tiene lugar la citocinesis para formar dos células hermanas. Además existe otra etapa, denominada G0, que describe a las células que han salido del ciclo celular y han pasado a estar quiescentes.

La mayoría de las cascadas de señalización iniciadas tras la estimulación hormonal convergen en último lugar en la activación de los reguladores del ciclo celular, en concreto de las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas (cdks), la familia de proteínas del Retinoblastoma (pRb, p107, p130) y los factores de transcripción E2F y DP. La progresión a través del ciclo celular está controlada principalmente por las cdks y las ciclinas. La expresión génica de las ciclinas se encuentra fuertemente regulada de forma específica en cada fase del ciclo (figura 9).

La Ciclina D es la primera ciclina que se induce cuando las células en G0 son estimuladas a entrar en el ciclo celular (161). La Ciclina D está involucrada en la progresión de G1 (162) en asociación con Cdk4 y Cdk6. El primer sustrato de la Cdk4/6-Ciclina D es la familia de la proteína del Retinoblastoma (pRb, p107, p130). pRb se encuentra unida al heterodímero formado por los factores de transcripción E2F y DP (163), impidiendo la activación de su actividad transcripcional. E2F/DP regula la transcripción de muchos genes implicados en la progresión del ciclo y en la síntesis de ADN, como Ciclina E, Ciclina A, Cdk1, ADN polimerasa, etc. La Cdk4/6-Ciclina D fosforila pRb, provocando su disociación de E2F/DP y permitiendo la expresión de los genes antes mencionados, entre ellos la Ciclina E, que es inducida durante la progresión del ciclo a través de la fase G1 (164, 165). La Ciclina E se asocia con Cdk2 en la transición G1/S (166, 167) y está implicada en el mantenimiento del estado hiperfosforilado de Rb (168), participando en una retroalimentación positiva de la acumulación de E2F/DP activo.

La Ciclina A, que está regulada en parte por E2F/DP (169), se acumula en la transición de la fase G1/S y persiste a través de la fase S. La Ciclina A se asocia con Cdk2 y la actividad del complejo es requerida para la entrada y finalización de la fase S, así como para la entrada en la fase G2 (170-172). Así, el complejo Cdk2-Ciclina A fosforila el heterodímero E2F-DP, inhibiendo la capacidad del factor E2F de unirse al ADN. La fase G2 también contiene un punto de chequeo que responde al daño en el ADN y provoca un

retraso para reparar el ADN antes de que la célula entre en mitosis. La mitosis está regulada por la asociación de Cdk1 con Ciclina B1 y B2 (173, 174), que media la fosforilación de proteínas del citoesqueleto y componentes del huso mitótico. Después de la mitosis, las células entran de nuevo en G1 y repiten el ciclo o entran en G0 y detienen su crecimiento entrando en quiescencia.

Figura 9. Regulación molecular del ciclo celular. Durante la transición G1/S el complejo Cdk4/6/Ciclina D, activado por estímulos hormonales, fosforila pRb liberando el factor E2F-DP y permitiendo la expresión de la Ciclina E y Ciclina A. El complejo Cdk2/Ciclina E mantiene pRb en un estado hiperfosforilado, posibilitando que E2F este activo durante la fase S. Durante la transición a la fase G2, el complejo Cdk2/Ciclina A fosforila E2F-DP, reprimiendo su actividad. Por último, el complejo Cdk1/Ciclina B durante la transición G2/M permite la entrada en Mitosis. Adaptado de (175)

1.3. LAS FOSFOLIPASAS A2: PLA2s

Las fosfolipasas A2 (PLA2s) hidrolizan los ácidos grasos de la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos (PL) de membrana para producir un lisofosfolípido (liso-PL) y un AG libre, que en muchos casos es insaturado como, por ejemplo, el AA (figura 10). Hasta la fecha se han identificado en mamíferos más de 30 enzimas que poseen actividad PLA2 o actividades relacionadas, las cuales se han subdividido en varias familias basándose en su estructura, mecanismo catalítico, localización y relaciones evolutivas:

- La familia de las PLA2s secretadas (sPLA2s), formada por 11 enzimas extracelulares de bajo peso molecular que requieren concentraciones milimolares de Ca²⁺ para llevar a cabo su reacción.

- La familia de las PLA2s citosólicas (cPLA2s), formada por 6 enzimas con un dominio C2 en el extremo amino terminal responsable de la interacción de la enzima con las membranas de manera dependiente de Ca²⁺.

- La familia de las PLA2s independientes de Ca²⁺ (iPLA2s) o lipasas que contienen un dominio

fosfolipasa similar a patatina (PNPLA), formada por 9 enzimas, algunas de las cuales funcionan como fosfolipasas y otras como lipasas.

- La familia de las acetil-hidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH), formadas por 4 enzimas que presentan especificidad de sustrato único por PAF y/o por fosfolípidos oxidados (176-180).

Además se ha identificado nuevos tipos de PLA2s, dos PLA2s lisosomales (181) y una PLA2 específica de tejido adiposo (AdPLA) (182).

1.3.1. Fosfolipasas A2 secretadas (sPLA2s)

Hasta la fecha se han identificado en mamíferos 11 sPLA2, (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA y XIIB), que pueden clasificarse en sPLA2 convencionales (grupo I/II/V/X) y en sPLA2 atípicas del grupo III y del grupo XII. Dentro de las sPLA2 del grupo I/II/V/X, los genes de las sPLA2 IIA, IIC, IID, IIE, IIF y V están agrupados en el locus del mismo cromosoma tanto en humanos como en ratones (183, 184) y por eso a menudo se las denomina como la subfamilia de sPLA2 del grupo II.

Todas las sPLA2 son enzimas secretadas de 14-19 KDa (excepto la sPLA2 del grupo III), que requieren niveles milimolares de Ca²⁺ para la catálisis enzimática, con un lazo de unión a Ca²⁺ altamente conservado y un sitio catalítico con una diada His-Asp. Además presentan 6 enlaces disulfuro totalmente conservados y hasta dos enlaces disulfuro adicionales, que contribuyen a la alta estabilidad que presentan estas enzimas (figura 11). Las sPLA2 de mamíferos no muestran preferencias por el AG, pero si presentan cierta especificidad por la cabeza polar de los sustratos (185).

Figura 11. Estructura primaria de las PLA2s secretadas. Todas las enzimas poseen un lazo de unión a Ca²⁺ y un dominio catalítico con un centro activo formado por un par His-Asp. Adaptado de (186).

Las sPLA2s, una vez que están fuera de la célula, presentan funciones muy variadas ya que son capaces de interactuar con diversas dianas y llevar a cabo

diferentes mecanismos de acción. Así cada sPLA2 puede funcionar como:

a) una enzima que hidroliza los PL de las membranas de varias células (en reposo, activadas, dañadas, apoptóticas, etc...) liberando tanto AGs (insaturados, É-6 y É-3) como liso-PL (liso-PC, liso-PA, liso-PAF) precursores de mediadores lipídicos (185, 187-189).

b) una enzima que hidroliza los PL de las membranas de los patógenos (bacterias, virus, protozoos) y los "PL no celulares" como lípidos de la dieta, lipoproteínas, surfactante pulmonar, cuerpos lipídicos de la piel, microvesículas, etc., con diferentes efectos biológicos dependiendo del tipo de sustrato sobre el que ejerce su acción (190-194).

c) un ligando para receptores de membrana y para proteínas solubles, como el factor Xa, los receptores tipo M (PLA2R1), las integrinas, los proteoglicanos de heparán sulfato, etc, actuando independientemente de su actividad enzimática (195-199).

Actualmente se ha propuesto que las sPLA2s estarían implicadas en los procesos metabólicos que participan en el desarrollo de la obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas. La PLA2GIB/ lipasa pancreática hidroliza en el duodeno los PLs de la dieta (principalmente PC) en AGs y liso-PLs, la mayoría de los cuales serán absorbidos por los enterocitos y transportados al hígado a través de la circulación portal (200). Los ratones Pla2g1b^{-/-} son normales en cuanto a la absorción de lípidos de la dieta cuando se alimentan con una dieta común (201), sin embargo muestran resistencia a la obesidad cuando son alimentados con una dieta alta en grasas y carbohidratos (diabetogénica) (202). Además, la administración oral de metil-indoxam (inhibidor de la PLA2GIB) con la dieta diabetogénica suprime de manera efectiva la obesidad y diabetes inducida por dieta (203). Estos resultados sugieren la implicación de la PLA2GIB en la digestión intestinal de los fosfolípidos de la dieta en condiciones de obesidad y diabetes, pero en condiciones de dieta normal debe de existir alguna(s) enzima(s) en el tracto gastrointestinal que compense(n) la deficiencia de PLA2GIB (201).

La PLA2GX tiene un papel regulador en la adipogénesis. Ratones Pla2g10^{-/-} alimentados con dieta normal presentan un aumento de peso comparados con los Pla2g10^{+/+}, que se atribuye a un aumento de la adiposidad y del tamaño de los adipocitos. Además, las células de la SVF del tejido adiposo de ratones Pla2g10^{-/-} tras la diferenciación adipocítica *ex vivo* acumulan más triglicéridos comparados con las de ratones Pla2g10^{+/+}. Estos estudios, junto con otros *in vitro* de ganancia de función, sugieren que los productos generados por la PLA2GX impiden el programa adipogénico (204).

La PLA2GIIA también participa en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta. Ratas alimentadas con dieta alta en grasas y carbohidratos aumentan la expresión y secreción de la PLA2GIIA por las células inmunes del tejido adiposo principalmente. Además, la administración de KH064, un inhibidor selectivo de la PLA2GIIA, previene el aumento de la expresión de PLA2GIIA, así como el aumento de la infiltración de macrófagos y de los niveles de PGE2 en el TAB. También atenúa la adiposidad visceral asociada a dieta HF, produciendo un importante aumento de la sensibilidad a insulina, tolerancia a glucosa y anomalías cardiovasculares asociadas al síndrome metabólico (205).

1.3.2. Las fosfolipasas A2 citosólicas de grupo IV (cPLA2s)

La familia de las PLA2s de grupo IV son proteínas citosólicas de alto peso molecular (61-114 kDa), que utilizan para la catálisis enzimática una serina. La primera PLA2 de grupo IV que se identificó, denominada por ello PLA2GIVA o cPLA2 \pm , es un enzima regulada por Ca²⁺, pero a diferencia de la sPLA2, el Ca²⁺ no es requerido para la catálisis enzimática, sino para la translocación de la enzima a las membranas intracelulares a través del dominio C2 (206-211). En el siguiente apartado se tratará con más detalle este grupo, ya que es la enzima objeto de este estudio.

La familia de las PLA2GIV está formada por seis miembros (IVA, IVB, IVC, IVD, IVE y IVF, también

denominadas como cPLA2 \pm , 2 , 3 , $^{\prime}$, μ y \parallel respectivamente) (212-217). Las cPLA2 2 , $^{\prime}$, μ y \parallel forman un grupo de genes en el cromosoma 15 humano, mientras que la cPLA2 \pm y 3 se encuentran en el cromosoma 1 y 19 respectivamente (214, 215, 217, 218). Todos los miembros del grupo, a excepción de la cPLA2 3 , comparten en su estructura la presencia de un dominio C2, responsable de la unión a membranas dependiente de Ca $^{2+}$, seguido de un dominio catalítico con un motivo lipasa (GXSGX). La cPLA2 3 , además de ser la única con actividad independiente de Ca $^{2+}$ al carecer de dominio C2 (219), es susceptible de farnesilación en el extremo carboxilo terminal en humanos pero no en ratones. La cPLA2 2 presenta además un dominio JmjC antes del dominio C2 (figura 12).

cPLA2 $^{\prime}$ y cPLA2 μ no muestran preferencia por un tipo de PLs, mientras que cPLA2 \parallel prefiere como sustrato la PE (fosfatidiletanolamina) frente a la PC (fosfatidilcolina). Las cPLA2 $^{\prime}$, cPLA2 μ y cPLA2 \parallel hidrolizan tanto AA como linoleico de la posición sn-2 de los fosfolípidos, mientras que la cPLA2 2 y la cPLA2 3 muestran poca especificidad por los AGs de la posición sn-2 (212). Tanto la cPLA2 \pm como la cPLA2 $^{\prime}$ se traslocan al RE/Golgi por aumento de Ca $^{2+}$ citosólico libre (206-211). La cPLA2 3 se encuentra de forma constitutiva asociada a las membranas (220), la cPLA2 μ parcialmente asociada a los lisosomas y la cPLA2 \parallel esta localizada en el citosol y no cambian su localización por aumentos de Ca $^{2+}$ citosólico libre (215).

1.3.2.1. La fosfolipasa A2 citosólica de grupo IVA (cPLA2 \pm)

La cPLA2 \pm tiene actividad PLA2, hidrolizando preferentemente PLs de membrana con AA en la posición sn-2, y también actividad liso-PLA2 y transacilasa, aunque estas actividades son relativamente bajas comparadas con su actividad principal como PLA2 productora de AA (221). En la estructura de la cPLA2 \pm podemos distinguir dos dominios (207), uno catalítico y otro regulador (figura 13). El dominio regulador o dominio C2, está

constituido por 120 aminoácidos en el extremo amino terminal, formando 8 2 -láminas antiparalelas, y es el responsable de la interacción de la enzima con las membranas intracelulares de una manera dependiente de Ca $^{2+}$ (211, 222, 223). En el dominio C2 se han identificado los residuos que unen dos iones de Ca $^{2+}$ en los 3 lazos de unión a Ca $^{2+}$ o CBL (del inglés calcium binding loops) de la superficie de unión a membranas (224-227). Los aminoácidos responsables de unir el Ca $^{2+}$ son el Asp40, la Thr41 y el Asp43 en el CBL1, la Asn65 en el CBL2 y el Asp93, la Ala94 y la Asn95 en el CBL3 (226-228).

El dominio catalítico de la cPLA2 \pm está formado por 14 2 -láminas y 13 \pm -hélices. La Ser505, uno de los residuos susceptibles de ser fosforilados más conservados y necesario para la activación máxima de la cPLA2 \pm se localiza en una región altamente flexible, sin entrar en contacto con el cuerpo de la proteína.

Figura 13. Estructura cristalina de la cPLA2 \pm humana. El color representa el orden de los aminoácidos (de colores fríos a colores cálidos). En la estructura del dominio C2 se coordinan dos átomos de Ca $^{2+}$. En el dominio catalítico se localiza la Ser228 catalítica del centro activo cubierta por una región que actúa a modo de tapa. También se muestra la Ser505, que regula la activación de la enzima mediante su fosforilación. Imagen creada utilizando los datos cristalográficos obtenidos por Dessen y col. (229), utilizando las coordenadas de aminoácidos de la base de datos Protein Data Bank y el software iMol.

El centro activo de la cPLA2 \pm está formado por un par Ser228-Asp549 localizado en el centro de una zona profunda predominantemente hidrofóbica. Este centro activo no contiene el residuo de His que podría actuar como el tercer miembro de una tríada catalítica típica de otras lipasas. En la cPLA2 \pm , si se muta la Arg200 a Lys o Ala la actividad decrece de manera considerable. Esto sugiere que la catálisis en esta enzima se lleva a cabo por una díada formada por la Ser228 y el Asp549 en la que la Arg200 sólo estabiliza la unión del sustrato en la hendidura (230). El centro activo está cubierto por una tapa a la que se conectan unos residuos que

actúan a modo de bisagra desplazando la tapa y promoviendo la activación de la cPLA2±.

La expresión de cPLA2± está aumentada a nivel transcripcional por citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento y reprimida por glucocorticoides (231).

La cPLA2± no requiere Ca²⁺ para desarrollar su actividad catalítica, pero sí aumentos de los niveles intracelulares de Ca²⁺ para que se produzca la traslocación de la enzima desde el citosol a las membranas, permitiendo así el acceso a su sustrato (paso clave en la regulación de la cPLA2±) (232, 233). Estudios con mutantes de la cPLA2± en los que se ha suprimido el dominio regulador C2 han permitido determinar que este dominio es necesario para que la enzima pueda unirse a las membranas e hidrolizar los fosfolípidos, pero no lo es para la hidrólisis de fosfolípidos monoméricos que no se encuentran localizados en membranas (figura 14) (233, 234). En muchos tipos celulares expuestos a agonistas que movilizan Ca²⁺ se ha observado cómo la cPLA2± se transloca a la membrana perinuclear, al RE y al aparato de Golgi (206-209, 235). Mediante técnicas de imagen en células vivas se ha observado que, en respuesta a aumentos fisiológicos de Ca²⁺ intracelular (pequeños aumentos transitorios), la cPLA2± se transloca principalmente al Golgi, mientras que la translocación al RE y a la membrana perinuclear requiere concentraciones de Ca²⁺ más elevadas (209). Resultados más recientes han mostrado que la cPLA2± también se puede translocar a otros compartimentos celulares, como las gotas lipídicas citoplásmicas (236, 237) y los fagosomas en formación (238-240). El dominio C2 se comporta de la misma manera que la enzima completa en respuesta a aumentos en los niveles de Ca²⁺, lo que indica que es suficiente para dirigir la localización subcelular de la enzima en respuesta a agonistas que movilizan Ca²⁺ (209). La especificidad de unión de los dominios C2 a fosfolípidos tiene un papel fundamental en la determinación de la localización subcelular. Por ejemplo, el dominio C2 de la PKC± tiene preferencia por la membrana plasmática rica en fosfolípidos

cargados negativamente como la PS (fosfatidilserina) y el PI(4,5)P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) (241-246), mientras que el dominio C2 de la cPLA2± prefiere membranas ricas en PC (209, 247-250).

El dominio catalítico de la cPLA2± contiene varios sitios funcionales susceptibles de fosforilación (figura 12 y 14). Dependiendo del tipo celular y del estímulo, la cPLA2± puede ser fosforilada por las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en la Ser505, por las proteínas kinasas activadas por MAPKs (MAPKAPKs) en la Ser727 y por la Ca²⁺/calmodulina kinasa II (CaMK II) en la Ser515 (251-255). La cPLA2± purificada y completamente desfosforilada es catalíticamente activa pero incrementa su actividad dos o tres veces cuando es fosforilada en el residuo de Ser505 (256, 257). Fosforilaciones en la Ser505 o Ser727 participan en la regulación de la liberación de AA en condiciones de aumentos transitorios de los niveles de Ca²⁺ intracelulares, pero son menos importantes cuando los aumentos de Ca²⁺ son elevados y mantenidos (252). Por ello se sostiene la hipótesis de que la fosforilación, más que regular la actividad catalítica, está implicada en la unión a membranas dependiente de Ca²⁺ (240, 258). La Ser505 y la Ser727 susceptibles de fosforilación se encuentran en una región flexible que no está cerca ni de la cara de unión a membranas ni en el centro activo (figura 14). Se piensa que la fosforilación de la Ser505 podría promover la orientación óptima de los dominios C2 y catalítico para que se llevara a cabo una catálisis eficiente (229). La fosforilación de la Ser505 por MAPKs está acompañada generalmente de la fosforilación de la Ser727 por MAPKAPKs (251, 252, 259). La fosforilación de la Ser727 regula la interacción del complejo p11/Anexina A2 con la cPLA2± (260). Este complejo se une al grupo hidroxilo de la Ser727, manteniendo la cPLA2± en un estado inactivo al interferir en su unión in vitro con la membrana y en la translocación a las membranas perinucleares de las células (260, 261). La interacción del complejo p11/Anexina A2 con cPLA2± se evita mediante la fosforilación de la Ser727, permitiendo así la interacción dependiente de Ca²⁺ de la cPLA2± con la membrana y la liberación de AA (260).

El dominio catalítico de la cPLA2± contiene un grupo de residuos básicos formado por la Arg488, Lys541, Lys543 y Lys544 responsable de la unión a fosfoinosítidos (PIPs) (figura 14) (262, 263). Los PIPs que más incrementan in vitro la actividad de la cPLA2± son el PI(4,5)P2 y el PI(3,4,5)P3, y en menor grado el PI(3,4)P2 (262-265). Se ha sugerido que la unión de la cPLA2± a los PIPs induce un cambio conformacional que sitúa de manera óptima el dominio catalítico en la membrana (239, 262, 266).

La ceramida 1-fosfato (C1P) es un potente regulador alostérico de la actividad de la cPLA2± in vitro. Se ha encontrado en el dominio C2 otro grupo de residuos básicos formado por la Arg57, la Lys58 y la Arg59, responsable de la unión a C1P tanto in vitro como in vivo (figura 14). Se ha sugerido que la C1P disminuye la constante de disociación de la enzima haciendo que permanezca más tiempo anclada en las membranas (267-270).

Se han descubierto varias proteínas que interactúan con la cPLA2±, como la Vimentina, la p11 o S100A10 (del inglés S100 calcium binding protein A10), la Anexina A1, la Caveolina-1, B-Myb y la proteína de interacción a cPLA2± (PLIP, del inglés cPLA2± interacting protein), una variante del procesamiento alternativo de TIP60. La Vimentina se une al dominio C2 de la cPLA2± de forma dependiente de Ca2+ aumentando la liberación de AA (271). La interacción del complejo p11/Anexina A2 con la cPLA2± (260) mantiene la cPLA2± en un estado inactivo al interferir en su unión a las membranas (260, 261). En queratinocitos humanos, la unión dependiente de Ca2+ de la proteína S100A11 (S100 calcium binding protein A11) con la Anexina A1 facilita la unión de la Anexina A1 a la cPLA2± provocando la inhibición de la actividad cPLA2± (272). La asociación de la cPLA2± con el aparato de Golgi de forma independiente de Ca2+ en células endoteliales confluentes requiere la presencia de Anexina A1 y provoca un bloqueo de la liberación de PGE2 (273). En algunos modelos, la cPLA2± se localiza en microdominios ricos en Caveolina-1 y co-inmunoprecipita con ella (274). La cPLA2± también puede asociarse con el factor de

transcripción nuclear B-Myb, que puede dirigir a la cPLA2± al núcleo por sus señales de localización nuclear. El complejo formado por la cPLA2± y B-Myb puede suprimir la expresión de c-Myc en macrófagos (221). PLIP también se une al dominio C2 de la cPLA2± y colocaliza con la cPLA2± en el núcleo en ausencia de suero, promoviendo la generación de PGE2 (275).

La actividad de la cPLA2± es mayor en células endoteliales subconfluentes que en células confluentes, a pesar de que las células endoteliales subconfluentes y confluentes expresan la misma cantidad de cPLA2± (276). Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha descrito que la cPLA2± en las células endoteliales subconfluentes está localizada en el citoplasma y en el núcleo y que el aumento de los niveles de Ca2+ citosólico inducen la relocalización de la cPLA2± a la periferia nuclear (RE y compartimento intermedio RE-Golgi) y el aumento de la liberación de AA. Sin embargo, en células endoteliales confluentes la cPLA2± se asocia con el aparato de Golgi que bloquea su relocalización a la periferia nuclear y el aumento de la liberación de AA tras la elevación de los niveles de Ca2+. Estudios recientes sugieren que la interacción de la cPLA2± y la Anexina A1 en el Golgi debida a la confluencia celular podría ser el mecanismo que controla la actividad cPLA2± (273).

Desde que hace más de 20 años se publicaron los primeros estudios demostrando que las células de mamífero contenían una PLA2 citosólica dependiente de Ca2+ específica para el AA (277, 278) se ha mantenido que su papel principal era la liberación de AA destinado a la producción de eicosanoides. La cPLA2± contribuye a la patogénesis de muchas enfermedades, especialmente aquellas con un importante componente inflamatorio como las respuestas alérgicas, daño pulmonar agudo, fibrosis pulmonar, daño cerebral, artritis, reabsorción ósea y encefalomielitis autoinmune (279-287). Se ha determinado que la cPLA2± es necesaria para la biogénesis de las gotas lipídicas en células CHO-K1, pues tanto la inhibición farmacológica como el silenciamiento génico de la cPLA2± impiden la

biogénesis de las gotas lipídicas inducidas por suero y por ácidos grasos de cadena larga. La inducción de las gotas lipídicas depende de la fosforilación en la Ser505 de la cPLA2± mediada por JNK, pero es independiente de la liberación de AA y de la translocación a la membrana dependiente de la unión Ca²⁺-dominio C2. La inhibición de la cPLA2± produce un aspecto tubulovesicular del RE rugoso, compatible con el papel de la cPLA2± en la formación de las gotas lipídicas nacientes desde el RE (288). Además la biogénesis de las gotas lipídicas depende del aumento de C1P, pues la sobreexpresión de la enzima que la sintetiza (ceramida kinasa) aumenta la fosforilación en la Ser505 de la cPLA2± y la formación de gotas lipídicas, mientras que su disminución bloquea este proceso (288, 289). Resultados más recientes han indicado que la fosforilación simultánea de cPLA2± por las kinasas JNK y p38 puede constituir un evento clave de la regulación de la formación de gotas lipídicas por esta enzima en leucocitos, lo que ocurre posiblemente a través de una modulación de la biosíntesis del orgánulo, no de la producción de lípidos neutros (290). La construcción de un ratón genéticamente modificado en el que se eliminó el gen de la cPLA2± ha proporcionado una gran cantidad de información acerca del papel de la cPLA2± en los procesos fisiológicos y patológicos (279, 280). In vivo, ratones Pla2g4a^{-/-} están protegidos frente a la acumulación de gotas lipídicas en el hígado y en el tejido adiposo por dieta normal y dieta HF (291, 292), probablemente debido a la perturbación de la maquinaria de formación de gotas lipídicas, como se ha señalado más arriba, o a una reducción de la producción de mediadores lipídicos adipogénicos o pro-inflamatorios. Del mismo modo, ratones Pla2g4a^{-/-} son resistentes a la aterosclerosis inducida por dieta aterogénica (293).

1.3.3. Las fosfolipasas A2 independientes de Ca²⁺/PNPLA

En mamíferos existen 9 iPLA2s, también denominadas lipasas, que poseen un dominio fosfolipasa similar a patatina (PNPLA1-9) (294, 295). Todas las enzimas de la familia poseen un dominio catalítico conservado que muestra homología con la patatina/iPLA2± de la patata

y adyacente a él, existe un motivo conservado de unión a nucleótidos (GXGXXG). El motivo patatina usa una díada catalítica (Ser-Asp) diferente de la tríada catalítica (Ser-His-Asp) encontrada en las lipasas clásicas (296). Las PNPLAs de mamíferos incluyen hidrolasas lipídicas con especificidades por diferentes sustratos como triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de retinol. La designación “PNPLA” parece ser más apropiada que “iPLA2”, ya que cada vez es más evidente que más de la mitad de estas enzimas funcionan principalmente como lipasas en lugar de como fosfolipasas. La familia iPLA2/PNPLA se subdivide en dos clases: enzimas tipo fosfolipasa (PLA), que actúan sobre fosfolípidos y enzimas tipo lipasa, que actúan sobre lípidos neutros. Las enzimas tipo PLA poseen un largo dominio amino terminal, que participa en su interacción proteína-proteína (repeticiones de anquirina) y en su localización transmembrana e intracelular. Las enzimas de tipo lipasa carecen del dominio amino terminal y se piensa que actúan principalmente en triglicéridos y otros lípidos neutros de las gotas lipídicas (figura 15). Actualmente se ha propuesto que las iPLA2s participan en los procesos metabólicos que tienen lugar durante el desarrollo de la obesidad y las anomalías metabólicas asociadas. Así por ejemplo, la iPLA2² (PLA2GVIA-2) está relacionada con la secreción de insulina estimulada por glucosa (297-300). Los ratones Pla2g6a^{-/-} sometidos a dieta HF, presentan una intolerancia más severa a la glucosa pero una mayor capacidad de respuesta a la insulina exógena que los ratones Pla2g6a^{+/+}. Por el contrario, ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de la Pla2g6a específicamente en las células ² pancreáticas presentan una concentración menor de glucosa en sangre y una mayor concentración de insulina en plasma durante el ayuno que los ratones control, y desarrollan niveles más bajos de glucosa en sangre en pruebas de tolerancia a glucosa (300). La iPLA2² también se ha relacionado con el estrés de retículo que causa la apoptosis de las células ² pancreáticas durante el desarrollo de la diabetes mellitus (301). La iPLA2² participa en la diferenciación adipocítica in vitro de los preadipocitos 3T3-L1, pues la disminución de su expresión en

experimentos de silenciamiento génico mediante siRNA disminuye la cantidad de TAG y la inducción de C/EBP \pm y PPAR 3 (302). Además, se piensa que existe una relación entre la iPLA2 2 y la lipogénesis en base a experimentos in vitro en los que el silenciamiento génico de la iPLA2 2 produce una reducción de la síntesis de triglicéridos asociada a una reducción de la formación de gotas lipídicas inducidas por estrés, y a experimentos en los que la sobreexpresión de la iPLA2 2 produce un aumento de estos parámetros (303). Esto sugiere que la iPLA2 2 suministra ácidos grasos obtenidos de los fosfolípidos para la síntesis de triglicéridos, mientras que la cPLA2 \pm se encarga de la biogénesis de las gotas lipídicas (ver sección de las funciones de la cPLA2 \pm).

La iPLA2 3 (PLA2GVIB), al igual que la iPLA2 2 , promueve la adipogénesis in vitro, pues su silenciamiento génico mediante siRNA inhibe la diferenciación adipocítica de los preadipocitos 3T3-L1 (302). Los ratones Pla2g6b $^{-/-}$ son delgados, con lipodistrofia abdominal y presentan una disminución de la secreción de insulina estimulada por glucosa después de una alimentación HF. Además, los ratones Pla2g6b $^{-/-}$ son resistentes a ganar peso, adiposidad, hígado graso e hiperlipidemias inducidas por dieta HF y presentan una relativa resistencia a insulina, intolerancia a glucosa y una alteración de los patrones de utilización energética de los lípidos a favor de los hidratos de carbono (304, 305).

La iPLA2 μ /PNPLA3 (PLA2GVID), también denominada adiponutrina, fue descubierta por primera vez en adipocitos, en los que se induce notablemente su expresión por insulina y durante la adipogénesis, pero se reduce durante el ayuno (306). In vitro, la iPLA2 μ /PNPLA3 muestra actividad triglicérido lipasa, transacilasa y una débil actividad PLA2 (116). Sin embargo, ni la sobreexpresión ni la disminución de la iPLA2 μ /PNPLA3 afecta a la lipólisis ni a la acumulación de triglicéridos en los adipocitos. Recientemente se ha descubierto en humanos una asociación entre variantes genéticas de la iPLA2 μ /PNPLA3 y el contenido de grasa hepática y la función hepática (307-310). Existe una fuerte

asociación entre variaciones alélicas del gen iPLA2 μ /PNPLA3 y la predisposición hereditaria a hígado graso tanto alcohólico como no alcohólico. Sin embargo, los ratones Pla2g6d $^{-/-}$ no presentan hígado graso ni con la dieta común ni con tres tipos diferentes de dietas que inducen hígado graso (311). También se han descubierto asociaciones entre polimorfismos del gen de la iPLA2 μ /PNPLA3 y la secreción de insulina en humanos obesos (312).

La iPLA2 η /PNPL2 (PLA2GVIE), también conocida como ATGL (triglicérido lipasa adiposa) o desnutrina, aunque posee actividad transacilasa y una débil actividad PLA2 in vitro, existen muchas evidencias tanto a nivel celular como in vivo, de que funciona principalmente como lipasa de triglicéridos tanto en el tejido adiposo como en otros tejidos (116). La iPLA2 η /PNPL2/ATGL aumenta su expresión en 3T3-L1 durante la adipogénesis (186), así como en el TAB de ratones después del ayuno o del tratamiento con dexametasona, pero disminuye su expresión por insulina (118, 131, 313). Los ratones Pla2g6e $^{-/-}$ muestran un defecto severo de la hidrólisis de triglicéridos en múltiples tejidos, lo que produce un aumento de la deposición lipídica tanto en el tejido adiposo como en otros tejidos (314). La acumulación de triglicéridos en el corazón culmina en una cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca y muerte prematura. Además el deterioro de la lipólisis en el TAM causa un defecto en la adaptación al frío. A pesar de la acumulación de triglicéridos en tejidos que responden a la insulina, estos ratones tienen aumentada la utilización de la glucosa, la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en todo el organismo. Tanto los ratones que carecen de iPLA2 η como los que carecen de HSL tienen alterada la capacidad lipolítica inducida por el ejercicio (315). Al contrario de lo observado en los ratones Pla2g6e $^{-/-}$, los ratones que sobreexpresan el gen Pla2g6e específicamente en el tejido adiposo presentan un aumento de la lipólisis y una disminución de la obesidad inducida por dieta (316). Mutaciones en el gen PNPLA2/iPLA2 η o en su coactivador CGI-58/ABHD5 en humanos causan enfermedades de almacenamiento de lípidos neutros caracterizadas por la acumulación de triglicéridos en

diversos tejidos (317-319). Se han encontrado diversos polimorfismos en el gen PNPLA2 humano que están correlacionados con una disminución de los niveles de ácidos grasos y triglicéridos en plasma, aumento de los niveles de glucosa durante el ayuno e incremento del riesgo de diabetes tipo II (320).

1.3.4. Las acetil hidrolasas del factor activador de plaquetas

La familia de las acetil-hidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH) está formada por cuatro enzimas con una serina catalítica que catalizan la hidrólisis del acetilo de la posición sn-2 del PAF originando 1-O-alkil-fosfololina y acetato. Una de ellas, la PAF-AH tipo plasma o PLA2 asociada a lipoproteínas (PLA2GVIIA), es una enzima secretada que ha atraído recientemente la atención como nueva diana terapéutica para la aterosclerosis (176-179). Las otras tres enzimas son intracelulares, denominadas PAF-AH tipo II (PLA2GVIIIB), homóloga a la PAF-AH tipo plasma y la PAF-AH tipo I (PLA2GVIII), que está formada por un homo o heterodímero de dos subunidades catalíticas estrechamente relacionadas, ± 1 y ± 2 , unido a otra subunidad reguladora ², LIS-1 (180). Se ha sugerido que la PAF-AH tipo II participa en la defensa frente al estrés oxidativo (321, 322) mientras que PAF-AH tipo I juega un papel importante en la espermatogénesis (323, 324).

1.3.5. Las fosfolipasas A2 lisosomales

Se han identificado dos tipos diferentes de PLA2s con localización lisosomal, la PLA2 ácida independiente de Ca^{2+} (aiPLA2) y la PLA2 lisosomal (LPLA2) o PLA2 del grupo XV (181). Aunque estructuralmente son diferentes, ambas se localizan en los lisosomas, muestran preferencia por pH ácidos para la catálisis y desempeñan un papel común en el metabolismo homeostático del surfactante pero en diferentes tipos celulares, células alveolares de tipo 2 y macrófagos alveolares respectivamente.

1.3.6. La fosfolipasa A2 específica de tejido adiposo (AdPLA)

Recientemente se ha identificado una nueva PLA2 asociada a las membranas y dependiente del Ca^{2+} intracelular, denominada fosfolipasa específica de tejido adiposo (AdPLA) o PLA2GXVI, que presenta una elevada expresión en TAB y se induce durante la diferenciación adipocítica (182). La actividad enzimática de la AdPLA está mediada por una tríada catalítica Cys113-His23-His35 y en el carboxilo terminal se encuentra un dominio transmembrana que es requerido para la catálisis en la interfase (figura 16) (325). La primera publicación que describía la AdPLA establecía una preferencia de la enzima por hidrolizar la posición sn-2 de la PC (182), pero otro estudio más reciente muestra que esta enzima es capaz de liberar ácidos grasos tanto de la posición sn-1 como sn-2, y que dependiendo de las condiciones, su actividad PLA1 puede ser mayor que su actividad PLA2 (326).

Los ratones *Pla2g16^{-/-}* tienen una marcada reducción de la masa del TAB y del contenido de triglicéridos, pero una adipogénesis normal (79). También presentan un elevado gasto energético por un aumento de la oxidación de ácidos grasos en los adipocitos. Los ratones *Pla2g16^{-/-}* tienen aumentada la tasa de lipólisis y disminuidos los niveles de PGE2 en el tejido adiposo (79). En este estudio los autores concluyen que la AdPLA suministraría AA para la síntesis de PGE2 y que el aumento de la lipólisis observado en los ratones *Pla2g16^{-/-}* se debe a un marcado incremento de los niveles de AMPc por una menor acción de la PGE2 sobre el receptor EP3 en el TAB (79). Sin embargo hay que ser cautos con esta interpretación, pues la disminución de los niveles de PGE2 en el tejido adiposo de los ratones *Pla2g16^{-/-}* obesos puede deberse simplemente a una menor migración al tejido adiposo de macrófagos que expresan *cPLA2 \pm* (186). Por todo esto, parece posible que la AdPLA, que es una PLA1/2, pudiera promover la obesidad a través de algún mecanismo diferente de la señalización mediada por PGE2.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos anteriormente, los objetivos generales de este trabajo son tanto desvelar la posible intervención de la cPLA2± en el proceso de diferenciación adipocítica in vitro como determinar su participación en algunos de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de la obesidad inducida por dieta HF en ratones. Estos objetivos generales pueden ser desglosados en varios objetivos más específicos:

2.1. Estudiar la expresión de la familia de las PLA2s en preadipocitos y adipocitos diferenciados in vitro, así como en la SVF y en los adipocitos que componen el tejido adiposo.

2.2. Caracterizar la cPLA2± durante el proceso de diferenciación adipocítica in vitro, definiendo su actividad, expresión proteica y génica, su regulación por fosforilación y su localización.

2.3. Analizar el papel de la cPLA2± en el proceso de diferenciación adipocítica in vitro, describiendo sus efectos sobre procesos de señalización tempranos y tardíos, así como su impacto final en el almacenamiento lipídico y la expresión de proteínas específicas de adipocitos.

2.4. Analizar el papel del AA, uno de los productos de la cPLA2±, en el proceso de diferenciación adipocítica in vitro, describiendo si es responsable de los procesos en los que participa la cPLA2± durante la diferenciación adipocítica in vitro.

2.5. Analizar el papel de la cPLA2± en los mecanismos que participan en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta HF en ratones y en los procesos asociados a ella, como la inflamación de bajo grado del tejido adiposo y la resistencia a la insulina.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Cultivo de la línea celular 3T3-L1 – Una de las líneas celulares utilizadas en este trabajo es la línea

preadipocítica 3T3-L1 (ATCC CL-173), obtenida gracias a la generosidad del Dr. Jose Javier García Ramírez, de la Universidad de Castilla-La Mancha. Proviene de la línea celular 3T3 (ATCC CCL-92), desarrollada por Todaro y Green (327) a partir de fibroblastos embrionarios de ratones Swiss albinos, utilizando el protocolo 3T3, que da lugar al nombre de la línea, y que consiste en la transferencia (“T”) cada 3 días (primer “3”) de 3×10^5 células (segundo “3”). Esta línea celular 3T3 fue sometida a un proceso de aislamiento clonal, desarrollado por Green y Meuth (328), eligiendo aquellos clones capaces de diferenciarse de fibroblastos a adipocitos en presencia de una mezcla de inductores hormonales, obteniéndose así la línea celular 3T3-L1. El cultivo de estas células se llevó a cabo en incubadores a 37 °C, en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂, siguiendo las pautas establecidas por la ATCC, teniendo especial importancia el evitar la confluencia durante la amplificación y la utilización de las células entre los pases 1-10, para que su capacidad de diferenciación no se vea disminuida.

Medio de cultivo de fibroblastos: medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera previamente inactivado (20 min a 56 °C), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina y 25 mM de HEPES.

Medio de cultivo de adipocitos: medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) previamente inactivado (20 min a 56 °C), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina y 25 mM de HEPES.

Medio de diferenciación 1 (MD1): medio de cultivo de adipocitos al que se le añaden 5 µg/ml de insulina, 0,5 mM de IBMX y 0,25 µM de dexametasona.

Medio de diferenciación 2 (MD2); Medio de cultivo de adipocitos al que se le añaden 5 µg/ml de insulina.

Los fibroblastos 3T3-L1 se mantuvieron en medio de cultivo de fibroblastos hasta que llegaron a confluencia (día -2). Dos días después, día 0, se indujo la diferenciación mediante la sustitución de este medio de

cultivo por el MD1. El día 2 se cambió el MD1 por el MD2, que fue sustituido a día 5 por el medio de diferenciación de adipocitos. A partir de este día las células se mantuvieron con este medio de diferenciación, que fue cambiado cada 2 días. Las células se consideraron diferenciadas y con fenotipo de adipocito a partir del día 8 (figura 17).

3.2. Cultivo y diferenciación de la línea celular NIH/3T3 – Otra línea celular utilizada en este trabajo es la línea fibroblástica NIH/3T3 (ATCC CRL-1658), también obtenida gracias a la generosidad del Dr. Jose Javier García Ramírez, de la Universidad de Castilla-La Mancha. Proviene de fibroblastos embrionarios de ratones NIH Swiss utilizando el protocolo 3T3, descrito anteriormente (327). NIH/3T3 es considerada la línea celular estándar de fibroblastos. El cultivo de estas células se llevó a cabo en incubadores a 37 °C, en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂, siguiendo las pautas establecidas por la ATCC, evitando la confluencia durante la amplificación y utilizando las células entre los pases 1-10, al igual que en las células 3T3-L1. Los fibroblastos NIH/3T3 se diferenciaron siguiendo el protocolo descrito para las células 3T3-L1, a excepción de que el MD2 y el medio de cultivo de adipocitos fueron suplementados con 10 µM de pioglitazona.

3.3. Obtención y cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón – Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) cPLA2^{±/+} y cPLA2^{±/-} fueron proporcionados por el Dr. Makoto Murakami del Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokio, Japón. El protocolo para su obtención y cultivo se basa en el protocolo descrito por Sharpless (329). Los MEFs se obtuvieron de embriones de 14,5 días de gestación. Una vez sacrificada la hembra gestante, se realizó una laparotomía media ventral y se extrajeron los cuernos uterinos que contienen los embriones. Éstos se separaron del saco embrionario y de la placenta y se colocaron cada uno en una placa de Petri. En condiciones de esterilidad, se eliminaron la cabeza y los órganos internos. El resto del tejido se cortó en trozos pequeños, se les añadió un volumen de tripsina-EDTA y posteriormente se incubaron durante 15 min a

37 °C. La tripsina se inactivó por adición de 3 volúmenes de medio de cultivo (indicado en el apartado 3.3.1.) y la suspensión celular se terminó de disgregar mediante pipeteo continuado. Para eliminar los restos de tejido no disgregado, se pasó la suspensión celular por filtros de 100 µm. Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 200 xg y el pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en placas de cultivo. Consideramos en este momento los fibroblastos en pase 0. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C, atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo por medio de cultivo fresco cada 3 días. Cuando alcanzaron una confluencia del 80-90 %, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina-EDTA hasta que las células se despegaron de la placa. Se añadieron 3 volúmenes de medio de cultivo para inactivar la tripsina y se centrifugaron a 200 xg 5 minutos. En este punto las células se resuspendieron en medio de criopreservación [medio de cultivo con 5% de DMSO (v/v)] y se almacenaron en nitrógeno líquido para un uso posterior o bien se resuspendieron en medio de cultivo y se expandieron de nuevo en placas de cultivo, considerándose en este momento en pase 1. Las células no deben alcanzar la confluencia durante la amplificación y deben utilizarse entre los pases 1-5, para que no pierdan su capacidad de diferenciación. Además, deben expandirse diluyendo como máximo 1:5, pues su capacidad de división puede verse afectada.

Los MEFs se mantuvieron en medio de cultivo hasta que llegaron a confluencia (día -2). Dos días después, día 0, se indujo la diferenciación mediante la sustitución de este medio por el MD1. El día 2 se cambió el MD1 por el MD2, que fue sustituido a día 5 por el MD3. A partir de este día las células se mantuvieron con este medio de diferenciación, que fue cambiado cada 2 días. Las células se consideran diferenciadas y con fenotipo de adipocito a partir del día 8 (figura 18).

3.4. Animales – Para la realización de este trabajo se han utilizado ratones hembras Swiss y C57/BL/6 cPLA2^{±/+} y cPLA2^{±/-}. Los ratones Swiss fueron

proporcionados por el animalario de la Universidad de Valladolid. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y fueron alimentados ad libitum durante 12 semanas. Los ratones C57/BL/6 cPLA2^{±/±} y cPLA2^{±/-} fueron proporcionados por el Dr. Makoto Murakami del Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokio, Japón. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y fueron alimentados ad libitum con agua y una dieta normal (CE2; CLEA Japan) hasta las 8 semanas de edad, seguida de una dieta HF (High fat diet 32; CLEA Japan) hasta las 20 semanas de edad. El peso corporal de los animales fue controlado cada semana. Los experimentos fueron realizados con conformidad a las normas establecidas por el animalario de la Universidad de Valladolid y del Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science.

3.5. Prueba de tolerancia a la glucosa – La prueba de tolerancia a glucosa se realizó en ratones cPLA2^{±/±} y cPLA2^{±/-} alimentados durante 12 semanas con una dieta HF. Se privó a los ratones de alimento durante 16 h y posteriormente se les inyectó intraperitonealmente 2 mg de glucosa por g de ratón (Wako) en solución salina. El nivel de glucosa en sangre se midió a diferentes tiempos utilizando el sistema de monitorización de glucosa en sangre Medisafe-Mini (Terumo).

3.6. Prueba de tolerancia a insulina – La prueba de tolerancia a insulina se realizó en ratones ratones cPLA2^{±/±} y cPLA2^{±/-} alimentados durante 12 semanas con una dieta HF. Se privó a los ratones de alimento durante 6 h y posteriormente se les inyectó intraperitonealmente 0,75 mU de insulina por g de ratón (Eli Lilly) en solución salina. El nivel de glucosa en sangre se midió a diferentes tiempos utilizando el sistema de monitorización de glucosa en sangre Medisafe-Mini (Terumo).

3.7. Obtención de muestras de tejidos y órganos – Los animales fueron sacrificados por desmedulación. Los tejidos se diseccionaron, pesaron y procesaron o almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Se

obtuvieron muestras de tejido adiposo gonadal de ratones Swiss, así como muestras de hígado y tejido adiposo gonadal de ratones C57/BL/6 cPLA2^{±/±} y cPLA2^{±/-}.

3.8. Dispersión del tejido adiposo y obtención de adipocitos y SVF – La dispersión y separación celular del tejido adiposo se lleva a cabo siguiendo el protocolo descrito por Rodbell (330). Se recogieron muestras de tejido adiposo gonadal de ratones Swiss en tampón Krebs-Ringer (KRB) HEPES pH 7,4 estéril. Posteriormente se troceó el tejido adiposo, desechando los vasos sanguíneos, y se incubaron con una solución de 2 mg/ml colagenasa IV en un baño durante 1 h a 37°C y con agitación suave. Posteriormente se filtró la suspensión celular con un filtro de 100 µm de poro para eliminar el tejido no disperso y se añadieron 3 volúmenes de medio de cultivo [medio DMEM F-12 suplementado con 10% (v/v) de FBS inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin] para inactivar la colagenasa. Tras una centrifugación a 600 xg durante 10 minutos, se forman una capa superior, correspondiente a los adipocitos maduros y un pellet, correspondiente a la SVF. La capa superior conteniendo los adipocitos maduros se recogió para su posterior procesamiento y el pellet se resuspendió en medio de cultivo, se filtró con un filtro de 40 µm de poro y se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos. Para eliminar los restos de eritrocitos, se resuspendió el pellet en 500 µl del tampón de lisis de eritrocitos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Por último se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos y el pellet resultante se recogió para su posterior procesamiento o se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en una placa de cultivo para el aislamiento por adhesión de las ASCs.

Las ASCs obtenidas de la SVF se mantuvieron en un incubador a 37 °C, atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂. Consideramos en este momento las ASCs en fase 0. Cada 3 días, se lavaron las células con PBS y se añadió medio de cultivo fresco. Cuando alcanzaron una confluencia del 80-90 %, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina-EDTA hasta que las células se despegaron

de la placa. Se añadieron 3 volúmenes de medio de cultivo para inactivar la tripsina y se centrifugaron a 200 xg 5 minutos. En este punto las células se resuspendieron en medio de criopreservación [medio de cultivo con 5% de DMSO (v/v)] y se almacenaron en nitrógeno líquido para un uso posterior o bien se resuspendieron en medio de cultivo y se expandieron de nuevo en placas de cultivo, considerándose en este momento en fase 1. Las células no deben alcanzar la confluencia durante la amplificación y deben utilizarse entre los pases 1-5, para que no pierdan su capacidad de diferenciación. Además, deben expandirse diluyendo como máximo 1:5, pues su capacidad de división puede verse afectada.

Las ASCs se pueden diferenciar *in vitro* a distintos linajes celulares, como adipocitos, condrocitos, osteocitos y miocitos en presencia de factores inductores específicos (23, 24). Las ASCs se mantuvieron en medio de cultivo y cuando alcanzaron la confluencia, se estimuló la diferenciación adipocítica mediante la sustitución del medio de cultivo por medio de cultivo suplementado con 10 μ M de insulina, 0,5 mM de IBMX, 1 μ M de dexametasona y 200 μ M de indometacina. Este medio fue renovado cada 3 días y las células se consideran diferenciadas a partir del día 9.

3.9. Silenciamiento génico mediante siRNA – Los siRNAs (ARN pequeño de interferencia, del inglés small interfering RNA) son moléculas de ARN de doble cadena con una longitud de 19-23 nucleótidos que se caracterizan por tener en los extremos 3' dos nucleótidos sobresalientes (no apareados). El proceso de interferencia es un proceso de regulación postranscripcional altamente coordinado en el cual se produce la degradación específica del ARNm. El complejo enzimático encargado de generar estas moléculas específicas a partir de pequeñas moléculas de ARN de doble cadena se denomina DICER y pertenece a la familia de nucleasas específicas de ARN de doble cadena. Los siRNA son reconocidos por el complejo enzimático RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN, del inglés RNA-induced silencing complex) que cataliza el

desenrollamiento de la molécula de ARN dúplex, la unión e interacción específica con el ARNm endógeno y la rotura específica del mismo. El ARNm resultante es reconocido en la célula como aberrante y es destruido por otras ribonucleasas. Por tanto el silenciamiento por siRNA es una herramienta poderosa para eliminar específicamente la expresión de determinados genes y poder estudiar sus funciones celulares. Para el silenciamiento génico del gen de la cPLA2 \pm murina se utilizaron dos juegos de siRNA, 5'-CGAGACACUUCAAUAAUGAUU-3' y su complementario (#1) y 5'-AGCACAUCGUGAGUAAUGAUU-3' y su complementario (#2). Para la introducción de las moléculas de siRNA se utilizó el reactivo Lipofectamine™ RNAiMAX, un reactivo catiónico que forma liposomas permitiendo la entrada del ARN en el interior de la célula. Las células fueron transfectadas al 90% de confluencia. En el momento de la transfección se cambió el medio de cultivo por medio Opti-MEM® sin antibiótico. Se diluyó la Lipofectamine™ RNAiMAX en medio Opti-MEM® sin antibiótico y pasados 5 min se mezclaron con una dilución del siRNA en medio Opti-MEM® sin antibiótico para una concentración final de 40 nM. Pasados 20 min se añadió la mezcla gota a gota al pocillo y a las 6 h se eliminó y se añadió medio de cultivo. Como control del silenciamiento se utilizó una mezcla de siRNAs que no tienen genes diana en la célula, referidos como siRNA negativo o control. Se analizaron los niveles de expresión de la proteína diana mediante inmunoblot 48 h después de la transfección y durante el proceso de diferenciación.

3.10. Transfección transitoria con vectores plasmídicos – Para los experimentos de localización de la cPLA2 \pm se clonó dicha proteína en el vector pEGFP-C3 utilizando los sitios de corte para Hind-III y Pst-I. Esta construcción codifica la expresión de una proteína de fusión fluorescente que contiene en el extremo N-terminal la EGFP seguida de la secuencia de la cPLA2 \pm humana (EGFP- cPLA2 \pm) (266, 331). Para la introducción de los vectores plasmídicos en fibroblastos 3T3-L1 se utilizó el reactivo Lipofectamine™ LTX Reagent, un reactivo catiónico

que forma liposomas permitiendo la entrada del plásmido en el interior de la célula. Las células fueron transfectadas al 80% de confluencia. Se diluyó 1 µg de ADN en medio Opti-MEM, posteriormente se añadió el PLUS™ Reagent y pasados 10 min se mezclaron con Lipofectamine™ LTX. Pasados 20 min se añadió la mezcla gota a gota al pocillo. Para la introducción de los vectores plasmídicos en adipocitos 3T3-L1 se utilizó el sistema de electroporación Gene Pulse Xcell (Bio-Rad laboratories). Para ello se levantaron los adipocitos utilizando tripsina-EDTA, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 200 xg 5 min. Posteriormente se resuspendió el pellet en 100 µl de PBS, se añadieron 3 µg de plásmido y se pasó el contenido a una cubeta de electroporación. La electroporación se realizó utilizando el programa específico para 3T3-L1. Posteriormente se añadió medio de adipocitos a las células electroporadas y se sembraron. La expresión de la proteína se analizó 18-24 h después de la transfección utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5X con láser blanco. Para monitorizar la fluorescencia verde se usó la línea láser Supercontinuum visible de 485 nm.

3.11. Tinción con Oil Red O – El Oil Red O es un colorante histoquímico que tiñe lípidos neutros. Esta tinción, descrita por Ramírez-Zacarías (332) fue utilizada para evaluar la cantidad de lípidos neutros de las células diferenciadas a adipocitos, representativo del grado de diferenciación adipocítica. Las células en cultivo se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 10% durante al menos 1 h. Se eliminó el paraformaldehído y se lavó con isopropanol al 60%. Después se tiñeron con una solución de Oil Red O al 0,21% (p/v) en isopropanol al 60% durante 10 min. Se eliminó la tinción y se lavaron varias veces con H₂O destilada. Se analizaron los niveles de expresión de gotas lipídicas mediante un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon). Posteriormente se extrajo el colorante incorporado por las células mediante isopropanol al 100% y se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm en el espectrofotómetro VersaMax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices). El contenido lipídico relativo (en tanto por 1) se calculó

con la fórmula A510 células tratadas/A510 células control. El Oil Red O también fue utilizado para teñir las gotas lipídicas en los experimentos de microscopía confocal, puesto que también emite fluorescencia. Para monitorizar la fluorescencia, se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X con láser blanco, usándose la línea láser Supercontinuum visible de 588 nm.

3.12. Inmunocitoquímica – Adipocitos 3T3-L1 transfectados previamente con el plásmido EGFP-cPLA2± y sembrados en cristales, se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min. Las células se permeabilizaron con una solución 0,1 % de Triton X-100 durante 2 min. Se lavaron 2 veces con PBS y se utilizó una solución de BSA al 5% (p/v) en PBS durante 30 min, para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. A continuación se incubaron las células con el anticuerpo primario diluido en una solución de BSA al 1% (p/v) en PBS durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en una solución de BSA al 1% (p/v) en PBS durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS y se utilizó 1µg/ml de DAPI para marcar los núcleos. Se lavaron 3 veces con PBS y se montaron los cubres en los portas con Gelvatol.

Se utilizó el anticuerpo primario de ratón frente a p115 diluido 1:100 y el anticuerpo secundario diluido 1:200 frente a la IgG de ratón unido a Alexa Fluor 594.

Para analizar la fluorescencia por microscopía confocal se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X con láser blanco. Para monitorizar el DAPI se usó un láser de Diodo azul de 405 nm, para la fluorescencia verde se usó la línea láser Supercontinuum visible de 485 nm y para la fluorescencia roja la línea láser Supercontinuum visible de 588 nm.

3.13. Obtención de homogeneizados proteicos e inmunodetección de proteínas – Los homogeneizados celulares se obtuvieron de tejido adiposo y de cultivos celulares utilizando un tampón de lisis celular. En el caso de los tejidos, se homogeneizaron fragmentos de tejido de 90-100 mg en 500 µl de tampón de lisis celular con una varilla de homogeneización durante 1 min. Posteriormente se volvieron a homogeneizar con

una jeringa de 1 ml y aguja de 25 G. Ambas homogeneizaciones se realizaron a 4 °C. Se centrifugaron las muestras a 9.000 xg durante 5 min a 4 °C, para eliminar los restos de tejido, y se recogieron los sobrenadantes, que se conservaron a -20 °C para su uso posterior. En cuanto a los cultivos celulares, éstos se lavaron dos veces con PBS frío y se recogieron mediante raspado en tampón de lisis celular, para posteriormente incubarse en hielo durante 30 min. El lisado celular se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 16.000 xg y se recogieron los sobrenadantes, que se conservaron a -20 °C para su uso posterior. Las células se resuspendieron en un tampón de lisis de membrana plasmática, que al ser hipotónico permite que las células se hinchen y se rompan liberando los núcleos. Las células se incubaron a 4 °C durante 15 minutos, se añadió NP-40 al 0,05% (v/v) y se mezclaron vigorosamente durante 10 segundos para romper la membrana plasmática. Se centrifugaron a 800 xg durante 2 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante, el cual contiene la fracción citoplasmática. El pellet resultante, correspondiente a la fracción nuclear, se lavó dos veces con el tampón de lisis usado anteriormente. Posteriormente se resuspendió en el tampón de lisis nuclear (hipertónico), se mezcló vigorosamente durante 10 segundos y se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Por último se centrifugó a 16.000 xg durante 10 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante, el cual contiene la fracción nuclear. Ambos extractos se conservaron -20 °C para su uso posterior.

El método del BCA (ácido bicinonónico) (333) se basa en la capacidad del BCA para formar un complejo púrpura con iones Cu⁺, formados como resultado de la reacción de reducción que produce el enlace peptídico de las proteínas sobre el ión Cu²⁺ del sulfato cúprico (CuSO₄) en un medio alcalino (reacción de Biuret). La cantidad de ión Cu⁺ es proporcional a la cantidad de proteína. La concentración de proteína se determinó según este método utilizando un kit comercial, siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante, y una recta patrón de calibrado con concentraciones conocidas de BSA. La absorbancia fue monitorizada a una longitud de onda de 562 nm en

placas de 96 pocillos en el espectrofotómetro VersaMax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices).

Para realizar el análisis de los niveles de expresión de proteínas, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras, según el método descrito por Laemmli (334), según el cual las proteínas se separan principalmente en función de su tamaño. Las muestras se redujeron y desnaturizaron mediante dilución en el tampón de carga y posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. Las electroforesis se realizaron en cubetas MiniProtean™ (Bio-Rad laboratories) utilizando geles separadores de 8, 10, 12 y 15% de acrilamida-bis-acrilamida (según el peso molecular de las proteínas de interés) y tampón de electroforesis durante 90 min aplicando un voltaje constante de 120 V. En paralelo a las muestras, se corrieron estándares preteñidos de diferentes tamaños moleculares. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF en una célula de transferencia TransBlot® (Bio-Rad laboratories) en condiciones de humedad utilizando el tampón de transferencia CAPS durante 60-90 min (en función del grosor del gel y del tamaño de la proteína) y aplicando un amperaje constante de 300 mA.

Para disminuir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario se incubaron las membranas con una solución de bloqueo compuesta por 5% (p/v) de leche deslipidada o 5% de BSA (p/v) en PBS, según la solución en la que se hiciese la dilución del anticuerpo primario. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Seguidamente se realizaron dos lavados con PBS. Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una solución compuesta por 0,5% de leche (p/v), por 0,5% de BSA (p/v) o por 5% de leche (p/v) en PBS Tween-20 0,1% (v/v), según la recomendación del fabricante. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, según la recomendación del fabricante. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS Tween-20 0,1% (v/v) para eliminar el exceso de

anticuerpo primario no adherido. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en una solución compuesta por 0,5% de leche (p/v) o por 0,5% de BSA (p/v) en PBS Tween-20 al 0,1% (v/v), según la solución en la que se diluyó el anticuerpo primario. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizaron de nuevo tres lavados con PBS Tween-20 0,1% (p/v) para eliminar el anticuerpo secundario no adherido. Se utilizaron anticuerpos producidos en conejo frente a C/EBP \pm , PPAR α , cPLA2 \pm , P(Ser505)-cPLA2 \pm , Lipina-2, C/EBP β , COX-2 y P(Ser563)-HSL (diluidos 1:1.000) y Lipina-1 (diluido 1:2.500); anticuerpos producidos en ratón frente a Ciclina A y Cdk2 (diluidos 1:1.000), β -Actina (1:20.000) y proteína de la matriz nuclear p84 (diluido 3:10.000); y un anticuerpo producido en pollo frente a FABP4/aP2 (diluido 1:1.000). Se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa frente a las inmunoglobulinas de conejo, ratón y pollo, diluidos 1:20.000.

Las membranas se incubaron con el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, que permite la detección quimioluminiscente de los anticuerpos conjugados con peroxidasa, y la señal de quimioluminiscencia se monitorizó en el sistema de captura de imágenes de quimioluminiscencia digital VersaDoc 5000 (Bio-Rad Laboratories). La densitometría cuantitativa de las bandas se realizó utilizando 4 tiempos diferentes de exposición con el software Quantity One v4.5.2 (Bio-Rad Laboratories). El análisis de cuantificación se realizó refiriendo la densidad de la banda correspondiente a la proteína de interés con la densidad de la banda correspondiente a una proteína constitutiva de referencia, siendo ésta la β -actina para homogeneizados totales y extractos citoplasmáticos o la proteína de la matriz nuclear p84 para extractos nucleares. Los datos de las gráficas se representaron como la media \pm desviación estándar.

3.14. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo – Las células se recogieron mediante tripsinización y se lavaron con PBS. Posteriormente se fijaron con etanol al 70% durante 1 h a 4 °C. Una vez fijadas, se lavaron 2

veces más con PBS y se incubaron con 200 μ g/ml de ribonucleasa A y 50 μ g/ml de yoduro de propidio en PBS durante 1 h a 37 °C y en oscuridad. Finalmente, las células se analizaron en el citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coultec), adquiriéndose 10.000 células por condición.

3.15. Análisis de la proliferación celular – La medida de proliferación celular fue realizada mediante el ensayo de MTT, descrito por Mosmann (335) y modificado Denizot y Lang (336), basado en la capacidad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas para romper los anillos de tetrazolio del MTT (amarillo) y formar cristales de formazán (azul), que pueden solubilizarse y cuantificarse por absorbancia a 570 nm. Así, la cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas presentes en el cultivo. Las células en cultivo se lavaron con PBS y se incubaron con una solución 0,5 mg/ml de MTT en PBS durante 5 h a 37 °C y en oscuridad. Se eliminó la solución, se añadió isopropanol al 100% para disolver los cristales de formazán y se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en el espectrofotómetro VersaMax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices). La proliferación celular relativa (en tanto por 1) se calculó con la fórmula $A_{570} \text{ células tratadas} / A_{570} \text{ células control}$.

3.16. Ensayo de liberación de [3H]AA – Para cuantificar el AA liberado al medio extracelular se sembraron células 3T3-L1 en placas de cultivo y se dejaron que llegaran a confluencia (día -2). Al día siguiente (día -1) se incubaron en medio de fibroblastos suplementado con 0,25 μ Ci [3H]AA durante toda la noche a 37° C, tiempo óptimo para una eficiente incorporación del AA a los fosfolípidos de membrana. Tras el marcaje, las células se lavaron dos veces con una solución de 0,5 mg/ml de BSA deslipidada en PBS y se estimularon con el MD1 con o sin FBS suplementado con 0,5 mg/ml de BSA deslipidada durante los tiempos indicados. Posteriormente se recogieron las muestras, por una parte el sobrenadante tras la centrifugación a 16.000 xg durante 2 min y por otra la porción celular por tratamiento con Triton-X-

100 al 0,1%. Se pasaron 800 µl del sobrenadante y de la porción celular de cada muestra a tubos de contaje, se añadieron 3 ml de líquido de centelleo y se realizó la cuantificación de la radiactividad en un contador de centelleo líquido LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Coulter), expresándose los resultados como porcentaje de [3H]AA liberado respecto al total de [3H]AA (239).

3.17. Técnicas de detección de mRNA – La extracción del ARN total de las muestras de tejido adiposo así como de los cultivos celulares se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol®, cuyo método se basa en la diferente solubilidad de los ácidos nucleicos y proteínas entre dos fases no miscibles. El reactivo TRIzol® está compuesto por una mezcla de fenol, en el que los ácidos nucleicos son insolubles, e isotiocianato de guanidina, que actúa como agente desnaturante de proteínas e inhibidor de proteasas a pH 4,5. Así, la integridad del ARN se mantiene durante la extracción. Para la extracción del ARN, las muestras se resuspendieron en 1 ml de TRIzol® hasta conseguir una solución homogénea. Para eliminar el exceso de grasa de las muestras de tejido adiposo, se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 min a 4 °C. Se añadieron 200 µl de cloroformo y, tras agitar vigorosamente, se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 xg, durante 10 minutos a 4 °C, separándose la fase acuosa, que contiene el ARN y la fase orgánica, con las proteínas y el ADN. Posteriormente, se añadieron 0,5 ml de isopropanol, se mezclaron y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron de nuevo a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C para precipitar el ARN. El precipitado se lavó con etanol al 70% en agua estéril libre de nucleasas. Una vez lavado, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría en el Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), midiendo la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm, donde los ácidos nucleicos tienen mayor absorbancia.

La PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) es una reacción donde una hebra de ARN es transcrita en

ADN complementario (ADNc), usando una enzima llamada transcriptasa reversa. La síntesis de ADNc se llevó a cabo usando el RETROscript® Kit Reverse Transcription for RT-PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 2 µg de ARN y 100 U de la enzima transcriptasa reversa (M-MVL-RT) en presencia de 40 U de inhibidor de ribonucleasas (RNase Inhibitor), 0,5 mM de cada dNTPs y 5 µM de random decamers como cebadores. El volumen total de la reacción fue de 20 µl. Se desnaturizó el ARN durante 3 min a 85 °C, la transcripción se realizó durante 1 h a 43 °C y se inactivó la enzima durante 10 min a 92 °C.

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR), es un método muy sensible que permite simultáneamente amplificar y cuantificar el producto de la reacción de amplificación del ADN durante el transcurso de la PCR. La cuantificación se realizó determinando el ciclo umbral (Ct, cycle threshold), ciclo de la reacción de PCR en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador LightCycler® 480 (Roche) utilizando ADNc, obtenido por transcripción reversa, oligonucleótidos directos y reversos como cebadores y la mezcla comercial KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix Optimized for LightCycler® 480, que contiene SYBR Green I, Taq polimerasa, dNTPs y un tampón de reacción. La realización de una curva de disociación al final de cada PCR permitió detectar la presencia de productos amplificados de forma inespecífica. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y el análisis de cuantificación se realizó mediante el método ””Ct (337), comparando los valores de Ct de nuestro gen de interés con los valores de Ct de un gen constitutivo de referencia, en nuestro caso, Ciclofilina B. Los datos de las gráficas se representaron como la media ± desviación estándar. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada gen estudiado, se muestran a continuación.

3.18. Análisis de lípidos – Los lípidos del tejido adiposo se extrajeron siguiendo el protocolo descrito por Folch (338). Se considera que la masa de tejido adiposo equivale al correspondiente volumen en agua.

El tejido adiposo se homogenizó con una mezcla cloroformo/metanol 2:1 (v/v) a una dilución final de 20 veces el volumen del tejido y se añadieron los estándares internos correspondientes. El extracto se agitó con 0,25 veces su volumen de H₂O y se centrifugó a 8.537 xg durante 5 min a 4 °C para separar las dos fases. La fase orgánica inferior se recogió en otro tubo y la fase acuosa superior se agitó con 2 veces su volumen de cloroformo, se centrifugó a 8.534 xg durante 5 min a 4 °C y se recogió la fase orgánica inferior obtenida, que se juntó con la fase orgánica recogida anteriormente. La fase orgánica extraída se evaporó en una centrífuga con vacío y se disolvió en 20 µl de cloroformo/metanol 2:1 (v/v), para la posterior separación de los lípidos mediante cromatografía en capa fina (TLC, thin layer chromatography). El extracto lipídico disuelto en cloroformo/metanol 2:1 (v/v) se pinchó en una TLC, activada previamente mediante calor (24 h a 65 °C en estufa), junto con los estándares de las correspondientes clases de lípidos. La TLC se desarrolló en un sistema hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (v/v/v) para la separación de lípidos neutros. La porción de TLC donde se encontraban los estándares se cortó y se expuso a vapores de yodo, permitiendo su visualización. Los estándares de retención (R_f) se utilizaron para localizar en la TLC las diferentes clases de lípidos de la muestra. Las porciones de sílice correspondientes a cada clase de lípido se recogieron en tubos y los lípidos fueron extraídos de la sílice mediante 1 ml de cloroformo metanol 1:1 v/v, seguido de 1 ml de cloroformo metanol 2:1 v/v, centrifugando en cada caso la sílice a 13.400 xg durante 5 min con el fin de recoger la fase orgánica lipídica.

La composición en ácidos grasos de las distintas clases de lípidos se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (290, 339). La fase orgánica extraída de la TLC se evaporó en una centrífuga con vacío y se disolvió en 50 µl de cloroformo metanol 2:1 (v/v). Posteriormente se añadieron 500 µl de KOH 0,5 M en metanol durante 30 min a 37 °C en agitación, produciéndose la transmetilación de los ácidos grasos. La reacción se neutralizó añadiendo un volumen de HCl 0,5 M, y los

ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES, del inglés fatty acid methyl esters) se extrajeron dos veces con un volumen de hexano centrifugando a 13.400 xg durante 5 min para recoger la fase orgánica lipídica, que se guardó a -80 °C en atmósfera de N₂ hasta su análisis. El análisis de los ésteres metílicos obtenidos se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) dotado de un espectrómetro de masas como detector (Agilent 5975 MS) en modo de impacto electrónico (EI, 70 eV), equipado con un inyector automático (Agilent 7693 autosampler) y una columna capilar (Agilent DB-23) [(50%-cianopropil)-metilpolisiloxano] de 60 m x 250 µm D.I. x 0,15 µm (grosor de película). El programa de temperaturas utilizado, fue una modificación del descrito por Abu (340). Se utilizó He como gas portador, a una presión constante de 26,1 psi. En cada caso se inyectó 1 µl de muestra en modo splitless (sin división de la muestra). La adquisición de datos se realizó en modo scan para la identificación de compuestos, y en modo SIM (monitorización de iones seleccionados) para la cuantificación. La identificación de compuestos se realizó usando el tiempo de retención característico para cada FAME, así como la librería de espectros del NIST (Instituto nacional de estándares y tecnología, del inglés National institute of standards and technology). Para la cuantificación en modo SIM se usaron los siguientes fragmentos: 74 y 87 para FAMES saturados, 83 para monoinsaturados, 67 y 81 para diinsaturados, y 79 y 91 para poliinsaturados (341). La cuantificación se llevo a cabo mediante el uso de un estándar interno (lípidos análogos al lípido problema del cual se quiere conocer la composición de ácidos grasos, pero con ácidos grasos de número impar de átomos de carbono, que son despreciables en la naturaleza) y mediante una curva de calibración para FAMES. El software utilizado fue MSD Productivity Chemstation, G1701EA, revisión E.02.00 SP2 (G1701-64553) (290, 339).

3.19. Análisis estadístico – Los datos presentados en este trabajo son resultados representativos de tres experimentos independientes, algunos de ellos realizados por triplicado. Los datos de las gráficas se representaron como la media ± desviación estándar. En

algunos casos se realizó el análisis estadístico t de Student. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95 % ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Expresión de PLA₂s en preadipocitos y adipocitos.

4.2. Caracterización de la cPLA₂± durante el proceso de diferenciación adipocítica in vitro.

4.3. Análisis del papel de la cPLA₂± en la diferenciación adipocítica in vitro.

4.3.1. Estudio del papel de la cPLA₂± en la diferenciación adipocítica de los adipocitos 3T3-L1.

4.3.2. Estudio del papel de la cPLA₂± en la diferenciación adipocítica de fibroblastos NIH/3T3.

4.3.3. Estudio del papel de la cPLA₂± en la diferenciación adipocítica de fibroblastos embrionarios de ratón.

4.3.4. Estudio del papel de la cPLA₂± en la diferenciación adipocítica de las ASCs del tejido adiposo de ratón.

4.4. Análisis del papel del AA exógeno durante la fase de confluencia en la diferenciación adipocítica in vitro.

4.4.1. Estudio del papel del AA exógeno durante la fase de confluencia en la diferenciación adipocítica de los preadipocitos 3T3-L1.

4.4.1. Estudio del papel del AA exógeno durante la fase de confluencia en la diferenciación adipocítica de los fibroblastos NIH/3T3.

4.5. Análisis del papel de la cPLA₂± en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta HF.

4.5.1. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en el peso corporal y en el peso del hígado y tejido adiposo de ratones alimentados con dieta HF.

4.5.2. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en la composición de AG y en el contenido total de TAG, PL y CE en el tejido adiposo de ratones alimentados con dieta HF.

4.5.3. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en la diferenciación adipocítica del tejido adiposo de ratones alimentados con dieta HF.

4.5.4. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en la expresión de lipinas y COX-2 en el tejido adiposo de ratones alimentados con dieta HF.

4.5.5. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en la expresión de PLA₂s en el tejido adiposo de ratones alimentados con dieta HF.

4.5.6. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en la lipólisis del tejido adiposo de ratones alimentados con dieta HF.

4.5.7. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en el metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con dieta H.

4.5.8. Efecto de la ausencia de la cPLA₂± en la expresión de factores proinflamatorios y antiinflamatorios en el tejido adiposo de ratones alimentados con dieta HF

5. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios realizados sobre la biología de la cPLA₂± en las últimas dos décadas se han llevado a cabo en tejidos y células del sistema inmune. Gracias a ellos se sabe que la cPLA₂± controla, junto con las enzimas de reactivación de ácidos grasos, la disponibilidad de AA libre, y por ello, la generación de eicosanoides en estas células (356, 357). Puesto que los eicosanoides son importantes mediadores de las respuestas inflamatorias, la cPLA₂± ha sido reconocida durante largo tiempo como una enzima meramente “inflamatoria”. Por este motivo, apenas existen estudios que indaguen sobre un posible papel de la cPLA₂± en otros procesos diferentes de los inmunes, y

de hecho, se sabe poco sobre su posible papel en tejidos típicamente metabólicos como el tejido adiposo.

En la presente memoria de investigación se ha abordado el estudio de la cPLA2± en células del tejido adiposo. Los resultados obtenidos han permitido conocer cómo la cPLA2± participa en la regulación de los procesos que tienen lugar durante la diferenciación adipocítica *in vitro*, así como los posibles mecanismos en los que podría estar implicada la cPLA2± durante el desarrollo de la obesidad inducida por dieta HF. Así, se ha descubierto que una enzima con una función principalmente inflamatoria puede participar en procesos típicamente metabólicos como la formación de adipocitos y en los procesos metabólicos e inflamatorios que tienen lugar durante el desarrollo de la obesidad por un consumo elevado de grasa, poniendo de relieve la importante interconexión existente entre los procesos metabólicos e inmunes en el tejido adiposo.

5.1. Expresión de PLA2s en preadipocitos y adipocitos

En las últimas décadas se han descubierto numerosas PLA2 que participan en multitud de funciones fisiológicas (358). Las PLA2 hidrolizan la posición sn-2 de los PL generando un AG libre y un liso-PL, productos que pueden funcionar como ligandos de los receptores de membrana celular o intracelulares, como moléculas de señalización, ser sustratos para la síntesis de moléculas bioactivas o ser fuente de energía que puede almacenarse o liberarse según las necesidades del organismo. Los resultados de expresión génica obtenidos en este trabajo apuntan a que las enzimas de la familia de las PLA2 deben de tener importantes funciones en el adipocito, una célula donde predomina el almacenamiento de TAG, y donde los procesos metabólicos de producción e hidrólisis de estos lípidos deben estar altamente controlados.

Comenzando por el grupo de las PLA2s secretadas, el nivel de expresión de la PLA2GIIE en adipocitos es mayor que en la SVF del tejido adiposo, aunque estas diferencias son menores que las encontradas en

preadipocitos y adipocitos diferenciados *in vitro*. Existen evidencias que sugieren que la PLA2GIIE participaría en la progresión de los procesos inflamatorios (359), pero no existe información en la literatura sobre la función de esta enzima en la diferenciación adipocítica o en el tejido adiposo. Basándonos en la homología de secuencia existente entre la PLA2GIIE y la PLA2GIIA, en el hecho de que esta última participa en el desarrollo de la aterosclerosis hidrolizando los fosfolípidos de las lipoproteínas (junto con otras PLA2s secretadas como la PLA2GV y la PLA2GX) (194, 360-364) y en que los mecanismos patológicos de la obesidad presentan muchas similitudes con los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de la aterosclerosis (365), podríamos plantear un escenario donde la PLA2GIIE estuviese participando en la adipogénesis liberando ácidos grasos de las lipoproteínas del suero que serían posteriormente captados por los adipocitos.

En cuanto a las PLA2s independientes de Ca²⁺, la expresión de la PLA2GVIA y la PLA2GVIB aumenta durante la diferenciación adipocítica *in vitro*, como se ha descrito en la literatura (302), aunque los aumentos de expresión génica observados no son tan altos como los observados para otras PLA2s independientes de Ca²⁺ (ver más abajo). Ambas PLA2s parecen ser necesarias para que se produzca la diferenciación adipocítica *in vitro*, a juzgar por los experimentos de silenciamiento génico publicados anteriormente (302). A diferencia de lo que ocurre *in vitro* y aunque se ha descrito que la PLA2GVIB participa en los mecanismos que conducen a la obesidad inducida por dieta (304, 305), los niveles de expresión para estas PLA2s son similares en los adipocitos y en la SVF del tejido adiposo.

Otras PLA2s independientes de Ca²⁺ como la PLA2GVID y la PLA2GVIE están muy aumentadas tanto en los adipocitos diferenciados *in vitro* como en los adipocitos del tejido adiposo, resultados que corroboran estudios publicados anteriormente (118, 131, 186, 313). Resulta curioso que en el adipocito las PLA2GVID y PLA2GVIE aumenten paralelamente su expresión, ya que, si bien ambas presentan actividad

triglicérido lipasa, su regulación es antagonista. Mientras que la PLA2GVID induce su expresión por insulina y la reduce durante el ayuno (118, 306), la PLA2GVIE disminuye su expresión por insulina y la aumenta después del ayuno o por tratamiento con dexametasona (118, 131, 313). De ellas, la PLA2GVID es la que más se expresa en adipocitos tanto diferenciados *in vitro* como obtenidos del tejido adiposo. Puesto que estudios anteriores han demostrado que ni la sobreexpresión ni la disminución de la PLA2GVID afecta a la lipólisis ni a la acumulación de triglicéridos en adipocitos (186), es posible que ésta desempeñe otras funciones importantes relacionadas con sus otras actividades, transacilasa y PLA2 (116).

Con respecto a la PLA2GXV (PLA2s lisosomal), su nivel de expresión es mayor en adipocitos que en preadipocitos 3T3-L1 y en los adipocitos que en la SVF del tejido adiposo de ratones. No hay evidencias previas de estos hallazgos en la literatura. Los estudios realizados en ratones deficientes en esta enzima describen una acumulación de surfactante pulmonar (principalmente dipalmitoil glicerofosfolina), acompañado de una gran cantidad de macrófagos alveolares con aspecto de foam cell (macrófagos que acumulan lípidos intracelulares) (366). Puesto que la función más descrita para la PLA2GXV es la degradación lisosomal de lípidos, no es evidente el papel que esta enzima pueda desempeñar en el tejido adiposo. Los lisosomas se han considerado históricamente como orgánulos dedicados a la degradación de sustancias provenientes del exterior celular, pero hoy en día esta visión está cambiando y se considera que estos orgánulos mantienen la homeostasis celular haciendo funciones de reciclaje y reutilización de componentes intracelulares que permiten el ahorro de energía. Gracias a sus actividades hidrolíticas producen aminoácidos, azúcares y ácidos grasos que son transportados al citosol y reutilizados en las rutas anabólicas celulares (367). De hecho, los animales que carecen de proteínas importantes para la función lisosomal presentan extrema delgadez debido a una gran reducción del almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo (368). Estudios muy recientes han puesto de manifiesto la estrecha relación existente entre

las gotas lipídicas y los lisosomas gracias al descubrimiento de la lipofagia, un proceso de degradación lipídica que usa la maquinaria autofágica para hidrolizar los lípidos de las gotas lipídicas, utilizando en último término las lipasas lisosomales (369). Según esto, el adipocito necesitaría mantener un buen nivel de enzimas lisosomales tanto para reciclar lípidos celulares como para poder hidrolizar los triglicéridos presentes en las gotas lipídicas en las circunstancias adecuadas. Este mecanismo de hidrólisis lipídica sería complementario a la hidrólisis por lipasas citosólicas como la ATGL y la HSL, cuya acción da cuenta de un 90% de la actividad lipolítica celular (370). Esta idea explicaría, al menos en parte, la mayor expresión de la PLA2GXV observada en adipocitos diferenciados *in vitro* y en adipocitos del tejido adiposo.

La expresión de la fosfolipasa específica de tejido adiposo (AdPLA) o PLA2GXVI, como se ha descrito anteriormente en la literatura, aumenta durante la diferenciación adipocítica *in vitro* (182) y es mucho mayor en adipocitos que en la fracción SVF del tejido adiposo (79). Esta PLA2 es capaz de liberar ácidos grasos tanto de la posición sn-1 como sn-2, pudiendo ser en algunos casos su actividad PLA1 mayor que su actividad PLA2 (326). Aunque se ha descrito que presenta una elevada expresión en el TAB y se induce durante la diferenciación adipocítica (182), existe hoy en día controversia acerca del papel propuesto durante la obesidad como suministrador de AA para la síntesis de la PGE2 antilipolítica (79).

De todas las PLA2s analizadas, la única cuya expresión es mayor en preadipocitos y en la SVF del tejido adiposo que en adipocitos, es la cPLA2± (PLA2GIVA). Nuestros resultados corroboran que la expresión de la cPLA2± disminuye durante la diferenciación adipocítica de la línea 3T3-L1 (302) y demuestran también que se produce una disminución de la expresión de la cPLA2± tras la diferenciación adipocítica de la línea fibroblástica NIH/3T3, de los fibroblastos embrionarios de ratón primarios (datos no mostrados) y de las células madre del tejido adiposo (ASCs). Por tanto, la diferenciación adipocítica *in vitro*

supone una disminución de la expresión de la cPLA2± independientemente del tipo celular.

5.2. Caracterización de la cPLA2± durante el proceso de diferenciación adipocítica in vitro

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo demuestran una compleja regulación de la cPLA2± durante la diferenciación adipocítica in vitro. Durante las primeras horas de diferenciación de las células 3T3-L1 se produce un aumento transitorio de la liberación de AA, posiblemente como consecuencia del aumento en la fosforilación de la Ser505 de la cPLA2±, y por ello, del incremento de su actividad (185). El FBS es el principal componente del medio de diferenciación adipocítica responsable del incremento en la liberación de AA y de la fosforilación en la Ser505 de la cPLA2± durante las primeras horas de diferenciación. A partir del segundo día de diferenciación, se produce una disminución de la expresión génica y proteica de la cPLA2±. La disminución de la expresión del ARNm de la cPLA2± probablemente se deba a la dexametasona presente en el medio de diferenciación, puesto que se ha descrito en otros sistemas celulares que los glucocorticoides reprimen la transcripción de la cPLA2± (371-373). Cabe destacar que existen pocos sistemas fisiológicos en los que se produzcan cambios regulados de la expresión de la cPLA2±, siendo normalmente una proteína cuya expresión no varía y cuya actividad se regula por modificaciones postraduccionales. Esta característica hace que la diferenciación adipocítica sea un modelo único en relación a la expresión de cPLA2±.

Durante la diferenciación adipocítica, la cPLA2± no solamente se regula por represión transcripcional y fosforilación, sino que posiblemente la distinta localización subcelular que presenta en los preadipocitos y en los adipocitos 3T3-L1 tenga un papel importante en su actividad. En los preadipocitos, la cPLA2± se localiza tanto en el núcleo como en el citosol. Sin embargo en los adipocitos 3T3-L1 diferenciados in vitro, la cPLA2± está localizada principalmente en la región perinuclear, más

concretamente en el aparato de Golgi. En muchos tipos celulares expuestos a agonistas que movilizan Ca²⁺ se ha observado que la cPLA2± se transloca a la membrana perinuclear, al RE y al compartimento intermedio RE-Golgi aumentando la liberación de AA a partir de los fosfolípidos contenidos en las membranas de estos orgánulos (206, 208, 209, 235, 374). No obstante, existen circunstancias en las que la translocación de la cPLA2± a orgánulos o membranas intracelulares no conlleva un incremento de su actividad. Así por ejemplo, en células endoteliales se ha observado una redistribución de la cPLA2± desde el núcleo y el citosol al aparato de Golgi distal, que depende de la confluencia celular, ocurre en ausencia de cambios intracelulares de Ca²⁺ y no va acompañada de un aumento de la liberación de AA (375). Es posible que la relocalización de la cPLA2± al Golgi en los adipocitos 3T3-L1 esté inducida por la confluencia celular a la que se someten las células durante la diferenciación adipocítica in vitro. Se ha descrito que la disminución de actividad de la cPLA2± en el Golgi se debe a la unión de la enzima a la Anexina A1, que impediría la relocalización de la cPLA2±, mediada por incrementos de Ca²⁺ intracelular, al RE y al compartimento intermedio RE-Golgi donde es activa (273).

Por todo ello, nuestros resultados indican una disminución de la actividad de la cPLA2± a partir del segundo día de diferenciación adipocítica debido a la disminución de su expresión génica y proteica, así como a la hipotética disminución de la actividad de la cPLA2± asociada a su relocalización en el aparato de Golgi, que podría funcionar como un mecanismo complementario para disminuir la actividad de la enzima en los adipocitos. Sería interesante en un futuro desvelar si en estas células la cPLA2± también interacciona con la Anexina A1 u otras proteínas secuestrantes en el Golgi.

5.3. Análisis del papel de la cPLA2± en la diferenciación adipocítica in vitro

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la cPLA2± es necesaria para la diferenciación adipocítica in vitro no solamente de células determinadas a adipocitos como la línea preadipocítica 3T3-L1, sino también de células multipotentes con capacidad para diferenciarse a distintos linajes celulares como son la línea fibroblástica NIH/3T3, los MEFs primarios y también las ASCs responsables de la adipogénesis en el tejido adiposo (352). Además, atendiendo al nivel de diferenciación adipocítica y teniendo en cuenta que los MEFs carecen totalmente de cPLA2± pero que el silenciamiento génico de los preadipocitos 3T3-L1 es solamente parcial, podríamos decir que existe una relación entre la cantidad de enzima presente en las células y el nivel de diferenciación adipocítica conseguido al final del proceso.

El estudio que se ha desarrollado a lo largo de esta memoria respalda la idea de que la cPLA2± participa en el proceso de diferenciación adipocítica de los preadipocitos 3T3-L1, regulando la expresión de Ciclina A, Cdk2 y C/EBP² durante las primeras fases de la diferenciación.

Durante la diferenciación adipocítica, los preadipocitos que se encuentran en la fase G0 del ciclo celular por inhibición de su crecimiento, reciben las señales mitóticas y adipogénicas apropiadas y entran sincrónicamente en ciclo, llevando a cabo una o dos rondas de división celular (expansión mitótica clonal) antes de salir de nuevo y diferenciarse a adipocito (30). Los experimentos realizados en este trabajo demuestran que la cPLA2± es necesaria para que se produzca el aumento de los niveles de Ciclina A y Cdk2 y la posterior progresión de la fase S y entrada en G2/M. Por tanto, la cPLA2± participaría en la regulación de la salida de la fase G0 de los preadipocitos quiescentes y en la entrada en el ciclo celular necesaria para que tenga lugar la diferenciación adipocítica (345). Este tipo de comportamiento de la cPLA2± también se ha visto en otros tipos celulares,

como las células endoteliales, donde se ha demostrado que la activación de la cPLA2± participa en el aumento de los niveles de Cdk2/Ciclina A y regula la progresión de la fase S y entrada en el ciclo celular durante los procesos de proliferación celular que tienen lugar durante la angiogénesis por inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos (276). Sin embargo, nuestros estudios son los primeros en demostrar un papel para la enzima durante la diferenciación adipocítica in vitro, donde los procesos de entrada y progresión de ciclo celular son también importantes.

La transición entre la proliferación y la diferenciación que tiene lugar durante la diferenciación adipocítica es un proceso estrictamente regulado, donde tanto las proteínas reguladoras del ciclo celular como los factores de diferenciación interactúan, creando una cascada de eventos que conducen a la transformación de las células en adipocitos (160). Nuestros resultados demuestran que la cPLA2± contribuye levemente a la inducción de la expresión de C/EBP² que tiene lugar durante las primeras fases de la diferenciación. Además de aumentar su expresión, para que el factor de transcripción C/EBP² pueda adquirir su actividad es necesario que esté fosforilado en la Thr188, en la Thr179 y en la Ser184 (36). La fosforilación de la Thr188 esta mediada por ERK durante las primeras horas de diferenciación y posteriormente por la Cdk2/Ciclina A (37), mientras que la fosforilación en la Thr179 y en la Ser184 la realiza la GSK3². Teniendo en cuenta los resultados obtenidos que indican que la cPLA2± participaría regulando la expresión de Ciclina A y de Cdk2 durante la fase de expansión clonal, cabría pensar que la disminución de la expresión de C/EBP±, PPAR³ y SREBP-1c observada en las células deficientes en cPLA2± sería debida también a una disminución de la activación de C/EBP² por una deficiencia en la fosforilación de la Thr188. Es decir, la cPLA2± estaría regulando C/EBP² tanto a nivel transcripcional como postraduccional, controlando así la transcripción de los factores tardíos C/EBP±, PPAR³ y SREBP-1c que participan en la diferenciación adipocítica (41-43). Estos factores de transcripción regulan en último termino la expresión de proteínas que intervienen en la formación de gotas lipídicas y en

el metabolismo de los adipocitos, tales como el transportador de glucosa GLUT4, que permite su entrada en el adipocito para la lipogénesis de novo, la ADRP, que recubre las gotas lipídicas que engloban los lípidos neutros y la proteína de unión a ácidos grasos FABP4/aP2 que participa en el metabolismo lipídico transportando ácidos grasos dentro de la célula.

Por otro lado, la cPLA2± también regula la expresión de la Lipina-1, que es necesaria tanto para la expresión de los factores de transcripción adipogénica C/EBP± y PPAR³, como para la síntesis de TAG en los adipocitos maduros (114). Por tanto, la cPLA2± controlaría tanto la adipogénesis como la producción de lípidos por regular también la inducción de la Lipina-1 durante la diferenciación adipocítica.

5.4. Análisis del papel del AA exógeno durante la fase de confluencia en la diferenciación adipocítica in vitro

Nuestros resultados apoyan la idea de que un aumento en la disponibilidad celular de AA previa a la inducción de la diferenciación adipocítica provoca un aumento en la cantidad de adipocitos diferenciados, debido fundamentalmente a incrementos en la expresión de C/EBP², Ciclina A y Cdk2 durante las primeras fases de la diferenciación (figura 69).

El efecto observado sobre la expresión de C/EBP² por tratamiento con AA puede estar producido por aumentos de AMPc. Puesto que los preadipocitos expresan COX-2 y COX-1, gran parte del AA disponible sería metabolizado a eicosanoides. De ellos, la PGI2 se ha descrito que favorece la diferenciación adipocítica uniéndose al receptor IP de la membrana de los preadipocitos, activando la AC y aumentando la cantidad de AMPc. El aumento de AMPc produciría la activación de la PKA, que fosforila el factor de transcripción CREB, permitiendo su unión a los elementos de respuesta a AMPc (CRE) del promotor de C/EBP² y llevando a cabo su transcripción (72). No es descartable que en las circunstancias en las que se han realizado los experimentos de adición de AA en este trabajo, la PGE2 actuando de forma autocrina y

uniéndose a los receptores EP4 de los preadipocitos que están acoplados a proteínas Gs, podría también aumentar AMPc y provocar los mismos efectos proadipogénicos que la PGI2 (376).

El aumento en la expresión de Ciclina A observado en las células tratadas con AA también podría estar mediado por un aumento de AMPc, pues se ha descrito que la expresión de Ciclina A en fibroblastos está mediada por CREB (377). Además, se ha descrito que durante los procesos proliferativos de las células 3T6, el bloqueo de la interacción de la PGE2 con el receptor EP4 reduce los niveles de Ciclina A induciendo una interrupción en la fase S y por tanto, bloqueando la progresión del ciclo (378).

Por otro lado, el tratamiento de las células con AA también aumenta la expresión de la Lipina-1, que es necesaria para inducción de los factores de transcripción adipogénica C/EBP± y PPAR³ y para el desarrollo de las funciones de los adipocitos maduros, incluyendo la lipogénesis y la acumulación lipídica (114). Las dos isoformas de la Lipina-1 ejercen papeles complementarios durante la diferenciación adipocítica, siendo la Lipina-1± principal responsable de la expresión de los factores adipogénicos y la Lipina-1² responsable de la expresión de genes implicados en síntesis lipídica (106). La inducción de la Lipina-1 durante la diferenciación adipocítica depende de la presencia de glucocorticoides en el medio de diferenciación (379). Además, se ha descrito que en el hígado el aumento de la expresión de la Lipina-1 inducida por los glucocorticoides se ve aumentada por el glucagón y el AMPc pero disminuye por la insulina (380, 381). Teniendo esto en cuenta, el aumento de la expresión de la Lipina-1 podría deberse a los eicosanoides derivados del AA, que por acción sobre sus receptores aumentan los niveles intracelulares de AMPc y actuarían de forma sinérgica con la dexametasona del medio de diferenciación.

Por último, la expresión proteica de COX-2 también se induce por AA en nuestros ensayos. Puesto que se ha identificado un elemento de respuesta a AMPc (CRE) en el promotor de COX-2 (382) y por tanto su

expresión estaría regulada a través de la señalización dependiente de AMPc, se podría pensar en un mecanismo de inducción semejante al expuesto anteriormente para C/EBP² y Ciclina A.

Mediante el uso de inhibidores como la indometacina, hemos observado que el efecto del AA en el aumento de la diferenciación adipocítica está mediado solamente en parte por su metabolización a eicosanoides dependiente de la actividad COX. El hecho de que el efecto inhibitorio de la indometacina sea parcial podría deberse a dos posibles razones. La primera, que el AA por sí mismo tenga un posible efecto sobre la diferenciación, algo no descrito hasta ahora en la literatura, ni explorado en este estudio. La segunda, que otros eicosanoides derivados de AA por acción de las lipoxigenasas (LX, HX y LT), por acción de enzimas de la familia del citocromo P450 (ETT) o por ambas enzimas (HETE) pudieran aumentar también la adipogénesis. En este sentido, se ha descrito que la actividad LOX es necesaria durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 (80), y que la eLOX3, la principal lipoxigenasa expresada en los preadipocitos 3T3-L1, participa en las etapas tempranas de la diferenciación produciendo HX que podrían funcionar como activadores de PPAR³ (81).

Además, cabe destacar que la diferenciación de las ASCs del tejido adiposo se realiza en presencia del inhibidor de COX indometacina. Este hecho pone de manifiesto que estos derivados del AA por acción de COX deben tener un papel principalmente inhibitorio en la adipogénesis de estas células. Nuestros resultados demuestran que las ASCs con una expresión reducida de la cPLA2[±] reducen su capacidad de diferenciación adipocítica, lo que apoya la idea de que otros eicosanoides diferentes de los producidos por la acción de COX serían los responsables de la acción proadipocítica de la cPLA2[±].

En la literatura se pueden encontrar múltiples trabajos que describen que el AA añadido en el momento de la inducción de la diferenciación y los metabolitos generados por la actividad COX inhiben la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 (383,

384). Los resultados presentados en este trabajo se realizaron añadiendo el AA en el momento en el que las células en cultivo alcanzan la confluencia, dos días antes de inducir la diferenciación, para poder compararlos con los obtenidos de las células tratadas con el siRNA frente a la cPLA2[±], que se realizaron transfecando las células en el momento previo a su llegada a confluencia. En paralelo a estos estudios, también se realizaron experimentos añadiendo el AA en el momento de la inducción de la diferenciación, observándose una importante reducción de la adipogénesis, como se ha descrito en la literatura (383, 384). Todos estos resultados parecen indicar que el momento en el que se produce/añade el AA durante la diferenciación adipocítica es muy importante, produciendo efectos opuestos en el proceso. Se ha descrito que estos efectos opuestos del AA en la diferenciación adipocítica dependen de los niveles intracelulares de AMPc (385), de tal forma que el AA en presencia de niveles elevados de AMPc disminuye la adipogénesis, mientras que en presencia de niveles reducidos de AMPc la aumenta (384). Nuestros experimentos estarían en concordancia con esta idea, pues durante el periodo de confluencia previo a la diferenciación los niveles de AMPc son menores que cuando se induce la diferenciación, pues el MD1 contiene IBMX, un agente que aumenta los niveles de AMPc.

Aunque nuestros resultados demuestran que el AA añadido de forma exógena mimetiza la acción de la cPLA2[±] en la diferenciación adipocítica, no podemos descartar el posible papel que el otro producto de su actividad enzimática, el liso-PL, puede ejercer en este proceso. El liso-PL es precursor de otros mediadores lipídicos como el LPA (91-93), que tiene un efecto potenciador de la adipogénesis, actuando tanto como ligando extracelular para los receptores EDG (94, 95), como ligando intracelular nuclear para el regulador transcripcional adipocítico PPAR³ (96).

5.5. Análisis del papel de la cPLA2± en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta HF

Los experimentos realizados en este trabajo apoyan la idea descrita previamente por otros autores (291, 292), de que los ratones cPLA2±/- sometidos a una dieta HF presentan una reducción del peso corporal y de la acumulación de grasa en el tejido adiposo y en el hígado con respecto a los ratones cPLA2±+/+. El análisis lipídico por CG/MS del tejido adiposo de estos animales demuestra que la reducción del peso del tejido adiposo se debe fundamentalmente a una menor cantidad tanto de triglicéridos como de ésteres de colesterol (figura 70). El trabajo presentado en esta memoria ha desvelado importantes evidencias que podrían explicar estas observaciones (figura 70).

La ausencia de cPLA2± en los ratones alimentados con dieta HF provoca una disminución de la diferenciación adipocítica en el tejido adiposo, manifestada por una reducción significativa de la expresión de los marcadores de diferenciación C/EBP² y SREBP-1c, y por un aumento de la expresión del marcador de preadipocitos PREF-1.

El gen Pref1 se expresa en preadipocitos inmaduros pero disminuye su expresión durante la diferenciación adipocítica (32). PREF-1 es una proteína transmembrana que, por escisión enzimática, produce una forma soluble activa que reprime la diferenciación adipocítica (34). Se ha descrito que ratones Pref1/- muestran un aumento de la adiposidad cuando son alimentados con dieta HF (386) y que ratones que sobreexpresan la forma soluble de PREF-1 muestran una marcada reducción de la masa del TAB como resultado de la alteración de la diferenciación adipocítica (387).

El C/EBP² es un regulador clave del metabolismo, que participa tanto en la diferenciación de los adipocitos (35) como en la activación de macrófagos (388). Se ha descrito que C/EBP² controla directamente muchos de los cambios metabólicos y de regulación génica asociados con dietas HF, así como la inflamación inducida por ácidos grasos tanto en macrófagos como en adipocitos (389). Además, los ratones deficientes en

C/EBP² sometidos a dieta HF presentan bajos niveles de MCP-1 y TNF-± en el tejido adiposo, datos que concuerdan con los de los ratones sin cPLA2±. Resulta curioso que en animales carentes de cPLA2±, la reducción de C/EBP² en tejido adiposo no resulte en una reducción de C/EBP± y PPAR³, puesto que el primero regula la transcripción de los segundos (41, 42). Apoyando nuestros resultados, se ha descrito que el nivel de expresión de C/EBP± y PPAR³ es el mismo en el TAB de ratones Cebp±/- que en los ratones Cebp±/+ (58). Además, el tejido adiposo de estos ratones tampoco presenta diferencias en cuanto a la expresión de FABP4/aP2 con respecto a los ratones control, al igual que ocurre en los ratones sin cPLA2± alimentados con dieta HF (58). Sin embargo, sí hemos encontrado una reducida expresión de SREBP-1c, cuya transcripción también está regulada por C/EBP² (43). Este tipo de comportamiento podría depender de cambios epigenéticos que pudieran estar alterados en las células sin cPLA2± y que podrían estar regulando de forma diferencial la transcripción de uno u otro gen. En este sentido, se sabe que la metilación del ADN y la acetilación de histonas influyen en el proceso adipogénico (390) y que derivados del AA promueven cambios epigenéticos importantes en promotores de unión a C/EBP² aumentando la expresión de estos genes (391). Otro posible mecanismo por el cual se podría explicar la expresión diferencial de PPAR³ y SREBP-1c en el tejido adiposo de los animales carentes de cPLA2± podría ser por una diferente activación de LXR en estos ratones, ya que se ha descrito que la activación de LXR incrementa la expresión de SREBP-1c y genes relacionados con lipogénesis, pero no altera la inducción de PPAR³. Se ha propuesto recientemente, aunque no probado de forma inequívoca, que la actividad de LXR puede ser regulada por la expresión de PLA2s como la PLA2GX (204). En su estudio, los autores observan que la sobreexpresión de PLA2GX en líneas celulares preadipocíticas inhibe la programación adipocítica promovida por agonistas de LXR, mientras que ratones carentes de esta enzima presentan un incremento en su peso y en el tamaño de sus adipocitos (204). En base a esto, los autores sugieren que la PLA2GX participa en

la diferenciación adipocítica generando productos que posiblemente inhiben la activación de LXR. El mecanismo por el que esto ocurre no se ha descrito. Apoyando esta idea, los ratones carentes de cPLA2 \pm tienen aumentada la expresión de la PLA2GX en el tejido adiposo.

Además de la reducción en la diferenciación adipocítica, un mecanismo alternativo aunque no excluyente por el que los ratones sin cPLA2 \pm sometidos a dietas HF tienen reducido el contenido en lípidos y el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo (292, 292, 292), sería por aumento de la lipólisis. En este sentido, el tejido adiposo de los ratones deficientes en cPLA2 \pm tiene aumentada la expresión de la PLA2GVIE (ATGL), primera enzima que participa en la degradación de los TAG. Se ha descrito que los ratones que sobreexpresan la PLA2GVIE de forma específica en el tejido adiposo presentan un aumento de la lipólisis y una atenuación de la obesidad inducida por dieta (316). Por otro lado, la siguiente enzima en la lipólisis, la HSL, que aumenta su actividad al ser fosforilada por la PKA en respuesta a aumentos de AMPc, presenta un nivel de fosforilación mayor en los animales deficientes en cPLA2 \pm . La HSL además de hidrolizar TAG, puede actuar sobre los ésteres de colesterol y el retinol, por lo que el aumento de su actividad podría ser también la responsable de la disminución de los ésteres de colesterol en el tejido adiposo de los ratones carentes de cPLA2 \pm . Si bien estos hallazgos nos inducen a pensar en un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo cuando falta la cPLA2 \pm , sería preciso realizar en un futuro experimentos más concluyentes que nos permitieran realizar esta afirmación sin equívocos.

Puesto que el AA libre generado por la cPLA2 \pm en el tejido adiposo de los ratones podría convertirse en múltiples eicosanoides con diferentes funciones sobre la adipogénesis y la acumulación lipídica en el tejido, la reducción del contenido de TAG y CE en el tejido adiposo de los ratones deficientes en cPLA2 \pm podría deberse a una disminución en la producción de PGE2. Esta afirmación obedece a dos razones: la primera, que se ha descrito que los animales sin cPLA2 \pm presentan

niveles reducidos de PGE2 en suero (292) y la segunda, que se ha sugerido que la PGE2 tiene una acción antilipolítica a través del receptor EP3, principal receptor expresado en tejido adiposo, produciendo una disminución de los niveles de AMPc por estar unido a proteínas Gi (5, 78, 79). Además, esta idea es consistente con las recientes observaciones de que la administración de un inhibidor de COX-2 a ratas alimentadas con dieta HF previene la acumulación de grasa en el hígado y en el tejido adiposo (392). Sin embargo, no podemos descartar que la bajada de otros eicosanoides distintos de la PGE2 o incluso del propio AA pudieran ser en parte responsables de los efectos en los ratones.

Se ha descrito que la sobreexpresión de IL-6 en ratones produce hipoglucemia y pérdida de peso, que los ratones deficientes en IL-6 desarrollan una obesidad prematura (393, 394) y que la administración de IL-6 puede aumentar la lipólisis sistémica en humanos sanos (99, 100). Teniendo esto en cuenta, podría ser que el aumento observado en la expresión de IL-6 en el tejido adiposo de ratones sin cPLA2 \pm alimentados con dieta HF también estuviese favoreciendo la lipólisis en estos ratones.

En los últimos años, ha quedado demostrado que el aumento del tejido adiposo asociado a la obesidad puede causar inflamación de bajo grado, como consecuencia de un aumento del grado de infiltración de monocitos en el tejido y por un cambio en la polarización de los macrófagos que pasarían de ser de tipo M2 (antiinflamatorio) a tipo M1 (proinflamatorio) (144-146). Nuestros resultados apoyan la idea de que la ausencia de cPLA2 \pm en ratones alimentados con dieta HF provocaría una alteración en el cambio de polarización de los macrófagos del tejido adiposo, pues se produce un aumento de algunos factores M2 (FIZZ1 y YM1) y una disminución de algunos factores M1 (MCP-1, TNF- \pm e iNOS). Los macrófagos M1 en el tejido adiposo inducen la expresión de proteínas como MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1, que participan en la extravasación de monocitos y otras células inmunes desde el torrente sanguíneo hasta al tejido. Nuestros resultados demuestran una reducción de la expresión de

MCP-1 en el tejido adiposo de ratones sin cPLA2± alimentados con dieta HF, que provocaría una reducción de la infiltración de monocitos en el tejido adiposo. Otros estudios realizados en ratones sometidos a dieta HF durante 3 días han propuesto que la cPLA2± interviene en la elevada expresión de ICAM-1 y MIP-2 (395), responsables de la infiltración transitoria de neutrófilos observada en el tejido adiposo en estas circunstancias (396). En el mismo trabajo también se ha demostrado que los neutrófilos presentes en el tejido adiposo son los responsables de los aumentos de secreción de TNF-± que contribuyen al desarrollo temprano de resistencia hepática a la insulina (395).

La obesidad conduce a alteraciones globales en el almacenamiento y utilización de la energía del organismo, correlacionadas con la resistencia a insulina y diabetes tipo II (135). Los resultados obtenidos de las pruebas de tolerancia a glucosa e insulina demuestran que la deficiencia en la cPLA2± previene la deficiencia metabólica de la glucosa y la resistencia a la insulina asociada a dieta HF.

La resistencia a la insulina en animales obesos está relacionada en parte con una mayor inflamación del tejido adiposo, como consecuencia de la mayor producción de TNF-±. TNF-± estimula la fosforilación en la serina de IRS-1, inhibiendo la vía de señalización de insulina (152, 153). La disminución observada en la expresión de TNF-± en los ratones deficientes en cPLA2± podría ser responsable, al menos en parte, de la mayor sensibilidad global a la insulina. Además, la menor expresión de MCP-1 en los ratones deficientes en cPLA2± provocaría una reducción de la infiltración de macrófagos M1 en el tejido adiposo, responsable de la disminución de la expresión de TNF-± en el tejido adiposo.

Aunque existen estudios que relacionan a la IL-6 con el deterioro de la acción de la insulina, basándose en que los niveles de IL-6 circulante y en el tejido adiposo están aumentados en pacientes con obesidad y diabetes tipo II (397-399), existen muchos otros estudios que sugieren que IL-6 no causa resistencia a insulina, e incluso podría tener efectos beneficiosos sobre la

enfermedad en algunos casos, pues aumenta la captación de glucosa y la oxidación de grasas (400, 401). Teniendo esto en cuenta, podría ser que el aumento observado en la expresión de IL-6 en el tejido adiposo de ratones sin cPLA2± alimentados con dieta HF también participase en el aumento de la sensibilidad a insulina en estos ratones.

Nuestros hallazgos son consistentes con observaciones recientes en modelos de animales carentes de actividades enzimáticas que intervienen en la producción de eicosanoides. Por ejemplo, la deficiencia de COX-2 atenúa la diferenciación del tejido adiposo y la inflamación en ratones (402); la deficiencia de la 12/15-Lipoxigenasa protege frente a la resistencia a la insulina inducida por dieta HF mediante la supresión de la infiltración de macrófagos proinflamatorios y de la elevación de citoquinas inflamatorias en el tejido adiposo (403); y la inhibición de la proteína activadora de la 5-Lipoxigenasa inhibe la infiltración de macrófagos, la producción de TNF-± e IL-6, reduce los niveles de ácidos grasos circulantes y la actividad de la HSL (404).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, se podría pensar en la cPLA2± como posible diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad y el desarrollo de las patologías asociadas.

6. CONCLUSIONES

6.1. Los adipocitos diferenciados in vitro tienen aumentada significativamente la expresión génica de la PLA2 secretada PLA2GIIIE; las PLA2s independientes de Ca²⁺ PLA2GVIA, PLA2GVIB, PLA2GVID y PLA2GVIE; la PLA2 lisosomal PLA2GXV y la PLA2 específica de tejido adiposo PLA2GXVI. La excepción es la PLA2 citosólica PLA2GIVA (cPLA2±), cuya expresión es mayor en los preadipocitos. Del mismo modo, en el tejido adiposo gonadal, la expresión génica de la cPLA2± es mayor en las células que componen la SVF, mientras que la PLA2GIIIE, PLA2GVIA, PLA2GVIB, PLA2GVID, PLA2GVIE, PLA2GXV y

PLA2GXVI se expresan principalmente en adipocitos maduros.

6.2. Durante las primeras horas de la diferenciación adipocítica *in vitro* se produce un aumento transitorio de la liberación de AA y de la fosforilación de la Ser505 de la cPLA2 \pm mediada por el FBS presente en el medio de diferenciación, mientras que a partir del segundo día de diferenciación se produce una marcada disminución de la expresión génica y proteica de la cPLA2 \pm . En los preadipocitos, la cPLA2 \pm se localiza tanto en el citosol como en el núcleo, mientras que en los adipocitos diferenciados *in vitro* la cPLA2 \pm se encuentra en el aparato de Golgi, donde colocaliza con p115, una proteína marcadora de este orgánulo.

6.3. La cPLA2 \pm es necesaria para la diferenciación adipocítica *in vitro* de la línea preadipocítica 3T3-L1 y regula la expresión del factor de transcripción C/EBP 2 y de las proteínas Cdk2/Ciclina A que participan en su fosforilación y activación durante la fase de expansión clonal. Por ello, la cPLA2 \pm regula en último término la expresión de la cascada transcripcional (C/EBP \pm , PPAR 3 y SREBP-1c) que desemboca en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del adipocito (FABP4/aP2, GLUT-4 y ADRP) y en la acumulación de lípidos neutros. También interviene en el aumento de la expresión de Lipina-1, COX-2 y otras proteínas de la familia de las PLA2s (PLA2GIIE, PLA2GVIA, PLA2GVIB, PLA2GVID, PLA2GVIE y PLA2GXVI), así como en la disminución de la Lipina-2.

6.4. La cPLA2 \pm es necesaria para la diferenciación adipocítica *in vitro* de células multipotentes como la línea fibrobástica NIH/3T3, los MEFs primarios y las ASCs responsables de la adipogénesis en el tejido adiposo y regula la expresión de la cascada transcripcional (C/EBP \pm y PPAR 3) que desemboca en la expresión del gen específico de adipocitos FABP4/aP2 y en la acumulación de lípidos neutros.

6.5. El AA, uno de los productos de la acción de la cPLA2 \pm sobre los fosfolípidos de membrana, mimetiza la acción de la enzima cuando es añadido de forma exógena a las células durante la fase de confluencia previa a la diferenciación *in vitro*. Todos los efectos

señalados en los puntos anteriores para la cPLA2 \pm en los preadipocitos 3T3-L1 y los fibroblastos NIH/3T3 son emulados por el AA en las condiciones mencionadas. Además, parte de la acción del AA en la diferenciación adipocítica *in vitro* esta mediada por sus productos derivados de la acción de COX.

6.6. La ausencia de cPLA2 \pm previene tanto el aumento del peso corporal como el aumento de peso del hígado y del tejido adiposo de ratones asociado a dieta HF.

6.7. La ausencia de cPLA2 \pm previene el aumento del contenido total de TAG y CE en el tejido adiposo de ratones asociado a dieta HF, disminuyendo también el contenido de ácido miristoleico, palmitoleico, oleico y linoleico en TAG y el contenido de ácido palmítico, linoleico, AA y docosanoico en CE. Además, la ausencia de cPLA2 \pm aumenta el contenido total de PL en el tejido adiposo y aumenta su contenido en ácido esteárico y oleico.

6.8. La ausencia de cPLA2 \pm parece prevenir la diferenciación adipocítica en el tejido adiposo de ratones asociada a dieta HF, aumentando la expresión génica del marcador de preadipocitos PREF-1 y disminuyendo la del marcador de adipocitos ADRP y la de los factores de transcripción C/EBP 2 y SREBP-1c que participan en el proceso.

6.9. La ausencia de cPLA2 \pm no modifica la expresión génica y proteica de Lipina-1, Lipina-2 y COX-2, ni la expresión génica de Lipina-3 en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta HF.

6.10. La ausencia de cPLA2 \pm modifica la expresión génica de otras proteínas de la familia de la PLA2, disminuyendo la PLA2GIIE y aumentando la PLA2GIIA, la PLA2GVIE, la PLA2GX y la PLA2GXVI en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta HF.

6.11. La ausencia de cPLA2 \pm produce un aumento de la fosforilación de la lipasa sensible a hormonas HSL en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta HF, que junto con la disminución del contenido de TAG y el aumento de la expresión de la

ATGL/PLA2GVIE parece indicar un posible aumento de la lipólisis en este tejido.

6.12. La ausencia de cPLA2± previene la deficiencia metabólica de la glucosa y la resistencia a la insulina en ratones asociada a dieta HF.

6.13. La ausencia de cPLA2± altera el estado inflamatorio del tejido adiposo de ratones asociado a

dieta HF, disminuyendo la expresión génica de TNF-±, MCP-1 e iNOS y aumentando la expresión génica de IL-6, FIZZ1 e YM1.

Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) asociada al proyecto de investigación SAF2007-60055, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España.

REFERENCES

1. Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A., and Coppack, S.W. (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 27, 875-888
2. Wajchenberg, B.L. (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr.Rev.* 21, 697-738
3. Shi, H., and Clegg, D.J. (2009) Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol.Behav.* 97, 199-204
4. Hamdy, O., Porrmatikul, S., and Al-Ozairi, E. (2006) Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr.Diabetes Rev.* 2, 367-373
5. Kim, S., and Moustaid-Moussa, N. (2000) Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J.Nutr.* 130, 3110S-3115S
6. Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., and Czech, M.P. (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9, 367-377
7. Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7, 885-896
8. Mohamed-Ali, V., Pinkney, J.H., and Coppack, S.W. (1998) Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 22, 1145-1158
9. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372, 425-432
10. Lau, D.C., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P.E., and Verma, S. (2005) Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 288, H2031-41
11. G. Fruhbeck, J.G. (2013) Adipose Tissue: Structure, Function and Metabolism . *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition). 1-13
12. Maury, E., and Brichard, S.M. (2010) Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol.Cell.Endocrinol.* 314, 1-16
13. Poissonnet, C.M., Burdi, A.R., and Bookstein, F.L. (1983) Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum.Dev.* 8, 1-11

14. Poissonnet, C.M., LaVelle, M., and Burdi, A.R. (1988) Growth and development of adipose tissue. *J.Pediatr.* 113, 1-9
15. Moreno, M.J., and Martinez, J.A. (2002) Adipose tissue: a storage and secretory organ. *An Sist.Sanit.Navar.* 25 Suppl 1, 29-39
16. Shepherd, P.R., Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F., and Kahn, B.B. (1993) Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 268, 22243-22246
17. MacDougald, O.A., and Mandrup, S. (2002) Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol.Metab.* 13, 5-11
18. Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., and Friedman, J.M. (2008) Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 135, 240-249
19. Otto, T.C., and Lane, M.D. (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* 40, 229-242
20. Spalding, K.L., Arner, E., Westermarck, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Ryden, M., Frisen, J., and Arner, P. (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 453, 783-787
21. Bjorntorp, P., Karlsson, M., and Pettersson, P. (1982) Expansion of adipose tissue storage capacity at different ages in rats. *Metabolism.* 31, 366-373
22. Gregoire, F.M., Johnson, P.R., and Greenwood, M.R. (1995) Comparison of the adipoconversion of preadipocytes derived from lean and obese Zucker rats in serum-free cultures. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 19, 664-670
23. Bunnell, B.A., Flaate, M., Gagliardi, C., Patel, B., and Ripoll, C. (2008) Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 45, 115-120
24. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-228
25. Ailhaud, G., and Hauner, H. (1998) Development of White adipose tissue. Bray GA and Bouchard C (eds.) *Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology.* New York: Marcel Dekker Inc. 359-378
26. Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol.Rev.* 78, 783-809
27. MacDougald, O.A., and Lane, M.D. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu.Rev.Biochem.* 64, 345-373
28. Richon, V.M., Lyle, R.E., and McGehee, R.E., Jr (1997) Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J.Biol.Chem.* 272, 10117-10124
29. Reichert, M., and Eick, D. (1999) Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene.* 18, 459-466
30. Cowherd, R.M., Lyle, R.E., and McGehee, R.E., Jr (1999) Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin.Cell Dev.Biol.* 10, 3-10
31. Iankova, I., Petersen, R.K., Annicotte, J.S., Chavey, C., Hansen, J.B., Kratchmarova, I., Sarruf, D., Benkirane, M., Kristiansen, K., and Fajas, L. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Mol.Endocrinol.* 20, 1494-1505
32. Smas, C.M., and Sul, H.S. (1996) Characterization of Pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 20 Suppl 3, S65-72

33. Smas, C.M., and Sul, H.S. (1993) Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. 73, 725-734
34. Sul, H.S. (2009) Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol.Endocrinol.* 23, 1717-1725
35. Yeh, W.C., Cao, Z., Classon, M., and McKnight, S.L. (1995) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 9, 168-181
36. Tang, Q.Q., Gronborg, M., Huang, H., Kim, J.W., Otto, T.C., Pandey, A., and Lane, M.D. (2005) Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102, 9766-9771
37. Li, X., Kim, J.W., Gronborg, M., Urlaub, H., Lane, M.D., and Tang, Q.Q. (2007) Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBPbeta during adipocyte differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104, 11597-11602
38. Kim, J.W., Tang, Q.Q., Li, X., and Lane, M.D. (2007) Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104, 1800-1804
39. Vinson, C.R., Sigler, P.B., and McKnight, S.L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. 246, 911-916
40. Cao, Z., Umek, R.M., and McKnight, S.L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5, 1538-1552
41. Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2000) Molecular regulation of adipogenesis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 16, 145-171
42. Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293-1307
43. Payne, V.A., Au, W.S., Lowe, C.E., Rahman, S.M., Friedman, J.E., O'Rahilly, S., and Rochford, J.J. (2009) C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. *Biochem.J.* 425, 215-223
44. Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002) C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16, 22-26
45. Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu.Rev.Biochem.* 77, 289-312
46. Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Foufelle, F. (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86, 839-848
47. Schoonjans, K., Staels, B., and Auwerx, J. (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim.Biophys.Acta.* 1302, 93-109
48. Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1995) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 5, 571-576
49. Im, S.S., Kwon, S.K., Kang, S.Y., Kim, T.H., Kim, H.I., Hur, M.W., Kim, K.S., and Ahn, Y.H. (2006) Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. *Biochem.J.* 399, 131-139
50. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224-1234

51. Wolins, N.E., Brasaemle, D.L., and Bickel, P.E. (2006) A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484-5491
52. Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol.Cell.* 3, 151-158
53. Christy, R.J., Kaestner, K.H., Geiman, D.E., and Lane, M.D. (1991) CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 2593-2597
54. Timchenko, N., Wilson, D.R., Taylor, L.R., Abdelsayed, S., Wilde, M., Sawadogo, M., and Darlington, G.J. (1995) Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Mol.Cell.Biol.* 15, 1192-1202
55. Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.C., Briggs, M., Spiegelman, B.M., and Auwerx, J. (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol.Cell.Biol.* 19, 5495-5503
56. Kim, J.B., and Spiegelman, B.M. (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10, 1096-1107
57. Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998) ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 4333-4337
58. Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432-7443
59. Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79, 1147-1156
60. Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol.Cell.* 4, 585-595
61. Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol.Cell.* 4, 611-617
62. Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., and Kadowaki, T. (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol.Cell.* 4, 597-609
63. Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., and Kasuga, M. (2002) Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 51, 2045-2055
64. Corey, E.J., Niwa, H., Falck, J.R., Mioskowski, C., Arai, Y., and Marfat, A. (1980) Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Adv.Prostaglandin Thromboxane Res.* 6, 19-25
65. Funk, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 294, 1871-1875
66. Smith, W.L., Urade, Y., and Jakobsson, P.J. (2011) Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem.Rev.* 111, 5821-5865

67. Fujimori, K., Ueno, T., Nagata, N., Kashiwagi, K., Aritake, K., Amano, F., and Urade, Y. (2010) Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2alpha synthase. *J.Biol.Chem.* 285, 8880-8886
68. Fujimori, K., Aritake, K., and Urade, Y. (2007) A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J.Biol.Chem.* 282, 18458-18466
69. Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., and Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 83, 803-812
70. Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 83, 813-819
71. Brun, R.P., Tontonoz, P., Forman, B.M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R.M., and Spiegelman, B.M. (1996) Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 10, 974-984
72. Aubert, J., Saint-Marc, P., Belmonte, N., Dani, C., Negrel, R., and Ailhaud, G. (2000) Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol.Cell.Endocrinol.* 160, 149-156
73. Ueno, T., and Fujimori, K. (2011) Novel suppression mechanism operating in early phase of adipogenesis by positive feedback loop for enhancement of cyclooxygenase-2 expression through prostaglandin F2alpha receptor mediated activation of MEK/ERK-CREB cascade. *FEBS J.* 278, 2901-2912
74. Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T., and Ichikawa, A. (2004) Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 322, 1066-1072
75. Sugimoto, Y., Tsuboi, H., Okuno, Y., Tamba, S., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A. (2004) Microarray evaluation of EP4 receptor-mediated prostaglandin E2 suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 322, 911-917
76. Fujimori, K., Yano, M., and Ueno, T. (2012) Synergistic suppression of early phase of adipogenesis by microsomal PGE synthase-1 (PTGES1)-produced PGE2 and aldo-keto reductase 1B3-produced PGF2alpha. *PLoS One.* 7, e44698
77. Fujimori, K., Yano, M., Miyake, H., and Kimura, H. (2014) Termination mechanism of CREB-dependent activation of COX-2 expression in early phase of adipogenesis. *Mol.Cell.Endocrinol.* 384, 12-22
78. Strong, P., Coleman, R.A., and Humphrey, P.P. (1992) Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors. *Prostaglandins.* 43, 559-566
79. Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K.A., Hellerstein, M.K., Lee, H.Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Kim, K.H., de Val, S., Kang, C., and Sul, H.S. (2009) AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat.Med.* 15, 159-168
80. Madsen, L., Petersen, R.K., Sorensen, M.B., Jorgensen, C., Hallenborg, P., Pridal, L., Fleckner, J., Amri, E.Z., Krieg, P., Furstenberger, G., Berge, R.K., and Kristiansen, K. (2003) Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem.J.* 375, 539-549
81. Hallenborg, P., Jorgensen, C., Petersen, R.K., Feddersen, S., Araujo, P., Markt, P., Langer, T., Furstenberger, G., Krieg, P., Koppen, A., Kalkhoven, E., Madsen, L., and Kristiansen, K. (2010) Epidermis-type lipoxygenase 3 regulates adipocyte differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *Mol.Cell.Biol.* 30, 4077-4091

82. Hirata, K., Wada, K., Murata, Y., Nakajima, A., Yamashiro, T., and Kamisaki, Y. (2013) Critical role of leukotriene B4 receptor signaling in mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Lipids Health.Dis.* 12, 122-511X-12-122
83. Yu, K., Bayona, W., Kallen, C.B., Harding, H.P., Ravera, C.P., McMahon, G., Brown, M., and Lazar, M.A. (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J.Biol.Chem.* 270, 23975-23983
84. Kim, D.H., Puri, N., Sodhi, K., Falck, J.R., Abraham, N.G., Shapiro, J., and Schwartzman, M.L. (2013) Cyclooxygenase-2 dependent metabolism of 20-HETE increases adiposity and adipocyte enlargement in mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J.Lipid Res.* 54, 786-793
85. Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J.Clin.Invest.* 101, 1-9
86. Rubin, B.R., and Bogan, J.S. (2009) Intracellular retention and insulin-stimulated mobilization of GLUT4 glucose transporters. *Vitam.Horm.* 80, 155-192
87. Kloting, N., Koch, L., Wunderlich, T., Kern, M., Ruschke, K., Krone, W., Bruning, J.C., and Bluher, M. (2008) Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth. *Diabetes.* 57, 2074-2082
88. Joyner, J.M., Hutley, L.J., and Cameron, D.P. (2000) Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences. *J.Endocrinol.* 166, 145-152
89. McCreia, J.M., Robinson, P., and Gerrard, J.M. (1985) Mepacrine (quinacrine) inhibition of thrombin-induced platelet responses can be overcome by lysophosphatidic acid. *Biochim.Biophys.Acta.* 842, 189-194
90. Gerrard, J.M., and Robinson, P. (1989) Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim.Biophys.Acta.* 1001, 282-285
91. Tokumura, A., Harada, K., Fukuzawa, K., and Tsukatani, H. (1986) Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim.Biophys.Acta.* 875, 31-38
92. van Dijk, M.C., Postma, F., Hilkmann, H., Jalink, K., van Blitterswijk, W.J., and Moolenaar, W.H. (1998) Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca²⁺ signaling pathways. *Curr.Biol.* 8, 386-392
93. Tokumura, A., Miyake, M., Nishioka, Y., Yamano, S., Aono, T., and Fukuzawa, K. (1999) Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol.Reprod.* 61, 195-199
94. Ferry, G., Tellier, E., Try, A., Gres, S., Naime, I., Simon, M.F., Rodriguez, M., Boucher, J., Tack, I., Gesta, S., Chomarat, P., Dieu, M., Raes, M., Galizzi, J.P., Valet, P., Boutin, J.A., and Saulnier-Blache, J.S. (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J.Biol.Chem.* 278, 18162-18169
95. Hooks, S.B., Santos, W.L., Im, D.S., Heise, C.E., Macdonald, T.L., and Lynch, K.R. (2001) Lysophosphatidic acid-induced mitogenesis is regulated by lipid phosphate phosphatases and is Edg-receptor independent. *J.Biol.Chem.* 276, 4611-4621
96. McIntyre, T.M., Pontsler, A.V., Silva, A.R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J.C., Zimmerman, G.A., Hama, K., Aoki, J., Arai, H., and Prestwich, G.D. (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100, 131-136

97. Ohsumi, J., Sakakibara, S., Yamaguchi, J., Miyadai, K., Yoshioka, S., Fujiwara, T., Horikoshi, H., and Serizawa, N. (1994) Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology*. 135, 2279-2282
98. Greenberg, A.S., Nordan, R.P., McIntosh, J., Calvo, J.C., Scow, R.O., and Jablons, D. (1992) Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res*. 52, 4113-4116
99. van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Moller, K., Saltin, B., Febbraio, M.A., and Pedersen, B.K. (2003) Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 88, 3005-3010
100. Lyngso, D., Simonsen, L., and Bulow, J. (2002) Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. *J.Physiol*. 543, 373-378
101. Eehalt, R., Fullekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T., and Stremmel, W. (2006) Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol.Cell.Biochem*. 284, 135-140
102. Schaffer, J.E., and Lodish, H.F. (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 79, 427-436
103. Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Gil-de-Gomez, L., Guijas, C., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2011) Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol*. 186, 6004-6013
104. Coleman, R.A., and Lee, D.P. (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog.Lipid Res*. 43, 134-176
105. Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D.N., and Reue, K. (2007) Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J.Biol.Chem*. 282, 3450-3457
106. Peterfy, M., Phan, J., and Reue, K. (2005) Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J.Biol.Chem*. 280, 32883-32889
107. Peterfy, M., Phan, J., Xu, P., and Reue, K. (2001) Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat.Genet*. 27, 121-124
108. Reue, K., Xu, P., Wang, X.P., and Slavin, B.G. (2000) Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J.Lipid Res*. 41, 1067-1076
109. Xu, J., Lee, W.N., Phan, J., Saad, M.F., Reue, K., and Kurland, I.J. (2006) Lipin deficiency impairs diurnal metabolic fuel switching. *Diabetes*. 55, 3429-3438
110. Langner, C.A., Birkenmeier, E.H., Roth, K.A., Bronson, R.T., and Gordon, J.I. (1991) Characterization of the peripheral neuropathy in neonatal and adult mice that are homozygous for the fatty liver dystrophy (fld) mutation. *J.Biol.Chem*. 266, 11955-11964
111. Langner, C.A., Birkenmeier, E.H., Ben-Zeev, O., Schotz, M.C., Sweet, H.O., Davisson, M.T., and Gordon, J.I. (1989) The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *J.Biol.Chem*. 264, 7994-8003
112. Verheijen, M.H., Chrast, R., Burrola, P., and Lemke, G. (2003) Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev*. 17, 2450-2464

113. Finck, B.N., Gropler, M.C., Chen, Z., Leone, T.C., Croce, M.A., Harris, T.E., Lawrence, J.C., Jr, and Kelly, D.P. (2006) Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell.Metab.* 4, 199-210
114. Phan, J., Peterfy, M., and Reue, K. (2004) Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor- γ is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. *J.Biol.Chem.* 279, 29558-29564
115. Koh, Y.K., Lee, M.Y., Kim, J.W., Kim, M., Moon, J.S., Lee, Y.J., Ahn, Y.H., and Kim, K.S. (2008) Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ 2. *J.Biol.Chem.* 283, 34896-34906
116. Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., and Gross, R.W. (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J.Biol.Chem.* 279, 48968-48975
117. Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.H., and Sul, H.S. (2004) Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J.Biol.Chem.* 279, 47066-47075
118. Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 306, 1383-1386
119. Fredrikson, G., Stralfors, P., Nilsson, N.O., and Belfrage, P. (1981) Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J.Biol.Chem.* 256, 6311-6320
120. Fredrikson, G., Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim.Biophys.Acta.* 876, 288-293
121. Hara-Chikuma, M., Sohara, E., Rai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Sasaki, S., Uchida, S., and Verkman, A.S. (2005) Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J.Biol.Chem.* 280, 15493-15496
122. Matarese, V., Buelt, M.K., Chinander, L.L., and Bernlohr, D.A. (1990) Purification of adipocyte lipid-binding protein from human and murine cells. *Methods Enzymol.* 189, 363-369
123. Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J.Biol.Chem.* 275, 38486-38493
124. Granneman, J.G., Moore, H.P., Granneman, R.L., Greenberg, A.S., Obin, M.S., and Zhu, Z. (2007) Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 282, 5726-5735
125. Miyoshi, H., Perfield, J.W., 2nd, Souza, S.C., Shen, W.J., Zhang, H.H., Stancheva, Z.S., Kraemer, F.B., Obin, M.S., and Greenberg, A.S. (2007) Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 282, 996-1002
126. Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A.W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M.P., and Brasaemle, D.L. (2004) Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J.Biol.Chem.* 279, 42062-42071
127. Yamaguchi, T., Omatsu, N., Morimoto, E., Nakashima, H., Ueno, K., Tanaka, T., Satouchi, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2007) CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J.Lipid Res.* 48, 1078-1089

128. Egan, J.J., Greenberg, A.S., Chang, M.K., Wek, S.A., Moos, M.C., Jr, and Londos, C. (1992) Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 8537-8541
129. Lafontan, M., Sengenès, C., Galitzky, J., Berlan, M., De Glisezinski, I., Crampes, F., Stich, V., Langin, D., Barbe, P., and Riviere, D. (2000) Recent developments on lipolysis regulation in humans and discovery of a new lipolytic pathway. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 24 Suppl 4, S47-52
130. Lafontan, M., and Langin, D. (2009) Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog.Lipid Res.* 48, 275-297
131. Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R.E., Ahmadian, M., and Sul, H.S. (2007) Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 293, G1-4
132. Friedman, J.M. (2000) Obesity in the new millennium. *Nature.* 404, 632-634
133. Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 104, 531-543
134. Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395, 763-770
135. Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 409, 307-312
136. Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 56, 901-911
137. Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V. (2008) Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int.J.Obes.(Lond).* 32, 451-463
138. Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007) Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 293, E1118-28
139. Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J., Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D., and Groop, L.C. (2003) PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat.Genet.* 34, 267-273
140. Petersen, K.F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D.L., DiPietro, L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science.* 300, 1140-1142
141. Lin, Y., Berg, A.H., Iyengar, P., Lam, T.K., Giacca, A., Combs, T.P., Rajala, M.W., Du, X., Rollman, B., Li, W., Hawkins, M., Barzilai, N., Rhodes, C.J., Fantus, I.G., Brownlee, M., and Scherer, P.E. (2005) The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J.Biol.Chem.* 280, 4617-4626
142. Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T.A., Ozawa, K., Ogawa, S., Hori, M., Yamasaki, Y., and Matsuhisa, M. (2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J.Biol.Chem.* 280, 847-851
143. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 306, 457-461

144. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest.* 112, 1796-1808
145. Nguyen, M.T., Favelyukis, S., Nguyen, A.K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007) A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J.Biol.Chem.* 282, 35279-35292
146. Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu.Rev.Physiol.* 72, 219-246
147. Surmi, B.K., and Hasty, A.H. (2008) Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol.* 3, 545-556
148. Shoelson, S.E., Herrero, L., and Naaz, A. (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 132, 2169-2180
149. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2009) CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat.Med.* 15, 914-920
150. Chen, A., Mumick, S., Zhang, C., Lamb, J., Dai, H., Weingarh, D., Mudgett, J., Chen, H., MacNeil, D.J., Reitman, M.L., and Qian, S. (2005) Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes.Res.* 13, 1311-1320
151. Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J.Clin.Invest.* 116, 115-124
152. Hotamisligil, G.S., and Spiegelman, B.M. (1994) Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes.* 43, 1271-1278
153. Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 95, 2409-2415
154. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 420, 333-336
155. Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., Kopp, A., Schoelmerich, J., and Falk, W. (2009) Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology.* 126, 233-245
156. Senn, J.J. (2006) Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J.Biol.Chem.* 281, 26865-26875
157. Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 116, 3015-3025
158. Stein, C.J., and Colditz, G.A. (2004) The epidemic of obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 89, 2522-2525
159. Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J.Clin.Invest.* 112, 1785-1788
160. Fajas, L. (2003) Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann.Med.* 35, 79-85
161. Sherr, C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 79, 551-555

162. Matsushime, H., Roussel, M.F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1991) Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 65, 701-713
163. Johnson, D.G., and Schneider-Broussard, R. (1998) Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front.Biosci.* 3, d447-8
164. Geng, Y., Eaton, E.N., Picon, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A., Sardet, C., and Weinberg, R.A. (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*. 12, 1173-1180
165. Ohtani, K., DeGregori, J., and Nevins, J.R. (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 12146-12150
166. Dulic, V., Lees, E., and Reed, S.I. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*. 257, 1958-1961
167. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., and Roberts, J.M. (1992) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*. 257, 1689-1694
168. Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I., and Weinberg, R.A. (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*. 70, 993-1006
169. Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 11264-11268
170. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N.J. (1991) Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*. 67, 1169-1179
171. Lehner, C.F., and O'Farrell, P.H. (1989) Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell*. 56, 957-968
172. Walker, D.H., and Maller, J.L. (1991) Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature*. 354, 314-317
173. Arellano, M., and Moreno, S. (1997) Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29, 559-573
174. King, R.W., Jackson, P.K., and Kirschner, M.W. (1994) Mitosis in transition. *Cell*. 79, 563-571
175. Aguilar, V., and Fajas, L. (2010) Cycling through metabolism. *EMBO Mol.Med.* 2, 338-348
176. Khakpour, H., and Frishman, W.H. (2009) Lipoprotein-associated phospholipase A2: an independent predictor of cardiovascular risk and a novel target for immunomodulation therapy. *Cardiol.Rev.* 17, 222-229
177. Packard, C.J. (2009) Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a biomarker of coronary heart disease and a therapeutic target. *Curr.Opin.Cardiol.* 24, 358-363
178. Tsimikas, S., Tsimionis, L.D., and Tselepis, A.D. (2007) New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27, 2094-2099
179. Wilensky, R.L., and Macphee, C.H. (2009) Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 20, 415-420

180. Arai, H. (2002) Platelet-activating factor acetylhydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 83-94
181. Kitsiouli, E., Nakos, G., and Lekka, M.E. (2009) Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim.Biophys.Acta.* 1792, 941-953
182. Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Jaworski, K., Ahmadian, M., and Sul, H.S. (2008) Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). *J.Biol.Chem.* 283, 25428-25436
183. Tischfield, J.A., Xia, Y.R., Shih, D.M., Klisak, I., Chen, J., Engle, S.J., Siakotos, A.N., Winstead, M.V., Seilhamer, J.J., Allamand, V., Gyapay, G., and Lusic, A.J. (1996) Low-molecular-weight, calcium-dependent phospholipase A2 genes are linked and map to homologous chromosome regions in mouse and human. *Genomics.* 32, 328-333
184. Valentin, E., Singer, A.G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., Gelb, M.H., and Lambeau, G. (2000) Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A(2). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 279, 223-228
185. Singer, A.G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G., and Gelb, M.H. (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J.Biol.Chem.* 277, 48535-48549
186. Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., and Yamamoto, K. (2011) Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog.Lipid Res.* 50, 152-192
187. Gora, S., Lambeau, G., Bollinger, J.G., Gelb, M., Ninio, E., and Karabina, S.A. (2006) The proinflammatory mediator Platelet Activating Factor is an effective substrate for human group X secreted phospholipase A2. *Biochim.Biophys.Acta.* 1761, 1093-1099
188. Mitsuishi, M., Masuda, S., Kudo, I., and Murakami, M. (2006) Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. *Biochem.J.* 393, 97-106
189. Mitsuishi, M., Masuda, S., Kudo, I., and Murakami, M. (2007) Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim.Biophys.Acta.* 1771, 1389-1396
190. Oorni, K., and Kovanen, P.T. (2009) Lipoprotein modification by secretory phospholipase A(2) enzymes contributes to the initiation and progression of atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 20, 421-427
191. Fourcade, O., Simon, M.F., Viode, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournie, B., Sarda, L., and Chap, H. (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell.* 80, 919-927
192. Hanasaki, K., Yamada, K., Yamamoto, S., Ishimoto, Y., Saiga, A., Ono, T., Ikeda, M., Notoya, M., Kamitani, S., and Arita, H. (2002) Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation. *J.Biol.Chem.* 277, 29116-29124
193. Chabot, S., Koumanov, K., Lambeau, G., Gelb, M.H., Balloy, V., Chignard, M., Whitsett, J.A., and Touqui, L. (2003) Inhibitory effects of surfactant protein A on surfactant phospholipid hydrolysis by secreted phospholipases A2. *J.Immunol.* 171, 995-1000
194. Karabina, S.A., Brocheriou, I., Le Naour, G., Agrapart, M., Durand, H., Gelb, M., Lambeau, G., and Ninio, E. (2006) Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB J.* 20, 2547-2549

195. Valentin, E., and Lambeau, G. (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1488, 59-70
196. Valentin, E., and Lambeau, G. (2000) What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)?. *Biochimie.* 82, 815-831
197. Mounier, C.M., Bon, C., and Kini, R.M. (2001) Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A(2): protein-versus phospholipid-dependent mechanism of action. *Haemostasis.* 31, 279-287
198. Pungercar, J., and Krizaj, I. (2007) Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon.* 50, 871-892
199. Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol.Sci.* 20, 162-170
200. Ikeda, I., Imaizumi, K., and Sugano, M. (1987) Absorption and transport of base moieties of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rats. *Biochim.Biophys.Acta.* 921, 245-253
201. Richmond, B.L., Boileau, A.C., Zheng, S., Huggins, K.W., Granholm, N.A., Tso, P., and Hui, D.Y. (2001) Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A(2)-deficient mice. *Gastroenterology.* 120, 1193-1202
202. Huggins, K.W., Boileau, A.C., and 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, E994-E1001
203. Hui, D.Y., Cope, M.J., Labonte, E.D., Chang, H.T., Shao, J., Goka, E., Abousalham, A., Charmot, D., and Buysse, J. (2009) The phospholipase A(2) inhibitor methyl indoxam suppresses diet-induced obesity and glucose intolerance in mice. *Br.J.Pharmacol.* 157, 1263-1269
204. Li, X., Shridas, P., Forrest, K., Bailey, W., and Webb, N.R. (2010) Group X secretory phospholipase A2 negatively regulates adipogenesis in murine models. *FASEB J.* 24, 4313-4324
205. Iyer, A., Lim, J., Poudyal, H., Reid, R.C., Suen, J.Y., Webster, J., Prins, J.B., Whitehead, J.P., Fairlie, D.P., and Brown, L. (2012) An inhibitor of phospholipase A2 group IIA modulates adipocyte signaling and protects against diet-induced metabolic syndrome in rats. *Diabetes.* 61, 2320-2329
206. Glover, S., de Carvalho, M.S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C.C., and Gelb, M.H. (1995) Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J.Biol.Chem.* 270, 15359-15367
207. Peters-Golden, M., Song, K., Marshall, T., and Brock, T. (1996) Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem.J.* 318 (Pt 3), 797-803
208. Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H., and Shimizu, T. (1999) Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 274, 5163-5169
209. Evans, J.H., Spencer, D.M., Zweifach, A., and Leslie, C.C. (2001) Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J.Biol.Chem.* 276, 30150-30160
210. Evans, J.H., and Leslie, C.C. (2004) The cytosolic phospholipase A2 catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes. *J.Biol.Chem.* 279, 6005-6016

211. Shirai, Y., Balsinde, J., and 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, 119-129
212. Song, C., Chang, X.J., Bean, K.M., Proia, M.S., Knopf, J.L., and Kriz, R.W. (1999) Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂-beta. *J.Biol.Chem.* 274, 17063-17067
213. Sharp, J.D., White, D.L., Chiou, X.G., Goodson, T., Gamboa, G.C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P.L., and Sportsman, J.R. (1991) Molecular cloning and expression of human Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *J.Biol.Chem.* 266, 14850-14853
214. Pickard, R.T., Striffler, B.A., Kramer, R.M., and Sharp, J.D. (1999) Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂. *J.Biol.Chem.* 274, 8823-8831
215. Ohto, T., Uozumi, N., Hirabayashi, T., and Shimizu, T. (2005) Identification of novel cytosolic phospholipase A₂s, murine cPLA₂{delta}, {epsilon}, and {zeta}, which form a gene cluster with cPLA₂{beta}. *J.Biol.Chem.* 280, 24576-24583
216. Chiba, H., Michibata, H., Wakimoto, K., Seishima, M., Kawasaki, S., Okubo, K., Mitsui, H., Torii, H., and Imai, Y. (2004) Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂delta, induced in psoriatic skin. *J.Biol.Chem.* 279, 12890-12897
217. Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N., and Knopf, J.L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell.* 65, 1043-1051
218. Tay, A., Simon, J.S., Squire, J., Hamel, K., Jacob, H.J., and Skorecki, K. (1995) Cytosolic phospholipase A₂ gene in human and rat: chromosomal localization and polymorphic markers. *Genomics.* 26, 138-141
219. Underwood, K.W., Song, C., Kriz, R.W., Chang, X.J., Knopf, J.L., and Lin, L.L. (1998) A novel calcium-independent phospholipase A₂, cPLA₂-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *J.Biol.Chem.* 273, 21926-21932
220. Tucker, D.E., Stewart, A., Nallan, L., Bendale, P., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., and Leslie, C.C. (2005) Group IVC cytosolic phospholipase A₂gamma is farnesylated and palmitoylated in mammalian cells. *J.Lipid Res.* 46, 2122-2133
221. Ghosh, M., Tucker, D.E., Burchett, S.A., and Leslie, C.C. (2006) Properties of the Group IV phospholipase A₂ family. *Prog.Lipid Res.* 45, 487-510
222. Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E.A. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 8527-8531
223. Atsumi, G., Tajima, M., Hadano, A., Nakatani, Y., Murakami, M., and Kudo, I. (1998) Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A₂ but not cytosolic phospholipase A₂, which undergoes proteolytic inactivation. *J.Biol.Chem.* 273, 13870-13877
224. Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2002) Involvement of calcium-independent phospholipase A₂ in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 40384-40389
225. Balsinde, J. (2002) Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* 364, 695-702

225. Pérez, R., Melero, R., Balboa, M.A., and 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, 40385-40391
226. Pérez, R., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2006) Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. *J. Immunol.* 176, 2555-2561
227. Pérez, R., Matabosch, X., Llebaria, A., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2006) Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J. Lipid Res.* 47, 484-491
228. Ruipérez, V., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2009) Coordinate regulation of Toll-like receptor-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A2s. *J. Immunol.* 182, 3877-3883
229. Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J., and Somers, W.S. (1999) Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell.* 97, 349-360
230. Pickard, R.T., Chiou, X.G., Striffler, B.A., DeFelippis, M.R., Hyslop, P.A., Tebbe, A.L., Yee, Y.K., Reynolds, L.J., Dennis, E.A., Kramer, R.M., and Sharp, J.D. (1996) Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine. *J.Biol.Chem.* 271, 19225-19231
231. Dolan-O'Keefe, M., Chow, V., Monnier, J., Visner, G.A., and Nick, H.S. (2000) Transcriptional regulation and structural organization of the human cytosolic phospholipase A(2) gene. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 278, L649-57
232. Clark, J.D., Schievella, A.R., Nalefski, E.A., and Lin, L.L. (1995) Cytosolic phospholipase A2. *J.Lipid Mediat.Cell Signal.* 12, 83-117
233. Leslie, C.C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 272, 16709-16712
234. Nalefski, E.A., Sultzman, L.A., Martin, D.M., Kriz, R.W., Towler, P.S., Knopf, J.L., and Clark, J.D. (1994) Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain. *J.Biol.Chem.* 269, 18239-18249
235. Schievella, A.R., Regier, M.K., Smith, W.L., and Lin, L.L. (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 270, 30749-30754
236. Wooten, R.E., Willingham, M.C., Daniel, L.W., Leslie, C.C., Rogers, L.C., Sergeant, S., and O'Flaherty, J.T. (2008) Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2alpha fluorescent proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1783, 1544-1550
237. Moreira, L.S., Piva, B., Gentile, L.B., Mesquita-Santos, F.P., D'Avila, H., Maya-Monteiro, C.M., Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C., and Diaz, B.L. (2009) Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 1791, 156-165
238. Girotti, M., Evans, J.H., Burke, D., and Leslie, C.C. (2004) Cytosolic phospholipase A2 translocates to forming phagosomes during phagocytosis of zymosan in macrophages. *J.Biol.Chem.* 279, 19113-19121
239. Casas, J., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2010) The cationic cluster of group IVA phospholipase A2 (Lys488/Lys541/Lys543/Lys544) is involved in translocation of the enzyme to phagosomes in human macrophages. *J.Lipid Res.* 51, 388-399

240. Casas, J., Meana, C., Esquinas, E., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2009) Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A2 to phagosomes in human macrophages. *J.Immunol.* 183, 2767-2774
241. Corbalan-Garcia, S., Rodriguez-Alfaro, J.A., and Gomez-Fernandez, J.C. (1999) Determination of the calcium-binding sites of the C2 domain of protein kinase Calpha that are critical for its translocation to the plasma membrane. *Biochem.J.* 337 (Pt 3), 513-521
242. Evans, J.H., Gerber, S.H., Murray, D., and Leslie, C.C. (2004) The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol.Biol.Cell.* 15, 371-383
243. Corbin, J.A., Evans, J.H., Landgraf, K.E., and Falke, J.J. (2007) Mechanism of specific membrane targeting by C2 domains: localized pools of target lipids enhance Ca²⁺ affinity. *Biochemistry.* 46, 4322-4336
244. Stahelin, R.V., Rafter, J.D., Das, S., and Cho, W. (2003) The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C-alpha and group IVa cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 278, 12452-12460
245. Evans, J.H., Murray, D., Leslie, C.C., and Falke, J.J. (2006) Specific translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane requires both Ca²⁺ and PIP₂ recognition by its C2 domain. *Mol.Biol.Cell.* 17, 56-66
246. Cho, W., and Stahelin, R.V. (2006) Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim.Biophys.Acta.* 1761, 838-849
247. Nalefski, E.A., Slazas, M.M., and Falke, J.J. (1997) Ca²⁺-signaling cycle of a membrane-docking C2 domain. *Biochemistry.* 36, 12011-12018
248. Perisic, O., Paterson, H.F., Mosedale, G., Lara-Gonzalez, S., and Williams, R.L. (1999) Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 274, 14979-14987
249. Nalefski, E.A., McDonagh, T., Somers, W., Seehra, J., Falke, J.J., and Clark, J.D. (1998) Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 273, 1365-1372
250. Hixon, M.S., Ball, A., and Gelb, M.H. (1998) Calcium-dependent and -independent interfacial binding and catalysis of cytosolic group IV phospholipase A2. *Biochemistry.* 37, 8516-8526
251. Borsch-Haubold, A.G., Bartoli, F., Asselin, J., Dudler, T., Kramer, R.M., Aplitz-Castro, R., Watson, S.P., and Gelb, M.H. (1998) Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J.Biol.Chem.* 273, 4449-4458
252. Hefner, Y., Borsch-Haubold, A.G., Murakami, M., Wilde, J.I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J.R., 3rd, Armstrong, C.G., Paterson, A., Cohen, P., Fukunaga, R., Hunter, T., Kudo, I., Watson, S.P., and Gelb, M.H. (2000) Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J.Biol.Chem.* 275, 37542-37551
253. Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Borsch-Haubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J., and Jakubowski, J.A. (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J.Biol.Chem.* 271, 27723-27729

254. Muthalif, M.M., Hefner, Y., Canaan, S., Harper, J., Zhou, H., Parmentier, J.H., Aebersold, R., Gelb, M.H., and Malik, K.U. (2001) Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A(2). *J.Biol.Chem.* 276, 39653-39660
255. Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A., and Davis, R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell.* 72, 269-278
256. Bayburt, T., and Gelb, M.H. (1997) Interfacial catalysis by human 85 kDa cytosolic phospholipase A2 on anionic vesicles in the scooting mode. *Biochemistry.* 36, 3216-3231
257. de Carvalho, M.G., Garritano, J., and Leslie, C.C. (1995) Regulation of lysophospholipase activity of the 85-kDa phospholipase A2 and activation in mouse peritoneal macrophages. *J.Biol.Chem.* 270, 20439-20446
258. Das, S., Rafter, J.D., Kim, K.P., Gygi, S.P., and Cho, W. (2003) Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A(2) activation by phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 278, 41431-41442
259. de Carvalho, M.G., McCormack, A.L., Olson, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Yates, J.R.,3rd, and Leslie, C.C. (1996) Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic phospholipase A2 expressed in insect cells and present in human monocytes. *J.Biol.Chem.* 271, 6987-6997
260. Tian, W., Wijewickrama, G.T., Kim, J.H., Das, S., Tun, M.P., Gokhale, N., Jung, J.W., Kim, K.P., and Cho, W. (2008) Mechanism of regulation of group IVA phospholipase A2 activity by Ser727 phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 283, 3960-3971
261. Wu, T., Angus, C.W., Yao, X.L., Logun, C., and Shelhamer, J.H. (1997) P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 272, 17145-17153
262. Das, S., and Cho, W. (2002) Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 277, 23838-23846
263. Six, D.A., and Dennis, E.A. (2003) Essential Ca(2+)-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A(2) C2 domain for interfacial activity. *J.Biol.Chem.* 278, 23842-23850
264. Leslie, C.C., and Channon, J.Y. (1990) Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from macrophages and reduce the calcium requirement for activity. *Biochim.Biophys.Acta.* 1045, 261-270
265. Mosior, M., Six, D.A., and Dennis, E.A. (1998) Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J.Biol.Chem.* 273, 2184-2191
266. Casas, J., Gijon, M.A., Vigo, A.G., Crespo, M.S., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2006) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A2 to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol.Biol.Cell.* 17, 155-162
267. Pettus, B.J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Leslie, C.C., Evans, J.H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y.A., and Chalfant, C.E. (2004) Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 279, 11320-11326
268. Subramanian, P., Vora, M., Gentile, L.B., Stahelin, R.V., and Chalfant, C.E. (2007) Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A2 via distinct and separate mechanisms. *J.Lipid Res.* 48, 2701-2708

269. Subramanian, P., Stahelin, R.V., Szulc, Z., Bielawska, A., Cho, W., and Chalfant, C.E. (2005) Ceramide 1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A2 alpha and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine. *J.Biol.Chem.* 280, 17601-17607
270. Stahelin, R.V., Subramanian, P., Vora, M., Cho, W., and Chalfant, C.E. (2007) Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase a2 via a novel site in the C2 domain. *J.Biol.Chem.* 282, 20467-20474
271. Nakatani, Y., Tanioka, T., Sunaga, S., Murakami, M., and Kudo, I. (2000) Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A(2)alpha. *J.Biol.Chem.* 275, 1161-1168
272. Sakaguchi, M., Murata, H., Sonogawa, H., Sakaguchi, Y., Futami, J., Kitazoe, M., Yamada, H., and Huh, N.H. (2007) Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 282, 35679-35686
273. Herbert, S.P., Odell, A.F., Ponnambalam, S., and Walker, J.H. (2007) The confluence-dependent interaction of cytosolic phospholipase A2-alpha with annexin A1 regulates endothelial cell prostaglandin E2 generation. *J.Biol.Chem.* 282, 34468-34478
274. Gaudreault, S.B., Chabot, C., Gratton, J.P., and Poirier, J. (2004) The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity. *J.Biol.Chem.* 279, 356-362
275. Sheridan, A.M., Force, T., Yoon, H.J., O'Leary, E., Choukroun, G., Taheri, M.R., and Bonventre, J.V. (2001) PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production. *Mol.Cell.Biol.* 21, 4470-4481
276. Herbert, S.P., Odell, A.F., Ponnambalam, S., and Walker, J.H. (2009) Activation of cytosolic phospholipase A2- α as a novel mechanism regulating endothelial cell cycle progression and angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 284, 5784-5796
277. Alonso, F., Henson, P.M., and Leslie, C.C. (1986) A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim.Biophys.Acta.* 878, 273-280
278. Flesch, I., Schmidt, B., and Ferber, E. (1985) Acyl chain specificity and kinetic properties of phospholipase A1 and A2 of bone marrow-derived macrophages. *Z.Naturforsch.C.* 40, 356-363
279. Bonventre, J.V., and Sapirstein, A. (2002) Group IV cytosolic phospholipase A2 (PLA2) function: insights from the knockout mouse. *Adv.Exp.Med.Biol.* 507, 25-31
280. Uozumi, N., and Shimizu, T. (2002) Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 59-69
281. Bonventre, J. (2004) Cytosolic phospholipase A2alpha reigns supreme in arthritis and bone resorption. *Trends Immunol.* 25, 116-119
282. Hegen, M., Sun, L., Uozumi, N., Kume, K., Goad, M.E., Nickerson-Nutter, C.L., Shimizu, T., and Clark, J.D. (2003) Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J.Exp.Med.* 197, 1297-1302
283. Klivenyi, P., Beal, M.F., Ferrante, R.J., Andreassen, O.A., Wermer, M., Chin, M.R., and Bonventre, J.V. (1998) Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A2 are resistant to MPTP neurotoxicity. *J.Neurochem.* 71, 2634-2637

284. Marusic, S., Leach, M.W., Pelker, J.W., Azoitei, M.L., Uozumi, N., Cui, J., Shen, M.W., DeClercq, C.M., Miyashiro, J.S., Carito, B.A., Thakker, P., Simmons, D.L., Leonard, J.P., Shimizu, T., and Clark, J.D. (2005) Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Exp.Med.* 202, 841-851
285. Miyaura, C., Inada, M., Matsumoto, C., Ohshiba, T., Uozumi, N., Shimizu, T., and Ito, A. (2003) An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. *J.Exp.Med.* 197, 1303-1310
286. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kita, Y., Yamamoto, H., Ohga, E., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2002) A pivotal role of cytosolic phospholipase A(2) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nat.Med.* 8, 480-484
287. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kume, K., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2000) Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2. *Nat.Immunol.* 1, 42-46
288. Gubern, A., Casas, J., Barcelo-Torns, M., Barneda, D., de la Rosa, X., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M.A., and Claro, E. (2008) Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J.Biol.Chem.* 283, 27369-27382
289. Gubern, A., Barcelo-Torns, M., Barneda, D., Lopez, J.M., Masgrau, R., Picatoste, F., Chalfant, C.E., Balsinde, J., Balboa, M.A., and Claro, E. (2009) JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 284, 32359-32369
290. Guijas, C., Perez-Chacon, G., Astudillo, A.M., Rubio, J.M., Gil-de-Gomez, L., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2012) Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J.Lipid Res.* 53, 2343-2354
291. Ii, H., Hatakeyama, S., Tsutsumi, K., Sato, T., and Akiba, S. (2008) Group IVA phospholipase A2 is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 86, 12-17
292. Ii, H., Yokoyama, N., Yoshida, S., Tsutsumi, K., Hatakeyama, S., Sato, T., Ishihara, K., and Akiba, S. (2009) Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A2-knockout mice. *PLoS One.* 4, e8089
293. Ii, H., Oka, M., Yamashita, A., Waku, K., Uozumi, N., Shimizu, T., Sato, T., and Akiba, S. (2008) Inhibition of cytosolic phospholipase A(2) suppresses production of cholesteryl ester through the reesterification of free cholesterol but not formation of foam cells in oxidized LDL-stimulated macrophages. *Biol.Pharm.Bull.* 31, 6-12
294. Kienesberger, P.C., Oberer, M., Lass, A., and Zechner, R. (2009) Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J.Lipid Res.* 50 Suppl, S63-8
295. Wilson, S.G., Adam, G., Langdown, M., Reneland, R., Braun, A., Andrew, T., Surdulescu, G.L., Norberg, M., Dudbridge, F., Reed, P.W., Sambrook, P.N., Kleyn, P.W., and Spector, T.D. (2006) Linkage and potential association of obesity-related phenotypes with two genes on chromosome 12q24 in a female dizygous twin cohort. *Eur.J.Hum.Genet.* 14, 340-348
296. Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., Pershing, J.C., Purcell, J.P., and Alibhai, M.F. (2003) The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry.* 42, 6696-6708
297. Ma, Z., Ramanadham, S., Wohltmann, M., Bohrer, A., Hsu, F.F., and Turk, J. (2001) Studies of insulin secretory responses and of arachidonic acid incorporation into phospholipids of stably transfected insulinoma cells that overexpress group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta) indicate a signaling rather than a housekeeping role for iPLA2beta. *J.Biol.Chem.* 276, 13198-13208

298. Bao, S., Song, H., Wohltmann, M., Ramanadham, S., Jin, W., Bohrer, A., and Turk, J. (2006) Insulin secretory responses and phospholipid composition of pancreatic islets from mice that do not express Group VIA phospholipase A2 and effects of metabolic stress on glucose homeostasis. *J.Biol.Chem.* 281, 20958-20973
299. Bao, S., Bohrer, A., Ramanadham, S., Jin, W., Zhang, S., and Turk, J. (2006) Effects of stable suppression of Group VIA phospholipase A2 expression on phospholipid content and composition, insulin secretion, and proliferation of INS-1 insulinoma cells. *J.Biol.Chem.* 281, 187-198
300. Bao, S., Jacobson, D.A., Wohltmann, M., Bohrer, A., Jin, W., Philipson, L.H., and Turk, J. (2008) Glucose homeostasis, insulin secretion, and islet phospholipids in mice that overexpress iPLA2beta in pancreatic beta-cells and in iPLA2beta-null mice. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 294, E217-29
301. Lei, X., Zhang, S., Barbour, S.E., Bohrer, A., Ford, E.L., Koizumi, A., Papa, F.R., and Ramanadham, S. (2010) Spontaneous development of endoplasmic reticulum stress that can lead to diabetes mellitus is associated with higher calcium-independent phospholipase A2 expression: a role for regulation by SREBP-1. *J.Biol.Chem.* 285, 6693-6705
302. Su, X., Mancuso, D.J., Bickel, P.E., Jenkins, C.M., and Gross, R.W. (2004) Small interfering RNA knockdown of calcium-independent phospholipases A2 beta or gamma inhibits the hormone-induced differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J.Biol.Chem.* 279, 21740-21748
303. Gubern, A., Barcelo-Torns, M., Casas, J., Barneda, D., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M.A., and Claro, E. (2009) Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 284, 5697-5708
304. Song, H., Wohltmann, M., Bao, S., Ladenson, J.H., Semenkovich, C.F., and Turk, J. (2010) Mice deficient in group VIB phospholipase A2 (iPLA2gamma) exhibit relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 298, E1097-114
305. Mancuso, D.J., Sims, H.F., Yang, K., Kiebish, M.A., Su, X., Jenkins, C.M., Guan, S., Moon, S.H., Pietka, T., Nassir, F., Schappe, T., Moore, K., Han, X., Abumrad, N.A., and Gross, R.W. (2010) Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2gamma prevents obesity and insulin resistance during high fat feeding by mitochondrial uncoupling and increased adipocyte fatty acid oxidation. *J.Biol.Chem.* 285, 36495-36510
306. Liu, Y.M., Moldes, M., Bastard, J.P., Bruckert, E., Viguerie, N., Hainque, B., Basdevant, A., Langin, D., Pairault, J., and Clement, K. (2004) Adiponutrin: A new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 89, 2684-2689
307. Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat.Genet.* 40, 1461-1465
308. Kotronen, A., Johansson, L.E., Johansson, L.M., Roos, C., Westerbacka, J., Hamsten, A., Bergholm, R., Arkkila, P., Arola, J., Kiviluoto, T., Fisher, R.M., Ehrenborg, E., Orho-Melander, M., Ridderstrale, M., Groop, L., and Yki-Jarvinen, H. (2009) A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia.* 52, 1056-1060
309. Sookoian, S., Castano, G.O., Burgueno, A.L., Gianotti, T.F., Rosselli, M.S., and Pirola, C.J. (2009) A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J.Lipid Res.* 50, 2111-2116
310. Tian, C., Stokowski, R.P., Kershenovich, D., Ballinger, D.G., and Hinds, D.A. (2010) Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat.Genet.* 42, 21-23

311. Chen, W., Chang, B., Li, L., and Chan, L. (2010) Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology*. 52, 1134-1142
312. Johansson, L.E., Lindblad, U., Larsson, C.A., Rastam, L., and Ridderstrale, M. (2008) Polymorphisms in the adiponutrin gene are associated with increased insulin secretion and obesity. *Eur.J.Endocrinol*. 159, 577-583
313. Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J.S. (2006) Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*. 55, 148-157
314. Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E.F., Klingenspor, M., Hoefler, G., and Zechner, R. (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science*. 312, 734-737
315. Huijsman, E., van de Par, C., Economou, C., van der Poel, C., Lynch, G.S., Schoiswohl, G., Haemmerle, G., Zechner, R., and Watt, M.J. (2009) Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab*. 297, E505-13
316. Ahmadian, M., Duncan, R.E., Varady, K.A., Frasson, D., Hellerstein, M.K., Birkenfeld, A.L., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Wang, Y., Kang, C., and Sul, H.S. (2009) Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-induced obesity. *Diabetes*. 58, 855-866
317. Lefevre, C., Jobard, F., Caux, F., Bouadjar, B., Karaduman, A., Heilig, R., Lakhdar, H., Wollenberg, A., Verret, J.L., Weissenbach, J., Ozguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J.F., and Fischer, J. (2001) Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am.J.Hum.Genet*. 69, 1002-1012
318. Fischer, J., Lefevre, C., Morava, E., Mussini, J.M., Laforet, P., Negre-Salvayre, A., Lathrop, M., and Salvayre, R. (2007) The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat.Genet*. 39, 28-30
319. Schweiger, M., Lass, A., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., and Zechner, R. (2009) Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab*. 297, E289-96
320. Schoenborn, V., Heid, I.M., Vollmert, C., Lingenhel, A., Adams, T.D., Hopkins, P.N., Illig, T., Zimmermann, R., Zechner, R., Hunt, S.C., and Kronenberg, F. (2006) The ATGL gene is associated with free fatty acids, triglycerides, and type 2 diabetes. *Diabetes*. 55, 1270-1275
321. Matsuzawa, A., Hattori, K., Aoki, J., Arai, H., and Inoue, K. (1997) Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *J.Biol.Chem*. 272, 32315-32320
322. Kono, N., Inoue, T., Yoshida, Y., Sato, H., Matsusue, T., Itabe, H., Niki, E., Aoki, J., and Arai, H. (2008) Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *J.Biol.Chem*. 283, 1628-1636
323. Koizumi, H., Yamaguchi, N., Hattori, M., Ishikawa, T.O., Aoki, J., Taketo, M.M., Inoue, K., and Arai, H. (2003) Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J.Biol.Chem*. 278, 12489-12494
324. Yan, W., Assadi, A.H., Wynshaw-Boris, A., Eichele, G., Matzuk, M.M., and Clark, G.D. (2003) Previously uncharacterized roles of platelet-activating factor acetylhydrolase 1b complex in mouse spermatogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 100, 7189-7194

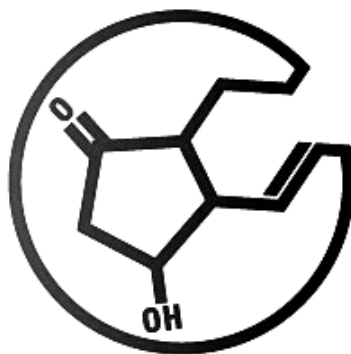
325. Pang, X.Y., Cao, J., Addington, L., Lovell, S., Battaile, K.P., Zhang, N., Rao, J.L., Dennis, E.A., and Moise, A.R. (2012) Structure/function relationships of adipose phospholipase A2 containing a cys-his-his catalytic triad. *J.Biol.Chem.* 287, 35260-35274
326. Uyama, T., Morishita, J., Jin, X.H., Okamoto, Y., Tsuboi, K., and Ueda, N. (2009) The tumor suppressor gene H-Rev107 functions as a novel Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A1/2 of the thiol hydrolase type. *J.Lipid Res.* 50, 685-693
327. Todaro, G.J., and Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J.Cell Biol.* 17, 299-313
328. Green, H., and Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 3, 127-133
329. Celis, J.E. (1998) *Cell Biology: A Laboratory Handbook.* Academic Press, New York. 1, 223-228
330. Rodbell, M. (1964) Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J.Biol.Chem.* 239, 375-380
331. Casas, J., Gijon, M.A., Vigo, A.G., Crespo, M.S., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2006) Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A2 protects cells from Ca²⁺-dependent death. *J.Biol.Chem.* 281, 6106-6116
332. Ramirez-Zacarias, J.L., Castro-Munozledo, F., and Kuri-Harcuch, W. (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry.* 97, 493-497
333. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150, 76-85
334. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685
335. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods.* 65, 55-63
336. Denizot, F., and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J.Immunol.Methods.* 89, 271-277
337. Livak, K.J., and 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, 402-408
338. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226, 497-509
339. Astudillo, A.M., Perez-Chacon, G., Balgoma, D., Gil-de-Gomez, L., Ruiperez, V., Guijas, C., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2011) Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 1811, 97-103
340. Abu, E.O., and Oluwatowoju, I. (2009) Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* 80, 189-194
341. Thurnhofer, S., and Vetter, W. (2005) A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *J.Agric.Food Chem.* 53, 8896-8903

342. Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M.R., Staels, B., Vidal, H., and Auwerx, J. (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J.Biol.Chem.* 272, 18779-18789
343. Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 7921-7925
344. Tang, Q.Q., Jiang, M.S., and Lane, M.D. (1999) Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Mol.Cell.Biol.* 19, 4855-4865
345. Kuri-Harcuch, W., and Marsch-Moreno, M. (1983) DNA synthesis and cell division related to adipose differentiation of 3T3 cells. *J.Cell.Physiol.* 114, 39-44
346. Fajas, L., Fruchart, J.C., and Auwerx, J. (1998) Transcriptional control of adipogenesis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10, 165-173
347. Zhang, P., Takeuchi, K., Csaki, L.S., and Reue, K. (2012) Lipin-1 phosphatidic phosphatase activity modulates phosphatidate levels to promote peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) gene expression during adipogenesis. *J.Biol.Chem.* 287, 3485-3494
348. Grimsey, N., Han, G.S., O'Hara, L., Rochford, J.J., Carman, G.M., and Siniosoglou, S. (2008) Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J.Biol.Chem.* 283, 29166-29174
349. Yan, H., Kermouni, A., Abdel-Hafez, M., and Lau, D.C. (2003) Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J.Lipid Res.* 44, 424-429
350. Chu, X., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. (2010) Up-regulation of adipogenesis in adipocytes expressing stably cyclooxygenase-2 in the antisense direction. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91, 1-9
351. Fajas, L., Miard, S., Briggs, M.R., and Auwerx, J. (2003) Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors impair adipocyte differentiation through inhibition of the clonal expansion phase. *J.Lipid Res.* 44, 1652-1659
352. Tang, Q.Q., and Lane, M.D. (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu.Rev.Biochem.* 81, 715-736
353. Reginato, M.J., Krakow, S.L., Bailey, S.T., and Lazar, M.A. (1998) Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J.Biol.Chem.* 273, 1855-1858
354. Hotamisligil, G.S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444, 860-867
355. Pickup, J.C. (2004) Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 27, 813-823
356. Perez-Chacon, G., Astudillo, A.M., Balgoma, D., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2009) Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim.Biophys.Acta.* 1791, 1103-1113
357. Astudillo, A.M., Balgoma, D., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2012) Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 1821, 249-256
358. Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., and Kokotos, G. (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem.Rev.* 111, 6130-6185

359. Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Lambeau, G., Singer, A., Gelb, M.H., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H., and Kudo, I. (2002) Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A(2). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 292, 689-696
360. Murakami, M., and Kudo, I. (2003) New phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 14, 431-436
361. Webb, N.R. (2005) Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis. *Curr.Opin.Lipidol.* 16, 341-344
362. Rosengren, B., Jonsson-Rylander, A.C., Peilot, H., Camejo, G., and Hurt-Camejo, E. (2006) Distinctiveness of secretory phospholipase A2 group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis. *Biochim.Biophys.Acta.* 1761, 1301-1308
363. Menschikowski, M., Hagelgans, A., and Siegert, G. (2006) Secretory phospholipase A2 of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases?. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 79, 1-33
364. Kimura-Matsumoto, M., Ishikawa, Y., Komiyama, K., Tsuruta, T., Murakami, M., Masuda, S., Akasaka, Y., Ito, K., Ishiguro, S., Morita, H., Sato, S., and Ishii, T. (2008) Expression of secretory phospholipase A2s in human atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 196, 81-91
365. Rocha, V.Z., and Libby, P. (2009) Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat.Rev.Cardiol.* 6, 399-409
366. Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R.W., and Shayman, J.A. (2006) Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol.Cell.Biol.* 26, 6139-6148
367. Sagne, C., and Gasnier, B. (2008) Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *J.Inherit.Metab.Dis.* 31, 258-266
368. Woloszynek, J.C., Coleman, T., Semenkovich, C.F., and Sands, M.S. (2007) Lysosomal dysfunction results in altered energy balance. *J.Biol.Chem.* 282, 35765-35771
369. Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 458, 1131-1135
370. Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006) Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J.Biol.Chem.* 281, 40236-40241
371. Dolan-O'keefe, M., and Nick, H.S. (1999) Inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 expression by glucocorticoids in rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 116, 855-864
372. Kol, S., Ben-Shlomo, I., Payne, D.W., Ando, M., Rohan, R.M., and Adashi, E.Y. (1998) Glucocorticoids suppress basal (but not interleukin-1-supported) ovarian phospholipase A2 activity: evidence for glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol.Cell.Endocrinol.* 137, 117-125
373. Hoeck, W.G., Ramesha, C.S., Chang, D.J., Fan, N., and Heller, R.A. (1993) Cytoplasmic phospholipase A2 activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 4475-4479
374. Channon, J.Y., and Leslie, C.C. (1990) A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J.Biol.Chem.* 265, 5409-5413
375. Herbert, S.P., Ponnambalam, S., and Walker, J.H. (2005) Cytosolic phospholipase A2-alpha mediates endothelial cell proliferation and is inactivated by association with the Golgi apparatus. *Mol.Biol.Cell.* 16, 3800-3809

376. Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2007) Prostaglandin E receptors. *J.Biol.Chem.* 282, 11613-11617
377. Desdouets, C., Matesic, G., Molina, C.A., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P., Brechot, C., and Sobczak-Thepot, J. (1995) Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol.Cell.Biol.* 15, 3301-3309
378. Sanchez, T., and Moreno, J.J. (2002) Role of EP(1) and EP(4) PGE(2) subtype receptors in serum-induced 3T6 fibroblast cycle progression and proliferation. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 282, C280-8
379. Zhang, P., O'Loughlin, L., Brindley, D.N., and Reue, K. (2008) Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis. *J.Lipid Res.* 49, 1519-1528
380. Manmontri, B., Sariahmetoglu, M., Donkor, J., Bou Khalil, M., Sundaram, M., Yao, Z., Reue, K., Lehner, R., and Brindley, D.N. (2008) Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin acts antagonistically. *J.Lipid Res.* 49, 1056-1067
381. Reue, K., and Brindley, D.N. (2008) Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J.Lipid Res.* 49, 2493-2503
382. Xie, W., Fletcher, B.S., Andersen, R.D., and Herschman, H.R. (1994) v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element. *Mol.Cell.Biol.* 14, 6531-6539
383. Miller, C.W., Casimir, D.A., and Ntambi, J.M. (1996) The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2alpha. *Endocrinology.* 137, 5641-5650
384. Madsen, L., Pedersen, L.M., Liaset, B., Ma, T., Petersen, R.K., van den Berg, S., Pan, J., Muller-Decker, K., Dulsner, E.D., Kleemann, R., Kooistra, T., Dorskeland, S.O., and Kristiansen, K. (2008) cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids. *J.Biol.Chem.* 283, 7196-7205
385. Petersen, R.K., Jorgensen, C., Rustan, A.C., Froyland, L., Muller-Decker, K., Furstenberger, G., Berge, R.K., Kristiansen, K., and Madsen, L. (2003) Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases. *J.Lipid Res.* 44, 2320-2330
386. Moon, Y.S., Smas, C.M., Lee, K., Villena, J.A., Kim, K.H., Yun, E.J., and Sul, H.S. (2002) Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol.Cell.Biol.* 22, 5585-5592
387. Lee, K., Villena, J.A., Moon, Y.S., Kim, K.H., Lee, S., Kang, C., and Sul, H.S. (2003) Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J.Clin.Invest.* 111, 453-461
388. Poli, V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J.Biol.Chem.* 273, 29279-29282
389. Rahman, S.M., Janssen, R.C., Choudhury, M., Baquero, K.C., Aikens, R.M., de la Houssaye, B.A., and Friedman, J.E. (2012) CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice. *J.Biol.Chem.* 287, 34349-34360
390. Ge, K. (2012) Epigenetic regulation of adipogenesis by histone methylation. *Biochim.Biophys.Acta.* 1819, 727-732
391. Venza, I., Visalli, M., Fortunato, C., Ruggeri, M., Ratone, S., Caffo, M., Caruso, G., Alafaci, C., Tomasello, F., Teti, D., and Venza, M. (2012) PGE2 induces interleukin-8 derepression in human astrocytoma through coordinated DNA demethylation and histone hyperacetylation. *Epigenetics.* 7, 1315-1330

392. Hsieh, P.S., Jin, J.S., Chiang, C.F., Chan, P.C., Chen, C.H., and Shih, K.C. (2009) COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity (Silver Spring)*. 17, 1150-1157
393. Wallenius, V., Wallenius, K., Ahren, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S.L., Ohlsson, C., and Jansson, J.O. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat.Med.* 8, 75-79
394. Franckhauser, S., Elias, I., Rotter Sopasakis, V., Ferre, T., Nagaev, I., Andersson, C.X., Agudo, J., Ruberte, J., Bosch, F., and Smith, U. (2008) Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia*. 51, 1306-1316
395. Hadad, N., Tuval, L., Elgazar-Carmom, V., Levy, R., and Levy, R. (2011) Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A2alpha via both NF-kappaB and CREB transcription factors. *J.Immunol.* 186, 1816-1827
396. Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. (2008) Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J.Lipid Res.* 49, 1894-1903
397. Roytblat, L., Rachinsky, M., Fisher, A., Greemberg, L., Shapira, Y., Douvdevani, A., and Gelman, S. (2000) Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes.Res.* 8, 673-675
398. Vozarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P.A., Bogardus, C., and Pratley, R.E. (2001) Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes.Res.* 9, 414-417
399. Bastard, J.P., Maachi, M., Van Nhieu, J.T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J.J., Capeau, J., and Hainque, B. (2002) Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 87, 2084-2089
400. Carey, A.L., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Thomas, W.G., Holmes, A.G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M.J., James, D.E., Kemp, B.E., Pedersen, B.K., and Febbraio, M.A. (2006) Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 55, 2688-2697
401. Wolsk, E., Mygind, H., Grondahl, T.S., Pedersen, B.K., and van Hall, G. (2010) IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 299, E832-40
402. Ghoshal, S., Trivedi, D.B., Graf, G.A., and Loftin, C.D. (2011) Cyclooxygenase-2 deficiency attenuates adipose tissue differentiation and inflammation in mice. *J.Biol.Chem.* 286, 889-898
403. Sears, D.D., Miles, P.D., Chapman, J., Ofrecio, J.M., Almazan, F., Thapar, D., and Miller, Y.I. (2009) 12/15-Lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *PLoS One*. 4, e7250
404. Horrillo, R., Gonzalez-Periz, A., Martinez-Clemente, M., Lopez-Parra, M., Ferre, N., Titos, E., Moran-Salvador, E., Deulofeu, R., Arroyo, V., and Claria, J. (2010) 5-Lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J.Immunol.* 184, 3978-3987



**THE EICOSANOID
RESEARCH DIVISION**
VALLADOLID