

# Regulación de la respuesta inmune innata por fosfolipasas A<sub>2</sub>

Jesús Balsinde

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

July 16, 2021

**Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan enlaces éster de los fosfolípidos de membrana. Como consecuencia de estas reacciones se genera una gran variedad de productos lipídicos que controlan un gran número de rutas de señalización celular. Las fosfolipasas de tipo A<sub>2</sub> son enzimas clave en este sentido debido a su capacidad de generar ácidos grasos poliinsaturados libres, que son precursores de diversas familias de compuestos con importantes funciones reguladoras de las reacciones de inmunidad innata e inflamación. Las células fagocíticas expresan múltiples formas de fosfolipasa A<sub>2</sub>, lo que ha suscitado un gran interés en determinar sus funciones fisiológicas y fisiopatológicas de cada una de ellas. Sobre la base de similitudes bioquímicas y estructurales, las fosfolipasas A<sub>2</sub> se agrupan en seis grandes familias. Tres de ellas han sido las más estudiadas en relación con su participación en procesos de señalización celular y producción de mediadores lipídicos: las fosfolipasas A<sub>2</sub> citosólicas dependientes de calcio, las enzimas secretadas y las citosólicas independientes de calcio. Nuestros estudios describen la participación de estos tres tipos de fosfolipasa A<sub>2</sub> durante la ejecución de respuestas inmunes innatas, con énfasis en la regulación de procesos que implican remodelación de membranas (fagocitosis, formación de gotas lipídicas) y la producción de nuevos mediadores lipídicos de la inflamación.**

*Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Universidad de Buenos Aires, viernes 3 diciembre 2021 ([Slide 1](#)).*

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> son hidrolasas que actúan específicamente sobre el enlace éster presente en la posición sn-2 del esqueleto de glicerol del fosfolípido ([Slide 2 – Phospholipase A<sub>2</sub> Action on Phospholipids](#)). La reacción da lugar a un lisofosfolípido y un ácido graso libre, los cuales son ambos biológicamente activos. Pues bien, esta reacción es de gran importancia biológica, porque tiene consecuencias para un gran número de procesos y funciones celulares ([Slide 3 – Importance of Phospholipid Hydrolysis by Phospholipase A<sub>2</sub>](#)). Por ejemplo, es una reacción que sirve para generar diversidad molecular; la fosfolipasa A<sub>2</sub> elimina un resto acilo, permitiendo que entre otro en su lugar a través de aciltransferasas específicas; esto es lo que se conoce como el ciclo de Lands y permite enriquecer las células con determinadas clases de ácidos grasos, lo que influye en sus propiedades biofísicas tales como la fluidez, etc. También, la fosfolipasa A<sub>2</sub> genera lisofosfolípidos cuya acumulación influye en la curvatura de una membrana, lo que es muy importante para la biogénesis de orgánulos tales como las gotas lipídicas, como veremos en un momento. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> también ayudan en procesos de reparación, porque eliminan restos de ácidos grasos oxidados o truncados. Y por último, la función que haya hecho posiblemente más famosa a estas enzimas: las fosfolipasas A<sub>2</sub> son las principales responsables de movilizar ácidos grasos poliinsaturados para la síntesis de eicosanoides y derivados de ácidos grasos omega-3 como las resolvinas, protectinas, etc, con papeles clave en inflamación.

La actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> está muy presente en biología; se calcula que la naturaleza ha producido más de 30 proteínas diferentes con esta actividad; seguramente haya muchas más aún por determinar. Tal variedad hizo necesario establecer una clasificación de estas enzimas ([Slide 4 – Phospholipase A<sub>2</sub> Classification](#)). El problema es que la clasificación, digamos más sistemática, es muy confusa y nada informativa porque no obedece a criterios funcionales o estructurales sino solo de orden cronológico; se fueron colocando en grupos según se fueron

describiendo o descubriendo. Así, la primera es la fosfolipasa de grupo I, presente en el veneno de cobras y en mamíferos en el páncreas. La segunda, la de grupo II, muy parecida estructuralmente a la primera aunque claramente diferente, es la enzima presente en el veneno de serpientes de cascabel y en humanos en el líquido sinovial. La tercera, grupo III, en el veneno de abejas y escorpiones. Y así sucesivamente hasta llegar a 16 grupos (**Slide 5 – Phospholipase A<sub>2</sub> Classification**) (**Slide 6 – Phospholipase A<sub>2</sub> Classification**). Debe hacerse notar que hay descritas algunas proteínas que poseen claramente actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> y que no se incluyen en esta clasificación por grupos unas veces porque cuando se describieron se desconocían que poseyeran esta actividad, otras porque la actividad es residual comparada con otras actividades de la misma proteína y, en fin, otras veces no se sabe muy bien por qué. En todo caso solo quiero destacar de esta clasificación las enzimas de los grupos IV, V y VI porque son con las que trabajamos y de las que voy a hablar a continuación.

Claro, esta clasificación por grupos es muy poco útil y por ello surgió otra clasificación alternativa, basada en similitudes bioquímicas por tanto mucho más práctica (**Slide 7 – Phospholipase A<sub>2</sub> Classification**). De acuerdo con esta clasificación, las fosfolipasas A<sub>2</sub> se agrupan en 6 grandes familias, a saber (empiezo por aquí siguiendo las agujas del reloj): las sPLA<sub>2</sub> o enzimas secretadas dependientes de calcio, todas ellas de bajo peso molecular, que incluyen los grupos I, II, III, V, IX, X, XI-XIV de la otra clasificación; todas ellas usan un mecanismo común de catálisis utilizando la diada His/Asp; las cPLA<sub>2</sub> o enzimas citosólicas dependientes de calcio, de alto peso molecular y que utilizan la diada catalítica Ser/Asp; las iPLA<sub>2</sub> enzimas citosólicas independientes de calcio, de alto peso molecular y que utilizan la diada catalítica Ser/Asp; las enzimas PAF-AH, cuya característica común es que hidrolizan específicamente PAF y usan la clásica tríada catalítica Ser/His/Asp; las L-PLA<sub>2</sub> o enzimas específicas de lisosomas y las adPLA<sub>2</sub> o enzimas específicas de tejido adiposo. Nuevamente mencionar aquí las tres fosfolipasas A<sub>2</sub> de las que voy a hablar a continuación: sPLA<sub>2</sub> (V), cPLA<sub>2</sub> (IV) e iPLA<sub>2</sub> (VI).

En esta figura os presento la célula con la que trabajamos fundamentalmente en el laboratorio, el macrófago humano. Esta célula tiene muchas ventajas para trabajar con ella, como por ejemplo que es muy grande, tiene un metabolismo lipídico muy activo, y se transfecta bastante bien, lo que nos proporciona un modelo útil de una célula humana primaria para estudiar las respuestas de activación a largo plazo (**Slide 8 – Human Blood Monocyte-Derived Macrophages**). La figura muestra un macrófago humano derivado de monocitos, teñido en azul con una proteína del metabolismo lipídico llamada lipina-1, de la que no voy a hablar hoy, que se localiza en la superficie de estas enormes formaciones citoplásmicas en morado que tienden a distribuirse en la periferia de las células. Estas formaciones son gotitas de lípidos y, como puede verse, los macrófagos tienen muchas de ellas. De esto hablaremos en un momento. Un aspecto muy importante de estas células es que a nivel de mRNA expresan al menos 15 formas de fosfolipasa A<sub>2</sub>. (**Slide 9 – Phospholipase A<sub>2</sub> Expression in Human Macrophages**). Esto, aparte de complicar las cosas, plantea preguntas muy interesantes: por qué o para qué tantas? Realizan funciones específicas todas y cada una de ellas o varias de ellas son redundantes? Bien, de todo esto vamos a hablar a continuación. Una vez más recuerdo los nombres de las tres fosfolipasas A<sub>2</sub> de las que vamos a hablar, cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , sPLA<sub>2</sub>-V y iPLA<sub>2</sub> $\beta$  (**Slide 10 – Three PLA<sub>2</sub>s**).

Comenzamos con la primera, la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  y nuestros estudios sobre su participación en señalización y formación de gotas lipídicas (**Slide 11 – cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , Lipid Signaling and Lipid Droplets**). Bien, en primer lugar vamos a hablar de la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  (**Slide 12 – Group IVA Phospholipase A<sub>2</sub>**). Esta es una enzima con la que, por unas razones u otras, llevo toda la vida trabajando, así que nos conocemos bastante bien. Se trata de una enzima muy interesante porque tiene un poquito de todo y eso la hace muy atractiva desde muchos puntos de vista. La enzima tiene dos dominios, a la izquierda hay un dominio C2 en naranja, que es un dominio de unión de calcio y lípidos, similar al existente en numerosísimas proteínas, las PKCs son un claro ejemplo, y a la derecha el dominio catalítico con estructura en forma de  $\alpha/\beta$  hidrolasa, característico de muchas hidrolasas, 8 láminas  $\beta$  conectadas por 6 hélices  $\alpha$ . Esta enzima tiene sin embargo un dominio estructural que la hace única: la presencia de un tapa doble que protege al centro activo. No se conoce ninguna otra hidrolasa que tenga un mecanismo de tapa similar. En condiciones de reposo, esta enzima es soluble, se halla en el citosol. Cuando ocurre la activación celular, el Ca<sup>2+</sup> libre citosólico aumenta, lo que hace que la enzima transloque a membranas gracias al dominio C2. Estos dos puntos violeta representan

los dos átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  que se precisan para la translocación. Dicha translocación puede ser fortalecida e incluso puede también ocurrir en condiciones de ausencia de elevaciones de calcio debido en la presencia en la proteínas de dos clusters de unión a lípidos aniónicos, uno a C1P y el otro a PIP<sub>2</sub>. Bien, una vez que la enzima ha translocado, el dominio catalítico entra en contacto con el sustrato y lo hace abriendo la primera tapa, que son estas dos hélices  $\alpha$ . Una vez ha ocurrido esto, la segunda tapa, en morado, se retira también, dejando al descubierto el pocket con los aminoácidos catalíticos. Una gran mayoría de hidrolasas usan la triada Ser/Asp/His para la catálisis; la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  usa Ser/Asp asistidos por Arg. Y por último, la tercera gran característica única de esta enzima es que presenta una enorme predilección por fosfolípidos con AA, lo que no ocurre con ninguna otra lipasa. Esta gran predilección es consecuencia de su sitio activo tan particular que solo acomoda bien residuos poliinsaturados en configuración cis. Es importante enfatizar que esto no significa que la enzima no pueda hidrolizar los fosfolípidos sin AA; lo hará, pero un ritmo mucho más lento. Finalmente, otra característica importante de esta enzima es que se fosforila en Ser505, que se indica con este punto azul celeste en la figura. Esta fosforilación es necesaria para que la enzima muestre actividad plena, y es llevada a cabo por miembros de la familia MAPK, ERK, p38 y JNK y parece ser muy importante no tanto para aumentar la actividad enzimática como para mantener una configuración óptimamente activa que le permita translocarse a la membrana en cuestión. Dependiendo del tipo de la célula y del estímulo el MAPK implicado varía.

Estudios con quimeras de GFP han demostrado que la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  transloca de manera muy notoria a membranas perinucleares (**Slide 13 – Translocation of cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  to Perinuclear Membranes**), pero estudios más exhaustivos y cuidadosos han mostrado que también se puede translocar a otras membranas. Por ejemplo, en células fagocíticas, la enzima se transloca al fagosoma, como veremos posteriormente, pero en este caso me interesa enfatizar que se transloca a las gotas lipídicas. Estos no son datos nuestros (**Slide 14 – Translocation of cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  to Lipid Droplets**).

Si echamos un vistazo de cerca a una de estas gotitas de lípidos, lo que vemos es algo como esto (**Slide 15 – Lipid Droplets**): una monocapa de fosfolípidos decorada con una variedad de proteínas y dentro de un núcleo hidrofóbico compuesto por triglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol (CE). Durante muchos años estas gotas de lípidos se consideraron únicamente como orgánulos inertes de almacenamiento de lípidos neutros para ser movilizados en caso de necesidad energética. Pero hoy sabemos que, además de ese papel de almacenamiento, las gotas de lípidos cumplen papeles de gran relevancia. En primer lugar, actuando como plataformas en las que un gran número de enzimas señaladoras del metabolismo lipídico pueden encontrarse e interactuar y, en segundo lugar, se ha visto que las gotas lipídicas tienen una participación fundamental en el desarrollo y progresión de enfermedades metabólicas con base inflamatoria, de las cuales la más frecuente es la enfermedad cardiovascular.

Bien para comenzar a estudiar el papel de la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  en la formación de gotas lipídicas hicimos uso de células deficientes en la enzima por siRNA y medimos la formación de gotas lipídicas por citometría de flujo (**Slide 16 – cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  Depletion Blocks Lipid Droplet Formation**). Las células se trataron con AA que, aparte de moverse a los lípidos neutros, también induce señalización activa. Después se tiñeron con Bodipy para detectar las gotas lipídicas y la fluorescencia se midió por citometría de flujo. Este desplazamiento a la derecha de la fluorescencia de las células tratadas con AA indica la formación de gotas lipídicas. Sin embargo, al eliminar la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  por siRNA este desplazamiento de la fluorescencia no se observa, indicando que no se forman gotas. Así pues, la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  es claramente necesaria para que las células acumulen gotas lipídicas en respuesta a AA. Como acabo de comentar, en este sistema el AA funciona como un estímulo, es decir, activa rutas de señalización, como puede verse en esta figura, donde el AA activa las MAP quinasas p38, JNK (**Slide 17 – Arachidonic Acid Activates MAP Kinases in Human Macrophages**). No vimos efecto en ERK, por eso no se muestra. Como también comenté anteriormente, la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  se fosforila por los miembros de la familia MAPK y esta fosforilación es necesaria para que la enzima exprese su actividad plena. El AA induce la fosforilación de cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  y esta fosforilación es inhibida en parte por inhibidores de p38 y JNK pero no de ERK (**Slide 18 – Phosphorylation of cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  by Both p38 and JNK**). Es importante notar que cuando los inhibidores de p38 y JNK se añaden juntos, la fosforilación de cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  se inhibe muy fuertemente, incluso por debajo del basal, sugiriendo una actuación conjunta de las dos quinasas. Y cómo se relacionan todo estos datos de fosforilación e inhibidores con la formación de gotas lipídicas? (**Slide**

**19 – cPLA<sub>2</sub>α Inhibition Blocks Lipid Droplet Formation**). Aquí tenemos las células con sus núcleos teñidos de azul con DAPI y en verde las gotas formadas tras estimulación con AA. En presencia del inhibidor de cPLA<sub>2</sub>α pirrofenona, la formación de gotas se inhibe de manera clara, como era de esperar. Esto es idéntico a lo que vimos hace un momento usando citometría de flujo y siRNA. Y con respecto a los inhibidores de MAP quinasas, vemos aquí a la derecha que, si usamos el inhibidor de p38 no sucede mucho, las células todavía producen un número significativo de gotas lipídicas. Lo mismo ocurre si usamos el inhibidor de JNK. Sin embargo, si utilizamos ambos al mismo tiempo, se observa una inhibición muy fuerte de la formación de gotas lipídicas. Así, las mismas condiciones que bloquean la fosforilación/activación de cPLA<sub>2</sub>α conducen a la inhibición de la formación de gotitas lipídicas. Es decir para que se inhiba la formación de gotas, hace falta inhibir JNK y p38 simultáneamente, justo igual que para inhibir la fosforilación de cPLA<sub>2</sub>α (**Slide 19 – cPLA<sub>2</sub>α Inhibition Blocks Lipid Droplet Formation**). Entonces, como resumen de estos datos, mostramos este modelo (**Slide 20 – Simultaneous Activation of p38 and JNK by AA Stimulates cPLA<sub>2</sub>α**), donde AA activa p38 y JNK (pero no ERK) y estas dos quinasas fosforilan cPLA<sub>2</sub>α para activarla, de modo que la enzima regula la síntesis de gotas lipídicas. Estos datos son novedosos en tanto que indican que son dos MAP quinasas distintas las que activan cPLA<sub>2</sub>α y no una, como se tiende a pensar habitualmente. Dos puntos importantes a tener en cuenta aquí. Es posible que p38 y JNK actúen sobre la cPLA<sub>2</sub>α simultánea pero independientemente; sin embargo, ya que ambas quinasas fosforilan la enzima en el mismo residuo, eso parece un poco raro, y nos lleva a pensar que tal vez haya una quinasa intermedia que se activa tanto por p38 y JNK. Esta quinasa sería la que directamente fosforila la cPLA<sub>2</sub>α. Esta es una hipótesis en la que estamos trabajando actualmente así como verificar si esto podría tener algo que ver con la translocación de esta enzima a la superficie de la gota. En segundo lugar, cómo exactamente media la cPLA<sub>2</sub>α la formación de gotas lipídicas? La respuesta es que no lo sabemos. Sí sabemos, sin embargo, que la enzima no regula la síntesis de lípidos neutros, como se muestra en esta diapositiva, donde la inhibición de cPLA<sub>2</sub>α con pirrofenona no modifica la producción de TAG en respuesta a AA (**Slide 21 – cPLA<sub>2</sub>α Does Not Regulate Neutral Lipid Synthesis**). Por tanto es posible que la enzima participe en alguna etapa crítica de la formación del orgánulo propiamente dicho.

DGAT y ACAT, las enzimas terminales para la biosíntesis de TAG y CE, respectivamente, se distribuyen homogéneamente a lo largo del retículo endoplásmico y son capaces de sintetizar una gran cantidad de lípidos neutros en respuesta a diversas situaciones tales como sobrecarga externa de lípido, estrés de retículo endoplásmico o activación celular (**Slide 22a – Essential Role of cPLA<sub>2</sub>α in Inducing Positive Membrane Curvature**). Inicialmente, los lípidos neutros que se forman se acomodan en el espacio hidrofóbico entre las dos hemicapas del retículo endoplásmico hasta un punto donde las dos hemicapas comienzan a separarse (**Slide 22b – Essential Role of cPLA<sub>2</sub>α in Inducing Positive Membrane Curvature**). La gotita de lípido naciente necesita una curvatura local positiva de la membrana en la base de la membrana del retículo endoplásmico para crecer. La acumulación de lisofosfolípidos, que tienen una conformación en forma de la cuña (en rosa en la diapositiva), genera una curvatura local de la membrana positiva, que permite a la gota brotar (**Slide 22c – Essential Role of cPLA<sub>2</sub>α in Inducing Positive Membrane Curvature**). Puesto que los lisofosfolípidos son generados por fosfolipasas A<sub>2</sub>, el papel clave de cPLA<sub>2</sub>α en este proceso podría explicarse fácilmente. Una vez que se genera la curvatura positiva requerida en la línea de base de la gotita del lípido, más lípidos neutros se pueden acomodar dentro de la monocapa del fosfolípido, lo que se acompaña de nueva síntesis y remodelación de los fosfolípidos de la membrana para mantener el proceso. Las moléculas de fosfatidilcolina en la superficie de la gotita del lípido se enriquecen particularmente en los ácidos grasos monosaturados, lo que no ocurre con las moléculas en el retículo endoplásmico (**Slide 23d – Essential Role of cPLA<sub>2</sub>α in Inducing Positive Membrane Curvature**). Una vez que la gota lipídica sobresale claramente de la membrana del retículo endoplásmico, se necesita la conversión de lisofosfolípidos cónicos en fosfolípidos cilíndricos, para establecer una curvatura neutra que confiera estabilidad y proteja el núcleo hidrofóbico de lipólisis (**Slide 23e – Essential Role of cPLA<sub>2</sub>α in Inducing Positive Membrane Curvature**). Finalmente, antes de que la gotita del lípido se forme completamente, se requiere una curvatura negativa local en la línea de fondo de la membrana del retículo endoplásmico. Esto es promovido por la acumulación de ácido fosfatídico (en color verde en la diapositiva), que induce una curvatura negativa fuerte

espontánea. El ácido fosfatídico se cree que se genera principalmente por fosfolipasa D (**Slide 23f – Essential Role of cPLA<sub>2</sub>α in Inducing Positive Membrane Curvature**).

La idea general detrás de todo esto es que debe haber una relación íntima entre cPLA<sub>2</sub>α y la estructura del retículo endoplásmico durante el proceso de desarrollo de la gota que se establece a través de la relación fosfolípido a lisofosfolípido. En apoyo de esta hipótesis tenemos algunas evidencias experimentales de que cPLA<sub>2</sub>α puede efectivamente regular la estructura del retículo endoplásmico. Se trata de un experimento de microscopía electrónica realizado en el laboratorio de nuestro colaborador Enrique Claro de la Universitat Autònoma de Barcelona (**Slide 24 – Inhibition of cPLA<sub>2</sub>α Alters the Endoplasmic Reticulum Structure**). Se puede ver que las células control han sido activadas para generar gotitas de lípidos y la estructura del retículo endoplasmático parece completamente normal. Sin embargo, si utilizamos células deficientes en cPLA<sub>2</sub>α, no solo no se observan gotitas lipídicas, sino que hay, siempre según el individuo del servicio de microscopía electrónica, muestras claras de estructuras tubulovesicular anormales en el retículo endoplásmico compatible con una composición fosfolipídica aberrante. Por tanto, como conclusión de esta parte podemos decir que la cPLA<sub>2</sub>α es algo más que una enzima señalizadora que regula la cascada de síntesis de eicosanoides sino que participa en otras funciones celulares aparentemente muy distintas, como son los procesos de regulación de la homeostasis de membrana a través de la modulación del ratio fosfolípido:lisofosfolípido (**Slide 25 – cPLA<sub>2</sub>α Participates in Other Cellular Functions...**)

Bien, pasamos ahora a hablar un poco de la enzima secretada sPLA<sub>2</sub>-V (**Slide 26 – sPLA<sub>2</sub>-V, Macrophage Polarization and Phagocytosis**). Todas las enzimas secretadas se parecen mucho unas a otras aunque también poseen detalles característicos específicos que las diferencian y que les dotan de funciones específicas dentro de las células. Aspecto muy importante: aunque se llamen secretadas, estas enzimas pueden funcionar, de hecho lo hacen, dentro de las células. Nosotros hemos trabajado mucho con una de ellas, la de grupo V, cuya característica estructural más acusada es que carece de los puentes disulfuro que son característicos de las enzimas secretadas más comunes, las de los grupos I y II, digestivas y sinoviales y de venenos de serpiente. Esta figura muestra la estructura tridimensional de la enzima (**Slide 27 – Group V Secreted Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-V)**). De bajo peso molecular y aspecto muy compacto, necesitan niveles milimolares de calcio para la catálisis (bola magenta) y utiliza una diada His/Asp. Nótese por último que la enzima ataca al fosfolípido desde la cabeza polar, es decir no ve el ácido graso que va a cortar y esto explica por qué estas enzimas no muestran prácticamente especificidad por lo que respecta al ácido graso. Sí la muestran algo con respecto a la cabeza polar; por ejemplo la de grupo V que nos ocupa ataca mal fosfatidilcolina porque en la zona de interacción con el fosfolípido la enzima presenta aminoácidos hidrofóbicos que no se llevan bien con la carga positiva de la colina.

Dependiendo del entorno, los macrófagos pueden encontrarse en dos estados diferentes de activación, lo que se denomina polarización (**Slide 28 – Polarized Activation of Macrophages**). Por un lado está la respuesta clásica o M1, que lleva a los macrófagos a adquirir un fenotipo proinflamatorio y se desencadena por estímulos como LPS o IFN $\gamma$  y conduce a la secreción de citoquinas proinflamatorias como las indicadas en la figura; y por otro lado está la M2 o respuesta alternativa, antiinflamatoria, pro-resolutiva, IL-4 es el estímulo típico y finalmente conduce a la regulación positiva de genes antiinflamatorios como IL-10, TGF $\alpha$  o ARG-1 entre otros. Bien, pues lo primero que se nos ocurrió fue pensar en que pasaría con la expresión de las fosfolipasas A<sub>2</sub> de los macrófagos bajo condiciones de polarización. Entonces, estimulamos las células con LPS + IFN $\gamma$  para obtener macrófagos M1 e IL-4 para obtener macrófagos M2 (**Slide 29 – Expression of PLA<sub>2</sub>s During Human Macrophage Polarization**) y después analizamos por qPCR la expresión de los diferentes genes. Y lo que nos encontramos fue algo inesperado. Solo una fosfolipasa A<sub>2</sub> varió significativamente, la sPLA<sub>2</sub>-V, y lo hizo en condiciones M2, no M1 como se preveía en la idea de que esta sPLA<sub>2</sub>-V es pro-inflamatoria. Estos datos sugieren que no es el caso y es algo que otros autores también vieron de modo independiente. La sPLA<sub>2</sub>-V no es pues una enzima que participe en condiciones pro-inflamatorias, sino anti-inflamatorias. Se comprobó por inmunoblot que la inducción del gen de sPLA<sub>2</sub>-V conduce a un incremento dependiente del tiempo de la proteína (**Slide 30 – Induction of sPLA<sub>2</sub>-V Protein During Macrophage Activation by IL-4**). Para verificar si esta inducción es algo particular de la IL-4 o es un rasgo

general de la polarización a M2, probamos a continuación otros estímulos que también polarizan a M2, como son el C-MSF y la IL-10 (**Slide 31 – Induction of sPLA<sub>2</sub>-V Protein by Other M2 Stimuli**). En ambos casos, la sPLA<sub>2</sub>-V incrementó de forma bastante clara, lo que indica que la sPLA<sub>2</sub>-V es realmente un buen marcador del estado de activación M2.

Cuáles son las consecuencias funcionales de este incremento de sPLA<sub>2</sub>-V inducido por IL-4? Una de las características funcionales más evidentes de los macrófagos polarizados a M2 es el incremento de su capacidad fagocítica. Por tanto, analizamos la capacidad de estas células para fagocitar zimosán, que es un homogeneizado de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de sPLA<sub>2</sub>-V (**Slide 32 – sPLA<sub>2</sub>-V Depletion Inhibits IL-4-Stimulated Zymosan Phagocytosis**). Como puede verse en la diapositiva, las células tratadas con IL-4 fagocitan mucho más zimosán que las células sin tratar. Cuando se usaron células deficientes en sPLA<sub>2</sub>-V, dicho incremento no se observa. En la siguiente diapositiva se muestra el experimento contrario, el efecto de sobreexpresar la sPLA<sub>2</sub>-V sobre la capacidad fagocítica de las células (**Slide 33 – sPLA<sub>2</sub>-V Overexpression Increases Zymosan Phagocytosis**). Puede apreciarse que, simplemente sobreexpresando la enzima, la capacidad fagocítica de las células incrementa tanto como si las células se hubieran tratado con IL-4, haciendo pues innecesario el tratamiento con IL-4 para observar el mismo nivel de respuesta.

Lógicamente, la sPLA<sub>2</sub>-V es una enzima y por tanto, la pregunta obvia siguiente es si esos incrementos de la capacidad fagocítica de las células están relacionados con cambios en el contenido fosfolipídico de las células (**Slide 34 – Do these effects correlate with changes in phospholipid content?**). Para responder a esta pregunta procedimos a analizar el contenido fosfolipídico de estas células mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Utilizamos células deficientes en sPLA<sub>2</sub>-V por siRNA. La siguiente diapositiva muestra el contenido celular de las especies mayoritarias de PC (**Slide 35 – Phosphatidylcholine (PC) Species in IL-4-Treated Human Macrophages**) en células tratado o no con IL-4 y con niveles normales o reducidos de sPLA<sub>2</sub>-V. En ningún caso pudimos apreciar ninguna diferencia significativa. Tampoco observamos nada apreciable cuando analizamos fosfolípidos de etanolamina (**Slide 36 – Phosphatidylethanolamine (PE) Species in IL-4-Treated Human Macrophages**) o de inositol (**Slide 37 – Phosphatidylinositol (PI) Species in IL-4-Treated Human Macrophages**). Ya dije anteriormente que estas células son muy grandes y tienen una enorme cantidad de lípidos; por tanto si la respuesta a IL-4 no es muy extensa el efecto se vería apantallado por la gran cantidad de lípido presente. Finalmente se nos ocurrió mirar el contenido celular en lisofosfolípidos, que son un producto directo de la acción de la sPLA<sub>2</sub>-V y además su contenido celular es necesariamente menor (**Slide 38 – Lysophospholipid Species in IL-4-Treated Human Macrophages**). De nuevo, no se observaron hay diferencias entre las células tratadas con IL-4 frente a las control; sin embargo, cuando examinamos las células deficientes en sPLA<sub>2</sub>-V se observó un cambio muy llamativo, resaltado por las flechas rojas. Los niveles de todas las especies de lisoPE disminuyeron significativamente. Téngase en cuenta que la disminución de los niveles de lisoPE se observa en las células tratadas con IL-4, pero no en las células no tratadas, lo que indica que esta bajada está relacionada con el estado de activación de la célula. En otras palabras, en las células tratadas con IL-4 la sPLA<sub>2</sub>-V es necesaria para mantener los niveles de lisoPE (**Slide 39 – LysoPE levels are maintained by sPLA<sub>2</sub>-V in IL-4-treated cells**). Entonces, ¿cuál es la consecuencia biológica de este hallazgo? Para responder a esto volvimos a nuestro ensayo de fagocitosis y lo que tratamos de determinar fue si la adición de lisoPE exógeno tiene algún efecto sobre la fagocitosis (**Slide 40 – LPE Restores Phagocytosis in sPLA<sub>2</sub>-V-Deficient Cells - Zymosan**). Igual que antes, la IL-4 aumentó la fagocitosis de las partículas de zimosán y la presencia de lisoPE no mostró ningún efecto significativo. Pero, ¿qué sucede si usamos células deficientes en sPLA<sub>2</sub>-V? (**Slide 41 – LPE Restores Phagocytosis in sPLA<sub>2</sub>-V-Deficient Cells - Zymosan**). La respuesta de IL-4 se inhibe y la adición de lisoPE restaura casi por completo la respuesta, por lo que lisoPE sustituye a sPLA<sub>2</sub>-V en estas condiciones. Este experimento se repitió usando esta vez bacterias vivas, *E. coli*, como estímulo fagocítico, y los resultados fueron los mismos, es decir, lisoPE restauró el efecto IL-4 en células deficientes en sPLA<sub>2</sub>-V (**Slide 42 – LPE Restores Phagocytosis in sPLA<sub>2</sub>-V-Deficient Cells - Bacteria**). La siguiente diapositiva muestra que este efecto de lisoPE es específico, ya que ningún otro lisofosfolípido, lisoPC o lisoPI, lo reproduce (**Slide 43 – LPC and LPI Do Not Restore**

Phagocytosis in sPLA<sub>2</sub>-V-Deficient Cells). Por tanto, como conclusión de esta parte de la charla, hemos visto que lisoPE participa de modo clave en el incremento de la actividad fagocítica de los macrófagos polarizados a M2 y que este metabolito es producido por sPLA<sub>2</sub>-V (Slide 44 – LysoPE is involved in IL-4-induced phagocytosis).

Para profundizar en estos efectos de sPLA<sub>2</sub>-V, pensamos que podría ser importante investigar la compartimentación de la síntesis de lisoPE, es decir, en qué parte de la célula se produce este lisoPE o, en otras palabras, determinar la localización subcelular de la enzima que lo está produciendo. Con este fin utilizamos células transfectadas con sPLA<sub>2</sub>-V unidas a EGFP (Slide 45 – sPLA<sub>2</sub>-V Does Not Translocate to the Phagosome in Human Macrophages). En la célula en reposo puede verse que el citoplasma está salpicado de puntos verdes que probablemente representan gránulos secretores. Cuando tratamos las células con zimosán para que comience la fagocitosis, los puntos verdes de sPLA<sub>2</sub>-V en el citoplasma desaparecen muy probablemente porque la enzima se está secretando, pero no vemos ninguna acumulación de color verde alrededor de las partículas, lo que sugiere que la enzima no interactúa significativamente con el fagosoma. Esto es algo que nos sorprendió, ya que trabajos anteriores de otros habían demostrado que sPLA<sub>2</sub>-V se transloca al fagosoma en macrófagos de ratón. Otra notable diferencia entre las células humanas y de ratón.

Este comportamiento de la sPLA<sub>2</sub>-V también contrasta fuertemente con el de la cPLA<sub>2</sub>α, a la que hacemos regresar a la charla, que se transloca al fagosoma (Slide 46 – cPLA<sub>2</sub>α Translocates to the Phagosome in Human Macrophages). Estos son macrófagos humanos transfectados con EGFP-cPLA<sub>2</sub>α, expuestos a zimosán en rojo. Se puede ver claramente el desplazamiento de la enzima al fagosoma, que se aprecia aún mejor en pseudocolor. Y ya que estamos con la cPLA<sub>2</sub>α, diremos que si lo que transfectamos es una cPLA<sub>2</sub>α mutante que no se puede fosforilar porque le hemos reemplazado la Ser<sup>505</sup> por una Ala, la enzima no transloca (Slide 47 – S505A cPLA<sub>2</sub>α Mutant Does Not Translocate to the Phagosome), lo que demuestra la importancia de la translocación para que esta enzima manifieste su funcionalidad. En la parte superior de la figura se muestra mismo que en la anterior, translocación de la enzima. Pero si se usa un mutante S505A, que previene la fosforilación, la enzima no se transloca en absoluto.

Y bueno, ¿qué está haciendo cPLA<sub>2</sub>α en el fagosoma? Los resultados que tenemos a este respecto son ciertamente sorprendentes (Slide 48 – cPLA<sub>2</sub>α Inhibition Modifies the Pattern of Phagosome Internalization). En la parte superior, se muestra un macrófago después de 2 h de exposición a zimosán; las partículas fagocitadas parecen estar concentradas en el interior de la célula, alrededor del núcleo. Sin embargo, si usamos pirofenona, un inhibidor de cPLA<sub>2</sub>α, hay muchas partículas alrededor del núcleo, pero también hay muchas dispersas alrededor del citoplasma. Y si usamos células deficientes en cPLA<sub>2</sub>α por siRNA, vemos lo mismo, muchas células dispersas alrededor del citoplasma. Aquí a la derecha está la cuantificación. Con todo esto podemos mostrar un esquema como el que se muestra en esta diapositiva (Slide 49 – Distinct Roles for sPLA<sub>2</sub>-V and cPLA<sub>2</sub>α in Regulating Phagocytosis), que indica que hay dos fosfolipasas A<sub>2</sub> implicadas en fagocitosis en macrófagos humanos. Por un lado, la sPLA<sub>2</sub>-V que no sabemos exactamente dónde está funcionando. Especulamos quizás en la membrana plasmática, cerca del fagosoma, donde hidroliza PE para generar lisoPE, que es necesario para regular la extensión y la cantidad de partículas ingeridas. Por otro lado, tenemos el cPLA<sub>2</sub>α, que interactúa con el fagosoma y de alguna manera regula la internalización de las partículas. Y una última pregunta que me gustaría abordar en este tema es si estas dos enzimas interactúan, si hay algún tipo de cross-talk entre ellas. Y la respuesta es sí, hay interacción. Si tomamos células deficientes en sPLA<sub>2</sub>-V por siRNA, las ponemos a fagocitar zimosán y examinamos el estado de fosforilación de cPLA<sub>2</sub>α, encontramos que hay una disminución significativa; aquí a la derecha está la cuantificación. Así que esto es muy interesante porque si sPLA<sub>2</sub>-V regula la fosforilación de cPLA<sub>2</sub>α y la fosforilación de cPLA<sub>2</sub>α es importante para la translocación al fagosoma, la sPLA<sub>2</sub>-V está regulando la translocación de cPLA<sub>2</sub>α al fagosoma (Slide 50 – sPLA<sub>2</sub>-V Depletion by siRNA Inhibits cPLA<sub>2</sub>α Phosphorylation). Por tanto como conclusión de esta parte, vemos que hay dos fosfolipasas regulando la fagocitosis pero su función no es redundante; una regula la extensión del proceso y la otra la internalización (Slide 51 – Two Distinct Phospholipase A<sub>2</sub>s Regulate Phagocytosis in a Non-Redundant Manner).

Y ya por fin pasamos a la última parte de la charla, en la que vamos a hablar de la enzima independiente de calcio y de su papel en el metabolismo del ácido palmitoleico (**Slide 52 – iPLA<sub>2</sub>β and Palmitoleic Acid Metabolism**). En esta figura se muestra la estructura tridimensional de la enzima, determinada hace solo tres años (**Slide 53 – Group VIA Phospholipase A<sub>2</sub> - iPLA<sub>2</sub>β**). La conformación activa de la enzima es un dímero. Cada monómero consta de dos dominios, el catalítico, a través del cual ocurre la interacción con el otro monómero, y un dominio con repeticiones de anquirina. Este dominio es muy común en proteínas que interaccionan consigo mismas o con otras proteínas, por lo que al principio se asumió que este sería el dominio de interacción de los monómeros. Pues no; el dominio de anquirina es quien interacciona con la membrana. En rosa los aminoácidos catalíticos, Ser y Asp. No está nada claro que esta enzima experimente modificaciones post-transcripcionales. La enzima no muestra tampoco especificidad de sustrato, es decir, puede hidrolizar cualquier ácido graso. Sin embargo, y esto es importante, sí se ha apreciado que en células manifiesta una clara preferencia por especies que contienen palmítico en la posición 1, la que no se hidroliza, y fosfolina en la 3, sugiriendo que las especies conteniendo estos sustratos se acomodan óptimamente al sitio activo. O, alternativamente que la enzima se sitúa e localiza en localizaciones muy ricas en este tipo de fosfolípidos. Bien el estudio de la función biológica de la iPLA<sub>2</sub>β ha resultado enormemente complejo y solo hasta la obtención del ratón k.o. hace unos 10-15 años se han podido describir con claridad algunas de sus funciones específicas, aunque su papel en inmunidad innata e inflamación sigue siendo prácticamente desconocido. Una de las primeras funciones atribuidas a esta enzima es la de participar en la remodelación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (lo que se conoce como el ciclo de Lands) a través de su regulación de los niveles celulares de lisofosfolípidos aceptores (**Slide 54 – Antisense inhibition of iPLA<sub>2</sub>β Reduces Cellular LysoPC Levels**). Esta enzima tampoco transloca al fagosoma durante la activación de los macrófagos por estímulos fagocíticos, ya se ve en la figura que no se mueve, parece estar como asociada a las mitocondrias (**Slide 55 – iPLA<sub>2</sub>β Does Not Translocate to the Phagosome in Human Macrophages**) (y tampoco parece tener un papel relevante en la regulación de la producción de eicosanoides; es decir que no libera cantidades significativas de ácido araquidónico, al menos en comparación con la cPLA<sub>2</sub>α (**Slide 56 – Inhibition of iPLA<sub>2</sub>β Does not Affect Eicosanoid Production**)). En esta diapositiva se muestra un análisis por LC/MS de la producción de eicosanoides en células fagocitando zimosán y en presencia o no de inhibidores de cPLA<sub>2</sub>α o iPLA<sub>2</sub>β. Puede verse que la inhibición de la cPLA<sub>2</sub>α por pirrofenona prácticamente elimina por completo la respuesta, mientras que la inhibición de la iPLA<sub>2</sub>β por FKGK18 prácticamente no tiene efecto.

Otra de las líneas de investigación en mi laboratorio se ocupan del ácido palmitoleico y sus isómeros posicionales. Este ácido supongo que les resultará muy familiar a todos aquellos del auditorio que trabajen en enfermedades metabólicas, aterosclerosis, diabetes, obesidad o metabolismo de lípidos en general, ya que es una de las “estrellas” actuales del campo (**Slide 57 – Palmitoleic Acid**). Se ha descrito en ratón ya hace algunos años que el ácido palmitoleico funciona como una hormona lipídica o adipoquina, liberada por el tejido adiposo para regular el metabolismo de los lípidos en el hígado y mejorar la señalización de la insulina. También se ha sugerido que posee un cierto carácter anti-inflamatorio, aunque todo esto es un tema de acalorado debate ya que los datos obtenidos en ratón no siempre coinciden con los datos obtenidos en humanos. Pero en cualquier caso, el interés por los posibles efectos beneficiosos del palmitoleico está yendo tan lejos que uno puede ir a cualquier herbolario o parafarmacia, o al internet, Amazon.com o tiendas similares en línea, y comprar todo el omega-7 que uno quiera. No sé si se podrá leer desde ahí, pero aquí en la etiqueta dice: "The New Good Fat"; que no se puede negar que como slogan comercial es una frase muy buena; que sea más o menos cierta ya es otro cantar en el que no vamos a entrar. Pues bien, analizando por LC/MS la distribución del ácido palmitoleico en macrófagos, nos encontramos que más del 70% se halla en una sola especie, PC(16:0/16:1)... acabo de decir hace un momento que este tipo de especies le encantan a la iPLA<sub>2</sub>β... (**Slide 58 – Distribution of 16:1 Fatty Acids Between Phospholipids**). Pero es que los macrófagos expuestos a estímulos fagocíticos liberan ácido palmitoleico de los fosfolípidos de membrana, parte del cual va al medio extracelular (**Slide 59 – Release of 16:1 Fatty Acids by Activated Macrophages**). Y otra parte se utiliza para reacciones de remodelación y se transfiere de unos fosfolípidos a otros, en este caso de PC a PI, y también se usa para formar FAHFA, o sea ésteres de ácidos grasos con ácidos grasos hidroxilados. Esta es una familia de lípidos descrita muy recientemente y que parece poseer

fuertes propiedades anti-diabéticas y anti-inflamatorias (**Slide 60 – Metabolism of 16:1 Fatty Acids by Activated Macrophages**). No sabemos aún el significado biológico de toda esta remodelación lipídica, pero está claro que el palmitoleico es un ácido graso que experimenta importantes variaciones durante la activación celular que requieren que se libere de su localización. Y claro, se nos ocurrió que la responsable de esta movilización de palmitoleico podría ser la iPLA<sub>2</sub>β. Hicimos los correspondientes análisis, tanto usando inhibidores específicos como inhibición por siRNA y, efectivamente, la iPLA<sub>2</sub>β parece ser la responsable (**Slide 61 – Inhibition of iPLA<sub>2</sub>β Blocks 16:1 Release from Activated Macrophages**). Así, con estos datos en esta diapo presento nuestra visión actual de este tema. (**Slide 62 – Final Scheme**). Pensamos que dentro del macrófago hay dos fosfolipasas A<sub>2</sub> citosólicas de parecido tamaño pero con funciones claramente diferenciadas; por un lado cPLA<sub>2</sub>α regulando las cascadas de formación de metabolitos derivados de PUFAs y por otro lado la iPLA<sub>2</sub>β regulando el metabolismo del ácido palmitoleico y regulando por tanto nuevas vías de activación lipídica. Conclusión con la diapositiva de Agradecimientos (**Slide 53 – Acknowledgments**). A comprehensive list of significant papers from our lab, evidently related to this talk, follows. Esto es to, esto es to, esto es todo amigos!

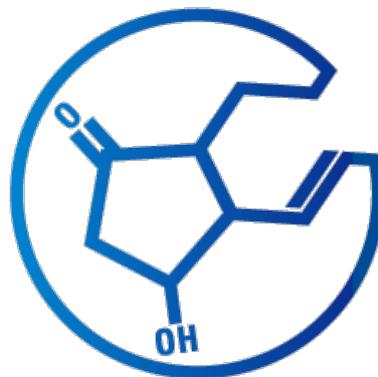
## REFERENCES

1. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and cellular role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol.* 186: 6004-6013.
2. Guijas, C., G. Pérez-Chacón, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gómez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid Res.* 53: 2343-2354.
3. Rubio, J. M., J. P. Rodríguez, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2015. Group V secreted phospholipase A<sub>2</sub> is up-regulated by interleukin-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J. Immunol.* 194: 3327-3339.
4. Astudillo, A.M., C. Meana, M.A. Bermúdez, A. Pérez-Encabo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 480.
5. Gubern, A., J. Casas, M. Barceló, D. Barneda, X. de la Rosa, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2008. Group IVA phospholipase A<sub>2</sub> is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 283: 27369-27382.
6. Gubern, A., M. Barceló, J. Casas, D. Barneda, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2009. Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 284: 5697-5708.
7. Gubern, A., M. Barceló, D. Barneda, J. M. López, R. Masgrau, F. Picatoste, C. E. Chalfant, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2009. JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 284: 32359-32369.
8. Balsinde, J., M. A. Balboa, P. A. Insel, and E. A. Dennis. 1999. Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 175-189.
9. Balsinde, J., M. V. Winstead, and E. A. Dennis. 2002. Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2-6.
10. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A<sub>2</sub> and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103-1113.
11. Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, D. Balgoma, L. Gil-de-Gómez, V. Ruipérez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 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.

12. Pérez, R., X. Matabosch, A. Llebaria, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2006. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J. Lipid Res.* 47: 484–491.
13. Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, C. Meana, D. Balgoma, A. Pol, M. A. del Pozo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* 286: 35299–35307.
14. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, V. Ruipérez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *J. Immunol.* 184: 1071–1078.
15. Balsinde, J. 2002. Roles of various phospholipases A<sub>2</sub> in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* 364: 695–702.
16. Balboa, M. A., and J. Balsinde. 2002. Involvement of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 40384–40389.
17. Balboa, M. A., Y. Sáez, and J. Balsinde. 2003. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J. Immunol.* 170: 5276–5280.
18. Balboa, M. A., R. Pérez, and J. Balsinde. 2003. Amplification mechanisms of inflammation: paracrine stimulation of arachidonic acid mobilization by secreted phospholipase A<sub>2</sub> is regulated by cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-derived hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *J. Immunol.* 171: 989–994.
19. Pérez, R., M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2006. Involvement of Group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. *J. Immunol.* 176: 2555–2561.
20. Balboa, M. A., R. Pérez, and J. Balsinde. 2008. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> mediates proliferation of human promonocytic U937 cells. *FEBS J.* 275: 1915–1924.
21. Ruipérez, V., J. Casas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2007. Group V phospholipase A<sub>2</sub>-derived lysophosphatidylcholine mediates cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 179: 631–638.
22. Ruipérez, V., A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Coordinate regulation of TLR-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A<sub>2</sub>s. *J. Immunol.* 182: 3877–3883.
23. Balgoma, D., A. M. Astudillo, G. Pérez-Chacón, O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* 184: 3857–3865.
24. Astudillo, A. M., D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim Biophys. Acta* 1821: 249–256.
25. Casas, J., M. A. Gijón, A. G. Vigo, M. S. Crespo, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2006. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A<sub>2</sub> to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol. Biol. Cell* 17: 155–162.
26. Casas, J., C. Meana, E. Esquinas, M. Valdearcos, J. Pindado, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2009. Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A<sub>2</sub> to phagosomes in human macrophages. *J. Immunol.* 183: 2767–2774.
27. Pindado, J., J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2007. TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>/cyclooxygenase-2 pathway. *J. Immunol.* 179: 4821–4828.
28. Guijas, C., J. P. Rodríguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1841: 1661–1671.
29. Gil-de-Gómez, L., A.M. Astudillo, C. Guijas, V. Magrioti, G. Kokotos, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A<sub>2</sub>s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 192: 752–762.

30. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Meana, J. M. Rubio, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J. Immunol.* 190: 5169–5177.
31. Balboa, M. A., Y. Shirai, G. Gaietta, M. H. Ellisman, J. Balsinde, and E. A. Dennis. 2003. Localization of group V phospholipase A<sub>2</sub> in caveolin-enriched granules in activated P388D<sub>1</sub> macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* 278: 48059–48065.
32. Shirai, Y., J. Balsinde, and E. A. Dennis. 2005. Localization and functional interrelationships among cytosolic group IV, secreted group V, and Ca<sup>2+</sup>-independent group VI phospholipase A<sub>2</sub>s in P388D<sub>1</sub> macrophages using GFP/RFP constructs. *Biochim. Biophys. Acta* 1735: 119–129.
33. Casas, J., M. Valdearcos, J. Pindado, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2010. The cationic cluster of group IVA phospholipase A<sub>2</sub> (Lys488/Lys541/Lys543/Lys544) is involved in translocation of the enzyme to phagosomes in human macrophages. *J. Lipid Res.* 51: 388–399.
34. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Peña, L. Gil-de-Gómez, J. Balsinde., and M. A. Balboa. 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J. Biol. Chem.* 287: 10894–10904.
35. Diez, E., J. Balsinde, M. Aracil, and A. Schüller. 1987. Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 921: 82–89.
36. Pérez, R., R. Melero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2004. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 279: 40385–40391.
37. Balgoma, D., O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2008. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>-mediated formation of 1,2-diarachidonoylglycerophosphoinositol in monocytes. *FEBS J.* 275: 6180–6191.
38. Guijas, C., A. M. Astudillo, L. Gil-de-Gómez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Phospholipid sources for adrenic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages: comparison with arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1386–1393.
39. Guijas, C., C. Meana, A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2016. Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease. *Cell Chem. Biol.* 23: 689–699.
40. Astudillo, A. M., C. Meana, C. Guijas, L. Pereira, R. Lebrero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* 59: 237–249.
41. Astudillo, A.M., M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1864: 772–783.
42. Monge, P., A. Garrido, J.M. Rubio, V. Magrioti, G. Kokotos, M.A. Balboa, and J. Balsinde, J. 2020. The contribution of cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A<sub>2</sub>s to adrenic acid mobilization in murine macrophages. *Biomolecules* 10: 542.
43. Balsinde, J., B. Fernández, and E. Diez. 1990. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* 144: 4298–4304.
44. Balsinde, J., B. Fernández, J. A. Solís-Herruzo, and E. Diez. 1992. Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1136: 75–82.
45. Rodríguez, J. P., C. Guijas, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Sequestration of 9-hydroxystearic acid in FAHFA (fatty acid esters of hydroxy fatty acids) as a protective mechanism for colon carcinoma cells to avoid apoptotic cell death. *Cancers* 11: 524.
46. Balsinde, J., and M. A. Balboa. 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in activated cells. *Cell. Signal.* 17: 1052–1062.
47. Balboa, M.A., and J. Balsinde. 2006. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 385–391 .

48. Balsinde, J., R. Pérez, and M.A. Balboa. 2006. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> and apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 1344–1350.
49. Peña, L., C. Meana, A. M. Astudillo, G. Lordén, M. Valdearcos, H. Sato, M. Murakami, J. Balsinde, and M.A. Balboa. 2016. Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A<sub>2</sub> in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 1083–1095.
50. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, P. Lebrero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2017. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Front. Immunol.* 8: 1251.
51. Rubio, J. M., A. M. Astudillo, J. Casas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front. Immunol.* 9: 1723.
52. Gil-de-Gómez, L., P. Monge, J.P. Rodríguez, A.M. Astudillo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Phospholipid arachidonic acid remodeling during phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 274.
53. Astudillo, A.M., J.P. Rodríguez, C. Guijas, J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2021. Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNF $\alpha$  gene expression in macrophages via a cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ /COX-1 pathway. *Cells* 10: 447.
54. Balboa, M.A., and Balsinde, J. 2021. Phospholipases: from structure to biological function. *Biomolecules* 11: 428.



**THE EICOSANOID  
RESEARCH DIVISION**  
VALLADOLID