



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**Regulación de la respuesta inflamatoria
de las células fagocíticas por lípidos:
Papel del ácido araquidónico y de los
isómeros del ácido palmitoleico**

Presentada por Miguel Ángel Bermúdez Arias
para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Jesús Balsinde Rodríguez
Dra. María Ángeles Balboa García

A MIS PADRES

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) en la convocatoria del año 2017 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Ref. de la ayuda BES-2017-079872) y financiada por los siguientes proyectos de investigación.

- Mecanismos moleculares de acción y actividad biológica *in vivo* de un nuevo ácido graso anti-inflamatorio, cis-7-hexadecenoico (16:1n-9). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-80883-R).
- "Isómeros posicionales y derivados oxigenados del ácido palmitoleico: nuevos mediadores lipídicos de la inflamación". Junta de Castilla y León, Consejería de Educación (CSI073U16).
- "Nuevos mediadores lipídicos de la inflamación: el ácido palmitoleico, sus isómeros y derivados". Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2015-73000-EXP).

El trabajo realizado durante la tesis doctoral, ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Astudillo, A.M., Meana, C., Bermúdez, M.A., Pérez-Encabo, A., Balboa, M.A. & Balsinde, J. (2020) Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicine* 8: 480.
- Guijas, C., Bermúdez, M.A., Meana, C., Astudillo, A.M., Pereira, L., Fernández-Caballero, L., Balboa, M.A. & Balsinde J. (2019) Neutral lipids are not a source of arachidonic acid for lipid mediator signaling in human foamy monocytes. *Cells* 8: 941.

Los resultados obtenidos han sido presentados en los siguientes congresos como comunicación oral y como póster.

Comunicación oral:

- 16:1-containing phosphatidylcholine reduces responses of macrophages to an inflammatory process. Miguel Á. Bermúdez, María Balboa and Jesús Balsinde. Reunión anual CIBERDEM (3-5 de noviembre de 2020), on-line.

Póster:

- cis-7-Hexadecenoate-containing phosphatidylcholine reduces inflammatory responses of macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Miguel Á. Bermúdez, María Balboa and Jesús Balsinde. 42 congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (16-19 julio de 2019) Madrid, España.

1. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Índice de contenidos	6
1. Abreviaturas	11
Capítulo I.- Introducción	17
1. Gotas lipídicas.....	19
1.1. Biogénesis de gotas lipídicas.....	20
1.2. Diversidad funcional de las gotas lipídicas	24
2. Aterosclerosis.....	26
2.1. Macrófagos espumosos y aterosclerosis.....	28
2.2. Monocitos espumosos circulantes	31
2.3. Ácido araquidónico, compuesto liberado en lesiones ateroscleróticas	34
2.4. La hidrólisis de glicerofosfolípidos como vía principal de liberación de AA para la producción de mediadores lipídicos	38
2.5. PLA ₂ y el metabolismo de las LD.....	42
2.6. Gotas lipídicas como fuente de ácido araquidónico.....	46
3. Ácido palmítoleico e isómeros	49
3.1. Isómeros de 16:1 y desórdenes metabólicos.....	50
3.2. Isómeros de 16:1 e inflamación	53
Capítulo II.- Objetivos.....	55
1. Objetivos.....	57
Capítulo III.- Materiales y métodos	59
1. Materiales	61
1.1. Cultivo celular	61

1.2. Disolventes y reactivos líquidos	61
1.3. Reactivos y productos sólidos.....	62
1.4. Gases	63
1.5. Estímulos	63
1.6. Inhibidores.....	63
1.7. Lípidos	64
1.8. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y qPCR	65
1.9. Microscopía de fluorescencia	66
1.10. Equipamento	66
1.11. Material biológico	68
2. Métodos	69
2.1. Aislamiento y cultivo de células	69
2.2. Tratamientos celulares.....	70
2.3. Análisis de lípidos.....	71
2.4. Análisis de LD por microscopía confocal.....	78
2.5. Estudios de inhibición de iPLA ₂ -VIA con oligonucleótidos antisentido	79
2.6. Translocación de NF- κ B.....	80
2.7. Análisis de expresión de genes por RT-qPCR	81
2.8. Medición de proteína.....	84
2.9. Análisis estadístico.....	84
3. Síntesis de los compuestos químicos de interés	85
3.1. Síntesis de los isómeros de 16:1	85

3.2. Síntesis de los isómeros 1-palmitoil-2-hexadecenoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina PC(16:0/16:1n-x) (x=7, 9, 10).....	102
Capítulo IV.- Resultados.....	105
1. Los lípidos neutros no son una fuente de ácido araquidónico libre en monocitos humanos espumosos.....	107
1.1. El ácido araquidónico exógeno activa la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos en monocitos.....	107
1.2. El ácido araquidónico de por sí, no sus derivados oxigenados, es responsable de que las células adquieran un fenotipo espumoso.	109
1.3. El AA se libera de fosfolípidos, no de triacilglicerol, durante la activación de los monocitos vía receptor.....	113
2. Los macrófagos peritoneales de ratón liberan ácidos grasos antiinflamatorios como el ácido palmítoleico y sus isómeros.....	119
2.1. Distribución endógena en macrófagos de ratón de los ácidos grasos 16:1 en fosfolípidos.....	119
2.2. Disminución de los niveles de las especies de fosfolípidos que contienen 16:1 en macrófagos estimulados.....	121
2.3. Liberación de los isómeros 16:1 en la respuesta celular.....	124
2.4. Participación de PLA ₂ en la liberación de los 16:1.....	125
2.5. Estudios con ácidos grasos deuterados.....	128
2.6. Síntesis de FAHFA conteniendo 16:1	131
3. La molécula de fosfatidilcolina que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón	133
3.1. El LPS aumenta la remodelación de 16:1n-9 de PC a otras clases de lípidos.....	133

3.2. El 16:1 contenido en PC reduce la respuesta inflamatoria en los macrófagos RAW264.7	138
3.3. PC(16:0/16:1n-9) reduce la translocación inducida por LPS de la subunidad p65 de NF-κB al núcleo.....	141
4. Síntesis química de los derivados de 16:1.....	144
4.1. Síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico (16:1n-9):.....	146
4.2. Síntesis del ácido graso (Z)-6-hexadecenoico (16:1n-10).....	149
4.3. Síntesis del ácido graso (Z)-9-hexadecenoico (16:1n-7).....	149
4.4. Síntesis del ácido graso 16:1n-9 deuterado	152
4.5. Síntesis de los fosfolípidos: PC(16:0/16:1n-9), PC(16:0/16:1n-7) y PC(16:0/16:1n-10).....	156
Capítulo V.- Discusión.....	158
1. Los lípidos neutros no son una fuente de ácido araquidónico en monocitos humanos espumosos.....	159
2. Los macrófagos peritoneales de ratón liberan los ácidos grasos antiinflamatorios, ácido palmitoleico y sus isómeros posicionales	163
3. La molécula de fosfatidilcolina que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón	167
Capítulo VI.- Conclusiones.....	171
1. Conclusiones	173
Capítulo VII.- Referencias bibliográficas.....	175
1. Referencias bibliográficas	177
Capítulo VIII.- Anexos (RMN y ESI-QTOF).....	197
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9).....	199
1.1. 16:1n-9	199

1.2. 16:1n-10	202
1.3. 16:1n-7	205
1.4. 16:1n-9 deuterado.....	211
2. Síntesis de los isómeros 1-Palmitoil-2-cis-hexadecenoil-sn-glycero-3- fosfocolina PC(16:0/16:1n-x). (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9).....	222

1. ABREVIATURAS

13-HODE - 13-hidroxiocetadecadienoico

AA – Ácido araquidónico

ACAT - Acil-CoA:colesterol aciltransferasas

ADRP - Proteína relacionada con la diferenciación adiposa (del inglés, *adipose differentiation-related protein*)

apoB-LPs -Lipoproteínas que contienen la apolipoproteína B

ApoE - Apolipoproteína E

ATGL - Triacilglicerol lipasa adiposa (del inglés, *adipose triacylglycerol lipase*)

BEL - Bromoenol lactona

BSA – Albúmina de suero bovino (del inglés, *bovine serum albumin*).

CD - Clúster de diferenciación

CE - Ésteres de colesterol (del inglés, *cholesteryl ester*)

CoA – Coenzima A

COX – Ciclooxygenasa

cPLA₂ - Fosfolipasas A₂ citosólicas dependientes de Ca²⁺

cPLA₂α - Fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de Ca²⁺ grupo IVA

CVD - Enfermedades cardiovasculares (en inglés, *cardiovascular disease*)

DAG - Diacilglicerol

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol

DCC - Diciclohexilcarbodiimida

DCM - Diclorometano

DMAP - 4,4-dimetilaminopiridina

DMDS - Dimetildisulfuro

DMEM - Medio Eagle modificado de Gibco Dulbecco (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

EET - Ácido epoxieicosatrienoico

FADS - Desaturasa de ácidos grasos (del inglés, *fatty acid desaturase*)

FAHFA - Ácidos grasos esterificados a ácidos grasos hidroxilados (del inglés *fatty acid esters of hydroxy fatty acids*)

FAME – Ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés, *fatty acid methyl esters*)

GC/MS – Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (del inglés, *gas chromatography/mass spectrometry*)

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico

HETE - Ácido hidroxieicosatetraenoico

HPETE - Ácido hidroperoxieicosatetraenoico

HRMS – Espectrometría de masas de alta resolución (del inglés, *High resolution mass spectrometry*)

ICAM - Molécula de adhesión intercelular (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*)

IL - Interleuquina

iPLA₂ - Fosfolipasas A₂ intracelulares independientes de Ca²⁺

JNK - Quinasa del dominio N-terminal de c-Jun (del inglés, *c-Jun N-terminal kinase*)

LAL – Lipasa ácida lisosomal

LC/MS – Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (del inglés, *liquid chromatography/mass spectrometry*)

LD – Gotas lipídicas (en inglés, *lipid droplet*)

LDL - Lipoproteínas de baja densidad

LFA - Antígeno asociado a la función de los linfocitos (del inglés *lymphocyte function-associated antigen 1*)

Liso-PL - Lisofosfolípidos

LOX – Lipooxigenasa

LPCAT - Lisofosfatidilcolina: acil-CoA acil transferasa

LPS - Lipopolisacárido

MAGL – Monoacilglicerol lipasa

MCP - Proteína quimioatrayente de monocitos (del inglés, *monocyte chemotactic protein*)

M-CSF - Factor estimulante de colonias de macrófagos (del inglés, *macrophage colony-stimulating factor*)

MPO - Mieloperoxidasa

NF- κ B - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NGS - Suero normal de cabra (del inglés, *normal goat serum*)

oxoETE - Ácido oxoeicosatetraenoico

- PA** - Ácido fosfatídico (del inglés, *phosphatidic acid*)
- PBS** - Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)
- PC** - Fosfatidilcolina
- PE** - Fosfatidiletanolamina
- PI** - Fosfatidilinositol
- PL** - Fosfolípidos
- PLA₂** - Fosfolipasas A₂
- PLD** – Fosfolipasa D
- PLIN** - Perilipinas
- PMA** - Acetato de forbol miristato (del inglés, *phorbol 12-myristate 13-acetate*)
- PPAR** – Receptor activador de la proliferación de los peroxisomas (del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor*)
- PS** - Fosfatidilserina
- PUFA** - Ácidos grasos poliinsaturados (del inglés, *polyunsaturated fatty acid*)
- qPCR** - PCR cuantitativa a tiempo real
- RE** - Retículo Endoplasmático
- RMN** – Resonancia magnética nuclear
- RNA** – Ácido ribonucleico
- RPMI** - Medio Roswell Park Memorial Institute
- SM** - Esfingomielina
- sPLA₂** - Fosfolipasas A₂ secretadas
- SR** - Receptores carroñeros (en inglés, *scavenger receptors*)

TAG – Triacilglicerol

TEA – Trietilamina

THF – Tetrahidrofurano

TLC – Cromatografía en capa fina (en inglés, *thin layer chromatography*)

TNF α - Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *tumor necrosis factor alpha*)

VCAM - Molécula de adhesión celular vascular (del inglés, *vascular cell adhesion molecule 1*)

VLA – Antígeno muy tardío (del inglés, *very late antigen*)

VLDL - Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés, *very low-density lipoprotein*)

Capítulo I.- Introducción

1. GOTAS LIPÍDICAS

Las células de los mamíferos almacenan el exceso de lípidos neutros en orgánulos citoplasmáticos llamados gotas lipídicas (LD). Estas están presentes en prácticamente todo tipo de células, aunque su número y tamaño pueden variar considerablemente de unas células a otras. Las LD son partículas esféricas que están cubiertas por una monocapa de fosfolípidos (PL) que contienen una serie de proteínas asociadas y que encierra en el interior diferentes lípidos neutros, principalmente triacilglicerolos (TAG) y ésteres de colesterol (CE) (1)(Fig. I.1.1).

Cientos de especies de fosfolípidos han sido identificados en la monocapa de las LD; la clase más abundante, con un 60% de la cantidad total presente, es la fosfatidilcolina (PC); seguido por la fosfatidiletanolamina (PE), que contiene un 24%; y el fosfatidilinositol (PI), con un 4% (2). Por otro lado, se ha identificado la presencia de otros PLs como el ácido fosfatídico, la fosfatidilserina, la esfingomielina y los lisofosfolípidos (3).

Las distintas proteínas asociadas a estas LD tienen diferentes funciones tanto en la movilización de sus lípidos, como en su biosíntesis y su degradación. Cabe destacar la familia de las PAT que incluyen la perilipina-1, adipofilina (ADPR – PLIN2) y TIP47 (Tail-Interacting protein de 47 KDa – PLIN3). (4)

La perilipina es una proteína que ayuda a estabilizar las LD y está implicada en procesos de protección de los lípidos neutros frente a las lipasas (5). Por otro lado, la proteína ADRP está relacionada con la diferenciación de los adipocitos y con la estabilización de las LD. Por último, no se conocen mucho las funciones de TIP47, pero parece estar involucrada en la regulación de la lipólisis en células del musculo esquelético (6). También se ha identificado la presencia de otras proteínas de la familia PAT, S3-12 (PLIN4) y OXPAT/MLDP (PLIN5) aunque están menos descritas (7, 8).

Aparte de la familia de las PAT, han sido descritas numerosas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico en la superficie de las LD, como son la triacilglicerol lipasa (ATGL) (9), la lipasa sensible a hormonas (HSL) (10), la citidina trifosfato:fosfocolina citidiltransferasa (CCT) (11), la lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT) (12), la acil-CoA sintetasa de cadena larga 3 (ACSL3) (13), lipina-1 (14, 15) o la fosfolipasa A₂ citosólica de grupo IVA (cPLA₂α) (16) entre otras.

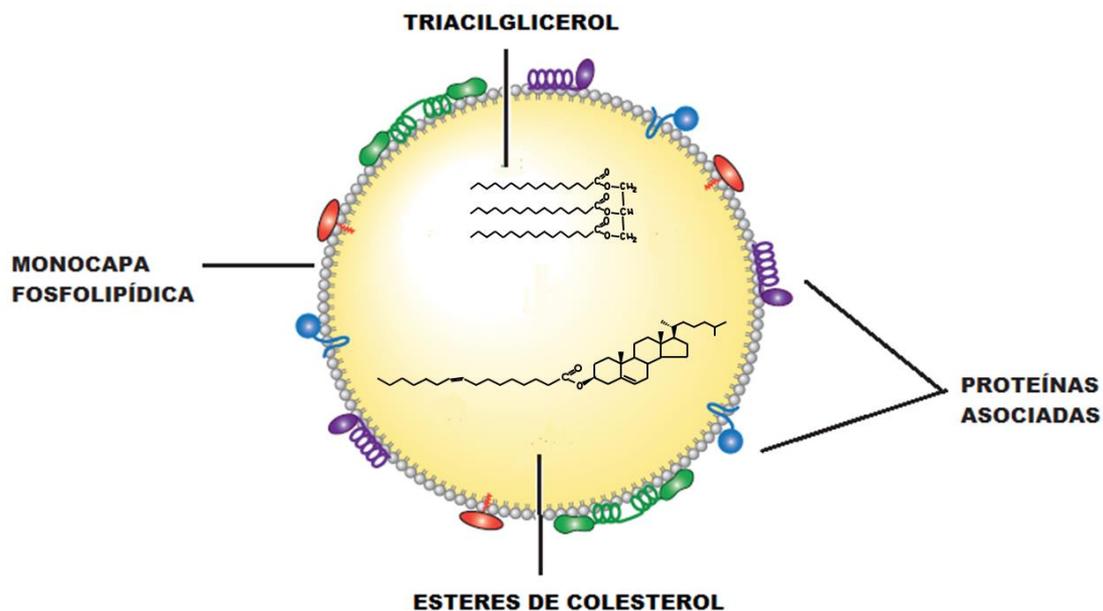


Fig. I.1.1. Estructura y composición de una gota lipídica. Las LD son acumulaciones citoplasmáticas de lípidos neutros (TAG, CE), rodeadas por una monocapa de fosfolípidos que contiene una gran variedad de proteínas asociadas. Adaptado de Walther y Farese (17).

1.1. Biogénesis de gotas lipídicas

A pesar de los importantes avances producidos en los últimos años, el mecanismo de generación de esas LD no ha sido aun completamente establecido. La formación de las LD involucra gran cantidad de pasos y ocurre en el retículo

endoplasmático (RE), donde se producirá la formación de la monocapa anfipática de las LD (18) (Fig. I.1.2).

El primer paso de la biogénesis de las LD es la síntesis de lípidos, como son los TAG y CE. En cada caso, para su síntesis están involucradas diferentes enzimas terminales localizadas en el RE, como son las enzimas diacilglicerol aciltransferasas (DGAT-1 y 2) y las acil-CoA:colesterol aciltransferasas (ACAT), que pueden ser activadas por distintos estímulos como son el exceso de ácidos grasos libres presentes en el medio, la activación celular o el estrés de RE (19, 20).

Los ácidos grasos que forman estos lípidos neutros pueden provenir de varios orígenes, bien de forma exógena a través de diferentes lipoproteínas del plasma sanguíneo, bien de otros compartimentos celulares o por la estimulación de la ruta biosintética *de novo* de los ácidos grasos (21, 22).

La hipótesis más aceptada, aunque no la única, indica que inicialmente los lípidos neutros formados son acomodados en el espacio hidrofóbico situado entre las dos monocapas del RE. Diferentes estudios biofísicos demuestran que se puede acomodar hasta un 3 mol% de TAG y un 5 mol% de CE antes del desprendimiento de la LD al citosol, aunque otros estudios han encontrado acúmulos de 5-10 mol% de TAG (23). Pequeñas cantidades de PLs son necesarias para la formación de la monocapa que rodea a estas LD. Sin embargo, una alta regulación de la proporción entre estos PLs y los lípidos neutros de la LD es esencial para mantener la forma redonda y las propiedades biofísicas de este orgánulo naciente (24).

Las LD nacientes necesitan una curvatura de membrana local positiva en la membrana del RE para poder crecer (Fig. I.1.2). Esta membrana está compuesta principalmente por PC, que presenta una forma espacial cilíndrica que genera una curvatura neutra, y en menor medida PE, que genera una ligera curva negativa (3, 25). Determinaciones biofísicas han revelado que la acumulación de

liso-PLs que tienen conformación en forma de cuña como el liso-PC, el liso-PE y, especialmente el liso-PA que genera una curvatura local positiva de la membrana, es beneficiosa en términos del brote de la gota lipídica naciente (3, 18, 24, 26). Debido a que estos lisofosfolípidos son generados por la acción de las fosfolipasas A₂ (PLA₂), parece que algunas de estas enzimas, como la cPLA₂α, puede estar implicada en la formación de las primeras etapas de las LD (21, 26-28).

Una vez generada la curva positiva en la base de las LD, las células son capaces de almacenar más TAG y CE dentro de la monocapa fosfolipídica. Debido a la mayor acumulación de estos lípidos neutros, es necesario un incremento a la vez de la cantidad de PLs, para mantener las propiedades biofísicas de la monocapa de la futura gota lipídica. Para ello se necesita una coordinación de diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos y en la reacilación de los lisoPLs previamente formados. Una vez que la LD brota de la superficie de la membrana del RE, es necesario establecer una curvatura neutra para favorecer la estabilización de las LD nacientes y la protección del núcleo hidrofóbico de la lipólisis. (11, 24)

Finalmente, una curvatura negativa es imprescindible en la base que conecta con el RE para la completa formación, separación y liberación al citosol de las LD nacientes. Este efecto se atribuye a la presencia de PA, que produce una fuerte curvatura negativa (3, 29), pudiendo ser originado por la acción de enzimas presentes en las LD como la PLD (30, 31) y eliminado, según se necesite, por la lipina-1 (14, 15).

A la par de este proceso de remodelación de los lípidos neutros y los fosfolípidos que componen estas nacientes LD, se va a producir el reclutamiento de diferentes proteínas accesorias como las de la familia PAT. Aunque no se sabe cuál es la implicación de estas proteínas en la generación de las LD, algunas de

sus funciones van desde la estabilización de su estructura, el control de lipolisis y el reclutamiento de otras proteínas y lípidos (17, 24, 32).

Aunque durante la última década el estudio de la biología de las LD ha dado lugar a intensas investigaciones, muchas cuestiones importantes como las relativas a los lugares de formación y el crecimiento de estas LD siguen teniendo controversia (3, 17, 18, 23, 24). Por ejemplo, no está claro dónde se localizan los sitios donde se produce la síntesis de TAG dentro del RE y cómo se correlacionan dichos sitios con la formación de LD. El modelo en el que se forman los TAG es bastante atractivo, pero gran parte no está probado. No se conoce si la mayoría de las proteínas son necesarias para el nacimiento de las LD, ni cómo o por qué sólo algunas de las LD nacientes son seleccionadas para su posterior expansión.

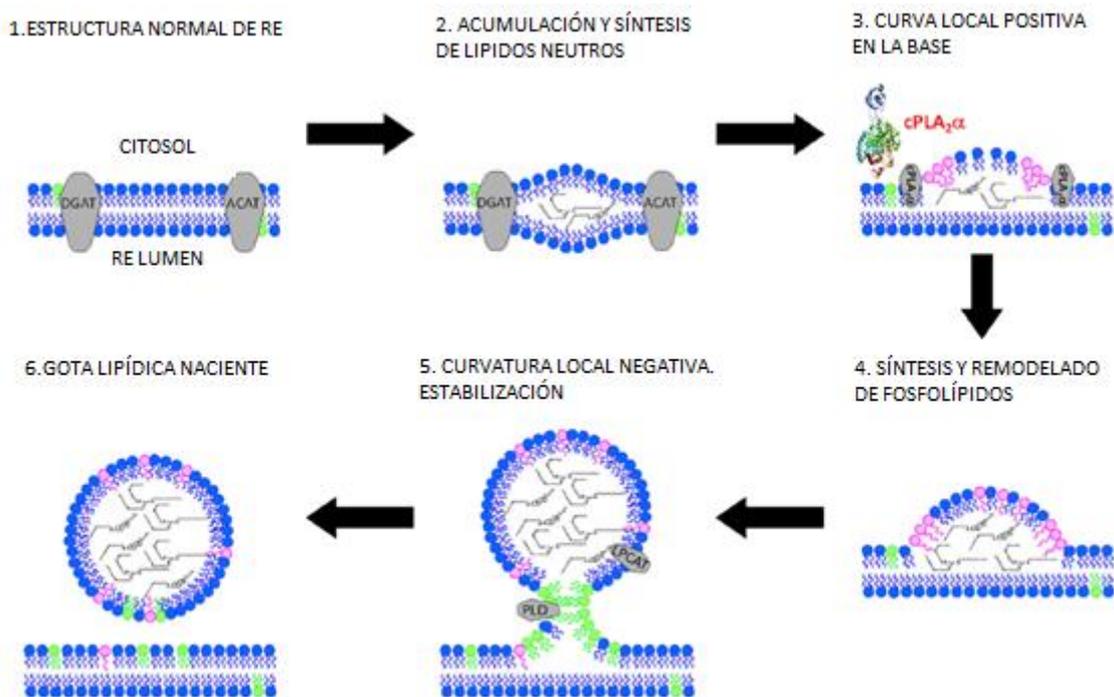


Fig. I.1.2. Síntesis de LD de la cara citosólica de las membranas del RE liso. El papel esencial de cPLA₂α en la inducción de una curvatura positiva de la membrana se indica en el paso 3. Los lisofosfolípidos están resaltados en rosa, y el ácido fosfatídico en verde. Todos los demás fosfolípidos se muestran en azul. Para más detalles ver el texto. DGAT, diacilglicerol: acil-CoA acil transferasa; ACAT, acil-CoA: colesterol acil transferasa; ER, retículo endoplásmico; PLD, fosfolipasa D; LPCAT, lisofosfatidilcolina: acil-CoA acil transferasa. Tomada de Guijas et al (33).

1.2. Diversidad funcional de las gotas lipídicas

El alto número de estudios y artículos de revisión recientes que tratan sobre las LD ilustra el cambio en la forma de pensar acerca de estos orgánulos. De ser considerados como meros depósitos de almacenamiento de ácidos grasos para la β -oxidación y la biosíntesis de membranas, las LD son ahora reconocidas como actores clave en la regulación celular de la homeostasis de los lípidos, la señalización, el tráfico extra e intracelular y la regulación transcripcional génica (3, 24, 34). Además, la formación de LD puede también constituir un signo de estrés y de muerte celular (35). Por otra parte, las LD también son importantes en la batalla contra las infecciones actuando como una defensa intracelular de primera línea en la inmunidad innata, respondiendo a las señales de peligro mediante la reprogramación del metabolismo celular y la activación de mecanismos antimicrobianos (36).

No es sorprendente que las LD de diferentes tipos de células, u obtenidas bajo diferentes estímulos o estados metabólicos, pueden diferir enormemente en sus proteínas y/o composición lipídica (37-39). De hecho se ha observado que una misma célula puede tener diferentes poblaciones de LD en adipocitos; por ejemplo, las LD nacientes presentan mayormente PLIN3 (TIP47) y PLIN4 (S3-12), mientras que en las LD ya formadas PLIN1 (perilipina) y PLIN2 (ADRP) son las proteínas predominantes (40, 41). Estas conclusiones sugieren que las LD pueden someterse a un proceso de maduración.

La heterogeneidad de las LD también es evidente en cuanto a su composición lipídica. El uso de microscopía de dispersión Raman ha permitido constatar que diferentes LD dentro de una misma célula presentan distinta composición lipídica (42).

Los estudios proteómicos están permitiendo encontrar cada vez más proteínas asociadas a los LD (38). La caracterización de cómo estas proteínas afectan a la

biología de estos orgánulos, permitirá en un futuro próximo conocer mejor el porqué de la heterogeneidad de éstos, y ayudar a aclarar las interacciones de la LD con el RE, las mitocondrias, los peroxisomas, los endosomas, los lisosomas, y la membrana plasmática (24, 43-45).

El desequilibrio de la función de las LD ha sido implicado en varias patologías humanas. Las LD sobreabundantes y agrandadas son el sello de la obesidad, la diabetes mellitus de tipo 2, la esteatosis hepática, la aterosclerosis, la esteatosis cardíaca y la cardiomiopatía (1).

2. ATEROSCLEROSIS

Aunque en los últimos 20 años se han hecho grandes avances para caracterizar las LD y su relación con la biología de la adiposidad y el hígado, menos investigaciones se han centrado en las LD y las enfermedades cardiovasculares (CVD). A pesar de ello, hoy en día sabemos que las LD pueden tener funciones protectoras y nocivas en salud cardiovascular. En algunas situaciones, el almacenamiento de lípidos dentro de las LD es un marcador de sobrecarga de lípidos y de reducción de la función cardíaca (46). En otras circunstancias, las LD pueden prevenir la toxicidad de los lípidos mediante secuestro de especies de lípidos tóxicos como el colesterol, las ceramidas y los 1,2-diacilgliceroles (DAGs) (47). Un ejemplo destacado en este contexto es la acumulación de ésteres de colesterol en las LD de macrófagos (células espumosas) en la íntima de las arterias, un paso importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo, se sabe poco sobre la composición de las LD en las células espumosas y cómo la formación y movilización de las LD son reguladas en el contexto de la aterosclerosis.

La aterosclerosis es la responsable de la gran mayoría de las enfermedades cardiovasculares y también es la principal causa de muerte en los países industrializados (48). La aterosclerosis implica primero la expansión de la íntima arterial, un área normalmente pequeña entre el endotelio y las células del musculo liso, debido a la acumulación de lípidos, células y matriz extracelular. Gracias a la preservación del lumen arterial, este proceso inicial raramente conduce a síntomas. Sin embargo, con el tiempo, algunas de estas lesiones pueden evolucionar y sufrir una descomposición necrótica, lo que precipita a la trombosis aguda y oclusión de las arterias, llegándose a obtener diferentes consecuencias: infarto de miocardio, angina inestable, muerte cardíaca repentina o accidente cerebrovascular. La aterosclerosis es un proceso de enfermedad focal

que ocurre predominantemente en los sitios de flujo laminar perturbado, en particular, en los puntos de la rama arterial y las bifurcaciones (49).

Estudios de las etapas más tempranas de la aterogénesis en los seres humanos y en modelos animales, indican que el paso inicial clave es la acumulación subendotelial de lipoproteínas que contienen la apolipoproteína B (apoB-LPs). Las ApoB-LPs son fabricadas por células del hígado e intestino y consisten en un núcleo de lípidos neutros, en particular los CE y los TAG, rodeadas por una monocapa de fosfolípidos y proteínas, parecida a la de los LD. Los apoB-LP hepáticos son secretados como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que se convierten en circulación en lipoproteínas de baja densidad (LDL), y los apoB-LPs intestinales son secretados como quilomicrones, que son convertidos por la lipólisis en partículas llamadas lipoproteínas remanentes (50).

Ante esta acumulación de LDL en el espacio endotelial, se produce una respuesta inflamatoria mediada por las propias células endoteliales, que puede ser aumentada por la existencia de modificaciones oxidativas de esas LDL. Las células endoteliales activadas secretan quimiotrayentes o quimioquinas como MCP-1, que interactúan con los receptores de quimioquinas afines en los monocitos, promoviendo la migración y la liberación de citoquinas inflamatorias, eicosanoides y AA (51-56).

Tras la quimioquinesis, los monocitos se anclan y ruedan sobre las células endoteliales que cubren las apoB-LP retenidas, en particular mediante la interacción del ligando de la glicoproteína P-selectina-1 del monocito (PSGL-1) con las selectinas de las células endoteliales (57). El análisis inmunohistoquímico de las lesiones humanas sugiere que las integrinas de los monocitos VLA-4 (antígeno-4 muy tardío) y LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos) y sus respectivos ligandos celulares endoteliales, VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular) e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), pueden ser especialmente importantes en el establecimiento de aterogénesis.

Además, las plaquetas reclutadas hacia el endotelio en las lesiones ateroscleróticas promueven las adhesiones de los monocitos circulantes con las células endoteliales, a través de la liberación de quimioquinas derivadas de plaquetas en el endotelio activado. Estas quimioquinas activan la señalización vía NF- κ B y la expresión de moléculas de adhesión en los monocitos (57, 58). Por último, la adhesión de los monocitos es seguida por su entrada al espacio subendotelial (59).

Impulsados por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y probablemente por otros factores de diferenciación, la mayoría de los monocitos de las primeras lesiones ateroscleróticas se convierten en células con características de macrófagos y/o células dendríticas (60, 61). El interés suscitado en relación a la heterogeneidad de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, y, en particular, en lo que respecta a los macrófagos que participan en los procesos proinflamatorios (M1) frente a los que participan en la resolución y reparación (M2), ha promovido el estudio de estos eventos sin llegar a conclusiones claras (60). Una gran fuente de información en relación a este tema se ha obtenido gracias a estudios *in vitro* que ha explorado los patrones de expresión génica, proteica, y la funcionalidad de los monocitos o macrófagos sometidos a diversos tratamientos, incluidos factores de crecimiento o diferenciación; citoquinas derivadas de las células Th1 y Th2; activadores o inhibidores de factores de transcripción, en particular los PPAR; e incluso con las propias lipoproteínas y lípidos aterogénicos (60, 62). Sin embargo, la situación en el subendotelio aterosclerótico es tan complejo, que hay una brecha significativa entre las observaciones *in vitro* e *in vivo*.

2.1. Macrófagos espumosos y aterosclerosis

Un sello distintivo del desarrollo de las placas ateroscleróticas es la acumulación en la íntima arterial de lipoproteínas sujetas a modificaciones

químicas (por ejemplo: oxidadas o acetiladas). Esto está asociado con la inflamación local en la pared del vaso y el posterior reclutamiento de monocitos de la circulación. Al interiorizar LDL modificadas, los monocitos se convierten en macrófagos cargados de grasa o células espumosas, que residen en la pared del vaso y fomentan la respuesta inflamatoria local. Los mecanismos subyacentes a esta generación de células espumosas han sido el foco de atención de una intensa investigación durante muchos años (63-66).

Los macrófagos están normalmente protegidos de la acumulación de colesterol tóxico por múltiples mecanismos, en particular la disminución de la expresión del receptor LDL en la superficie celular (64). Sin embargo, las LDL oxidadas o con otro tipo de modificaciones químicas, puede ser reconocidas y captadas por receptores alternativos "scavenger" (SR) (63, 65, 66), evadiendo así los mecanismos de control. Los receptores scavenger comprenden varias clases de receptores transmembrana, cuya característica común es la afinidad por macromoléculas cargadas negativamente o partículas como, por ejemplo, LDL modificadas.

Una de las primeras evidencias de que los receptores scavenger son importantes en la aterogénesis surgió de la experimentación realizada en animales doblemente deficientes en el receptor SR-A y la ApoE (principal componente de las apoproteínas en los quilomicrones). Estos animales tenían una reducción de un 60% en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, en comparación con el tipo salvaje (67). Sin embargo, estudios más recientes han sido menos categóricos en cuanto al papel proaterogénico del SR-A (68, 69). En estos estudios la doble deficiencia en SR-A y el receptor LDL causó sólo un 20% de reducción en la aterosclerosis (68), mientras que la deficiencia de SR-A en ratones transgénicos que expresan una ApoE disfuncional no produjo ninguna disminución en aterosclerosis. Finalmente, parece que la acción proaterogénica del SR-A dependería de la expresión de ApoE. Esta controversia ha sido

interpretada como una indicación de que la ApoE tiene un complejo papel de la aterosclerosis, y está relacionada con el hecho de que la ApoE no sólo actúa en el metabolismo de la lipoproteína plasmática, sino que también tiene una influencia estimuladora del eflujo de colesterol en los macrófagos (70, 71). Uno anticiparía que este último efecto sirviera como un mecanismo de protección que contrarresta la formación de células espumosas.

Recientemente, un apoyo más sólido para un papel central de los SR, en especial el SR-B o CD36, fue proporcionado por un estudio en ratones con deficiencia en ApoE y CD36 simultáneamente, los cuales presentaban una reducción de un 76% del área de lesión aterosclerótica en comparación con los ratones deficientes en ApoE, después de 12 semanas en una dieta occidental (72). CD36 ha sido identificado como el receptor que facilita la entrada de las LDL modificadas por las mieloperoxidasas (MPO). Las LDL modificadas por MPO tienen una probada capacidad de inducir la formación de células espumosas *in vitro*. La deficiencia de CD36 en ratones reduce la captación de LDL modificada por MPO en casi un 90% y la formación de células espumosas en un 50% (73).

El papel destacado de las LDL modificadas en la aterogénesis sugiere que intervenir en la acción de los productos relacionados con las LDL podría tener un considerable potencial profiláctico o incluso curativo. En este particular, la protección frente a la oxidación de las LDL por antioxidantes que pudieran actuar directamente sobre las LDL, o indirectamente en la maquinaria oxidativa celular; e incluso la conversión de las LDL oxidadas en partículas no proaterogénicas por acción de distintas enzimas, son intervenciones que podrían ayudar en la atenuación de la aterosclerosis (74) (Fig. I.2.1).

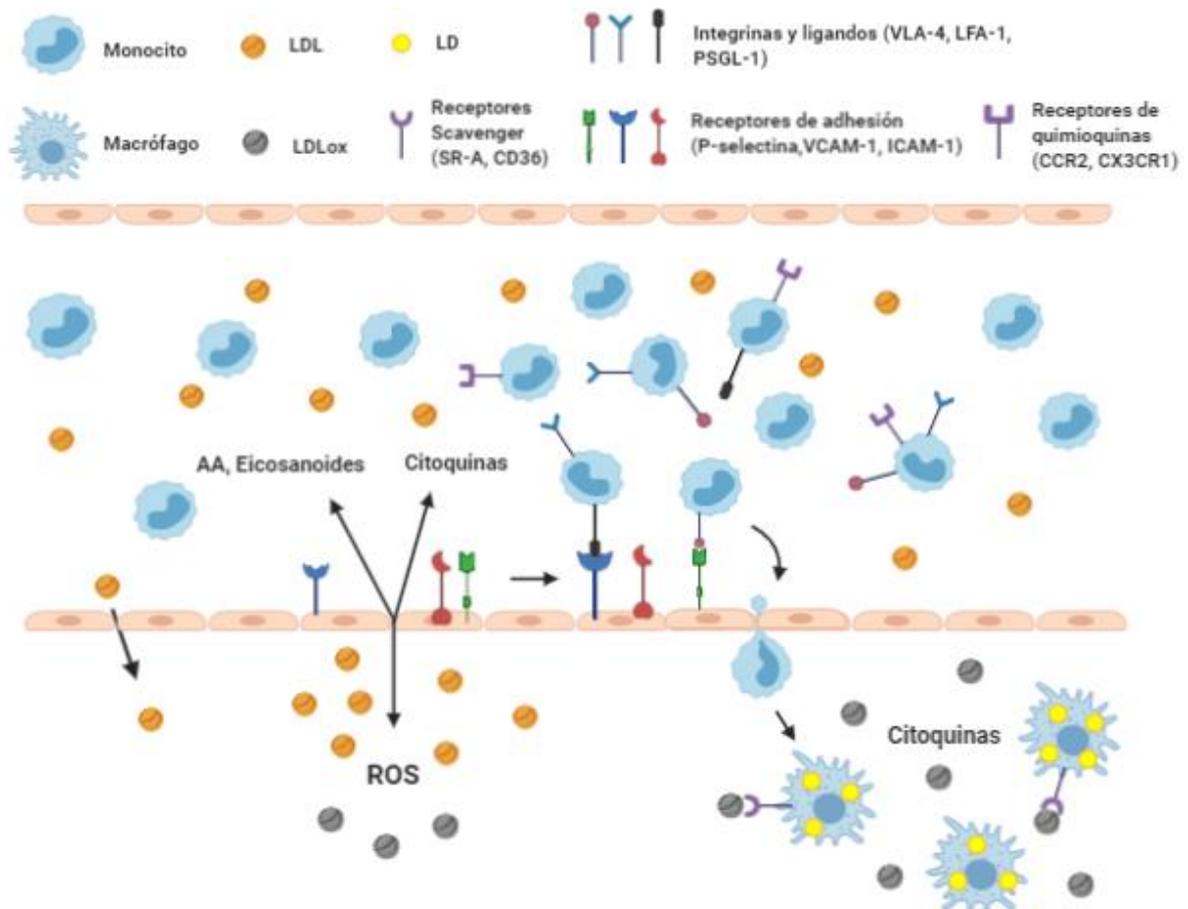


Fig. I.2.1. Papel de los monocitos y macrófagos en el inicio de formación de placas ateroscleróticas. Diferentes factores que producen daño endotelial favorecen una mayor permeabilidad a las LDL, un aumento de la expresión de moléculas de adhesión y una mayor secreción de quimioquinas, citoquinas, eicosanoides y AA. En estas condiciones se facilita la entrada de los monocitos al espacio subendotelial, donde se diferencian a macrófagos. Éstos aumentan la expresión de receptores scavenger, que son los encargados de endocitar las LDL que se han oxidado, acumulándolas en LD y convirtiéndose en macrófagos espumosos, que serán los principales causantes del desarrollo de las placas aterogénicas.

2.2. Monocitos espumosos circulantes

El hecho de que los monocitos circulantes sean atraídos por zonas del endotelio dañadas y una vez en el interior de la íntima se conviertan en macrófagos espumosos, es un concepto ya establecido desde hace décadas (52, 75). Sin embargo, existe un modelo emergente en el que los monocitos que interactúan con los productos liberados por las células endoteliales, pueden adquirir un fenotipo espumoso mucho antes de cruzar la barrera endotelial arterial y diferenciarse a macrófagos espumosos en la íntima (76-79).

En este sentido, en las primeras investigaciones relacionadas con este tema, se encontró que los leucocitos de pacientes con aterosclerosis en las arterias coronarias acumulaban TAG y CE (80), y que los leucocitos circulantes de pacientes con hipercolesterolemia presentaban altos niveles de LDs (81). Además, se ha descrito que los monocitos humanos de sangre periférica incrementan su contenido en LD después de una ingesta alta en grasa, en comparación con los niveles encontrados en monocitos de individuos en ayuno, cuyos niveles de LD es muy bajo (82, 83). Se piensa que la formación de estas LD es debida a la captación de los ácidos grasos libres generados tras su liberación de los TAG y de las VLDL por las lipasas de la superficie de las células endoteliales (83-86).

De forma análoga, las líneas de ratón propensas a desarrollar placas ateroscleróticas de manera espontánea, como son la apoE^{-/-} y la LDb (Ldlr^{-/-} Apobec1^{-/-}) caracterizadas por una circulación alta de LDL, presentan un abundante contenido de LD en sus monocitos tras una semana con dieta alta en grasa. Estos monocitos se denominan monocitos espumosos o en inglés foamy monocytes (79). De hecho, los monocitos de los ratones apoE^{-/-} llegan a acumular más LD que los correspondientes ratones control en una dieta normal.

La confirmación de que existe una relación entre la carga de LD de los monocitos y el desarrollo temprano de las lesiones ateroscleróticas, se ha encontrado en modelos *in vivo* donde se eliminaron los monocitos espumosos circulantes (CD11c⁺) mediante tratamiento con clodronato (79). Este tratamiento no influía en los niveles de monocitos sin LD (CD11c⁻), ni en los macrófagos residentes en las arterias. Además, el clodronato redujo las lesiones ateroscleróticas en ratones tratados, respecto a los ratones sin tratar (79).

Además se ha descrito que la síntesis de las LD de los monocitos espumosos circulantes va acompañada de aumentos en la expresión de los niveles de integrinas como VLA-4, CD11b, CD11c, CD18 y CD29 (76, 79, 87), y también de

receptores de quimioquinas como CCR2 y CX3CR1 (77, 87). También se ha demostrado en experimentos *in vitro*, que el aumento de expresión de estos compuestos facilita la adhesión a las células endoteliales, mientras que *in vivo* se ha observado un aumento de estos monocitos infiltrados en las placas ateroscleróticas (79, 87). Por otra parte, la formación de LD en monocitos circulantes también va acompañada de una activación inflamatoria, aumentando los niveles de expresión de diferentes genes que codifican para diversas citoquinas, tales como IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β e IFN- γ (79, 87).

Todo ello hace pensar que la acumulación de LD en los monocitos va acompañada de mayor expresión de receptores de adhesión, quimioquinas y marcadores proinflamatorios en general, lo que da lugar a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, las LD en los monocitos circulantes se están considerando no sólo como una posible diana terapéutica sino también como un marcador de riesgo en aterosclerosis (76-79)(Fig. I.2.2.).

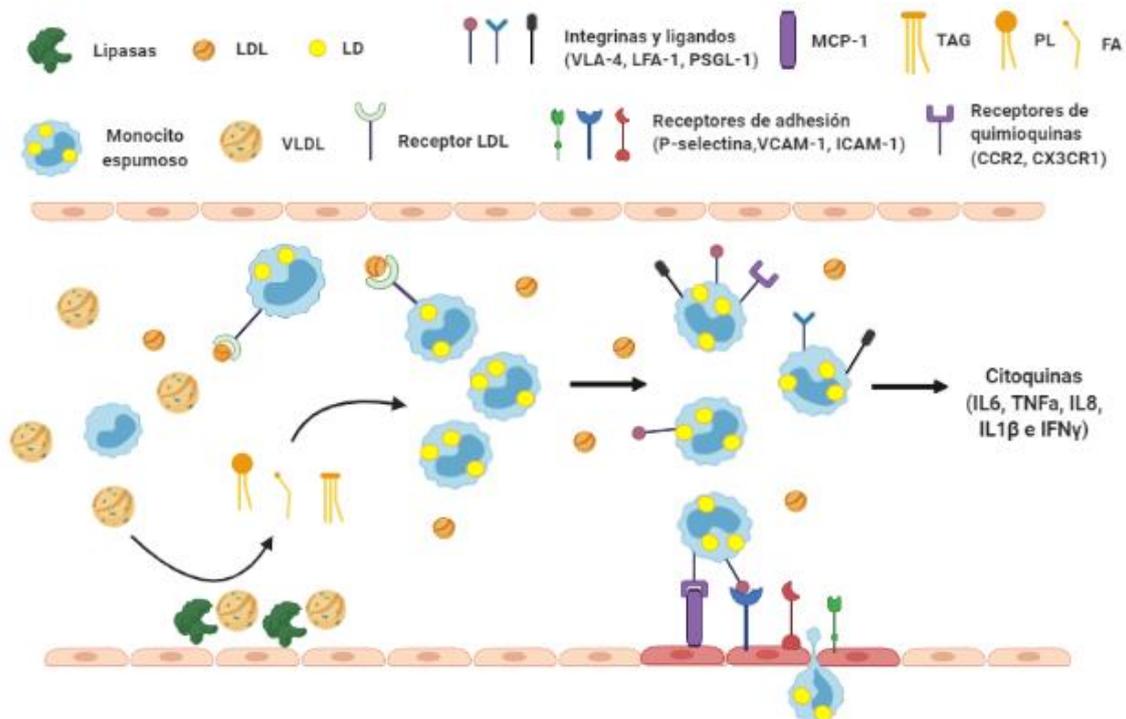


Fig. I.2.2. Formación de monocitos espumosos circulantes en etapas tempranas de la aterosclerosis. En un estado de dislipidemia, los monocitos circulantes pueden formar LD antes

de migrar al espacio subendotelial. Este proceso puede ser producido por la captación del exceso de LDL, o por la absorción de los lípidos provenientes de la hidrólisis de las VLDL por las lipoproteinlipasas presentes en la superficie de las células endoteliales. La formación de monocitos espumosos va acompañada de una activación inflamatoria de las células, produciéndose un aumento de la expresión de integrinas y receptores de quimioquinas, a la vez que una gran liberación de numerosas citoquinas inflamatorias. Esto hace que los monocitos cargados con LD sean más propensos a la migración subendotelial y, por lo tanto, los hace más aterogénicos.

2.3. Ácido araquidónico, compuesto liberado en lesiones ateroscleróticas

El ácido araquidónico (5,8,11,14-ácido eicosatetraenoico, AA) es un ácido graso de la familia n-6 que se obtiene directamente de la dieta, o se sintetiza a partir del ácido linoleico (18:2n-6) mediante las acciones sucesivas de las Δ 6-desaturasa, elongasa y Δ 5-desaturasa. Se produce principalmente en el hígado, pero también en otros tejidos (88, 89).

El AA es el precursor común de los eicosanoides, una familia de mediadores lipídicos con funciones clave en fisiología y, especialmente en situaciones fisiopatológicas que implican reacciones inflamatorias (90, 91). Además, cuando está presente en concentraciones elevadas, el AA puede dar lugar a cantidades significativas de su producto de elongación de 2 carbonos, el ácido adrénico (22:4n-6). El ácido adrénico es el precursor de las prostaglandinas de 22 carbonos (dihomoprostaglandinas) (92-94). La potente actividad biológica de los eicosanoides obliga a las células a controlar estrictamente los niveles de AA libre, de tal manera que la disponibilidad de dicho ácido graso libre es frecuentemente un paso limitante en la generación de eicosanoides (95, 96)(Fig. I.2.3).

plaquetas reclutadas hacia el endotelio activado constituyen otra fuente de producción de AA libre en los focos de aterosclerosis (98).

En estudios previos del laboratorio se ha descrito que el AA es un potente inductor de la síntesis de lípidos neutros en monocitos circulantes humanos y, por lo tanto, de su conversión en células espumosas. Las vías de activación de cPLA₂α por p38 y JNK, y la activación de la síntesis de ácidos grasos *de novo* parecen ser las rutas intracelulares que conducen a la formación de LD (26). También se ha observado que los efectos biológicos del AA no se ven afectados por la presencia de inhibidores de la ciclooxigenasa o la lipoxigenasa, lo que sugiere que son debidas al propio ácido graso y no a un metabolito oxigenado producido por las células después de estar en contacto con el AA (26).

En este sentido, el análisis molecular de la composición de los ácidos grasos de los lípidos neutros de monocitos espumosos ha demostrado que estos monocitos presentan un enriquecimiento de un ácido graso cuya concentración celular es normalmente baja, el ácido cis-7-hexadecenoico (16:1n-9), un isómero posicional del ácido palmitoleico (105). Además, se descubrió que el 16:1n-9 posee actividad antiinflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo*, comparable a la de los ácidos grasos de la serie n-3, y claramente distinguible de los efectos del ácido palmitoleico (106). La acumulación selectiva en los lípidos neutros de las células fagocitarias de un ácido graso poco común revela un cambio fenotípico temprano que puede proporcionar un biomarcador de proaterogenicidad, y una diana potencial de intervención farmacológica en las primeras etapas de la enfermedad cardiovascular (105).

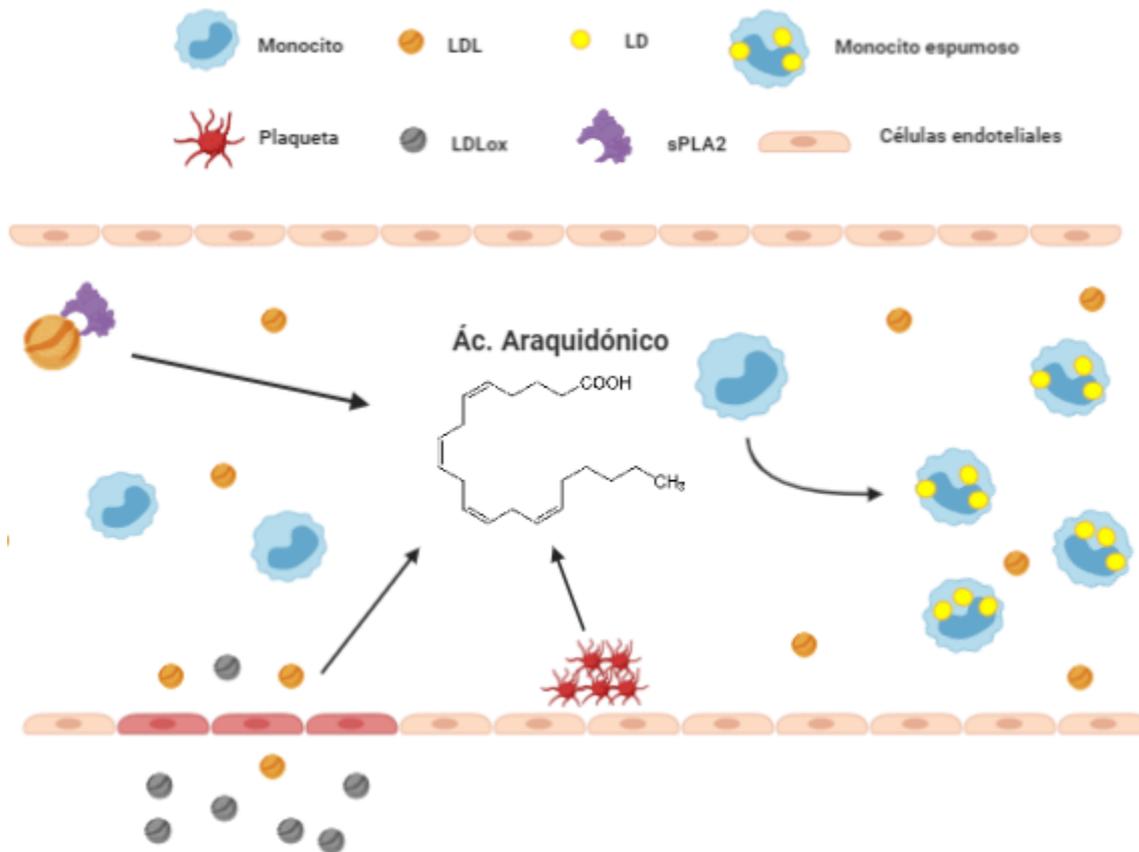


Fig. I.2.4. Biología del ácido araquidónico libre en focos de aterosclerosis. La acción de las fosfolipasas A₂ secretadas asociadas a focos de aterosclerosis sobre los PL de las LDL circulantes, actúan como fuente de AA. La activación de las células endoteliales en presencia de LDL oxidadas hace que se generen cantidades importantes de AA libre al torrente sanguíneo. Además, las plaquetas reclutadas en el endotelio activado pueden contribuir a la liberación de este ácido graso.

En las células inflamatorias, el AA se encuentra generalmente esterificado en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos, en particular de los glicerofosfolípidos de colina (PC), de etanolamina (PE) y de inositol (PI) (96). Los niveles de AA libre de las células son controlados por dos reacciones que compiten entre sí, por un lado, la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), que hidroliza la posición sn-2 de los fosfolípidos para producir el ácido graso libre y, por otro, las reacciones de las aciltransferasas dependientes de CoA, que reincorporan el ácido graso libre en los fosfolípidos. Es importante destacar que la mayor parte de los ácidos grasos dentro de las células se encuentran activados con CoA (107, 108). En este paso de

reacilación de AA libre cabe destacar las sintetasas de cadena larga de acil-CoA (ACSL3, 4 y 6) (109, 110) y las acil transferasas lisoPC:acil-CoA aciltransferasa 2 (111), lisoPC:acil-CoA aciltransferasa 3 (112-114), lisoPI:acil-CoA aciltransferasa y ácido lisofosfatídico:acil-CoA aciltransferasa 3 (113, 115) que muestran selectividad por el AA.

En las células en reposo, las reacciones de reacilación dominan sobre el paso de desacilación mediado por la PLA₂, por lo que el AA libre se mantiene en niveles bajos. La estimulación de las células por agonistas de los receptores inflamatorios provoca la activación de las PLA₂ intracelulares (116-119). En estas condiciones, la tasa de la liberación del AA excede claramente a la de reincorporación en los fosfolípidos y, por lo tanto, se produce una acumulación neta de AA libre que es seguida por su conversión a diversos eicosanoides. No obstante, las reacciones de reacilación de AA siguen siendo muy plurales en condiciones de estimulación, como se manifiesta en el hecho de que sólo una pequeña fracción del AA liberado por las PLA₂ se convierte en eicosanoides (108).

2.4. La hidrólisis de glicerofosfolípidos como vía principal de liberación de AA para la producción de mediadores lipídicos

La producción de mediadores lipídicos está intrínsecamente vinculada con la disponibilidad de precursores de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) necesarios para su síntesis. Esta producción depende de las actividades de numerosas enzimas y proteínas que regulan la captación, el transporte, la hidrólisis, el almacenamiento, la remodelación y el tráfico de PUFA entre las diferentes reservas lipídicas celulares y extracelulares (lipoproteínas) (108, 120). Tradicionalmente, la producción de eicosanoides se ha asociado con la actividad de las enzimas fosfolipasa A₂ (PLA₂), que tienen acceso a uno de los principales reservorios de PUFA fácilmente movilizables: la posición sn-2 de los

glicerofosfolípidos. En particular, la fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de calcio de grupo IVA (cPLA₂α) ha sido ampliamente reconocida como la principal responsable de liberar AA para la producción de eicosanoides (Fig. I.2.5.) (121). Otros miembros de la superfamilia de las PLA₂ también pueden estar implicados en el suministro de AA y otros PUFA para la producción de mediadores lipídicos, aunque su contribución es menor. Estudios recientes han revelado otras fuentes fisiológicamente relevantes de AA para la producción de eicosanoides, como son las hidrólisis de endocannabinoides por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (122-124), de lípidos lisosomales por la lipasa ácida de lisosomas (LAL) (125) y de lípidos neutros por la lipasa del tejido adiposo (ATGL) (126, 127) (Fig. I.2.5.).

La superfamilia PLA₂ consta de más de 30 enzimas que muestran una selectividad y especificidad diferentes sobre los fosfolípidos de membrana (128-130). Todas ellas liberan FAs y lisofosfolípidos de la posición sn-2 del esqueleto de glicerol de los glicerofosfolípidos y se han dividido clásicamente en al menos tres grandes familias, las fosfolipasas A₂ secretadas (sPLA₂), las intracelulares independientes de Ca²⁺ (iPLA₂) y las citosólicas A₂ dependientes de Ca²⁺ (cPLA₂).

Aunque, como se ha hecho constar anteriormente, muchos miembros de la superfamilia PLA₂ pueden potencialmente producir AA libre para la síntesis de eicosanoides, la cPLA₂α es la única que muestra una especificidad significativa para hidrolizar fosfolípidos de membrana que contienen AA (129, 130). Al activarse la célula por diversos estímulos inflamatorios, la enzima se transloca de manera dependiente de Ca²⁺ desde el citosol a las membranas del aparato de Golgi, RE, la envoltura nuclear o las LD, un evento que es esencial para el inicio de la producción de eicosanoides. Esto permite su posicionamiento en la proximidad inmediata de la maquinaria enzimática COX/LOX, optimizando así la provisión de ácido araquidónico para una rápida producción de eicosanoides. Las enzimas COX se localizan principalmente en el RE, pero también en el aparato de Golgi, mientras que la síntesis de leucotrienos se produce muy

probablemente en la envoltura nuclear (129, 131). Sin embargo, la localización perinuclear de cPLA₂α no es imprescindible para su acoplamiento funcional con las enzimas COX/LOX (132). Es importante señalar que los estudios realizados en ratones deficientes en cPLA₂α han confirmado que la enzima es esencial para la producción de eicosanoides inducida por estímulos en la mayoría de células y tejidos (129, 131, 133, 134). En consecuencia, numerosos estudios han sugerido su participación en enfermedades con un componente inflamatorio, como el asma, las úlceras gástricas, la fibrosis quística, la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, las lesiones neuronales, las enfermedades metabólicas y el cáncer (129, 131, 135).

Otra enzima de la familia de las PLA₂ con gran interés fisiopatológico es la fosfolipasa A₂ independiente de calcio de grupo VIA (iPLA₂-VIA). Se trata de una enzima con múltiples funciones en fisiología celular y fisiopatología, siendo de especial relevancia en la regulación de la formación ósea, la apoptosis, la secreción de insulina, y la maduración de espermatozoides (136, 137). A diferencia de cPLA₂α, la iPLA₂-VIA no manifiesta especificidad con respecto al ácido graso liberado en los ensayos *in vitro* (128, 138). Estudios realizados en macrófagos de ratón han demostrado que la cPLA₂α y la iPLA₂-VIA actúan sobre diferentes fosfolípidos celulares. Mientras que la primera regula la liberación de ácido araquidónico y la producción de eicosanoides, la segunda parece actuar sobre fosfolípidos que no contienen AA (139, 140).

Además de las enzimas intracelulares, hay otro grupo importante de PLA₂ que participa en la producción de mediadores lipídicos, la familia de las enzimas secretadas (sPLA₂) (141, 142). Las sPLA₂ son secretadas por un variado número de células y actúan principalmente sobre sustratos extracelulares, como las lipoproteínas, las micropartículas, las bacterias y los virus, y la parte externa de la membrana plasmática de las células de mamíferos. En particular, los grupos IID, IIF, III y X (codificados por *PLA2G2D*, *PLA2G2F*, *PLA2G3* y *PLA2G10*,

respectivamente) muestran una cierta preferencia por la liberación de PUFAs, incluidos el ácido araquidónico y n-3 PUFAs (Fig. I.2.5.), al actuar sobre sus respectivas membranas diana en contextos fisiológicamente relevantes (143). La PLA₂ de grupo IID se expresa en las células dendríticas linfoides y muestra un papel antiinflamatorio al liberar n-3 PUFAs y promover la producción de resolvina D₁ (144, 145). La sPLA₂ de grupo X es la más potente en hidrolizar membranas ricas en PC conteniendo PUFA (141, 143), liberando una mezcla de FAs insaturados, incluyendo n-3 PUFAs, de diferentes células *in vitro* y tejidos (146) murinos *in vivo*, y protegiendo contra la inflamación, la aterosclerosis y la obesidad (147, 148).

Además de las PLA₂, el AA esterificado en fosfolípidos es también objeto de sucesivas reacciones de transacilación destinadas a asegurar la correcta distribución del ácido graso dentro de las diversas localizaciones celulares (107, 108, 149, 150). Esto parece ser importante no sólo para la homeostasis de la membrana sino también para la ejecución de respuestas celulares apropiadas durante la activación fisiológica y fisiopatológica (151-154). Estas reacciones de transacilación son catalizadas por la transacilasa independiente de CoA (CoA-IT), una enzima que transfiere preferentemente AA de las especies de diacil PC a diacil PE y plasmalógenos de PE (107, 108). La secuencia proteica de una posible CoA-IT está aún por describir, por lo que actualmente la única manera de estudiar la regulación celular de CoA-IT es a través de su actividad enzimática (155, 156). Basándose en los puntos comunes bioquímicos y mecánicos, Yamashita y sus colaboradores (157, 158) sugieren que las reacciones de transacilación independientes de CoA son catalizadas por una o varias enzimas de la familia de las PLA₂ y han especulado que la cPLA₂ del grupo IVC (también llamada fosfolipasa citosólica A₂ γ , cPLA₂ γ) es una posible candidata. Además, un estudio reciente demuestra que esa transferencia de AA de PC a PE en células activadas se ve ralentizada en células deficientes en esta enzima, sugiriendo que

la cPLA₂ γ puede actuar de forma análoga a la CoA-IT en lo que se refiere a la homeostasis del AA en PL (159). Sin embargo, no se puede confirmar si la cPLA₂ γ participa en la reacción de transacilación independiente de la CoA proporcionando los lisofosfolípidos aceptores que inician la reacción, catalizando directamente la transacilación de los ácidos grasos o actuando a ambos niveles.

En resumen, además de cPLA₂ α , otras enzimas intracelulares, así como miembros de la familia de la sPLA₂ de acción principalmente extracelular, contribuyen a la producción de mediadores lipídicos en diversos entornos. Es evidente que aún estamos lejos de comprender la complejidad de la regulación y la variedad de fuentes de disponibilidad de precursores de PUFA para la producción de mediadores lipídicos por parte de diferentes PLA₂. Dado que todavía se desconocen las funciones biológicas de muchas PLA₂ y, como se explica en la siguiente sección, varias PLA₂ se han asociado recientemente con el metabolismo de las LD, no será sorprendente descubrir que muchas de las vías de producción de mediadores de lípidos mediadas por PLA₂ también incluyen el reciclaje de los lípidos de las LDs y el tráfico de ácidos grasos entre los fosfolípidos y los TAG.

2.5. PLA₂ y el metabolismo de las LD

Numerosas PLA₂ también han sido implicadas en la regulación del metabolismo de las LD (33). Aparte del papel de las LD como plataformas de regulación de la movilización de AA y la síntesis de eicosanoides, varias formas de PLA₂ también han sido sugeridas como reguladores críticos de la biogénesis de las LD. Las PLA₂ pueden actuar a varios niveles: i) como proveedores de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana para la síntesis de TAG (22, 146, 160), ii) como modificadores de las partículas, como las lipoproteínas, que contienen fosfolípidos para facilitar su absorción e internalización por las células (100, 161),

iii) como generadores de metabolitos que pueden controlar la formación de LD (162), y iv) como reguladores directos de la formación de las LD (26-28).

Como se ha mencionado anteriormente, una vez que los macrófagos reconocen e incorporan las LDLs (modificadas o no) desacilan los CE de las partículas que llegan por la vía endocítica hasta los lisosomas. El colesterol libre es redistribuido por la célula y utilizado por ésta. Cuando la cantidad de colesterol libre es excesiva, es de nuevo reaclado por la ACAT y almacenado en LD citoplasmáticas, que en última instancia conducirá a la formación de células espumosas (75, 163). Los CE que contienen las células espumosas están compuestos principalmente de ácido oleico, mientras que el ácido graso que predominan en las LDL es el ácido linolénico. Este hecho hace suponer que una parte significativa de ácidos grasos que se reaclan en colesterol libre para su almacenamiento en la LD, debe provenir de fuentes endógenas (146).

Estudios dirigidos a identificar las fuentes intracelulares de los ácidos grasos esterificados en CE presentes en macrófagos tratados con LDL oxidadas, han mostrado que un inhibidor dual de las cPLA₂ e iPLA₂, pero no la bromoenol lactona, inhibidor de la iPLA₂ (152, 154, 164), bloquea la síntesis de CE, señalando así la participación de alguna forma de la cPLA₂, muy probablemente la cPLA₂α en la generación de estos CE (146). Estudios independientes han demostrado que el tratamiento de macrófagos con oxLDL induce la activación de la cPLA₂α y la posterior liberación de eicosanoides (165). Se han propuesto dos mecanismos para la regulación de la formación de CE mediada por la cPLA₂ y la consiguiente formación de LD en macrófagos tratados con LDL oxidadas. El primero es la activación de la vía de la síntesis *de novo* de ceramidas por las LDL oxidadas. Se sabe que los elevados niveles intracelulares de ceramidas y su producto fosforilado, ceramida 1-fosfato, inducen la activación de la cPLA₂α (166-168). La segunda vía sería la disponibilidad del ácido graso oxidado 13-hidroxiocetadecadienoico (13-HODE), formado por la oxidación del ácido

linoleico, el principal ácido graso de las LDL. El 13-HODE puede liberarse de las LDL oxidadas en lesiones ateroscleróticas a través de la PLA₂ asociada a las lipoproteínas (PLA₂ grupo VIIA) (169). Se ha demostrado que el 13-HODE activa la cPLA₂α favoreciendo la translocación de la enzima a la membrana donde reside su sustrato (146, 170). Este efecto puede estar mediado por el carácter aniónico del 13-HODE, que facilita la interacción de cPLA₂α con las membranas, como se ha descrito con otros lípidos aniónicos (108, 171, 172). Otros componentes importantes del LDL oxidadas, como el 7-cetocolesterol o el 25-hidroxicolesterol, no reproducen los efectos del 13-HODE (170).

La iPLA₂-VIA ha sido propuesta como una enzima clave en la síntesis de TAG antes de la formación de LD inducida por el estrés. Esta enzima proporciona ácidos grasos libres derivados de fosfolípidos para la esterificación en lípidos neutros (21). Puesto que tanto la actividad de la cPLA₂α como la liberación de AA en estas circunstancias parecen depender de la iPLA₂-VIA, se ha propuesto que ésta última actúa con anterioridad a la cPLA₂α en la formación de las LD. (21). Estos datos estarían de acuerdo con los hallazgos que muestran que la síntesis de TAG, mediada por iPLA₂-VIA, se produce antes de la propia formación de LD y, a su vez, sugieren una función reguladora de iPLA₂-VIA más allá de la de simplemente proporcionar ácidos grasos libres para la síntesis de TAG (21).

El otro miembro ampliamente estudiado de la familia iPLA₂ es la enzima de grupo VIB, iPLA₂γ. Su localización en el peroxisoma y la membrana mitocondrial sugiere que esta enzima puede estar involucrada en la integración del metabolismo de los lípidos y la obtención de energía (129). Se ha descrito que una breve restricción calórica induce la liberación de ácidos grasos de fosfolípidos y la acumulación de TAG en células de miocardio mürido, como mecanismo de suministro de energía a las células (173). La sobreexpresión de la iPLA₂γ en estas células aumenta tanto la liberación de los ácidos grasos de los fosfolípidos como

la acumulación de TAG después de una restricción calórica. Esto se produce por un funcionamiento incompleto de la β -oxidación de los ácidos grasos debido a fallos funcionales de las mitocondrias en estas células, lo que lleva a su almacenamiento en LD citoplasmáticas para evitar la lipotoxicidad (174).

Se ha encontrado la presencia de sPLA₂ en lesiones ateroscleróticas, probablemente procedentes de monocitos/macrófagos, y se ha propuesto un papel para estas enzimas en la aparición y progresión de la enfermedad (103, 104). Desde un punto de vista general, las sPLA₂ pueden modificar las lipoproteínas nativas en circulación mediante la hidrólisis de sus fosfolípidos, generando así ácidos grasos libres y lisofosfolípidos que cambian el tamaño, la carga eléctrica, la susceptibilidad a la oxidación y/o el estado de agregación de las partículas de lipoproteínas nativas. Estos cambios facilitan su internalización por los macrófagos, lo que da lugar a la acumulación de LD y a la formación de células espumosas. Los estudios *in vitro* han demostrado que entre todas las sPLA₂ supuestamente implicadas en la progresión de la aterosclerosis, la enzima del grupo X es la enzima hidrolítica más potente, seguida de los grupos V y III. Los grupos IIA, IIE y IIF exhiben bajas tasas de hidrólisis de partículas LDL (103).

La sPLA₂ de grupo IIA constituye un caso especial entre las sPLA₂ porque sólo hidroliza una pequeña cantidad de fosfolípidos dentro de las LDL debido a su preferencia por los fosfolípidos que contienen grupos de cabeza aniónicos (128, 129). A pesar de este potencial reducido para hidrolizar LDLs, comparado con otros sPLA₂s (175), esta enzima también se ha relacionado fuertemente con la aparición y la progresión de la aterosclerosis (176), ya que facilita la migración de las partículas de LDL al subendotelio (101, 175).

Por lo tanto, las PLA₂ contribuyen al metabolismo de las LD de numerosas maneras y desempeñan importantes funciones como moderadores de los flujos metabólicos y de la señalización de los mediadores de lípidos.

2.6. Gotas lipídicas como fuente de ácido araquidónico

Varios estudios basados en la inhibición y localización de la cPLA₂α, han indicado que la cPLA₂α es probablemente la responsable de la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de las LD (Fig. I.2.5.). Sin embargo, aún no se ha podido demostrar que la cPLA₂α pueda hidrolizar las moléculas de fosfolípidos en la superficie de las LD. En este escenario, los TAG podrían servir simplemente como depósitos de reserva de AA que no se ha incorporado en fosfolípidos (177). De modo similar, el enriquecimiento de TAG con AA en las células inmunes también ha sido sugerido como sumidero para limitar el nivel del ácido graso en fosfolípidos, con el fin de reducir la respuesta inflamatoria (178, 179). Sin embargo, las vías enzimáticas y los mecanismos reguladores que rigen la remodelación de los niveles de ácido graso en PL y TAG no se han identificado.

Una serie de estudios han demostrado que la activación de cPLA₂α es necesaria para biogénesis de LD en células sometidas a estrés, por lo que lo más probable es que participe en la remodelación de la membrana fosfolipídica del RE para facilitar la expansión de las LD (26, 27, 33, 159). También es posible que la translocación de la cPLA₂α a la superficie de las LD y su participación en las reacciones de desacilación/reacilación de los fosfolípidos permitan su colaboración tanto en la biogénesis de las LD como en la liberación de AA como mediador lipídico (33).

Por otro lado, sería de gran interés estudiar si el AA, que se acumula en los lípidos neutros dentro de las LD, también puede movilizarse durante la inflamación. Esto constituiría una segunda vía, no caracterizada hasta ahora, para la movilización de AA, alternativa a la movilización "clásica" de AA impulsada por la fosfolipasa A₂ de los fosfolípidos. Algunos estudios sopesan la idea de que la ATGL pueda estar implicada en la liberación de AA y la posterior formación de eicosanoides (126). Sin embargo, otros estudios sugieren que esta

liberación de AA tras la activación inflamatoria sólo proviene de la fracción fosfolipídica (179) (Fig. I.2.5).

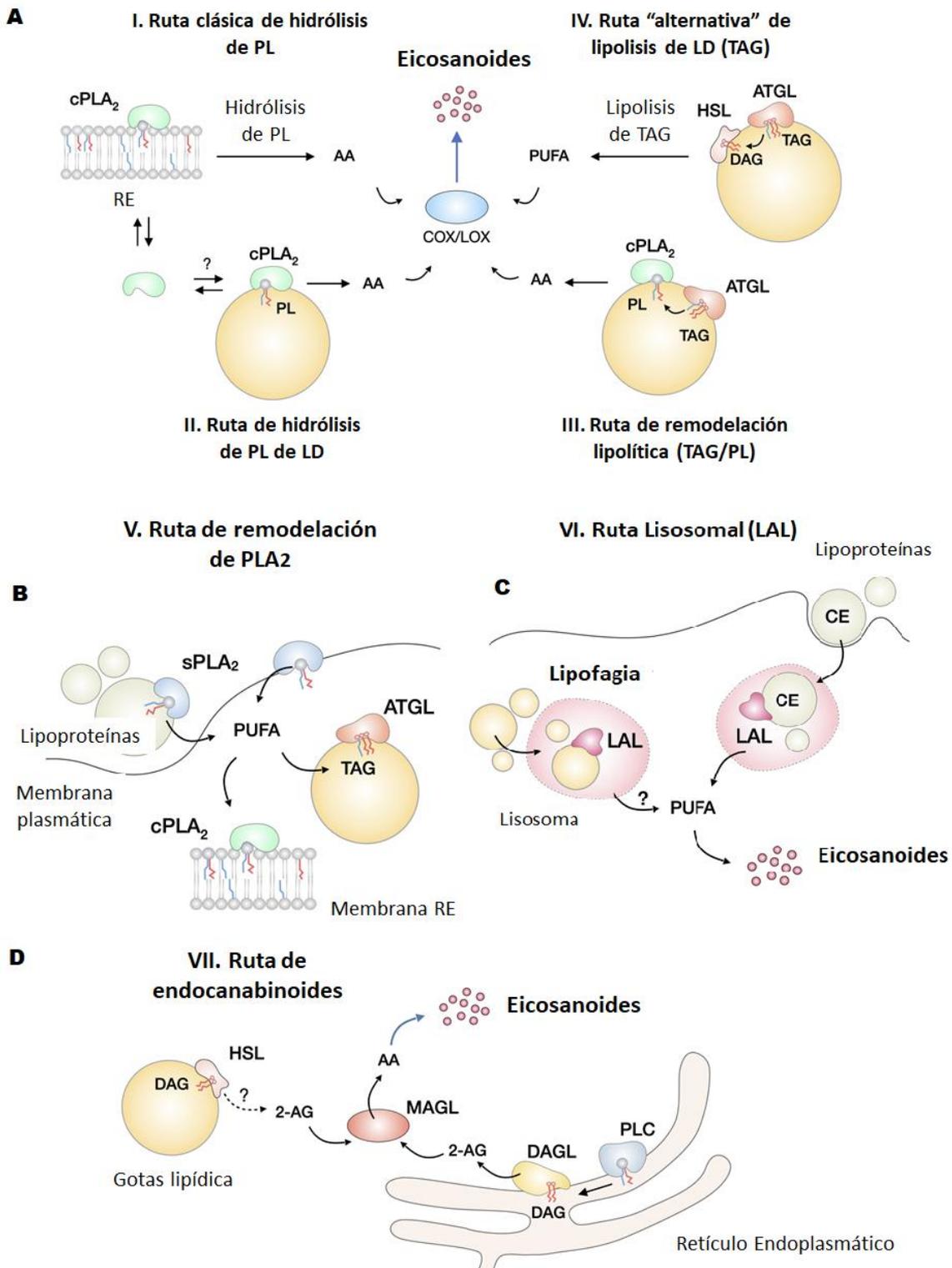


Fig. I.2.5. Fuentes celulares de AA para la producción de mediadores lipídicos. (A) La hidrólisis de los fosfolípidos de membrana por la cPLA₂ se considera la principal fuente de AA (ruta I). La cPLA₂ encontrada en las LD sugiere que puede liberar AA de la monocapa fosfolipídica (ruta II).

Los PUFAs podrían ser liberados por la ATGL y la HSL de las LD (ruta IV), o bien ser reacidados en fosfolípidos y luego liberados por la cPLA₂ (ruta III). **(B)** Las sPLA₂ liberan PUFAs de las lipoproteínas (ruta V). **(C)** La endocitosis de las lipoproteínas y su degradación lisosómica por la LAL es una fuente de PUFAs para eicosanoides (ruta VI). **(D)** La MAGL es una fuente de AA mediante la hidrólisis del 2-araquidonilglicerol (2-AG) (ruta VII). Adaptada de Jarc y Petan et al (121).

3. ÁCIDO PALMITOLEICO E ISÓMEROS

El ácido palmitoleico (16:1n-7) es el isómero más abundante y, posiblemente por ello, el más estudiado de los ácidos grasos formados por 16 carbonos y una insaturación encontrados en mamíferos. Debido a que en la mayoría de los alimentos este ácido graso es poco abundante, se ha aceptado que en mamíferos proviene, en gran parte, de la acción de la esteroil-CoA desaturasa (SCD) sobre el ácido palmítico (16:0), gracias a su actividad $\Delta 9$ desaturasa (180). En los seres humanos, la biosíntesis del palmitoleico se produce principalmente en el hígado, y secundariamente en las células del tejido adiposo, donde más tarde se incorpora a los PLs, TAGs, y CEs (181, 182).

Otro de los isómeros posicionales del 16:1 es el 16:1n-10 o ácido sapiénico, que fue detectado por primera vez en muestras de cabello y uñas humanos, de ahí su nombre (183). También se ha descrito posteriormente que este ácido graso es un componente menor de los fosfolípidos de la membrana de los glóbulos rojos humanos y de los ésteres de colesterol del plasma (184). Se ha propuesto que la mayoría de este ácido graso proviene de la acción de la FADS2, una $\Delta 6$ desaturasa que actúa sobre el ácido palmítico, ya que tampoco se conocen alimentos con altos niveles de este ácido graso (185).

Otro de los isómeros recientemente detectados es el 16:1n-9 o ácido hipogeico, que se forma por la β -oxidación parcial del ácido oleico (18:1n-9). Ha sido descrito en monocitos y macrófagos espumosos humanos como un posible biomarcador en la detección prematura de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (105).

Aparte de los isómeros ya mencionados, en suero humano se ha encontrado el ácido trans palmitoleico (16:1n-7t), que se cree que puede ser adquirido por la ingesta de algunos productos lácteos y productos vegetales (186).

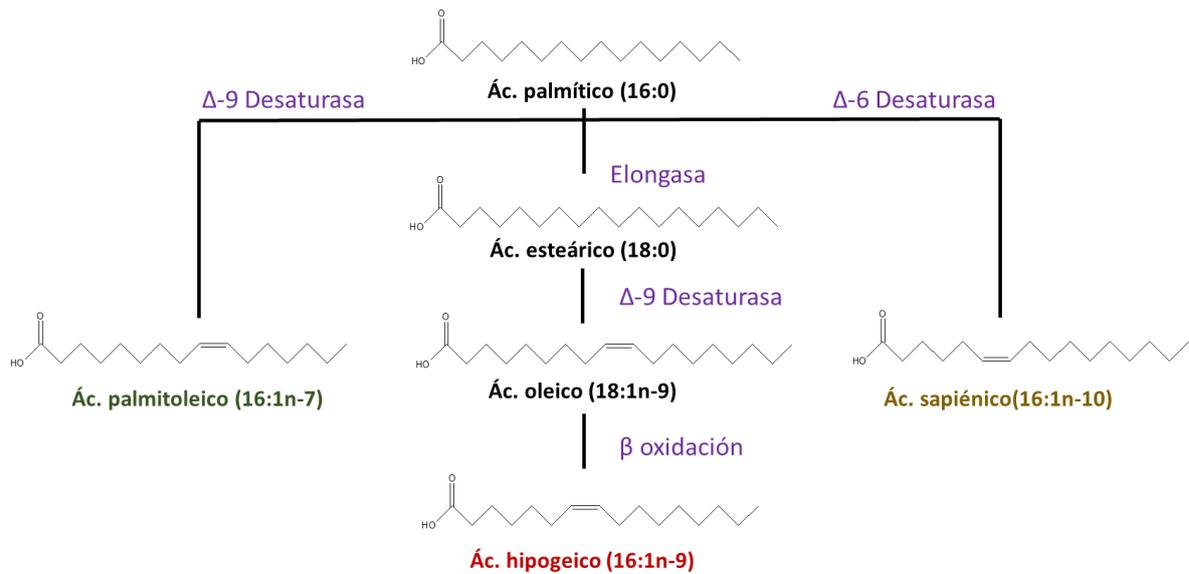


Fig. I.3.1. Biosíntesis de los isómeros de 16:1 a partir del ácido palmítico. La formación de una insaturación en el ácido palmítico por acción de las Δ -9 y Δ -6 desaturasas proporciona los isómeros 16:1n-7 y 16:1n-10 respectivamente. La formación del 16:1n-9 se produce por la β -oxidación parcial del ácido oleico, que se forma a partir de la elongación y la acción de la Δ -9 desaturasa del ácido palmítico.

3.1. Isómeros de 16:1 y desórdenes metabólicos

Desde el punto de vista biofísico, los ácidos grasos monoinsaturados son "buenos" para las membranas biológicas porque, al ser líquidos a temperatura corporal y no oxidarse fácilmente, ayudan a mantener la fluidez de la membrana dentro de los límites apropiados. La proporción de ácidos grasos saturados y no saturados constituye una importante propiedad en la composición de los fosfolípidos de las membranas biológicas. La reducción del número de ácidos grasos insaturados en las membranas puede contribuir al desarrollo de una serie de estados fisiopatológicos, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (187).

En este contexto, un estudio reciente ha demostrado que el enriquecimiento de células Caco-2 (un modelo celular de cáncer de colon humano) con ácido

sapiénico favorece la biosíntesis de su producto de elongación, el 18:1n-10 (8cis-18:1), y de un ácido graso poliinsaturado, el ácido sabaleico (5cis,8cis-18:2), formado a través de la acción consecutiva de la $\Delta 5$ desaturasa tras su elongación. Estos hechos hacen que aumente los niveles de ácidos grasos insaturados en el lipidoma celular, contribuyendo a una mayor fluidez de las membranas y mejorando la supervivencia celular (188).

Por su parte, el isómero 16:1n-7 además de presentar los efectos biofísicos comentados, presenta acciones biológicas únicas como coordinador de respuestas metabólicas, que han llevado a considerarlo como una hormona lipídica o “lipoquina” (189, 190). Estos estudios revelan que, en modelos animales de enfermedad metabólica, el tejido adiposo libera ácido palmitoleico (16:1n-7), que suprime la esteatosis hepática y mejora la sensibilidad a la insulina en todo el organismo. Por lo tanto, este ácido graso podría ayudar a mejorar los trastornos metabólicos (189, 190).

Los trabajos en modelos de ratón generalmente apoyan el papel del 16:1n-7 como un mediador antiinflamatorio con propiedades antidiabéticas (191). En células de origen murino, el 16:1n-7 circulante aumenta la absorción de glucosa y activa la señalización de la insulina, mejorando la función celular y el control glucémico, y aumentando el transporte de glucosa al músculo esquelético. Además, el 16:1n-7 previene la apoptosis y el estrés de RE inducido por el palmitato (189-194) (Fig. I.3.2).

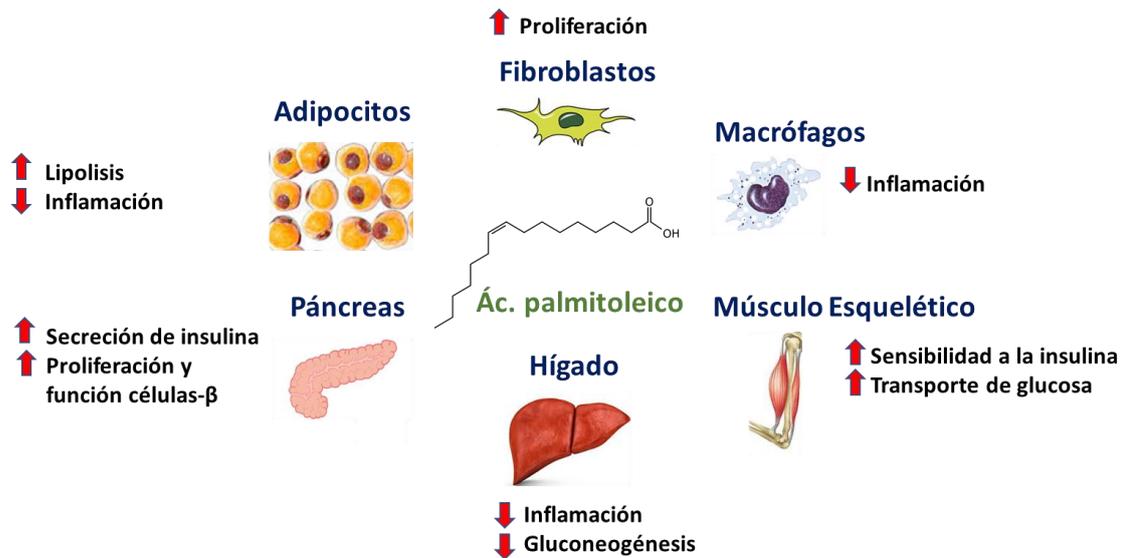


Fig. I.3.2. Funciones biológicas del ácido palmitoleico (16:1n-7) en diferentes sistemas celulares múridos. Diferentes propiedades descritas del ácido graso 16:1n-7 en adipocitos, páncreas, hígado, células del músculo esquelético, fibroblastos y macrófagos.

Los estudios en humanos, sin embargo, han mostrado diferentes resultados (181, 195). Se ha descrito que los niveles circulantes de 16:1n-7 en humanos correlacionan positivamente con el grado de la esteatosis hepática, así como con la deposición de grasa en los hepatocitos (182, 196, 197). Un estudio reciente ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de circulación de 16:1n-7 y marcadores de inflamación en jóvenes canadienses sanos (198). Hasta el momento no se ha logrado proponer una hipótesis mecanicista que pueda ayudar a comprender la variedad de efectos biológicos exhibidos por el 16:1n-7. Sin embargo, el reciente hallazgo de un isómero del 16:1n-7, el *cis*-7-ácido hexadecenoico (16:1n-9) con una potente actividad antiinflamatoria en células inmunes innatas, ha planteado la posibilidad de que la multiplicidad de acción del 16:1n-7 puedan ser debidas, al menos en parte, a la presencia y acción de otros isómeros (como el 16:1n-9) (105, 106).

3.2. Isómeros de 16:1 e inflamación

Cuando se añade exógenamente, el 16:1n-9 exhibe potentes acciones antiinflamatorias *in vitro* e *in vivo*, que se distinguen de las del 16:1n-7 y son comparables en magnitud a las ejercidas por los ácidos grasos de la serie n-3 (105, 106). Monocitos y macrófagos también contienen cantidades significativas del isómero 16:1n-10, que muestra actividad antiinflamatoria, aunque generalmente son necesarias concentraciones más altas que las observadas para 16:1n-7 o 16:1n-9 (106).

En los monocitos se ha estudiado la formación de los isómeros 16:1 con diferentes estímulos, observando que las células expuestas a ácido araquidónico muestran un aumento en los niveles de 16:1n-9 y 16:1n-7 dependiente del tiempo. Por el contrario, los niveles celulares de 16:1n-10 no cambiaron. Estos efectos no se observaron con estímulos proinflamatorios como el lipopolisacárido (LPS), zimósán (Zym) o ionóforo de calcio A23187 (106). A pesar de la importancia de estos isómeros como posibles reguladores de las respuestas inflamatorias, se sabe muy poco sobre la regulación de sus niveles, la distribución y movilización entre las diferentes reservas de lípidos dentro de la célula.

Con respecto al mecanismo por el cual los isómeros del 16:1n-7 tienen efectos en inflamación, se plantea la posibilidad de que estos efectos dependan de su almacenamiento y distribución en diferentes lípidos celulares. En este contexto, estudios realizados en macrófagos tratados con los distintos isómeros del 16:1, mostraron una incorporación casi exclusiva en los fosfolípidos (PL) entre varios lípidos celulares, siendo la mayor incorporación en la fosfatidilcolina (PC). Además, el 90% del total de 16:1 incorporado se encuentra en PC y casi el 80% está presente en la molécula PC(16:0/16:1), lo que sugiere un papel biológico específico para estos PL (106). Por otro lado, es importante destacar que ya se ha demostrado que los PC poliinsaturados son moléculas antiinflamatorias y antioxidantes tanto en modelos animales como en humanos. Además, se ha

descubierto que algunas especies de PC con una composición definida de ácidos grasos ejercen una actividad biológica por sí mismas (199, 200), pero no se conoce suficientemente el trasfondo molecular que subyace a esos efectos.

Por último, recientemente se ha descubierto una nueva familia de lípidos bioactivos, los ácidos grasos esterificados a ácidos grasos hidroxilados (FAHFA) en tejido adiposo, plasma e hígado de ratones y humanos, conteniendo varios de ellos ácido *palmitoleico* (201). Su síntesis está regulada por la ingesta y sus altos niveles están relacionados con una reducción de obesidad y de resistencia a insulina. Además, concentraciones muy bajas de estos compuestos (en el rango micromolar) son capaces de ejercer potentes efectos antiinflamatorios tanto *in vitro* como *in vivo* (reducción de *Il1b*, *Il12a* y *Tnf*), un hecho que sus componentes por separado no son capaces de reproducir, ni siquiera a mayor concentración (201).

Capítulo II.- Objetivos

1. OBJETIVOS

Dado el gran interés generado por los recientes avances científicos acerca de la relación existente entre la acumulación de LD de monocitos circulantes y la aterosclerosis, y dada la posible implicación del ácido araquidónico como uno de los factores clave en la formación de estos monocitos humanos espumosos, el objetivo principal de esta tesis es el estudio del contenido del ácido araquidónico en monocitos humanos espumosos y el metabolismo de éste en condiciones de activación celular. De forma más específica:

- Describir la distribución de AA en diferentes clases de lípidos en monocitos humanos espumosos.
- Elucidar si la actividad biológica descrita del AA es verdaderamente producida por dicha molécula o en cambio, lo es por los derivados oxidados de éste generados espontáneamente.
- Examinar la movilización y liberación de AA de las diferentes clases de lípidos en monocitos humanos espumosos en respuesta a un estímulo inflamatorio.

Por otro lado, teniendo en cuenta la cantidad y diversidad de los efectos biológicos atribuidos al ácido palmitoleico, y la descripción de nuevas funciones biológicas de sus isómeros de doble enlace en células fagocíticas, se ha propuesto el estudio metabólico y funcional de los isómeros 16:1 en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios. De forma más específica los objetivos perseguidos en este punto del trabajo son:

- Analizar la distribución de los isómeros de 16:1 en PLs, evaluar si existe una movilización de éstos en respuesta a estímulos inflamatorios y en caso afirmativo, estudiar las rutas metabólicas implicadas.

- Estudio del metabolismo y la actividad biológica de los isómeros del 16:1 contenidos en PC en la respuesta inflamatoria.

Capítulo III.- Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Cultivo celular

Medio RPMI 1640 (Gibco)

Medio DMEM (Lonza)

Suero Humano (Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León).

Suero fetal bovino (FBS) (Gibco)

Penicilina + estreptomicina (Gibco)

Gentamicina (Lonza)

Ficoll-Paque (GE Healthcare)

Placas y frascos para cultivo celular (BD Biosciences)

Raspadores de células (BD Biosciences)

1.2. Disolventes y reactivos líquidos

i. Extracción, separación y análisis de lípidos

Agua milli-Q, ultrapura (Millipore)

Cloroformo, grado HPLC (Thermo Fisher)

Metanol, grado HPLC (Thermo Fisher)

n-hexano, grado HPLC (Sigma-Aldrich)

Hexanos, mezcla de isómeros, grado HPLC (Sigma-Aldrich)

2-propanol o isopropanol, grado HPLC (Thermo Fisher)

Dietil éter (Scharlab)

Ácido acético, glacial (Scharlab)

Acetonitrilo grado HPLC (Sigma-Aldrich)

ii. Otros usos

Metanol 99.8 %, anhidro (Sigma-Aldrich)

Ácido clorhídrico 35 % (Scharlab)

Etanol, absoluto (Scharlab)

Dimetil sulfóxido (DMSO), extrapuro (Scharlab)

Ácido sulfúrico, extrapuro (Scharlab)

Reactivo de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) (Bio-Rad)

Tritón X-100 (Scharlab)

1.3. Reactivos y productos sólidos

Albúmina de suero bovino (BSA), libre de ácidos grasos y endotoxinas (Sigma-Aldrich)

Acetato de amonio (Sigma-Aldrich)

Hidróxido de potasio (Scharlab)

Yodo (Scharlab)

Dimetil disulfuro (Scharlab)

Tiosulfato de sodio (II) (Sigma-Aldrich)

Ácido bórico (Scharlab)

Cloruro sódico (Scharlab)

Tris-HCl (Scharlab)

Columnas de sílice de extracción en fase sólida (Supelco Discovery DSC-Si, Sigma-Aldrich)

1.4. Gases

Nitrógeno, extrapuro (Air Liquide)

Helio, extrapuro (Air Liquide)

Argón, extrapuro (Air Liquide)

Dióxido de carbono, extrapuro (Air Liquide)

1.5. Estímulos

Zimosán (Sigma-Aldrich)

Manano y laminarina (Sigma-Aldrich)

LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich)

PMA, forbol 12-miristato 13-acetato (Sigma-Aldrich)

Ionóforo A23187 (Sigma-Aldrich)

1.6. Inhibidores

Inhibidor de cPLA2 α (Pirrofenona) (Calbiochem)

Inhibidor de iPLA2 y ATGL (Bromo-enol lactona, BEL) (Cayman)

Inhibidor de iPLA2 (FKGK18) (Sintetizado y proporcionado por el Dr. G. Kokotos; Departamento de Química, Universidad Nacional y Kapodistria de Atenas)

Inhibidor de transacilasa independiente de CoA (SKF98625) (Sintetizado y proporcionado por el Dr. Alfonso Pérez; Departamento de Química Orgánica, Universidad de Valladolid)

1.7. Lípidos

i. Tratamientos celulares

Ácido araquidónico (AA, 20:4 n -6) (Sigma-Aldrich)

Isómeros 1-palmitoil-2-hexadecenoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (PC(16:0/16:1 n -7), PC(16:0/16:1 n -9), PC(16:0/16:1 n -10)) (Sintetizados en el laboratorio)

1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (PC(16:0/18:1)) (Avanti)

1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (PC(16:0/16:0)) (Avanti)

ii. Estándares internos para la espectrometría de masas

1,2-diheptadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PC(17:0/17:0)) (Larodan)

1,2-dipentadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PC(15:0/15:0)) (Sigma-Aldrich)

1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PE(14:0/14:0)) (Sigma-Aldrich)

1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoinositol, sal de amonio (PI(16:0/16:0)) (Cayman)

1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina, sal de sodio (PS(14:0/14:0)) (Avanti)

1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol, sal de sodio (PG(14:0/14:0)) (Cayman)

1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato, sal de sodio (PA(14:0/14:0)) (Sigma-Aldrich)

1,2-diheptadecanoil-*sn*-glicerol (1,2-DAG(17:0/17:0)) (Sigma-Aldrich)

Ácido heptadecanoico (17:0) (Sigma-Aldrich)

1,2,3-triheptadecanoil-*sn*-glicerol (TAG(17:0/17:0/17:0)) (Sigma-Aldrich)

Colesteril erucato (CE(22:1 n -9)) (Sigma-Aldrich)

iii. Patrones para la separación por cromatografía en capa fina

Mezcla de especies de PC, procedente de soja (Sigma-Aldrich)

1,2-dioleil-*sn*-glicerol (1,2-DAG(18:1 n -9/18:1 n -9)) (Sigma-Aldrich)

1,3-palmitoil-2-oleoilglicerol (TAG(16:0/18:1 n -9/16:0)) (Sigma-Aldrich)

Colesteril oleato (CE(18:1 n -9)) (Sigma-Aldrich)

1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (PC(16:0/18:1)) (Avanti)

1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina (PE(16:0/18:1)) (Avanti)

1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina (PS (16:0/18:1)) (Avanti)

Fosfatidilinositol hígado, bovino (PI) (Avanti)

iv. Lípidos marcados isotópicamente

Ácido palmitoleico deuterado (16:1 n -7) (Cayman)

Ácido cis-7-hexadecenoico (16:1 n -9) deuterado (Sintetizado en el laboratorio)

1-palmitoil-2-[3H]palmitoil-glicero-3-fosfocolina, actividad específica 60 Ci x mmol-1) (American Radiolabeled Chemicals)

1.8. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y qPCR

TRIzol® (Thermo Fisher)

Cloroformo, grado biología molecular (Scharlab)

2-propanol o isopropanol, grado biología molecular (Scharlab)

Etanol, grado biología molecular (Scharlab)

Agua dietilpirocarbonato (DEPC), libre de RNAsa (Thermo Fisher)

Kit Verso cDNA (Thermo Fisher)

Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green qPCR Master Mix (Agilent)

1.9. Microscopía de fluorescencia

4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich)

4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentametil-4-Bora-3a,4a-Diazo-s-Indaceno
(BODIPY[®]493/503) (Thermo Fisher)

Anticuerpo monoclonal XP p65 de conejo (D14E12) (Cell Signalling)

Anticuerpo secundario policlonal anti-conejo Fab Alexa 594 (Cell Signalling)

Cubres y portas (Thermo Fisher)

Paraformaldehído (EMS)

1.10. Equipamiento

i. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS)

Agilent 7890A (cromatógrafo de gases) (Agilent)

Agilent 5975C (espectrómetro de masas de cuadrupolo) (Agilent)

Columna Agilent DB23 (60 m longitud x 250 mm diámetro interno, 0.15 mm de espesor de película) (Agilent)

Software del análisis y control: Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation

ii. Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC/MS)

Inyector automático Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher)

Bomba binaria Ultimate HPG-3400SD (Thermo Fisher)

Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QTRAP4500) (AB Sciex)

Fuente de iones Turbo V (AB Sciex)

Sonda TurbolonSpray (AB Sciex)

Columna Fortis HILIC (Fortis)

Columna SUPELCOSIL LC-18 (Sigma-Aldrich)

Software Analyst v.1.5.2 (AB Sciex)

iii. PCR cuantitativa (qPCR)

ABI7500 (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA)

Analysis software: 7500 Software v.2.3

iv. Microscopía confocal fluorescencia

Microscopio confocal Leica TCS SP5X

Software Image J (NIH)

Software análisis de translocación Cell profiler (Broad Institute of Harvard y MIT)

v. Otros

Sonicador: Vibracell™ 75115 (Bioblock Scientific)

Espectrofotómetro: BioPhotometer Plus (Eppendorf)

Cuantificación de RNA: Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher)

Evaporación de los disolventes: Concentrator 5301 (Eppendorf)

Balanza de precisión: Explorer Pro (Ohaus)

Placas de cromatografía en capa fina: Fungicrom Separating Chambers (Fungilab)

Termobloque: Thermoblock (Grant)

Baño de agitación: SW22 (Julabo)

Medida de radiactividad por contaje de centelleo: LS 6500 (Beckman Coulter)

1.11. Material biológico

Los experimentos con macrófagos peritoneales residentes de ratones se realizaron con la cepa Swiss Webster, criados en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Se utilizaron ratones machos y hembras con edades comprendidas entre las 10-12 semanas por igual, sin mezclar los sexos en el mismo experimento. Los ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura constante (21-24 °C), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y fueron alimentados *ad libitum* con una dieta especial para animales de laboratorio y con libre acceso a agua estéril. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Valladolid y de acuerdo con la legislación española y europea sobre investigación animal.

Los experimentos realizados con monocitos humanos extraídos de sangre periférica de las células sanguíneas se purificaron de la mezcla de 5 capas leucocitarias (*buffy coats*) de donantes sanos del grupo sanguíneo O⁺, proporcionadas por el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.

Las células de macrófagos RAW264.7 fueron proporcionadas por *American Type Culture Collection*.

2. Métodos

2.1. Aislamiento y cultivo de células

i. Extracción de monocitos humanos de sangre periférica

La sangre se diluyó con PBS en una proporción 1:1 (v/v) y se traspasó suavemente sobre una fase de Ficoll-Paque en una proporción 2:1 (v/v). Se centrifugó a $750 \times g$ durante 30 minutos sin freno para separar las células mononucleares del plasma y los glóbulos rojos. Se recogió el anillo de células correspondientes a las células mononucleares y se lavó 3 veces con PBS centrifugando a $450 \times g$ durante 10 minutos ya con freno. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con gentamicina a una concentración de $40 \mu\text{g/ml}$ y se plaquearon en placas de cultivo primario, a razón de 40 millones de células por placa. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera húmeda con una proporción de CO_2/aire de 1:19 durante al menos 2 h para permitir que se adhieran las células. Las células no adheridas se eliminaron lavando las células con PBS y los monocitos adheridos restantes se utilizaron al día siguiente (14).

ii. Extracción de macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos peritoneales residentes de los ratones se obtuvieron mediante un lavado peritoneal utilizando 5 ml de PBS estéril frío. Para ello, los ratones fueron sacrificados tras inhalación de CO_2 , se les retiró la piel abdominal y se les realizó la inyección de la solución salina con un breve masaje. Posteriormente, se extrajo el PBS que contiene los macrófagos de la cavidad del peritoneo y se lavaron las células 2 veces con PBS mediante centrifugación a $300 \times g$ durante 10 minutos (202).

Las células se sembraron a 2×10^6 por pocillo (placas de 6 pocillos) en 2 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado

por calor, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, y se dejaron adherir durante 20 h en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂ a 37 °C. Los pocillos se lavaron ampliamente para eliminar las células no adherentes. Los macrófagos adheridos se utilizaron para la experimentación.

iii. Cultivo de la línea celular RAW264.7

El cultivo de estas células adherentes fue llevado a cabo mediante el uso del medio de cultivo DMEM enriquecido con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células son mantenidas en un incubador en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37 °C manteniendo una concentración mínima de 0,05 millones de células por cm² y una máxima de 0,26 millones de células por cada cm². Esto se produce cada 48-72 h (203).

2.2. Tratamientos celulares

i. Estímulos e inhibidores

En los casos de macrófagos peritoneales de ratón se encuentran en cultivo con un medio con suero, éste se sustituyó por medio sin suero durante 1 hora antes de la adición del tratamiento.

Para los monocitos humanos, que siempre se encuentran en medio sin suero, se retiró el medio, se lavaron una vez con PBS y se volvieron a cubrir con medio sin suero al menos 30 minutos antes del ensayo.

En las células RAW264.7 se sustituyó el medio con suero 1 h antes de los diferentes tratamientos por un medio enriquecido con 0,5% (v/v) de suero. Para favorecer la incorporación de los fosfolípidos indicados en estas células se añadió al medio de cultivo una cantidad de albúmina, libre de ácidos grasos, con una concentración final de 0,2% (v/v) del medio utilizado.

En los experimentos donde se usaron inhibidores químicos, éstos se añadieron 30 minutos antes de los estímulos indicados.

Cuando se trataron las células con ácidos grasos disueltos en etanol y/o con inhibidores disueltos en dimetil sulfóxido nunca se superaron las proporciones 1:1000, respecto al volumen total de medio en el que se encontraban las células. De igual manera se añadieron los mismos volúmenes de ambos disolventes a las células control en cada caso.

ii. Preparación de zimosán y zimosán opsonizado

Para la preparación del zimosán, las partículas se resuspendieron en PBS y se hirvieron durante 60 minutos a 100 °C, tras lo cual se centrifugaron durante 30 minutos a 3220 x g y se lavaron tres veces. El pellet se resuspendió a 20 mg/ml en PBS y se congeló hasta su uso. El zimosán se sonicó tres veces durante 15 s y se diluyó en medio libre de suero antes de añadirlo a las células (204).

Para la preparación del zimosán opsonizado, el zimosán resuspendido en PBS se hizo precipitar y fue resuspendido en suero humano sin inactivar en una proporción de 10 mg por ml de suero. Se mantuvo durante 20 min a 37 °C agitando cada 5 minutos. Posteriormente, se lavó con PBS y se sonicó tres veces durante 15 s en el medio utilizado para sus tratamientos (205).

2.3. Análisis de lípidos

i. Extracción de lípidos:

Los lípidos totales se extrajeron según Bligh y Dyer (206). Las células se rasparon con H₂O/MeOH 1:1 (v/v), y se añadieron estándares internos. A continuación, se añadieron 3,75 volúmenes de cloroformo/metanol 1:2 (v/v), en relación con el volumen de la fase acuosa inicial. Tras agitar enérgicamente, se incorporaron 1,25 volúmenes de H₂O y 1,25 volúmenes de cloroformo.

Las muestras se agitaron y se centrifugaron durante 5 minutos a $9300 \times g$ a 15°C para separar las fases. Los lípidos que quedaban en la fase orgánica inferior se recogieron y se realizó una segunda extracción añadiendo 2 volúmenes de cloroformo a la fase acuosa. Tras repetir el proceso, la fase orgánica se combinó con la anterior y se evaporó por centrifugación al vacío obteniendo el extracto lipídico total de las células.

ii. Separación de extractos lipídicos por cromatografía en capa fina:

La separación de los diferentes extractos lipídicos en las diferentes clases de lípidos fue llevada a cabo por cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de sílice como fase estacionaria. Las placas son secadas por calor a 70°C durante al menos 1 hora. Para cargar las muestras en las placas cromatográficas, los extractos lipídicos se resuspenden en $20 \mu\text{l}$ de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se cargan los patrones correspondientes.

- En el caso de separación de lípidos neutros se empleó una fase móvil con una mezcla de n-hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (v/v) (207).
- En el caso de la separación de diferentes clases de fosfolípidos se utilizó una fase móvil de cloroformo/metanol/28% hidróxido de amonio 60:37.5:4 (v/v) la cual se pasa dos veces por la TLC, pretratada con ácido bórico, con un periodo de secado intermedio (208).

Las zonas donde se encuentran las clases de lípidos separadas de cada muestra se rasparon de la placa. La extracción de los lípidos adsorbidos se realiza utilizando 1 ml de cloroformo/metanol 1:1 (v/v) y 1 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v).

iii. Derivatización de ácidos grasos a ésteres metílicos:

Los ácidos grasos no pueden ser analizados de forma directa por GC/MS al no ser lo suficientemente volátiles para ser transportados por la fase gaseosa a lo

largo de la columna. Para ello, se requiere de un paso de derivatización química anterior al análisis por GC/MS que permite, por una parte, separar los ácidos grasos del esqueleto de glicerol o colesterol en el que se encuentran esterificados, y por otra parte, convertirlos en compuestos más estables y volátiles para su mejor separación en columna e ionización.

Los extractos lipídicos se disuelven en 100 μ l de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se pasan a tubos de cristal. Seguidamente se añaden 1 ml de 0.5 M KOH en metanol anhidro y se dejó reaccionar en baño con agitación a 37 °C durante 1 hora. La reacción se neutraliza con 1 ml de 0.5 M HCl en solución acuosa y los ésteres metílicos de ácidos grasos se extraen con 2 ml de n-hexano que tras centrifugar a 800 x g durante 5 minutos a 16 °C se obtiene la fase orgánica donde se encuentran los FAMES (14, 156).

iv. Derivatización de los ésteres metílicos de los ácidos grasos a dimetildisulfuros para el análisis de los diferentes isómeros de 16:1 por GC-MS

Los aductos de dimetilsulfuros se llevaron a cabo bajo el procedimiento descrito por Sansone et al. (209) con pequeñas modificaciones (130). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos disueltos en hexano se traspasan a un vial de teflón, a los cuales se añaden 50 μ l de una disolución al 6% de yodo en éter (v/v) y 100 μ l de dimetildisulfuro. Los viales se purgan con nitrógeno y se dejan en agitación a 40 °C toda la noche. Al día siguiente se procede a la extracción añadiendo 1 ml de hexano y 1 ml de tiosulfato de sodio al 5% (v/v). Tras una fuerte agitación, la muestra es centrifugada y es recogida la fase orgánica donde se encuentran los derivados de DMDS. Posteriormente se seca la fase orgánica con sulfato de magnesio anhidro, concentrado y analizado por un análisis de GC/MS utilizando prácticamente el mismo protocolo de análisis utilizado para los ésteres metílicos. En este caso la rampa de temperatura es de 10 °C/min hasta los 250 °C, y esta

temperatura se mantiene durante 20 min para poder separar los derivados de DMDS de los 16:1, identificados por los diferentes espectros de fragmentación.

v. Análisis de ésteres metílicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas:

El análisis de los ésteres metílicos se lleva a cabo por GC/MS usando un equipo de cromatografía de gases Agilent 7890A acoplado a un detector de masas Agilent 5975C que opera en modo de impacto electrónico (EI, 70 eV) con inyección automática Agilent 7693. La columna usada para la separación de FAME es un modelo Agilent DB23 (60 m longitud x 0.250 mm diámetro interno, 0.15 mm de espesor de película) cuya fase estacionaria es de (50 %-cianopropil)-metilpolisiloxano. Se inyectó 1 µl de muestra en modo splitless. La temperatura de entrada se mantuvo a 250 °C. La temperatura del horno se mantuvo a 50 °C durante 1 min, luego se aumentó a 175 °C a intervalos de 25 °C por minuto, y a 230 °C a intervalos de 2,75 °C por minuto. La temperatura final se mantuvo durante 5 minutos, y el tiempo de ejecución fue de 33 minutos. La línea de transferencia de la espectrometría de masas se mantuvo a 250 °C y el cuadrupolo y la fuente del espectrómetro de masas a 150 °C y 230 °C. Se utilizó helio como gas portador a una presión constante de 180 kPa. La adquisición de datos se llevó a cabo tanto en modo de barrido como de monitorización de iones seleccionados (SIM). El modo de barrido se utilizó para la identificación de los compuestos, comparándolos con los estándares auténticos de FAME y con los espectros de la biblioteca del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología). El modo SIM se utilizó para la cuantificación, utilizando los fragmentos 74 y 87 para los saturados, 83 para los monoinsaturados, 67 y 81 para los diinsaturados y 79 y 91 para los ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados. Para las curvas de calibración se utilizó una mezcla de 37 componentes de Supelco. El análisis de los datos se realizó con el software Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation (14, 156).

vi. Análisis de especies de fosfolípidos por cromatografía de lípidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Esta técnica se usa para determinar todas las especies moleculares de PC, PE, PI, PS, PA y PG. A los extractos de lípidos correspondientes a 10×10^6 células se añadieron los estándares internos antes mencionados. Las muestras se redisolviéron en 50 μ l de hexanos/2-propanol/agua (42:56:2, v/v/v), y se inyectaron 40 μ l en un cromatógrafo líquido de alto rendimiento de Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 con un inyector automático Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher) equipado con una bomba binaria Ultimate HPG-3400SD (Thermo Fisher). La columna era una FORTIS HILIC (150 \times 3 mm, tamaño de partícula de 3 μ m) (Fortis Technologies), protegida con un cartucho Supelguard LC-Si (20 mm \times 2,1 mm) (Sigma-Aldrich). La fase móvil fue un gradiente de disolvente A (hexanos/2-propanol, 30:40, v/v) y disolvente B (hexanos/2-propanol/20 mM de acetato de amonio en agua, 30:40:7, v/v/v). El gradiente comenzó en el 75% A desde cero hasta 5 min, luego disminuyó del 75% A al 40% A a los 15 min, del 40% A al 5% A a los 20 min, manteniéndose en el 5% hasta los 40 min, y aumentando al 75% a los 41 min. A continuación, la columna se reequilibró al 75% A durante 14 minutos más antes de la siguiente inyección de la muestra. El flujo a través de la columna se fijó en 0,4 ml/min y se inyectaron 40 μ l del extracto lipídico. Este flujo entró en la interfaz de ionización por electrospray de un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo Sciex QTRAP 4500 operado en modo de iones negativos (AB Sciex). Los parámetros de la fuente fueron los siguientes: tensión de pulverización de iones, -4500 V; gas de cortina, 20 psi; gas de nebulización, 50 psi; gas de desolvatación, 60 psi; temperatura, 425 °C. Los parámetros de los compuestos se fijaron como sigue: potencial de declusión; -45 V (glicerofosfolípidos de colina), -60 V (glicerofosfolípidos de etanolamina) -30 V (fosfatidilinositol), -50 V (fosfatidilserina), -60 V (ácido fosfatídico), -50 V (fosfatidilglicerol); energía de

colisión -50 V (glicerofosfolípidos de colina), -40 V (glicerofosfolípidos de etanolamina), -60 V (fosfatidilinositol), -50 V (fosfatidilserina), -45 V (ácido fosfatídico), -45 V (fosfatidilglicerol); potencial de entrada, -10 V; y potencial de salida de la célula de colisión, -8 V. La caracterización de las especies de fosfolípidos se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los que producen estándares analíticos homólogos, así como mediante experimentos de fragmentación por disociación inducida por colisión (CID, Collision-Induced Dissociation) en ionización negativa con un método de MRM, detectando en Q3 los m/z de 253,4 y 303,4 correspondientes a 16:1 y AA, respectivamente, como $[M-H]^-$. Todos los glicerofosfolípidos se detectaron como iones $[M-H]^-$ excepto para los iones de fosfatilcolina que fueron detectados como el aducto $[M + CH_3COO]^-$. La cuantificación se realizó integrando los picos cromatográficos de cada especie y comparándolos con el área del pico del patrón interno que corresponde a cada clase de fosfolípido (14, 139, 205, 210-212).

vii. Análisis de especies oxidadas de ácido araquidónico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Se inyectó un volumen de 90 μ l de la muestra diluida en el eluyente A en un cromatógrafo líquido de alta resolución Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 con un inyector automático Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher) equipado con una bomba binaria Ultimate HPG-3400SD (Thermo Fisher). La columna era una LC-18 (SUPELCOSIL) (250 \times 2,1 mm, tamaño de partícula de 5 μ M) protegida con un cartucho protector Supelguard LC-18 (20 \times 2,1 mm) (Sigma-Aldrich). Las fracciones oxidadas se separaron según el procedimiento descrito por Dumlao et al. (213), con pequeñas modificaciones. La fase móvil consistió en un gradiente de disolvente A (agua/acetonitrilo/ácido acético, 70:30:0,02, en volumen) y disolvente B (acetonitrilo/isopropanol, 50:50, en volumen). El gradiente se inició con el 100% del disolvente A, que se redujo linealmente al 75% a los 3 min, al 55% a los 11 min, al 40% a los 13 min, al 25% a

los 18 min y al 10% a los 18,5 min. La última mezcla de disolventes se mantuvo durante 1,5 minutos más; finalmente, la columna se reequilibró con el 100% de disolvente A durante 10 minutos antes de la siguiente inyección de muestra. El flujo a través de la columna se fijó en 0,6 ml/min, y este flujo entró en la interfaz de ionización por electrospray de un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo Sciex QTRAP 4500 operado en modo de iones negativos (AB Sciex). Los parámetros de la fuente se ajustaron como sigue: tensión de pulverización de iones, -4500 V; gas de cortina, 30 psi; gas de nebulización, 50 psi; gas de desolvatación, 60 psi; temperatura, 550 °C. Las moléculas oxidadas y no oxidadas se analizaron como iones [M-H]⁻. La identificación de las especies de oxidadas de ácido araquidónico se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los datos bibliográficos, así como mediante su comparación de los experimentos de fragmentación de las muestras en ionización negativa con un método de fragmentación específica de los m/z correspondientes a las especies oxidadas de AA (m/z = 317, 319, 335). La cuantificación se realizó integrando los picos cromatográficos de cada especie en modo de escaneo completo y se compararon con sus correspondientes líneas de calibrado.

viii. Análisis de FAHFA por LC/MS

La determinación de FAHFA por LC/MS se llevó a cabo según Zhang et al. (214), modificado por Rodríguez et al. (215). Los extractos de lípidos totales se redisolviéron en 500 µl de cloroformo y se cargaron en columnas de sílice de extracción en fase sólida (Supelco Discovery DSC-Si, Sigma-Aldrich) que habían sido previamente acondicionadas haciendo pasar 15 ml de n-hexano. Los lípidos neutros se eluyeron con 5 ml de n-hexano/acetato de etilo (95:5, v/v). Los FAHFA se eluyeron con 4 ml de acetato de etilo y se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno. El aislamiento cuantitativo de los FAHFA por este método se confirmó utilizando un estándar de 9-PAHSA. La fracción de FAHFA se redisolvió en 50 µl de metanol y se inyectaron 40 µl al LC/MS. Los análisis se realizaron utilizando

un cromatógrafo líquido de alto rendimiento Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 equipado con una bomba binaria estándar Ultimate HPG-3400SD y un automuestreador Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Sciex QTRAP 4500 operado en modo de iones negativos (AB Sciex). El flujo total a través de la columna fue de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, con 93:7 MeOH:H₂O con 5 mM de acetato de amonio y 0,01% de hidróxido de amonio como disolvente. El tiempo total de funcionamiento fue de 60 minutos. Los parámetros de la fuente fueron los siguientes: tensión de pulverización de iones, -4500 V; gas de cortina, 30 psi; gas de nebulización, 50 psi; gas de desolvatación, 60 psi; temperatura, 500 °C. Para la medición cuantitativa de las especies de FAHFA derivadas de 16:1, el instrumento se ajustó al modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), seleccionando tres transiciones para cada FAHFA: ion padre \rightarrow ácido graso hidróxido, ion padre \rightarrow ácido graso hidróxido menos la pérdida de agua e ion padre \rightarrow m/z del ácido graso esterificado como ion carboxilato.

2.4. Análisis de LD por microscopía confocal

Una vez plaqueadas y tratadas las células en los cristales para microscopía en placas de 6 pocillos, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % (v/v) en PBS con sacarosa al 3 % (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la eliminación del medio de la fijación, se realizaron repetidos lavados con PBS, las células fueron teñidas con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) y los lípidos neutros con BODIPY 498/503 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS). Por último se montaron los cristales en los portas de microscopía con Gelvatol. El contenido de LD se examinó con un microscopio confocal Leica TCS SP5X (Wetzlar, Alemania), utilizando un objetivo HCX PL APO CS de inmersión en aceite, 63 \times , 1,4 NA. La fluorescencia de BODIPY 498/503 se monitorizó con un láser de luz blanca que excitaba a 490

nm, y la emisión de fluorescencia se recogió entre 502 nm y 555 nm. La fluorescencia de DAPI se excitó con un láser de diodo azul a 405 nm y la emisión se recogió entre 439 nm y 4787 nm. La cuantificación de la fluorescencia de no menos de 150 células por condición se analizó utilizando el software ImageJ (versión 1.52a).

2.5. Estudios de inhibición de iPLA₂-VIA con oligonucleótidos antisentido

El oligonucleótido antisentido iPLA₂-VIA utilizado en este trabajo ha sido descrito en estudios anteriores (216-221). La secuencia antisentido de iPLA₂-VIA (CTC CTT CAC CCG GAA TGG GT) corresponde a los nucleótidos 59-78 de la secuencia murina de iPLA₂-VIA. Como control, se utilizó el complemento en sentido (ACC CAT TCC GGG TGA AGG AG). Tanto los oligonucleótidos en sentido como en antisentido contenían enlaces de fosforotioato para limitar la degradación. Los oligonucleótidos se mezclaron con Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tratamiento con oligonucleótidos y las condiciones de cultivo no fueron tóxicos para las células, según se evaluó mediante el ensayo de exclusión del colorante azul tripán y la cuantificación de la proteína celular adherida.

Para la actividad PLA₂ independiente del Ca²⁺, los homogeneizados de células RAW264.7 fueron despojados de sus núcleos por precipitación por centrifugación y posteriormente incubados durante 2 h a 37 °C en 100 mM de HEPES (pH 7,5) que contenían 5 mM de EDTA y 100 μM de sustrato fosfolipídico marcado radiactivamente (1-palmitoil-2-[³H] palmitoil-glicero-3-fosfocolina, actividad específica 60 Ci x mmol⁻¹); (American Radiolabeled Chemicals) en un volumen final de 150 μL. Antes del ensayo las membranas sustrato fueron calentadas a 57 °C durante 5 min para inactivar la transacilasa independiente de CoA (155). El sustrato fosfolipídico se utilizó en forma de vesículas sonicadas en

tampón. Las reacciones se pararon añadiendo 3,75 volúmenes de cloroformo/metanol (1:2). Tras la extracción de los lípidos, se separó el ácido [³H]palmítico libre por TLC utilizando n-hexano / éter etílico/ ácido acético (70:30:1) como fase móvil y se midió la presencia de ácido [³H]palmítico por conteo de centelleo (218).

2.6. Translocación de NF- κ B

Las células fueron sembradas y tratadas en cristales en placas de 12 pocillos. Para la tinción inmunofluorescente, las células de los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4 % (v/v) a temperatura ambiente durante 15 minutos y se permeabilizaron con PBS que contenía 0,3% (v/v) de TritonX-100 durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, las muestras se lavaron dos veces con PBS, seguido de un bloqueo con PBS que contenía 10% de suero normal de cabra durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal de conejo contra la subunidad p65 de NF- κ B (Cell Signaling #8242) a dilución 1:200 en 1% (v/v) de NGS, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal anti-conejo (Fab Alexa Fluor 594) a dilución 1:2000 en PBS durante 1h. A continuación, se incubaron las células con 4', 6-diamidino-2-fenilina-dole (DAPI, 1 mg/ml) durante 5min a temperatura ambiente. Tras varios lavados, se montaron sobre los portaobjetos para utilizarlos en la microscopía. La localización subcelular de p65 y DAPI se visualizó utilizando un microscopio confocal (TCS SP5X; Leica) y el índice de translocación se calculó por la ratio de la cantidad de píxeles de la zona marcada con p-65 con la cantidad de píxeles de la zona marcada con núcleo-DAPI con el software CellProfiler. Se tomaron tres fotografías por condición, en las que hay entre 80 y 100 células y están distribuidas en los cristales de forma similar en todas las condiciones.

2.7. Análisis de expresión de genes por RT-qPCR

i. Extracción de ARN

El ARN de las células se extrajo utilizando el reactivo TRIzol™ (Ambion, Thermo Fisher Scientific) que es una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En resumen, para una extracción del ARN se añadió cloroformo, se mezcló enérgicamente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C para separar una capa acuosa superior clara (que contiene ARN), una interfase y una capa orgánica inferior. A continuación, se precipitó el ARN de la capa acuosa añadiendo isopropanol incubando la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugándola a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet de ARN se lavó con etanol al 70 % (v/v) preparado en agua libre de nucleasas. El pellet se secó al aire y se resuspendió en agua libre de nucleasas. La concentración de ARN se midió por espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Las relaciones 260/280 y 260/230 se utilizaron como indicadores de la pureza del ARN.

ii. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La PCR de transcripción inversa se utiliza para obtener una cadena de ADN a partir de una cadena de ARN utilizando una enzima de transcripción inversa. En este trabajo se utilizó el kit de síntesis Verso cDNA (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezcló el ARN (1 µg) con tampón de síntesis, una mezcla de dNTP, cebadores oligo dT anclados (para transcribir específicamente las cadenas de ARN mensajero o ARNm), un potenciador (que elimina el ADN contaminante), la mezcla de enzimas Verso (que contiene la transcriptasa inversa Verso y un inhibidor de la ARNasa) y agua

libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 1 hora a 42 °C y la reacción se detuvo calentando a 95 °C 2 minutos. El ADN complementario se conservó a -20 °C hasta su utilización.

iii. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR)

En este trabajo, la detección de los productos de la PCR, al final de cada ciclo de amplificación, se llevó a cabo mediante un tinte fluorescente que se intercala con el ADN de doble cadena, el verde SYBR.

La amplificación del ARN mensajero de interés se logró utilizando cebadores específicos listados en la tabla 1. Para la cuantificación del ADN mediante esta metodología, se obtiene el número de ciclos en los que la fluorescencia supera un umbral seleccionado (Ct, cycle threshold). El umbral es el nivel de señal que refleja un aumento estadísticamente significativo respecto a la señal de referencia, para que la señal de amplificación pueda distinguirse del fondo. Para el análisis de la expresión génica se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (222). En él, los valores Ct de un gen de referencia se restan a los Ct del gen de interés, con el fin de normalizar la variación en la cantidad de ADN entre las muestras. El gen de referencia utilizado en este trabajo fue *Gapdh* de ratón. Los valores de ΔCt obtenidos se normalizan entonces a una de las condiciones, que en este trabajo fue la condición no tratada de las células de control. Los datos se representan como expresión relativa de ARNm.

La qPCR se realizó a partir de 20 ng de ADNc utilizando el Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente protocolo (223):

1. 95 °C 3 min para la desnaturalización inicial
2. 40 ciclos de amplificación:

- 2.1. 95 °C 12 s para la desnaturalización
- 2.2. 60 °C 16 s para la hibridación
- 2.3. 72 °C 28 s para la extensión y recogida de datos
3. 72 °C 1 min para la extensión final
4. Curva de disociación:
 - 4.1. 95 °C 15 s
 - 4.2. 60 °C 60 s
 - 4.3. 95 °C 30 s
 - 4.4. 60 °C 15 s
5. 4 ° C ∞

Tabla III.2.7.1.- Relación de oligonucleótidos cebadores directos e inversos usados para la amplificación de ADNc por PCR.

Gen de ratón	Cebador Directo (5'-3')	Cebador Reverso (5'-3')
Interleuquina 6 (Il6)	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
Factor de necrosis tumoral alfa (Tnf)	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG
Gliceraldehído- 3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh)	GGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

2.8. Medición de proteína

Para el análisis lipídico, los homogeneizados celulares se sonicaron tres veces al 23% durante 15 segundos. La proteína se cuantificó mediante el método Bradford (224) utilizando un kit comercial (BioRad Protein Assay). Se trata de un método colorimétrico basado en el cambio máximo de absorbancia de 465 a 595 nm que experimenta el Azul de Coomassie G- 250 cuando interactúa con las proteínas de forma no covalente. La absorbancia se mide a 595 nm para cuantificar la concentración de proteínas por la ley de Lambert-Beer. Para calcular la cantidad de proteína de la muestra, se realizó una curva estándar utilizando diferentes cantidades de BSA, cubriendo un rango de 1 a 15 µg/ml.

2.9. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces con los diferentes tratamientos por duplicado o triplicado. Los valores mostrados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Cuando se realizó comparación estadística de datos, se usó el test *t de Student* para muestras desapareadas, considerando estadísticamente significativas las diferencias entre grupos de datos que presentan una confianza estadística mayor del 95 % (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$).

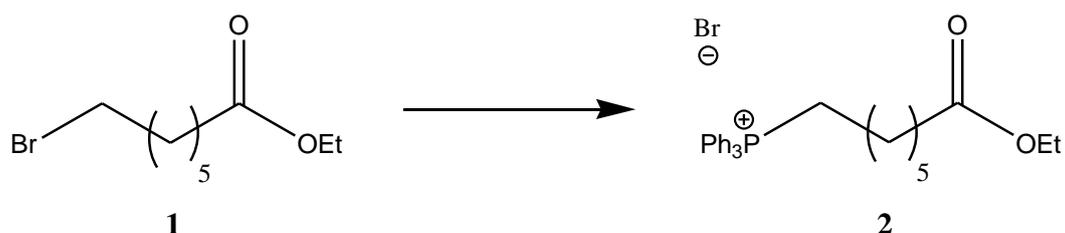
3. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE INTERÉS

Los reactivos utilizados durante esta síntesis fueron adquiridos en Acros Organics y Sigma-Aldrich, mientras que los disolventes fueron de Thermo Fisher. Los disolventes anhidros se secaron utilizando tamices moleculares introduciéndolos en el disolvente y generando una atmósfera inerte en el mismo con N₂. Los análisis de TLC se llevaron a cabo en placas de gel de sílice 5 cm x 20 cm con indicador fluorescente 254 nm. Los espectros de RMN se adquirieron en un instrumento Agilent Technologies MR 400 con consola Agilent MR 400 y una sonda de RMN (1H, 400,123 MHz; 13C, 100,611 MHz). Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón utilizando tetrametilsilano como patrón interno. Estos espectros se obtuvieron en el Laboratorio de Técnicas Experimentales de la Universidad de Valladolid. Los valores de J están en Hz. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent 5973 (ESI-QTOF), en el Laboratorio de Técnicas Experimentales de la Universidad de Valladolid. Fuente de ionización: electrospray (ESI).

3.1. Síntesis de los isómeros de 16:1

i. Síntesis del ácido *cis*-7-hexadecenoico (16:1*n*-9).

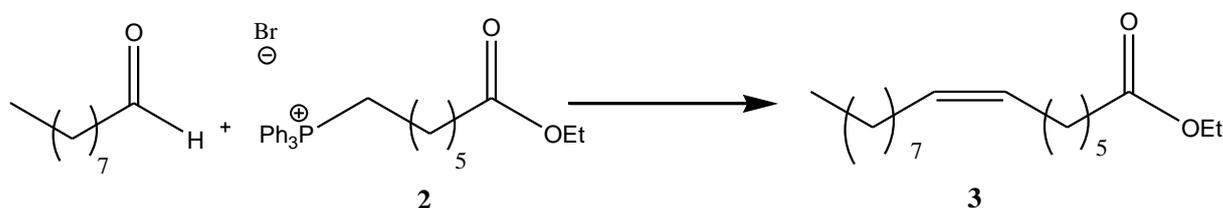
- Síntesis del bromuro de (7-etoxi-7-oxoheptil) trifenil fosfonio:



En primer lugar, para asegurar que la trifetilfosfina (PPh_3) estuviera seca, se puso en la bomba de vacío una hora antes de realizar la reacción. Se preparó una solución de 7-bromoheptanoato de etilo **1** (5 ml, 22,28 mmol) en CH_3CN anhidro (90ml) y se añadió PPh_3 (14,61 g, 55,7 mmol), y K_2CO_3 (10% en peso, 20,7g). La solución se dejó a reflujo durante 24 horas. La reacción se monitorizó por TLC utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1) como eluyente y un $R_f = 0,10$. Una vez completada la reacción, la solución se concentró para eliminar el disolvente, resultando una pasta pegajosa de color marrón. Para eliminar el exceso de PPh_3 , la masa de reacción se disolvió en MeOH, precipitando el PPh_3 como un polvo blanco y filtrante. La cromatografía se realizó en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ como eluyente (20:1). La fracción de interés se concentró, dando como resultado una grasa marrón **2** (8.34 g, 16.71 mmol, 75%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 7.7-7.51 (m, 15H), 3.93 (dd, $J = 6.81, 21.49$ Hz, 2H), 3.56 (m, 2H), 2.28 (s, 1H), 2.11 (m, 2H), 1.51 (m, 4H), 1.4 (m, 2H), 1.19 (m, 2H), 1.07 (t, $J = 7.79$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm), 173.8, 173.3, 135.0, 133.5, 133.4, 130.5, 130.3, 118.5, 117.5, 77.6, 77.2, 77.0, 60.1, 51.4, 51.3, 33.9, 33.5, 29.8, 29.7, 28.36, 24.2, 22.8, 22.1, 14.1. HRMS m/z calc. Para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{P}([\text{M}+\text{H}-\text{Br}]^+)$: 417.2134 encontrado a 417.2142.

- Síntesis de *cis*-7-hexadecanoato de etilo:



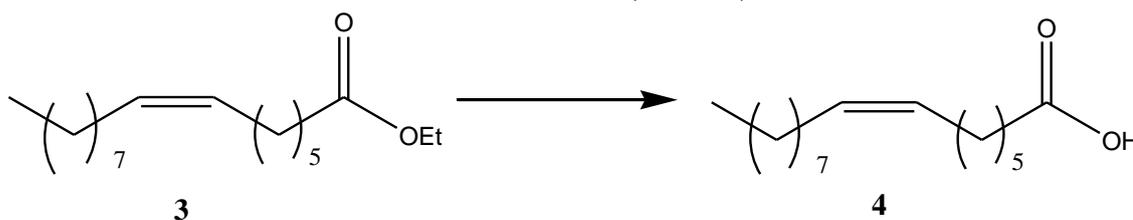
La sal de Wittig **2** (2 g, 4 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (50 ml), y se añadió el aldehído (nonanal **1**) (0,69 ml, 4 mmol). La solución resultante se llevó a una atmósfera inerte de N_2 y se añadió CsCO_3 (5,21 g, 16 mmol). Se dejó en agitación a 60°C durante 24 horas. Se siguió en TLC usando como eluyente una mezcla de

AcOEt/Heptano (1:10) dando un $R_f=0,23$. Se añadió Celite® (1 g) y se dejó en agitación durante 15 minutos. Se dejó enfriar la solución y se filtró lavando con CH_2Cl_2 . Una vez concentrado, el sólido se cromatografió en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla de AcOEt/heptano como eluyente (1:25). La fracción de interés se concentró, resultando un líquido viscoso incoloro **3**. (0,781 g, 2,77 mmol, 78%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 5.28 (m, 2H, $J=5.3$), 4.10-3.87 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.57 (m, 3H), 1.21 (m, 18H), 0.82 (t, $J=6.85\text{Hz}$, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm), 173.1, 130.7, 130.7, 61.3, 33.9, 33.7, 33.7, 31.9, 30.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.4, 29.2, 25.2, 22.8, 14.1, 14.1. **HRMS** m/z calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$): 305.2456 encontrado a 305.2452.

- **Síntesis del ácido cis-7-hexadecenoico (16:1n-9)**



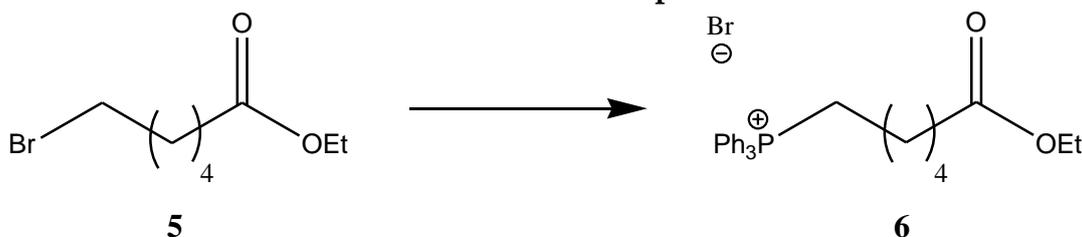
Se preparó una solución del éster **3** (2,476 g, 8,77 mmol) en 80 ml de MeOH. Además, se preparó una solución de hidróxido de litio (3,46 g, 0,144 mol) en agua destilada (90 ml). Ambas diluciones se combinaron en el mismo matraz y se dejaron durante 24 horas a temperatura ambiente mientras se agitaba. Transcurrido este tiempo, la fase orgánica se eliminó en el rotavapor. La fase acuosa se sometió a una extracción líquido-líquido realizada con (3x75 ml) de éter. Posteriormente, se añadió HCl a la fase acuosa hasta un pH de alrededor de 1 y se extrajo de nuevo con (3x75 ml) de éter. La fase orgánica se secó con una solución de NaCl saturado y con MgSO_4 y se concentró dejando como resultado un líquido viscoso totalmente incoloro **4** (2,106 g, 8,28 mmol, 94,5%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 5.33 (m, 2H, $J=5.3$), 2.33 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.39-1.20 (m, 18H), 0.87 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101

MHz, CDCl₃): δ (ppm), 180.8, 130.3, 129.3, 77.0, 34.0, 31.9, 29.7, 29.5, 29.2, 28.6, 27.2, 26.9, 24.5, 22.6, 14.0. **HRMS** m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂Na ([M+H+Na]⁺): 277.2143 encontrado 277.2145

ii. Síntesis del ácido *cis*-6-hexadecenoico (16:1*n*-10).

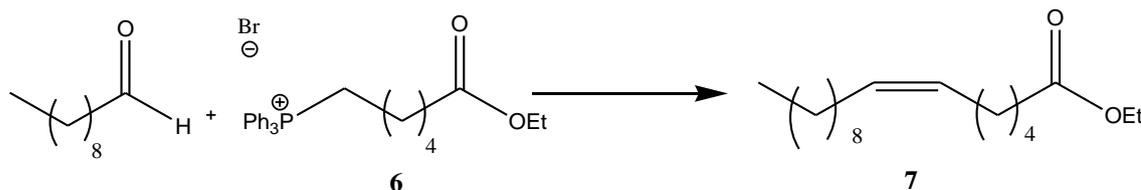
- Síntesis del bromuro de (6-etoxi-6-oxoheptil) trifenil fosfonio



Se preparó una solución de 5-bromohexanoato de etilo **5** (5 ml, 28,1 mmol) en CH₃CN anhidro (90 ml) y se añadió la PPh₃ seca (14,61 g, 55,7 mmol), y K₂CO₃ (10% en peso, 20,7 g). La solución se dejó a reflujo durante 24 horas. La reacción se monitorizó por TLC utilizando CH₂Cl₂/MeOH (20:1) como eluyente y R_f= 0,10. Una vez completada la reacción, la solución se concentró para eliminar el disolvente, resultando una pasta pegajosa de color marrón. Para eliminar el exceso de PPh₃, la masa de reacción se disolvió en MeOH, precipitando el PPh₃ como un polvo blanco y filtrante. La cromatografía se realizó en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla CH₂Cl₂/MeOH como eluyente (20:1). La fracción de interés se concentró, resultando una grasa marrón **6** (7,78 g, 15,59 mmol, 70%).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 7.7-7.51 (m, 15H), 3.65 (dd, J= 6.81, 21.49 Hz, 2H), 3.47 (m, 3H), 2.15 (t, 2H), 1.51 (m, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ (ppm), 173.8, 173.3, 135.0, 133.5, 133.4, 130.5, 130.3, 118.5, 117.5, 77.6, 77.2, 77.0, 60.1, 51.4, 51.3, 33.9, 33.5, 29.8, 29.7, 28.3, 24.2, 22.8, 22.1, 14.1. **HRMS** m/z calc. para C₂₆H₃₀O₂P([M+H-Br]⁺): 406.4884, encontrado a 406.4197.

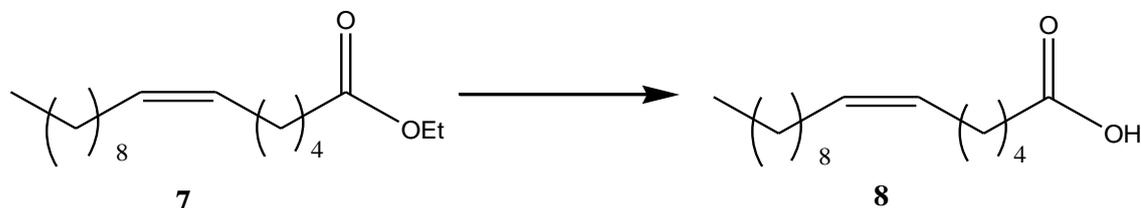
- Síntesis de cis-6-hexadecenoato de etilo



La sal de Wittig **6** (2 g, 4,12 mmol) se resolvió en CH_2Cl_2 (50 ml), y se añadió aldehído (decanal) (0,78ml, 4,12mmol). La solución resultante se llevó a una atmósfera inerte de N_2 y se añadió CsCO_3 (5,21 g, 16 mmol). Se dejó en agitación a 60°C durante 24 horas. Se siguió en TLC usando como eluyente una mezcla de AcOEt/Heptano (1:10) dando un $R_f=0,23$. Se añadió Celite® (1 g) y se dejó en agitación durante 15 minutos. Se dejó enfriar la solución y se filtró lavando con CH_2Cl_2 . Una vez concentrado, el sólido se cromatografió en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla de AcOEt/heptano como eluyente (1:25). La fracción de interés se concentró, resultando un líquido viscoso incoloro **7**. (0,750 g, 2,77 mmol, 78%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 5.28 (m, 2H, $J=5.3$), 3.65 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.57 (m, 3H), 1.21 (m, 18H), 0.82 (t, $J= 6.85\text{Hz}$, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 173.1, 130.7, 130.7, 61.3, 33.9, 33.7, 33,7, 32.1, 30.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.4, 29.2, 25.2, 22.8, 14.1, 14.1., **HRMS** m/z calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$): 305.2456 encontrado a 305.2445.

- Síntesis del ácido cis-6-hexadecenoico (16:1n-10)



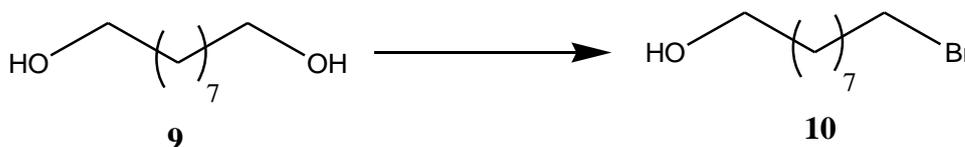
Se preparó una solución del éster **7** (2,476 g, 8,77 mmol) en 80 ml de MeOH. Además, se preparó una solución de hidróxido de litio (3,46 g, 0,144 mol) en agua destilada (90 ml). Ambas diluciones se combinaron en el mismo matraz y se dejaron durante 24 horas a temperatura ambiente mientras se agitaba.

Transcurrido este tiempo, la fase orgánica se eliminó en el rotavapor. La fase acuosa se sometió a una extracción líquido-líquido realizada con (3x75 ml) de éter. Posteriormente, se añadió HCl a la fase acuosa hasta un pH de alrededor de 1 y se extrajo de nuevo con (3x75 ml) éter. La fase orgánica se secó con una solución acuosa de NaCl saturado y con MgSO₄ y se concentró dejando como resultado un líquido viscoso totalmente incoloro **8** (2,106 g, 8,28 mmol, 94,5 %).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.33 (m, 2H, J=5.3), 2.33 (t, J= 7.5Hz, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.39-1.20 (m, 18H), 0.87 (t, J=7.7Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 180.8, 130.3, 129.3, 77.0, 34.0, 31.9, 29.7, 29.5, 29.2, 28.6, 27.2, 26.9, 24.5, 22.6, 14.0. HRMS m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂Na ([M+H+Na]⁺): 277.2143 encontrado a 277.2138.

iii. Síntesis del ácido cis-9-hexadecenoico (16:1n-7)

- Síntesis del 9-bromononanol

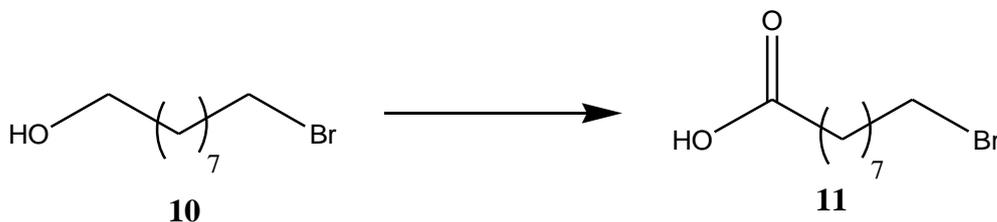


El 1,9-nonanediol **9** (25 g, 156 mmol) se resolvió en 150 ml de HBr al 47% (1.3 mol). Se adaptó el separador Dean-Stark y se llenó el matraz de reacción con tolueno. Se colocaron 200 ml de tolueno en el matraz de recogida. El matraz de reacción se ajustó a 75°C y el matraz de recogida a 250°C para asegurar una evaporación vigorosa y continua del tolueno. Al cabo de 24 horas, se retiró el matraz de recogida y se sustituyó por un matraz de tolueno limpio, dejándolo en las mismas condiciones durante otras 24 horas. Los matraces de recogida se concentraron, dando lugar a un líquido marrón que acaba solidificándose a temperatura ambiente **10**. (26,16 g, 118,56 mmol, 76,4%).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 3.6 (t, 2H), 3.4 (t, 2H), 2.15 (s, 1H), 1.5 (q, 2H), 1.36 (q, 2H), 1.25 (m, 8H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 63, 34, 32.5,

29.5, 28.5, 28, 25.9. **HRMS** m/z calc. para $C_9H_{19}OBrNa([M+H+Na]^+)$: 246.0525, encontrado a 246.0578.

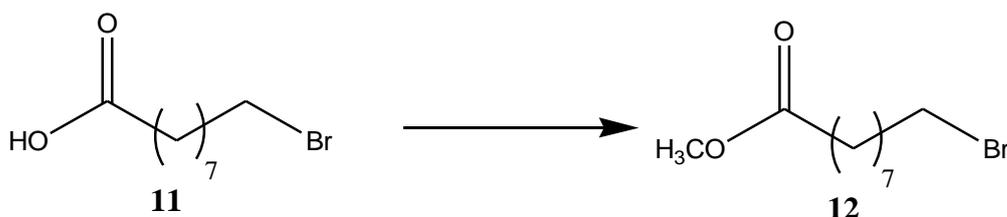
- **Síntesis del ácido 9-bromo-nonanoico**



El bromoalcohol **10** (8,16, 36,57 mmol) se disolvió en 100 ml de acetona a 0°C. El reactivo Jones se añadió gota a gota a la misma temperatura hasta que la solución pasó de verde a naranja-marrón. La mezcla de reacción se puso a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 ml de agua y se extrajo con éter (100x3 ml). La fase orgánica se trató y se extrajo con NaOH 10 % (100 ml) y agua (2x100 ml), observándose decoloración en la fase orgánica. La nueva fase acuosa se llevó a pH ácido (1~2) con HCl y se extrajo con éter (3x100 ml). La nueva fase orgánica se secó con $MgSO_4$ y se concentró, resultando un líquido verde que solidifica a temperatura ambiente. (7,5 g, 30,7 mmol, 84 %).

1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm), 3.4 (t, 2H), 2.35 (t, 2H), 1.85 (q, 2H), 1.65 (q, 2H), 1.42 (q, 2H), 1.35 (m, 8H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm), 180, 34, 32.5, 29.5, 28.5, 28, 25.9. **HRMS** m/z calc. para $C_9H_{17}O_2BrNa([M+H+Na]^+)$: 260,1239, encontrado a 260.1578.

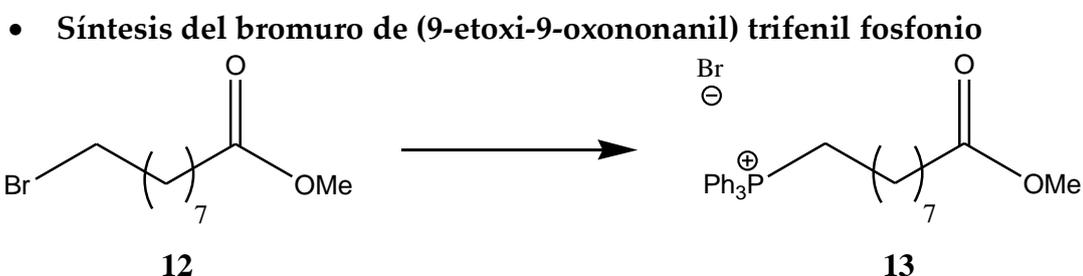
- **Síntesis del 9-bromo-nonanoato de metilo**



Se preparó gota a gota una solución de cloruro de acetilo (2 ml) a 0°C en 50 ml de MeOH. El compuesto **11** (2,5 g, 10,5 mmol) se disolvió en 10 ml de MeOH y se

añadió gota a gota a la predisolución a la misma temperatura y mientras se agitaba. Una vez hecho esto, la reacción se puso a reflujo durante 2 h. Al final de este tiempo, se eliminó el disolvente y la masa se disolvió en éter, mientras que el ácido sobrenadante se neutralizó con NaHCO₃ saturado. Al concentrar la fase orgánica se obtuvo un líquido viscoso e incoloro **12**. (2,35 g, 9,38 mmol, 90%).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 3.55 (s, 3H), 3.27 (t, 2H), 2.18 (t, 2H), 1.72 (q, 2H), 1.5 (q, 2H), 1.31 (m, 2H), 1.2 (m, 6H) ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 174, 52, 34, 33, 29.5, 28.5, 28, 25.9. HRMS m/z para C₁₀H₁₉O₂BrNa([M+H+Na]⁺): 274.0466, encontrado a 274.0477.

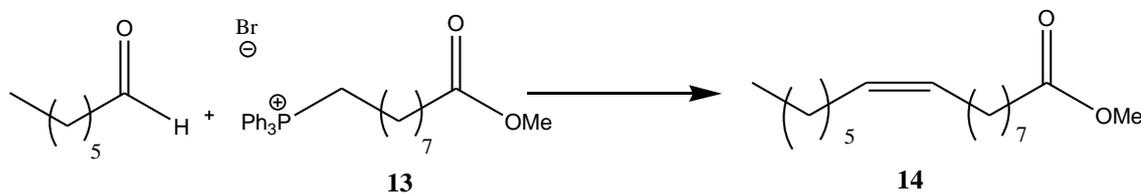


Se secó la trifenilfosfina (PPh₃) antes de realizar la reacción. Se preparó una solución de 9-bromoheptanoato de metilo **12** (2,35 g, 9,38 mmol) en CH₃CN anhidro (90 ml) y se añadió PPh₃ (5 g, 18,76 mmol), y K₂CO₃ (10% en peso, 3,15 g). La solución se dejó a reflujo durante 24 horas. La reacción se monitorizó por TLC usando CH₂Cl₂/MeOH (20:1) como eluyente y R_f= 0,10. Una vez completada la reacción, la solución se concentró para eliminar el disolvente, resultando una pasta pegajosa de color marrón. Para eliminar el exceso de PPh₃, la masa de reacción se disolvió en MeOH, precipitando el PPh₃. La cromatografía se realizó en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla CH₂Cl₂/MeOH como eluyente (20:1). La fracción de interés se concentró, dando como resultado una grasa amarilla **12** (3,8 g, 7,54 mmol, 80,4 %).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 7.7-7.51 (m, 15H), 3.65 (s, 3H), 2.15 (m, 2H), 1.51 (m, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 173.8, 173.3, 135.0, 133.5, 133.4, 130.5, 130.3, 118.5, 117.5, 77.6, 77.2, 77.0, 51.4, 51.3, 33.9, 33.5, 29.8,

29.7, 28.3, 24.2, 22.8, 22.1, 14.1. HRMS m/z calc. para $C_{27}H_{31}O_2P([M+H-Br]^+)$: 433.2291, encontrado a 433,5416.

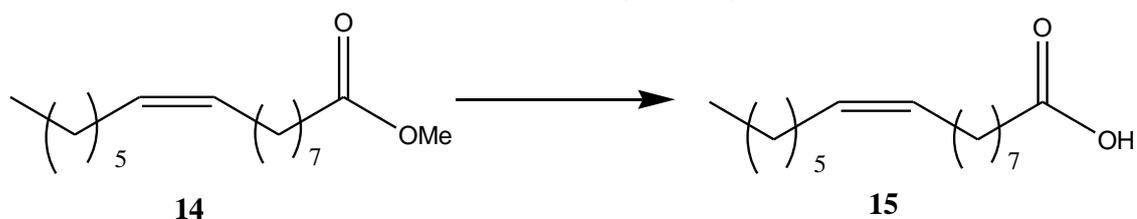
- **Síntesis de cis-9-hexadecenoato de etilo**



La sal de Wittig **13** (2 g, 3,82 mmol) se resolvió en CH_2Cl_2 (50 ml), y se añadió aldehído (heptanal) (0,53 ml, 3,82 mmol). La solución resultante se llevó a una atmósfera inerte de N_2 y se añadió $CsCO_3$ (5,21 g, 16 mmol). Se dejó en agitación a $60^\circ C$ para 24 horas. Se siguió en TLC usando como eluyente una mezcla de AcOEt/Heptano (1:10) dando un $R_f=0,23$. Se añadió Celite® (1 g) y se dejó en agitación durante 15 minutos. Se dejó enfriar la solución y se filtró lavando con CH_2Cl_2 . Una vez concentrado, el sólido se cromatografió en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla de AcOEt/heptano como eluyente (1:25). La fracción de interés se concentró, dando como resultado un líquido viscoso amarillento **14** (0,706 g, 2,64 mmol, 69 %).

1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ (ppm), 5.28 (m, 2H, $J=5.3$), 4.10-3.87 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.57 (m, 3H), 1.21 (m, 18H), 0.82 (t, $J=6.85$ Hz, 3H).
 ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 173.1, 130.7, 130.7, 51.9, 33.9, 33.7, 33,7, 32.1, 30.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.4, 29.2, 25.1, 22.8, 14.1, HRMS m/z calc. para $C_{17}H_{32}O_2Na$ ($[M+H+Na]^+$): 292.2341, encontrado a 292.4235.

- **Síntesis del ácido cis-9-hexadecenoico (16:1n-7)**



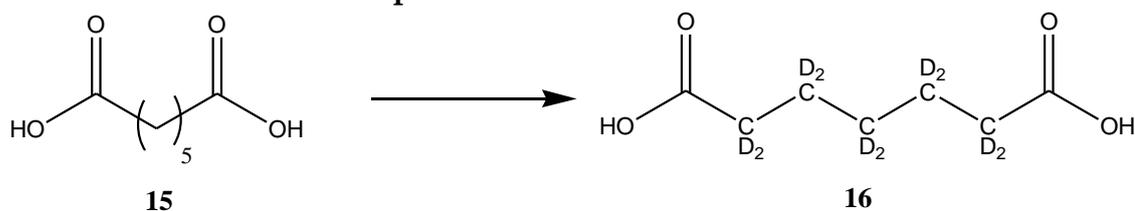
Se preparó una solución del éster **14** (2,476 g, 8,77 mmol) en 80 ml de MeOH. Además, se preparó una solución de hidróxido de litio (3,46 g, 0,144 mol) en agua

destilada (90 ml). Ambas diluciones se combinaron en el mismo matraz y se dejaron durante 24 horas a temperatura ambiente mientras se agitaba. Transcurrido este tiempo, la fase orgánica se eliminó en el rotavapor. La fase acuosa se sometió a una extracción líquido-líquido realizada con (3x75 ml) de éter. Posteriormente, se añadió HCl a la fase acuosa hasta un pH de alrededor de 1 y se extrajo de nuevo con (3x75 ml) de éter. La fase orgánica se secó con una solución de NaCl saturado y con MgSO₄ y se concentró dejando como resultado un líquido viscoso totalmente incoloro **15** (2.106 g, 8.28 mmol, 94.5 %).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.33 (m, 2H, J=5.3), 2.33 (t, J= 7.5Hz, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.39-1.20 (m, 18H), 0.87 (t, J=7.7Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm), 180.8, 130.3, 129.3, 37.2, 34.0, 31.9, 30.5, 29.7, 29.5, 29.2, 28.6, 27.2, 26.9, 24.5, 22.6, 14.0. HRMS m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂ ([M+H+Na]⁺): 278.2145, encontrado a 278.3984.

iv. Síntesis del ácido *cis*-7-hexadecenoico deuterado ([D27] 16:1n-9)

- Deuteración del ácido pimélico

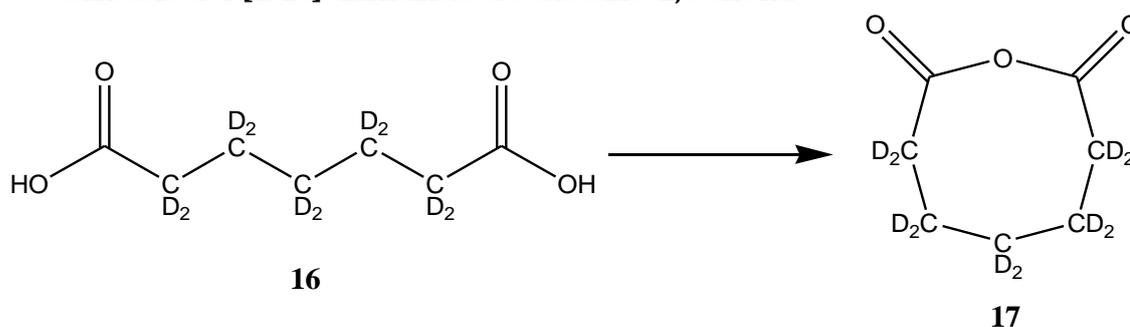


A una mezcla de ácido pimélico **15** (7 g, 43,7 mmol) en D₂O (70 ml) se añadió una solución de NaOD (40%, 8 g, 195,7 mmol) y Pd(C) 10% (0,54 g). La mezcla se calentó a 260 °C (27 bar) con fuerte agitación durante 6 días. A continuación, el reactor se enfrió a temperatura ambiente y la mezcla obtenida se filtró para separar el catalizador y se lavó con agua (4x25 ml). La solución acuosa se acidificó con HCl concentrado hasta pH 2 y se llevó a un embudo de separación. El compuesto se extrajo con acetato de éter (5x100 ml). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl (30 ml), se secó con MgSO₄ anhidro y se eliminó

el disolvente al vacío, obteniéndose 5,32 g (31,38 mmol) de ácido [D10]pimélico con una deuteración media del 94%D (sólido blanco), y un rendimiento del 72%.

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 1,36 (residual CH_2), 1,60 (residual $2\times\text{CH}_2$), 2,31 (residual $2\times\text{CH}_2$). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm, 179,85 (s, CO_2H).

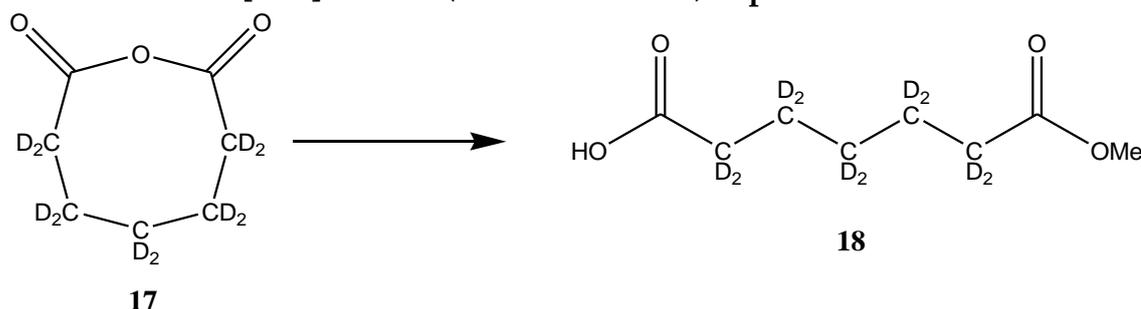
• **Síntesis del [D10] anhídrido de oxocano-2,8-diona**



Una disolución de ácido [D10]pimélico **16** (8,16 g, 48 mmol) en anhídrido acético (100 ml) se calentó a reflujo (140°C) durante 4 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y el anhídrido acético se evaporó a presión reducida. Se añadió xileno (50 ml) a la mezcla resultante, que se eliminó de nuevo a presión reducida. Se obtuvo un sólido amarillo **17** (7,04 g, 41 mmol, 85 %).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1,40 (residual CH_2), 1,65 (residual $2\times\text{CH}_2$), 2,42 (residual $2\times\text{CH}_2$). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 168,68 (s, CO).

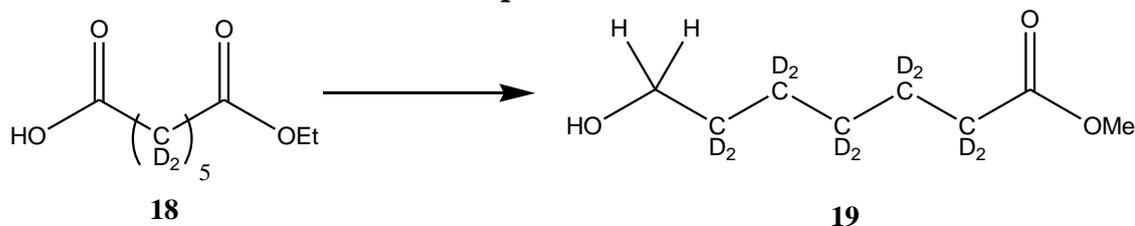
• **Síntesis del [D10] ácido 7-(metoxicarbonilo) heptanoico**



Una disolución del anhídrido [D10] oxocano-2,8-diona **17** (11,25 g, 74,01 mmol) disuelta en metanol (110 ml) se calentó a reflujo durante 3 horas. Después, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo 13,29 g (72,22 mmol, 98%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 1,27 (residual CH_2), 1,54 (residual $2\times\text{CH}_2$), 2,21 (residual $2\times\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3,58 (3 H, s, $\text{CH}_3\text{-O}$), 11,41 (1 H, s, COOH). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 51,29 (s, $\text{CH}_3\text{-O}$), 174,21 (s, CO ester), 179,54 (s, COOH).

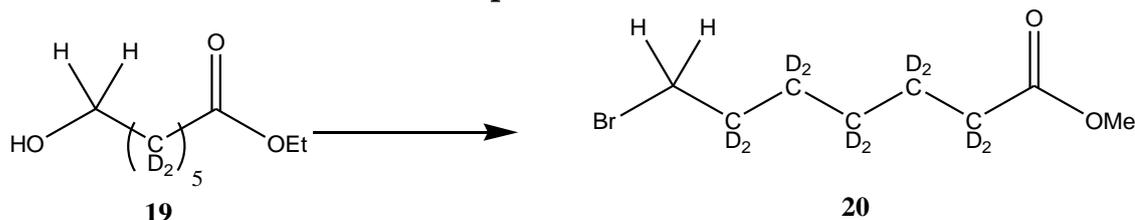
• Síntesis del [D10] 7-hidroxiheptanoato de metilo



Se preparó una solución de ácido [D10]7-(metoxicarbonilo) heptanoico **18** (12,15 g, 66,03 mmol) en THF anhidro (82 ml) a 0°C y en atmósfera inerte se añadió una solución de complejo $\text{BH}_3\text{-SMe}_2$ (40,94 ml, 2M, 81,88 mmol). La solución se mantuvo a 0°C durante 2 h y luego se dejó reposar gradualmente hasta la temperatura ambiente durante un día. Se añadió gota a gota MeOH (9,8 ml) y la mezcla se agitó continuamente durante 2 h. Se añadieron otros 10 ml de MeOH para asegurar la destrucción del borano. El residuo obtenido se disolvió en agua (200 ml) y éter dietílico (200 ml), y se realizó una primera extracción. Las extracciones se realizaron con éter dietílico (2×50 ml). Las fases orgánicas se unieron y se lavaron secuencialmente con NaHCO_3 , NaCl y H_2O . Después se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. Se obtiene un líquido incoloro (7,86 g, 46 mmol, 70 %).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 1,24 (residual $2\times\text{CH}_2$), 1,50 (residual $2\times\text{CH}_2$), 2,18 (residual $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 2,40 (1H, s, OH), 3,49 (2 H, s, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3,56 (4H, s, $\text{CH}_3\text{-O}$). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 51,29 (s, $\text{CH}_3\text{-O}$), 62,33 (s, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 174,21 (s, CO ester).

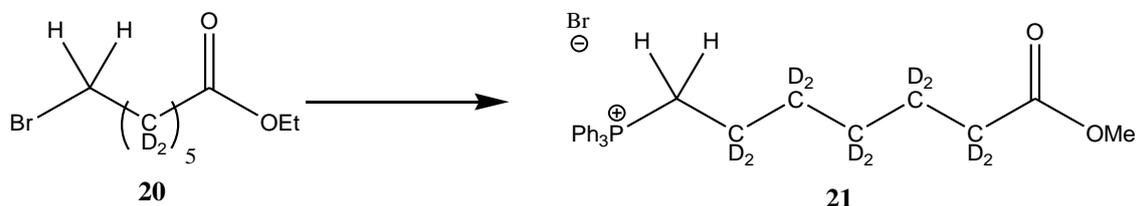
• **Síntesis del [D10] 7-bromoheptanoato de metilo**



Se añadió CBr_4 (5,63 g, 17 mmol) a una solución de [D10] metil 7-hidroxiheptanoato **19** (7,86 g, 46,24 mmol) en DCM (75 ml). Se agitó la mezcla a 0°C y se añadió trifenilfosfina (13,6 g, 51,79) disuelta en DCM (20 ml). Se agitó durante la noche. Una vez completada la reacción (TLC, AcoEt/heptano 1/20 como eluyente, $R_f=0,25$), se eliminó el disolvente a presión reducida y se volvió a disolver en heptano para eliminar el óxido de trifenilfosfina formado durante la reacción. Se filtró con Celite y se lavó con más heptano (50 ml). El disolvente se eliminó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna con el eluyente utilizado anteriormente. Se obtuvo un líquido incoloro (9,75 g, 42 mmol, 91 %).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 1.29 (residual CH_2), 1.42 (residual CH_2), 1.59 (residual CH_2), 1.81 (residual CH_2), 2.26 (residual $\text{CH}_2\text{-COO-}$), 3.37 (2 H, s, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 3.65 (4 H, s, OCH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 33,58 (s, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 51,29 (s, $\text{CH}_3\text{-O}$), 174,21 (s, CO ester).

• **Síntesis del bromuro de [D10] (7-metoxi-7-oxoheptanilo) trifenil fosfonio**

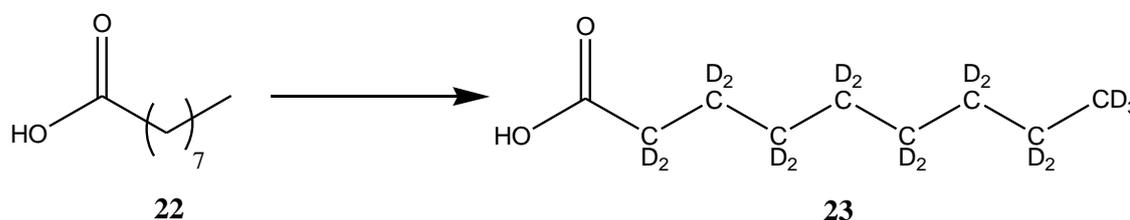


Se secó la trifenilfosfina (PPh_3) antes de realizar la reacción. Se preparó una solución de [D10] metil 7-bromoheptanoato **20** (9,75 g, 41,83) en CH_3CN anhidro (170 ml) y se añadió PPh_3 (27,43 g, 104,56 mmol), y K_2CO_3 (10% en peso, 3,15 g). La solución se dejó a reflujo durante 24 horas. La reacción se monitorizó por TLC

utilizando CH₂Cl₂/MeOH (20:1) como eluyente y R_f= 0,10. Una vez completada la reacción, la solución se concentró para eliminar el disolvente, resultando una pasta pegajosa de color marrón. Para eliminar el exceso de PPh₃, la masa de reacción se disolvió en MeOH, precipitando el PPh₃ como un polvo blanco y filtrante. La cromatografía se realizó en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla CH₂Cl₂/MeOH como eluyente (20:1). La fracción de interés se concentró, dando como resultado una grasa amarilla **21** (14,5g, 33mmol, 80,4%).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,27 (residual 2xCH₂), 1,58 (residual 2xCH₂), 2,21 (residual CH₂-COO-), 3,61 (3 H, s, CH₃-O), 3,79 (2 H, d, J_{H-P}= 13 Hz, CH₂-P), 7,59-7,92 (15 H, m, PPh₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 22.5 (CH₂-P), 51.6 (CH₃-O), 118.3 (C-Ar), 130.4 (C-Ar), 133.6 (C-Ar), 134.9 (C-Ar), 174.2 (CO ester).

- Deuteración del ácido nonanoico

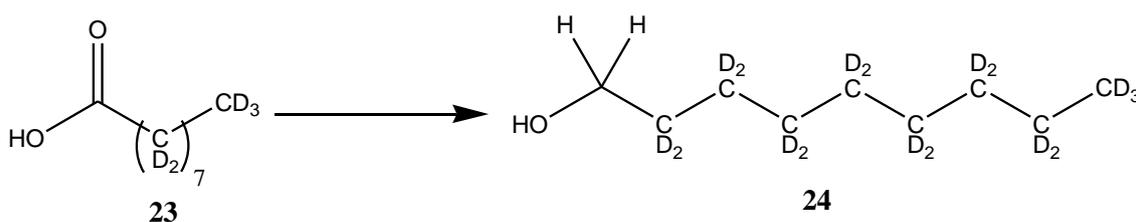


Se preparó una mezcla de ácido nonanoico **22** (10,3 g, 65,09 mmol) en D₂O (100 ml), NaOD (40%, 10,3 g, 252 mmol) y Pd(C) 10% (0,54 g) y Pt/C 5% (0,54 g). La mezcla se calentó a 265 °C (27 bar.) con fuerte agitación durante 6 días. El reactor se enfrió a temperatura ambiente, la mezcla obtenida se filtró para separar el catalizador y se lavó con agua (4x25 ml). A continuación, la solución acuosa se acidificó con HCl concentrado hasta pH 2 y se llevó a un embudo de separación. El compuesto se extrajo con acetato de etilo (5x100 ml). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl (30 ml), se secó con MgSO₄ anhidro y se eliminó el disolvente al vacío, obteniéndose 9,5 g (54 mmol) de ácido

[D17]nonanoico con una deuteración media del 85%D (sólido blanco) y un rendimiento del 83%.

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 0,81 (residual CH_3), 1,22 (residual $5\times\text{CH}_2$), 1,57 (residual CH_2), 2,29 (residual $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 11,69 (1,00 H, s, COOH) $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 175,5 (COOH).

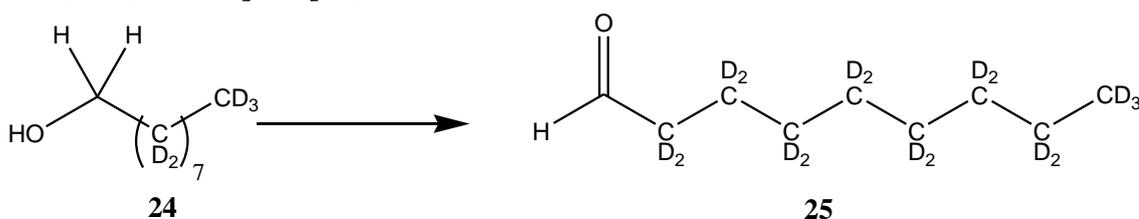
- **Síntesis del [D17] 1-nonanol**



Se preparó una solución de hidruro de aluminio y litio (12,3 g, 324,8 mmol) en THF anhidro (350 ml) a 0°C y en atmósfera inerte, donde se añadió [D17] ácido nonanoico **23** (28,46 g, 162,4 mmol) disuelto en THF anhidro (260 ml). Tras la adición, se calentó a reflujo durante la noche con agitación vigorosa. La reacción se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se hidrolizó mediante la adición sucesiva de agua (12,5 ml), NaOH 2M (12,5 ml) y agua (37 ml). El sólido blanco resultante se filtró y se lavó con THF (100 ml). El disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un líquido incoloro **24** (23,8 g, 292 mmol, 90%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 0,82 (residual CH_3), 1,22 (residual $6\times\text{CH}_2$), 1,48 (residual CH_2), 2,06 (1 H, s, OH), 3,58 (2 H, s, $\text{CH}_2\text{-OH}$). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 62,73 ($\text{CH}_2\text{-OH}$).

- **Síntesis del [D17] nonanal**

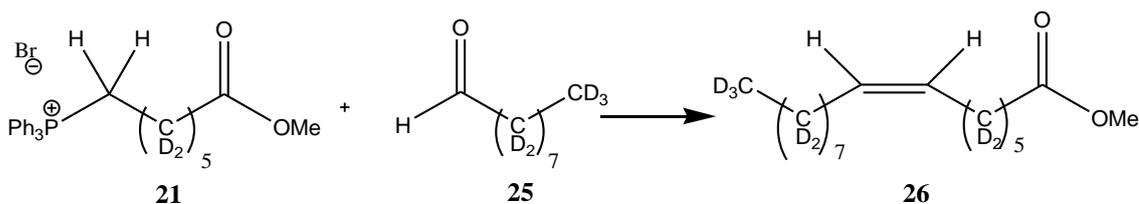


Se preparó una mezcla de clorocromato de piridinio (10,03 g, 46,6 mmol) y gel de sílice (10 ml) en DCM (65 ml) y se añadió una solución de [D17] nonan-1-ol **24**

(5 g, 31 mmol) en DCM (65 ml) a 0°C. Tras la adición, se dejó agitando durante 2 horas. Tras la reacción, se añadió éter dietílico (300 ml) y se dejó reposar durante 10 minutos. El sólido resultante se eliminó por filtración, la solución filtrada se recogió en un matraz y el disolvente se eliminó a presión reducida. El aldehído se purificó por destilación (110 °C y 15,5 torr) para obtener un líquido incoloro **25** (2,4g, 15 mmol, 48%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 0,80 (residual CH_3), 1,21 (residual $5\times\text{CH}_2$), 1,53 (residual CH_2), 2,32 (residual $\text{CH}_2\text{-CHO}$), 9,69 (1 H, s, CHO). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 202,73 (CHO).

- **Síntesis del [D27] cis-7-hexadecenoato de metilo**

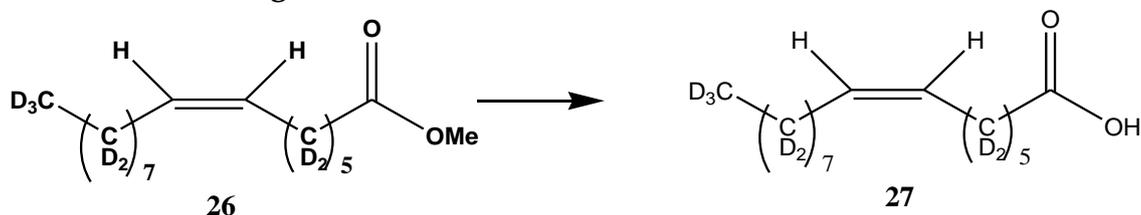


Se preparó una mezcla de bromuro de trifenil fosfonio (7-metoxi-7-oxonilo) [D10] **21** (2,66 g, 5,37 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (60 ml), y el aldehído [D17] nonanal **25** (1,03 g, 6,4 mmol, 1,2 eq) en CH_2Cl_2 anhidro (60 ml). La solución resultante se puso en atmósfera inerte de Argón y se añadió Cs_2CO_3 (7 g, 21,48 mmol). Se dejó en agitación a 60°C durante 24 h. Se siguió en TLC usando como eluyente una mezcla de AcOEt/Heptano (1:10) dando un $R_f=0,23$. Se añadió Celite (0,5 g) y se dejó agitar durante 15 minutos. La solución se dejó enfriar y se filtró lavando con CH_2Cl_2 . Una vez concentrado, el sólido se cromatografió en una columna con gel de sílice utilizando una mezcla de AcOEt/heptano como eluyente (1:25). La fracción de interés se concentró, dando como resultado un líquido viscoso amarillento **26**. (1,55 g, 5,1 mmol, 98%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 0,84 (residual CH_3), 1,16-1,36 (residual $8\times\text{CH}_2$), 1,60 (residual CH_2), 1,96 (residual $2\times\text{CH}_2\text{-C=C}$), 2,27 (residual $\text{CH}_2\text{-COO}$),

3,64 (3H, s, CH₃-O), 5,30 (1H, d, J = 10 Hz, HC=), 5,35 (1H, d, J = 10 Hz, HC=). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 51,29 (CH₃-O), 129,08 (=CH), 130,26 (=CH), 174,05 (CO ester).

- Síntesis del ácido graso [D27] cis-7-hexadecenoico

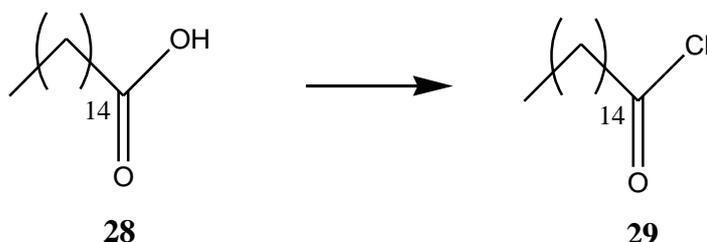


Se preparó una solución de [D27] cis-7-hexadecenoato de metilo **26** (1 g, 3,4 mmol) en 35 ml de MeOH. Además, se preparó una solución de hidróxido de litio (8 ml, 4M). Ambas soluciones se combinaron en el mismo matraz y se dejaron durante 24 horas a temperatura ambiente mientras se agita. Después, la fase orgánica se eliminó en el rotavapor. La fase acuosa se sometió a una extracción líquido-líquido realizada con (3x35 ml) de éter. Posteriormente, se añadió HCl a la fase acuosa hasta un pH de alrededor de 1 y se extrajo de nuevo con (3x35 ml) de éter. La fase orgánica se secó con una solución de NaCl saturado y con MgSO₄. Se filtró y se concentró dando como resultado un líquido viscoso amarillento **27**(0,703 g, 2,8 mmol, 74%, 84%D).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 0,84 (residual CH₃), 1,11-1,43 (residual 8xCH₂), 1,62 (residual CH₂), 1,98 (residual 2xCH₂-C=), 2,30 (residual CH₂-COOH), 5,30 (1H, d, J = 11 Hz, HC=), 5,35 (1H, d, J = 11 Hz, HC=), 10,79 (1 H, s, COOH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 129,12 (CH=), 130,18 (CH=), 180,28 (CO₂H).

3.2. Síntesis de los isómeros 1-palmitoil-2-hexadecenoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina PC(16:0/16:1n-x) (x=7, 9, 10)

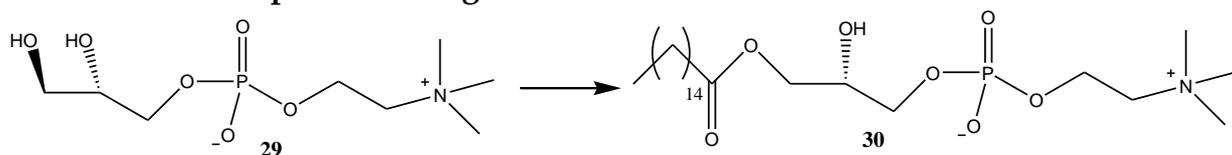
- Síntesis del cloruro de ácido palmítico



Se añadieron 20 g de ácido palmítico **28** sobre 11,4 ml de cloruro de tionilo. La reacción se dejó a reflujo sin disolvente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el crudo se sometió a presión reducida para eliminar el exceso de SOCl_2 . El cloruro de ácido se purificó destilándolo a presión reducida (80 °C, 0,2 torr) en un horno de bolas.

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 2.85 (t, 2H), 1.98 (q, 2H), 1.25 (m, 24H), 0.85 (t, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm), 174, 47, 32, 30, 29.5, 29, 28, 25, 23, 4. HRMS m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{ClO}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 274.2063 encontrado a 274.8697.

- Síntesis del 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolinas.

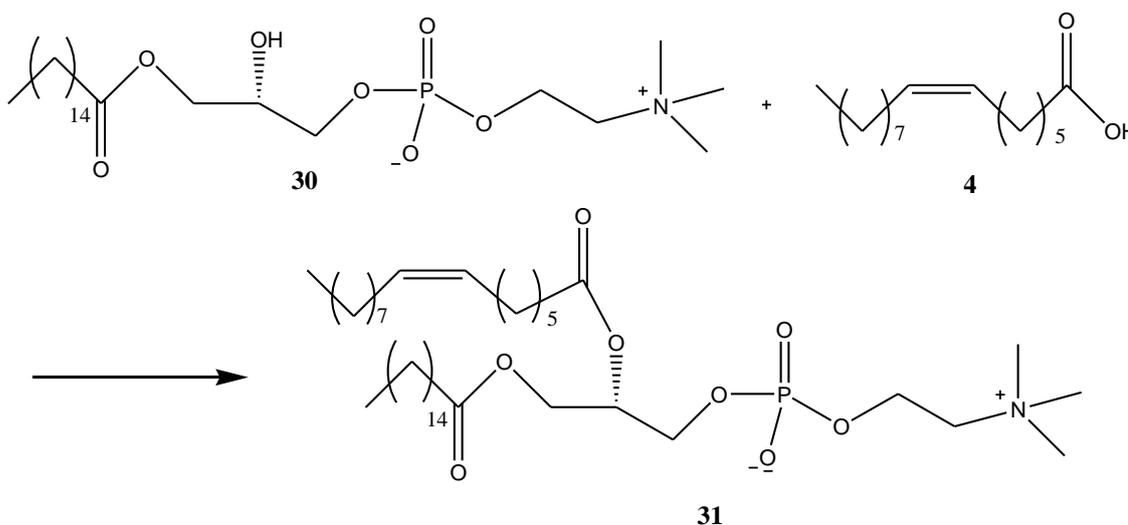


La glicerofosfolina **29** se disolvió en 40 ml de isopropanol (1g, 3,9mmol) y se añadió el dibutiltinaño (DBTO) (1,1 g, 3,9 mmol), y se puso a reflujo durante 1h. Transcurrido el tiempo, se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente, entonces se añadió la trietilamina (65 ml, 4,7 mmol) y el cloruro de ácido palmítico (1,28 g, 4,7 mmol), y se dejó agitar durante 30 min. La reacción se monitorizó por TLC utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65/25/4 ($R_f=0,3$) como eluyente. Después, se añadieron 40 ml de agua a la reacción y se extrajo con

heptano (3x40 ml). La fase acuosa se concentró y se realizó la separación cromatográfica por columna con el mismo eluyente. La fracción de interés se concentró y se obtuvo un precipitado blanco **30** (1,26 g, 2,54 mmol, 60 %).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ (ppm), 4.3 (m, 2H), 4.15 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 3.6 (m, 2H), 3.2 (s, 9H), 2.35 (t, $J=7.5\text{Hz}$ 2H), 1.6 (m, 2H), 1.3 (m, 22H), 0.9 (t, $J=6.8\text{Hz}$ 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ (ppm), 173.8, 38.5, 67, 66, 65, 59.5, 54, 34, 32, 29.3, 25, 22.5, 14. m/z calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{PNa}([\text{M}+\text{Na}]^+)$: 518.3217, encontrado a 518.3223

- **Síntesis de los isómeros 1-palmitoil-2-hexadecenoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina PC(16:0/16:1n-x), (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9)**



Se preparó una disolución del compuesto **30** (0,25 g, 0,49 mmol), los isómeros de los ácidos grasos 16:1 correspondientes (**4**, **8**, **15**) (0,5 g, 1,96 mmol), y DMAP (0,12 g, 0,98 mmol) en 14 ml de CH_2Cl_2 anhidro en un matraz topacio. El DCC (0,404 g, 1,96 mmol) se resolvió en 2 ml de CH_2Cl_2 anhidro. Las soluciones se mezclaron en atmósfera inerte y la reacción se puso en un baño de ultrasónico a reflujo durante 6-8 h (importante asegurarse de que están todos los reactivos disueltos, se necesitó calor para su disolución). Después se añadieron 20 ml de CH_2Cl_2 , se lavó con (2x20 ml) de KHSO_4 saturado y 20 ml de NaHCO_3 saturado. La fase orgánica se secó con MgSO_4 y se separó por columna en

CHCl₃/MeOH/H₂O 65/25/4 (rf=0,6) como eluyente, obteniendo los fosfolípidos PC(16:0/16:1) con un rendimiento semejante con todos los isómeros de 16:1 sintetizados (100 mg, 0,13 mmol, 13,6%).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.3 (q, 2H), 5.2 (m, 1H), 4.4 (dd, 1H), 4.25 (m, 2H), 4.15 (c, 1H), 3.95 (t, 2H), 3.6 (m, 2H), 3.2 (s, 9H), 2.35 (m, 4H), 2 (m, 4H), 1.6 (m, 4H), 1.3 (m, 42H), 0.9 (t, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm)**, 174, 173.8, 129.5, 129, 38.5, 67, 66, 65, 59.5, 54, 34, 32, 29.3, 25, 22.5, 14.

HRMS m/z PC(16:0/16:1n-9) calc. para C₄₀H₇₉NO₈PNa ([M+Na]⁺): 754,5357 encontrado a 754,5379. PC(16:0/16:1n-7) a 754,5362 y PC(16:0/16:1n-10) a 754,5369.

Capítulo IV.- Resultados

1. LOS LÍPIDOS NEUTROS NO SON UNA FUENTE DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO LIBRE EN MONOCITOS HUMANOS ESPUMOSOS

1.1. El ácido araquidónico exógeno activa la síntesis *de novo* de ácidos grasos en monocitos

Estudios previos del laboratorio donde se ha desarrollado esta tesis han demostrado que la incubación de monocitos humanos con bajas concentraciones de AA da lugar a que las células adquieran un fenotipo espumoso, como consecuencia de la acumulación de LD citoplasmáticas (26, 105). En este estudio, se han utilizado enfoques lipidómicos basados en espectrometría de masas para caracterizar la composición lipídica de estos monocitos espumosos por lo que respecta a la distribución de AA en las diferentes clases de lípidos. Se ha observado que, en los monocitos en reposo o no tratados, el AA endógeno está presente casi exclusivamente en la fracción fosfolipídica, siendo el contenido de AA de las fracciones lipídicas neutras (monoacilglicerol, MAG; diacilglicerol, DAG; triacilglicerol, TAG; ésteres de colesterol, CE) prácticamente insignificante (Fig. IV.1.1 A). Cuando las células se expusieron a 10 μ M de AA durante 2 h, la fracción de TAG fue la única clase de lípidos celulares donde se incorporaron cantidades significativas de este ácido graso (Fig. IV.1.1 A). En el conjunto de fosfolípidos (PL) sólo se incorporaron pequeñas cantidades de AA, sugiriendo que esta fracción lipídica está casi repleta en monocitos en reposo y no puede acomodar más AA (107, 108).

La distribución de los ácidos grasos estudiada por la técnica de GC/MS confirmó pequeños cambios, no significativos, de AA en la fracción de PLs. Además, también se observó una pequeña disminución de otros ácidos grasos en esta misma fracción, como son el ácido linoleico (18:2n-6) y los poliinsaturados

de la serie n-3 (22:5n-3 y 22:6n-3) cuando se suplementaron con AA las células. Esto puede sugerir que estos ácidos grasos presentes en PLs sean desplazados por la entrada de esa pequeña porción de AA. Es importante también destacar que el único ácido graso que aumenta en esta fracción fosfolipídica en estas condiciones sea el ácido palmitoleico (16:1) aunque su cantidad presente en esta fracción es relativamente baja. Sin embargo, ninguna de estas diferencias alcanzó significación estadística (Fig. IV.1.1 B).

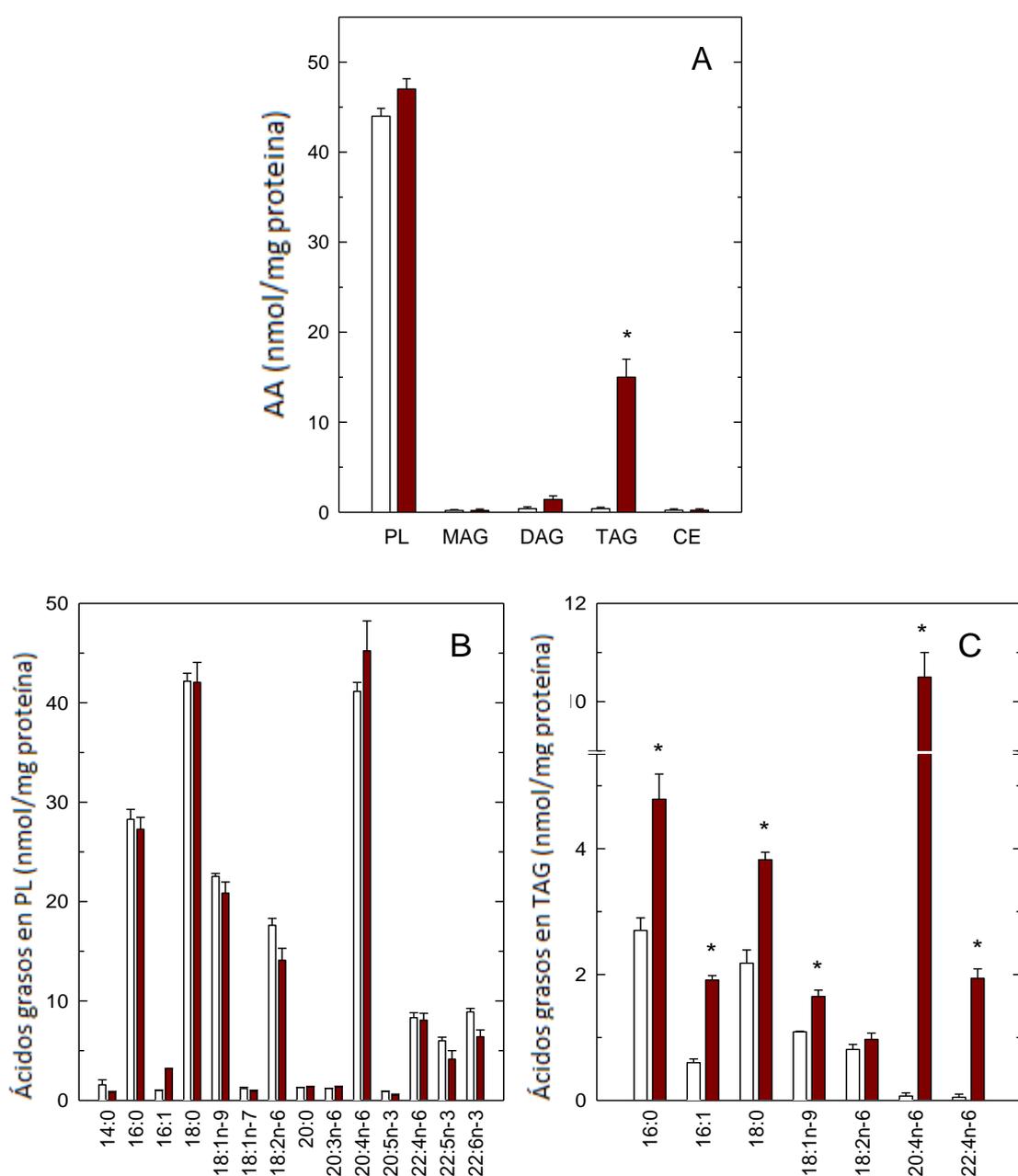


Fig. IV.1.1. Incorporación de AA en diferentes clases de lípidos en monocitos humanos. Los monocitos no fueron tratados (barras blancas) o fueron tratados con 10 μ M AA durante 2 h (barras granate). Posteriormente, se aislaron las diversas clases de lípidos y se midió su contenido de AA mediante GC/MS después de convertir los ácidos grasos de los diferentes lípidos en ésteres metílicos. (A). También se muestra el perfil completo de los ácidos grasos de los fosfolípidos (B) y TAG (C). Los ácidos grasos se designan por su número de átomos de carbono y, después de los dos puntos, por su número de enlaces dobles. Para diferenciar los isómeros se utiliza la nomenclatura n-x (n menos x), donde n es el número de carbonos de un determinado ácido graso y x es un número entero que, restado de n, da la posición del último doble enlace de la molécula. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. (n=3). *p < 0,05, significativamente diferente de las células sin tratar de AA..

Cuando se analizaron los ácidos grasos presentes en TAG por GC/MS, se observaron no solo los aumentos esperados de AA y su producto de elongación, el ácido adrenico (22:4n-6), sino también de ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (18:0) y ácido oleico (18:1n-9), sugiriendo que el AA exógeno también activa la síntesis *de novo* de ácidos grasos en monocitos (26).

1.2. El ácido araquidónico de por sí, no sus derivados oxigenados, es responsable de que las células adquieran un fenotipo espumoso.

En trabajos anteriores del laboratorio donde se ha realizado esta tesis se observó que los efectos biológicos del AA en monocitos no se veían afectados por la presencia de inhibidores de la ciclooxigenasa o la lipoxigenasa (26), lo que sugería que se debían al propio ácido graso y no a un metabolito oxigenado producido por las células tras estar en contacto con el AA. Sin embargo, las muestras comerciales de AA suelen contener cantidades apreciables de sus productos oxidados, lo que suscita la preocupación de que estos compuestos puedan poseer una actividad biológica por sí mismos que enmascare la del ácido graso libre puro. Para estudiar esta posibilidad, se analizó por LC/MS la composición de las muestras comerciales de AA adquiridas a tres proveedores diferentes. Según el proveedor y las condiciones de envío (puro o disuelto en disolventes orgánicos; presencia o no de un antioxidante), se encontró que entre

el 5 y el 35% del producto, abierto inmediatamente después de su llegada al laboratorio, estaba presente en forma de compuestos oxidados que contenían grupos hidroxilo, hidroperoxi u oxo (Fig. IV.1.2).

La identificación de la mayoría de los compuestos oxidados se llevó a cabo gracias al uso de LC/MS/MS en modo de escaneo de iones producto que, tras fragmentar los diferentes derivados oxidados del AA se obtienen diferentes iones específicos para cada compuesto. Comparando los tiempos de retención y las relaciones m/z de los fragmentos obtenidos de cada especie con los datos bibliográficos (225, 226), se pudo llevar a cabo la asignación de casi la totalidad de los compuestos (Tabla IV.1.1).

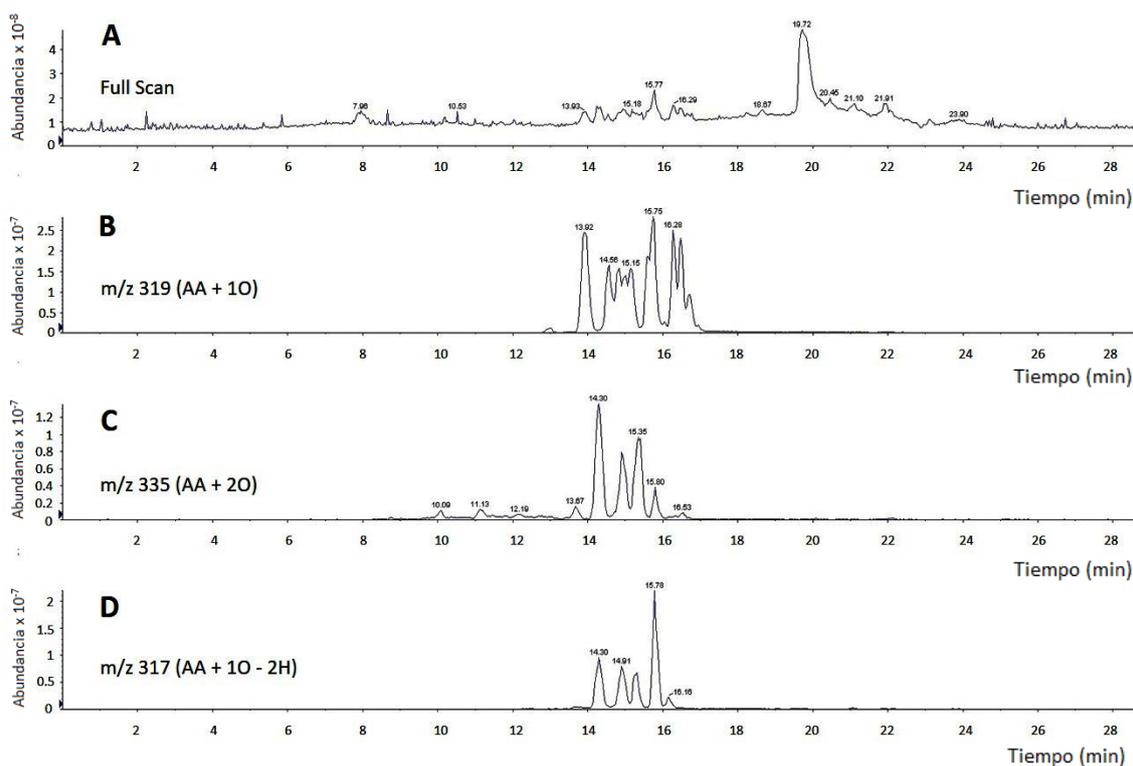


Fig. IV.1.2. Análisis por LC/MS de AA comercial. A) Cromatograma de barrido completo de una muestra de AA comercial, que muestra un pico principal a 19,72 min, que representa AA puro no oxidado, y grupos de picos entre 13,93 y 16,53 min, que representan múltiples derivados de AA oxidados. B,C,D, Análisis de los derivados oxidados de AA comercial. En el panel B, se seleccionó m/z 319 para detectar hidróxidos y epóxidos de AA (m/z de AA más un átomo de oxígeno). En el panel C, se seleccionó m/z 335 para detectar hidroperóxidos de AA (m/z de AA más dos átomos de oxígeno). En el panel D, se seleccionó m/z 317 para detectar derivados del AA que contienen un grupo oxo (m/z de AA más un átomo de oxígeno menos dos átomos de hidrógeno).

Tabla IV.1.1 - Productos de la oxidación del ácido araquidónico detectados en muestras comerciales

<i>Eicosanoides</i>	<i>LC Tiempo de retención (min)</i>	<i>[M-H] (m/z)^a</i>	<i>Ion producto(m/z)^b</i>
15-oxoETE	14.30	317	219
12-oxoETE	14.91	317	153
5-oxoETE	15.78	317	203
15-HETE	13.92	319	175, 219
11-HETE	14.56	319	167
12-HETE	14.93	319	179, 208
8-HETE	15.01	319	155, 163
9-HETE	15.15	319	151
5-HETE	15.71	319	115
14,15-EET	15.75	319	219
11,12-EET	16.28	319	167, 179
8,9-EET	16.31	319	155, 167
5,6-EET	16.49	319	191
15-HPETE	14.30	335	113
12-HPETE	15.35	335	153
5-HPETE	16.53	335	155

^a Aniones carboxilato producidos por la ionización de electrospray de iones negativos.

^b Se indican los iones producto específicos para los experimentos que utilizan la espectrometría de masas en tándem en el modo de escaneo de iones producto.

HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico; EET, ácido epoxieicosatrienoico; HPETE, ácido hidroperóxico-eicosatetraenoico; oxoETE, ácido oxoeicosatetraenoico

El AA no oxidado se separó de sus derivados oxidados mediante cromatografía en capa fina, utilizando un sistema que consiste en n-hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1) (Rf de AA puro, 0,66; Rf de productos oxidados, 0,27-0,46). Así pues, se aisló el AA puro no oxidado y se volvió a analizar su efecto en la formación de LD en los monocitos humanos. También se analizó el efecto de las fracciones de AA oxidado. Los resultados se muestran en la Fig. IV.1.3, e indican claramente que es efectivamente el AA puro el responsable de que las células adquieran un fenotipo espumoso. Las fracciones de AA oxidado tuvieron poco o ningún efecto en la respuesta.

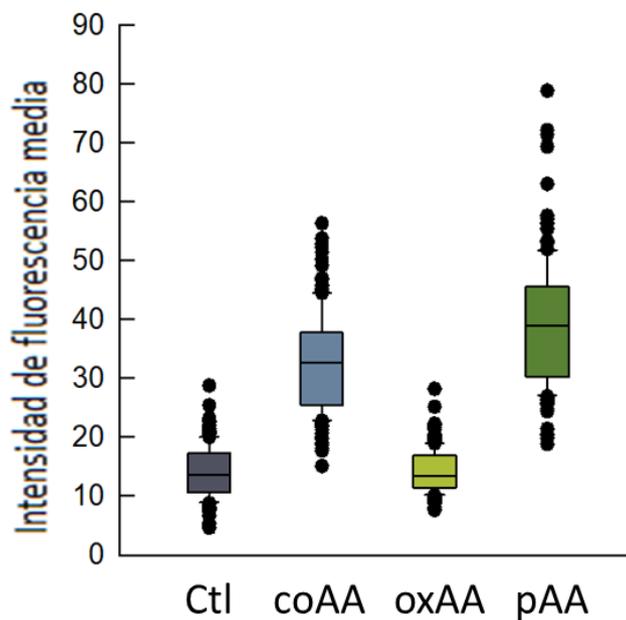
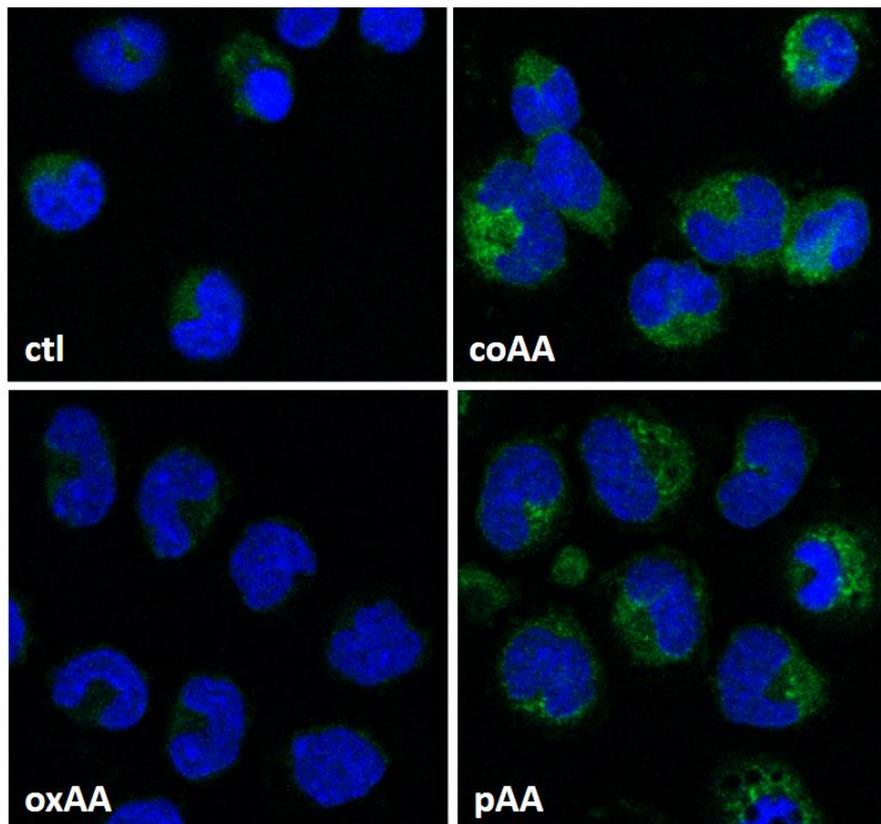


Fig. IV.1.3. Formación de LD inducida por AA en monocitos humanos. Los monocitos no fueron tratados (Ctl) o fueron tratados con AA comercial (coAA), AA oxidado (oxAA) o AA puro (pAA) durante 2 h. En todos los casos, el ácido graso se añadió a una concentración de 10 μ M. Después de la fijación y permeabilización, las células se tiñeron con BODIPY493/503 (2 μ g/ml) para visualizar las LD (verde) y el DAPI (1 μ g/ml) para marcar los núcleos (azul). Las células fueron entonces analizadas por microscopía confocal (aumento original 630x). La figura inferior muestra la distribución de los datos de intensidad de fluorescencia de BODIPY493/503 junto con la mediana, el mínimo, el máximo y los cuartiles de dos experimentos independientes.

1.3. El AA se libera de fosfolípidos, no de triacilglicerol, durante la activación de los monocitos vía receptor

Debido a que los monocitos espumosos están presentes en los sitios de inflamación, la acumulación de AA en TAG en monocitos espumosos podría ser importante desde un punto de vista fisiopatológico. Por lo tanto, se investigó si el AA presente en el TAG puede ser movilizado al activarse las células. Para abordar esta cuestión, se analizó la movilización del AA mediante espectrometría de masas en monocitos humanos activados.

En la primera serie de experimentos, se analizó la movilización de AA de los monocitos espumosos en respuesta a un estímulo proinflamatorio bien definido, el zimosán opsonizado (227). En la Fig. IV.1.4.A se muestra cómo el zimosán opsonizado estimula la movilización de AA en monocitos espumosos. Sin embargo, los análisis por GC/MS del contenido de AA de las fracciones de PL y TAG indicaron claramente que el origen del ácido graso liberado era principalmente, si no exclusivamente, de la fracción fosfolipídica. Para corroborar estos hallazgos, se llevaron a cabo experimentos con los inhibidores de las enzimas supuestamente implicadas en la liberación de AA en fosfolípidos, la fosfolipasa A₂ citosólica de grupo IVA (cPLA₂α), o en TAG, la lipasa de TAG (ATGL). Para inhibir cPLA₂α se utilizó la pirrofenona (164, 171, 203), y para bloquear la ATGL se usó bromoenol lactona (BEL), un inhibidor general de fosfolipasas que se ha demostrado que inhibe eficazmente la hidrólisis de TAG inducida por ATGL (228-230). Las figuras IV.1.4.B y 4.C muestran que mientras la pirrofenona redujo casi completamente la pérdida de AA de los monocitos estimulados, el inhibidor BEL no tuvo ningún efecto apreciable. Se puede observar que en las Figs. IV.1.4.B y 4.C el BEL no afecta a la movilización de AA en los fosfolípidos, y que la pirrofenona no afecta a los niveles de AA en el TAG, lo que refleja la especificidad de la acción de ambos compuestos.

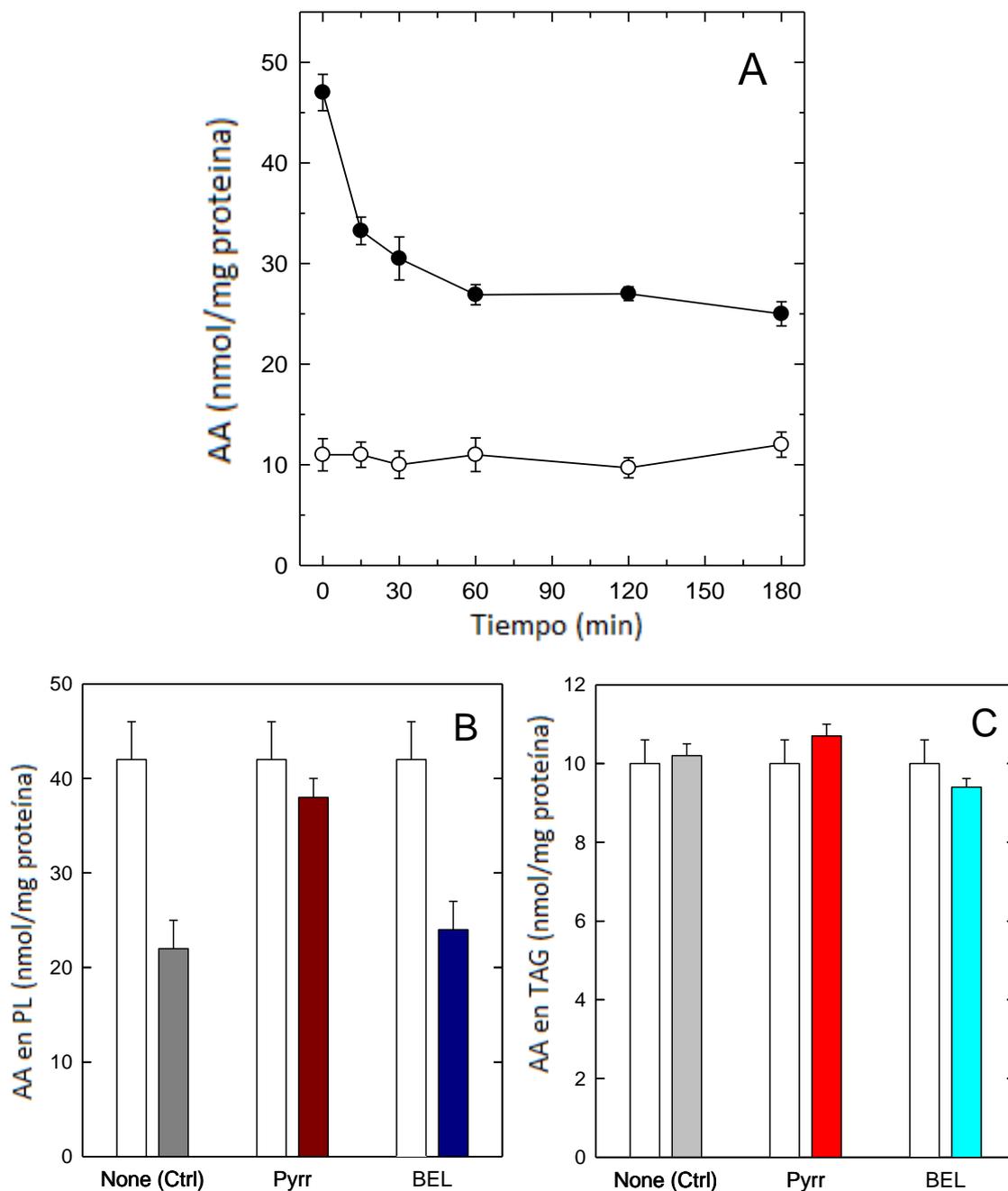


Fig. IV.1.4. Movilización de AA en monocitos humanos estimulados con zimosán. A) Las células fueron estimuladas con 1 mg/ml de zimosán opsonizado durante los tiempos indicados. Después se analizó el contenido de AA en fosfolípidos (círculos negros) o TAG (círculos abiertos) por medio de GC/MS. B,C) Las células fueron preincubadas con 1 μ M de pirrofenona (pyrr), 10 μ M de BEL o ninguna (none) durante 30 min, como se indica. Después, las células fueron o bien no tratadas (barras abiertas) o tratadas con 1 mg/ml de zimosán opsonizado durante 2 h. El contenido de AA en los fosfolípidos (B) o TAG (C) fue analizado por el GC/MS. Los datos se expresan como media \pm SEM de tres determinaciones independientes.

En los experimentos mostrados en la Fig. IV.1.4. se observa que, a pesar del fenotipo espumoso de los monocitos, la cantidad de AA en fosfolípidos aún

excede claramente a la de este ácido graso en TAG. Esto llevó a preguntarse si la movilización de AA sería diferente en las células en las que el TAG, y no el fosfolípido, constituyera el principal reservorio celular de AA. Para abordar esta cuestión, se incubaron los monocitos con concentraciones crecientes de AA (hasta 200 μM) durante 24 h, de modo que la incorporación sólo estaría limitada por la capacidad intrínseca de las células de expandir sus reservas de lípidos para acomodar el ácido graso (107, 108). Debido a que las concentraciones de AA ≥ 50 μM son citotóxicas para la mayoría de los tipos de células (231-234), para estos experimentos el ácido graso fue complejado con albúmina de suero bovino (proporción 2:1) antes de añadirlo a las células. Además de proporcionar un entorno más fisiológico para que las células incorporen el ácido graso, este procedimiento preservó la viabilidad celular por encima del 98% durante las incubaciones.

A bajas concentraciones, no tóxicas, la incorporación de AA en los lípidos celulares es la misma independientemente de que el ácido graso esté o no complejado con la albúmina. La Fig. IV.1.5.A muestra que la cantidad de AA en fosfolípidos cambia poco incluso después de incubar las células con 200 μM del ácido graso, lo que indica de nuevo que los monocitos circulantes ya contienen prácticamente todo el AA que pueden acomodar en fosfolípidos, por lo tanto, la fracción de fosfolípidos no se expande más. Por el contrario, la incubación de las células con ≥ 50 μM AA durante 24 h dio como resultado que la fracción de TAG incorporara AA a niveles muy superiores a los encontrados en los fosfolípidos (Fig. IV.1.5.B). Así pues, al ampliar su reserva de TAG, los monocitos tienen la capacidad de aumentar el contenido de AA celular entre 2 y 2,5 veces en comparación con el que se encuentra en las células circulantes. La estimulación con zimosán opsonizado de los monocitos enriquecidos con AA dio lugar a las esperadas disminuciones bruscas del contenido de AA celular (Figs. IV.1.5.C y 5.D). El AA movilizado en respuesta al estímulo inflamatorio fue de magnitud

similar a la experimentada por las células no enriquecidas con AA, contribuyendo a ello solo la fracción fosfolipídica y no la almacenada en TAG (Fig. IV.1.5.C y 5.D). Así pues, incluso en las células que contienen más AA en TAG que en PLs, la movilización de AA estimulada por receptor se debe a la hidrólisis de los fosfolípidos y no del TAG.

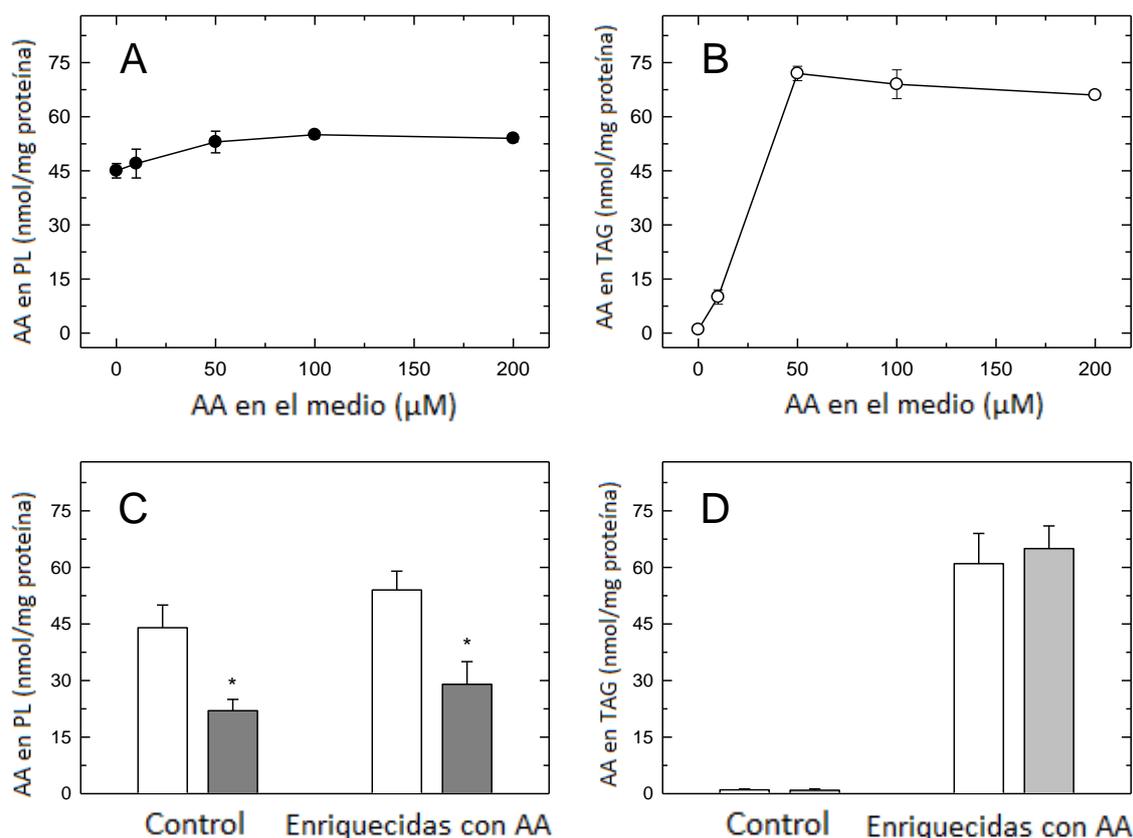
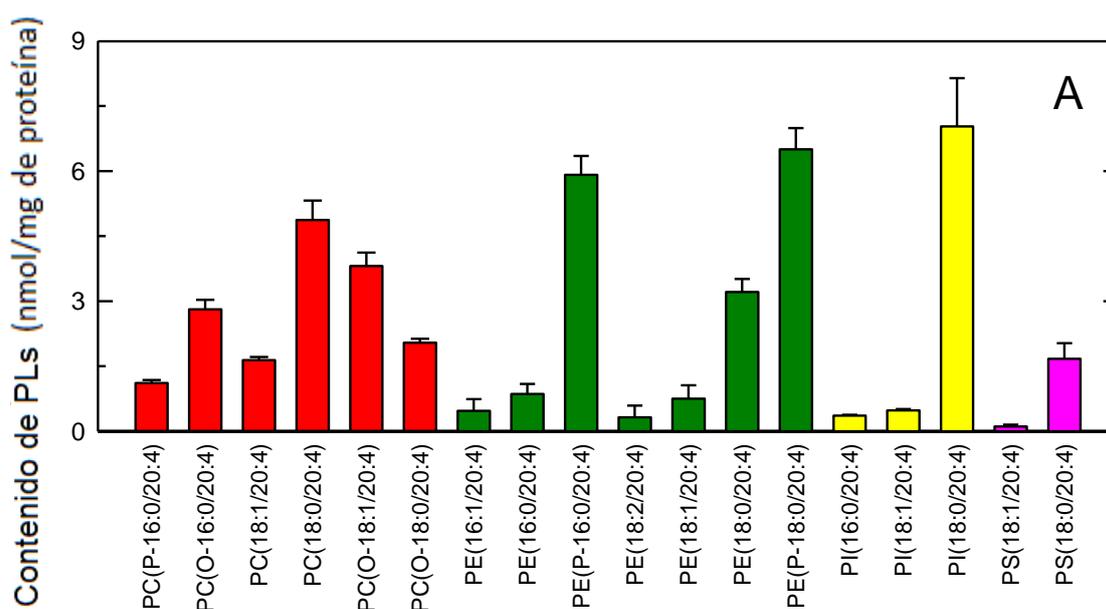


Fig. IV.1.5. Contenido de AA en monocitos humanos incubados en medios ricos en AA (A,B). Las células se incubaron con la concentración indicada de AA durante 24 h. El ácido graso se añadió al medio complejo con albúmina de suero bovino en una proporción de 2:1. Después de las incubaciones, el contenido de AA de los fosfolípidos celulares (A) o TAG (B) fue analizado por el GC/MS. Comparación de las respuestas de movilización de AA entre las células de circulación normal y las células enriquecidas con AA (C, D). Las células fueron o bien no tratadas (barras abiertas) o bien tratadas con 1 mg/ml de zimosán opsonizado durante 2 h (barras grises). El contenido de AA en los fosfolípidos (C) o TAG (D) fue analizado por GC/MS. Los datos se expresan como media \pm SEM de tres determinaciones independientes. * $p < 0,05$, significativamente diferente de las células no estimuladas.

La Fig. IV.1.6.A muestra la distribución del AA entre las diferentes especies de fosfolípidos, analizado por LC/MS/MS. Se detectaron múltiples compuestos que contienen AA entre las principales clases de fosfolípidos, siendo las especies que

contienen mayores cantidades de este ácido graso los plasmalógenos de etanolamina y la especie de inositol PI(18:0/20:4). A nivel de clase, se encontró que PC y PE contiene cantidades similares de AA, mientras que PI y PS contiene niveles más bajos (Fig. IV.1.6.B). La estimulación de las células con zimosan oponible dio lugar a importantes disminuciones de AA en PC, PE y PI. Es importante mencionar que, durante la activación celular, la enzima transacilasa independiente de CoA repone el AA, procedente de las especies de PC (1-acilo), en PE (especies 1-acilo y 1-alqueno) (139, 158, 159, 235, 236). Por lo tanto, la contribución real del PE a la liberación de AA total es probablemente mayor que la reflejada en la Fig. IV.1.6.B.



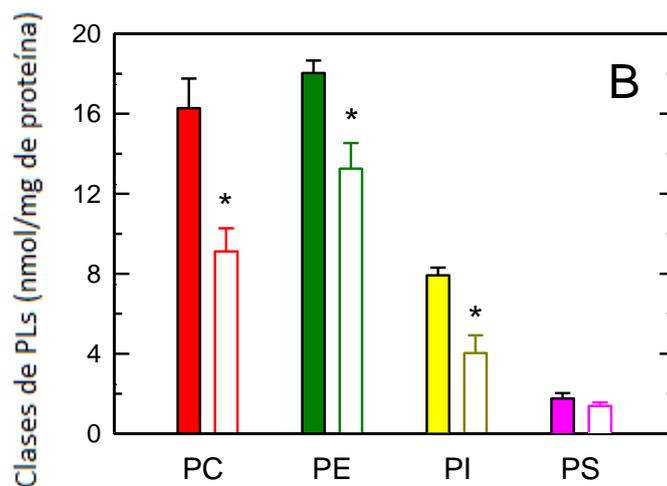


Fig. IV.1.6. Especies de fosfolípidos que contienen AA en monocitos humanos. A) El perfil de distribución de AA entre las especies de fosfolípidos que contienen colina (PC, barras rojas), fosfolípidos que contienen etanolamina (PE, barras verdes), fosfatidilinositol (PI, barras amarillas) y fosfatidilserina (PS, barras rosas) se determinó mediante LC/MS/MS. B), el contenido de AA en fosfolípidos según se muestra por clase y el efecto de la estimulación celular. Las células no fueron estimuladas (barras de color) o fueron estimuladas por 1 mg/ml de zimosan opsonizado durante 2 h (barras abiertas). Posteriormente, las diferentes clases de fosfolípidos se separaron mediante cromatografía en capa fina y su contenido de AA se determinó mediante GC/MS después de convertir los ésteres de glicerol de ácidos grasos en ésteres metílicos de ácidos grasos. Los datos se expresan como media \pm SEM de tres determinaciones independientes. * $p < 0,05$, significativamente diferente de las células no estimuladas.

2. LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN LIBERAN ÁCIDOS GRASOS ANTIINFLAMATORIOS COMO EL ÁCIDO PALMITOLEICO Y SUS ISÓMEROS

2.1. Distribución endógena en macrófagos de ratón de los ácidos grasos 16:1 en fosfolípidos

En estudios previos del laboratorio en el que se ha realizado esta tesis, se observó que cuando se tratan los monocitos humanos con AA se produce la síntesis *de novo* de diferentes ácidos grasos, que se almacenan en LD y promueven un fenotipo espumoso (26). Se observó también una destacada acumulación de un ácido graso habitualmente minoritario, el ácido palmitoleico (26). Sin embargo, al perfeccionar el protocolo de detección, se observó que el ácido graso que se acumula en los lípidos neutros no era el ácido palmitoleico, sino un isómero, el 16:1n-9, que poseía además propiedades antiinflamatorias como el ácido palmitoleico (105). Dadas las funciones biológicas observadas de estos isómeros, se analizó la presencia de otros posibles isómeros de 16:1 en células fagocíticas, encontrando un tercer isómero, el ácido sapiénico (16:1n-10), también con cierto carácter antiinflamatorio. (106)

Debido a que las respuestas de los macrófagos son destacadamente más altas que los monocitos, y que se tiene una mayor disponibilidad en el laboratorio, se decidió utilizar como modelos macrófagos peritoneales de ratón para el estudio de estos ácidos grasos durante los procesos de activación celular. El análisis cuantitativo de la distribución de los ácidos grasos 16:1 dentro de las clases de fosfolípidos se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS). Más del 90% del total de los ácidos grasos 16:1 celulares se encontraron en los glicerofosfolípidos que contienen colina (PC). Otras clases importantes de fosfolípidos como los fosfolípidos que contienen

etanolamina (PE), el fosfatidilinositol (PI) o la fosfatidilserina (PS) contuvieron sólo cantidades bajas de este ácido graso (Fig. IV.2.1).

A continuación, se procedió a determinar el perfil de distribución de las especies moleculares que contienen 16:1 mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un triple cuadrupolo QTRAP 4500 en modo de reacción múltiple. Se identificaron inequívocamente las especies que contienen 16:1 al detectar la producción de un fragmento m/z de 253,2, que corresponde al ión del ácido graso 16:1 [M-H]. Se detectó un total de 14 especies principales, que comprende ~90% de la cantidad total celular del ácido graso 16:1 (Fig. IV.2.1.B). Se observó que el ~75% del total de 16:1 en PC se hallaba en una sola especie de fosfolípido, PC(16:0/16:1).

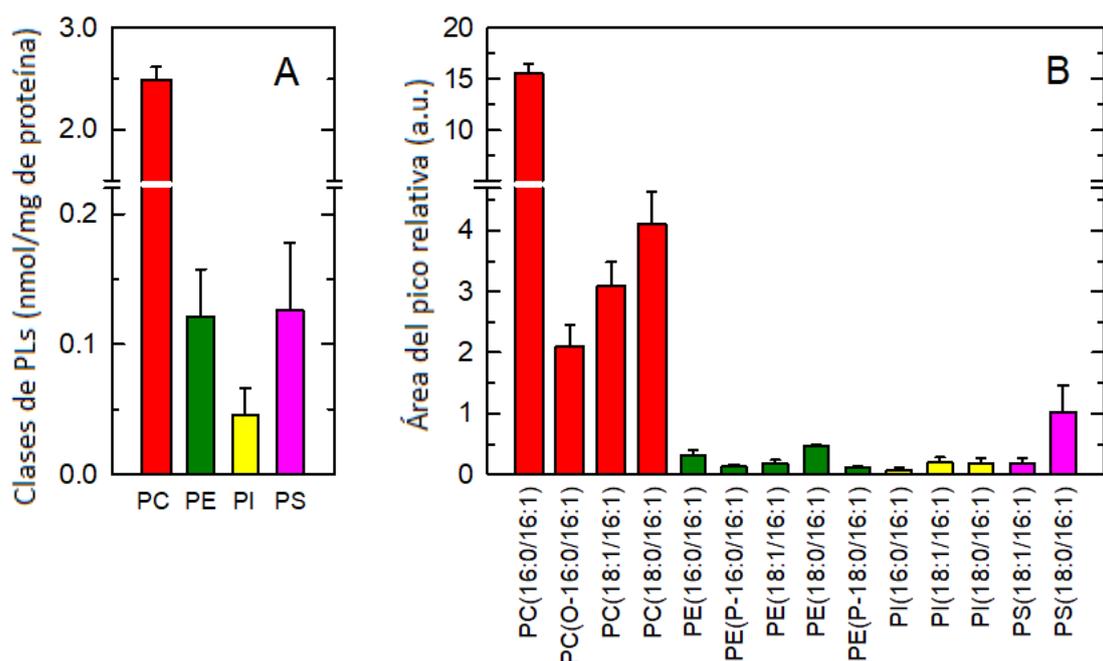


Fig. IV.2.1. Contenido de 16:1 en especies de fosfolípidos en macrófagos peritoneales residentes de ratón. (A) Contenido de 16:1 en diferentes clases de fosfolípidos **(B)** Perfil de distribución de las especies que contienen 16:1 en PC (rojo), PE (verde), PI (amarillo), y PS (rosa) en macrófagos, determinado por LC/MS. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=6).

2.2. Disminución de los niveles de las especies de fosfolípidos que contienen 16:1 en macrófagos estimulados

La presencia de cantidades elevadas de 16:1 dentro de una sola especie es un hallazgo inesperado que hace razonable especular con un papel para esta especie durante los procesos de activación celular. De acuerdo con ello, trabajos lipidómicos previos del laboratorio caracterizaron los cambios moleculares de fosfolípidos en macrófagos en reposo frente a los activados, identificando que los niveles de la especie PC(32:1) disminuyen después de la activación celular (139). Mediante experimentos de fragmentación utilizando como analizador un espectrómetro de masas de trampa de iones, se demostró que esta especie contiene el 16:1 en la posición sn-2 del fosfolípido. Para ampliar estos hallazgos iniciales, se propuso medir los cambios en los niveles de todas las especies de PC que contienen 16:1 después de la activación celular. Para estos experimentos se utilizó zimosán como estímulo de los macrófagos. La estimulación celular redujo significativamente los niveles de todas las principales especies de PC con 16:1 de manera dependiente del tiempo, siendo el PC(16:0/16:1) la molécula que experimentó las disminuciones más pronunciadas (Fig. IV.2.2.A y 2.B). En cuanto al resto de las especies de fosfolípidos que contienen 16:1 y no son de la clase PC, aparte de estar presentes en niveles muy bajos en comparación con las especies PC (Fig. IV.2.1), no se apreciaron cambios significativos en la estimulación con zimosán.

Debe señalarse que los preparados de zimosán son homogeneizados de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae*, por lo que podrían contener cantidades significativas de ácidos grasos 16:1. Para excluir que el componente lipídico del zimosán pudiera estar influyendo en las respuestas analizadas, se ensayó una combinación de los dos principales polisacáridos presentes en el zimosán, el manano (α -[1-6]-manosa) y la laminarina (β -[1-3]-glucano), que son los

responsables de activar las vías de hidrólisis de fosfolípidos en los macrófagos a través de una variedad de receptores de lectinas de tipo C (237, 238). Los resultados se muestran en las Figs. IV.2.2.C y 2.D e indican que la combinación de manano y laminarina produjo resultados casi idénticos a los obtenidos con el zimosán, descartando así un efecto de los lípidos endógenos del zimosán sobre la movilización de los ácidos grasos 16:1 en macrófagos. A continuación, dado que los macrófagos responden a una amplia variedad de estímulos, se investigó si otros estímulos de la respuesta inmunológica innata podían inducir la hidrólisis de los fosfolípidos conteniendo 16:1. La figura IV.2.2.E muestra que la estimulación de los macrófagos con el lipopolisacárido bacteriano, un agonista de TLR4, sí indujo la hidrólisis de PC en una medida comparable a la encontrada para el zimosán o el manano más la laminarina. Estos datos sugieren que la reducción de los niveles de PC de 16:1 puede constituir un sello distintivo de la activación de los macrófagos por estímulos inflamatorios innatos.

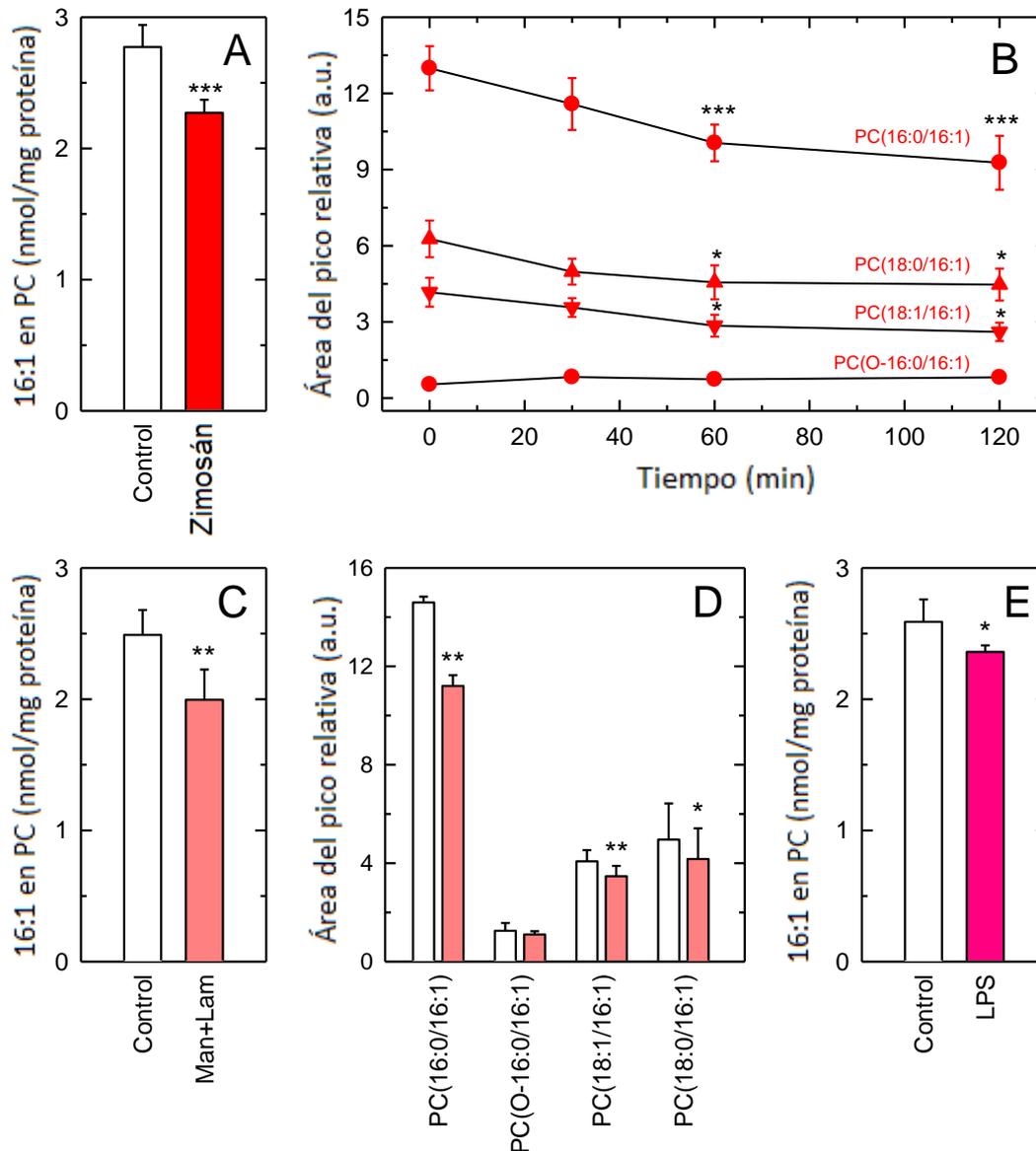


Fig. IV.2.2. Efecto de la activación de los macrófagos en los niveles celulares del 16:1 en PC. (A) Las células no fueron tratadas (control) o fueron estimuladas con 1 mg/ml de zimosán durante 1 h. Después se determinó el contenido de ácido graso 16:1 en PC. Estos resultados se muestran como media \pm SEM (n=6). ***p < 0,001, significativo estadísticamente para las células estimuladas con zimosán frente a las células de control (B) Tiempo del efecto del zimosán en los niveles de 16:1 que contienen especies PC. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=6). ***p < 0,001 o *p < 0,05, significativo estadísticamente para las células estimuladas con zimosán en los tiempos indicados frente a las condiciones no estimuladas (tiempo cero). (C) Las células no fueron tratadas (control) o fueron estimuladas con 0,5 mg/ml de manano (Man) más 0,5 mg/ml de laminarina (Lam) durante 1 h. Después se determinó el contenido de ácido graso 16:1 en PC. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=6). **p < 0,01 significativo estadísticamente para las células estimuladas por el Hombre+Lam frente a las células de control. (D) Las diferentes especies de PC que contienen 16:1 se midieron en células no estimuladas (barras abiertas) o en células estimuladas con 0,5 manano más 0,5 mg/ml de laminarina (barras rojas) durante 1 h. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=6). **p < 0,01 o *p < 0,05, significado de las células estimuladas con Man+Lam frente a las células de

control dentro de cada especie. (E) Las células no fueron tratadas (control) o fueron estimuladas con 200 ng/ml de lipopolisacárido bacteriano (LPS) durante 6 h. Después se determinó el contenido de ácido graso 16:1 en PC. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=6). *p < 0.05, significativo estadísticamente para las células estimuladas por LPS frente a las células de control.

2.3. Liberación de los isómeros 16:1 en la respuesta celular

En trabajos anteriores del laboratorio en que se ha desarrollado esta tesis, se demostró que al menos tres isómeros posicionales del ácido graso 16:1 coexisten a niveles significativos en macrófagos y otras células de la inmunidad innata: 16:1n-7 (ácido 9-cis-hexadecenoico; ácido palmitoleico), 16:1 n-9 (ácido 7-cis-hexadecenoico; ácido hipogeico), y 16:1n-10 (ácido 6-cis-hexadecenoico; ácido sapiénico), y que además los tres exhiben actividad antiinflamatoria (105, 106). Por consiguiente, se consideró importante evaluar si los tres isómeros se movilizan y si esto ocurre de modo diferente al activar las células con zimosán. La figura IV.2.3.A muestra que los macrófagos estimulados muestran una disminución en las cantidades de los tres isómeros, lo que sugiere que cualquiera que sea la vía de movilización del 16:1, no distingue la posición del doble enlace. Por analogía con fosfolípidos que contienen ácido araquidónico, cuyas disminuciones después de la estimulación celular dan como resultado una mayor liberación de ácido araquidónico libre (211, 239), se hipotetizó que la disminución de los fosfolípidos celulares que contienen 16:1 se debía a la liberación de este ácido graso durante la activación de las células. Como se muestra en la Fig. IV.2.3.B, se encontró que este era el caso, y se pudo detectar un aumento dependiente del tiempo en la formación de ácidos grasos libres 16:1 después de la activación de los macrófagos. A 1 h, la liberación de 16:1 había aumentado 2 veces más que los niveles no estimulados, lo que representa el 10-15% del total de estos ácidos grasos inicialmente presente en las células.

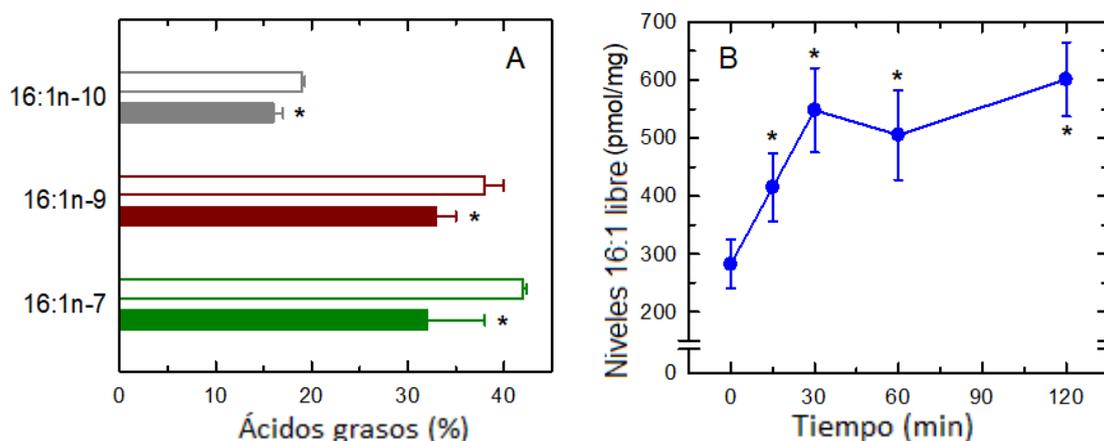


Fig. IV.2.3. Liberación de ácidos grasos 16:1 en macrófagos activados. (A) Los isómeros de ácidos grasos 16:1 fueron analizados por GC/MS después de la transmetilación y la transformación en derivados de DMDS. El contenido de cada isómero se analizó en células control no estimuladas (barras abiertas) o células estimuladas (barras cerradas) con manano más laminarina (0,5 mg/ml cada una) durante 1 h. (B) Tiempo de liberación de los ácidos grasos 16:1 en los macrófagos estimulados con manano más laminarina, según se evaluó por GC/MS después de derivar los ácidos grasos libres a ésteres metílicos. Los resultados se muestran como media \pm error estándar (n=6). *p < 0,05, significativamente diferente de las células no estimuladas.

2.4. Participación de PLA₂ en la liberación de los 16:1

Dado que los estudios lipidómicos previos del laboratorio indicaron que los ácidos grasos 16:1 se encuentran principalmente en la posición sn-2 de los fosfolípidos en los macrófagos peritoneales residentes de ratón (139), sería lógico esperar que una PLA₂ mediara la movilización de los ácidos grasos 16:1 en células activadas. Para verificar este punto, se probó en primer lugar el efecto de los inhibidores selectivos de las dos principales PLA₂ intracelulares potencialmente responsables de la liberación de ácidos grasos en los macrófagos activados, es decir, cPLA₂ α e iPLA₂-VIA (139, 140). Para inhibir cPLA₂ α se utilizó la pirrofenona. Para inhibir la iPLA₂-VIA se usó la fluorocetona FKGK18 y bromoenol lactona (BEL). Estos inhibidores son los compuestos más potentes y selectivos actualmente disponibles para bloquear la cPLA₂ α y la iPLA₂-VIA en células (128, 240). Además, se ensayó también el efecto del SKF9625, un inhibidor

de la transacilasa independiente de coenzima A, que actúa en conjunto con cPLA₂ α para remodelar los fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados (158). La figura IV.2.4.A muestra que la liberación de los ácidos grasos 16:1 fue casi completamente inhibida por los dos inhibidores de la iPLA₂-VIA, mientras que la pirrofenona y el SKF98625 no tuvieron efecto. En las condiciones utilizadas, ninguno de los inhibidores ejerció ningún efecto detectable sobre la viabilidad celular.

A continuación, para confirmar los resultados obtenidos con los inhibidores, se examinó el efecto de un oligonucleótido antisentido para la iPLA₂-VIA, que ya ha sido utilizado anteriormente en laboratorio para reducir la expresión de esta enzima en diferentes tipos celulares (216-221). Dado que no se pudo disponer de anticuerpos contra la iPLA₂-VIA de ratón que dieran respuestas consistentes, se analizó la eficacia de la inhibición por oligos antisentido determinando los niveles de mRNA de esta fosfolipasa mediante qPCR, y también ensayando la actividad iPLA₂ sensible a BEL en homogeneizados celulares después de los diferentes tratamientos. Utilizando estas técnicas, se observó una disminución del mRNA del 50-60% (Fig. IV.2.4.B), y una disminución de la actividad enzimática del 60-70% (Fig. IV.2.4.C). Es importante destacar que incluso con esta inhibición incompleta, la movilización de los ácidos grasos 16:1 de los macrófagos se suprimió casi totalmente (Fig. IV.2.4.D). En conjunto, estos datos muestran que la iPLA₂-VIA es la enzima clave que regula la movilización de ácidos grasos 16:1 en macrófagos activados.

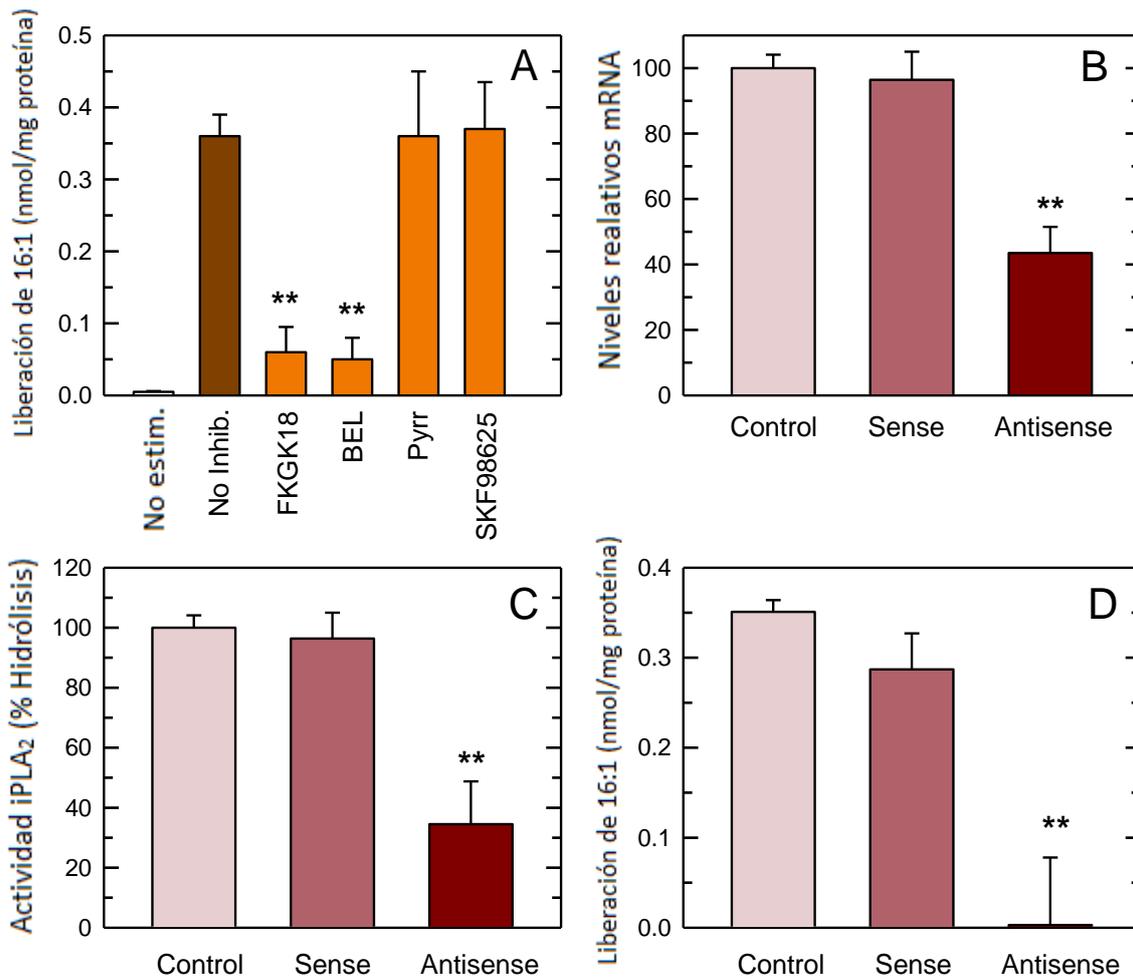


Fig. IV.2.4. Liberación de ácidos grasos 16:1 por macrófagos estimulados. (A) Las células no fueron estimuladas o fueron estimuladas por el manano más laminarina (0.5 mg/ml cada uno) durante 1 h (barras de color) en ausencia (sin inhibición) o presencia de los siguientes inhibidores: 10 μ M de FKGK18, 5 μ M de bromoenol lactona (BEL), 2 μ M de pirrofenona (pyrr), o 10 μ M de SKF98625. Después, el contenido total de ácidos grasos 16:1 fue medido por el GC/MS. La liberación de ácidos grasos se calculó restando la cantidad de fosfolípidos ligados 16:1 en las células estimuladas de la cantidad en las células no estimuladas. Los resultados se muestran como valores medios \pm error estándar de la media. (n = 4). **p < 0,01, significativamente diferente de las células estimuladas en ausencia de inhibidores. (B) Las células fueron tratadas durante 36 h con oligonucleótido en sentido (sense) o antisentido (antisense), o vehículo (Control), y la expresión del ARNm de iPLA₂-VIA fue analizada por qPCR. (C) Actividad iPLA₂ en homogeneizados de células tratadas con el vehículo (control), sentido o antisentido se determinó por ensayo *in vitro*. (D) Después de los tratamientos con oligonucleótidos, las células fueron estimuladas y se determinó la liberación de 16:1. Los resultados se muestran como valores medios \pm SEM. (n = 4). **p < 0,01, significativamente diferente de las células de control.

2.5. Estudios con ácidos grasos deuterados

Una pregunta importante que surge de los resultados que muestran que los macrófagos activados liberan 16:1 es si, después de ser liberado, el ácido graso permanece en forma de ácido graso libre o se utiliza para la formación de nuevos lípidos que contengan 16:1 y que puedan tener también actividad biológica. Se ha demostrado que los macrófagos activados liberan algunos ácidos grasos, como son el AA y otros poliinsaturados, que se transfieren también entre diversas especies de fosfolípidos mediante reacciones de remodelación, siendo estas necesarias para mantener el funcionamiento y la actividad de los macrófagos (158). Por analogía, se propuso analizar primero si el 16:1 liberado de PC se utiliza en las reacciones de remodelación de los ácidos grasos en fosfolípidos, lo que daría lugar al enriquecimiento de determinadas especies de fosfolípidos que no son de la clase PC. Para analizar el destino metabólico de cada isómero 16:1 por separado y también para mejorar la detección por LC/MS, se utilizaron ácidos grasos deuterados para estos experimentos.

La figura IV.2.5. muestra el perfil característico del 16:1 natural, 16:1n-7 deuterado (16:1n-7d) y 16:1n-9 deuterado (16:1n-9d). El 16:1n-10 deuterado no estaba disponible en el momento de realizar estos experimentos. Se obtuvo el 16:1n-7d de fuentes comerciales y contenía 14 átomos de deuterio; por lo tanto, produjo un conjunto de picos en forma de campana debido a la presencia de varios isotopómeros con un máximo a m/z 267, correspondiente al m/z de la molécula nativa más 14 deuterios. El ácido graso 16:1n-9d fue sintetizado en el laboratorio y contenía 27 átomos de deuterio (en todos los átomos de hidrógeno ligados a carbonos saturados); por lo tanto, produjo un conjunto de picos en forma de campana con un máximo a m/z 277, es decir, la m/z de la molécula nativa de 16:1 más 27. La señal producida por el 16:1 nativo fue muy diferente, mostrando un máximo en m/z 253, permitiendo así una clara diferenciación entre las diferentes especies.

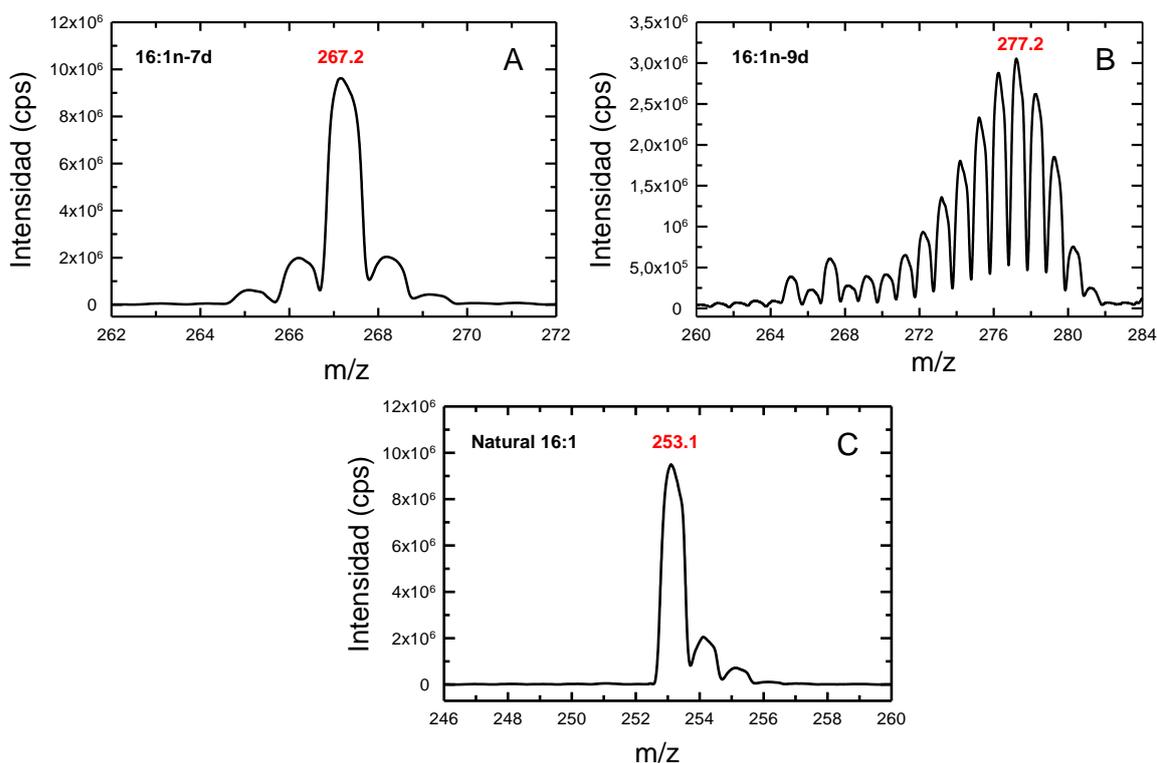


Fig. IV.2.5. Detección de isómeros 16:1 por espectrometría de masas. Se inyectaron directamente en el espectrómetro de masas el 16:1n-7 deuterado (A), el 16:1n-9 deuterado (B) y el 16:1 natural (C) y se determinaron sus espectros m/z. Los m/z de los iones más abundantes están resaltados en rojo.

Se incubaron las células con 16:1n-7d o 16:1n-9d durante 1 h antes de ser estimuladas durante 1 h. Los ácidos grasos deuterados exógenos se incorporaron y distribuyeron en los fosfolípidos de una manera muy parecida a la de los ácidos grasos endógenos (Fig. IV.2.6.). Tanto para 16:1n-7d como para 16:1n-9d, se observó que la estimulación celular promovía la pérdida de 16:1 de PC, perdiéndose cantidades similares de ambos ácidos grasos. Esto es análogo a lo encontrado previamente para el 16:1 endógeno, confirmando así la validez de este enfoque metabolipidómico y, a su vez, proporcionando más prueba de que la liberación estimulada de 16:1 no es específica de los isómeros. Es importante señalar que se pudo detectar un aumento pequeño, pero claramente significativo, en los niveles de la especie PI(18:0/16:1), que contiene 16:1n-7 o 16:1n-9 (Fig. IV.2.6.). Estos resultados demuestran que parte del 16:1 liberado del PC se transfiere a PI durante la activación por receptor en los macrófagos.

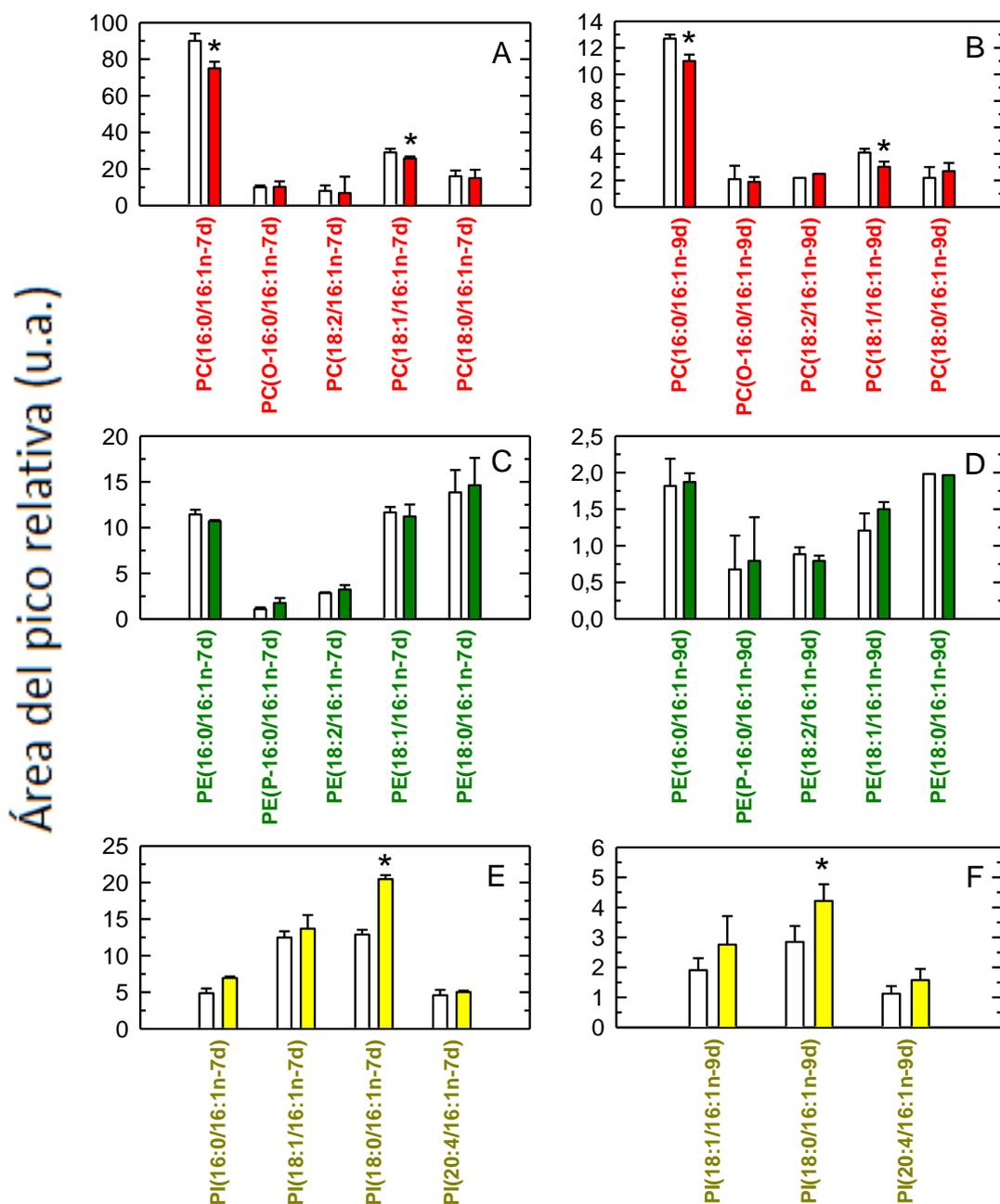


Fig. IV.2.6. Análisis de las especies de fosfolípidos que contienen ácidos grasos deuterados 16:1. Las células fueron incubadas con 16:1n-7 deuterado (columna izquierda, paneles A, C y E) o 16:1n-9 deuterado (columna derecha, paneles B, D y F) (10 μ M, 1 h). Después de lavar extensamente las células para eliminar los ácidos grasos no incorporados, las células fueron o bien no tratadas (barras abiertas) o tratadas con manano más laminarina (0,5 mg/ml cada una, 1 h). Las diversas especies deuteradas se determinaron por LC/MS. Los resultados se muestran como media \pm error estándar (n=6). * p < 0,05, significativamente diferente de las células no tratadas.

2.6. Síntesis de FAHFA conteniendo 16:1

En trabajos recientes se ha descrito en células de mamíferos la existencia de una nueva familia de lípidos que consiste en un ácido graso esterificado al grupo hidroxilo de un ácido graso hidroxilado (FAHFA, del inglés *fatty acid esters of hydroxy fatty acids*), con propiedades antidiabéticas y antiinflamatorias (201). Dado que se ha demostrado que el 16:1 es uno de los ácidos grasos constituyentes de los FAHFAs, se buscó la posible presencia de FAHFAs que contengan el 16:1 en los macrófagos activados. Se detectaron tres especies de este tipo en las células en reposo: los ésteres del ácido hexadecenoico con ácido hidroxihexadecenoico (16:1/OH-16:1), hidroxipalmitico, (16:1/OH-16:0) e hidroxisteárico (16:1/OH-18:0) (Fig. IV.2.7.). Es importante señalar que este último aumentó claramente al activarse los macrófagos, lo que indica que parte del 16:1 liberado durante el proceso de activación se utiliza para formar compuestos de los que se sabe que poseen actividad antiinflamatoria.

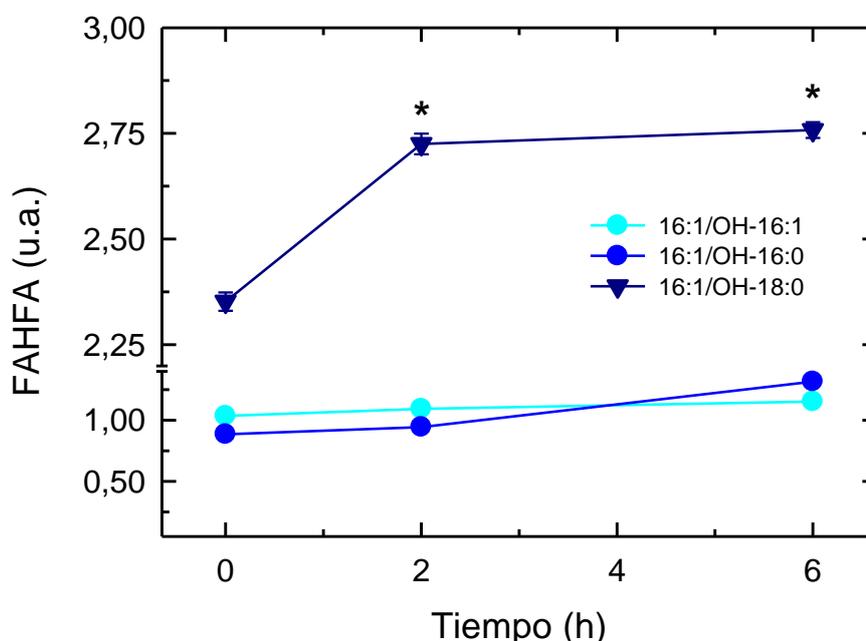


Fig. IV.2.7. Identificación de las FAHFA derivados del 16:1. Las células fueron estimuladas con manano más laminarina (0,5 mg/ml cada una) durante los tiempos indicados. Los FAHFAs con contenido de 16:1 fueron determinados por LC/MS. Se detectaron tres especies: 16:1/OH-16:1 (cian), 16:1/OH-16:0 (azul) y 16:1/OH-18:0 (azul oscuro). Se muestra un experimento

2. *Los macrófagos peritoneales de ratón liberan ácidos grasos antiinflamatorios como el ácido palmitoleico y sus isómeros*

representativo, y los datos se expresan como valores medios \pm de tres réplicas individuales. *
 $p < 0,05$, significativamente diferente de las células no estimuladas.

3. LA MOLÉCULA DE FOSFATIDILCOLINA QUE CONTIENE ISÓMEROS DE 16:1 REDUCE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS DE RATÓN

3.1. El LPS aumenta la remodelación de 16:1n-9 de PC a otras clases de lípidos

Los resultados anteriores, junto con otros resultados del laboratorio, describen que el grueso de los ácidos grasos hexadecenoicos, con un perfil similar en macrófagos peritoneales de ratón (Fig. IV.2.1.) y en la línea celular macrofágica murina RAW264.7 (106), está esterificado en una única especie de PC, que contiene ácido palmítico en la posición sn-1, y ácido hexadecenoico en la posición sn-2 (PC(16:0/16:1)). Como se ha observado en el apartado anterior, esta especie disminuye notablemente cuando los macrófagos se activan con estímulos inflamatorios, a la vez que aumenta la movilización de ácido hexadecenoico libre.

Para comprender mejor la influencia del contenido de 16:1 en PC en su efecto biológico, se desarrolló la síntesis en escala de gramos de PC(16:0/16:1) sustituido por los isómeros de 16:1 (16:1n-7, 16:1n-9, 16:1n-10). Esta ruta sintética proporcionó la cantidad necesaria de estos ácidos grasos monoinsaturados enantioméricamente puros (cis > 95%), para la síntesis de los tres isómeros contenidos en la posición sn-2 de la molécula PC(16:0/16:1). Se ofrece más detalle del procedimiento en el Capítulo IV.4.

Ya que en la Fig. IV.2.2.E se muestra que el LPS también produce una hidrólisis de los PC que contienen 16:1, se quiso analizar cómo afecta este estímulo bacteriano a la distribución de 16:1 en diferentes fracciones celulares en macrófagos incubados o no con PC(16:0/16:1n-9). Se utilizó la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas para analizar los diferentes ácidos grasos que componen los diferentes extractos lípidicos. Debido a que tiene un perfil de ácidos grasos 16:1 similar al encontrado en los macrófagos peritoneales

3. La molécula de fosfatidilcolina que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón

de ratón y se puede disponer de altas cantidades de células de forma rápida para la realización de los experimentos de espectrometría de masas, en estos experimentos se utilizó la línea celular macrofágica de ratón RAW264.7.

En la Fig. IV.3.1. se muestran los ácidos grasos que componen el extracto lipídico total de las células con estos tratamientos, observándose que se produce una incorporación efectiva de los ácidos grasos que forman la fosfatidilcolina utilizada, tanto del 16:0 (ác. palmítico) como de 16:1n-9 (ác. hipogeico). Dado que la tecnología de GC/MS permite un análisis cuantitativo de estos lípidos, se ha calculado que se produce una incorporación efectiva de entre un 5-10% de la cantidad del lípido que se incubaba con las células. Por otra parte, no se observa prácticamente ningún desplazamiento significativo de los demás ácidos grasos que contienen estas células tras la incorporación de esta molécula, ni tampoco tras la activación celular con LPS.

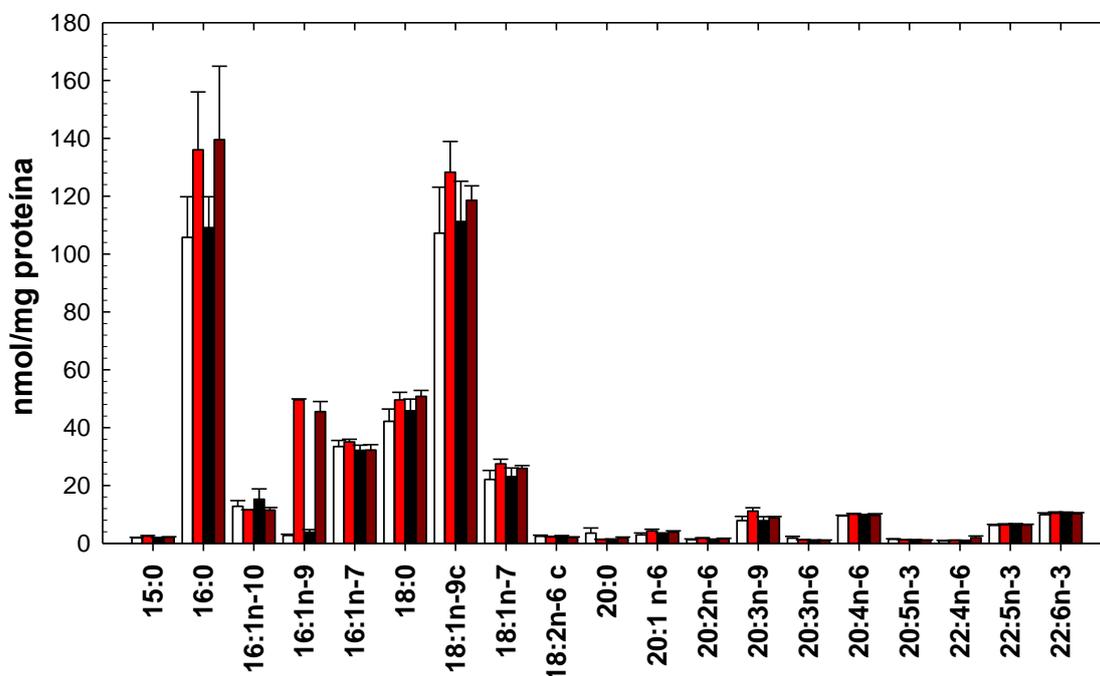


Fig. IV.3.1. Perfil de ácidos grasos del extracto celular en respuesta a LPS. Las células RAW264.7 fueron incubadas con o sin PC(16:0/16:1n-9) 100 μ M complejo con BSA (3:1) durante 24h y estimuladas con y sin LPS (200 ng/ml-6h). Control (blanco), PC(16:0/16:1n-9) (rojo), LPS (negro), LPS + PC(16:0/16:1n-9) (granate). El extracto lipídico total fue analizado por GC/MS tras la transmetilación de los ácidos grasos y la derivatización a derivados de sulfuro

para distinguir los isómeros de 16:1. Los datos se muestran como media y las barras de error representan el SEM (n = 3).

Para analizar la incorporación de PC(16:0/16:1n-9) y la distribución de 16:1n-9 en las diferentes clases de lípidos (PLs, TAG, DAG y CE) en respuesta a LPS, se aislaron las fracciones de lípidos por cromatografía en capa fina y se analizó el contenido del isómero 16:1n-9 por medio de GC/MS. Como se ha comentado anteriormente, esta técnica nos permite realizar un análisis de la distribución del ácido graso 16:1n-9 de forma cuantitativa. Para analizar mejor la incorporación y la remodelación de 16:1n-9 en respuesta a LPS, se analizó la distribución (%) del 16:1n-9 incorporado en las diferentes clases de lípidos.

La figura IV.3.2 muestra que las células acumulan este ácido graso preferentemente en los PLs (en torno al 95%), lo que tiene sentido, ya que el PC(16:0/16:1n-9) se está incorporando a las células como tal. Además, se encontraron pequeños aumentos de este ácido graso en lípidos neutros, aunque se trata de cantidades muy bajas (DAG, TAG y CE). Cuando estas células son tratadas con LPS se produce una pequeña disminución de la cantidad de 16:1 incorporado en PLs, viéndose aumentado en las demás clases de lípidos. Los cambios sin embargo son muy modestos.

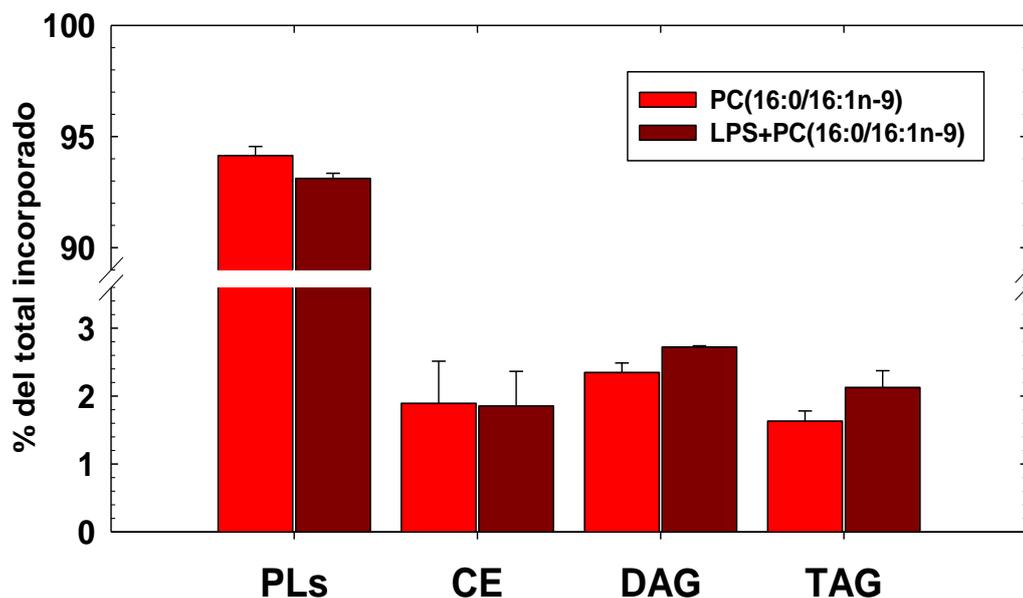


Fig. IV.3.2. Remodelación de 16:1n-9 en diferentes lípidos celulares en respuesta a LPS. Las células RAW264.7 fueron incubadas o no con PC(16:0/16:1n-9) 100 μ M complejadas con BSA (3:1) durante 24h y estimuladas con LPS (200 ng/ml-6h) o ninguna. Se extrajeron las clases de lípidos, separadas por cromatografía de capa fina (TLC). Los ácidos grasos de diferentes fracciones se transmetilan y derivatizan con dimetil disulfuro (DMS). Estos aductos de 16:1n-9 se midieron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). % de aumento en cada clase de lípido respecto al total incorporado en cada condición. 100% = 50 nmol aprox. Los datos se muestran como media y las barras de error representan el SEM (n = 3).

Dado que prácticamente todo el PC(16:0/16:1n-9) se incorpora en la fracción de PLs, pareció interesante analizar el contenido de 16:1n-9 en las diferentes clases de fosfolípidos. PI y PA no pudieron separarse con el método utilizado, por lo que se muestran juntos. Como era de esperar, se observa una incorporación preferente en PC (aprox. 75%) entre estas clases de PL. Sin embargo, la cantidad de 16:1n-9 también aumenta, aunque en mucha menor medida, en PE, PS, PI/PA (Fig. IV.3.3). Este resultado indica que el ácido graso 16:1n-9 podría ser movilizado desde PC a otras clases de PL. En cuanto al efecto del LPS sobre la distribución de 16:1n-9 entre los PL, es interesante que la cantidad de este ácido graso contenido en el PI/PA aumenta muy significativamente cuando las células enriquecidas con 16:1n-9-PC son estimuladas con LPS. Al mismo tiempo, hay una

disminución en la cantidad relativa de este ácido graso en PC, lo que sugiere una remodelación del 16:1 de PC a PI/PA en respuesta al LPS.

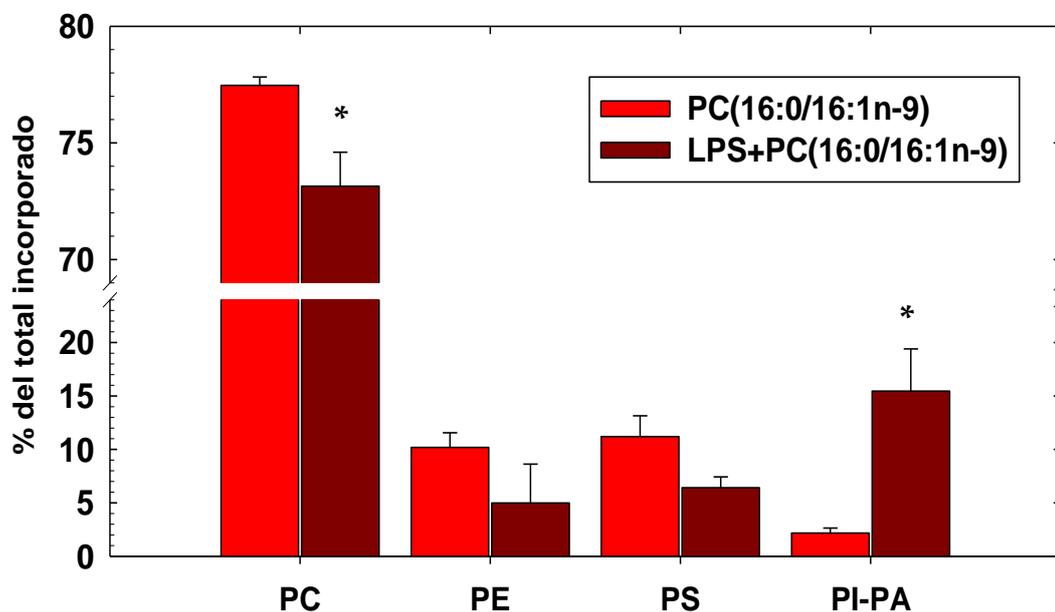


Fig. IV.3.3. Remodelación de 16:1n-9 en diferentes lípidos celulares en respuesta a LPS. Las células RAW264.7 fueron incubadas o no con PC(16:0/16:1n-9) 100 μ M complejadas con BSA (3:1) durante 24 h y estimuladas o no con LPS (200 ng/ml-6 h). Se extrajeron las clases de fosfolípidos, separados por cromatografía de capa fina (TLC). Los ácidos grasos de diferentes fracciones se transmetilan y derivatizan con dimetil disulfuro (DMDS). Estos aductos de 16:1n-9 se midieron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS). Aumento de la cantidad total de 16:1 respecto al control o LPS = 100% (25 nmol aprox.). Los datos se muestran como media y las barras de error representan el SEM (n = 3. * = p<0.05, , significativamente diferente de las células no estimuladas.

Para distinguir si el aumento mediado por LPS en 16:1n-9 ocurre en PI o PA o en ambos, las especies que contienen 16:1 en diferentes clases de PLs se analizaron los fosfolípidos por LC/MS utilizando el modo de reacción múltiple para su identificación. En consonancia con los datos de GC/MS, se encontró un aumento en las especies de PC que contienen estos isómeros cuando los macrófagos RAW264.7 fueron incubados con PC(16:0/16:1n-9) (80% aprox.), encontrando también niveles más bajos en las otras clases de PLs.

Como se muestra en la figura IV.3.4., el LPS redujo la cantidad 16:1-PC mientras que aumentó los niveles de 16:1 en el PI, lo que sugiere que se está produciendo una remodelación de 16:1 principalmente hacia PI. Otras clases de

fosfolípidos, incluyendo PS y PA aumentan también con la activación de las células por LPS aunque dicho aumento es muy modesto. Estos resultados demuestran que el LPS, al igual que ocurre con el zimosán, aumenta la remodelación de 16:1 de PC fundamentalmente a PI, sugiriendo un posible papel para el 16:1-PI en el proceso inflamatorio.

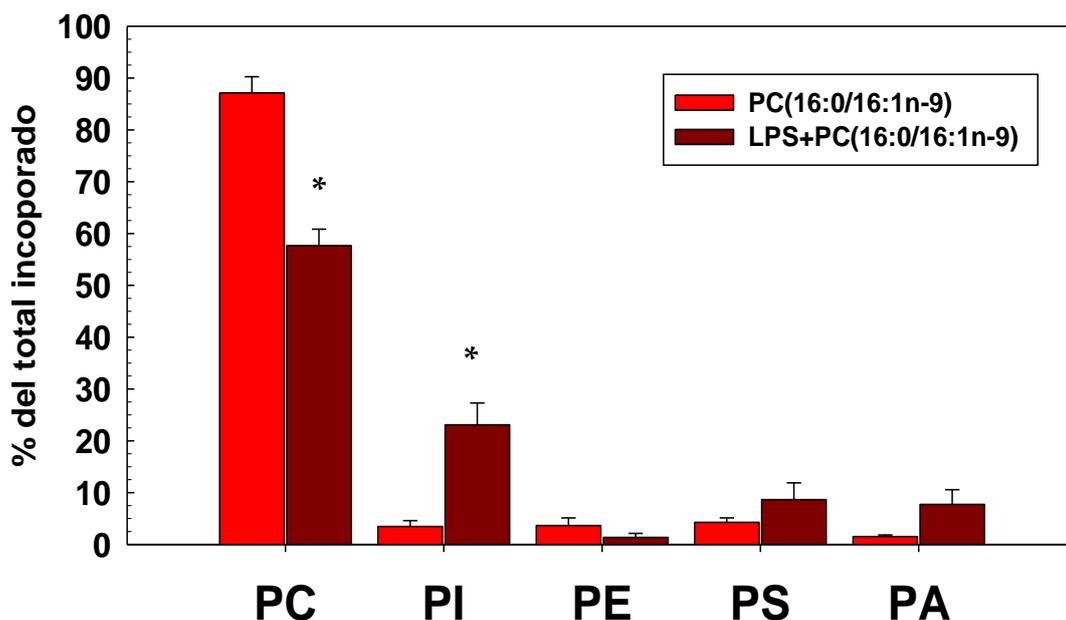


Fig. IV.3.4. El LPS promueve la remodelación de 16:1 de PC a PI. Las células RAW264.7 fueron incubadas o no con PC (16:0/16:1n-9) 100 μ M complejo con BSA (3:1) durante 24 h y estimuladas con LPS (200 ng/ml-6 h) o ninguna. Distribución de la incorporación de las especies de 16:1 en las diferentes clases de fosfolípidos (PC, PI, PE, PS y PA) detectados LC-MS. 16:1 aumentado total frente a control o LPS = 100%. Los datos se muestran como media y las barras de error representan el SEM (n = 3). * = $p < 0.05$, significativamente diferente de las células no estimuladas.

3.2. El 16:1 contenido en PC reduce la respuesta inflamatoria en los macrófagos RAW264.7

El objetivo de este parte del estudio es determinar si las especies de PC que contienen 16:1n-7, 16:1n-9, o 16:1n-10 como uno de los sustitutos de los acilos en la posición sn-2, son también moléculas biológicamente activas que dan cuenta del efecto antiinflamatorio del ácido graso.

Para comprobar si las especies de PC que contienen los isómeros de 16:1: (PC(16:0/16:1n-7), PC(16:0/16:1n-9) y PC(16:0/16:1n-10)), y otros compuestos con composición química similar (PC(16:0/18:1n-9) y PC(16:0/16:0)), tienen actividad biológica por sí mismas, se analizó la expresión de los genes proinflamatorios (*Il6* y *Tnfa*) en células RAW264.7 enriquecidas con estos lípidos y estimuladas con LPS.

Estos datos revelaron que los niveles de expresión de *Il6* y *Tnfa* después de la exposición de LPS están significativamente disminuidos en las células previamente incubadas con los isómeros de PC(16:0/16:1), en comparación con PC(16:0/18:1n-9) y PC(16:0/16:0), que no ejercen ningún efecto (Fig. IV.3.5).

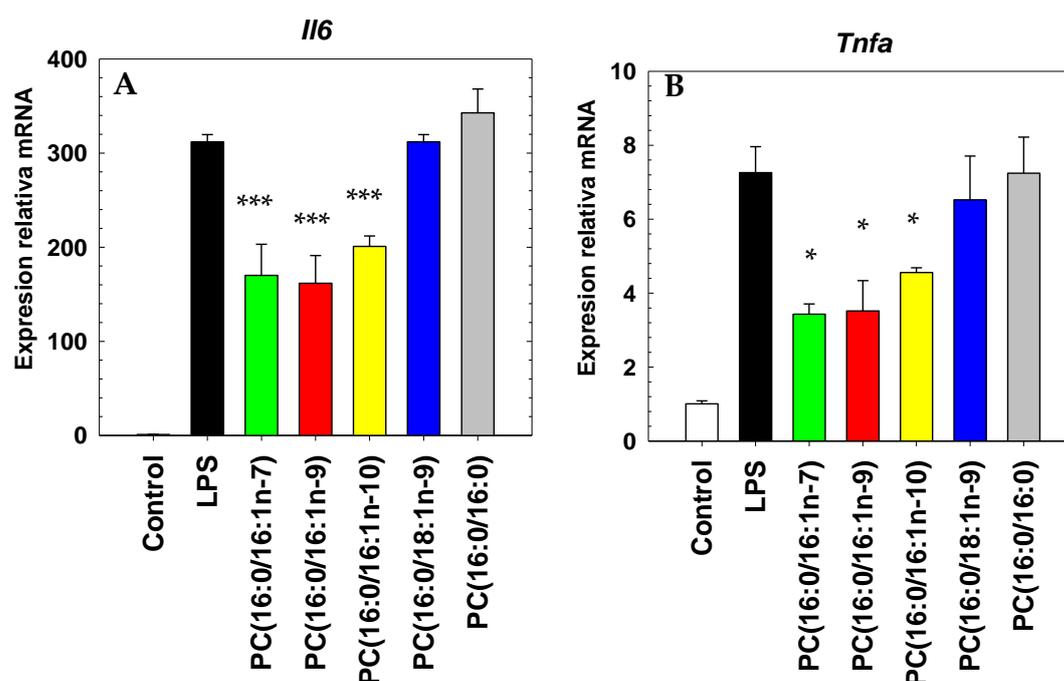


Fig. IV.3.5. PC(16:0/16:1) reduce la expresión de las citoquinas inflamatorias. Las células RAW264.7 fueron incubadas o no con 100 μ M durante 24h con los diferentes PCs complejados con BSA(3:1) y estimulados con 200ng/ml de LPS durante 6h. La expresión de *Il-6* (A) y *Tnf- α* (B) fue analizada por RT-qPCR. Los datos se muestran como media \pm barras de error representan el SEM (n = 3). * = p<0,05; ** =p<0,01; *** =p<0,005, significativamente diferente de las células no tratadas con los PC.

Tratando de caracterizar este efecto antiinflamatorio observado de PC(16:0/16:1n-9), se evaluó la expresión de *Il6* modificando la dosis y el tiempo

3. La molécula de fosfatidilcolina que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón

de incubación con este lípido (Fig. IV.3.6). Se puede observar que la disminución de la expresión de esta citoquina alcanza un máximo a una concentración de 100 μM reduciendo la expresión hasta un 70%. Por otro lado, entre 12-24 horas de preincubación fueron suficientes para reducirlo en un 60% aproximadamente de forma estable.

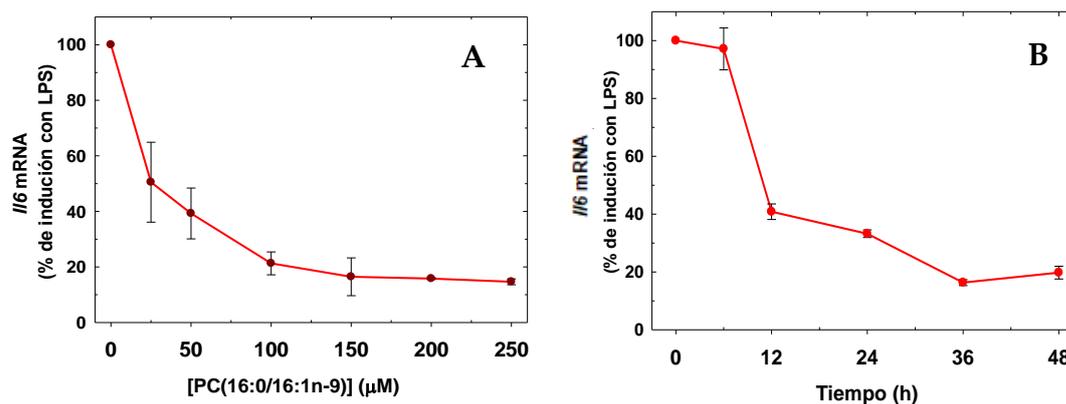


Fig. IV.3.6. Evaluación del PC(16:0/16:1) en respuesta a LPS. A) Inducción de *Il6* en respuesta a 6 h de LPS en células previamente incubadas con las concentraciones indicadas de PC(16:0/16:1n-9) durante 24 h. Los datos se muestran como % de inducción respecto a la condición sin preincubación. B) Tiempo de incubación con PC(16:0/16:1n-9) antes de la estimulación con LPS durante 6h. La expresión de *Il6* fue analizada por RT-qPCR (100%=tratamiento con LPS). Los datos se muestran como media y las barras de error representan el SEM (n = 3).

Para comparar si el efecto antiinflamatorio también se produce con otros estímulos, tanto dependientes de receptor (zimosán opsonizado y LPS) como no dependientes (PMA e ionóforo A23187), se examinaron los niveles de *Il6* en células tratadas con los tres isómeros de PC(16:0/16:1) y expuestas a estímulos inflamatorios ampliamente utilizados. Los niveles de mRNA de las citoquinas disminuyen notablemente en las células tratadas con los fosfolípidos que contienen los isómeros para todos los estímulos examinados (Fig. IV.3.7). En conjunto, estos datos demuestran que la respuesta inflamatoria de los macrófagos RAW264.7 está disminuida debido al tratamiento previo con las fosfatidilcolinas que contienen los isómeros de 16:1 en la posición sn-2 y es independiente del estímulo inflamatorio utilizado, actúe o no vía receptor.

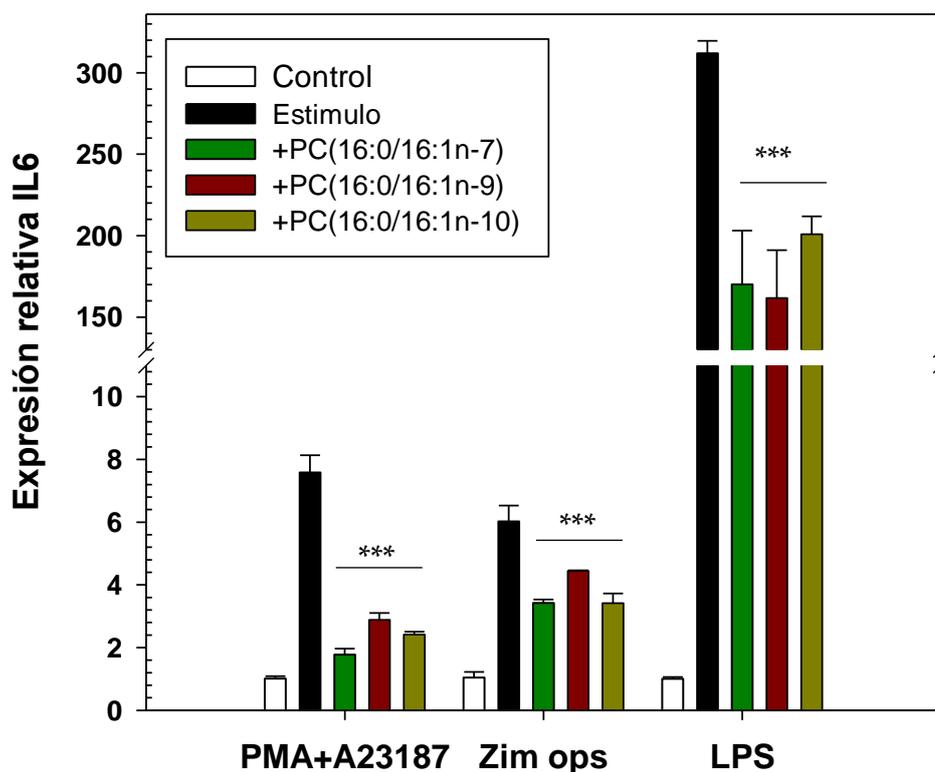


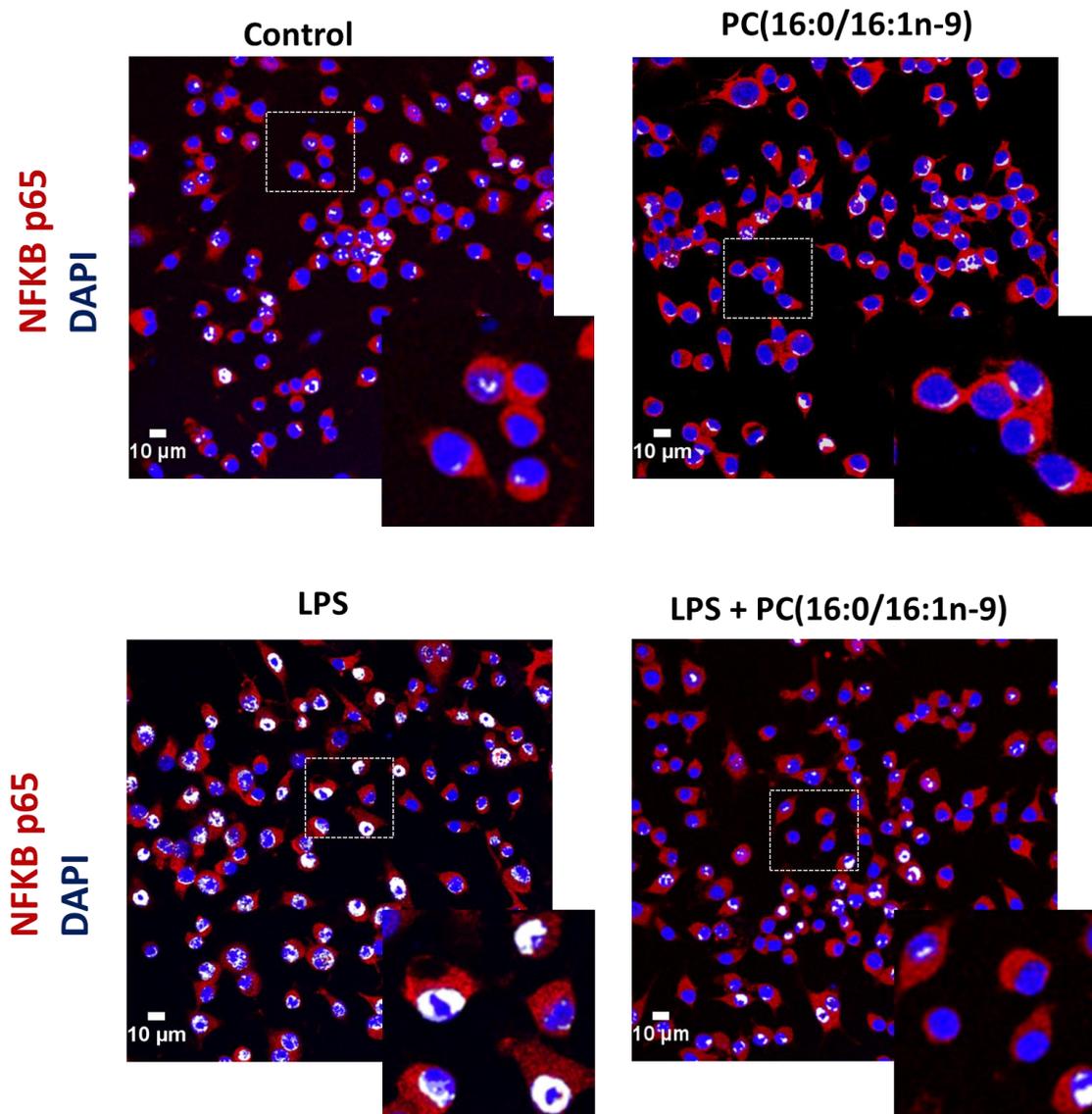
Fig. IV.3.7. Los isómeros de PC(16:0/16:1) poseen propiedades antiinflamatorias ante diferentes estímulos relacionados con la inflamación. Las células fueron tratadas con PC(16:0/16:1) 100 μ M durante 24h y expuestas durante 6h a estímulos inflamatorios (PMA (100 ng/ml) + ionóforo A23187 (1 μ mol/ml), zimósán ops (500 μ g/ml) y LPS (200 ng/ml). La expresión del IL-6 fue analizada por RT-qPCR. Los datos se muestran como media y las barras de error representan el SEM (n = 3). Los valores de p por la prueba t de Student son los indicados. *** = p < 0,005, significativamente diferente de las células no tratadas con PC.

3.3. PC(16:0/16:1n-9) reduce la translocación inducida por LPS de la subunidad p65 de NF- κ B al núcleo

Los genes proinflamatorios analizados anteriormente están bajo la regulación transcripcional de NF- κ B. Por lo tanto, se examinó si PC(16:0/16:1n-9) inhibe la activación por el LPS a través de la vía NF- κ B. Para ello se utilizó una tinción de la subunidad p65 (color rojo) y los núcleos (color azul) donde el índice de translocación se calcula como resultado de la cantidad de píxeles p65 que colocalizan con el color azul del núcleo. Los resultados muestran que la

3. La molécula de fosfatidilcolina que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón

incubación con PC reduce de manera importante la translocación de p65 inducida por el LPS al núcleo (Fig. IV.3.8.) Curiosamente, este efecto también se observa incluso en ausencia del estímulo. Estos resultados demuestran que PC(16:0/16:1n-9) ejerce el efecto antiinflamatorio al disminuir la activación de NF- κ B.



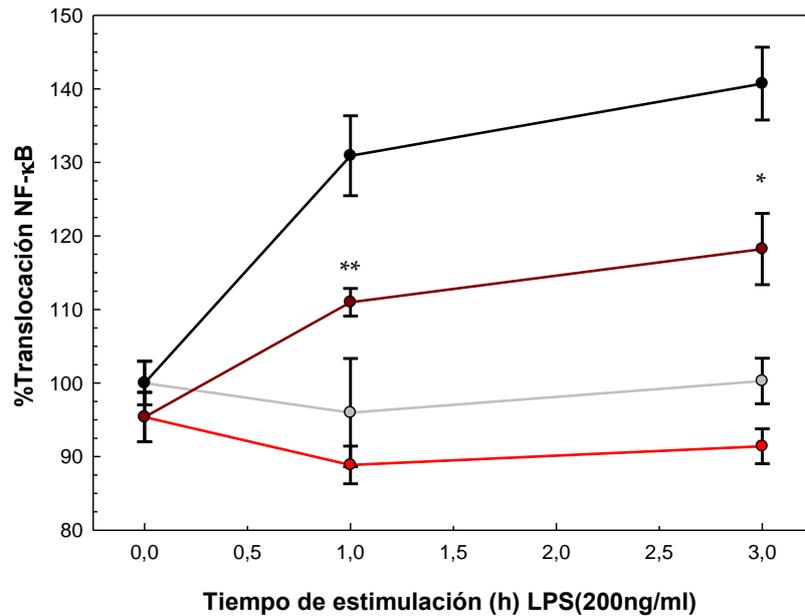


Fig. IV.3.8. PC(16:0/16.1n-9) inhibe la translocación nuclear inducida por LPS de NF-κB. A) Las células RAW264.7 fueron pretratadas o no con 100 μM durante 24 h con PC(16:0/16:1n-9) complejo con BSA(3:1) y estimuladas o no con 200 ng/ml LPS durante 6h. Las células se incubaron con un anticuerpo anti-p65, seguidos de un anticuerpo secundario policlonal anti-conejo (rojo) y una tinción de núcleo con DAPI (azul). La localización subcelular de la p65 y la DAPI se visualizó por microscopía confocal y su colocalización está representada en color blanco. Las imágenes son representativas de tres experimentos a 1h de estimulación. **B)** El curso temporal de la translocación nuclear de p65 se determinó por microscopía confocal (100% = translocación nuclear en las células no preincubadas (control)). Control (gris), LPS (negro), PC(16:0/16:1n-9) (rojo) y LPS+ PC(16:0/16:1n-9) (granate). Los datos se muestran como media y las barras de error representan el SEM (n = 3). * = p<0,05; ** =p<0,01, significativamente diferente de las células no pretratadas con el PC.

4. SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS DERIVADOS DE 16:1

Debido a que los isómeros de los fosfolípidos PC(16:0/16:1) y los ácidos grasos marcados isotópicamente no se encuentran disponibles comercialmente, se procedió a elaborar una ruta sintética efectiva y sencilla para realizar los estudios biológicos correspondientes que se detallaron en los capítulos precedentes.

Para poder elaborar la síntesis química de los PCs se partió de los componentes que lo forman, como son los dos ácidos grasos y la glicerofosocolina. Debido a que no se encuentran disponible los isómeros 16:1 en escala de gramos para poder llevar a cabo la síntesis de los PC, primero se llevó a cabo la síntesis de estos tres isómeros de los ácidos grasos 16:1 (16:1n-7, 16:1n-9 y 16:1n-10) y del 16:1n-9 deuterado.

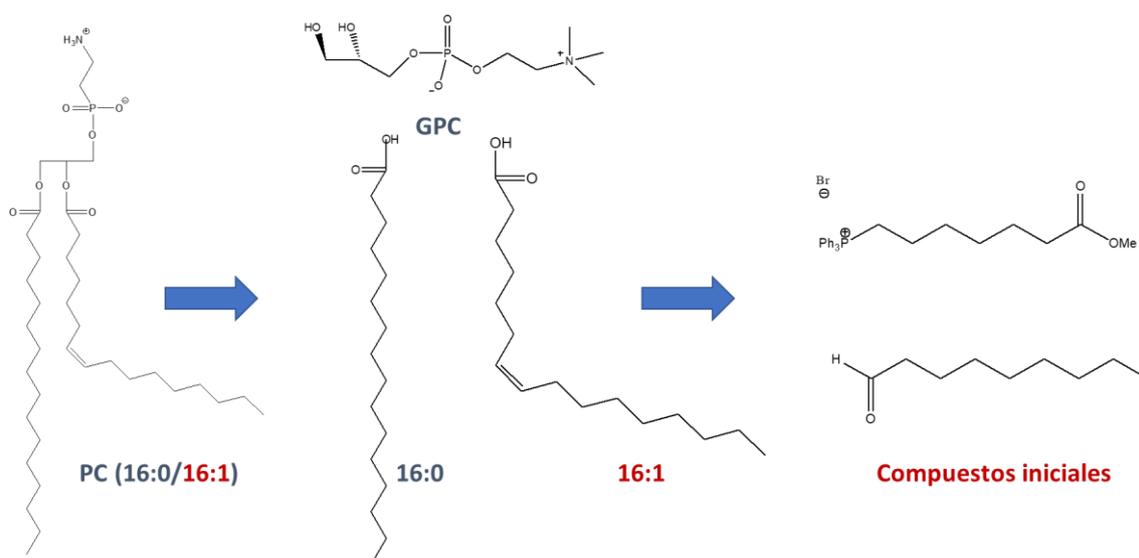
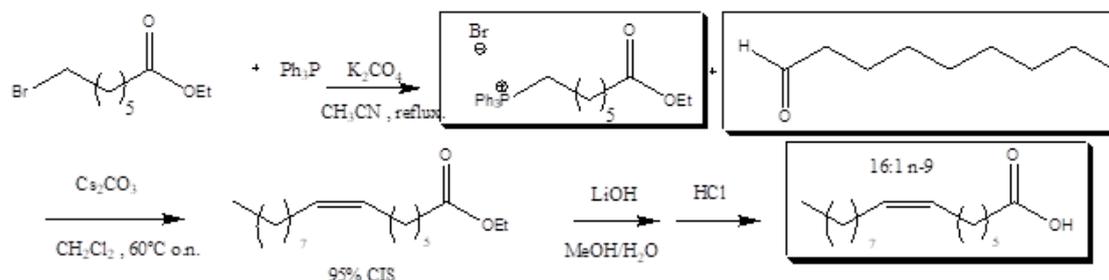


Fig. IV.4.1. Esquema síntesis de los isómeros PC(16:0/16:1)

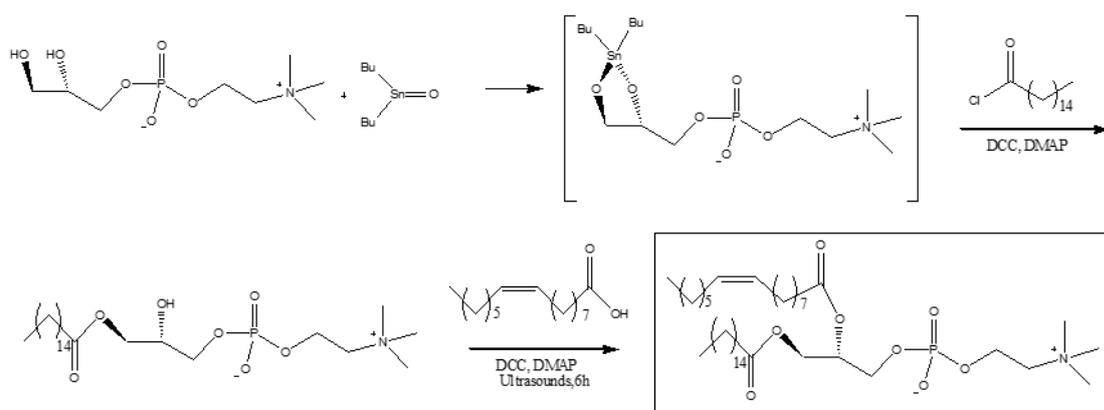
Los isómeros 16:1 no comerciales se prepararon utilizando una estrategia sintética que utiliza la reacción de Wittig (241), a partir de un oxo-fragmento y una sal de bromuro de trifetilfosfonio (sal de Wittig), para formar un doble enlace con estereoquímica *cis* (~95%) y una posterior saponificación para obtener los compuestos deseados. La reacción de Wittig proporciona la flexibilidad para preparar estos ácidos grasos con diferentes posiciones del doble enlace,

modificando simplemente la longitud de la cadena de carbono en cada fragmento utilizado (241).



Esquema IV.4.2. Síntesis de los ácidos grasos 16:1

Para poder obtener los isómeros PC(16:0/16:1) en los que los ácidos grasos 16:1 se encuentran en la posición sn-2, fue necesario comenzar con la glicerofosfatidilcolina, en el que el ácido palmítico se introdujo regioselectivamente en la posición sn-1 mediante el uso de catalizador organoestánico (242). Para mejorar el rendimiento de la reacción, el ácido palmítico se modificó previamente a un haluro de ácido para aumentar su reactividad. Una vez obtenida el lisoPC(16:0), la esterificación de los isómeros 16:1 en la posición disponible se llevó a cabo de manera similar a la descrita aquí (243), pero aumentando la productividad y reduciendo el tiempo de las reacciones mediante el uso de un baño de ultrasonidos durante el desarrollo de la reacción (244).

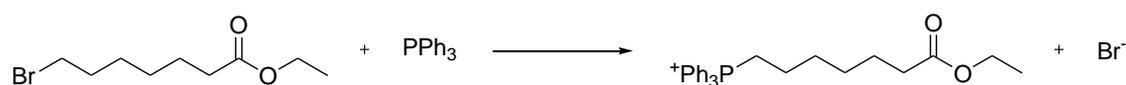


Esquema IV.4.3. Síntesis de los PC(16:0/16:1)

4.1. Síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico (16:1n-9):

La síntesis de los isómeros de 16:1 utilizados en los experimentos anteriores se ha abordado a través de la unión de dos fragmentos de la cadena carbonada que componen el ácido graso, el resultado de esta unión produce la formación del doble enlace. Para ello se ha utilizado la denominada reacción de Wittig entre un iluro de fósforo y un grupo carbonilo del otro fragmento que formará la estructura carbonada del ácido graso (241).

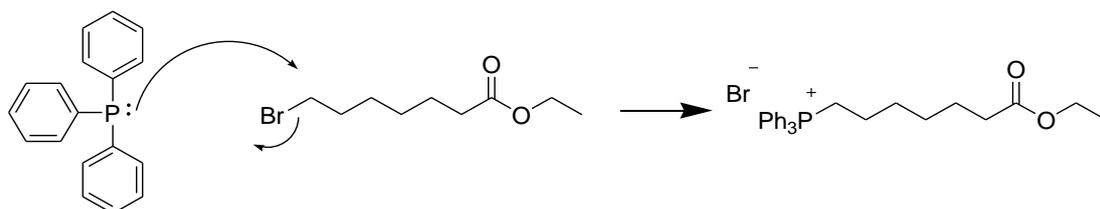
El primer paso se trata de la formación del iluro de fósforo a partir del 7-bromoheptanoato de etilo que se encuentra comercialmente disponible.



Esquema IV.4.4. Formación de la sal de Wittig

Un paso clave fue la utilización de trifenilfosfina anhidra, ya que en presencia de humedad la reacción no ocurre de manera exitosa, por lo cual, debe ser sometida a un proceso de deshidratación a través de una bomba de vacío antes de ser utilizada.

Se trata de una reacción concertada que ocurre a través de un ataque nucleofílico del átomo de fósforo de la trifenilfosfina sobre el átomo de carbono enlazado al bromo, produciendo la sustitución y, por tanto, la formación del bromuro de fosfonio correspondiente.



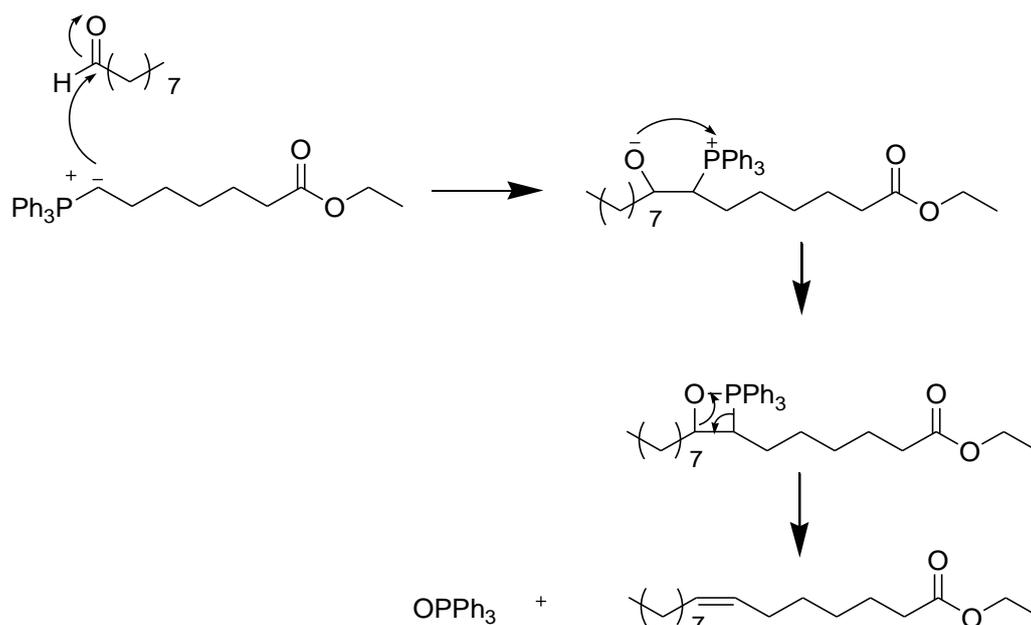
Esquema IV.4.5. Ataque nucleofílico de la fosfina al átomo de carbono bromado.

Debido a que en la reacción se añade trifenilfosfina en exceso, lo que ha quedado sin reaccionar ha de ser eliminado. El proceso más efectivo para llevarlo a cabo es disolver la masa de reacción en MeOH. La sal se disuelve, mientras que la mayor parte de la trifenilfosfina precipita, por lo que puede separarse por filtración.

En los espectros de esta reacción se ha observado la presencia de una mezcla de los ésteres etílico y metílico. Esto se produce debido a una transesterificación durante la cromatografía utilizada para la purificación del compuesto, en la cual, se utiliza sílica-gel como fase estacionaria y el metanol en la fase móvil. La formación del bromuro de fosfonio mediante este método alcanza altos rendimientos, próximos al 94%.

La sal de fosfonio obtenida se trata in situ con una base para deprotonar el átomo de carbono que se encuentra unido a la trifenilfosfina, formándose así el iluro de fósforo correspondiente.

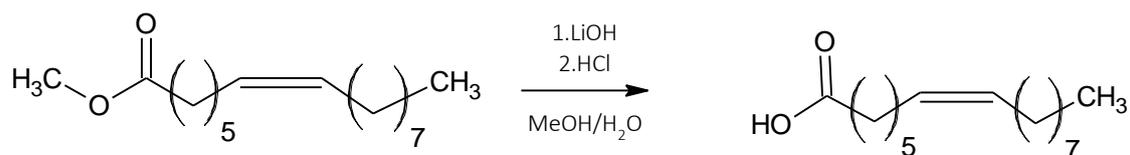
El iluro de fósforo se hizo reaccionar con un aldehído de la longitud deseada, en este caso, con nonanal para obtener el doble enlace. Esta reacción transcurre a través de un ataque nucleofílico del átomo de carbono negativo del iluro sobre el átomo de carbono carbonílico del aldehído. Como resultado, se forma un intermedio en el cual, el átomo de oxígeno ataca al átomo de fósforo de la trifenilfosfina, dando lugar a un intermedio cíclico derivado del oxafosfetano. Por último y a través de una β -eliminación, se libera óxido de trifenilfosfina y se forma el doble enlace deseado.



Esquema IV.4.6. Representación del mecanismo de la reacción de Wittig.

Para este paso se ha observado que la calefacción de ambos fragmentos en presencia de carbonato de cesio conduce al (*Z*)-alqueno con un rendimiento superior al 80%. El uso de carbonato de cesio como base permite simplificar la reacción, ya que evita el empleo de amiduros de litio o bases más fuertes junto con un medio anhidro. El doble enlace formado se encuentra en configuración *Z* (*cis*) debido a que el iluro de fósforo del que se parte no se encuentra estabilizado por resonancia electrónica. En este paso, se sigue teniendo mezcla del éster etílico y metílico, pero esto no es un problema, ya que en la saponificación posterior se formará el ácido carboxílico.

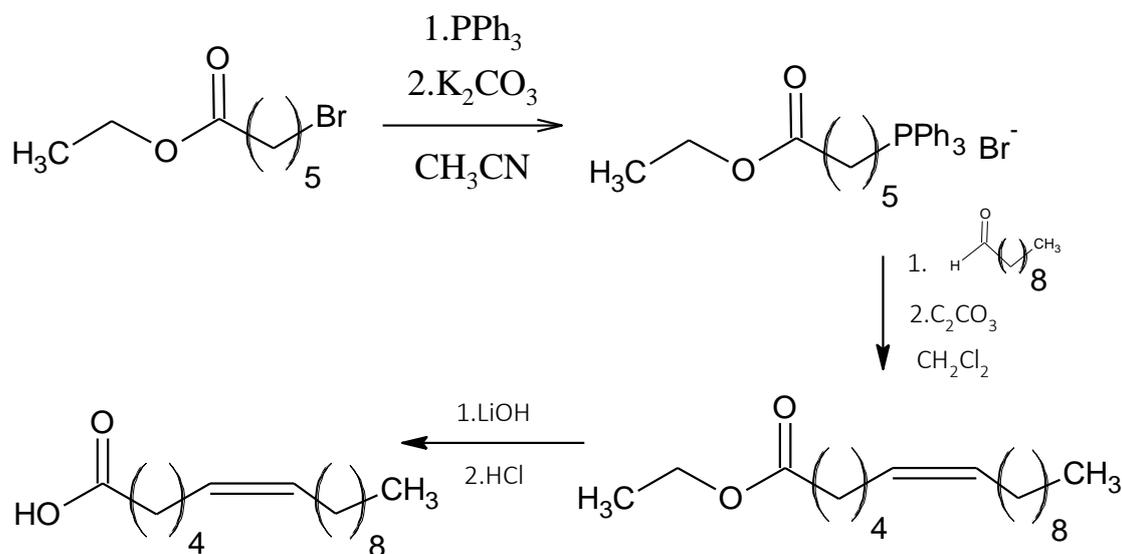
Para la separación del ácido graso formado en la saponificación, se procede a una extracción líquido-líquido donde se logra aislar mediante la acidificación del medio, quedando el compuesto deseado en la fase orgánica y todas las sales formadas durante el proceso en la fase acuosa.



Esquema IV.4.7. Saponificación del éster metílico.

4.2. Síntesis del ácido graso (Z)-6-hexadecenoico (16:1n-10)

La síntesis del ácido graso (Z)-6-hexadecenoico fue abordada de forma análoga a la síntesis del ácido (Z)-7-hexadecenoico, empleando 6-bromohexanoato de etilo y decanal como reactivos de partida, que se encuentran disponibles comercialmente.



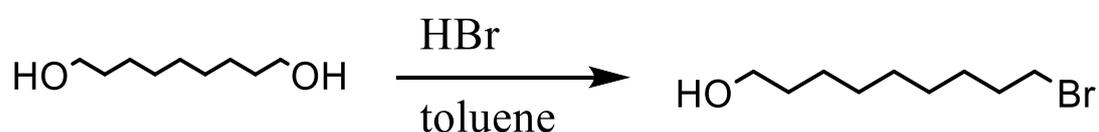
Esquema IV.4.8. Ruta de síntesis del ácido 16:1n-10.

4.3. Síntesis del ácido graso (Z)-9-hexadecenoico (16:1n-7)

Dada la falta del halogenuro de éster comercial para la formación del ácido (Z)-9-hexadecenoico (16:1 n-7), se tuvo que considerar una ruta de síntesis mayor

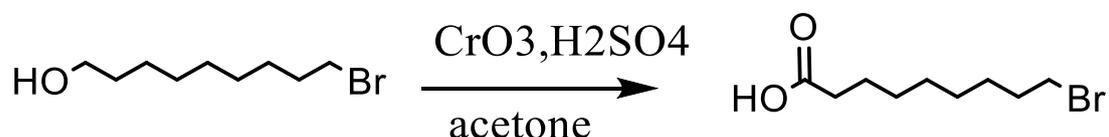
partiendo desde reactivos más simples para poder formar los compuestos de partida análogos a los anteriores, en este caso del 1,9-nonanodiol (245).

Para ello, el primer paso de la síntesis del halogenuro de ester es la monohalogenación del dialcohol. Debido a que se empleó un sistema de extracción por el método Dean-Stark, que permite la separación de la fase donde se encuentra el monohalogenado del sistema de reacción, no se llegó a formar el producto dihalogenado, permitiendo así que el rendimiento de la reacción pudiese alcanzar el 97%.



Esquema IV.4.9. Halogenación del 1,9-nonanodiol .

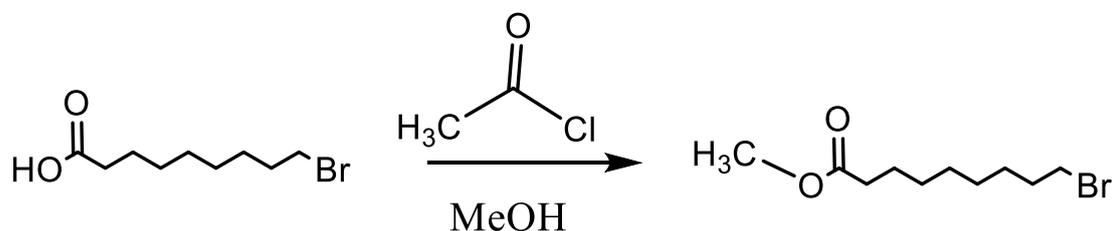
Una vez obtenido el alcohol, se procedió a la oxidación de este grupo funcional a un grupo ácido, que será el que se convierta posteriormente en el ester de bromuro, que es el análogo a los empleados para la síntesis de los ácidos 16:1n-9 y 16:1n-10. La oxidación más efectiva empleada para esta reacción fue la oxidación crómica tipo Jones, que, seguida de un proceso de extracción ácido-base, dio lugar a rendimientos de hasta un 92%.



Esquema IV.4.10. Oxidación del 9-bromo-1-nonanol.

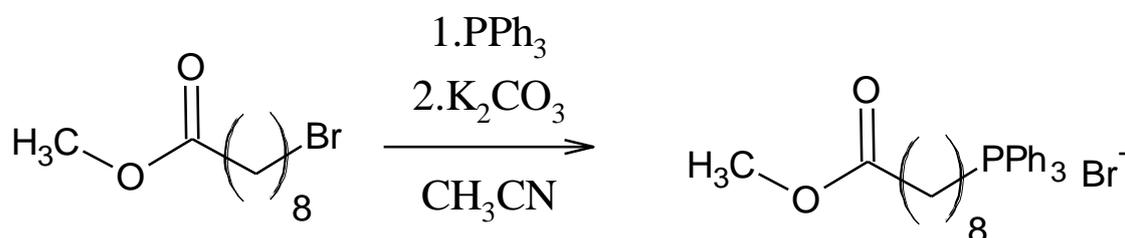
Para esterificar el ácido se emplea metanol con cloruro de acetilo como catalizador. Se ha escogido el uso de metanol con el fin de obtener ésteres metílicos, y así evitar formar mezclas de productos en reacciones posteriores. La reacción

transcurrió de forma rápida y sin la formación de subproductos, con rendimientos de hasta el 94.5%.

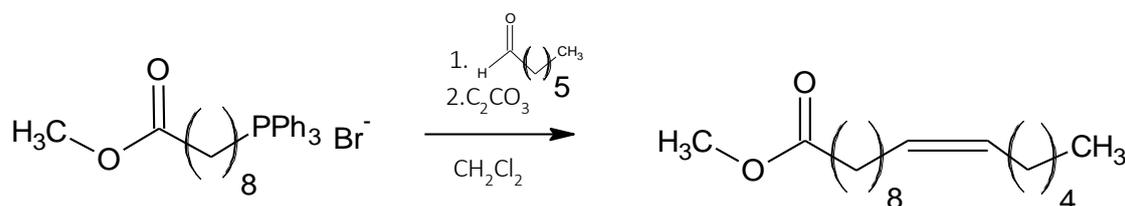


Esquema IV.4.11. Metilación del ácido 9-bromononanoico.

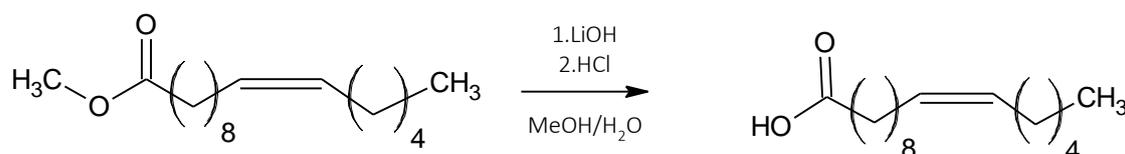
El resto de la ruta sintética transcurrió de forma análoga a las síntesis de los otros dos isómeros, mediante la formación de la sal de fosfonio seguida por la reacción de Wittig y, finalmente, la saponificación del éster para obtener el ácido graso 16:1n-7.



Esquema IV.4.12. Síntesis la sal de fosfonio.



Esquema IV.4.13. Reacción de Wittig.

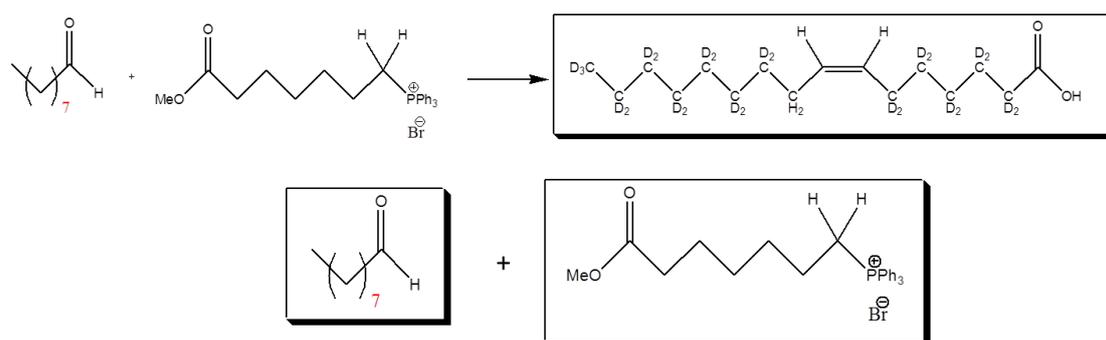


Esquema IV.4.14. Síntesis del (Z)-9-hexadecenoico.

4.4. Síntesis del ácido graso 16:1n-9 deuterado

Dado que los ácidos grasos marcados isotópicamente permiten el seguimiento de la molécula de forma inequívoca en los diferentes extractos celulares con técnicas como el HPLC/MS y GC/MS.

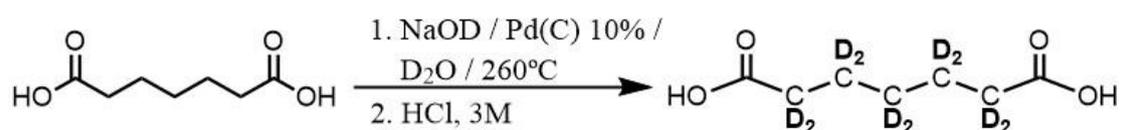
Para sintetizar de este ácido graso marcado con deuterio se sigue una ruta sintética muy parecida a la del ácido graso, pero los productos iniciales que se utilizaron en este caso fueron tratados en un proceso de deuteración (Esquema IV.4.14). Para ello se trataron los compuestos iniciales en un reactor a altas presiones y temperaturas con agua deuterada, permitiendo así el intercambio de los Hidrógenos de las cadenas hidrocarbonadas con los deuterios del agua en presencia de un catalizador Pd(C) (246).



Esquema IV.4.15. Esquema de síntesis del ácido graso 16:1 deuterado.

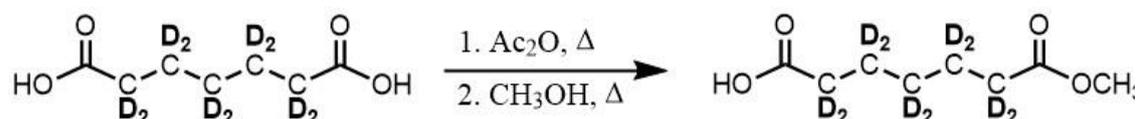
Los primeros ensayos se realizaron con ácido pimélico (ácido heptanodioico), que se trata de un compuesto dicarboxílico que permite una mayor deuteración debido a la acidez provocada por la presencia de estos grupos funcionales, y una mezcla NaOD/D₂O y Pd(C) 10%. La temperatura de trabajo se fijó en 220 °C y una presión de 20 bares. Después de tres días de reacción se obtuvo un porcentaje de deuteración diferente según el átomo de carbono considerado. Dado que los carbonos en α respecto al grupo carboxilo tienen una mayor acidez, se produce un mayor intercambio por deuterio superando el 80%, mientras que en el resto de átomos de carbono el intercambio fue inferior al 10%. El siguiente paso fue

aumentar la temperatura hasta 260 °C y con ello la presión (27 bar). En estas condiciones y después de tres días se obtuvieron porcentajes de intercambio superiores al 70%, por lo que fue necesario repetir el proceso con el producto parcialmente deuterado obteniéndose finalmente el ácido [D₁₀]pimérico con un porcentaje de intercambio H/D superior al 90%.



Esquema IV.4.16. Deuteración del ácido pimérico.

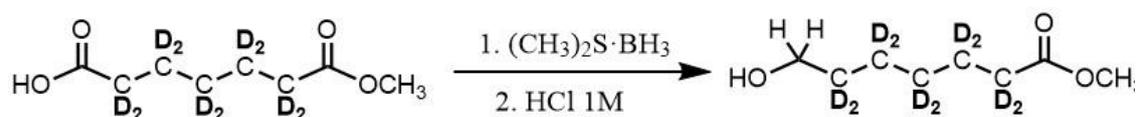
Para lograr la transformación de este diácido en la sal de fosfonio fue necesario diferenciar ambos grupos carboxílicos, para ello se formó su anhídrido correspondiente mediante el uso de calefacción en anhídrido acético. Posteriormente se realizó la apertura de este anhídrido con el uso de metanol a reflujo obteniéndose el monoéster.



Esquema IV.4.17. Formación del monoéster de ácido.

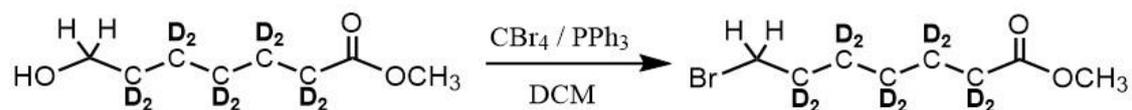
El monoéster fue convertido en [D₁₀]7-hidroxiheptanoato de metilo por reducción con borano dimetilsulfuro en THF anhidro con objetivo de formar posteriormente su halogenuro correspondiente. Debido al elevado coste del derivado de borano deuterado y dado que los ensayos que se pretenden realizar con el ácido graso final son también alcanzables con un grado menor de intercambio H/D, se optó por realizar esta reacción utilizando este reactivo sin

deutarar, obteniéndose que los hidrógenos que se unen al carbono reducido a alcohol.



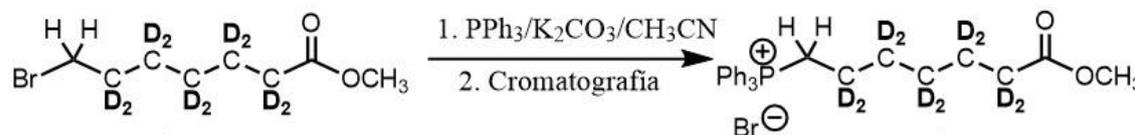
Esquema IV.4.18. Reducción del grupo ácido.

El compuesto obtenido se transformó en el [D₁₀]7-bromoheptanoato de metilo debido a la bromación producida tras hacerlo reaccionar con CBr₄/PPh₃ (247). Este proceso permitió aislar el compuesto mediante destilación con excelentes rendimientos (91%).



Esquema IV.4.19. Bromación del alcohol.

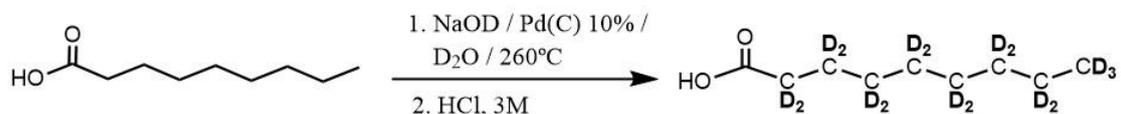
Una vez obtenido el halogenuro de éster, que se trata del compuesto inicial para los otros ácidos grasos sintetizados, se procedió de forma análoga para obtener la sal de wittig. Obteniéndose en este punto de uno de los dos fragmentos necesarios para la obtención del ácido [D₂₇](Z)-7-hexadecenoico.



Esquema IV.4.20. Síntesis de la sal de fosfonio.

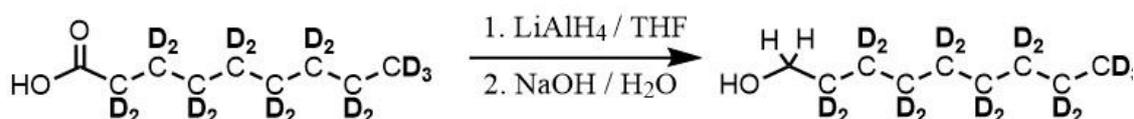
El otro fragmento se preparó a partir de ácido nonanoico. La reacción de intercambio H/D transcurrió con excelentes rendimientos, tanto químico como en el intercambio H/D. La aplicación de las condiciones empleadas en el caso del

ácido pimélico, también son satisfactorias para el caso del ácido nonanoico. Al igual que en el caso del ácido pimélico fue necesario un tiempo de reacción de 6 días para obtener un grado de intercambio H/D superior al 80%.



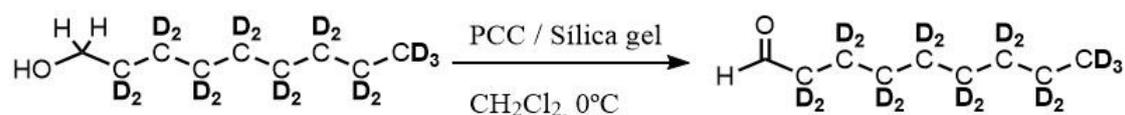
Esquema IV.4.21. Deuteración del ácido nonanoico.

El ácido carboxílico de este compuesto fue fácilmente reducido al alcohol por reacción con LiAlH_4 , con un rendimiento del 90%. Como se hizo en el caso de la reducción anterior (Esquema IV.4.17), se optó por el uso de un reductor no deuterado para obtención del alcohol (248, 249).



Esquema IV.4.22. Reducción del ácido nonanoico[D₁₇].

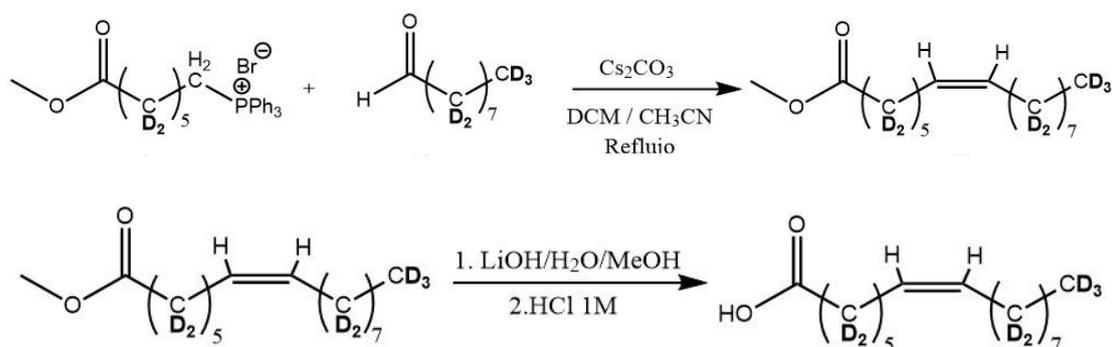
Por último, la oxidación del alcohol a [D₁₇]nonanal, fue posible por tratamiento del alcohol con PCC, obteniendo el aldehído con un rendimiento del 48%.



Esquema IV.4.23. Formación del nonanal [D₁₇].

Como se ha comentado anteriormente la preparación del ácido (Z)-7-hexadecenoico es posible por reacción entre nonanal y el bromuro de (7-metoxi-7-oxoheptil)trifenilfosfonio en medio básico. Una vez completada la reacción, la eliminación de las fracciones insolubles por filtración permite aislar el éster

monoinsaturado, que tras el proceso de saponificación correspondiente se obtuvo el ácido graso 16:1n-9 marcado isotópicamente con deuterio.



Esquema IV.4.24. Síntesis del ácido graso 16:1n-9 deuterado.

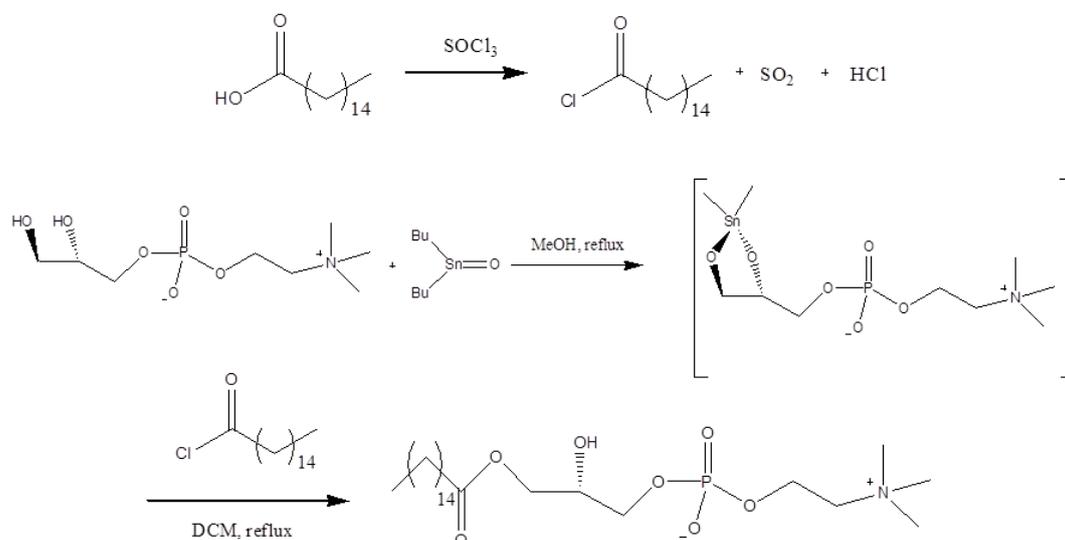
4.5. Síntesis de los fosfolípidos: PC(16:0/16:1n-9), PC(16:0/16:1n-7) y PC(16:0/16:1n-10).

Para poder realizar la síntesis de los fosfolípidos de interés diferentemente sustituidos, se parte del fosfolípido sin sustituir que está disponible comercialmente. Para permitir la reacción selectiva en la posición sn-1 se hace reaccionar con el óxido de estaño, que permite formar un complejo que fomente la incorporación del ácido graso que se quiera introducir en esta posición (250).

Previa a la reacción de formación del organoestannano, se necesita sintetizar el cloruro de ácido palmítico para formar el fosfolípido intermedio. La formación del cloruro de ácido tiene lugar de forma rápida al calentar ácido palmítico en presencia de cloruro de tionilo sin la necesidad de emplear disolvente. El producto se purifica destilándolo a presión reducida.

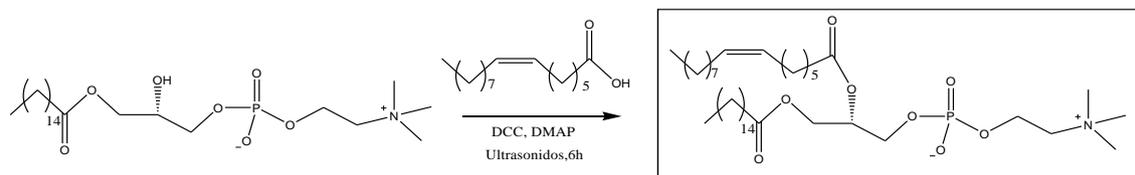
El organoestannano se obtiene por calefacción de la glicerofosfocolina con óxido de dibutil estaño (DBTO) en isopropanol, y, sin aislarlo retirarlo del medio de reacción, se produce la adición del cloruro de ácido en presencia de

trietilamina (TEA), logrando así la incorporación del ácido palmítico de forma regioselectiva en la posición sn-1 (242).



Esquema IV.4.25. Síntesis de 1-palmitoil-2-liso-glicerofosfocolina.

Una vez que se ha obtenido el fosfolípido intermedio, se procedió a introducir los distintos ácidos grasos sintetizados en la posición sn-2. La reacción entre la monoacilcolina y el ácido graso se realizó en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4,4-dimetilaminopiridina (DMAP) en condiciones de atmósfera inerte y ausencia de luz, seguido de extracciones con KHSO₄ saturado, finalizando con una cromatografía en columna. Posteriormente la reacción se optimizó utilizando un baño de ultrasonidos como medio de la reacción en las mismas condiciones, lo cual aumenta mucho el rendimiento de la propia reacción y en mucho menos tiempo (de 72 h a 6 h de reacción) (244).



Esquema IV.4.26. Síntesis del fosfolípido final PC(16:0/16:1)

Capítulo V.- Discusión

1. LOS LÍPIDOS NEUTROS NO SON UNA FUENTE DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MONOCITOS HUMANOS ESPUMOSOS

Las células de la inmunidad innata, como los monocitos circulantes de la sangre, contienen grandes cantidades de AA que puede mobilizarse en diversas condiciones fisiopatológicas (51). Este ácido graso puede metabolizarse en un número relativamente alto de metabolitos oxigenados, llamados colectivamente eicosanoides, por cuatro vías principales: la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, el citocromo-P450 y las reacciones desencadenadas por especies reactivas de oxígeno (251). Si bien muchos productos de estas enzimas y de la oxidación no enzimática de AA provocan diversas respuestas celulares que actúan a través de receptores específicos, el AA no metabolizado por sí mismo también posee actividad biológica. Debido a sus características estructurales, con cuatro dobles enlaces cis interrumpidos por metilenos, el AA influye en la fluidez de la membrana celular, regulando así la función de las principales proteínas de membrana que participan en la señalización intracelular (233, 234). En el presente estudio se ampliaron las contribuciones realizadas anteriores en el laboratorio sobre el papel del AA en la inducción del fenotipo espumoso en monocitos humanos, y se proporcionaron más pruebas de que se trata de un efecto mediado por el propio ácido graso y no por un metabolito oxigenado.

Este trabajo también pone de relieve una diferencia entre los monocitos en condiciones normales y los cargados de lípidos, es decir, la presencia de elevadas cantidades de AA en la fracción de TAG de los monocitos espumosos, lo que no ocurre en los monocitos circulantes normales. En estas últimas células, el AA sólo está presente en fosfolípidos de membrana. Así pues, se plantea la cuestión clave de si el AA que se acumula en los lípidos neutros puede mobilizarse durante la activación inflamatoria de los monocitos y utilizarse posteriormente para generar mediadores lipídicos bioactivos. Esto es particularmente pertinente ya que los

monocitos cargados de AA pueden migrar a los sitios de inflamación, donde podrían descargar sus depósitos de AA en respuesta a estímulos proinflamatorios locales, agravando así el daño. Además, la existencia de vías alternativas para la liberación de AA dentro de la misma célula que dependen del uso del sustrato (es decir, fosfolípidos frente a TAG), también conferiría al sistema una mayor versatilidad en cuanto a la regulación celular de la respuesta inflamatoria mediada por lípidos (es decir, la regulación de la fosfolipasa A₂ frente a la regulación de la ATGL).

Para abordar las cuestiones mencionadas, en este estudio se han realizado análisis lipidómicos basados en espectrometría de masas, combinados con estrategias para obtener monocitos con contenido celular variable de AA. Se encontró una relación entre la exposición de las células a cantidades variables de AA y la aparición del ácido graso en TAG, pero no en fosfolípidos de membrana. Esto es coherente con la noción de que el TAG puede constituir un acúmulo expandible para acomodar el exceso de AA que no puede entrar en los fosfolípidos, que tienen una mayor afinidad y una menor capacidad (107, 108, 252). Sin embargo, no se ha apreciado relación entre la cantidad de AA en TAG y la capacidad de las células para aumentar su respuesta de movilización de AA, que sigue siendo esencialmente la misma, independientemente de la cantidad de AA presente en el TAG. Incluso en condiciones en las que el TAG constituye el principal almacén celular de AA, no se detectó una hidrólisis significativa del TAG, y la respuesta de liberación de AA era totalmente atribuible a la hidrólisis de fosfolípidos. El análisis de las clases de fosfolípidos involucrados en el proceso demuestra que las tres principales clases de fosfolípidos implicados que contienen AA son PC, PE y PI, lo cual concuerda en general con datos previos (211).

Se ha sugerido ampliamente que las LD actúan como sitio intracelular para la biosíntesis de eicosanoides, y algunas de las principales enzimas de la ruta del

AA, como la cPLA₂ α y la ciclooxigenasa-2, se asocian a este orgánulo (33, 253). Si bien aún no se ha demostrado directamente que cPLA₂ α use como sustrato los fosfolípidos de la monocapa de la superficie de la LD para liberar AA (126), se sabe que esta enzima es esencial para mantener la estructura de la LD, en un proceso que puede estar relacionado con la formación de lisofosfolípidos (33). Dado que la movilización de AA en las células de la inmunidad innata implican la interacción entre cPLA₂ α y ciertas fosfolipasas A₂ secretadas (116), y se sabe que estas últimas enzimas también actúan intracelularmente (254-257), es posible que no sólo la cPLA₂ α sino que también una fosfolipasa A₂ secretada actúe para hidrolizar los fosfolípidos de la monocapa de la LD, como ocurre con las lipoproteínas del suero, que son estructuralmente similares a la LD (258). Una vez que se produce la hidrólisis de fosfolípidos en la superficie de la LD, el conjunto de ácidos grasos debe ser preservado para mantener la integridad de la LD. Por lo tanto, el reciclaje de los ácidos grasos entre los fosfolípidos de la superficie de la LD y los lípidos neutros del núcleo interno podría ocurrir para mantener la homeostasis (259). En la actualidad se desconoce si este reciclaje de los ácidos grasos implica al AA en condiciones de activación, pero las células de la inmunidad innata poseen toda la maquinaria enzimática necesaria para transferir AA desde el TAG a los fosfolípidos mediante reacciones dependientes de CoA (260). En este aspecto, podría argumentarse que también podría ser posible un conjunto de reacciones opuestas, es decir, la transferencia de AA de los fosfolípidos al TAG para reponer el AA que podría perderse de esta fracción por liberación directa. Esto daría lugar a una liberación neta de AA del TAG en ausencia de cambios aparentes en los niveles de masa del TAG que contiene AA. Esta situación recuerda un poco a lo que se ha observado cuando se estimulan los macrófagos peritoneales de ratón con zimosán opsonizado para que liberen AA (139, 235, 261). En este sistema, los niveles de PE cambian poco después de la estimulación celular, porque casi todo el AA liberado por la cPLA₂ α se repone con la transacilasa independiente de CoA, que transfiere AA del diacil-PC al

diacil-PE y alquenil-PE. Sin embargo, aparte del problema biofísico de cómo las lipasas de lípidos neutros acceden a su sustrato dentro de la LD (259), el escenario anterior parece improbable porque los experimentos utilizando bromoenol lactona, un potente inhibidor de fosfolipasas similares a la patatina como la ATGL (228-230, 262), no tuvieron ningún efecto en la movilización de AA a partir de monocitos espumosos activados.

En conclusión, estos resultados demuestran que los fosfolípidos de membrana son las principales, si no las únicas, fuentes de movilización de AA a partir de los monocitos humanos estimulados, incluso en condiciones en las que los niveles celulares del ácido graso en el TAG superan a los de las membranas. Estos resultados, en el contexto de la literatura existente, son totalmente consistentes con el trabajo de Johnson et al. (179) en neutrófilos humanos, y difieren de los de Dichlberger et al. (126) en mastocitos humanos. En este último estudio, el silenciamiento de ATGL en mastocitos redujo la síntesis de eicosanoides generados por las vías de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa en la misma medida que la observada con el silenciamiento de cPLA₂α (126). Es posible que las vías responsables de la liberación de AA difieran dependiendo del tipo de tejido y célula (234). Quedan por dilucidar las posibles implicaciones fisiopatológicas y/o razones biológicas de la presencia de AA en TAG en los monocitos, si las hubiera. Dado que los altos niveles de AA libre son tóxicos para las células (232-234, 263), una posibilidad que hay que considerar es que la entrada de AA en TAG pueda servir como un fondo de almacenamiento ampliable para proteger a las células de la toxicidad del ácido graso o para limitar la inflamación mediante la reducción de la cantidad del ácido graso libre disponible para la síntesis de eicosanoides.

2. LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN LIBERAN LOS ÁCIDOS GRASOS ANTIINFLAMATORIOS, ÁCIDO PALMITOLEICO Y SUS ISÓMEROS POSICIONALES

En los últimos años, los ácidos grasos 16:1 se han convertido en centro de atención de la investigación en lípidos bioactivos, dado su potencial como biomarcadores nutricionales y metabólicos (264). En este trabajo se ha demostrado que la mayoría de los 16:1 presentes en los macrófagos se acumulan en una sola especie molecular de fosfolípidos, el PC(16:0/16:1), de la que se libera en condiciones de activación celular. Aunque no se centran específicamente en los ácidos grasos 16:1, estudios recientes que incluyen perfiles lipidómicos de macrófagos también identificaron la especie PC(32:1), probablemente compuesta de 16:0 y 16:1 (aunque también son posibles otras composiciones, por ejemplo, 14:0 y 18:1, o 18:0 y 14:1). Montenegro-Burke et al. (265) analizaron la composición lipídica de los macrófagos humanos polarizados derivados de monocitos, encontrando seis especies que diferían significativamente entre los distintos estados; una de ellas era PC(32:1). En otro estudio en el que también se analizó el perfil de glicerofosfolípidos de los macrófagos humanos se observó una disminución de los fosfolípidos monoinsaturados como PC(32:1) durante la activación polarizada de las células a fenotipos M1 o M2 (266). En cambio, los estudios con macrófagos de ratón mostraron aumentos en los niveles de PC(32:1) tras la polarización con el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y el lipopolisacárido bacteriano (261, 267).

El uso de inhibidores específicos junto con oligonucleótidos antisentido han permitido desvelar la participación de la iPLA₂-VIA en la movilización de 16:1. La otra gran PLA₂ intracelular presente en los macrófagos, la cPLA₂α, no parece participar en el proceso, ya que el inhibidor específico pirrofenona no tuvo un efecto discernible. El bloqueo de la transacilasa independiente del CoA tampoco tuvo efecto, lo que indica que el 16:1 no se transfiere directamente entre las

especies de fosfolípidos por mecanismos similares a los de los ácidos grasos *n*-6 (158). Estos resultados confirman y amplían trabajos anteriores sobre el papel de la iPLA₂-VIA en la mediación de las respuestas de liberación de ácidos grasos de fosfolípidos en macrófagos que no implican al ácido araquidónico (139, 140). Además, el hallazgo de que el principal sustrato para la liberación de 16:1 mediado por la iPLA₂-VIA es la especie PC(16:0/16:1) también es relevante en vista de los datos anteriores que muestran que, en las células activadas, la iPLA₂-VIA manifiesta selectividad para las moléculas de PC que contienen ácido palmítico en la posición sn-1, y que algunas de las principales especies hidrolizadas por la enzima contienen 16:1 en la posición sn-2 (139, 268). En conjunto, estos resultados sugieren que la iPLA₂-VIA es la enzima clave para la movilización de 16:1, y que la selectividad de sustrato de la enzima en un contexto celular puede ser más estricta de lo que los ensayos *in vitro* han sugerido (269), probablemente debido a compartimentación celular. Debido al carácter antiinflamatorio de los ácidos grasos 16:1, es concebible que la liberación regulada de esos ácidos grasos constituya un paso importante para la mitigación o resolución de una reacción inflamatoria.

En este estudio también se aborda la participación de parte de los 16:1 liberados de PC en las reacciones de remodelación de los ácidos grasos en fosfolípidos. Este es un aspecto importante en la señalización de los lípidos, ya que las reacciones de remodelación de los ácidos grasos pueden aumentar la diversidad de fosfolípidos y generar nuevas especies que contienen 16:1 y que podrían constituir marcadores de estados de activación específicos de los macrófagos. Además, la transferencia de ácidos grasos 16:1 entre los fosfolípidos podría conducir a la generación de nuevas especies que contengan 16:1 -o a aumentar los niveles de las preexistentes- que doten a la célula de funciones nuevas o mejoradas. Para explorar estas posibilidades, se hizo uso de ácidos grasos deuterados. Esta estrategia mejora la sensibilidad y permite caracterizar

los distintos isómeros por separado. Es importante destacar que este enfoque identificó un aumento significativo de los niveles de la especie PI(18:0/16:1). Esto se observó con los dos ácidos grasos deuterados analizados, lo que implica que las enzimas implicadas en la transferencia no distinguen entre isómeros posicionales. Obsérvese a este respecto que la iPLA₂-VIA también hidroliza todos los isómeros 16:1 de PC.

Cabe señalar que la cantidad de 16:1 obtenida por la especie PI es bastante baja, lo que sugiere que la remodelación 16:1 entre los fosfolípidos utiliza sólo pequeñas cantidades del ácido graso movilizado por la iPLA₂-VIA. Teniendo en cuenta las áreas de pico relativas de las muestras y los estándares internos en los experimentos de LC/MS, se estima que ~5-10% del 16:1 inicialmente presente en PC se transfiere a PI, y el resto permanece como ácido graso libre. A pesar de ello, el hecho de que las células produzcan activamente PI conteniendo 16:1 sugiere que este lípido puede tener alguna función de señalización. De hecho, el trabajo de Koeberle et al. (270) estableció recientemente que el PI que contiene 16:1 posee propiedades similares a las de factores de crecimiento cuando se añade a cultivos celulares de fibroblastos. Es evidente que será necesario seguir trabajando para explorar el papel de señalización y las posibles funciones celulares del PI que contiene 16:1 en los macrófagos.

Los estudios aquí presentados también revelan un segundo destino metabólico para el 16:1 movilizado de fosfolípidos en macrófagos activados. Los datos muestran que parte del 16:1 hidrolizado por la iPLA₂-VIA se desvía a la formación de FAHFA, una familia de lípidos con propiedades antiinflamatorias (201, 271). Es interesante que, de los tres FAHFA que contienen 16:1 identificados en macrófagos en reposo, sólo uno de ellos, 16:1/OH-18:0 aumenta claramente en las células activadas. Esto sugiere algún tipo de especificidad en la formación de tales especies, que sería compatible con que desempeñe un papel biológico.

Similar a la situación discutida anteriormente con respecto a la remodelación

2. Los macrófagos peritoneales de ratón liberan los ácidos grasos antiinflamatorios, ácido palmitoleico y sus isómeros posicionales

del fosfolípido 16:1, la formación de los FAHFA que contienen 16:1 también parece utilizar pequeñas cantidades del ácido graso, que pueden estimarse en ~1% del total de 16:1 movilizado de los fosfolípidos. Sin embargo, las comparaciones de las áreas relativas de pico correspondientes a los FAHFA que contienen 16:1 identificados en nuestros experimentos de LC/MS con los de un estándar similar (éster de ácido palmítico del ácido hidroxisteárico) indican que los niveles de FAHFA aumentan en las células activadas hasta aproximadamente 4 nM, un valor que está en el rango del reportado para los niveles de FAHFA en suero de ratones (0,4-2,5 nM), y también comparable al rango de lípidos señalizadores como los eicosanoides y los endocannabinoides (201). Por lo tanto, es posible que incluso en los niveles identificados en este estudio, los FAHFA conteniendo 16:1 puedan ser de relevancia fisiopatológica.

3. LA MOLÉCULA DE FOSFATIDILCOLINA QUE CONTIENE ISÓMEROS DE 16:1 REDUCE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS DE RATÓN

En este trabajo se demuestra que la mayoría de los 16:1 presentes en los macrófagos se acumulan en una sola especie de fosfolípidos, el PC(16:0/16:1), desde donde se libera en condiciones de activación celular. Ya que se ha mostrado que el LPS es uno de los estímulos que inducen la hidrólisis de las moléculas de PC que contienen 16:1, se procedió a caracterizar el efecto de este estímulo bacteriano sobre la distribución de 16:1 en diferentes fracciones celulares de macrófagos enriquecidos con PC(16:0/16:1n-9). Analizando el extracto lipídico total de las células después del tratamiento con el PC, se observó una incorporación efectiva de los dos ácidos grasos que componen el PC, sin producir ningún desplazamiento de otros ácidos grasos.

La mayor parte del contenido de 16:1n-9 añadido como PC está incorporado en los PL, siendo el más abundante el propio PC. De forma análoga a lo encontrado para las células estimuladas con zimosán, los datos muestran que el LPS aumenta la transferencia significativa de 16:1 de PC a PI, sugiriendo un papel para estos lípidos en el proceso inflamatorio. Estos datos concuerdan con los resultados observados con la incubación con ácidos grasos deuterados en los que también se observa una remodelación a PI de los 16:1 contenidos en PC cuando se estimulan las células con mannano + laminarina, los principales componentes polisacáridicos del estímulo fúngico zimosán.

Esta remodelación de 16:1 desde la posición sn-2 de PC podría ser producida por tres vías i) la acción concertada de una fosfolipasa A₂, que rompe el ácido graso de la posición sn-2 de PC, y de la acil-CoA sintetasa y las aciltransferasas específicas, que incorporan el ácido graso en otros lípidos, ii) por la acción de transacilaciones independientes de CoA y iii) por la ruta de biosíntesis *de novo*.

3. La molécula de fosfatidilcolina que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón

Dado que en este trabajo se ha demostrado que se produce una liberación de los 16:1 contenidos en PC por la acción de la iPLA₂-VIA y no de las transacilasas independientes de CoA, en respuesta a una activación proinflamatoria de los macrófagos, esto hace posible pensar que esta remodelación de los ácidos grasos 16:1 a los fosfolípidos de inositol observada se produzca via desacilación/reacilación dependiente de CoA

Por supuesto, las demás posibilidades no pueden descartarse y de hecho, Koberle et al. plantea la posibilidad de que el palmitoleico se remodele a 16:1-PI a través de la vía de biosíntesis *de novo* (270). Sin embargo, en este estudio las cantidades de 16:1 observadas en PA son muy bajas, lo que hace difícil plantear la ruta *de novo* como un contribuyente principal a la síntesis de PI conteniendo 16:1.

Los resultados indican que las respuestas a LPS de los macrófagos incubados con PC(16:0/16:1) son significativamente más bajas comparadas con las células sin tratar, observándose prácticamente los mismos niveles de inducción de citoquinas inflamatorias en los tres isómeros de 16:1-PC utilizados. También es interesante el hecho de que no se produce ninguna variación en los niveles de expresión de estas moléculas proinflamatorias con respecto a las células estimuladas solo con LPS cuando se utilizan dos PC que contienen en la posición sn-2 el ácido oleico (18:1n-9) y el ácido palmítico (16:0). Es llamativo sobre todo en el caso del primero, ya que se trata de un ácido graso monoinsaturado al igual que los 16:1 pero con dos metilenos más. Estos resultados sugieren una actividad biológica específica para los ácidos grasos 16:1 contenido en la posición sn-2 de la PC.

La disminución de la inducción de estas citoquinas proinflamatorias puede explicarse debido a una menor activación de NF-κB en estas condiciones. Se ha descrito que los ácidos grasos poliinsaturados contenido en la posición sn-2 del PC interfieren, en un modelo de colitis ulcerosa, en la activación celular por LPS

y Tnf- α , modificando la fosforilación de las MAPK, atenuando la activación de NF- κ B y reduciendo los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias, lo que da lugar a una señalización antiinflamatoria (272, 273). Además, es importante destacar la existencia de varias especies de PC, que no contienen ácidos grasos poliinsaturados como sustituyentes acilo, que tienen funciones biológicas por sí mismas (199, 200). PC(12:0/12:0) ha sido identificado como ligando del receptor nuclear del hígado homólogo-1 (LRH-1) asociado a la regulación de la homeostasis de los ácidos biliares y colesterol. El tratamiento con este PC también disminuye la esteatosis hepática y mejora la homeostasis de la glucosa en dos modelos de ratón de resistencia a la insulina (199). Por otro lado, PC(16:0/18:1) ha sido reconocido como un ligando endógeno del receptor nuclear PPAR α (200). Esta proteína ha sido implicada en la regulación de los procesos energéticos celulares, cuya activación está asociada con la regulación negativa de las respuestas inflamatorias. Diferentes investigaciones con ligandos de PPAR α han demostrado una reducción de los síntomas de inflamación y enfermedad en varios modelos, incluyendo la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la artritis y la enfermedad inflamatoria intestinal (274). Los resultados obtenidos junto a estos datos bibliográficos, permitirían especular sobre una posible función de la propia molécula PC(16:0/16:1), aunque más investigación es necesaria en este aspecto.

Otra característica destacada del trabajo actual es que el efecto antiinflamatorio de los tres isómeros se produce en los macrófagos expuestos a todos los estímulos inflamatorios examinados, que son reconocidos por diferentes receptores de membrana (LPS y zimosán opsonizado) o no (PMA e ionóforo A23187). Este resultado permite sugerir que el mecanismo de acción de este lípido se produce en la cascada de señalización tras la unión del agonista al receptor correspondiente. De hecho, otros estudios demuestran que la incubación de PUFA-PC exógeno en una línea celular de cáncer de colon cambia la

3. La molécula de fosfatidilcolina que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón

compartimentación del receptor agonista Tnf- α /R a la balsa de lípidos sin interferir con la unión receptor/agonista, sugiriendo que el mecanismo regulador debe implicar cambios en las cascadas de señalización posteriores (272).

En conjunto, se ha demostrado que el 16:1 contenido en PC ejerce un papel protector en los macrófagos expuestos a varios estímulos proinflamatorios a través de la disminución de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Además, el enriquecimiento de las células con PC(16:0/16:1) produce un aumento selectivo del ácido graso 16:1 en los fosfolípidos de inositol cuando se activan las células con LPS y zimosán. También se ha demostrado que estos ácidos grasos son liberados de las moléculas del PC por la acción de la enzima iPLA₂-VIA, permitiendo así su remodelación a otras clases de lípidos (Fig. V.3.1).

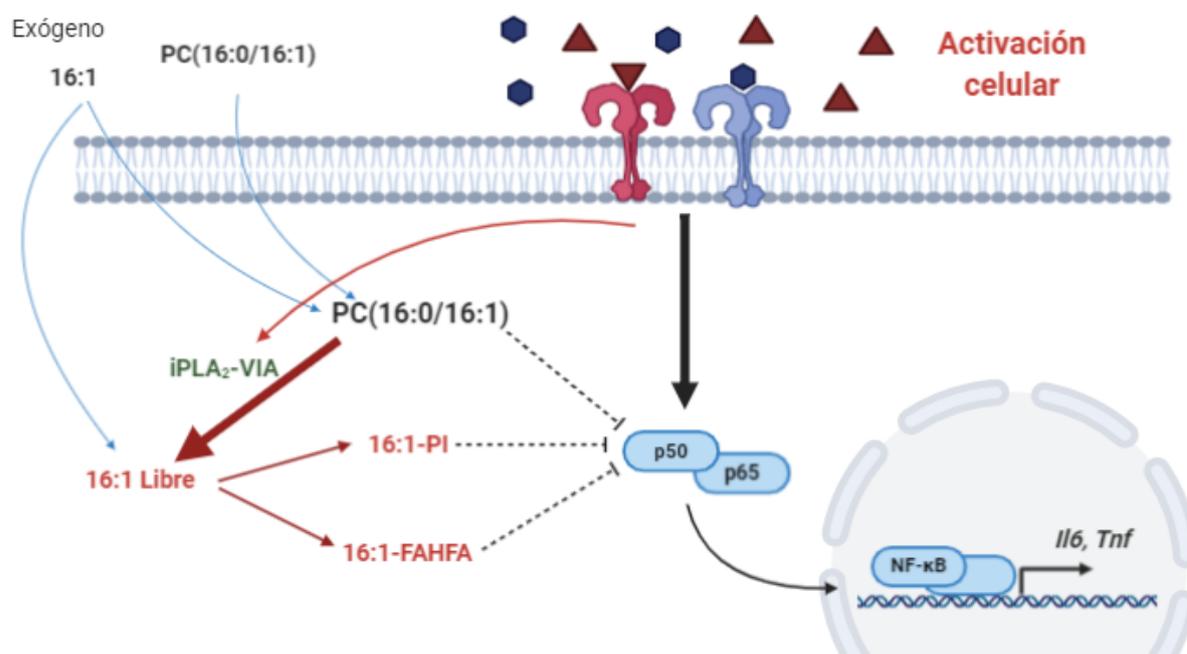


Fig. V.3.1. Movilización del ácido graso 16:1 durante la activación de macrófagos murinos y su posible implicación en la respuesta de celular. Los isómeros de los ácidos grasos 16:1 están acumulados mayoritariamente en la especie PC(16:0/16:1), tras un activación celular se produce una liberación de este ácido graso del PC por la acción de la iPLA₂-GVIA, observándose un aumento de los lípidos PI y FAHFA que contienen 16:1. La adición de PC(16:0/16:1) redujo la translocación de NF- κ B al núcleo en células activadas y los niveles de expresión de ARNm de genes proinflamatorios como *Il6* y *Tnfa*, señalando al PC añadido y a los productos biosintetizados que contienen 16:1 como los posibles contribuyentes de este efecto.

Capítulo VI.- Conclusiones

1. CONCLUSIONES

Con lo que respecta al primer objetivo, el estudio de la acumulación de LD en los monocitos en respuesta a ácido araquidónico, en el contexto de aterosclerosis, y la movilización de este ácido graso frente a una activación celular, los resultados obtenidos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- El ácido araquidónico exógeno, cuyo exceso se almacena en TAG pero no en la fracción fosfolipídica, activa la síntesis *de novo* de ácidos grasos, provocando su acumulación en las LD que formarán monocitos espumosos.
- La inducción del fenotipo espumoso por AA en monocitos humanos es un efecto mediado por el propio ácido graso y no por un metabolito oxigenado derivado.
- Los fosfolípidos de membrana son las principales fuentes de movilización de AA en monocitos humanos estimulados, incluso en condiciones en las que los niveles celulares del ácido graso en TAG superan a los de las membranas.

En cuanto al segundo objetivo general, el estudio lipidómico y biológico de los isómeros del ácido palmitoleico en las células de la inmunidad innata durante la activación celular, las evidencias experimentales generaron los siguientes resultados:

- El 90% de los isómeros de 16:1 acumulados en PL está presente en la clase de glicerofosfolípidos de colina (PC) en macrófagos de ratón. Además, el ~75% del total de 16:1 en PC se halla en una sola especie, PC(16:0/16:1).

- Los niveles de los tres isómeros de los ácidos grasos 16:1 en PC se reducen significativamente y de forma similar en los macrófagos activados por estímulos innatos (zimosán, LPS, manano y laminarina).
- La reducción del contenido de 16:1 en PC se corresponde con la liberación de este ácido graso a través de la enzima iPLA₂-VIA durante la activación de las células.
- Parte del 16:1 liberado del PC por la activación de los macrófagos frente a manano y laminarina se transfiere a PI y otra parte es utilizado para formar otros derivados lipídicos, como son los FAHFA, que poseen actividad biológica.
- La remodelación de 16:1 de PC a PI también es observada en macrófagos enriquecidos con PC(16:0/16:1) y tratados con LPS.
- Las macrófagos enriquecidas con los isómeros de PC(16:0/16:1) demuestran una respuesta inflamatoria reducida a LPS en comparación con las células incubadas con PC(16:0/18:1n-9) y PC(16:0/16:0), que no ejercen ningún efecto.
- Este efecto antiinflamatorio de los isómeros de PC(16:0/16:1) es independiente del estímulo utilizado, actúe o no vía receptor, y se produce de forma similar entre los isómeros utilizados.
- PC(16:0/16:1) ejerce el efecto antiinflamatorio al disminuir la activación de NF-κB.

Capítulo VII.- Referencias bibliográficas

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olzmann, J. A., and Carvalho, P. (2019) Dynamics and functions of lipid droplets, *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 137-155.
2. Grillitsch, K., Connerth, M., Köfeler, H., Arrey, T. N., Rietschel, B., Wagner, B., Karas, M., and Daum, G. (2011) Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: Lipidome meets protein. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1811, 1165-1176.
3. Thiam, A. R., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets, *Nature Rev Mol Cell Biol* 14, 775-786.
4. Brasaemle, D. L. (2007) Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis, *J Lipid Res* 48, 2547-2559.
5. Kimmel, A., Brasaemle, D., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C., and Londos, C. (2010) Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins, *J Lipid Res* 51, 468-471.
6. Macpherson, R. E., Vandenboom, R., Roy, B. D., and Peters, S. J. (2013) Skeletal muscle PLIN3 and PLIN5 are serine phosphorylated at rest and following lipolysis during adrenergic or contractile stimulation, *Physiol Rep* 1, 17.
7. Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2006) MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *J Biol Chem* 281, 14232-14240.
8. Wolins, N. E., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A., Bensch, K. G., and Bickel, P. E. (2003) Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets, *J Biol Chem* 278, 37713-37721.
9. Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., and Zechner, R. (2011) Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores, *Prog Lipid Res* 50, 14-27.
10. Shen, W. J., Patel, S., Miyoshi, H., Greenberg, A. S., and Kraemer, F. B. (2009) Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis, *J Lipid Res* 50, 2306-2313.
11. Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H. W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D. E., Mann, M., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2011) Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase, *Cell Metab* 14, 504-515.
12. Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A., and Thiele, C. (2011) Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine, *J Biol Chem* 286, 21330-21339.
13. Poppelreuther, M., Rudolph, B., Du, C., Großmann, R., Becker, M., Thiele, C., Eehalt, R., and Füllekrug, J. (2012) The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake, *J Lipid Res* 53, 888-900.

14. Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Gil-de-Gómez, L., Guijas, C., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2011) Subcellular localization and role of Lipin-1 in human macrophages, *J Immunol* 186, 6004-6010.
15. Sembongi, H., Miranda, M., Han, G. S., Fakas, S., Grimsey, N., Vendrell, J., Carman, G. M., and Siniossoglou, S. (2013) Distinct roles of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2 during adipogenesis and lipid droplet biogenesis in 3T3-L1 cells, *J Biol Chem* 288, 34502-34513.
16. Yu, W., Bozza, P. T., Tzizik, D. M., Gray, J. P., Cassara, J., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (1998) Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies, *Am J Pathol* 152, 759-769.
17. Walther, T. C., and Farese, R. V., Jr. (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism, *Annu Rev Biochem* 81, 687-714.
18. Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Kraemer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J. X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K. K., Coleman, R. A., Bewersdorf, J., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2013) Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets, *Dev Cell* 24, 384-399.
19. Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation, *Prog Lipid Res* 43, 134-176.
20. Buhman, K. F., Accad, M., and Farese, R. V. (2000) Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases, *Biochim Biophys Acta* 15, 1-3.
21. Gubern, A., Barceló-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.
22. Leiguez, E., Zuliani, J. P., Cianciarullo, A. M., Fernandes, C. M., Gutiérrez, J. M., and Teixeira, C. (2011) A group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A2 and distinct signaling pathways, *J Leuk Biol* 90, 155-166.
23. Murphy, D. J. (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms, *Pro Lipid Res* 40, 325-438.
24. Pol, A., Gross, S. P., and Parton, R. G. (2014) Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites, *J Cell Biol* 204, 635-646.
25. Penno, A., Hackenbroich, G., and Thiele, C. (2013) Phospholipids and lipid droplets, *Biochim Biophys Acta* 3, 589-594.
26. Guijas, C., Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Gil-de-Gómez, 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.
27. Gubern, A., Casas, J., Barceló-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.
28. Gubern, A., Barceló-Torns, M., Barneda, D., López, 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.
29. Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., de Kruijff, B., Burger, K. N., and Rand, P. R. (2005) Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid, *Biochemistry* 44, 2097-2102.
 30. Marchesan, D., Rutberg, M., Andersson, L., Asp, L., Larsson, T., Borén, J., Johansson, B. R., and Olofsson, S. O. (2003) A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system, *J Biol Chem* 278, 27293-27300.
 31. Andersson, L., Boström, P., Ericson, J., Rutberg, M., Magnusson, B., Marchesan, D., Ruiz, M., Asp, L., Huang, P., Frohman, M. A., Borén, J., and Olofsson, S. O. (2006) PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation, *J Cell Sci* 119, 2246-2257.
 32. Tan, J. S., Seow, C. J., Goh, V. J., and Silver, D. L. (2014) Recent advances in understanding proteins involved in lipid droplet formation, growth and fusion, *J Genet Genomics* 41, 251-259.
 33. Guijas, C., Rodríguez, J. P., Rubio, J. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2014) Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation, *Biochim Biophys Acta* 12, 004.
 34. Ohsaki, Y., Suzuki, M., and Fujimoto, T. (2014) Open questions in lipid droplet biology, *Chem Biol* 21, 86-96.
 35. Cabodevilla, A. G., Sánchez-Caballero, L., Nintou, E., Boiadjeva, V. G., Picatoste, F., Gubern, A., and Claro, E. (2013) Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled β -oxidation of fatty acids, *J Biol Chem* 288, 27777-27788.
 36. Bosch, M., Sánchez-Álvarez, M., Fajardo, A., Kapetanovic, R., Steiner, B., Dutra, F., Moreira, L., López, J. A., Campo, R., Marí, M., Morales-Paytuví, F., Tort, O., Gubern, A., Templin, R. M., Curson, J. E. B., Martel, N., Català, C., Lozano, F., Tebar, F., Enrich, C., Vázquez, J., Del Pozo, M. A., Sweet, M. J., Bozza, P. T., Gross, S. P., Parton, R. G., and Pol, A. (2020) Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense, *Science* 370.
 37. Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y., and Fujimoto, T. (2009) Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets, *Histochem Cell Biol* 132, 281-291.
 38. Hodges, B. D., and Wu, C. C. (2010) Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets, *J Lipid Res* 51, 262-273.
 39. Soni, K. G., Mardones, G. A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C. L., and Bonifacino, J. S. (2009) Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets, *J Cell Sci* 122, 1834-1841.
 40. 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.
 41. Wolins, N. E., Quaynor, B. K., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A., and Bickel, P. E. (2005) S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes, *J Biol Chem* 280, 19146-19155.

42. Rinia, H. A., Burger, K. N., Bonn, M., and Müller, M. (2008) Quantitative label-free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy, *Biophys J* 95, 4908-4914.
43. Binns, D., Januszewski, T., Chen, Y., Hill, J., Markin, V. S., Zhao, Y., Gilpin, C., Chapman, K. D., Anderson, R. G., and Goodman, J. M. (2006) An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies, *J Cell Biol* 173, 719-731.
44. Dvorak, A. M., Dvorak, H. F., Peters, S. P., Shulman, E. S., MacGlashan, D. W., Jr., Pyne, K., Harvey, V. S., Galli, S. J., and Lichtenstein, L. M. (1983) Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells, *J Immunol* 131, 2965-2976.
45. Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., and Fujimoto, T. (2005) Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane, *J Cell Sci* 118, 2601-2611.
46. Krahmer, N., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease, *EMBO Mol Med* 5, 973-983.
47. Fazio, S., Major, A. S., Swift, L. L., Gleaves, L. A., Accad, M., Linton, M. F., and Farese, R. V., Jr. (2001) Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages, *J Clin Invest* 107, 163-171.
48. Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D., and Wylie-Rosett, J. (2010) Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association, *Circulation* 121, 948-954.
49. Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D., and Farb, A. (2002) Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions, *J Interv Cardiol* 15, 439-446.
50. Williams, K. J., and Tabas, I. (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 551-561.
51. Osterud, B., and Bjorklid, E. (2003) Role of monocytes in atherogenesis, *Physiol Rev* 83, 1069-1112.
52. Moore, K. J., and Tabas, I. (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis, *Cell* 145, 341-355.
53. Lupo, G., Nicotra, A., Giurdanella, G., Anfuso, C. D., Romeo, L., Biondi, G., Tirolo, C., Marchetti, B., Ragusa, N., and Alberghina, M. (2005) Activation of phospholipase A(2) and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells, *Biochim Biophys Acta* 15, 135-150.
54. Lupo, G., Assero, G., Anfuso, C. D., Nicotra, A., Palumbo, M., Cannavò, G., Renis, M., Ragusa, N., and Alberghina, M. (2002) Cytosolic phospholipase A2 mediates arachidonoyl phospholipid hydrolysis in immortalized rat brain endothelial cells stimulated by oxidized LDL, *Biochim Biophys Acta* 8, 19-29.
55. 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.
56. Jiang, J. X., Zhang, S. J., Xiong, Y. K., Jia, Y. L., Sun, Y. H., Lin, X. X., Shen, H. J., Xie, Q. M., and Yan, X. F. (2015) EETs attenuate Ox-LDL-induced TB4 production and

- activity by inhibiting p38 MAPK phosphorylation and 5-LO/BLT1 receptor expression in rat pulmonary arterial endothelial cells, *PLoS one* 10.
57. Mestas, J., and Ley, K. (2008) Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis, *Trends Cardiovasc Med* 18, 228-232.
 58. Koenen, R. R., von Hundelshausen, P., Nesselova, I. V., Zerneck, A., Liehn, E. A., Sarabi, A., Kramp, B. K., Piccinini, A. M., Paludan, S. R., Kowalska, M. A., Kungl, A. J., Hackeng, T. M., Mayo, K. H., and Weber, C. (2009) Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice, *Nat Med* 15, 97-103.
 59. Kamei, M., and Carman, C. V. (2010) New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes, *Curr Opin Hematol* 17, 43-52.
 60. Johnson, J. L., and Newby, A. C. (2009) Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques, *Curr Opin Lipidol* 20, 370-378.
 61. Paulson, K. E., Zhu, S. N., Chen, M., Nurmohamed, S., Jongstra-Bilen, J., and Cybulsky, M. I. (2010) Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis, *Circ Res* 106, 383-390.
 62. Kadl, A., Meher, A. K., Sharma, P. R., Lee, M. Y., Doran, A. C., Johnstone, S. R., Elliott, M. R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., Kensler, T., Ravichandran, K. S., Isakson, B. E., Wamhoff, B. R., and Leitinger, N. (2010) Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2, *Circ Res* 107, 737-746.
 63. Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., and Lusis, A. J. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics, *Circulation* 91, 2488-2496.
 64. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science* 232, 34-47.
 65. Chisolm, G. M., 3rd, Hazen, S. L., Fox, P. L., and Cathcart, M. K. (1999) The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms, *J Biol Chem* 274, 25959-25962.
 66. Steinberg, D. (1997) Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis, *Circulation* 95, 1062-1071.
 67. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., and et al. (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection, *Nature* 386, 292-296.
 68. Sakaguchi, H., Takeya, M., Suzuki, H., Hakamata, H., Kodama, T., Horiuchi, S., Gordon, S., van der Laan, L. J., Kraal, G., Ishibashi, S., Kitamura, N., and Takahashi, K. (1998) Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice, *Lab Invest* 78, 423-434.
 69. de Winther, M. P., Gijbels, M. J., van Dijk, K. W., van Gorp, P. J., Suzuki, H., Kodama, T., Frants, R. R., Havekes, L. M., and Hofker, M. H. (1999) Scavenger receptor deficiency leads to more complex atherosclerotic lesions in APOE3Leiden transgenic mice, *Atherosclerosis* 144, 315-321.

70. Hayek, T., Oiknine, J., Brook, J. G., and Aviram, M. (1994) Role of HDL apolipoprotein E in cellular cholesterol efflux: studies in apo E knockout transgenic mice, *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1072-1078.
71. Langer, C., Huang, Y., Cullen, P., Wiesenhütter, B., Mahley, R. W., Assmann, G., and von Eckardstein, A. (2000) Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages, *J Mol Med* 78, 217-227.
72. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., and Silverstein, R. L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice, *J Clin Invest* 105, 1049-1056.
73. Podrez, E. A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R. L., Hajjar, D. P., Cohen, P. A., Frazier, W. A., Hoff, H. F., and Hazen, S. L. (2000) Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species, *J Clin Invest* 105, 1095-1108.
74. Kaplan, M., and Aviram, M. (1999) Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase, *Clin Chem Lab Med* 37, 777-787.
75. Tabas, I., and Bornfeldt, K. E. (2016) Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis, *Circ Res* 118, 653-667.
76. Wu, H., Gower, R. M., Wang, H., Perrard, X. Y., Ma, R., Bullard, D. C., Burns, A. R., Paul, A., Smith, C. W., Simon, S. I., and Ballantyne, C. M. (2009) Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia, *Circulation* 119, 2708-2717.
77. Foster, G. A., Xu, L., Chidambaram, A. A., Soderberg, S. R., Armstrong, E. J., Wu, H., and Simon, S. I. (2015) CD11c/CD18 Signals Very Late Antigen-4 Activation To Initiate Foamy Monocyte Recruitment during the Onset of Hypercholesterolemia, *J Immunol* 195, 5380-5392.
78. Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J. L., Gorbato, R., Sukhova, G. K., Gerhardt, L. M., Smyth, D., Zavitz, C. C., Shikatani, E. A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H. Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R., and Swirski, F. K. (2013) Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis, *Nat Med* 19, 1166-1172.
79. Xu, L., Dai Perrard, X., Perrard, J. L., Yang, D., Xiao, X., Teng, B. B., Simon, S. I., Ballantyne, C. M., and Wu, H. (2015) Foamy monocytes form early and contribute to nascent atherosclerosis in mice with hypercholesterolemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1787-1797.
80. Tertov, V. V., Kalenich, O. S., and Orekhov, A. N. (1992) Lipid-laden white blood cells in the circulation of patients with coronary heart disease, *Exp Mol Pathol* 57, 22-28.
81. Dresel, H. A., Via, D. P., Stöhr, M., Elchner, U., Gnasso, A., Postiglione, A., Blin, N., Augustin, J., and Schettler, G. (1986) Observations on leukocytes from patients with severe familial hypercholesterolemia, *Arteriosclerosis* 6, 259-264.
82. Varela, L. M., Ortega, A., Bermudez, B., Lopez, S., Pacheco, Y. M., Villar, J., Abia, R., and Muriana, F. J. (2011) A high-fat meal promotes lipid-load and

- apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in circulating monocytes, *Am J Clin Nutr* 93, 918-925.
83. den Hartigh, L. J., Connolly-Rohrbach, J. E., Fore, S., Huser, T. R., and Rutledge, J. C. (2010) Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes, *J Immunol* 184, 3927-3936.
 84. den Hartigh, L. J., Altman, R., Norman, J. E., and Rutledge, J. C. (2014) Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NFκB, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, 25.
 85. Lopez, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega, A., Bermudez, B., Abia, R., and Muriana, F. J. (2013) p38 MAPK protects human monocytes from postprandial triglyceride-rich lipoprotein-induced toxicity, *J Nutr* 143, 620-626.
 86. Alipour, A., van Oostrom, A. J., Izraeljan, A., Verseyden, C., Collins, J. M., Frayn, K. N., Plokker, T. W., Elte, J. W., and Castro Cabezas, M. (2008) Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 792-797.
 87. Gower, R. M., Wu, H., Foster, G. A., Devaraj, S., Jialal, I., Ballantyne, C. M., Knowlton, A. A., and Simon, S. I. (2011) CD11c/CD18 expression is upregulated on blood monocytes during hypertriglyceridemia and enhances adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 160-166.
 88. Sprecher, H. (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids, *Biochim Biophys Acta* 19, 2-3.
 89. Zhou, L., and Nilsson, A. (2001) Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues, *J Lipid Res* 42, 1521-1542.
 90. Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294, 1871-1875.
 91. Phillis, J. W., Horrocks, L. A., and Farooqui, A. A. (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders, *Brain Res Rev* 52, 201-243.
 92. Harkewicz, R., Fahy, E., Andreyev, A., and Dennis, E. A. (2007) Arachidonate-derived dihomoprostaglandin production observed in endotoxin-stimulated macrophage-like cells, *J Biol Chem* 282, 2899-2910.
 93. Sprecher, H., VanRollins, M., Sun, F., Wyche, A., and Needleman, P. (1982) Dihomo-prostaglandins and -thromboxane. A prostaglandin family from adrenic acid that may be preferentially synthesized in the kidney, *J Biol Chem* 257, 3912-3918.
 94. Kopf, P. G., Zhang, D. X., Gauthier, K. M., Nithipatikom, K., Yi, X. Y., Falck, J. R., and Campbell, W. B. (2010) Adrenic acid metabolites as endogenous endothelium-derived and zona glomerulosa-derived hyperpolarizing factors, *Hypertension* 55, 547-554.
 95. Flesch, I., Schonhardt, T., and Ferber, E. (1989) Phospholipases and acyltransferases in macrophages, *Klin Wochenschr* 67, 119-122.
 96. Irvine, R. F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?, *Biochem J* 204, 3-16.
 97. 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.

98. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med* 340, 115-126.
99. Wong, J. T., Tran, K., Pierce, G. N., Chan, A. C., O, K., and Choy, P. C. (1998) Lysophosphatidylcholine stimulates the release of arachidonic acid in human endothelial cells, *J Biol Chem* 273, 6830-6836.
100. 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.
101. Sato, H., Kato, R., Isogai, Y., Saka, G., Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Tsutsumi, K., Yamada, J., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hatakeyama, S., Hara, S., Kudo, I., Itabe, H., and Murakami, M. (2008) Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis, *J Biol Chem* 283, 33483-33497.
102. Karabina, S. A., Brochériou, 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.
103. Karabina, S. A., Gora, S., Atout, R., and Ninio, E. (2010) Extracellular phospholipases in atherosclerosis, *Biochimie* 92, 594-600.
104. Rosenson, R. S., and Hurt-Camejo, E. (2012) Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis, *Eur Heart J* 33, 2899-2909.
105. Guijas, C., Meana, C., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (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.
106. Astudillo, A. M., Meana, C., Guijas, C., Pereira, L., Lebrero, P., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2018) Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells, *J Lipid Res* 59, 237-249.
107. Chilton, F. H., Fonteh, A. N., Surette, M. E., Triggiani, M., and Winkler, J. D. (1996) Control of arachidonate levels within inflammatory cells, *Biochim Biophys Acta* 5, 1-15.
108. Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Balmoma, D., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2009) Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases, *Biochim Biophys Acta* 12, 26.
109. Fujino, T., Kang, M. J., Suzuki, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. (1996) Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3, *J Biol Chem* 271, 16748-16752.
110. Kang, M. J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. T. (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2880-2884.
111. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and

- characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase, *J Biol Chem* 282, 6532-6539.
112. Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2008) Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2830-2835.
 113. Gijón, M. A., Riekhof, W. R., Zarini, S., Murphy, R. C., and Voelker, D. R. (2008) Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils, *J Biol Chem* 283, 30235-30245.
 114. Zarini, S., Hankin, J. A., Murphy, R. C., and Gijón, M. A. (2014) Lysophospholipid acyltransferases and eicosanoid biosynthesis in zebrafish myeloid cells, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 115, 52-61.
 115. Yuki, K., Shindou, H., Hishikawa, D., and Shimizu, T. (2009) Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: an enzyme with dual functions in the testis, *J Lipid Res* 50, 860-869.
 116. Balsinde, J., Winstead, M. V., and Dennis, E. A. (2002) Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Lett* 531, 2-6.
 117. Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., and Dennis, E. A. (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A2, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 175-189.
 118. Leslie, C. C. (2004) Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production, *Biochem Cell Biol* 82, 1-17.
 119. Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells, *Cell Signal* 17, 1052-1062.
 120. Kita, Y., Shindou, H., and Shimizu, T. (2019) Cytosolic phospholipase A(2) and lysophospholipid acyltransferases, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 6, 838-845.
 121. Jarc, E., and Petan, T. (2020) A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators, *Biochimie* 169, 69-87.
 122. Nomura, D. K., Long, J. Z., Niessen, S., Hoover, H. S., Ng, S. W., and Cravatt, B. F. (2010) Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis, *Cell* 140, 49-61.
 123. Nomura, D. K., Morrison, B. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., Kinsey, S. G., Marcondes, M. C., Ward, A. M., Hahn, Y. K., Lichtman, A. H., Conti, B., and Cravatt, B. F. (2011) Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation, *Science* 334, 809-813.
 124. Grabner, G. F., Eichmann, T. O., Wagner, B., Gao, Y., Farzi, A., Taschler, U., Radner, F. P., Schweiger, M., Lass, A., Holzer, P., Zinser, E., Tschöp, M. H., Yi, C. X., and Zimmermann, R. (2016) Deletion of monoglyceride lipase in astrocytes attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, *J Biol Chem* 291, 913-923.
 125. Schlager, S., Vujic, N., Korbilius, M., Duta-Mare, M., Dorow, J., Leopold, C., Rainer, S., Wegscheider, M., Reicher, H., Ceglarek, U., Sattler, W., Radovic, B., and Kratky, D. (2017) Lysosomal lipid hydrolysis provides substrates for lipid mediator synthesis in murine macrophages, *Oncotarget* 8, 40037-40051.
 126. Dichlberger, A., Schlager, S., Maaninka, K., Schneider, W. J., and Kovanen, P. T. (2014) Adipose triglyceride lipase regulates eicosanoid production in activated human mast cells, *J Lipid Res* 55, 2471-2478.

127. Schlager, S., Goeritzer, M., Jandl, K., Frei, R., Vujic, N., Kolb, D., Strohmaier, H., Dorow, J., Eichmann, T. O., Rosenberger, A., Wölfler, A., Lass, A., Kershaw, E. E., Ceglarek, U., Dichlberger, A., Heinemann, A., and Kratky, D. (2015) Adipose triglyceride lipase acts on neutrophil lipid droplets to regulate substrate availability for lipid mediator synthesis, *J Leukoc Biol* 98, 837-850.
128. 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.
129. Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., and Yamamoto, K. (2011) Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans, *Prog Lipid Res* 50, 152-192.
130. Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2019) Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A(2) enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 6, 772-783.
131. Leslie, C. C. (2015) Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease, *J Lipid Res* 56, 1386-1402.
132. Murakami, M., Das, S., Kim, Y. J., Cho, W., and Kudo, I. (2003) Perinuclear localization of cytosolic phospholipase A(2)alpha is important but not obligatory for coupling with cyclooxygenases, *FEBS Lett* 546, 251-256.
133. Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., and Shimizu, T. (1997) Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition, *Nature* 390, 618-622.
134. Bonventre, J. V., Huang, Z., Taheri, M. R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M. A., and Sapirstein, A. (1997) Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2, *Nature* 390, 622-625.
135. Adler, D. H., Cogan, J. D., Phillips, J. A., 3rd, Schnetz-Boutaud, N., Milne, G. L., Iverson, T., Stein, J. A., Brenner, D. A., Morrow, J. D., Boutaud, O., and Oates, J. A. (2008) Inherited human cPLA(2alpha) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction, *J Clin Invest* 118, 2121-2131.
136. Ramanadham, S., Ali, T., Ashley, J. W., Bone, R. N., Hancock, W. D., and Lei, X. (2015) Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in biological processes and diseases, *J Lipid Res* 56, 1643-1668.
137. Turk, J., White, T. D., Nelson, A. J., Lei, X., and Ramanadham, S. (2019) iPLA(2)β and its role in male fertility, neurological disorders, metabolic disorders, and inflammation, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 6, 846-860.
138. Mouchlis, V. D., and Dennis, E. A. (2019) Phospholipase A(2) catalysis and lipid mediator lipidomics, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 6, 766-771.
139. Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A. M., Guijas, C., Magrioti, V., Kokotos, G., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2014) Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A2s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages, *J Immunol* 192, 752-762.
140. Monge, P., Garrido, A., Rubio, J. M., Magrioti, V., Kokotos, G., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2020) The Contribution of cytosolic group IVA and calcium-

- independent group VIA phospholipase A(2)s to Adrenic acid mobilization in murine macrophages, *Biomolecules* 10.
141. Lambeau, G., and Gelb, M. H. (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2, *Annu Rev Biochem* 77, 495-520.
 142. Murakami, M., and Lambeau, G. (2013) Emerging roles of secreted phospholipase A(2) enzymes: an update, *Biochimie* 95, 43-50.
 143. Murakami, M. (2017) Lipoquality control by phospholipase A(2) enzymes, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 93, 677-702.
 144. Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J. M., Hara, S., Gelb, M. H., and Murakami, M. (2013) Lymphoid tissue phospholipase A2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators, *J Exp Med* 210, 1217-1234.
 145. Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., and Taketomi, Y. (2015) A new era of secreted phospholipase A₂, *J Lipid Res* 56, 1248-1261.
 146. Akiba, S., Yoneda, Y., Ohno, S., Nemoto, M., and Sato, T. (2003) Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification, *J Lipid Res* 44, 1676-1685.
 147. Ait-Oufella, H., Herbin, O., Lahoute, C., Coatrieux, C., Loyer, X., Joffre, J., Laurans, L., Ramkhelawon, B., Blanc-Brude, O., Karabina, S., Girard, C. A., Payré, C., Yamamoto, K., Binder, C. J., Murakami, M., Tedgui, A., Lambeau, G., and Mallat, Z. (2013) Group X secreted phospholipase A2 limits the development of atherosclerosis in LDL receptor-null mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 466-473.
 148. Murase, R., Sato, H., Yamamoto, K., Ushida, A., Nishito, Y., Ikeda, K., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Taketomi, Y., and Murakami, M. (2016) Group X secreted phospholipase A2 releases ω 3 polyunsaturated fatty acids, suppresses colitis, and promotes sperm fertility, *J Biol Chem* 291, 6895-6911.
 149. MacDonald, J. I., and Sprecher, H. (1991) Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells, *Biochim Biophys Acta* 9, 105-121.
 150. Hermansson, M., Hokynar, K., and Somerharju, P. (2011) Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells, *Prog Lipid Res* 50, 240-257.
 151. Fonteh, A. N., and Chilton, F. H. (1992) Rapid remodeling of arachidonate from phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine pools during mast cell activation, *J Immunol* 148, 1784-1791.
 152. Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D1 macrophages, *J Biol Chem* 271, 6758-6765.
 153. Boilard, E., and Surette, M. E. (2001) Anti-CD3 and concanavalin A-induced human T cell proliferation is associated with an increased rate of arachidonate-phospholipid remodeling. Lack of involvement of group IV and group VI phospholipase A2 in remodeling and increased susceptibility of proliferating T cells to CoA-independent transacyclase inhibitor-induced apoptosis, *J Biol Chem* 276, 17568-17575.

154. Balsinde, J. (2002) Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling, *Biochem J* 364, 695-702.
155. Winkler, J. D., Sung, C. M., Bennett, C. F., and Chilton, F. H. (1991) Characterization of CoA-independent transacylase activity in U937 cells, *Biochim Biophys Acta* 5, 339-346.
156. Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Balgoma, D., Gil-de-Gómez, L., Ruipérez, 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* 2, 97-103.
157. Yamashita, A., Tanaka, K., Kamata, R., Kumazawa, T., Suzuki, N., Koga, H., Waku, K., and Sugiura, T. (2009) Subcellular localization and lysophospholipase/transacylation activities of human group IVC phospholipase A2 (cPLA2 γ), *Biochim Biophys Acta* 10, 6.
158. Yamashita, A., Hayashi, Y., Matsumoto, N., Nemoto-Sasaki, Y., Koizumi, T., Inagaki, Y., Oka, S., Tanikawa, T., and Sugiura, T. (2017) Coenzyme-A-independent transacylation system; possible involvement of phospholipase A2 in transacylation, *Biology* 6.
159. Lebrero, P., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Fernández-Caballero, L., Kokotos, G., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2019) Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: A role for cytosolic phospholipase A(2) γ in phospholipid remodeling, *Cells* 8.
160. Gubern, A., Barceló-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.
161. Boyanovsky, B. B., van der Westhuyzen, D. R., and Webb, N. R. (2005) Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans, *J Biol Chem* 280, 32746-32752.
162. Pucer, A., Brglez, V., Payré, C., Pungercar, J., Lambeau, G., and Petan, T. (2013) Group X secreted phospholipase A(2) induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival, *Mol Cancer* 12, 1476-4598.
163. Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D., and Tabas, I. (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages, *Nat Cell Biol* 5, 781-792.
164. 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.
165. Panini, S. R., Yang, L., Rusinol, A. E., Sinensky, M. S., Bonventre, J. V., and Leslie, C. C. (2001) Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol, *J Lipid Res* 42, 1678-1686.
166. 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.

167. Lamour, N. F., Subramanian, P., Wijesinghe, D. S., Stahelin, R. V., Bonventre, J. V., and Chalfant, C. E. (2009) Ceramide 1-phosphate is required for the translocation of group IVA cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin synthesis, *J Biol Chem* 284, 26897-26907.
168. Huwiler, A., Johansen, B., Skarstad, A., and Pfeilschifter, J. (2001) Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release, *Faseb J* 15, 7-9.
169. Tyurin, V. A., Yanamala, N., Tyurina, Y. Y., Klein-Seetharaman, J., Macphee, C. H., and Kagan, V. E. (2012) Specificity of lipoprotein-associated phospholipase A(2) toward oxidized phosphatidylserines: liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry characterization of products and computer modeling of interactions, *Biochemistry* 51, 9736-9750.
170. Akiba, S., Li, H., Yoneda, Y., and Sato, T. (2004) Translocation of phospholipase A2 to membranes by oxidized LDL and hydroxyoctadecadienoic acid to contribute to cholesteryl ester formation, *Biochim Biophys Acta* 8, 1-2.
171. Casas, J., Gijón, 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.
172. 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.
173. Han, X., Cheng, H., Mancuso, D. J., and Gross, R. W. (2004) Caloric restriction results in phospholipid depletion, membrane remodeling, and triacylglycerol accumulation in murine myocardium, *Biochemistry* 43, 15584-15594.
174. Mancuso, D. J., Han, X., Jenkins, C. M., Lehman, J. J., Sambandam, N., Sims, H. F., Yang, J., Yan, W., Yang, K., Green, K., Abendschein, D. R., Saffitz, J. E., and Gross, R. W. (2007) Dramatic accumulation of triglycerides and precipitation of cardiac hemodynamic dysfunction during brief caloric restriction in transgenic myocardium expressing human calcium-independent phospholipase A2gamma, *J Biol Chem* 282, 9216-9227.
175. Hanasaki, K., Ono, T., Saiga, A., Morioka, Y., Ikeda, M., Kawamoto, K., Higashino, K., Nakano, K., Yamada, K., Ishizaki, J., and Arita, H. (1999) Purified group X secretory phospholipase A(2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells, *J Biol Chem* 274, 34203-34211.
176. Webb, N. R., Bostrom, M. A., Szilvassy, S. J., van der Westhuyzen, D. R., Daugherty, A., and de Beer, F. C. (2003) Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A2 increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 263-268.
177. Bozza, P. T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R. A., and Bandeira-Melo, C. (2011) Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85, 205-213.
178. Triggiani, M., Oriente, A., Seeds, M. C., Bass, D. A., Marone, G., and Chilton, F. H. (1995) Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool, *J Exp Med* 182, 1181-1190.

179. Johnson, M. M., Vaughn, B., Triggiani, M., Swan, D. D., Fonteh, A. N., and Chilton, F. H. (1999) Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 21, 253-258.
180. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G., and Jacobsson, A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice, *Prog Lipid Res* 49, 186-199.
181. Hodson, L., and Karpe, F. (2013) Is there something special about palmitoleate?, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 225-231.
182. Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S., and Hotamisligil, G. S. (2010) Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes, *Am J Clin Nutr* 92, 1350-1358.
183. Destailats, F., Guitard, M., and Cruz-Hernandez, C. (2011) Identification of Δ 6-monounsaturated fatty acids in human hair and nail samples by gas-chromatography-mass-spectrometry using ionic-liquid coated capillary column, *J Chromatogr A* 30, 9384-9389.
184. Ge, L., Gordon, J. S., Hsuan, C., Stenn, K., and Prouty, S. M. (2003) Identification of the delta-6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity, *J Invest Dermatol* 120, 707-714.
185. Longmuir, K. J., Resele-Tiden, C., and Rossi, M. E. (1988) Fatty acids of pulmonary surfactant phosphatidylcholine from fetal rabbit lung tissue in culture. Biosynthesis of n-10 monoenoic fatty acids, *J Lipid Res* 29, 1065-1077.
186. Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S., and Hotamisligil, G. S. (2010) Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: a cohort study, *Ann Intern Med* 153, 790-799.
187. Schwingshackl, L., and Hoffmann, G. (2012) Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses, *Nutrients* 4, 1989-2007.
188. Scanferlato, R., Bortolotti, M., Sansone, A., Chatgililoglu, C., Polito, L., De Spirito, M., Maulucci, G., Bolognesi, A., and Ferreri, C. (2019) Hexadecenoic fatty acid positional isomers and de novo PUFA synthesis in colon cancer cells, *Int J Mol Sci* 20.
189. Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., and Hotamisligil, G. S. (2008) Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism, *Cell* 134, 933-944.
190. Erbay, E., Babaev, V. R., Mayers, J. R., Makowski, L., Charles, K. N., Snitow, M. E., Fazio, S., Wiest, M. M., Watkins, S. M., Linton, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2009) Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis, *Nat Med* 15, 1383-1391.
191. Çimen, I., Kocatürk, B., Koyuncu, S., Tufanlı, Ö., Onat, U. I., Yıldırım, A. D., Apaydın, O., Demirsoy, Ş., Aykut, Z. G., Nguyen, U. T., Watkins, S. M., Hotamisligil, G. S., and Erbay, E. (2016) Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation, *Sci Transl Med* 8.
192. Tsuchiya, Y., Hatakeyama, H., Emoto, N., Wagatsuma, F., Matsushita, S., and Kanzaki, M. (2010) Palmitate-induced down-regulation of sortilin and impaired GLUT4 trafficking in C2C12 myotubes, *J Biol Chem* 285, 34371-34381.

193. Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J. L., Elmi, N., Bronk, S. F., Kohno, S., Charlton, M. R., and Gores, G. J. (2010) Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis, *J Hepatol* 52, 586-593.
194. Yang, Z. H., Miyahara, H., and Hatanaka, A. (2011) Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes, *Lipids Health Dis* 10, 10-120.
195. De Fabiani, E. (2011) The true story of palmitoleic acid: Between myth and reality, *Eur J Lipid Scie Tech* 113, 809-811.
196. Fabbrini, E., Magkos, F., Su, X., Abumrad, N. A., Nejedly, N., Coughlin, C. C., Okunade, A. L., Patterson, B. W., and Klein, S. (2011) Insulin sensitivity is not associated with palmitoleate availability in obese humans, *J Lipid Res* 52, 808-812.
197. Gong, J., Campos, H., McGarvey, S., Wu, Z., Goldberg, R., and Baylin, A. (2011) Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine?, *Am J Clin Nutr* 93, 186-191.
198. Perreault, M., Roke, K., Badawi, A., Nielsen, D. E., Abdelmagid, S. A., El-Soheily, A., Ma, D. W., and Mutch, D. M. (2014) Plasma levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are positively associated, but 18:0 and 18:2n-6 are inversely associated with markers of inflammation in young healthy adults, *Lipids* 49, 255-263.
199. Lee, J. M., Lee, Y. K., Mamrosh, J. L., Busby, S. A., Griffin, P. R., Pathak, M. C., Ortlund, E. A., and Moore, D. D. (2011) A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects, *Nature* 474, 506-510.
200. Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J., and Semenkovich, C. F. (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver, *Cell* 138, 476-488.
201. Yore, M. M., Syed, I., Moraes-Vieira, P. M., Zhang, T., Herman, M. A., Homan, E. A., Patel, R. T., Lee, J., Chen, S., Peroni, O. D., Dhaneshwar, A. S., Hammarstedt, A., Smith, U., McGraw, T. E., Saghatelian, A., and Kahn, B. B. (2014) Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects, *Cell* 159, 318-332.
202. Balsinde, J., Fernández, B., and Diez, E. (1990) Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C, *J Immunol* 144, 4298-4304.
203. Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2007) TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway, *J Immunol* 179, 4821-4828.
204. Balsinde, J., Fernández, B., Solís-Herruzo, J. A., and Diez, E. (1992) Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages, *Biochim Biophys Acta* 22, 75-82.
205. Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A. M., Meana, C., Rubio, J. M., Guijas, C., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2013) A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses, *J Immunol* 190, 5169-5177.
206. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

207. Diez, E., Balsinde, J., Aracil, M., and Schüller, A. (1987) Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages, *Biochim Biophys Acta* 921, 82-89.
208. Fine, J. B., and Sprecher, H. (1982) Unidimensional thin-layer chromatography of phospholipids on boric acid-impregnated plates, *J Lipid Res* 23, 660-663.
209. Sansone, A., Melchiorre, M., Chatgialloglu, C., and Ferreri, C. (2013) Hexadecenoic fatty acid isomers: a chemical biology approach for human plasma biomarker development, *Chem Res Toxicol* 26, 1703-1709.
210. Axelsen, P. H., and Murphy, R. C. (2010) Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain, *J Lipid Res* 51, 660-671.
211. Balgoma, D., Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Montero, O., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010) Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids, *J Immunol* 184, 3857-3865.
212. Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Meana, C., Balgoma, D., Pol, A., Del Pozo, M. A., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2011) Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis, *J Biol Chem* 286, 35299-35307.
213. Dumlao, D. S., Buczynski, M. W., Norris, P. C., Harkewicz, R., and Dennis, E. A. (2011) High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acyl ethanolamines, *Biochim Biophys Acta* 11, 724-736.
214. Zhang, T., Chen, S., Syed, I., Ståhlman, M., Kolar, M. J., Homan, E. A., Chu, Q., Smith, U., Borén, J., Kahn, B. B., and Saghatelian, A. (2016) A LC-MS-based workflow for measurement of branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids, *Nat Protoc* 11, 747-763.
215. Rodríguez, J. P., Guijas, C., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (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.
216. Balsinde, J., Balboa, M. A., and Dennis, E. A. (1997) Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages, *J Biol Chem* 272, 29317-29321.
217. Balsinde, J., Balboa, M. A., and Dennis, E. A. (2000) Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D1 macrophage-like cells, *J Biol Chem* 275, 22544-22549.
218. Balboa, M. A., Sáez, Y., and Balsinde, J. (2003) Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes, *J Immunol* 170, 5276-5280.
219. 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.
220. Carnevale, K. A., and Cathcart, M. K. (2001) Calcium-independent phospholipase A(2) is required for human monocyte chemotaxis to monocyte chemoattractant protein 1, *J Immunol* 167, 3414-3421.

221. Mishra, R. S., Carnevale, K. A., and Cathcart, M. K. (2008) iPLA2beta: front and center in human monocyte chemotaxis to MCP-1, *J Exp Med* 205, 347-359.
222. 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.
223. Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Peña, L., Gil-de-Gómez, L., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2012) Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages, *J Biol Chem* 287, 10894-10904.
224. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254.
225. Murphy, R. C., Barkley, R. M., Zemski Berry, K., Hankin, J., Harrison, K., Johnson, C., Krank, J., McAnoy, A., Uhlson, C., and Zarini, S. (2005) Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids, *Anal Biochem* 346, 1-42.
226. Deems, R., Buczynski, M. W., Bowers-Gentry, R., Harkewicz, R., and Dennis, E. A. (2007) Detection and quantitation of eicosanoids via high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, *Methods Enzymol* 432, 59-82.
227. Elson, D. H., Yakubenko, V. P., Roome, T., Thiagarajan, P. S., Bhattacharjee, A., Yadav, S. P., and Cathcart, M. K. (2011) Protein kinase C δ is a critical component of Dectin-1 signaling in primary human monocytes, *J Leukoc Biol* 90, 599-611.
228. Hashimoto, T., Segawa, H., Okuno, M., Kano, H., Hamaguchi, H. O., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Hasui, S., Yamaguchi, T., Hirose, F., and Osumi, T. (2012) Active involvement of micro-lipid droplets and lipid-droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes, *J Cell Sci* 125, 6127-6136.
229. Dai, Z., Qi, W., Li, C., Lu, J., Mao, Y., Yao, Y., Li, L., Zhang, T., Hong, H., Li, S., Zhou, T., Yang, Z., Yang, X., Gao, G., and Cai, W. (2013) Dual regulation of adipose triglyceride lipase by pigment epithelium-derived factor: a novel mechanistic insight into progressive obesity, *Mol Cell Endocrinol* 377, 123-134.
230. Khan, S. A., Sathyanarayan, A., Mashek, M. T., Ong, K. T., Wollaston-Hayden, E. E., and Mashek, D. G. (2015) ATGL-catalyzed lipolysis regulates SIRT1 to control PGC-1 α /PPAR- α signaling, *Diabetes* 64, 418-426.
231. 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.
232. Pompeia, C., Lima, T., and Curi, R. (2003) Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death?, *Cell Biochem Funct* 21, 97-104.
233. Tallima, H., and El Ridi, R. (2017) Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review, *J Adv Res* 11, 33-41.
234. Sonnweber, T., Pizzini, A., Nairz, M., Weiss, G., and Tancevski, I. (2018) Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases, *Int J Mol Sci* 19.
235. Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A. M., Lebrero, P., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2017) Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release, *Front Immunol* 8.

236. Chilton, F. H., and Murphy, R. C. (1986) Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil, *J Biol Chem* 261, 7771-7777.
237. Suram, S., Gangelhoff, T. A., Taylor, P. R., Rosas, M., Brown, G. D., Bonventre, J. V., Akira, S., Uematsu, S., Williams, D. L., Murphy, R. C., and Leslie, C. C. (2010) Pathways regulating cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production in macrophages by *Candida albicans*, *J Biol Chem* 285, 30676-30685.
238. Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Ruipérez, V., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010) Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes, *J Immunol* 184, 1071-1078.
239. Rubio, J. M., Rodríguez, J. P., Gil-de-Gómez, L., Guijas, C., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2015) Group V secreted phospholipase A2 is upregulated by IL-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids, *J Immunol* 194, 3327-3339.
240. Nikolaou, A., Kokotou, M. G., Vasilakaki, S., and Kokotos, G. (2019) Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A(2), *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 6, 941-956.
241. Maryanoff, B. E., and Reitz, A. B. (1989) The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects, *Chemical Reviews* 89, 863-927.
242. Gliszczyńska, A., Niezgoda, N., Gładkowski, W., Czarnecka, M., Świtalska, M., and Wietrzyk, J. (2016) Synthesis and biological evaluation of novel phosphatidylcholine analogues containing monoterpene acids as potent antiproliferative agents, *PLoS one* 11, e0157278.
243. Hsiao, C. Y., Ottaway, C. A., and Wetlaufer, D. B. (1974) Preparation of fully deuterated fatty acids by simple method, *Lipids* 9, 913-915.
244. Singh, A. (1990) An efficient synthesis of phosphatidylcholines, *J Lipid Res* 31, 1522-1525.
245. Nanda, S., and Yadav, J. S. (2003) Asymmetric synthesis of unnatural (Z,Z,E)-octadecatrienoid and eicosatrienoid by lipoxygenase-catalyzed oxygenation, *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 1799-1806.
246. Darwish, T. A., Luks, E., Moraes, G., Yepuri, N. R., Holden, P. J., and James, M. (2013) Synthesis of deuterated [D32] oleic acid and its phospholipid derivative [D64] dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, *J Labelled Comp Radiopharm* 56, 520-529.
247. Hu, T. S., Yu, Q., Wu, Y. L., and Wu, Y. (2001) Enantioselective syntheses of monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins tonkinecin and annonacin starting from carbohydrates, *J Org Chem* 66, 853-861.
248. Brocksom, T. J., Coelho, F., Deprés, J. P., Greene, A. E., Freire De Lima, M. E., Hamelin, O., Hartmann, B., Kanazawa, A. M., and Wang, Y. (2002) First comprehensive bakkan approach: stereoselective and efficient dichloroketene-based total syntheses of (+/-)- and (-)-9-acetoxylfukinanolide, (+/-)- and (+)-bakkenolide A, (-)-bakkenolides III, B, C, H, L, V, and X, (+/-)- and (-)-homogynolide A, (+/-)-homogynolide B, and (+/-)-palmosalide C, *J Am Chem Soc* 124, 15313-15325.
249. Barbachyn, M. R., Cleek, G. J., Dolak, L. A., Garmon, S. A., Morris, J., Seest, E. P., Thomas, R. C., Toops, D. S., Watt, W., Wishka, D. G., Ford, C. W., Zurenko, G. E.,

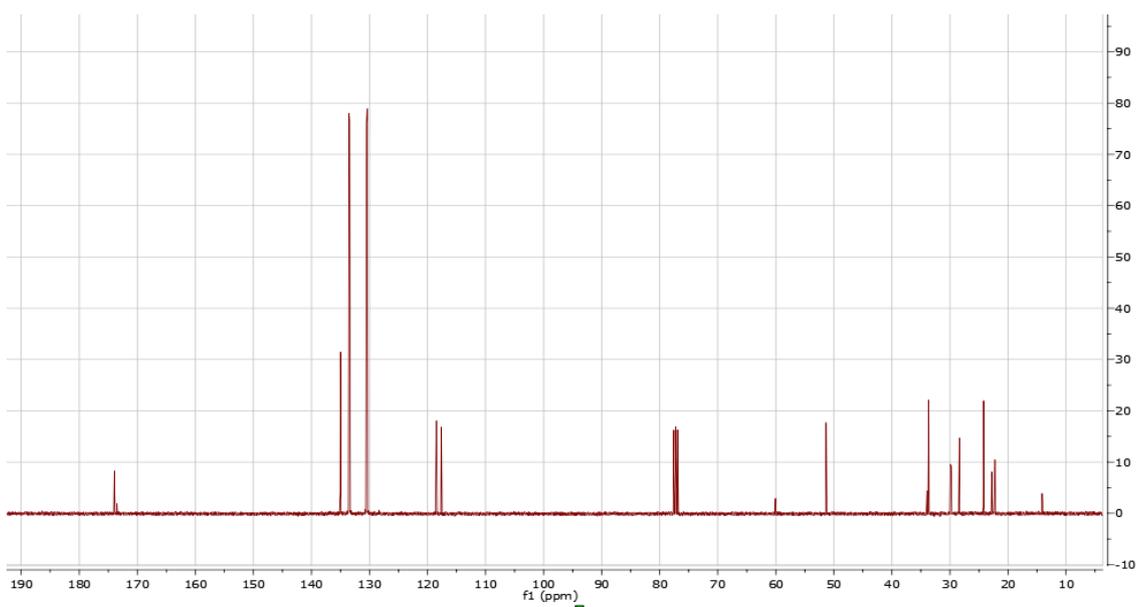
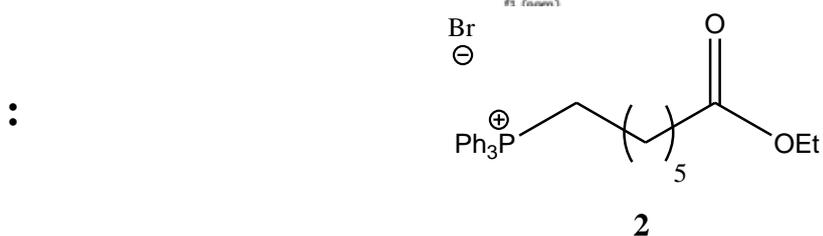
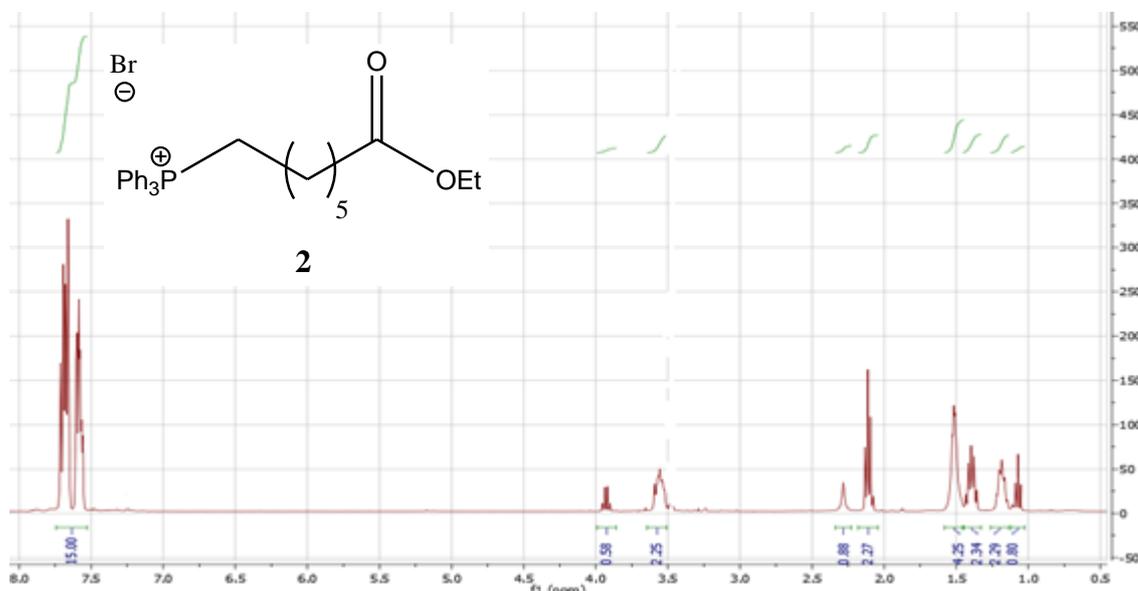
- Hamel, J. C., Schaadt, R. D., Stapert, D., Yagi, B. H., Adams, W. J., Friis, J. M., Slatter, J. G., Sams, J. P., Oien, N. L., Zaya, M. J., Wienkers, L. C., and Wynalda, M. A. (2003) Identification of phenylisoxazolines as novel and viable antibacterial agents active against Gram-positive pathogens, *J Med Chem* 46, 284-302.
250. Niezgodna, N., Mituła, P., Kempieńska, K., Wietrzyk, J., and Wawrzęńczyk, C. (2013) Synthesis of phosphatidylcholine with conjugated linoleic acid and studies on its cytotoxic activity, *Aus J Chem* 66, 354-361.
251. Astudillo, A. M., Balgoma, D., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2012) Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells, *Biochim Biophys Acta* 2, 249-256.
252. Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) The incorporation of arachidonic acid into triacylglycerol in P388D1 macrophage-like cells, *Eur J Biochem* 235, 480-485.
253. Pereira-Dutra, F. S., Teixeira, L., de Souza Costa, M. F., and Bozza, P. T. (2019) Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation, *J Leukoc Biol* 106, 563-580.
254. Bingham, C. O., 3rd, Fijneman, R. J., Friend, D. S., Goddeau, R. P., Rogers, R. A., Austen, K. F., and Arm, J. P. (1999) Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells, *J Biol Chem* 274, 31476-31484.
255. Balsinde, J., Balboa, M. A., Yedgar, S., and Dennis, E. A. (2000) Group V phospholipase A(2)-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D(1) macrophages, *J Biol Chem* 275, 4783-4786.
256. Mounier, C. M., Ghomashchi, F., Lindsay, M. R., James, S., Singer, A. G., Parton, R. G., and Gelb, M. H. (2004) Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A(2) occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A(2)-alpha, *J Biol Chem* 279, 25024-25038.
257. Balboa, M. A., Shirai, Y., Gaietta, G., Ellisman, M. H., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (2003) Localization of group V phospholipase A2 in caveolin-enriched granules in activated P388D1 macrophage-like cells, *J Biol Chem* 278, 48059-48065.
258. Oörni, 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.
259. Dichlberger, A., Schlager, S., Kovanen, P. T., and Schneider, W. J. (2016) Lipid droplets in activated mast cells - a significant source of triglyceride-derived arachidonic acid for eicosanoid production, *Eur J Pharmacol* 785, 59-69.
260. Blank, M. L., Smith, Z. L., and Snyder, F. (1993) Arachidonate-containing triacylglycerols: biosynthesis and a lipolytic mechanism for the release and transfer of arachidonate to phospholipids in HL-60 cells, *Biochim Biophys Acta* 3, 275-282.
261. Rouzer, C. A., Ivanova, P. T., Byrne, M. O., Milne, S. B., Marnett, L. J., and Brown, H. A. (2006) Lipid profiling reveals arachidonate deficiency in RAW264.7 cells: Structural and functional implications, *Biochemistry* 45, 14795-14808.
262. 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.
263. Brash, A. R. (2001) Arachidonic acid as a bioactive molecule, *J Clin Invest* 107, 1339-1345.
264. Ferreri, C., Masi, A., Sansone, A., Giacometti, G., Larocca, A. V., Menounou, G., Scanferlato, R., Tortorella, S., Rota, D., Conti, M., Deplano, S., Louka, M., Maranini, A. R., Salati, A., Sunda, V., and Chatgialloglu, C. (2016) Fatty acids in membranes as homeostatic, metabolic and nutritional biomarkers: recent advancements in analytics and diagnostics, *Diagnostics* 7.
265. Montenegro-Burke, J. R., Sutton, J. A., Rogers, L. M., Milne, G. L., McLean, J. A., and Aronoff, D. M. (2016) Lipid profiling of polarized human monocyte-derived macrophages, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 127, 1-8.
266. Zhang, C., Wang, Y., Wang, F., Wang, Z., Lu, Y., Xu, Y., Wang, K., Shen, H., Yang, P., Li, S., Qin, X., and Yu, H. (2017) Quantitative profiling of glycerophospholipids during mouse and human macrophage differentiation using targeted mass spectrometry, *Sci Rep* 7, 017-00341.
267. Snider, S. A., Margison, K. D., Ghorbani, P., LeBlond, N. D., O'Dwyer, C., Nunes, J. R. C., Nguyen, T., Xu, H., Bennett, S. A. L., and Fullerton, M. D. (2018) Choline transport links macrophage phospholipid metabolism and inflammation, *J Biol Chem* 293, 11600-11611.
268. Murakami, M., Masuda, S., Ueda-Semmyo, K., Yoda, E., Kuwata, H., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Sumimoto, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakatani, Y., and Kudo, I. (2005) Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂γ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A₂, *J Biol Chem* 280, 14028-14041.
269. Mouchlis, V. D., Chen, Y., McCammon, J. A., and Dennis, E. A. (2018) Membrane allostery and unique hydrophobic sites promote enzyme substrate specificity, *J Am Chem Soc* 140, 3285-3291.
270. Koeberle, A., Shindou, H., Harayama, T., and Shimizu, T. (2012) Palmitoleate is a mitogen, formed upon stimulation with growth factors, and converted to palmitoleoyl-phosphatidylinositol, *J Biol Chem* 287, 27244-27254.
271. Brejchova, K., Balas, L., Paluchova, V., Brezinova, M., Durand, T., and Kuda, O. (2020) Understanding FAHFAs: From structure to metabolic regulation, *Prog Lipid Res* 79, 29.
272. Treede, I., Braun, A., Sparla, R., Kühnel, M., Giese, T., Turner, J. R., Anes, E., Kulaksiz, H., Füllekrug, J., Stremmel, W., Griffiths, G., and Eehalt, R. (2007) Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine, *J Biol Chem* 282, 27155-27164.
273. Jung, Y. Y., Nam, Y., Park, Y. S., Lee, H. S., Hong, S. A., Kim, B. K., Park, E. S., Chung, Y. H., and Jeong, J. H. (2013) Protective effect of phosphatidylcholine on lipopolysaccharide-induced acute inflammation in multiple organ injury, *Korean J Physiol Pharmacol* 17, 209-216.
274. Straus, D. S., and Glass, C. K. (2007) Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms, *Trends Immunol* 28, 551-558.

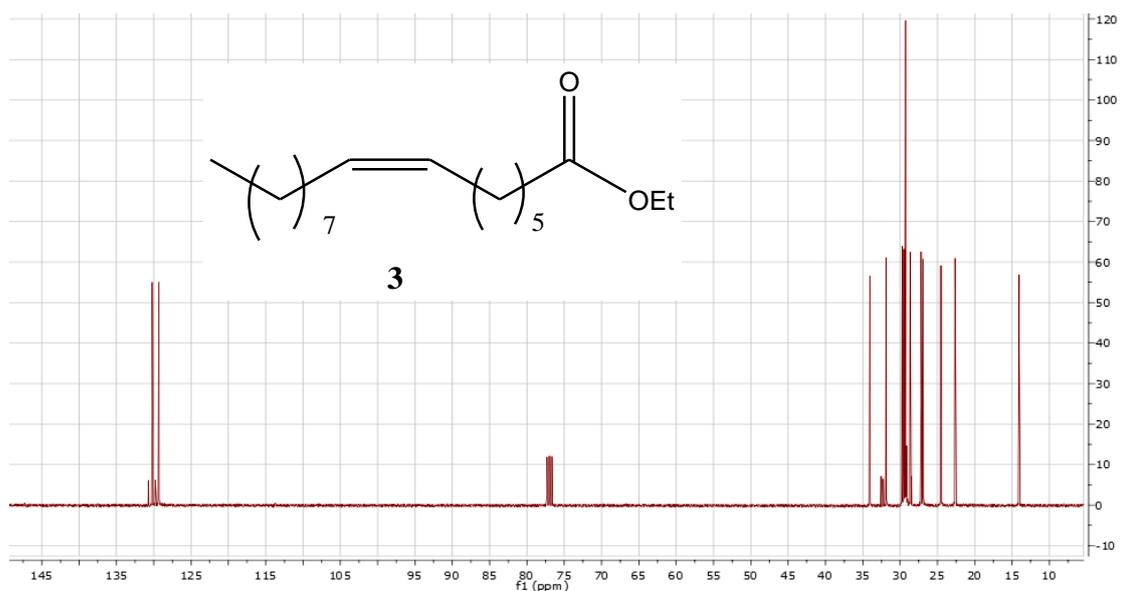
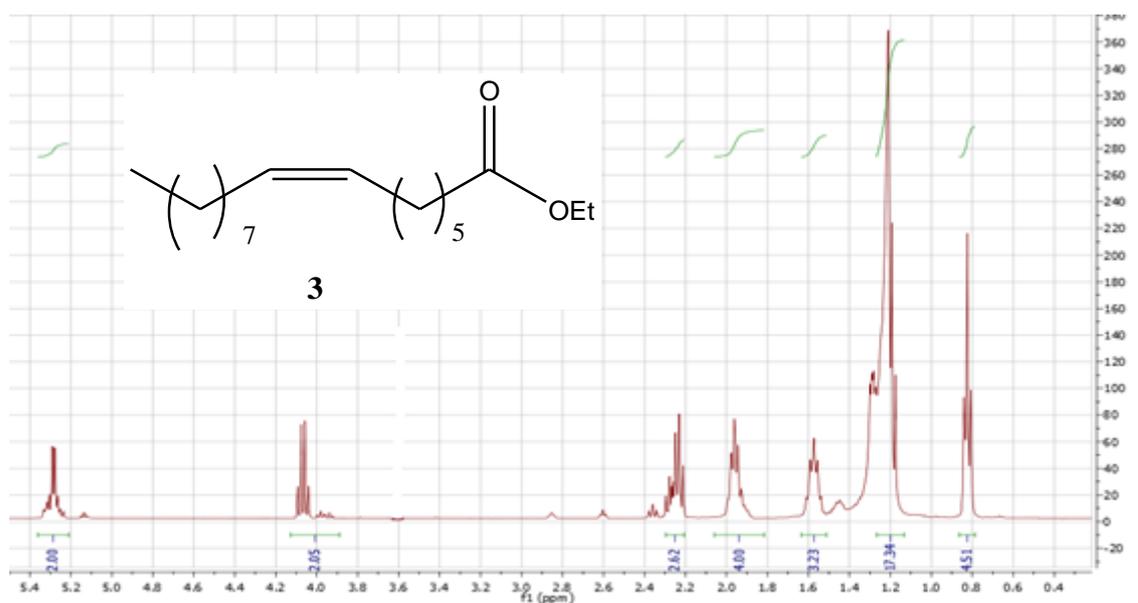
Capítulo VIII.- Anexos (RMN y ESI-QTOF)

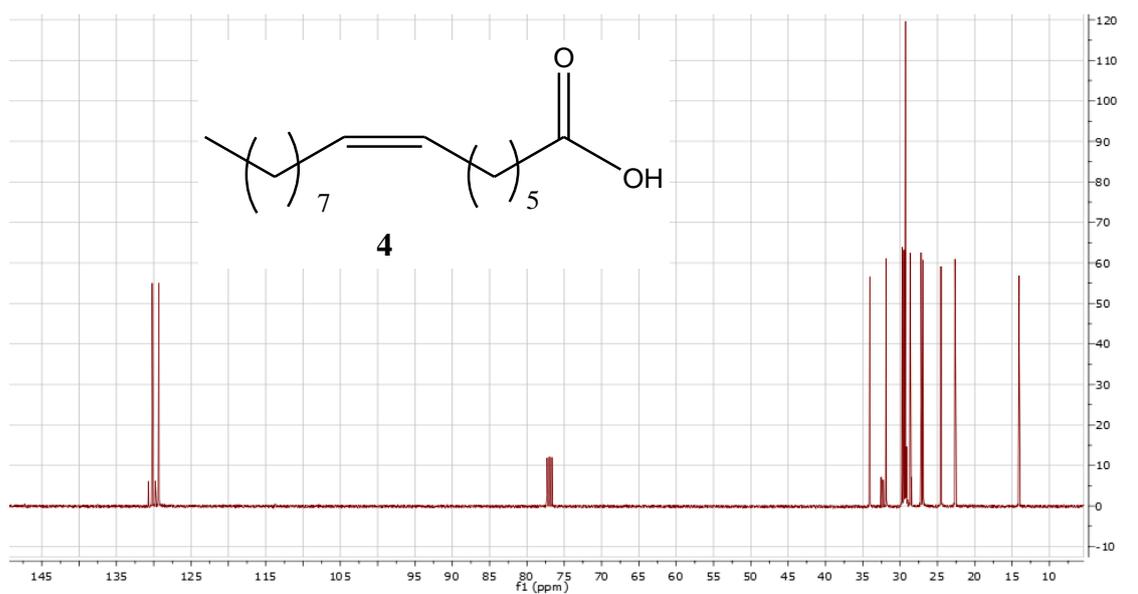
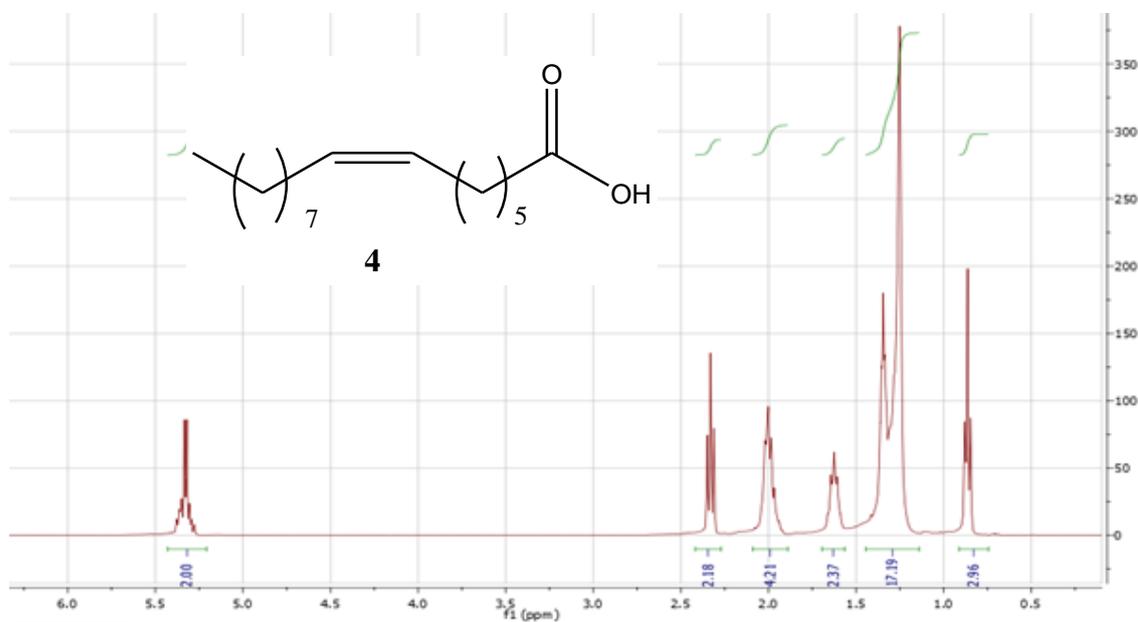
1. SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS (16:1N-7, 16:1N-10,
16:1N-9, [D27] 16:1N-9)

1.1. 16:1n-9

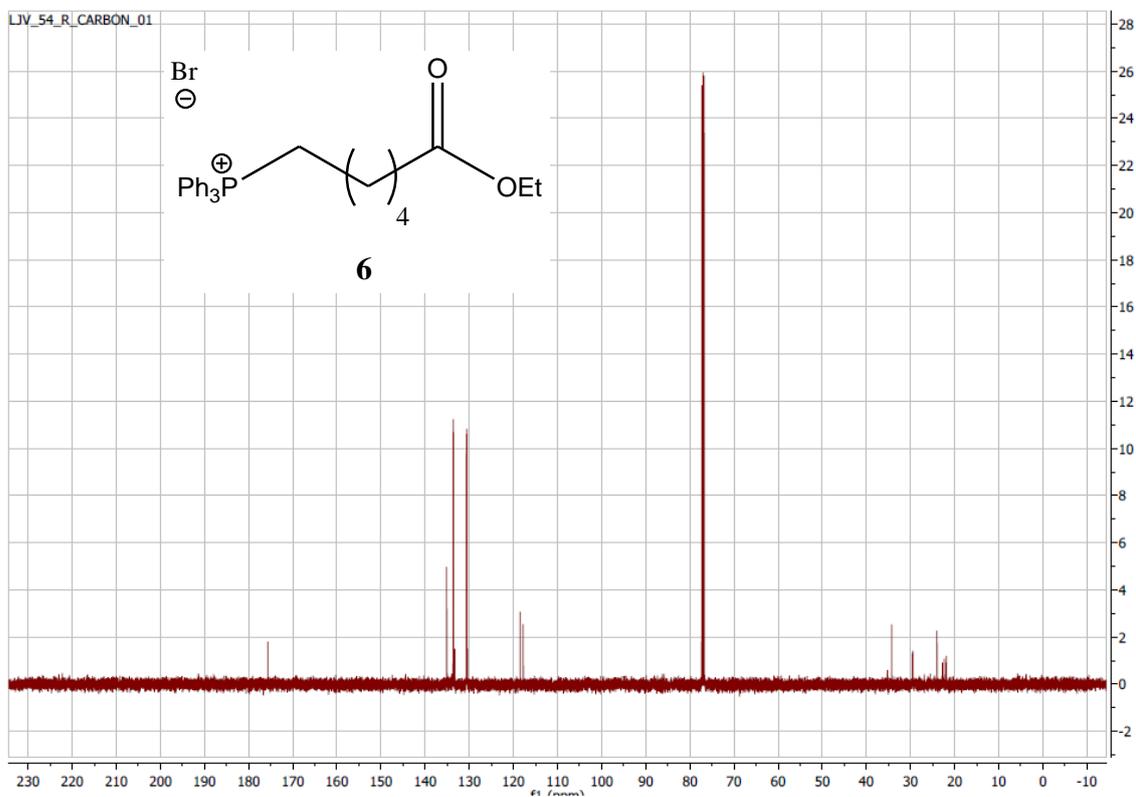
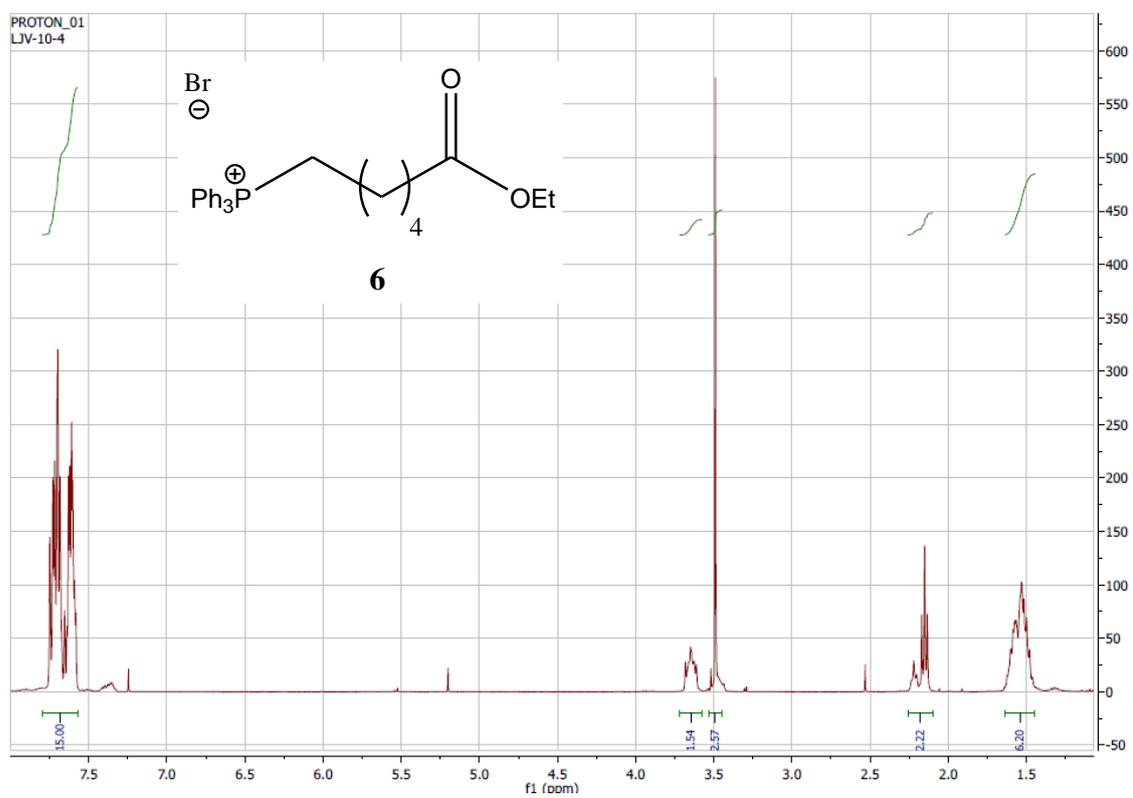


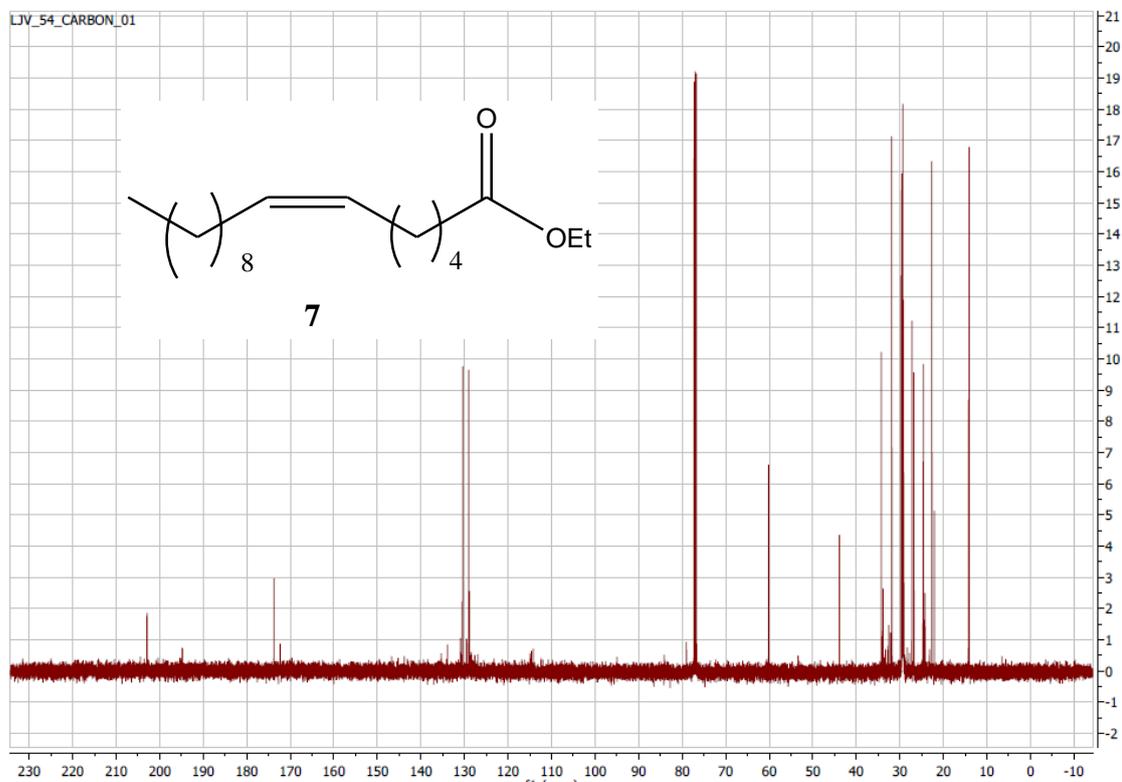
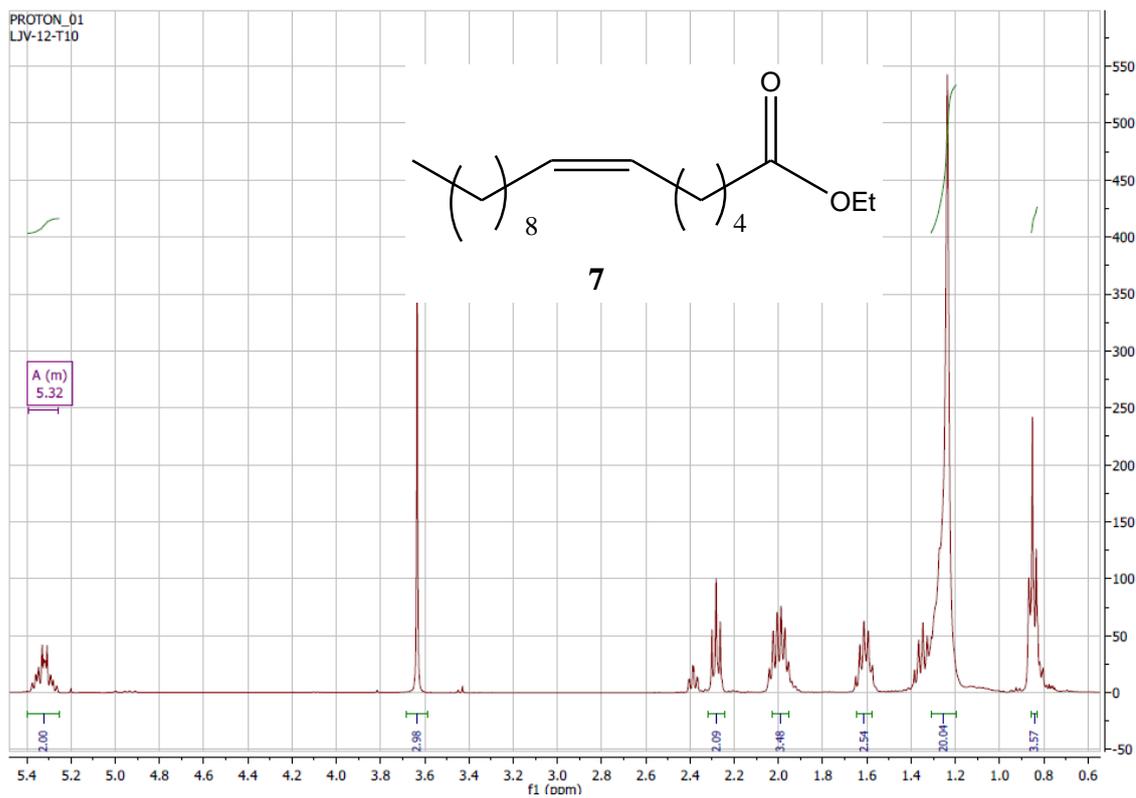
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)



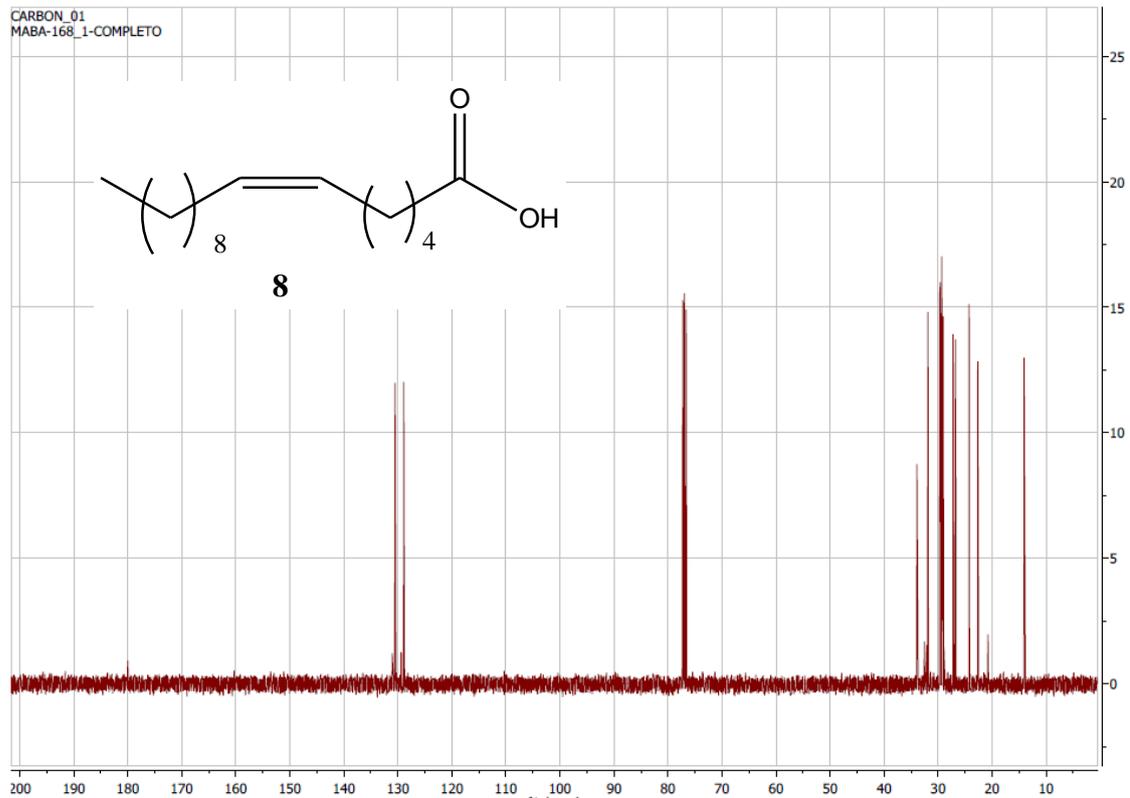
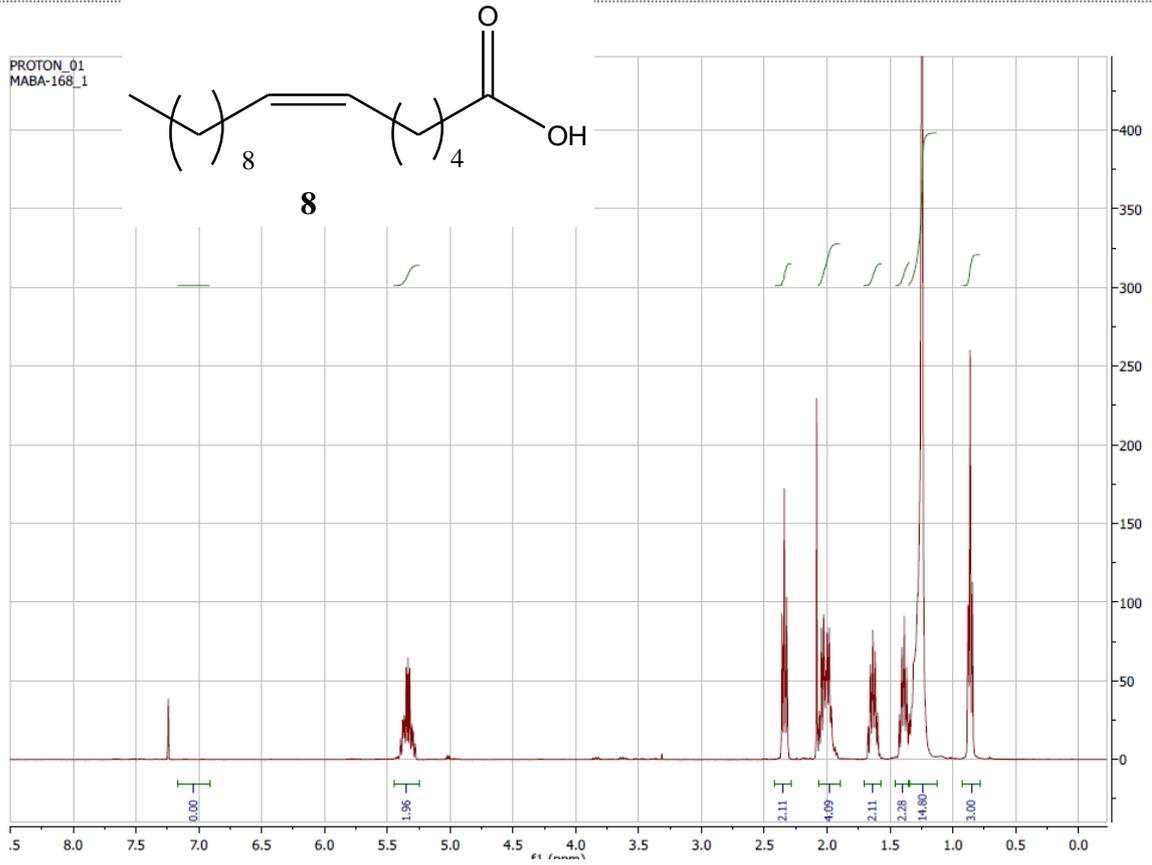


1.2. 16:1n-10

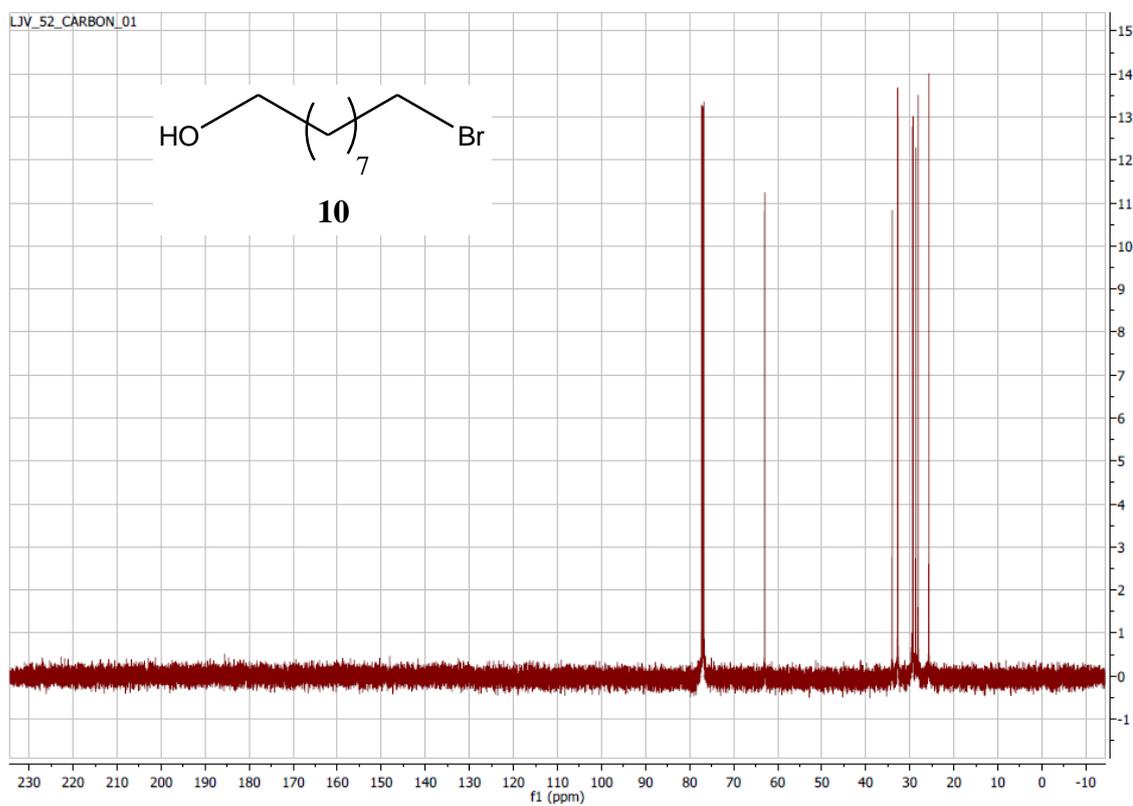
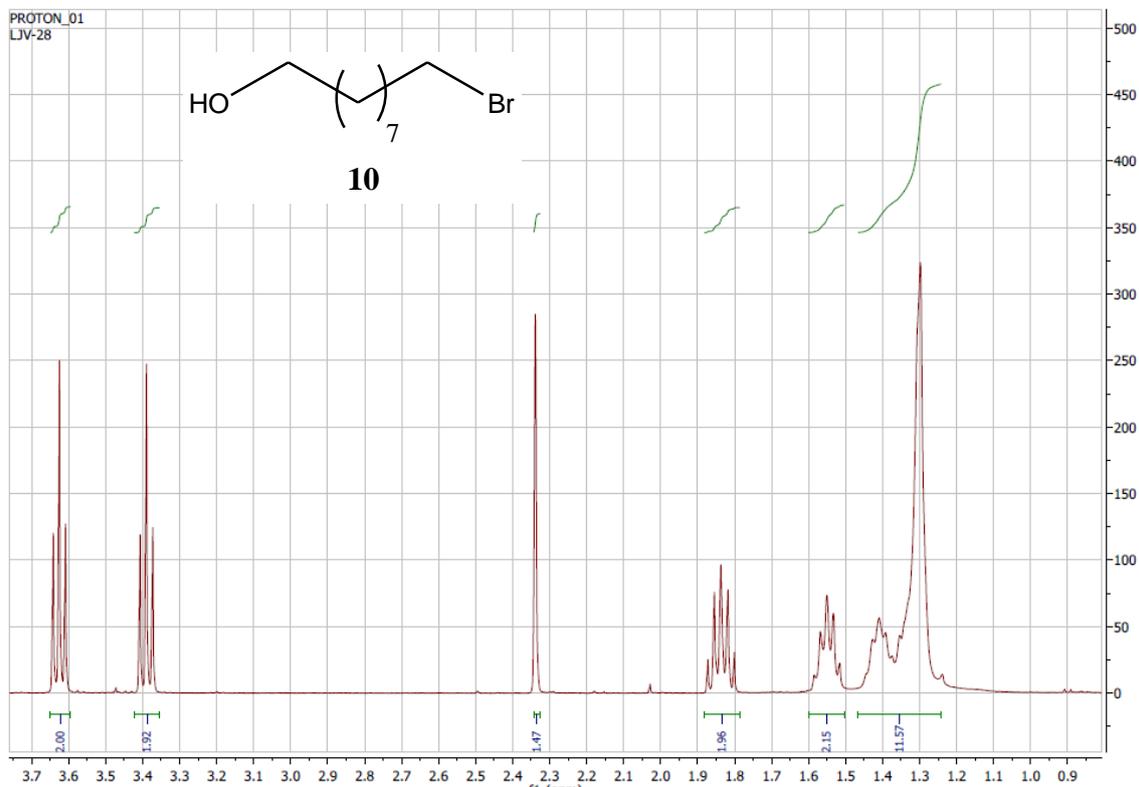




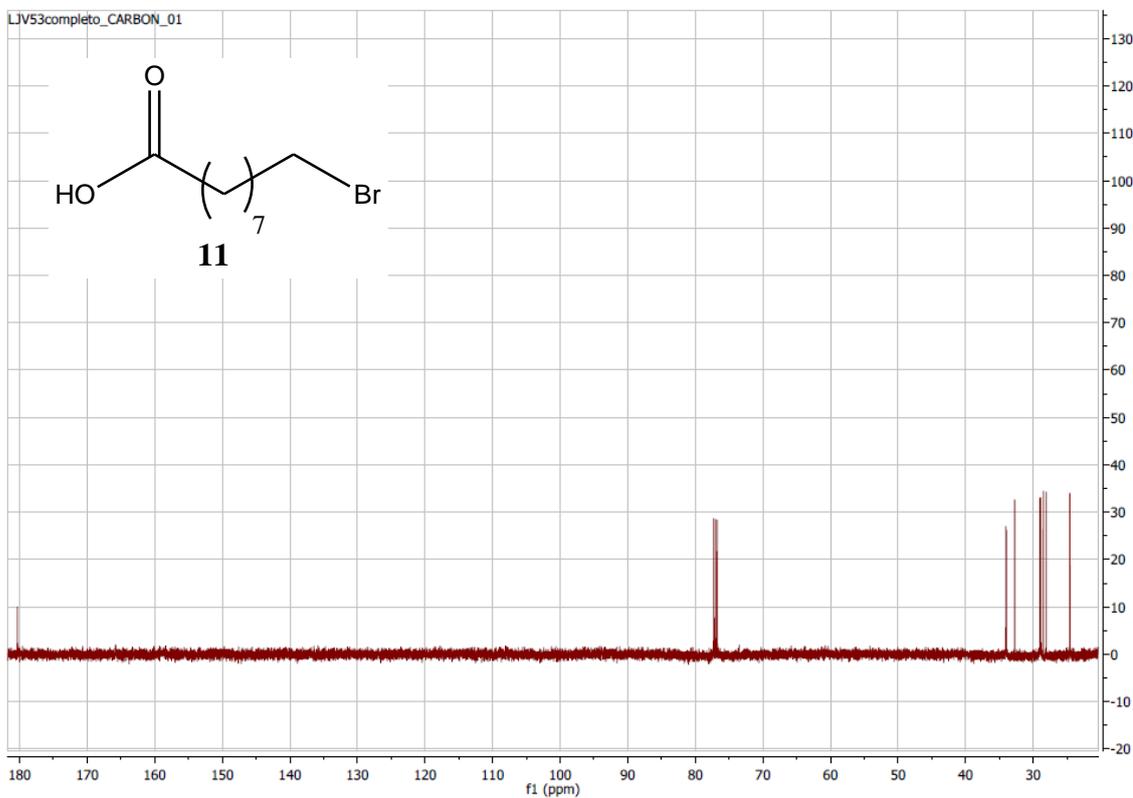
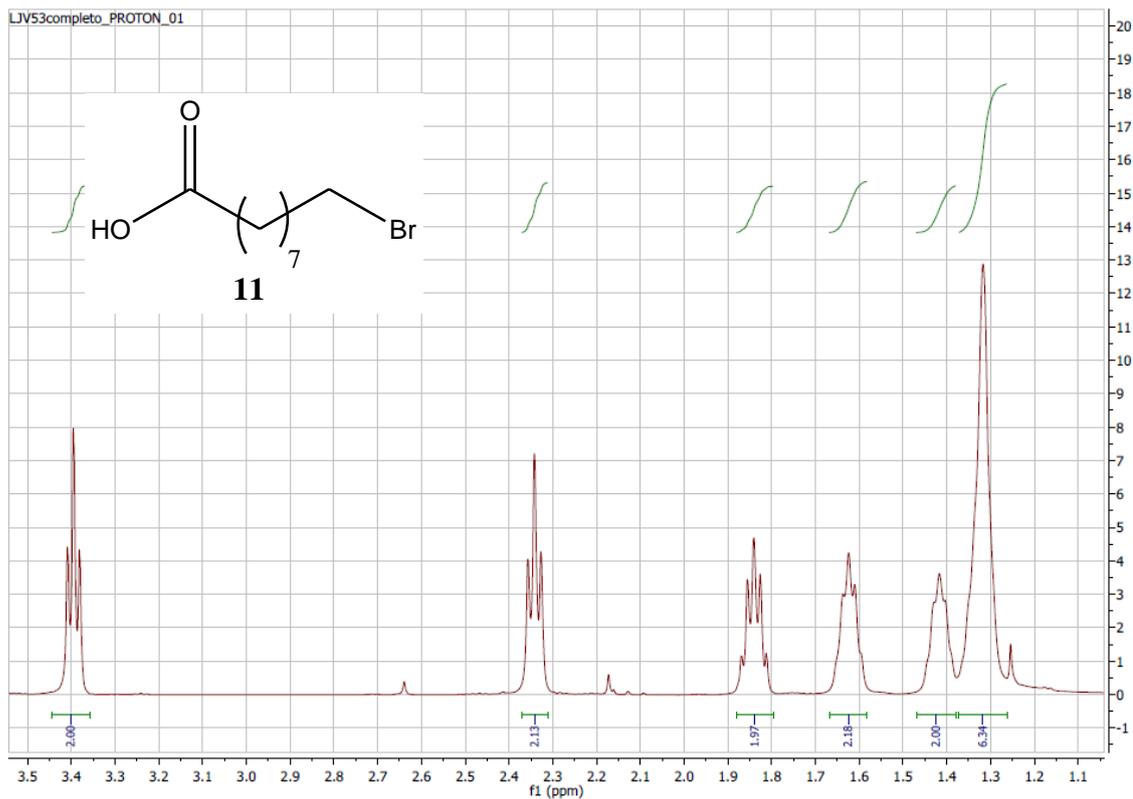
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)

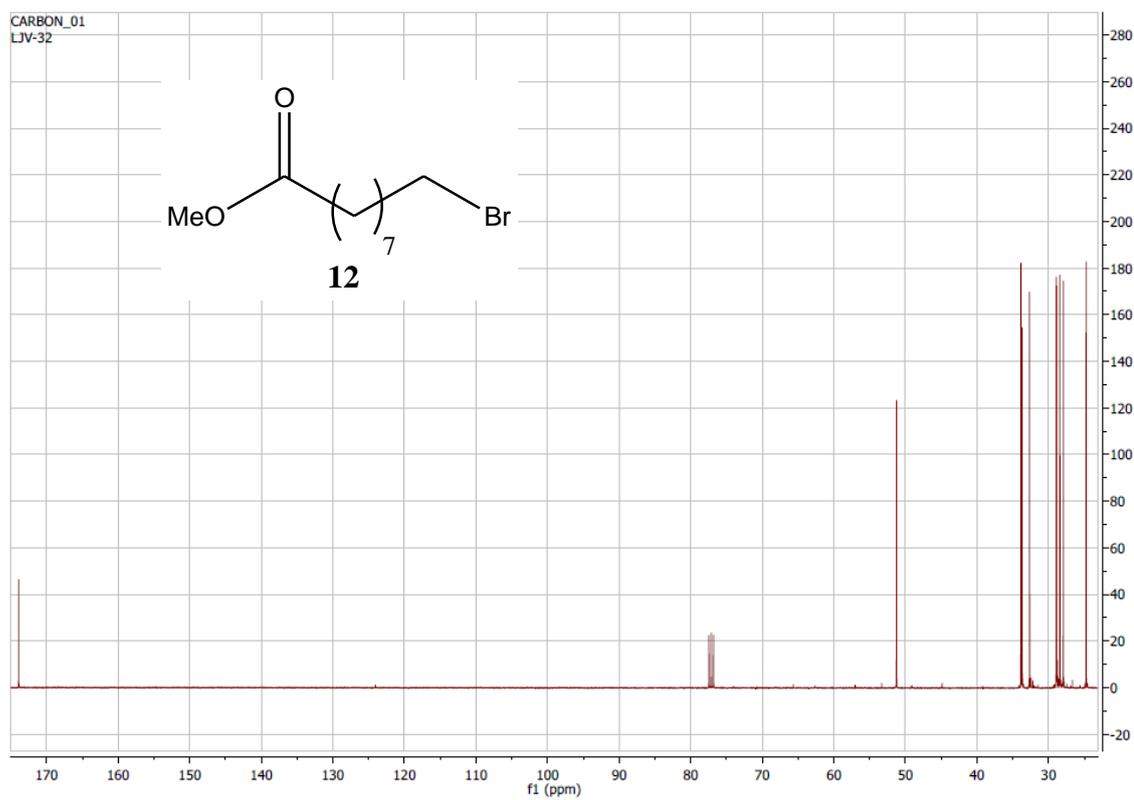
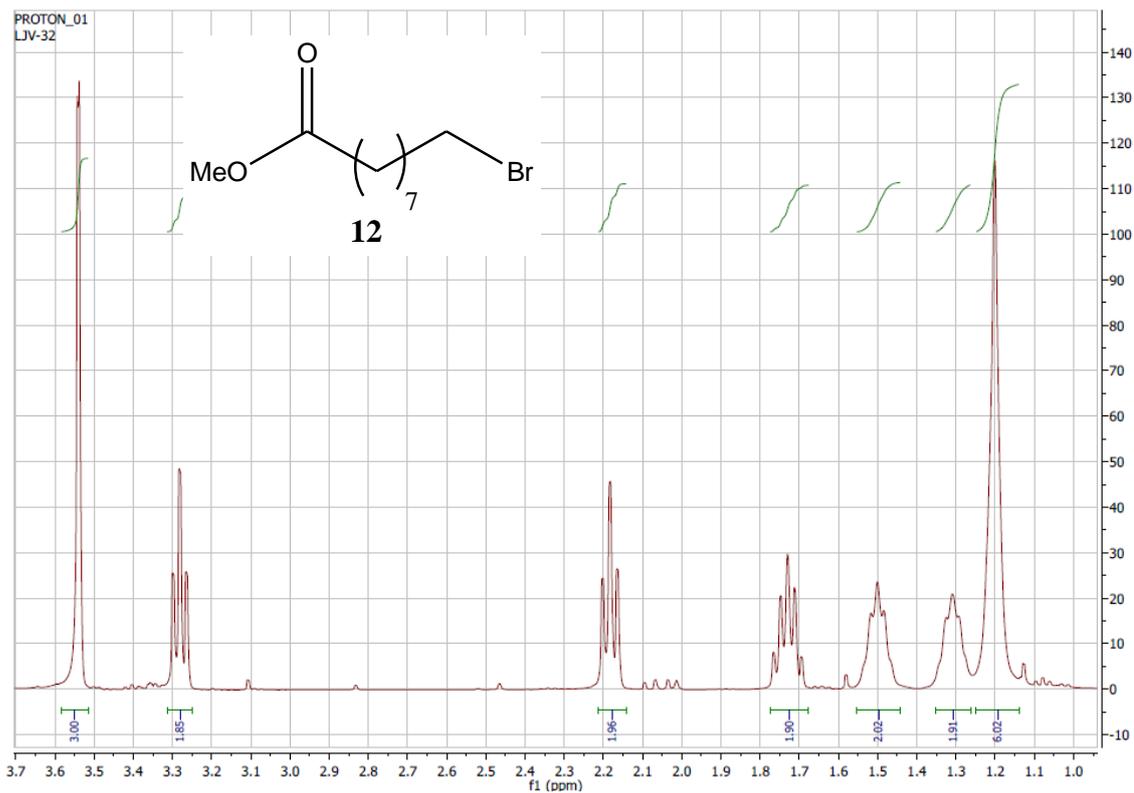


1.3. 16:1n-7

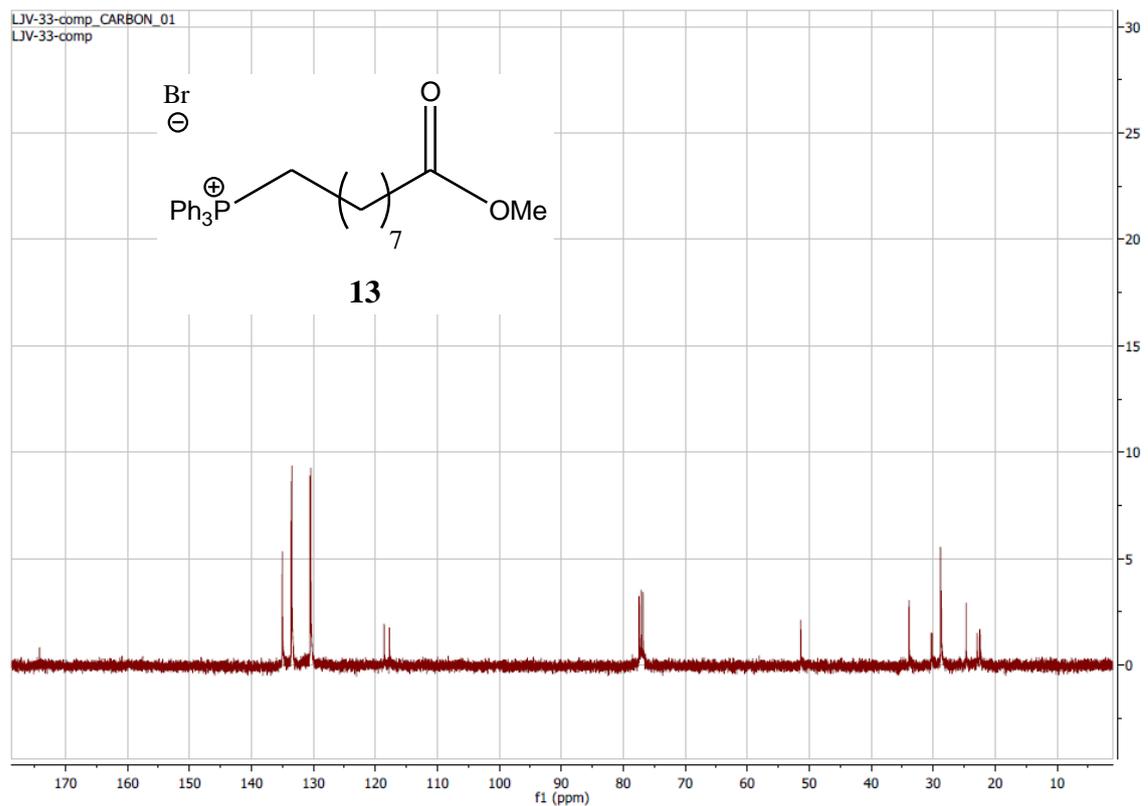
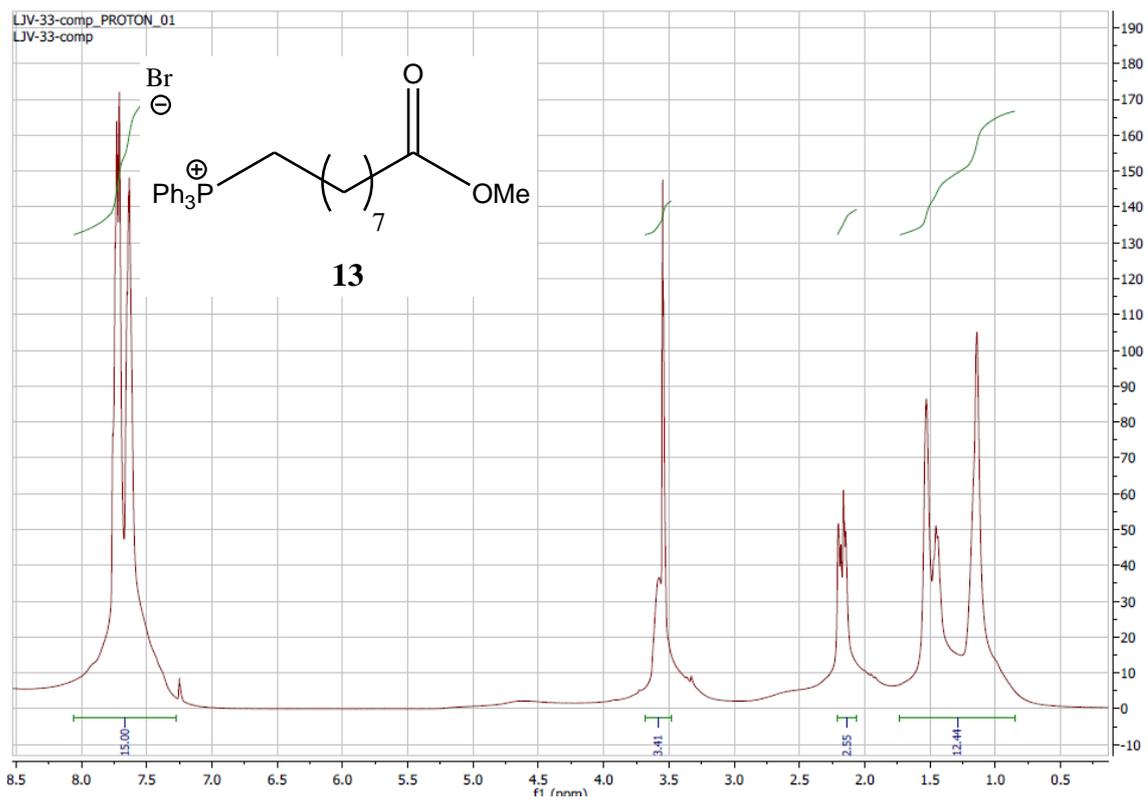


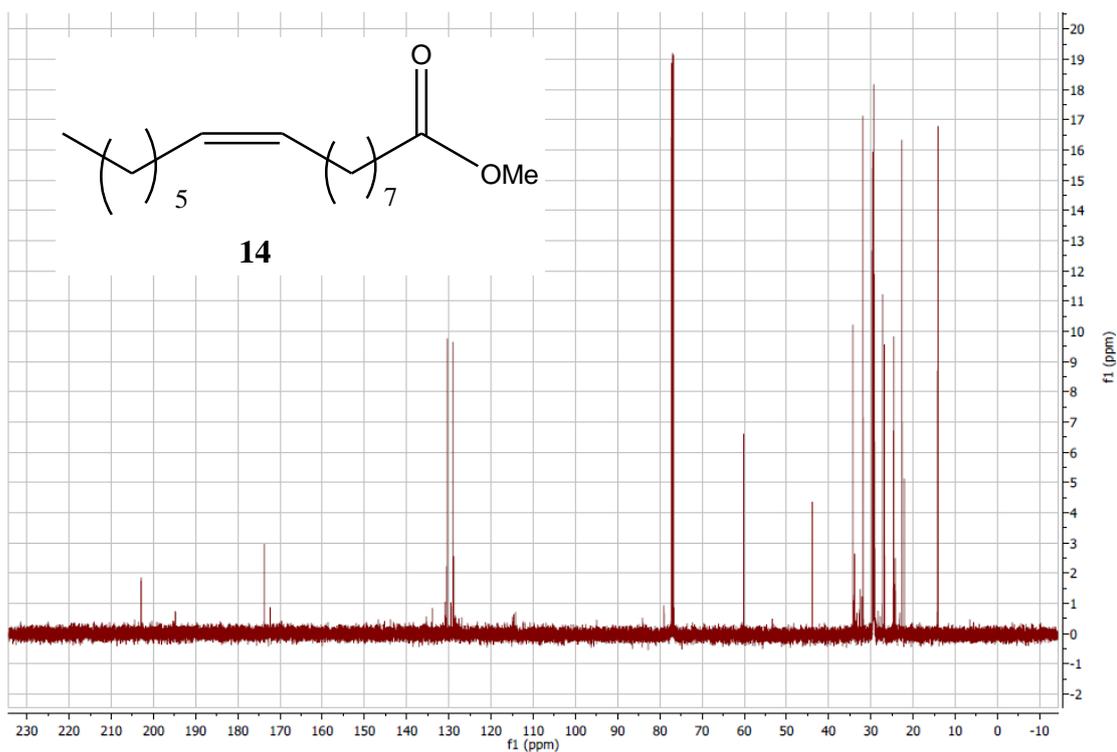
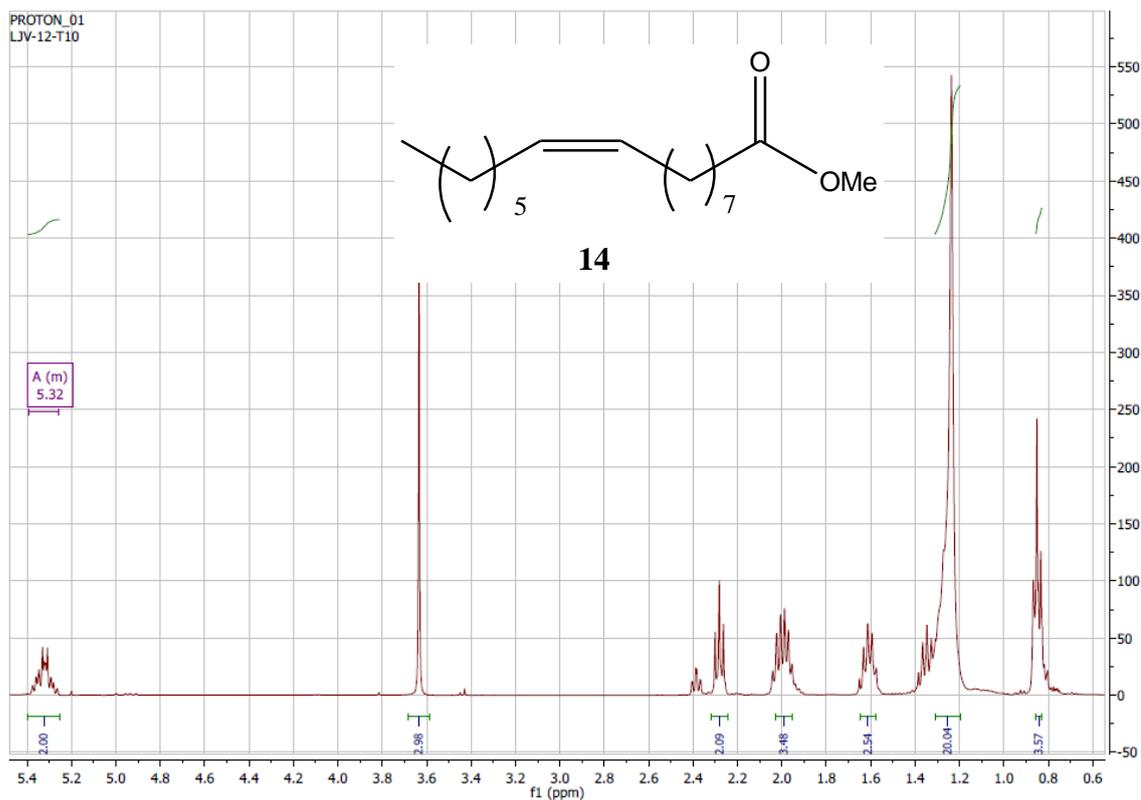
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)



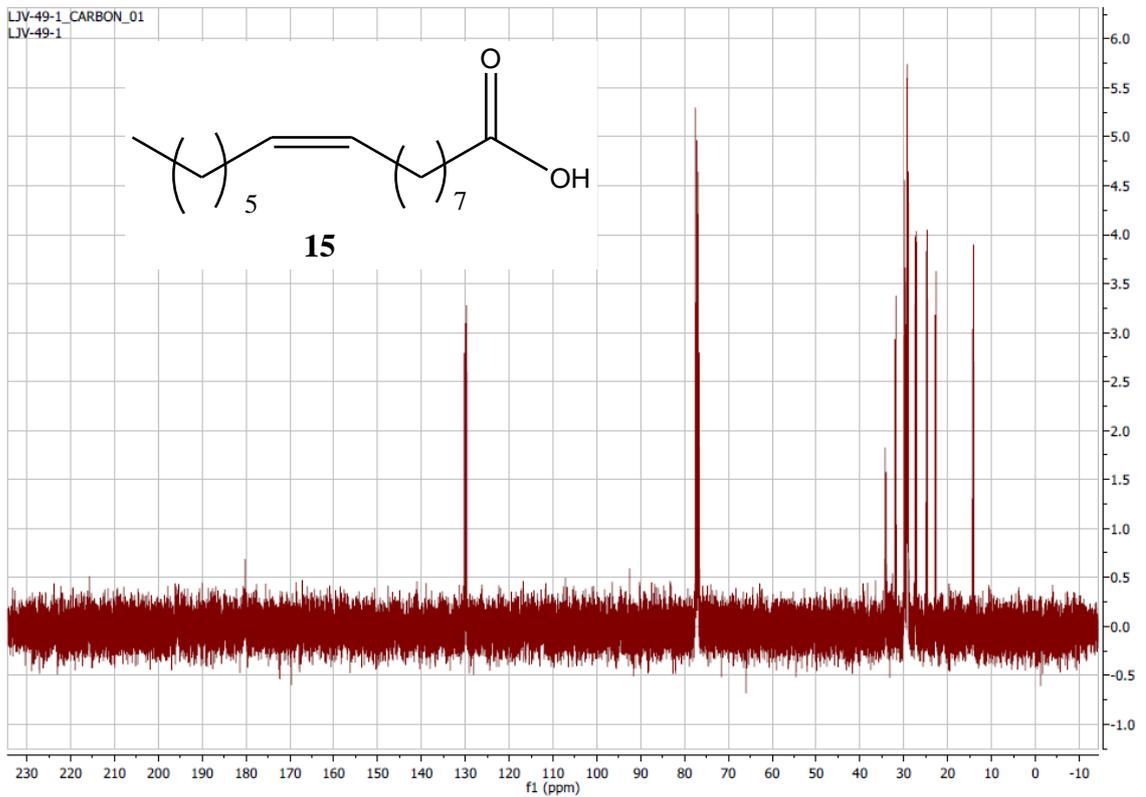
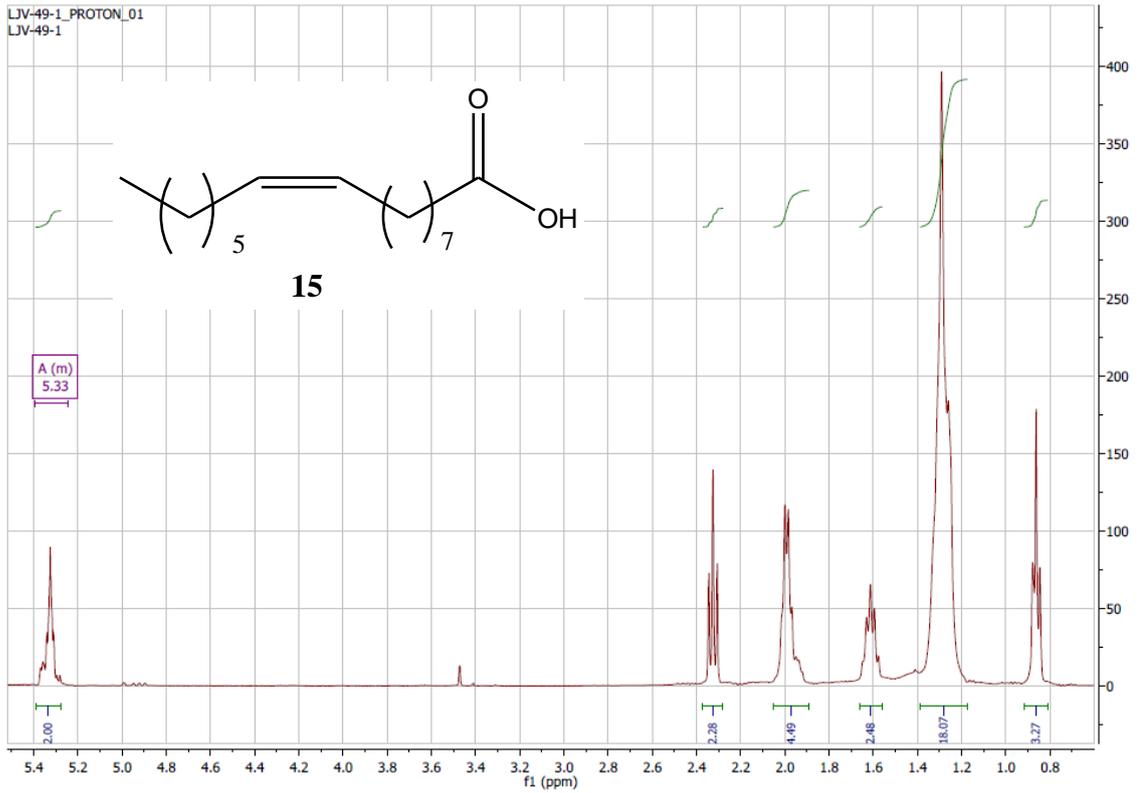


1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)

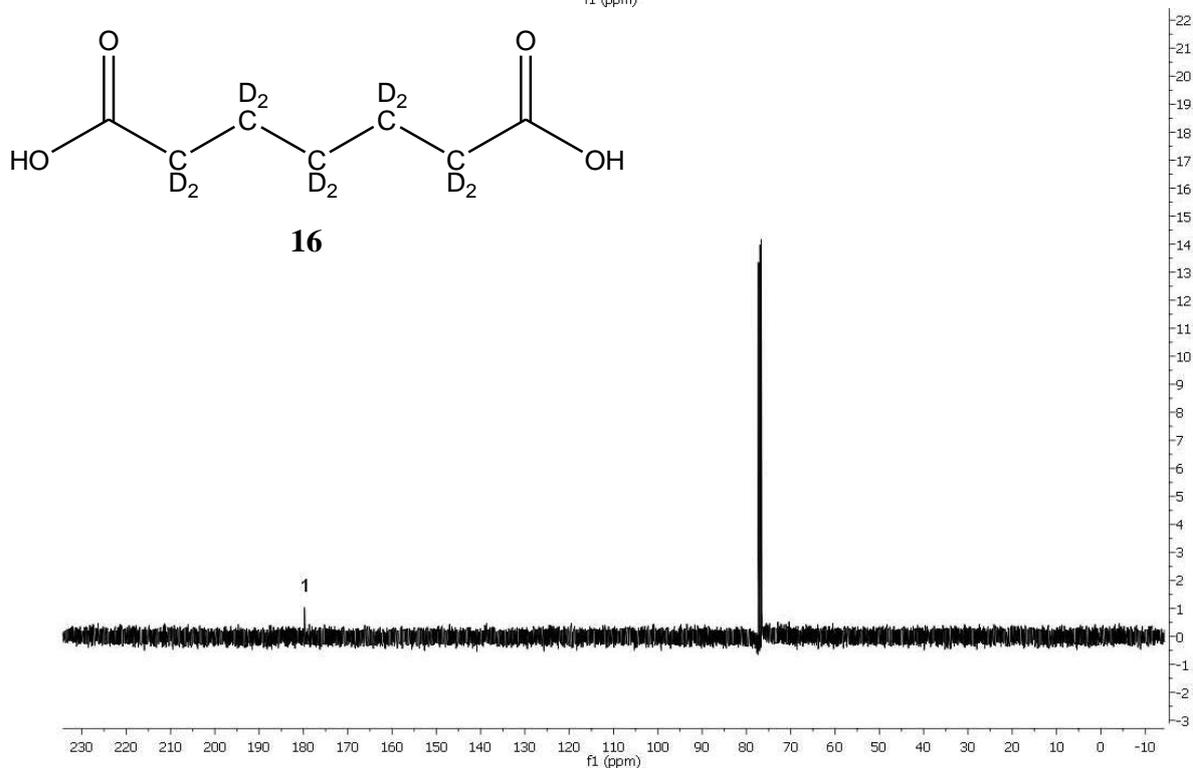
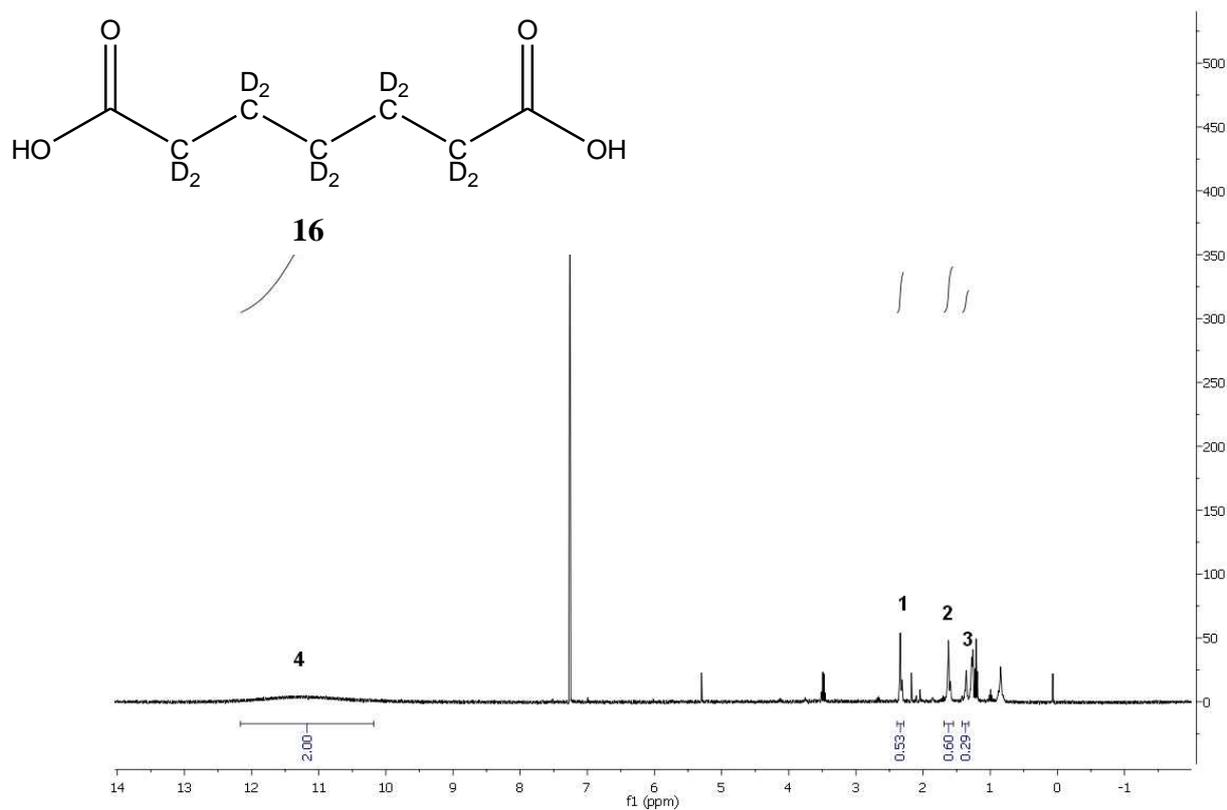




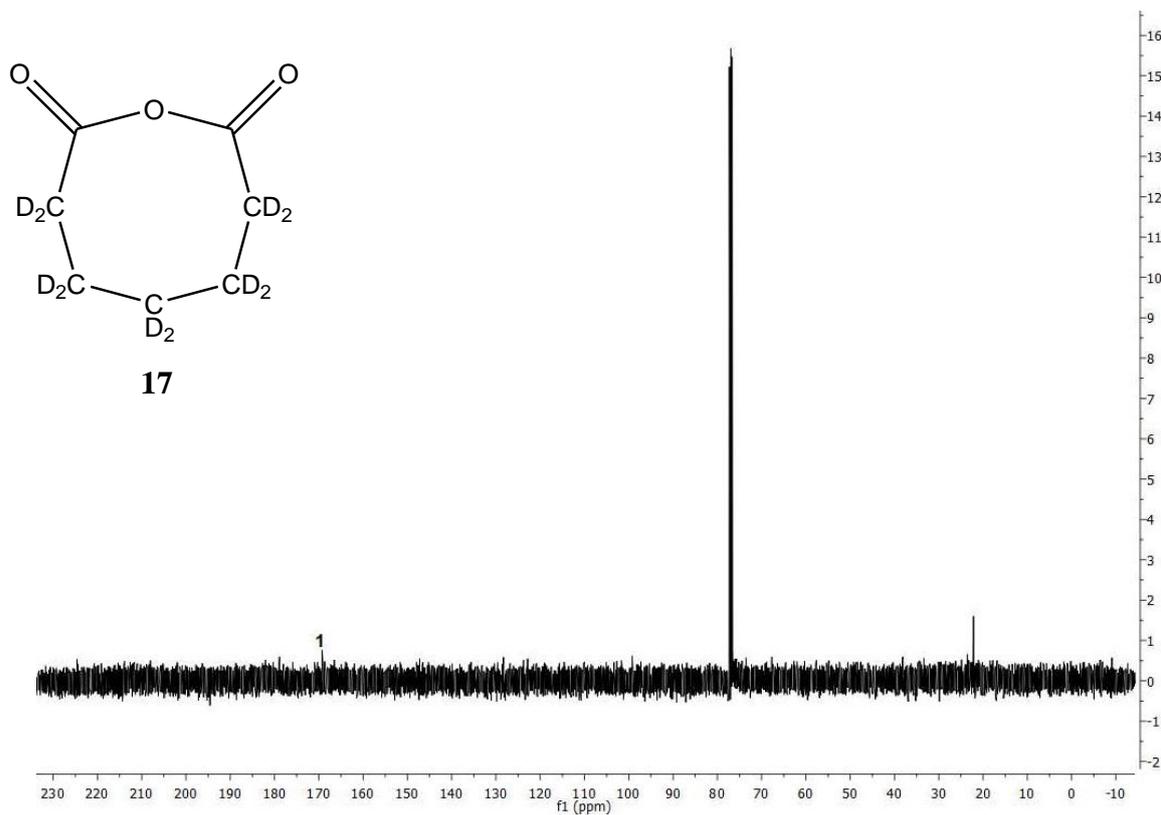
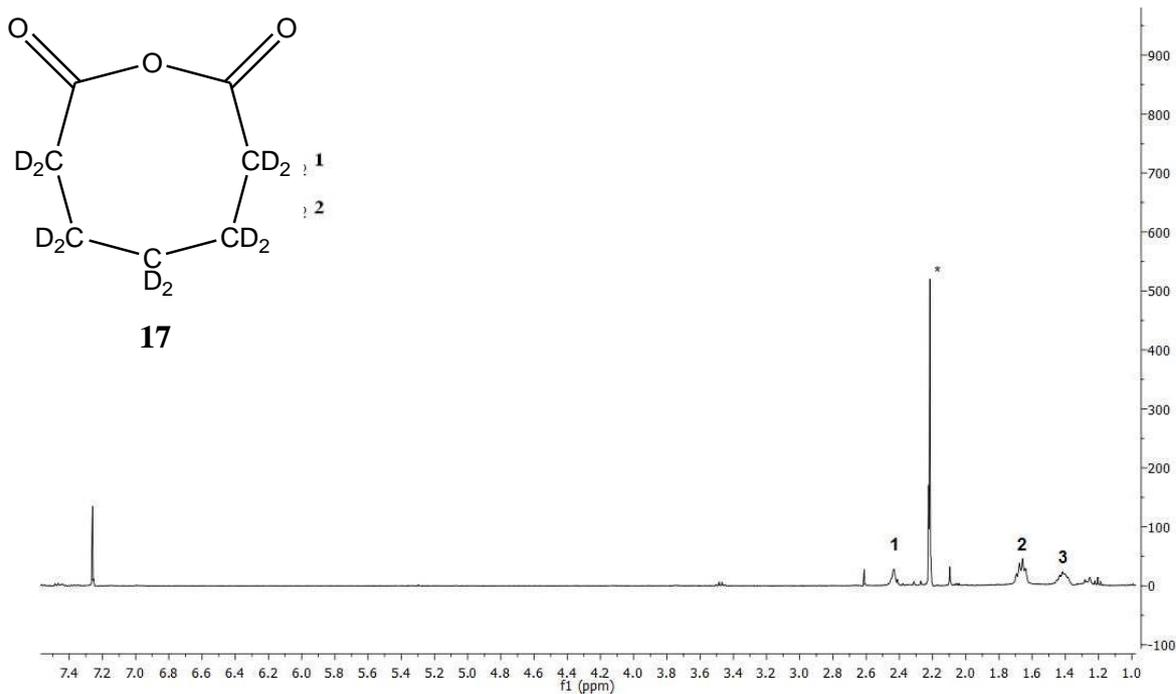
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)

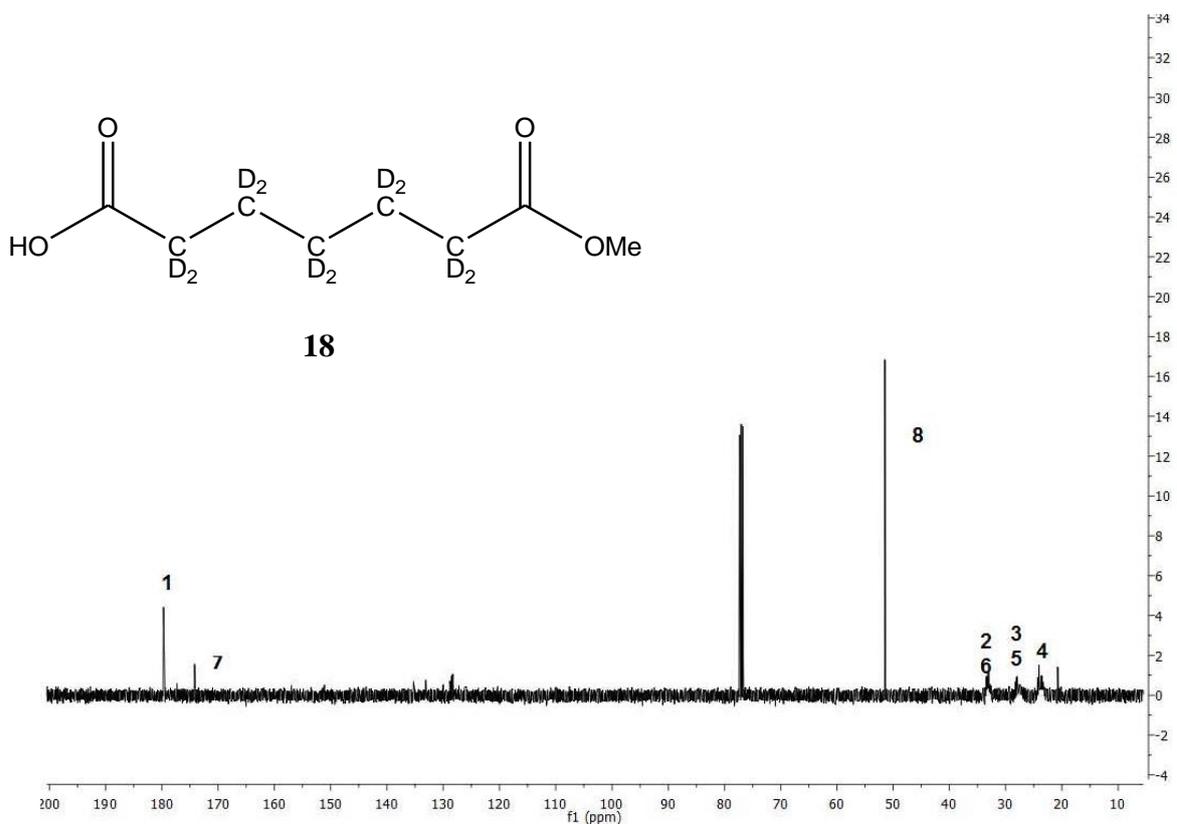
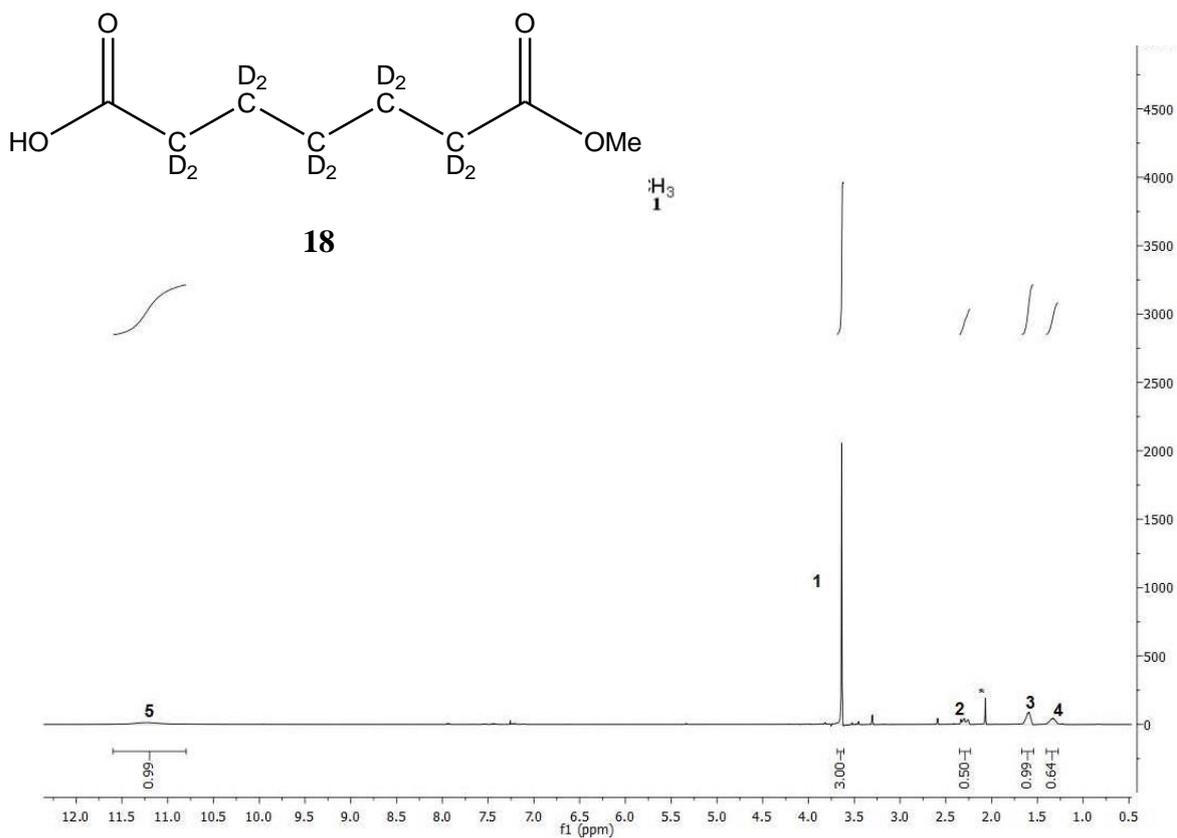


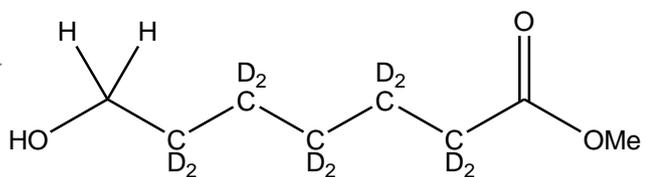
1.4. 16:1n-9 deuterado



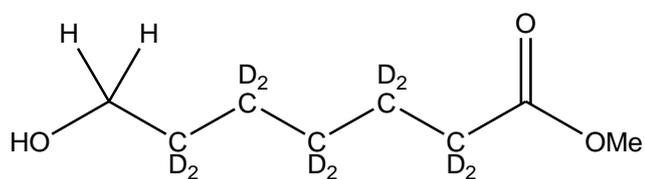
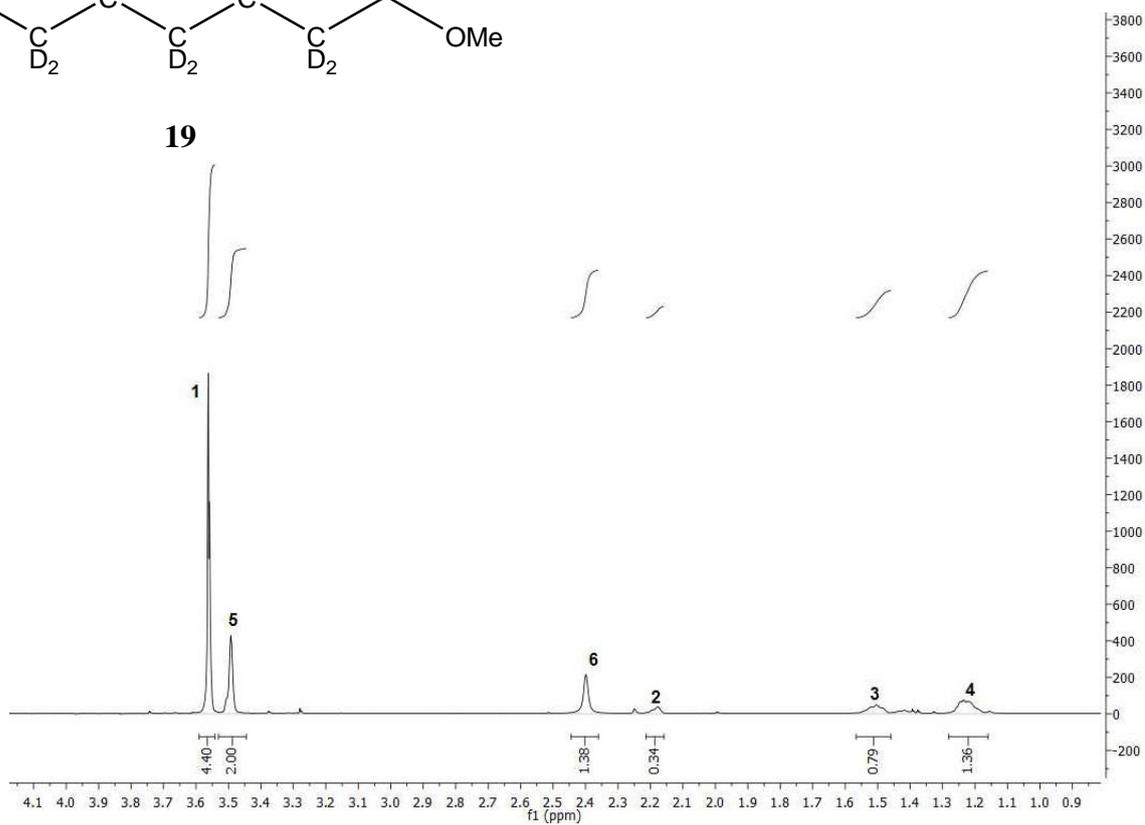
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)



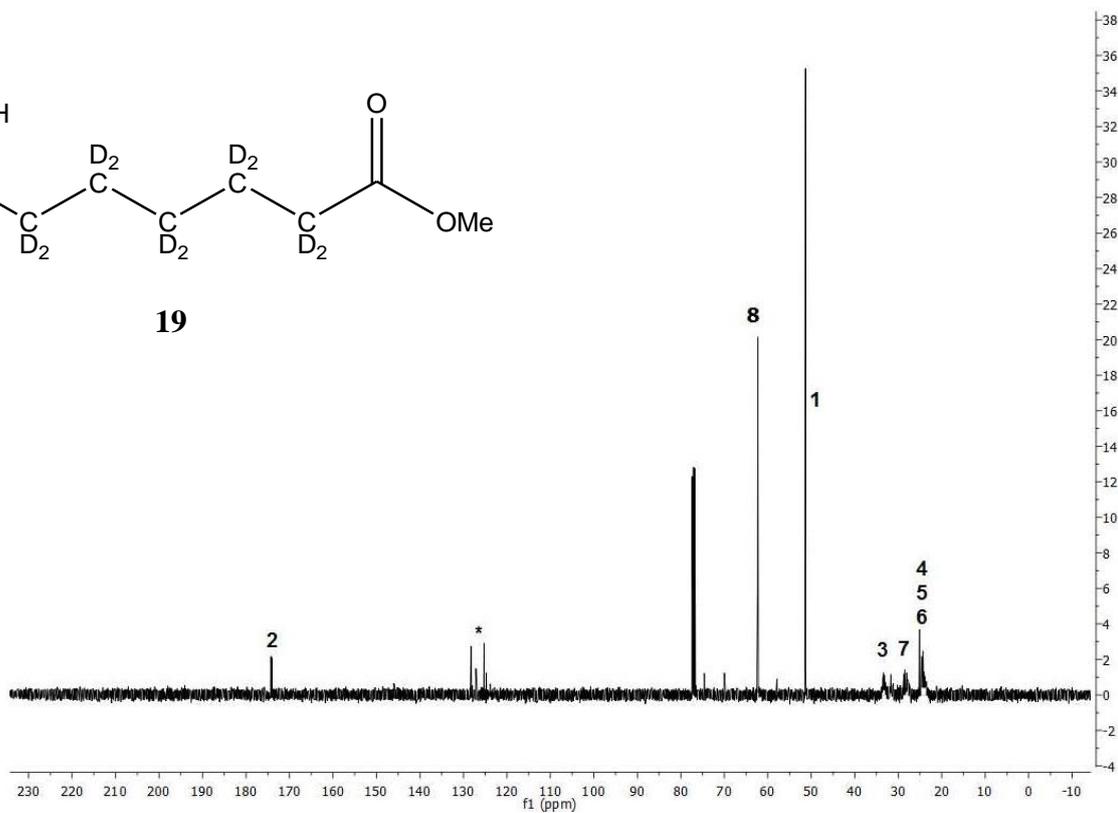


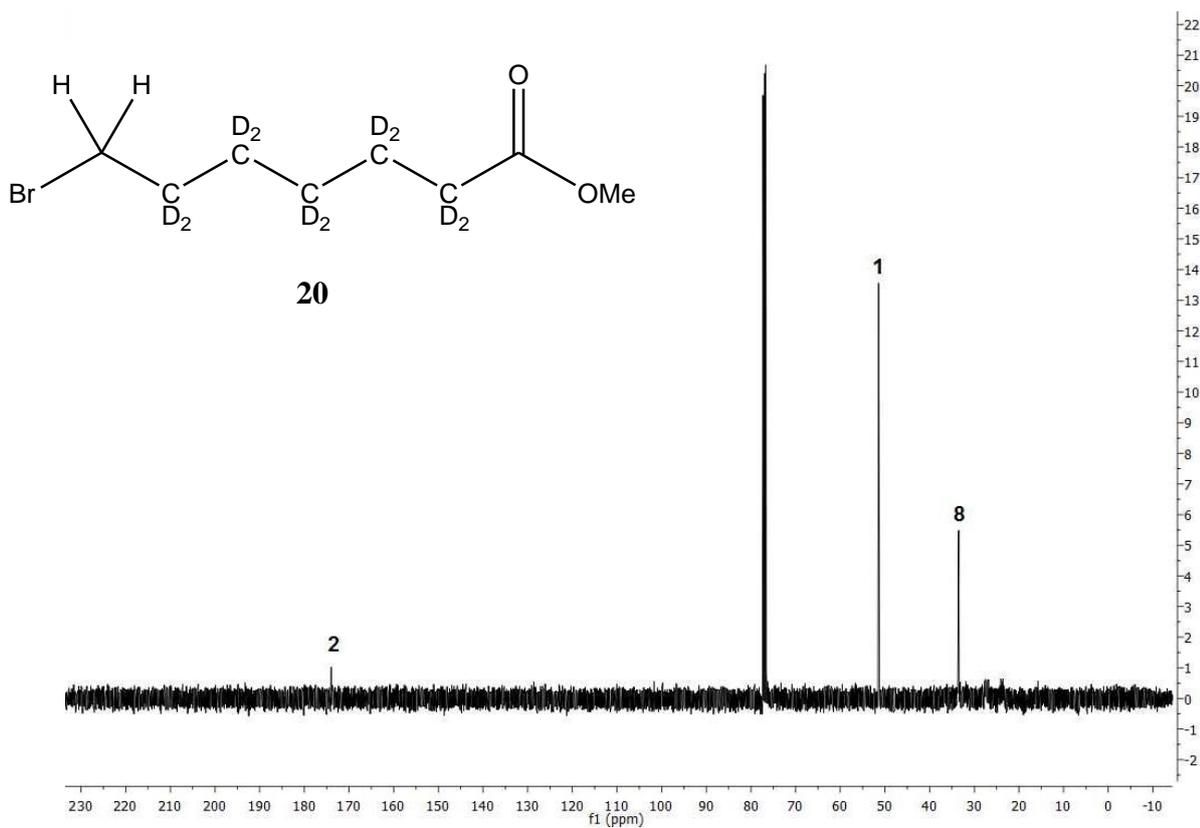
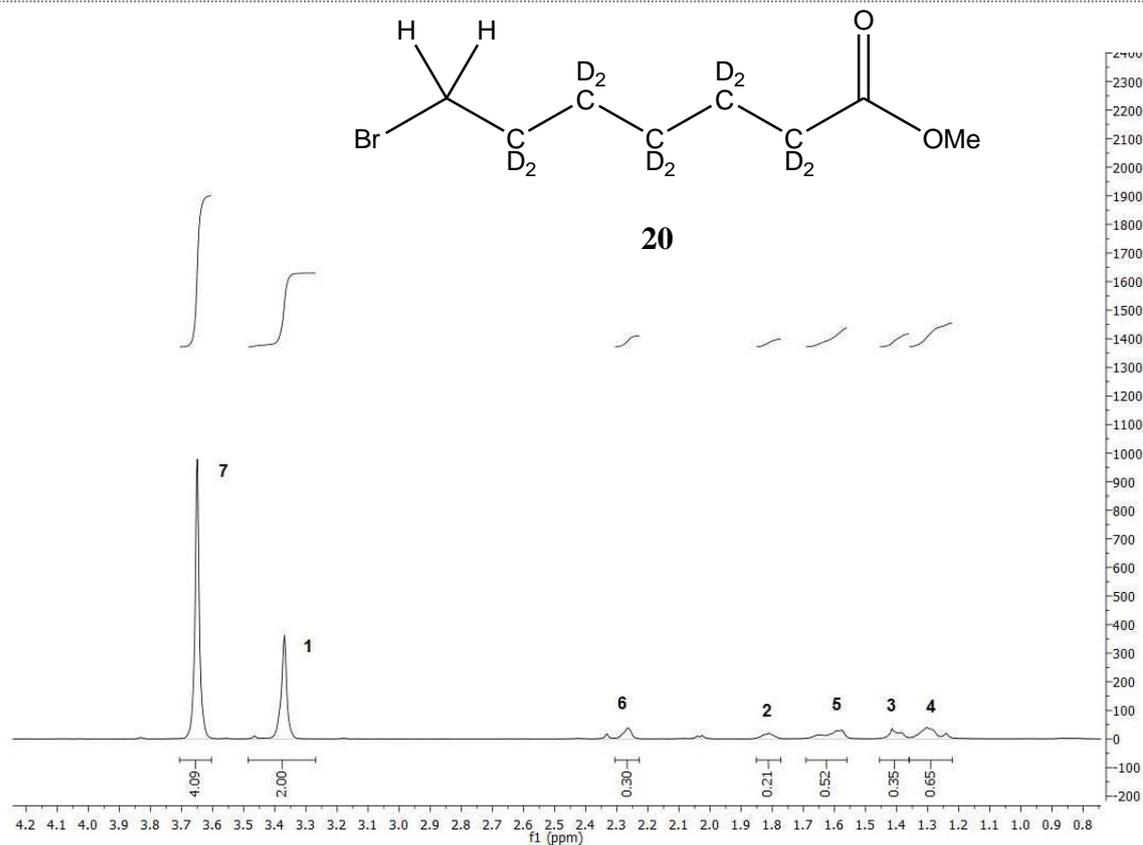


19

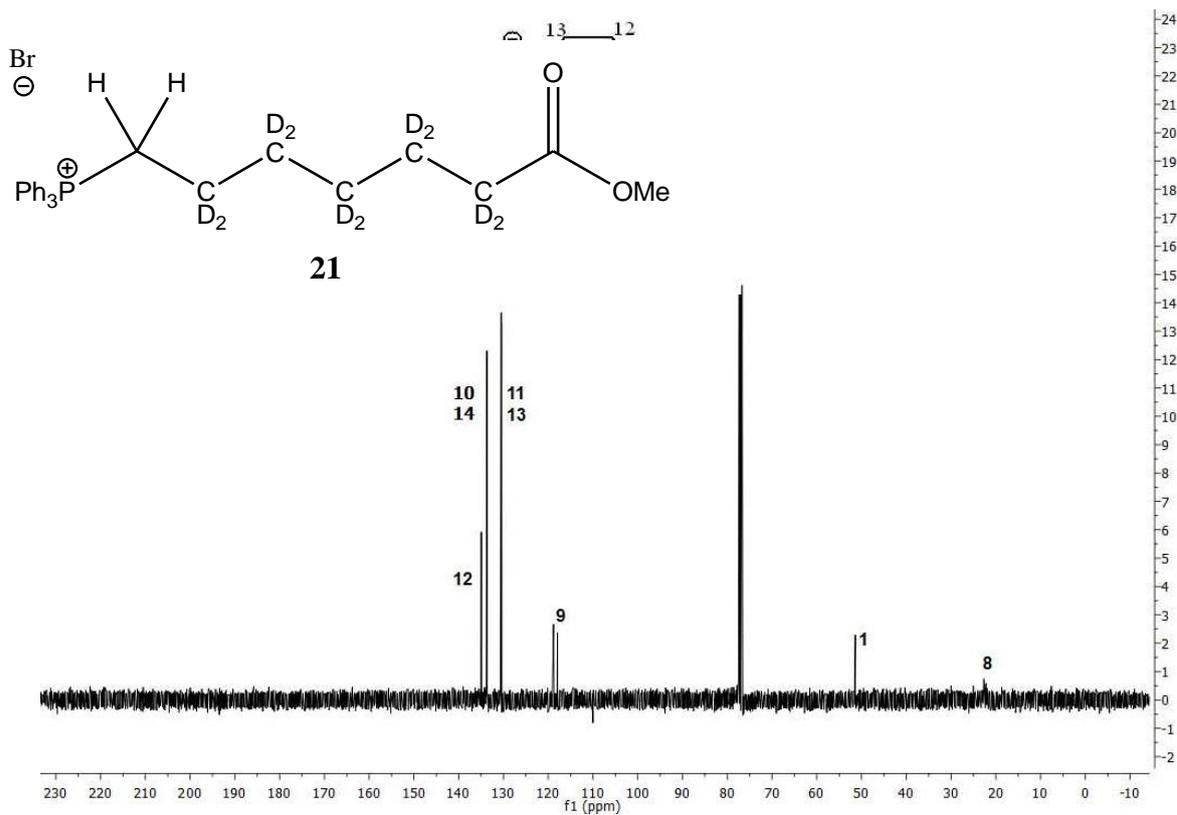
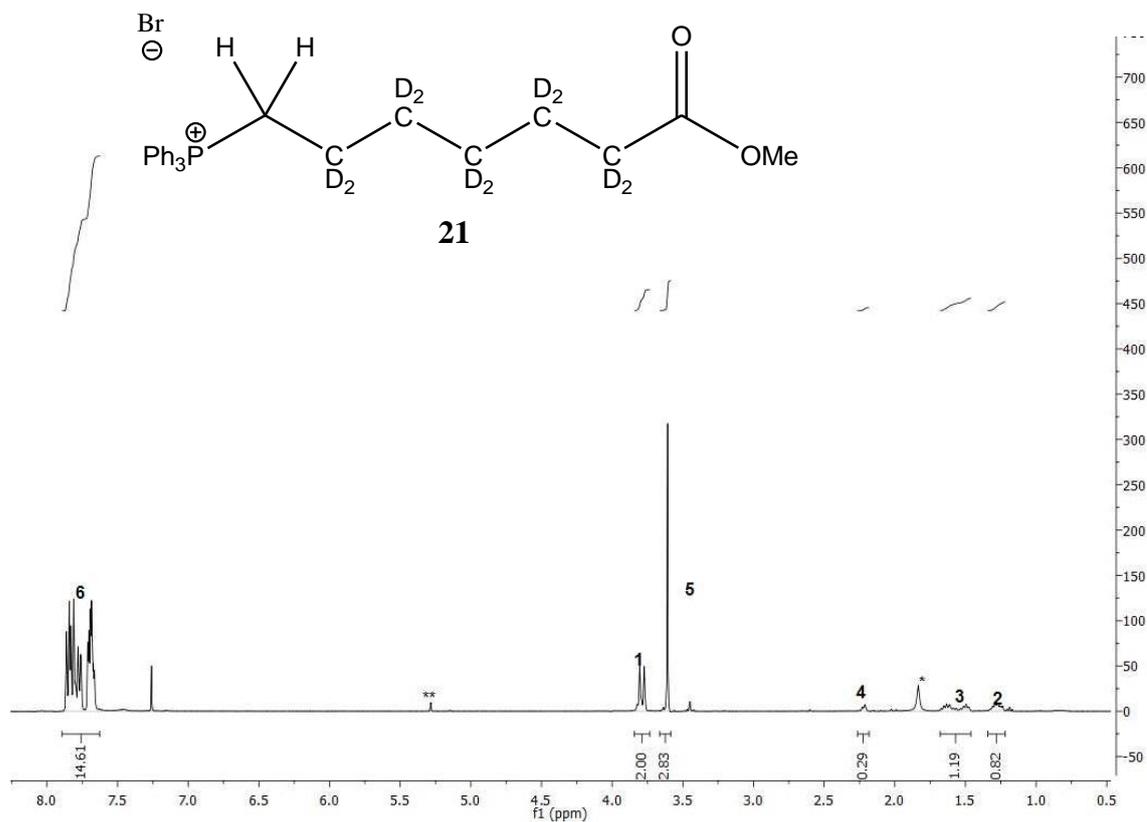


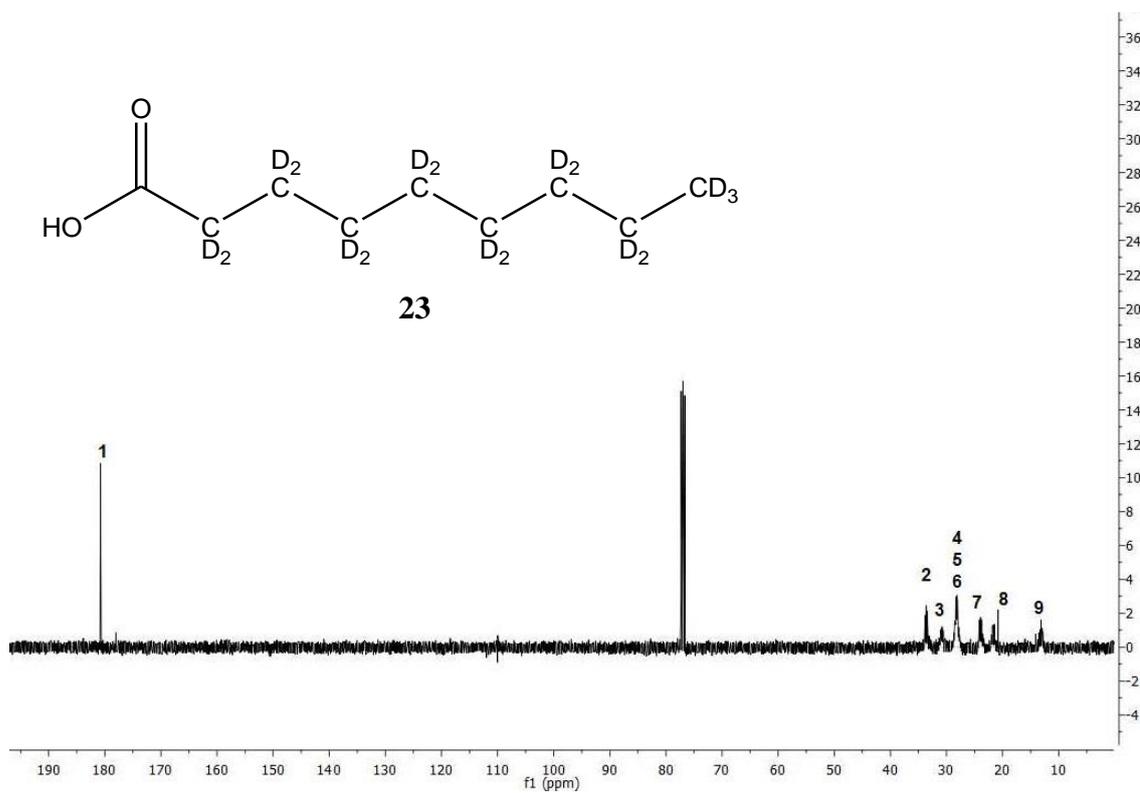
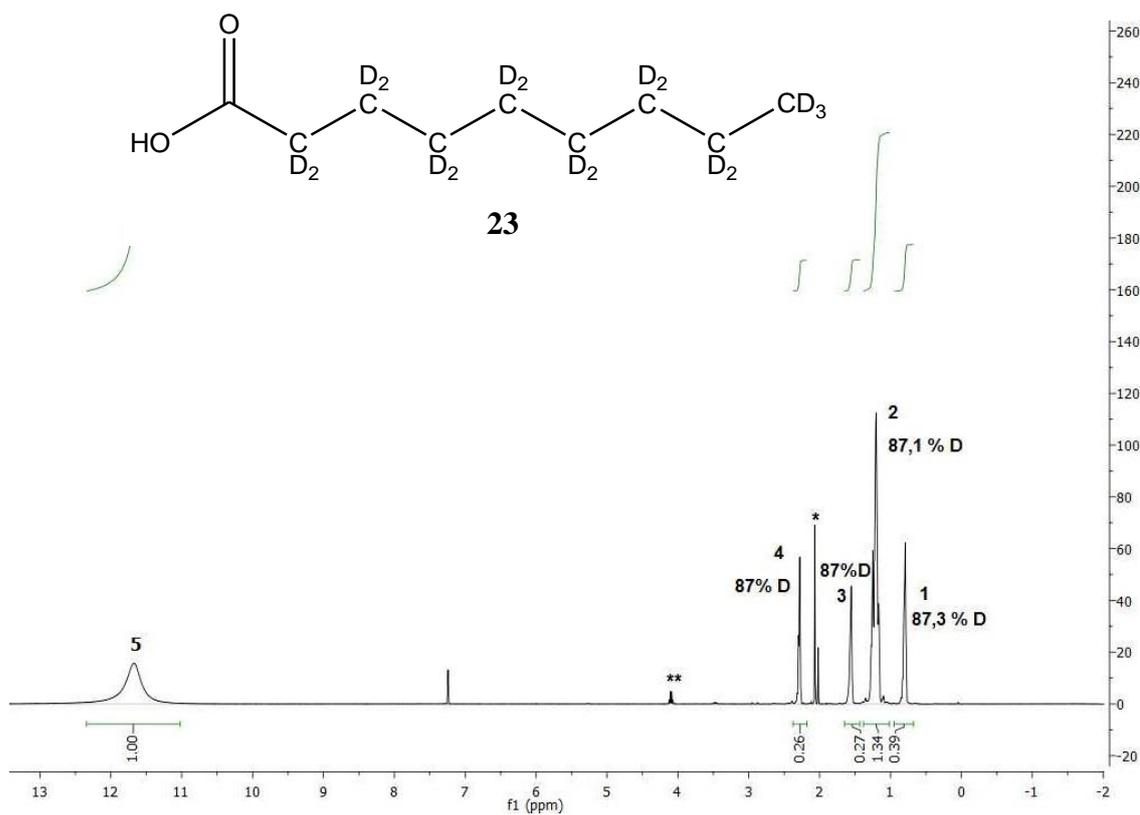
19

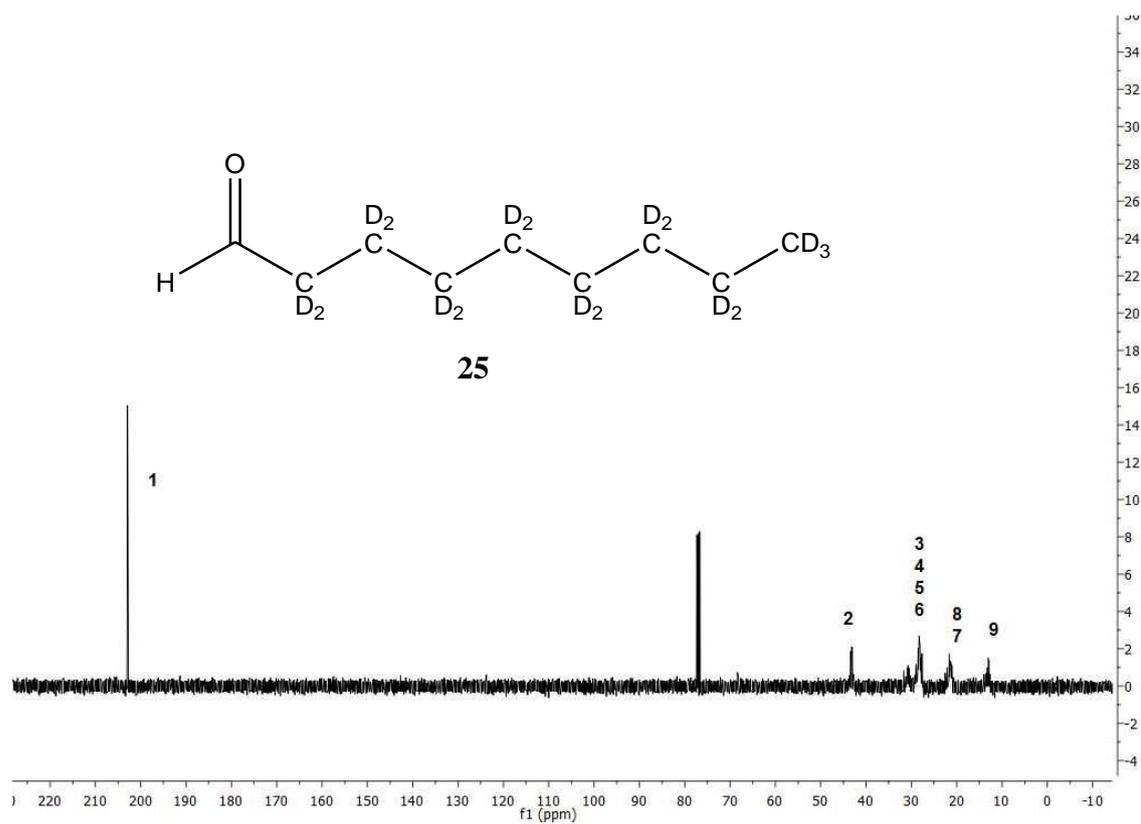
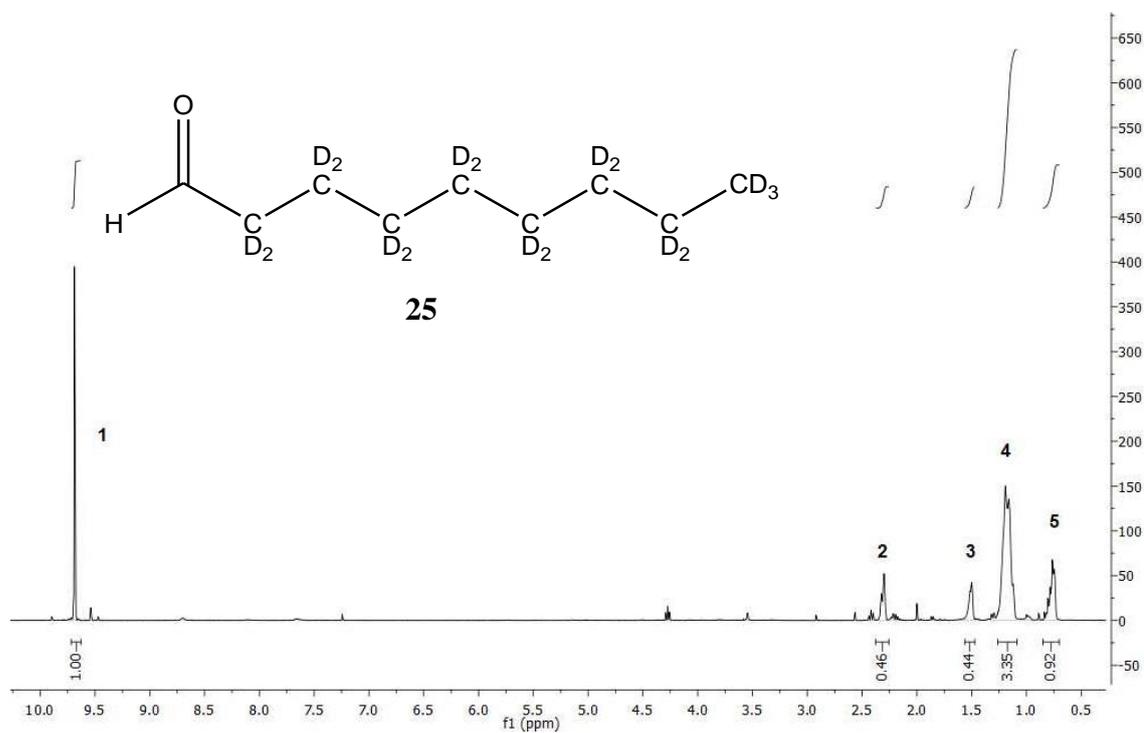




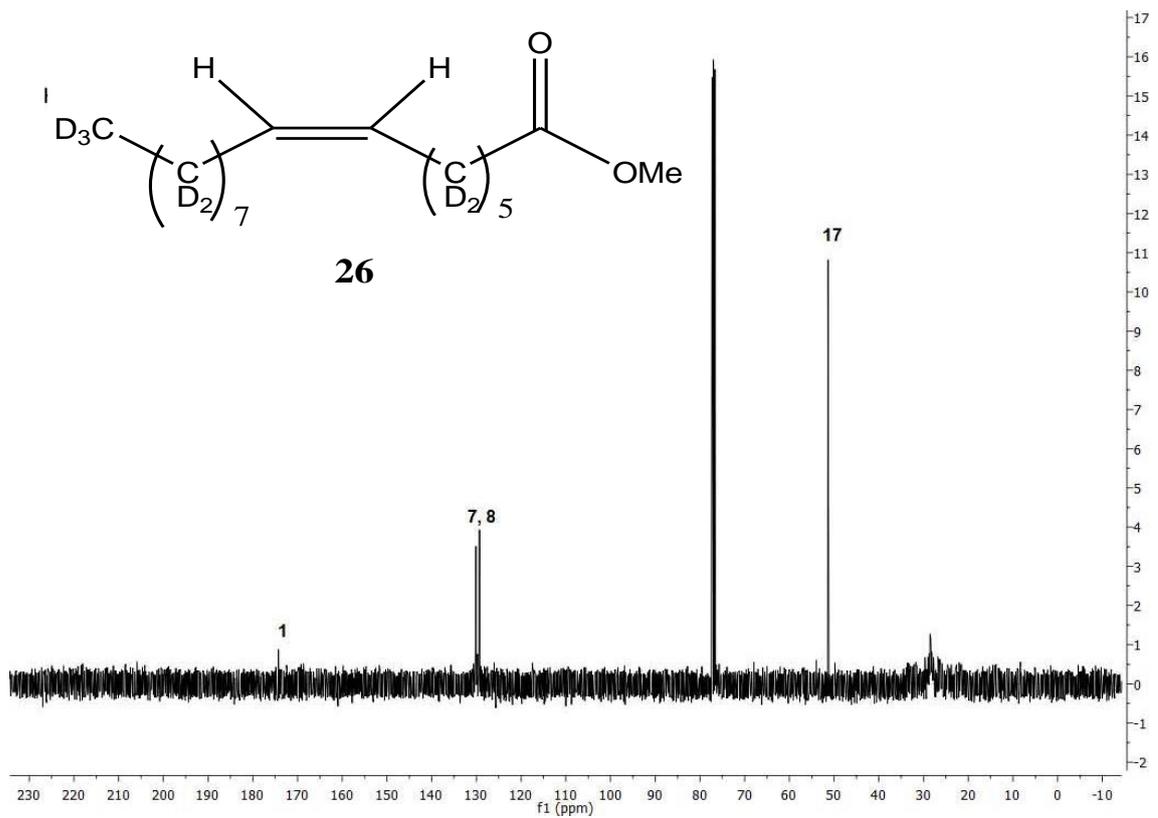
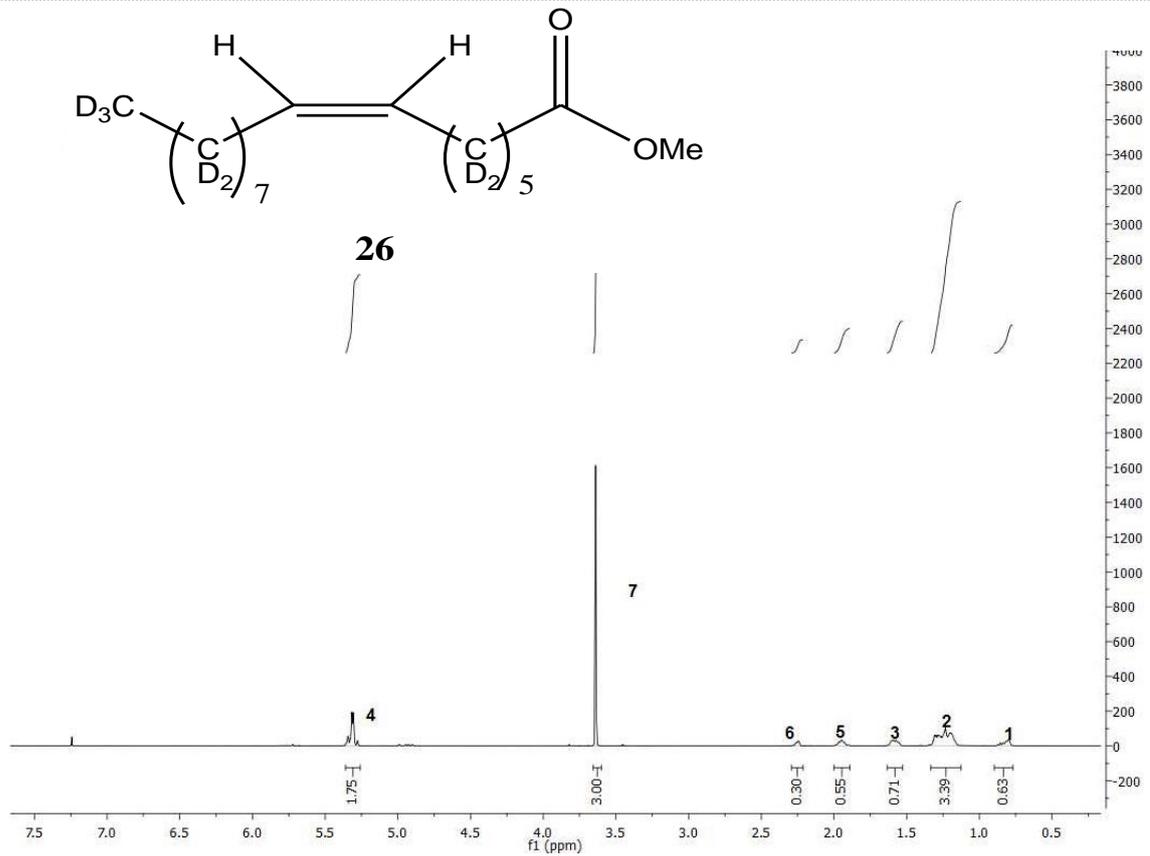
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)

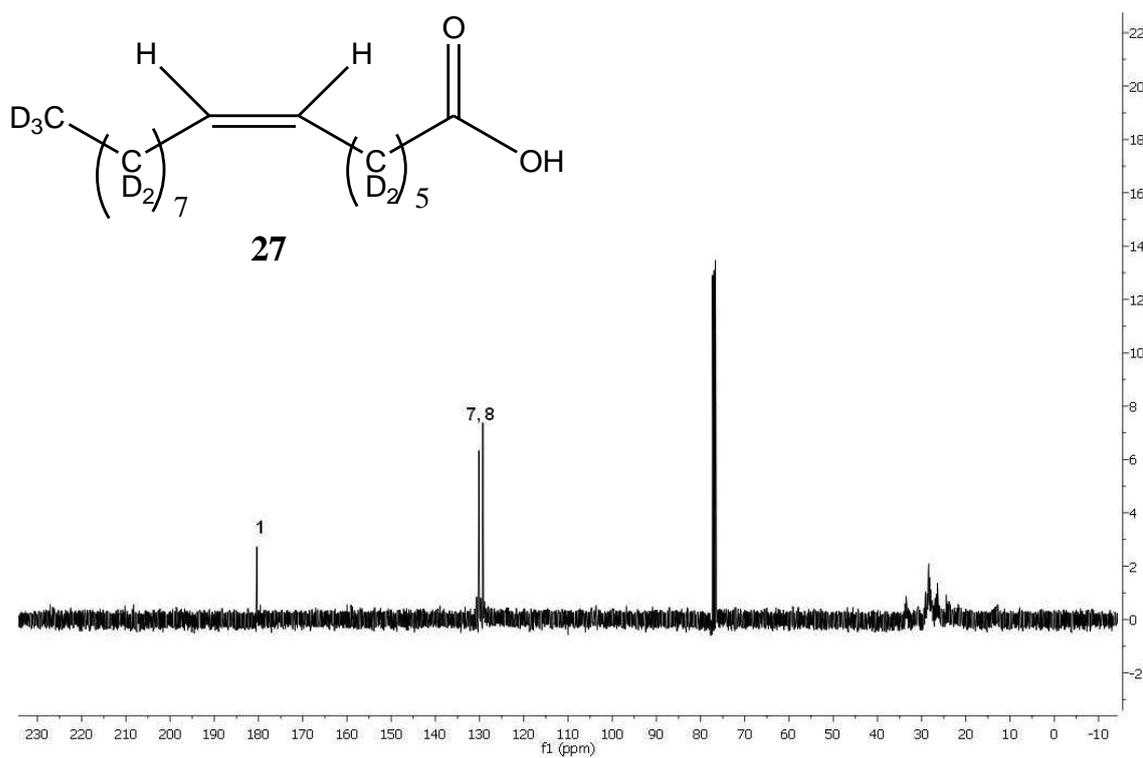
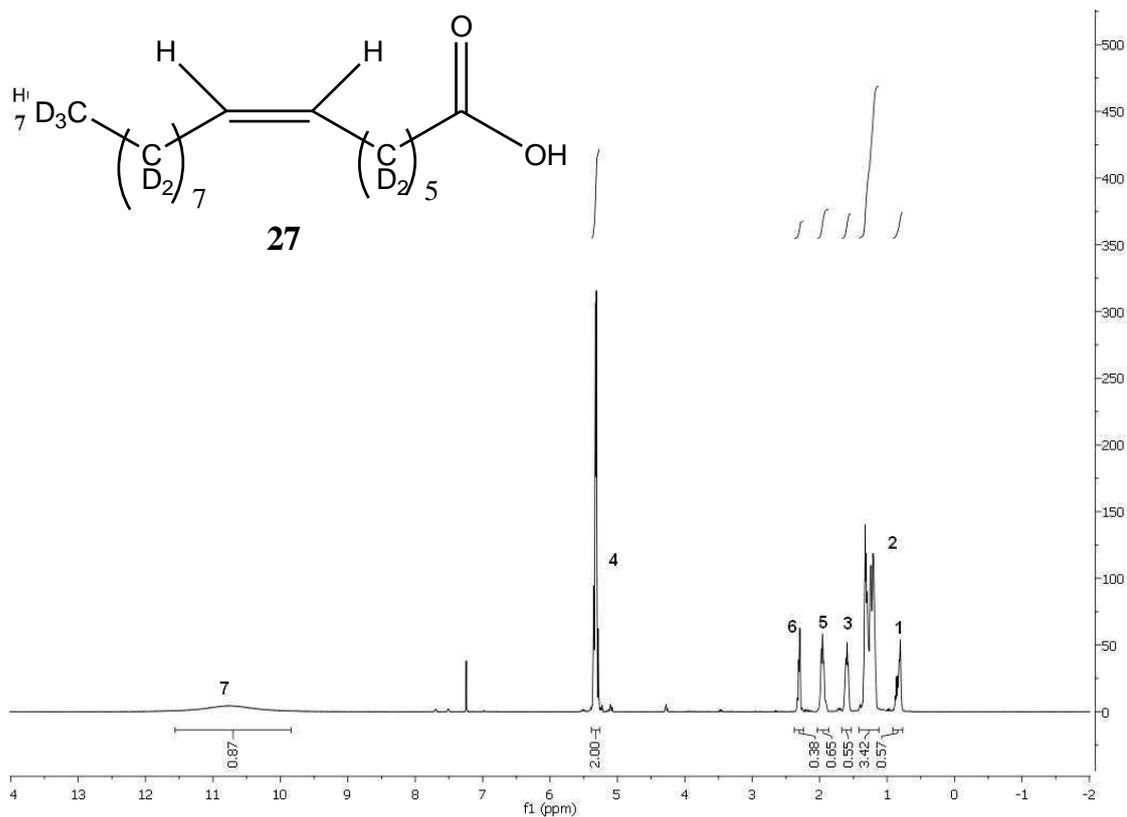




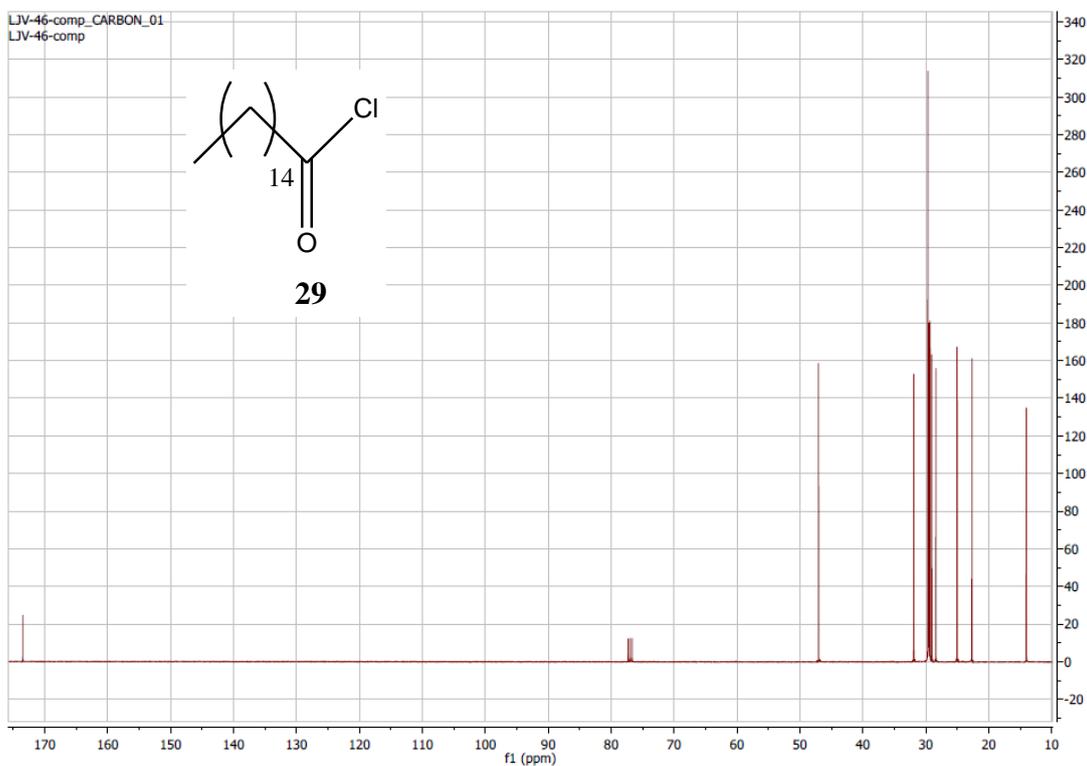
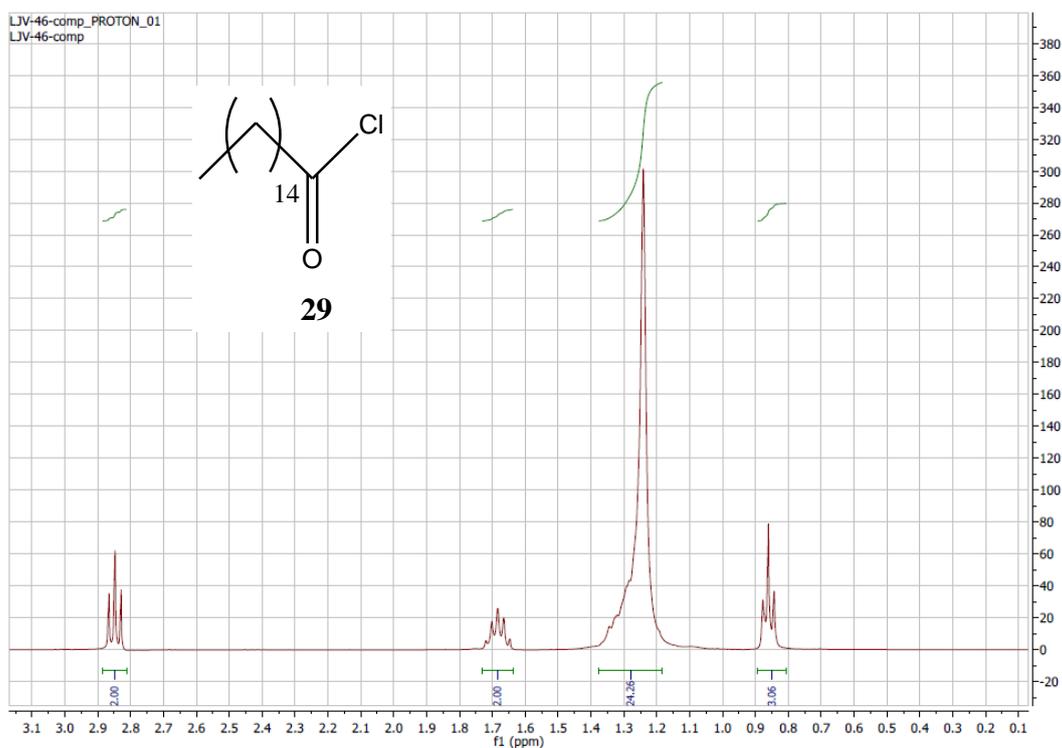


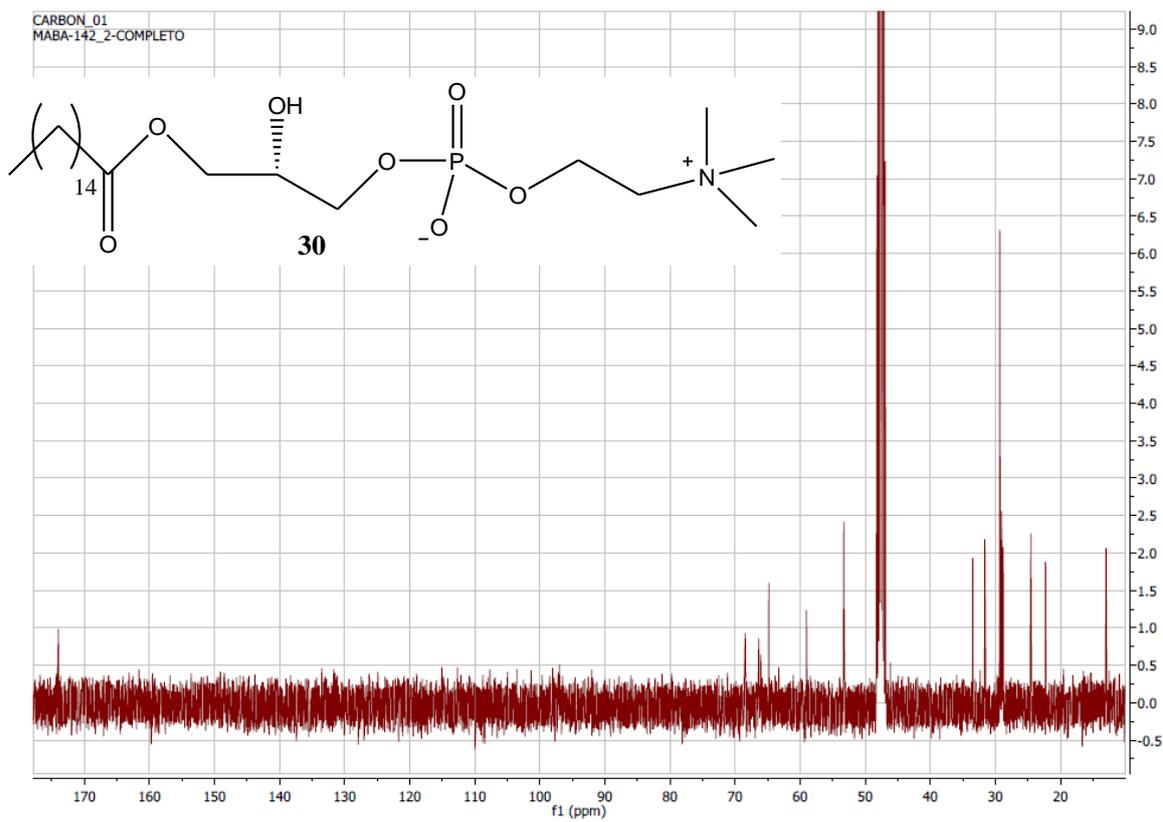
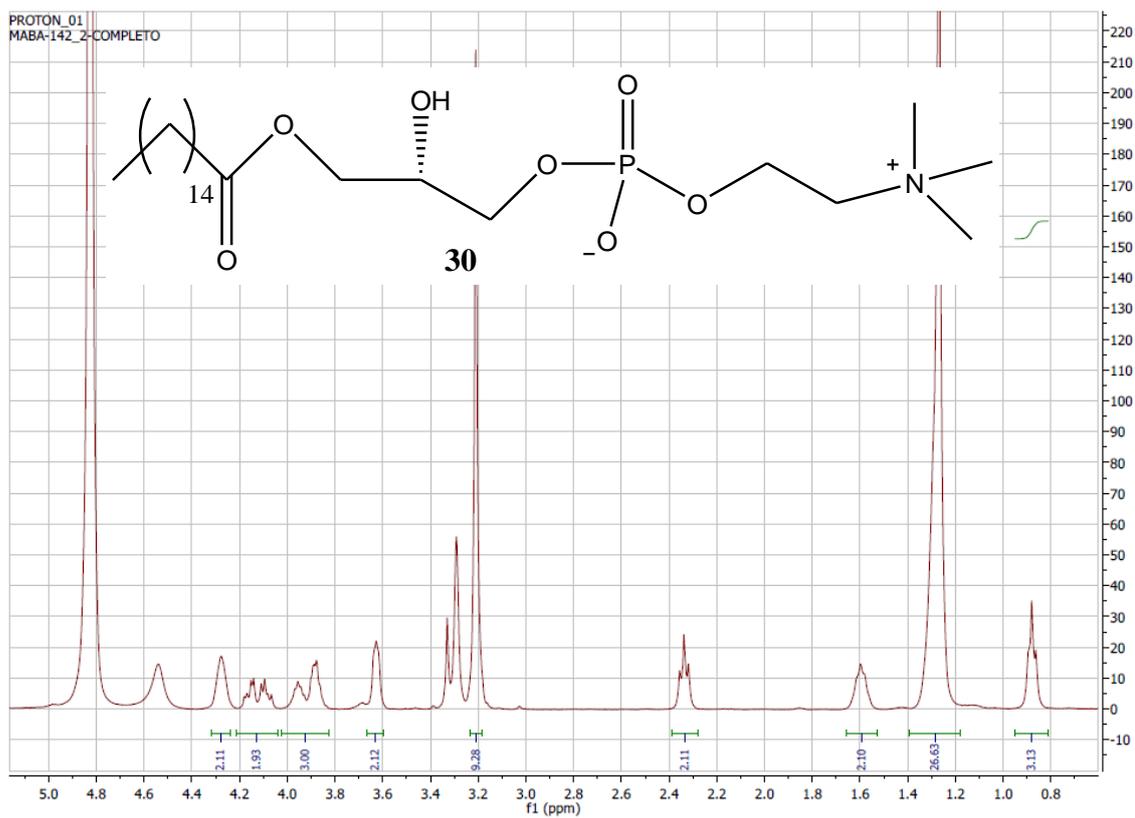
1. Síntesis de los ácidos grasos (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9, [D27] 16:1n-9)





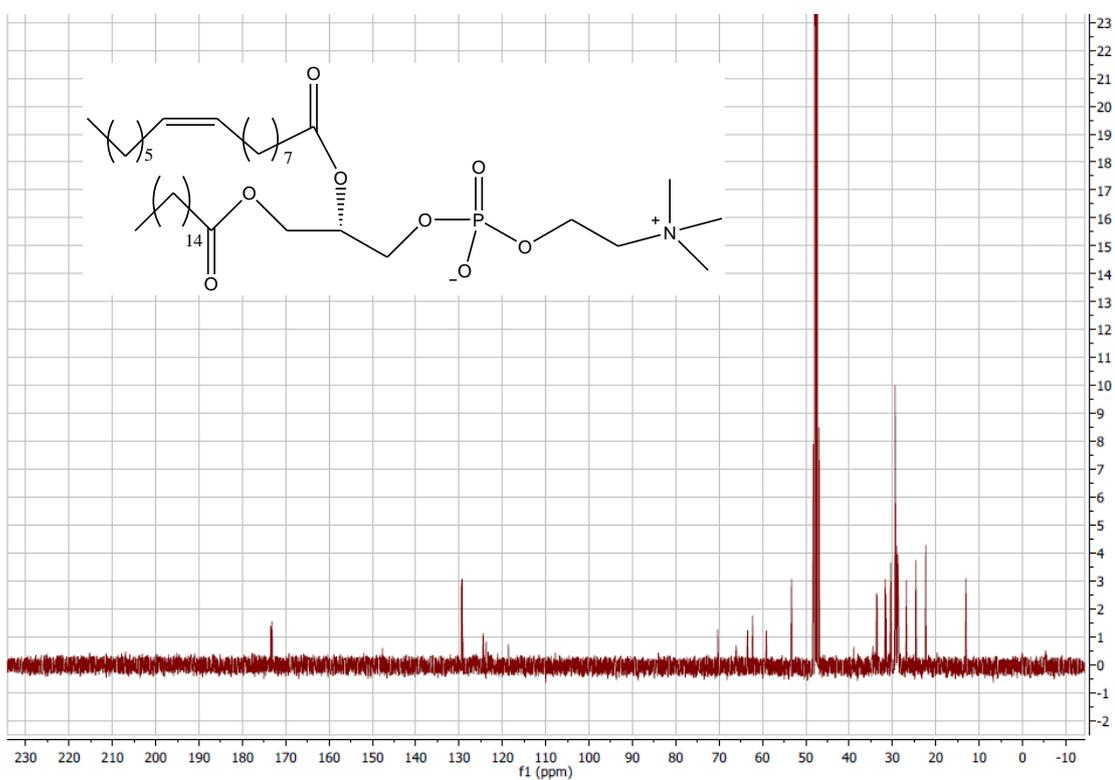
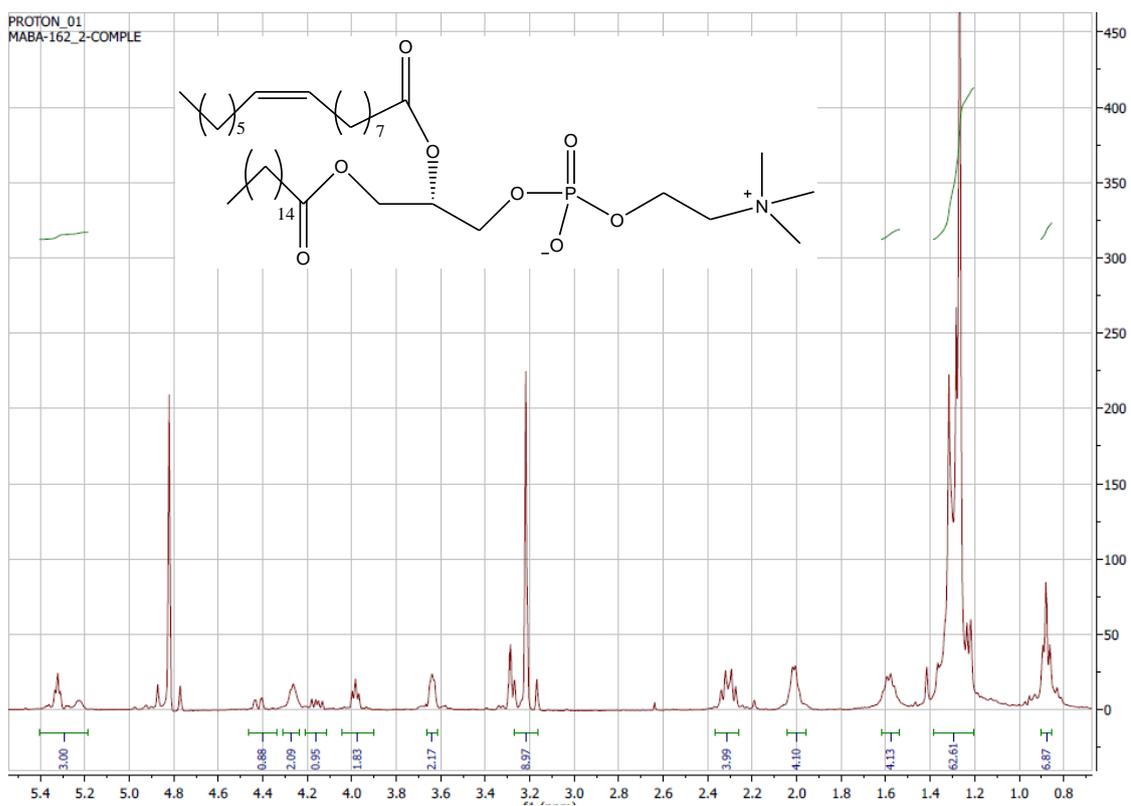
2. SÍNTESIS DE LOS ISÓMEROS 1-PALMITOIL-2-CIS- HEXADECENOIL-SN-GLYCERO-3-FOSFOFOLINA PC(16:0/16:1N-X). (16:1N-7, 16:1N-10, 16:1N-9)

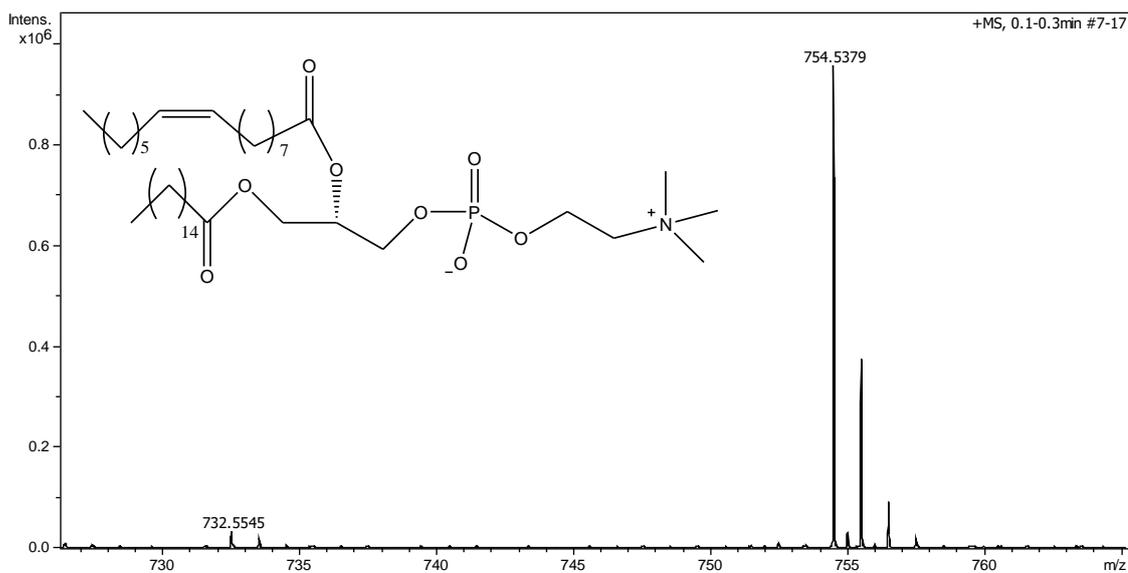




2. Síntesis de los isómeros 1-Palmitoil-2-cis-hexadecenoil-sn-glicero-3-fosfocolina PC(16:0/16:1n-x). (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9)

i. PC(16:0/16:1n-7)

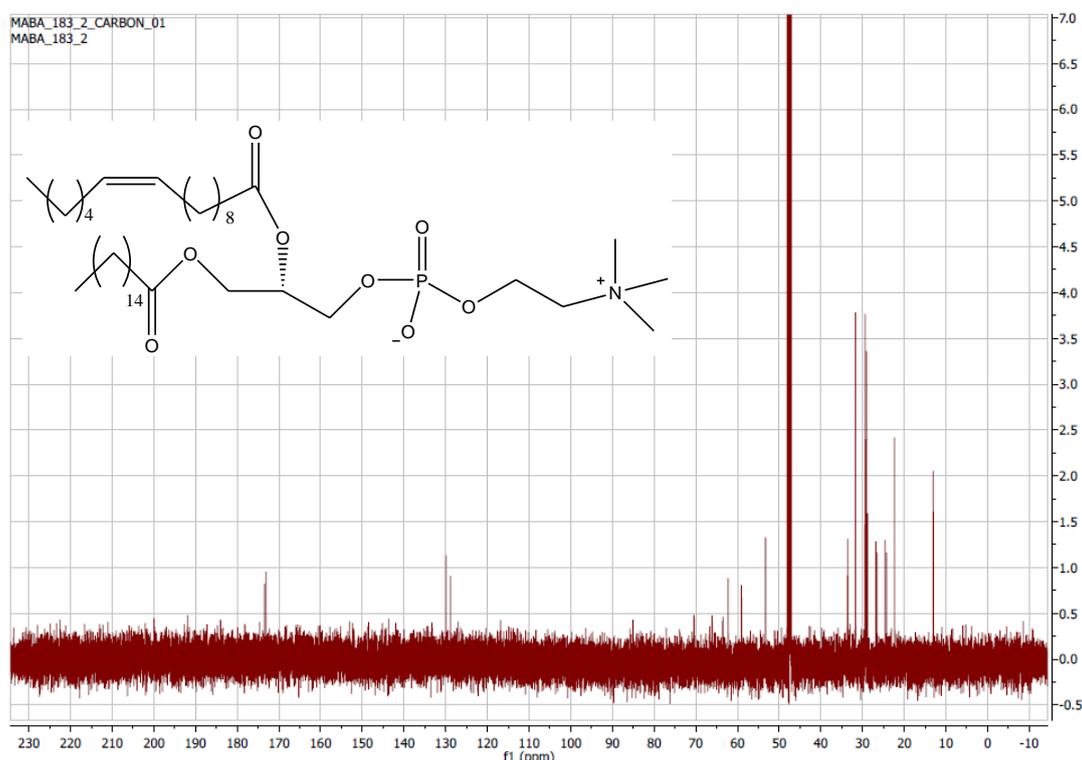
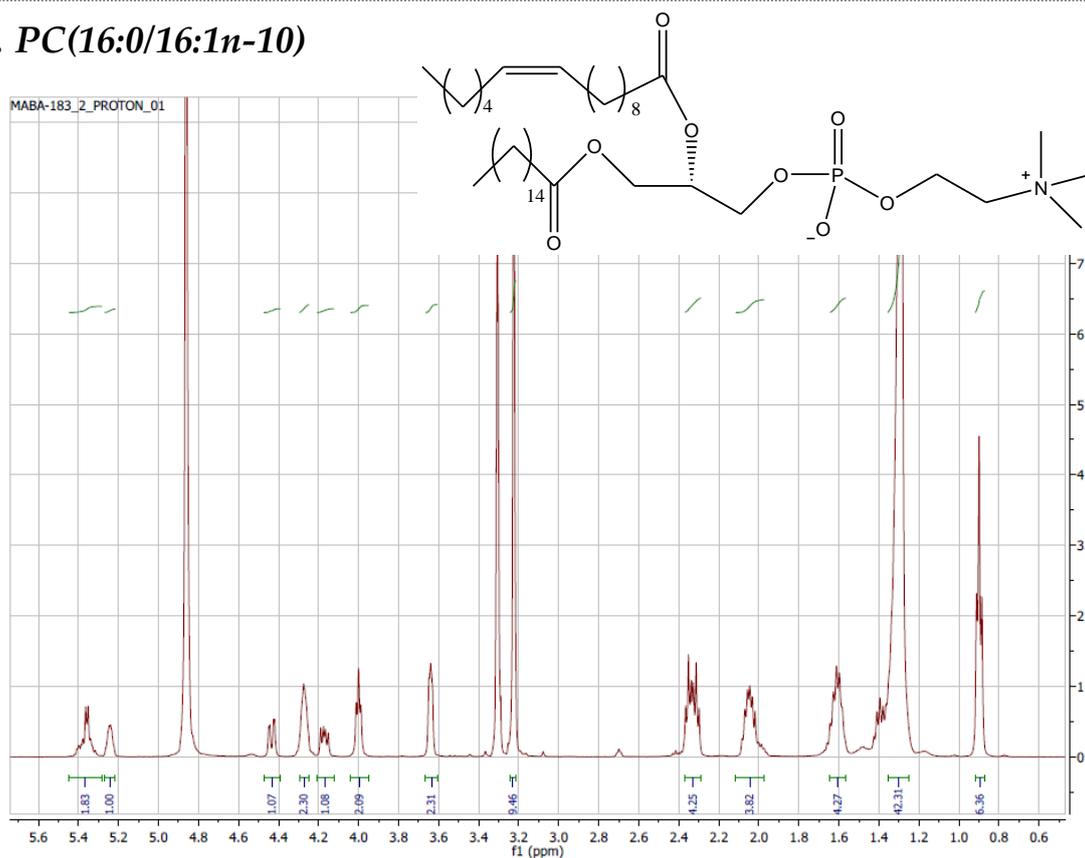


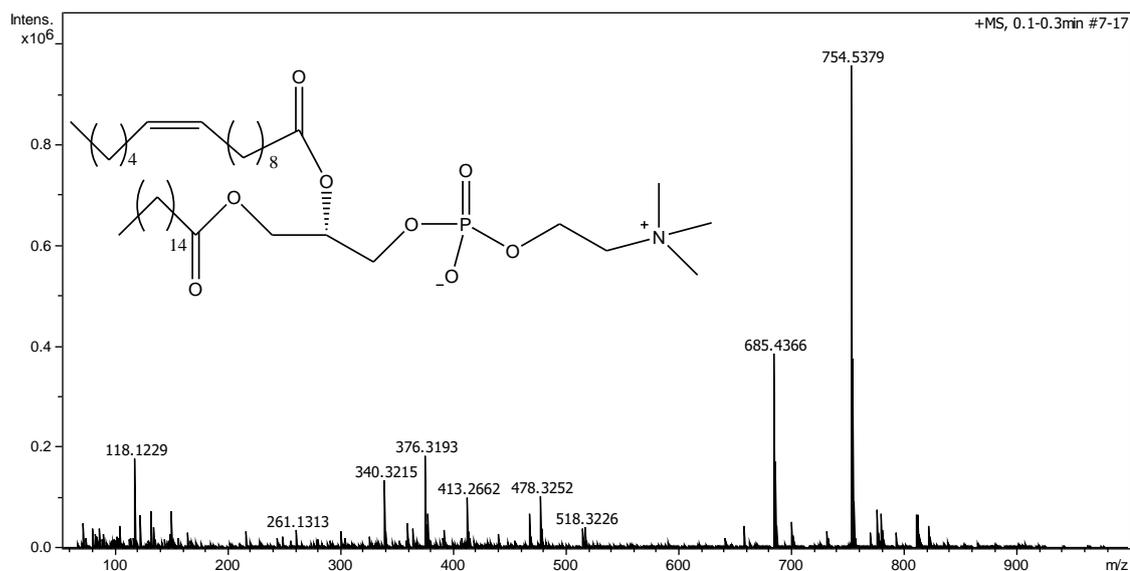


Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
732,5545	732,5538	-0.9	72.8	C ₄₀ H ₇₉ NO ₈ P
754,5379	754,5357	-2.9	29.8	C ₄₀ H ₇₈ NNaO ₈ P

2. Síntesis de los isómeros 1-Palmitoil-2-cis-hexadecenoil-sn-glycero-3-fosfocolina PC(16:0/16:1n-x). (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9)

ii. PC(16:0/16:1n-10)

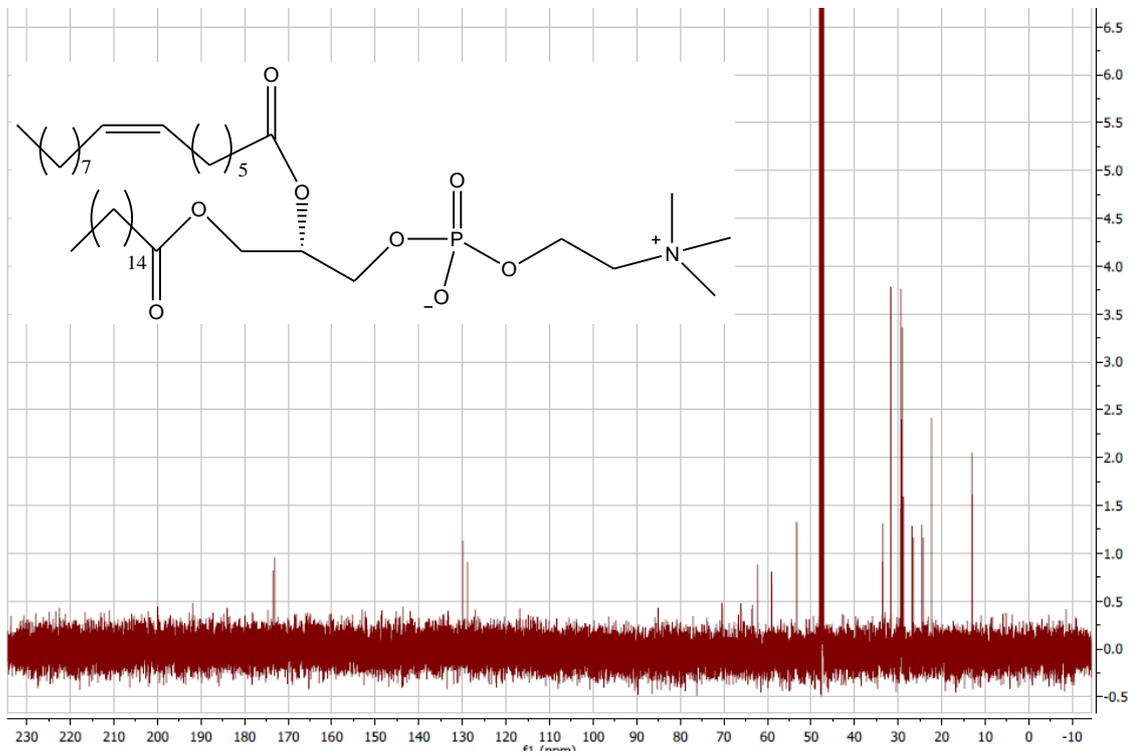
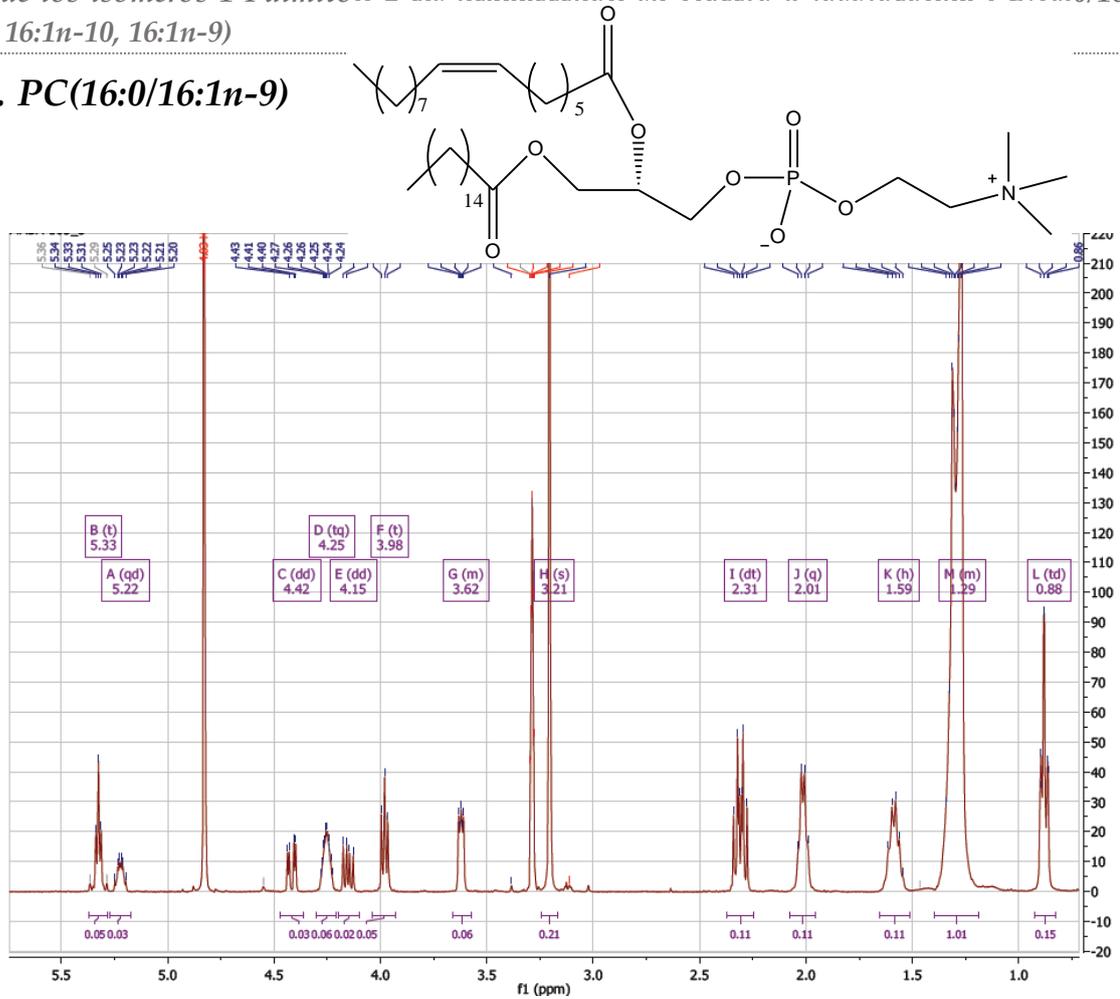


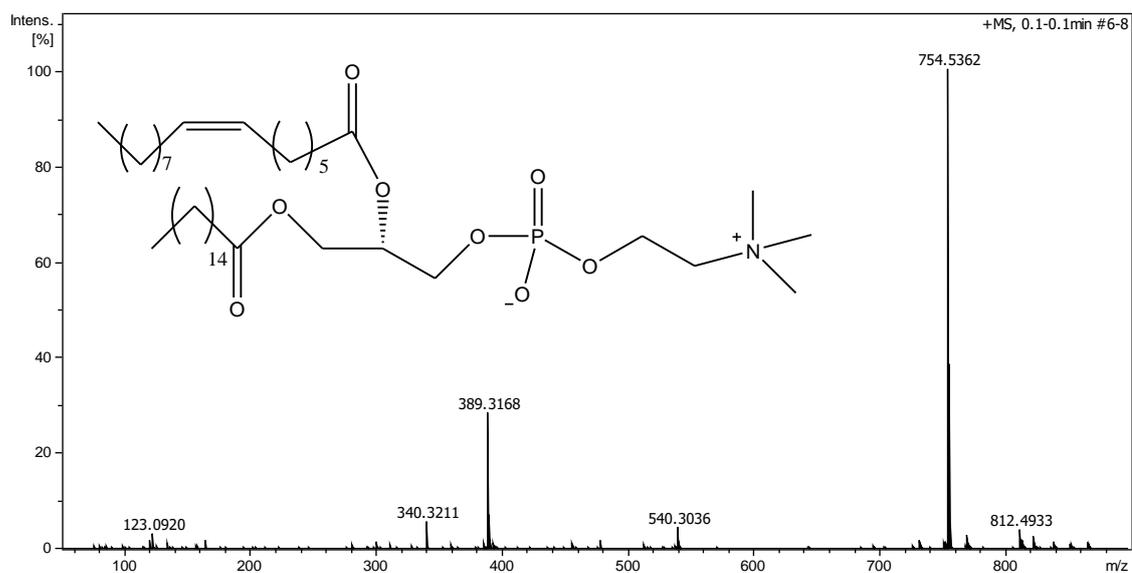


Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
754,5379	754,5362	-1.2	53.2	C40H78NNaO8P

2. Síntesis de los isómeros 1-Palmitoil-2-cis-hexadecenoil-sn-glucero-3-fosnofocolina PC(16:0/16:1n-x). (16:1n-7, 16:1n-10, 16:1n-9)

iii. PC(16:0/16:1n-9)





Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
754,5362	754,5357	-0.6	35.5	C40H78NNaO8P