



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA E INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y
GENÉTICA MOLECULAR

Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y
FISIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL:

REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS POR ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MONOCITOS HUMANOS: IMPORTANCIA DEL ÁCIDO GRASO 16:1*n*-9

Presentada por Carlos Guijas Maté para optar al
grado de doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Jesús Balsinde Rodríguez

Dra. M^a Ángeles Balboa García

Valladolid, 2016



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Universidad de Valladolid

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR

D. Jesús Balsinde Rodríguez, doctor en Ciencias Químicas y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y D^a María Ángeles Balboa García, doctora en Biología e Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR:

Que D. Carlos Guijas Maté, Licenciado en Física por la Universidad de Valladolid y Máster en Biofísica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección los estudios y experimentos necesarios para la elaboración de la memoria titulada “Regulación de la formación de gotas lipídicas por ácido araquidónico en monocitos humanos: importancia del ácido graso 16:1n-9”, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Y para que así conste, a los efectos legales, firman la presente:

Fdo: Jesús Balsinde Rodríguez

Fdo: M^a Ángeles Balboa García

En Valladolid, Enero de 2016

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Jesús Balsinde y a la Dra. M^a Ángeles Balboa la oportunidad dada, así como la confianza depositada en mí para la realización de esta tesis doctoral. Moreover, I would like to thank Dr. Robert Murphy for welcoming me in his lab during my short-stay in Denver.

Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de los compañeros de laboratorio con los que he tenido la suerte y el privilegio (no se puede expresar de otra forma) de coincidir. Alma, mi más sincera gratitud por enseñarme la poca lipidómica que sé, por tutelarme tras mi llegada y por tu ayuda con los experimentos y la corrección de textos. Lo que el ácido araquidónico ha unido, que no lo separe el hombre. Julius, esa mente inquieta que tienes es la que convierte a las personas buenas en extraordinarias. Muchas gracias por tu ayuda, pero sobre todo por tu amistad e incondicional apoyo. Sólo puedo desearte que todo te vaya genial, lo mereces. Quiero agradecer a Juan Pablo el aire nuevo que insufló al laboratorio, así como las charlas filosófico-científico-vitales de las que pudimos disfrutar, he aprendido mucho de ellas. Ya se sabe: *no calentarum largum vivirum*. Londentxu (que así es como se escribe correctamente), ¡mucho ánimo que no te queda nada! Recuerda que una playa paradisiaca de Hawai o Costa Rica con una plantación de mangos te espera cuando termines. Nunca pierdas ese espíritu aventurero que tienes. Clara Meana, quiero agradecerte tu visión crítica de las cosas, que aunque nos ha llevado a interminables discusiones, siempre es de gran ayuda a la hora de hacerse numerosas preguntas para seguir avanzando. Luci P, aunque ya hace tiempo que te fuiste, sigo teniendo muy presentes tus consejos sobre moda y a Dior pongo por testigo que no volveré a juntar naranja y rojo. Suerte en tu nueva etapa. También quiero agradecer a Montse y Yolanda su ayuda y profesionalidad siempre que lo he necesitado. No me olvido de dar las gracias a la gente que estaba en el laboratorio cuando llegué por su paciencia conmigo y a la savia nueva, más algún viejo rockero, que ha llegado. ¡Suerte con vuestras tesis! Finalmente, aunque fue la persona con quien menos tiempo coincidí en el laboratorio, quiero agradecer a Lorena su ayuda en el cuarto de cultivos, su disponibilidad a dejarse enseñar y en la actualidad, su apoyo y comprensión fuera del laboratorio. Afortunadamente, esos 3 meses eran todo lo que necesitábamos.

No quiero olvidarme de toda la gente que está o ha estado en la tercera planta del IBGM y que ha dado un toque de alegría y locura a mi estancia. Especialmente me acuerdo de los clásicos inmortales como Monty o Maribel Fernández, de los que acaban de irse y ya se echa de menos como las chicas de Andrés (Tamara y Ruizzz), Esther o Claudia, de quién continúa como Bea y de la jefa *de facto* de la tercera planta, que es esa SA que podría

protagonizar el próximo anuncio de Duracell. Además, alguna rara vez me ha dado por bajar a otras plantas, lo que me ha permitido conocer a Laura, infatigable compañera de viajes y punky reprimida, y a María, a la que deseo la mayor de las suertes en su aventura americana. Los picnics, pincho-caña, cenas y, sobre todo, post-cenas quedan en el recuerdo.

También me gustaría volver al lugar donde empezó mi contacto con la investigación para agradecer a mis compañeros de máster los grandes ratos de diversión, cubaneo y, de vez en cuando, ciencia, que tuvimos. Especialmente a mi fiel escudero y amigo Sergín por haberme mostrado todos los secretos de la capital, así como a usar una pipeta por primera vez.

Quiero agradecer a toda la gente del laboratorio del Dr Murphy su acogida en USA, que me hizo sentir como en casa a pesar de estar a miles de kilómetros. Me gustaría hacer especial hincapié en el Dr. Miguel Gijón, que me recibió como si fuese un miembro más de su familia y me ayudó en todo lo que estuvo en su mano. Also, I want to thank Thomas Leiker for his advice in mass spectrometry and Dr. Carlos Sorgi and Dr. Simona Zarini for all funny memories that were generated in the “latin corner”. Obrigado meu amigo, grazie. Finally, my gratitude with Dr. Sarah Martin who taught me to live like a real American, helped me in the lab with everything I needed and gave me a lift to work when it was very cold. I will never forget it.

A mis amigos de Torquemada y de la universidad agradecerles todos los inolvidables momentos vividos. Estando con vosotros no suele faltar una buena dosis de buen rollo, sarcasmo y humor del bueno. Particularmente me acuerdo de Muel, Niel e Ivano, y aunque cambie vuestros nombres, os aprecio mucho y valoro enormemente vuestra amistad.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, y especialmente al núcleo fundamental de ella, mis padres, Andrés y Lola, su apoyo, comprensión y ánimos durante los años que ha durado la tesis y su visión siempre optimista de cara al futuro.

“Por la boca entra la salud...y la enfermedad”

Karlos Arguiñano

“Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better.”

Samuel Beckett, Wordwarst Ho

FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador de la Universidad de Valladolid, en colaboración con el Banco Santander (Convocatoria del año 2012), y financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- Rutas anti-inflamatorias mediadas por lípidos que regulan la activación del inflammasoma: Papel de los ácidos grasos omega-3 (SAF2013-48201-R1).
- Estudio lipidómico de los mecanismos que gobiernan la disponibilidad y metabolismo oxidativo de ácido araquidónico en macrófagos humanos (CSI007U13).
- Estudio por espectrometría de masas del perfil lipidómico de macrófagos humanos polarizados (BFU2010-18826).
- Una aproximación de lipidómica al estudio de la respuesta inmune innata: mecanismos que gobiernan la disponibilidad y metabolismo oxidativo de ácido araquidónico en macrófagos (BFU2007-67154/BMC).
- CIBERDEM - Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CB07/08/0004).

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

El trabajo realizado durante estos años ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Pardo, V., A. Gonzalez-Rodriguez, C. Guijas, J. Balsinde, and A. M. Valverde. 2015. Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation. *J Biol Chem* 290: 11663-11677.
- Rubio, J. M., J. P. Rodriguez, L. Gil-de-Gomez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 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.
- Guijas, C., J. P. Rodriguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A₂ regulation of lipid droplet formation. *Biochim Biophys Acta* 1841: 1661-1671.
- Meana, C., L. Pena, G. Lorden, E. Esquinas, C. Guijas, M. Valdearcos, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2014. Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J Immunol* 193: 4614-4622.

- Gil-de-Gomez, L., A. M. Astudillo, C. Guijas, V. Magrioti, G. Kokotos, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 192: 752-762.
- Gil-de-Gomez, L., A. M. Astudillo, C. Meana, J. M. Rubio, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J Immunol* 190: 5169-5177.
- Guijas, C., G. Perez-Chacon, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gomez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 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.
- Guijas, C., A. M. Astudillo, L. Gil-de-Gomez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Phospholipid sources for adrenic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 1821: 1386-1393.
- Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gomez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J Immunol* 186: 6004-6013.
- Astudillo, A. M., G. Perez-Chacon, D. Balgoma, L. Gil-de-Gomez, V. Ruiperez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim Biophys Acta* 1811: 97-103.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido expuestos en las siguientes comunicaciones orales en congresos:

- *Simultaneous Activation of p38 and JNK by Arachidonic Acid Stimulates the Cytosolic Phospholipase A₂-dependent Synthesis of Lipid Droplets in Human Monocytes*. Fourth European Workshop on Lipid Mediators, París, Septiembre de 2012.
- *Regulation of lipid droplet biogenesis by arachidonic acid in human monocytes*. 4º CIBERDEM annual meeting, Val de Boí, Octubre de 2011.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	XXI
SUMMARY.....	XXVII
A. INTRODUCCIÓN.....	37
A.1. GOTAS LIPÍDICAS, MONOCITOS Y ATROSCLEROSIS	39
A.1.1. Gotas Lipídicas	39
A.1.2. Aterosclerosis, síndrome metabólico e inflamación	47
A.1.3. Papel de los monocitos circulantes en la aterosclerosis	48
A.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GOTAS LIPÍDICAS POR FOSFOLIPASAS A ₂	56
A.2.1. Fosfolipasas A ₂	56
A.2.2. Fosfolipasas A ₂ citosólicas y gotas lipídicas.....	58
A.2.3. Otras fosfolipasas A ₂ en la formación de gotas lipídicas	61
A.3. EL ÁCIDO PALMITOLEICO Y SUS ISÓMEROS	64
A.3.1. El ácido palmitoleico y su efecto en síndrome metabólico.....	66
A.3.2. El ácido palmitoleico en inflamación.....	67
A.3.3. El ácido palmitoleico formando parte de otros lípidos.....	69
A.3.4. Efectos biológicos de los isómeros del ácido palmitoleico	72
A.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	74
A.4.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	75
A.4.2. Determinación estructural de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	76
B. OBJETIVOS	81
C. MATERIALES Y MÉTODOS	85
C.1. MATERIALES	87
C.1.1. Cultivo celular	87
C.1.2. Disolventes y reactivos líquidos	87
C.1.3. Reactivos y productos sólidos.....	88
C.1.4. Gases	89
C.1.5. Estímulos	89
C.1.6. Inhibidores	89

CONTENIDOS PREVIOS

C.1.7.	Lípidos	90
C.1.8.	Inmunodetección de proteínas (Inmunoblot)	91
C.1.9.	Extracción de RNA, síntesis de cDNA, PCR y electroforesis en geles de agarosa... ..	92
C.1.10.	Microscopía de fluorescencia	93
C.1.11.	ELISA	93
C.1.12.	Tampones y soluciones.....	93
C.1.13.	Material biológico.....	95
C.2.	EQUIPAMIENTO	96
C.3.	MÉTODOS EXPERIMENTALES	100
C.3.1.	Aislamiento y cultivo de células y tejidos	100
C.3.2.	Extracción de lípidos de células y tejidos	102
C.3.3.	Separación de clases de lípidos por cromatografía en capa fina	103
C.3.4.	Derivatización de ácidos grasos y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	105
C.3.5.	Análisis de especies de fosfolípidos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo	110
C.3.6.	Inmunodetección de proteínas (inmunoblot)	113
C.3.7.	Determinación de los niveles de RNA y DNA	116
C.3.8.	Microscopía de fluorescencia	121
C.3.9.	Ensayos de radiactividad	122
C.3.10.	Otras metodologías	124
C.3.11.	Presentación de datos y análisis estadístico	125
D.	RESULTADOS	127
D.1.	REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS POR ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MONOCITOS HUMANOS.....	129
D.1.1.	El ácido araquidónico promueve la síntesis de lípidos neutros e incrementa la formación de gotas lipídicas en monocitos humanos	129
D.1.2.	El ácido araquidónico induce la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos en monocitos humanos	138
D.1.3.	El ácido araquidónico activa la expresión de genes implicados en la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos en monocitos humanos.....	143
D.1.4.	La vía de señalización del ácido araquidónico que resulta en la formación de gotas lipídicas está mediada por la activación de la cPLA ₂ α por una acción conjunta de JNK y p38.....	147
D.1.5.	El ácido araquidónico induce la síntesis de lípidos neutros en macrófagos humanos y monocitos U937	158

CONTENIDOS PREVIOS

D.1.6. Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas inducen un aumento más moderado de lípidos neutros en monocitos humanos	163
D.2. 16:1 <i>n</i> -9, UN ÁCIDO GRASO FORMADO POR LA β-OXIDACIÓN DEL ÁCIDO OLEICO, QUE SE ACUMULA EN LÍPIDOS NEUTROS.....	167
D.2.1. El isómero del ácido graso 16:1 que aumenta en lípidos neutros al estimular con AA los monocitos es 16:1 <i>n</i> -9.....	167
D.2.2. El ácido graso 16:1 <i>n</i> -9 se acumula en lípidos neutros de monocitos humanos de forma basal	180
D.2.3. El ácido graso 16:1 <i>n</i> -9 se forma a partir de la β-oxidación de ácido oleico.....	188
D.3. EL ÁCIDO GRASO 16:1 <i>n</i> -9 PRESENTA POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO EN RATÓN	201
D.3.1. El ácido graso 16:1 <i>n</i> -9 también aparece en ratón, mostrando preferencia por la acumulación en macrófagos peritoneales.....	201
D.3.2. El 16:1 <i>n</i> -9 se comporta como un ácido graso antiinflamatorio en modelos de ratón.	209
E. DISCUSIÓN.....	213
E.1. REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS POR ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MONOCITOS HUMANOS	215
E.1.1. El ácido araquidónico promueve la síntesis de lípidos neutros e incrementa la formación de gotas lipídicas en monocitos humanos.....	215
E.1.2. El ácido araquidónico induce la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos en monocitos humanos	217
E.1.3. El ácido araquidónico activa la expresión de genes implicados en la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos en monocitos humanos.....	218
E.1.4. La vía de señalización del ácido araquidónico que resulta en la formación de gotas lipídicas está mediada por la activación de la cPLA ₂ α por una acción conjunta de JNK y p38.....	225
E.1.5. El ácido araquidónico induce la síntesis de lípidos neutros en macrófagos humanos y monocitos U937	232
E.1.6. Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas inducen un aumento más moderado de lípidos neutros en monocitos humanos	233
E.1.7. Observaciones finales sobre la formación de gotas lipídicas en monocitos humanos.....	235
E.2. 16:1 <i>n</i> -9, UN ÁCIDO GRASO FORMADO POR LA β-OXIDACIÓN DEL ÁCIDO OLEICO, QUE SE ACUMULA EN LÍPIDOS NEUTROS.....	238

CONTENIDOS PREVIOS

E.2.1. El isómero del ácido graso 16:1 que aumenta en lípidos neutros al estimular con AA los monocitos es 16:1 <i>n</i> -9.....	238
E.2.2. El ácido graso 16:1 <i>n</i> -9 se acumula en lípidos neutros de monocitos humanos de forma basal	240
E.2.3. El ácido graso 16:1 <i>n</i> -9 se forma a partir de la β-oxidación de ácido oleico.....	242
E.2.4. Observaciones finales sobre el ácido graso 16:1 <i>n</i> -9	246
E.3. EL ÁCIDO GRASO 16:1<i>n</i>-9 PRESENTA POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO EN RATÓN.....	248
E.3.1. El ácido graso 16:1 <i>n</i> -9 también aparece en ratón, mostrando preferencia por la acumulación en macrófagos peritoneales.....	248
E.3.2. El 16:1 <i>n</i> -9 se comporta como un ácido graso antiinflamatorio en modelos de ratón.	249
F. CONCLUSIONS.....	253
G. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	257

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A.1. Estructura y composición de una gota lipídica	40
Figura A.2. Formación de una gota lipídica en las membranas del retículo endoplásmico liso.....	42
Figura A.3. Metabolismo lipídico y formación de gotas lipídicas	44
Figura A.4. Papel de los monocitos en el inicio de la aterosclerosis.....	50
Figura A.5. Monocitos espumosos y aterosclerosis	53
Figura A.6. Ácido araquidónico libre en focos de aterosclerosis	55
Figura A.7. Reacción de hidrólisis del ácido graso esterificado en la posición sn-2 de un glicerofosfolípido, catalizada por una fosfolipasa A ₂ (PLA ₂)	56
Figura A.8. Rutas metabólicas de formación de isómeros del ácido graso 16:1	65
Figura A.9. Esquema de un equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas equipado con una fuente de ionización por impacto electrónico y un analizador de cuadrupolo ...	77
Figura A.10. Derivados químicos de los ácidos grasos para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	79
Figura C.1. Separación de distintas clases de lípidos por cromatografía en capa fina (TLC)	104
Figura C.2. Separación de distintas clases de fosfolípidos por cromatografía de líquidos de alta resolución y espectro de masas que generan. Imagen de contorno.....	114
Figura C.3. Ejemplo de las distintas nomenclaturas de los ácidos grasos.....	126
Figura D.1. El AA induce la síntesis de triacilglicerol (TAG) y ésteres de colesterol (CE) en monocitos humanos	130
Figura D.2. El incremento de los niveles de TAG y CE por AA se debe principalmente al reclutamiento de otros ácidos grasos distintos al propio AA	131
Figura D.3. Efecto de la triacsina C en la incorporación de ácidos grasos en triacilglicerol en monocitos humanos	133
Figura D.4. El AA en períodos prolongados de incubación induce la síntesis de TAG	135
Figura D.5. Inducción de gotas lipídicas por AA y otros ácidos grasos en monocitos humanos.....	137
Figura D.6. Perfil de fosfolípidos al tratar los monocitos humanos con AA	139
Figura D.7. El aumento de los ácidos grasos celulares totales en monocitos humanos tratados con AA no se debe a una disminución de su β -oxidación.....	141
Figura D.8. Efecto del AA en la síntesis de novo de ácidos grasos en monocitos humanos	142
Figura D.9. Efecto del AA en la expresión génica de proteínas implicadas en la síntesis de novo de ácidos grasos en monocitos humanos	144
Figura D.10. Efecto de los inhibidores de enzimas de la síntesis de novo de ácidos grasos en los niveles de TAG acumulados en monocitos humanos tratados con AA	146

CONTENIDOS PREVIOS

Figura D.11. Efecto de la pirrofenona en la formación de gotas lipídicas por AA en monocitos humanos	147
Figura D.12. La cPLA ₂ α se activa por el AA exógeno en monocitos humanos.....	149
Figura D.13. El AA exógeno induce la fosforilación de la quinasas p38 y JNK en monocitos humanos	151
Figura D.14. Análisis de las quinasas implicadas en la fosforilación de la cPLA ₂ α en monocitos humanos	153
Figura D.15. Efecto de los inhibidores de las MAPK en la formación de gotas lipídicas por AA en monocitos humanos.....	155
Figura D.16. Los niveles de lípidos neutros en monocitos estimulados con AA disminuyen al impedir la activación de la cPLA ₂ α	157
Figura D.17. Contenido celular de ácidos grasos en lípidos neutros de macrófagos humanos tratados con AA	159
Figura D.18. Los niveles de TAG y CE de células U937 aumentan con tratamientos a tiempos largos de AA	161
Figura D.19. Perfil de ácidos grasos en células U937 tratadas con AA durante 24 horas	162
Figura D.20. Perfil de ácidos grasos en fosfolípidos de monocitos humanos tratados con LDL oxidada.....	164
Figura D.21. Perfil de ácidos grasos en lípidos neutros de monocitos humanos tratados con LDL oxidada.....	166
Figura D.22. Separación cromatográfica de 3 ésteres metílicos del ácido graso 16:1 distintos, y espectro de fragmentación representativo de todos ellos	170
Figura D.23. El isómero del ácido graso 16:1 que aparece en TAG y CE de monocitos humanos coincide en tiempo de retención con los patrones de 16:1n-9 y 16:1n-10.....	172
Figura D.24. Esquema de trabajo para la determinación del isómero del ácido graso 16:1	174
Figura D.25. Espectros de fragmentación de 16:1n-10 y 16:1n-9 como derivados a 4,4,-dimetiloxazolinas de ácidos grasos	176
Figura D.26. Fragmentación del pico correspondiente al ácido graso 16:1 incógnita derivatizado a 4,4-dimetiloxazolina en monocitos humanos	178
Figura D.27. Valores totales de isómeros del ácido graso 16:1 en monocitos humanos en estado basal.....	181
Figura D.28. Distribución comparativa de isómeros del ácido graso 16:1 en monocitos humanos basales	183
Figura D.29. Incorporación de los ácidos grasos 16:1n-9 y 16:1n-7 en las principales clases de lípidos en monocitos humanos.....	184

CONTENIDOS PREVIOS

Figura D.30. Incorporación de los ácidos grasos 16:1n-9 y 16:1n-7 en las principales clases de fosfolípidos en monocitos humanos.....	186
Figura D.31. La suplementación de los monocitos humanos con ácido oleico induce aumentos de los niveles del ácido graso 16:1n-9 en lípidos totales	189
Figura D.32. Espectros de fragmentación del ácido oleico deuterado y endógeno como ésteres metílicos	191
Figura D.33. Espectro de fragmentación del ácido graso [² H]-16:1n-9 como ester metílico en monocitos humanos	194
Figura D.34. Incorporación del ácido graso [² H]-18:1n-9 y su derivado [² H]-16:1n-9 en las distintas clases de lípidos en monocitos humanos.....	196
Figura D.35. El etomoxir inhibe la formación del ácido graso 16:1n-9 a partir de ácido oleico en monocitos humanos	198
Figura D.36. Efecto del AA en la β-oxidación del ácido graso [² H]-18:1n-9 a [² H]-16:1n-9 en monocitos humanos	200
Figura D.37. Los macrófagos peritoneales de ratón presentan el ácido graso 16:1n-9.....	202
Figura D.38. Niveles totales de los isómeros del ácido graso 16:1 en distintas células, órganos y tejidos de ratón	205
Figura D.39. Niveles de los isómeros del ácido graso 16:1 en distintas células, órganos y tejidos de ratón por clase de lípido.....	207
Figura D.40. Distribución de los isómeros del ácido graso 16:1 en macrófagos peritoneales de ratón	208
Figura D.41. Efecto de la preincubación con distintos ácidos grasos en la expresión génica de moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales de ratón	210
Figura D.42. Efecto del enriquecimiento con distintos ácidos grasos en la expresión proteica de la interleuquina 6 en suero de ratón	212
Figura E.1. El AA estimula la síntesis de novo de ácidos grasos.....	221
Figura E.2. Destinos metabólicos de los ácidos grasos de cadena larga	224
Figura E.3. Rutas metabólicas sugeridas de activación de la cPLA ₂ α en la síntesis de gotas lipídicas.	227
Figura E.4. Mecanismos por los cuales la cPLA ₂ α podría regular la biosíntesis de gotas lipídicas.	231
Figura E.5. Posibles mecanismos de síntesis del ácido graso 16:1n-9.....	244

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla A.1. Clasificación, características e implicación de las PLA ₂ citosólicas dependientes de Ca ²⁺ (cPLA ₂) en la formación de gotas lipídicas	61
Tabla A.2. Clasificación, características e implicación de otras PLA ₂ distintas a las cPLA ₂ en la formación de gotas lipídicas	63
Tabla A.3. Efectos biológicos del ácido palmitoleico en diversos modelos y correlación de sus valores con distintas patologías	71
Tabla C.1. Lista de tampones y soluciones usadas en el trabajo con su composición.....	94
Tabla C.2. Lista de equipos, software y bases de datos usados en el trabajo	99
Tabla C.3. Rampa de temperaturas empleada en el proceso de cromatografía de gases para la separación de FAME y DMOX	107
Tabla C.4. Resumen de los iones característicos que se usan para la identificación y cuantificación de FAME y DMOX por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	109
Tabla C.5. Gradiente de eluyentes en el análisis de clases de fosfolípidos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.	111
Tabla C.6. Fragmentos característicos producidos por cada clase de fosfolípidos tras la disociación inducida por colisión y modos de trabajo usados para su análisis	112
Tabla C.7. Parámetros de uso de los anticuerpos primarios empleados en el trabajo.	116
Tabla C.8. Programa de temperaturas usado para la amplificación de cDNA por PCR convencional.	118
Tabla C.9. Relación de oligonucleótidos cebadores directos e inversos usados para la amplificación de cDNA por PCR..	120
Tabla C.10. Programa de temperaturas usado para la amplificación de cDNA por PCR cuantitativa a tiempo real.....	121
Tabla D.1. Estudio comparativo del aumento del isómero del ácido graso 16:1 en TAG y CE con el incremento de la masa total de ambas clases de lípidos al estimular las células	168
Tabla D.2. Resumen de la identificación del isómero del ácido graso 16:1 en distintos tipos celulares y sueros con los que se trabaja.....	179
Tabla D.3. Resumen de la identificación del isómero del ácido graso 16:1 en ratón	203

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA: Ácido araquidónico

ACAT: Acil-CoA:colesterol aciltransferasa

ACC: Acetil-CoA carboxilasa

ACSL: Acil-CoA sintetasa de cadena larga

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

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP (del inglés, *AMP-activated protein kinase*)

ATGL: Triglicérido lipasa adiposa (del inglés, *adipose triglyceride lipase*)

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

CD: Clúster de diferenciación

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CE: Éster de colesterol (del inglés, *cholesteryl ester*)

CoA: Coenzima A

COX: Ciclooxygenasa

cPLA₂: Fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de Ca²⁺

cPLA₂α: Fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de Ca²⁺ de grupo IVA

CPT: Carnitina palmitoiltransferasa

CXCL1: Quimioquina de motivo CXC ligando 1

DAG: Diacilglicerol

DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa

DHA: Ácido docosahexaenoico

DMOX: 4,4-dimetiloxazolina de un ácido graso

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELOVL: Elongasa de ácidos grasos de cadena muy larga (del inglés, *elongase of very-long chain fatty acid*)

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés, *extracellular signal-regulated kinases*)

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

CONTENIDOS PREVIOS

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

FAME: Éster metílico de un ácido graso (del inglés, *fatty acid methyl ester*)

FAS: Sintasa de ácidos grasos (del inglés, *fatty acid synthase*)

FBS: Suero fetal bovino (del inglés, *fetal bovine serum*)

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

HDL: Lipoproteína de alta densidad (del inglés, *high-density lipoprotein*)

HPLC/MS: Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (del inglés, *high-performance liquid chromatography/mass spectrometry*)

HSL: Lipasa sensible a hormonas (del inglés, *hormone-sensitive lipase*)

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular 1 (del inglés, *intracellular adhesion molecule 1*)

IL: Interleuquina

iPLA₂: Fosfolipasa A₂ citosólica independiente de Ca²⁺

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal

LD: Gota lipídica (del inglés, *lipid droplet*)

LDL: Lipoproteína de baja densidad (del inglés, *low-density lipoprotein*)

LO: Lipoxigenasa

LPCAT: Lisofosfatidilcolina aciltransferasa

LPS: Lipopolisacárido

MAG: Monoacilglicerol

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*)

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (del inglés, *monocyte chemotactic protein 1*)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

mRPM: Macrófagos peritoneales residentes de ratón (del inglés, *mouse resident peritoneal macrophages*)

m/z: Relación masa/carga

NFκB: 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*)

NOS2: Óxido nítrico sintasa 2 (del inglés, *nitric oxide synthase 2*)

OA: Ácido oleico (del inglés, *oleic acid*)

CONTENIDOS PREVIOS

oxLDL: Lipoproteína de baja densidad oxidada (del inglés, *oxidized low-density lipoprotein*)

PA: Ácido fosfatídico

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

PE: Fosfatidiletanolamina

PG: Fosfatidilglicerol

PI: Fosfatidilinositol

PL: Fosfolípido

PLA₂: Fosfolipasa A₂

PPAR: Receptor activador de la proliferación de los peroxisomas (del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor*)

PS: Fosfatidilserina

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RE: Retículo endoplásmico

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI: Medio *Roswell Park Memorial Institute*

SCD: Estearoil-CoA desaturasa

sPLA₂: Fosfolipasa A₂ secretada

SREBP: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides (del inglés, *sterol regulatory element-binding protein*)

TAG: Triacilglicerol

TC: Triacina C

TLC: Cromatografía en capa fina (del inglés, *thin-layer chromatography*)

TLR: Receptor tipo *toll* (del inglés, *toll-like receptor*)

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

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

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

LISTA DE ÁCIDOS GRASOS

NOMBRE TRIVIAL	NOMBRE SISTEMÁTICO	NOTACIÓN ABREVIADA
Ácido láurico	Ácido dodecanoico	12:0
Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	14:0
Ácido fisetérico	Ácido cis-5-tetradecenoico	14:1 $n-9$
Ácido pentadecílico	Ácido pentadecanoico	15:0
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	16:0
Ácido sapiénico	Ácido cis-6-hexadecenoico	16:1 $n-10$
-	Ácido cis-7-hexadecenoico	16:1 $n-9$
Ácido palmitoleico	Ácido cis-9-hexadecenoico	16:1 $n-7$
Ácido palmiteláidico	Ácido trans-9-hexadecenoico	16:1 $n-7t$
Ácido palmitvaccénico	Ácido cis-11-hexadecenoico	16:1 $n-5$
Ácido margárico	Ácido heptadecanoico	17:0
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	18:0
Ácido oleico	Ácido cis-9-octadecenoico	18:1 $n-9$
Ácido cis-vaccénico	Ácido cis-11-octadecenoico	18:1 $n-7$
Ácido linoleico	Ácido cis-9,12-octadecadienoico	18:2 $n-6$
Ácido γ -linolénico	Ácido cis-6,9,12-octadecatrienoico	18:3 $n-6$
Ácido α -linolénico	Ácido cis-9,12,15-octadecatrienoico	18:3 $n-3$
Ácido araquídico	Ácido eicosanoico	20:0
Ácido gondoico	Ácido cis-11-eicosenoico	20:1 $n-9$
Ácido dihomolinoleico	Ácido cis-11,14-eicosadienoico	20:2 $n-6$
Ácido <i>Mead</i>	Ácido cis-5,8,11-eicosatrienoico	20:3 $n-9$
Ácido dihomo- γ -linolénico	Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico	20:3 $n-6$
Ácido araquidónico	Ácido cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 $n-6$
Ácido timnodónico (EPA)	Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5 $n-3$
Ácido erúcico	Ácido cis-13-docosenoico	22:1 $n-9$
Ácido adrénico	Ácido cis-7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4 $n-6$
Ácido osbond	Ácido cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5 $n-6$
Ácido clupanodónico	Ácido cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5 $n-3$
Ácido cervónico (DHA)	Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6 $n-3$

Solamente se muestran los ácidos grasos que aparecen o son de interés en este trabajo. La lista completa puede consultarse en http://www.balsinde.org/varios/ffa_list.pdf.

SUMMARY

INTRODUCTION

Lipid droplets (LD) are intra-cytosolic organelles present in virtually all cell types. These organelles are composed of a neutral lipid core surrounded by a phospholipid monolayer, which provides them a hydrophobic environment within the cells. LD surface contains multiple proteins, some of them involved in lipid metabolism. LD are formed in response to multiple stimuli, such as lipid overload, stress or cellular activation. The most accepted theory proposes that LD are synthesized between the two leaflets of the cytosolic face of the smooth endoplasmic reticulum in a tight regulated process which includes fatty acyl-CoA generation, neutral lipid synthesis, phospholipid remodeling and protein and phospholipid biosynthesis. LD are currently regarded as greatly dynamic structures which take part in a wide range of cellular processes and whose dysregulation is involved in several diseases, such as metabolic syndrome-related pathologies, neoplastic processes, neurodegenerative diseases or hepatitis C virus infection. In immune cells LD are produced in response to multiple cell activating agents and are involved in the control and amplification of the inflammatory response. Some PLA₂, key enzymes in the lipid metabolism, are related to LD biosynthesis, either providing fatty acids for the neutral lipid synthesis, modifying lipid-containing particles to allow their internalization by cells, generating metabolites that regulate LD synthesis, or participating in the own biosynthesis of the organelles.

Atherosclerosis is the main pathology in cardiovascular disease, the world-leading cause of death. This disorder is included within metabolic syndrome-related diseases and shares the same risk factors with other common diseases such as non-alcoholic steatohepatitis, obesity or type 2 diabetes. Atherosclerosis is a multifactorial pathology that initially consists on fat, cells and matrix deposition in the blood vessels intima. Monocyte-derived macrophages are key cells in the fatty streak development through the accumulation of lipid droplets when are exposed to modified LDL in the sub-endothelial space, becoming foam cells. The long-term accumulation of foam cells can lead to fatal consequences. In the last years, circulating monocytes have also been considered as key cells in the early atherosclerotic plaque development through the formation of lipid droplets prior to their extravasation, becoming foamy monocytes, and increasing their pro-inflammatory activation, extravasation potential and atherogenic properties in several models. In this work, LD formation by monocytes exposed to arachidonic acid (AA), a fatty acid present in the atherosclerosis foci, is proposed as a necessary study in the search of mechanisms and early biomarkers of foamy monocytes synthesis.

Palmitoleic acid has been described as a lipid hormone or lipokine produced in adipose tissue and released to the bloodstream, with beneficial effects in metabolic syndrome-related pathologies. However, other studies have shown that palmitoleic acid has detrimental effects in other biological models. Moreover, palmitoleic acid has been shown as an anti-inflammatory fatty acid in some mouse models, but the measurement of its high plasma levels is related to several markers of disease and inflammation in epidemiologic studies in humans. The discrepancies found in the study of biological effects of this fatty acid could be given by the different chemical forms in which palmitoleic acid is present in cells, ranging from free fatty acid, esterified in other lipids, forming phosphatidylinositol molecules or oxidized, being part of FAHFA. Other isomers of palmitoleic acid with biological implications, such as sapienic and palmitelaidic acids, have also been detected in cells, and the search and study of other major isomers deserves more attention.

OBJECTIVES

The recent discovery of lipid droplet deposition in circulating monocytes as a mechanism in the early atherosclerosis development leads to the first main goal: The study of the regulation of lipid droplet formation by arachidonic acid in human monocytes.

On the other hand, palmitoleic acid is in the spotlight of lipid research due to its behavior as a lipokine with several beneficial metabolic effects. Hence, the design of an experimental method for palmitoleic acid isomers detection and quantification is required, as well as, a functional and biochemical study of new isomers in immune cells.

EXPERIMENTAL METHODS

A metabolipidomic approach was employed for the analysis of neutral lipids, main components of lipid droplets, and for the structural study of palmitoleic acid isomers by gas chromatography/mass spectrometry. Other mass spectrometry techniques were used for the determination of palmitoleic acid-containing phospholipids and a phospholipidome profile.

Several complementary techniques such as western blot, fluorescence microscopy, qPCR, radioactivity assays or ELISA were used for the measurement of protein and gene expression levels and the synthesis of lipid droplets by human monocytes.

RESULTS AND DISCUSSION

REGULATION OF LIPID DROPLET FORMATION BY ARACHIDONIC ACID IN HUMAN MONOCYTES

AA (10 μM , 2 hours), induced neutral lipid synthesis and LD formation in human monocytes. On one hand, the neutral lipid synthesis was due to the direct AA incorporation into TAG, and on the other hand, to the mobilization of other fatty acids such as 16:0, 16:1, 18:0 or 18:1*n*-9 towards TAG and CE molecules. Both mechanisms can be dissociated by the arachidonoyl-CoA synthetases inhibitor triacsin C, which inhibited the former but conserved the latter. Other unsaturated fatty acids (18:1*n*-9, 18:2*n*-6, 18:3*n*-6) induced LD to a lesser extent, but unlike AA, the LD synthesis was inhibited by the preincubation of cells with TC. Therefore, in all subsequent experiments, the study of the signaling pathway leading to LD formation by AA was carried out in the presence of TC.

AA triggered *de novo* fatty acid synthesis by human monocytes. AA did not alter the phospholipid levels in human monocytes, ruling out the transfer of fatty acids from PL to TAG and CE during the biosynthesis of LD. However, the total amount of cellular fatty acids was increased after AA treatment, showing a higher rate of acetyl-CoA use for fatty acid synthesis without changes in the β -oxidation rate and suggesting that *de novo* fatty acid synthesis was activated by AA. This fatty acid increased the gene expression of several proteins involved in lipogenesis, such as ACC α , FAS, ELOVL6, SCD-1, SREBP-1c and SREBP-2. The chemical inhibition of the *de novo* fatty acid synthesis pathway in different steps resulted in a decrease of TAG synthesis, suggesting that fatty acids recruited for neutral lipid and lipid droplet formation in the presence of TC, came from the *de novo* fatty acid synthesis pathway. Triacsin C inhibited exogenous AA and 16:0 incorporation into cellular lipids, but did not affect the incorporation of fatty acids coming from this pathway. It has been hypothesized that acyl-CoA pools might be compartmentalized, and different ACSL, affected or not by TC inhibition, could catalyze fatty acid thioesterification to coenzyme A.

Lipid droplet formation by AA in human monocytes required the cPLA $_2\alpha$ phosphorylation at Ser⁵⁰⁵ by the simultaneous effect of p38 and JNK MAPK. cPLA $_2\alpha$ inhibition by its selective inhibitor pyrrophenone resulted in LD formation abrogation, suggesting a key role of this enzyme in LD biosynthesis by AA. Exogenous AA promoted the cPLA $_2\alpha$ phosphorylation at Ser⁵⁰⁵ residue alongside with an increase in its catalytic activity and the activation of the signaling pathways of p38 and JNK, but not ERK. MAPK are well-

known activators of cPLA₂α by phosphorylation in response to different stimuli. In order to identify which kinases were involved in cPLA₂α phosphorylation, some experiments with inhibitors of MAPK were performed, identifying p38 and JNK kinases as regulators of cPLA₂α phosphorylation in response to exogenous AA. The total phosphorylation of cPLA₂α was achieved when both kinases were acting at the same time. Since cPLA₂α is a key enzyme in LD formation in response to AA, the inhibition of both, p38 and JNK pathways, resulted in LD formation by AA suppression, parallel to the inhibition of cPLA₂α phosphorylation. The inhibition of only one of MAPK proteins resulted in neutral lipid synthesis and LD formation, since cPLA₂α phosphorylation levels were higher than controls. In summary, AA activated p38 and JNK pathways, whose simultaneous effect phosphorylated cPLA₂α at Ser⁵⁰⁵, a key event in lipid droplet formation in human monocytes. JNK, but not p38, was previously described as a key cPLA₂α activating pathway in LD formation. Since two parallel MAPK pathways were involved in the activation by phosphorylation of cPLA₂α on the same residue, it is reasonable to consider the hypothesis that an intermediate kinase was being phosphorylated by p38 and JNK and then it was phosphorylating cPLA₂α at Ser⁵⁰⁵, as it has been described in other models of cPLA₂α activation. The mechanism by which cPLA₂α directly regulates LD biosynthesis could be due to their catalytic action on the smooth endoplasmic reticulum phospholipids during organelle budding, catalyzing the conversion of cylindrical-shape phospholipids into wedge-shape lysophospholipids, which induces a necessary local positive curvature during organelle synthesis.

The same studies, made on mature macrophages, other immune cells that are involved in atherosclerosis development through the accumulation of lipid droplets, gave rise to similar qualitative results. AA promoted neutral lipid synthesis in the presence of TC, but to a lesser extent than in human monocytes. Oxidized LDL, a classical atherosclerosis stimulus, also induced neutral lipid synthesis in circulating monocytes, but to a lesser extent than AA, showing the great potential of this fatty acid as a LD promoter in monocytes.

It is tempting to speculate that prior to perform its biological effect, cells convert AA into some eicosanoids that could be the bioactive compounds in this model. The enzymatic synthesis of eicosanoids by monocytes is unlikely to happen according to preliminary experiments and bibliography, but some of the products formed by the non-enzymatic oxidation of AA need a further research to determine if some of them are directly involved in LD formation by exogenous AA in these cells.

A central role of cPLA₂α in lipid droplet formation in human monocytes has been identified; hence this enzyme might be an interesting target in the prevention of foamy

monocytes formation in human models. Interestingly, the cPLA₂ α deficient mice present less atherosclerotic injuries in aorta under a high-fat diet than their *wild type* littermates. Preventing foamy monocytes formation by the loss of this enzyme could be one of the mechanisms by which these mice would be protected against this disease. Moreover, this enzyme has also been related to other metabolic diseases, and its deficiency protects mice from abdominal fat accumulation, TAG deposition in liver and hepatic steatosis induced by high-fat diet.

16:1*n*-9, A FATTY ACID FORMED FROM OLEIC ACID BY β -OXIDATION, ACCUMULATES IN NEUTRAL LIPIDS

Among all fatty acids increased by AA-exposed monocytes, one of them, preliminarily identified as a 16:1 isomer, was especially augmented by the treatment. After the experimental design of a method that includes a double FAME/DMOX derivatization, the fatty acid was identified as 16:1*n*-9, a rare fatty acid with barely references in the bibliography, which had not been previously studied in-depth.

Monocytes were more than 3-fold enriched in 16:1*n*-9 than in palmitoleic acid, the main 16:1 isomer in almost all cells and tissues. Regarding the distribution among cellular lipids, 16:1*n*-9 showed a different location than palmitoleic and the rest of fatty acids. 75 % of basal 16:1*n*-9 was esterified in neutral lipids (DAG, TAG and CE) and only 21 % in phospholipids, conversely to the rest of fatty acids, primarily incorporated into PL, which is the main fatty acid reservoir in cells (fatty acids esterified in PL constitute the 80 % of total cellular fatty acids). Palmitoleic acid was only esterified in PL. The incorporation of both 16:1 isomers into phospholipid classes was also altered. 16:1*n*-7 was incorporated into PC species in greater extent, whereas 16:1*n*-9 was preferentially incorporated into PA species. All these differences between both isomers suggest possible different roles in cells.

16:1*n*-9 was formed from oleic acid by partial β -oxidation in mitochondria in human monocytes. The enrichment of cells with oleic acid at physiological concentrations resulted in the increase of total 16:1*n*-9 levels. To confirm the biochemical origin of 16:1*n*-9, monocytes were labeled with deuterated oleic acid. Labeled 16:1*n*-9 was detected by GC/MS esterified essentially in TAG, followed by phospholipids. In order to determine whether 16:1*n*-9 was produced from oleic acid by β -oxidation, monocytes were preincubated with the CPT1 inhibitor etomoxir, which inhibited the fatty acid importation into mitochondria in oleic acid-enriched monocytes. Etomoxir decreased the total 16:1*n*-9

formed from oleic acid in human monocytes, suggesting that this fatty acid was formed in one cycle of partial β -oxidation of oleic acid in the mitochondria, since peroxisome, the other organelle in which β -oxidation could be carried out, does not use the CPT system of fatty acid importation. Finally, the β -oxidation rate from oleic acid into 16:1*n*-9 was increased when cells were exposed to exogenous AA. This result is in agreement with the high amount of 16:1*n*-9 produced in response to AA, which could not be explained only in terms of the increase of its substrate, the oleic acid. A direct functional and physical contact between mitochondria and LD has been described, and some fatty acids from TAG lipolysis in LD are used by mitochondria for β -oxidation, suggesting that this process would be bidirectional and the shortened fatty acids could reverse to LD.

16:1*n*-9, A POTENTIAL ANTI-INFLAMMATORY FATTY ACID IN MOUSE

Using the experimental approach previously designed, the fatty acid 16:1*n*-9 was also found in mouse resident peritoneal macrophages (mRPM), as well as in multiple organs and tissues such as liver, brain, heart, lung, kidney, white and brown adipose tissue, muscle and spleen. mRPM presented 4-fold more 16:1*n*-9 than 16:1*n*-7, conversely to the rest of tissues and organs, including mouse serum, which exhibited a higher mass of palmitoleic acid than 16:1*n*-9. In terms of the distribution of both isomers among all tissues and organs, either in PL or TAG, 16:1*n*-7 was more abundant than 16:1*n*-9 with the exception of mRPM. In CE, 16:1*n*-9 esterified in mRPM was 10-fold higher than the rest of biological samples. Comparing the distribution of both isomers in mRPM, 16:1*n*-9 was esterified preferentially in CE, similarly to monocytes, whereas palmitoleic acid was only incorporated into cellular phospholipids and was not present in other lipid classes.

Finally, the modulation of the inflammatory response by both fatty acid isomers was studied. Mouse resident peritoneal macrophages were preincubated for 2 hours with 16:1*n*-9, 16:1*n*-7 or DHA as a positive control, and cells were challenged with bacterial lipopolysaccharide. As previously described, palmitoleic acid-enriched macrophages resulted in the inhibition of *Tnf α* and *Nos2* gene expression. 16:1*n*-9 cell preincubation significantly inhibited those two markers and *Il6*, *Il12a*, *Il23a* and *Il1 β* as well, to a higher extent than palmitoleic acid. To confirm these results, several *in vivo* experiments were carried out. Fatty acids and endotoxin were injected intraperitoneally to mice. Serum circulating levels of *Il6* were measured by ELISA, finding that 16:1*n*-9 strongly inhibited *Il6* production in response to LPS. This effect was not observed with palmitoleic acid or DHA.

This suggests that the novel described fatty acid 16:1*n*-9 possesses potential anti-inflammatory properties in mouse models

There are only a few studies describing the biological effects of 16:1*n*-9 and all of them are epidemiological. High levels of this fatty acid in plasma and erythrocytes are related to an elevated risk of sudden cardiac arrest and more incidence of metabolic syndrome. In that way, 16:1*n*-9 behaves as its isomer palmitoleic acid, which presents an anti-inflammatory component *in vitro*, but whose increased circulating levels are related to the development of damaging effects. These discrepancies could be due to the different biological forms in which this fatty acid is measured and the wide range of biological metabolites through which might be acting. The brief literature about this fatty acid, the interest generated by its isomer palmitoleic acid, the recent discovery of its biochemical pathways of synthesis and its behavior as a potent anti-inflammatory fatty acid *in vitro* and *in vivo* invite to a more in-depth study of 16:1*n*-9 properties.

CONCLUSIONS

- Regarding the first general goal, the study of the regulation of lipid droplet formation by arachidonic acid in human monocytes in the context of their conversion into foamy monocytes in a model of atherosclerosis, the obtained results led to the following conclusions:
 1. AA induced neutral lipid synthesis and lipid droplet formation in human monocytes, to a greater extent than other tested fatty acids. On one hand, neutral lipid synthesis was due to the direct AA incorporation into cellular TAG, and on the other hand, to the incorporation of other fatty acids towards TAG and CE molecules. Both pathways can be dissociated by using triacsin C, an acyl-CoA synthetases inhibitor
 2. AA stimulated the *de novo* fatty acid synthesis in human monocytes. Fatty acids synthesized by such pathway were used to neutral lipid synthesis by cells.
 3. AA promoted cPLA₂α phosphorylation at Ser⁵⁰⁵ by a simultaneous effect of p38 and JNK. This is a key event prior to lipid droplet biosynthesis by human monocytes.
 4. AA also induced neutral lipid synthesis in human monocyte-differentiated macrophages. Similarly, oxidized LDL promoted neutral lipid accumulation in human monocytes, although to a lesser extent than AA.

- Regarding the second general goal, which was the study of palmitoleic acid isomers in innate immune cells, the experimental evidences generated the following results:
5. The most increased fatty acid in neutral lipids of monocytes and macrophages challenged to atherosclerosis stimuli was a palmitoleic acid isomer. The design and application of an experimental method for its analysis allowed the determination of the fatty acid 16:1*n*-9.
 6. Unlike palmitoleic acid and the rest of cellular fatty acids, 16:1*n*-9 was esterified in neutral lipids in human monocytes. These cellular lipids were more enriched in 16:1*n*-9 than in palmitoleic acid, showing differences in their incorporation patterns into phospholipid classes.
 7. The fatty acid 16:1*n*-9 was formed from oleic acid by partial β -oxidation in mitochondria in human monocytes. The conversion rate was increased when cells were exposed to AA.
 8. The fatty acid 16:1*n*-9 was detected in mouse tissues and organs, and it was especially abundant in peritoneal macrophages, where it was esterified to a greater proportion than palmitoleic acid.
 9. Either the *in vitro* preincubation of mouse peritoneal macrophages, or the *in vivo* enrichment of peritoneal cells with the fatty acid 16:1*n*-9, reduced the gene and protein expression of pro-inflammatory cytokines in response to LPS.

A. INTRODUCCIÓN

A.1. GOTAS LIPÍDICAS, MONOCITOS Y ATEROSCLEROSIS

A.1.1. GOTAS LIPÍDICAS

A.1.1.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS GOTAS LIPÍDICAS

Las gotas lipídicas o *Lipid Droplets* (LD) (también llamados *lipid bodies* en células inmunes) son orgánulos presentes en prácticamente todos los organismos y tipos celulares, incluyendo células inmunes como macrófagos, neutrófilos o eosinófilos (1-3). Los LD son partículas esféricas con una superficie compuesta por una monocapa de fosfolípidos (PL) embebiendo colesterol libre y distintas proteínas que protege a un núcleo hidrofóbico, formado esencialmente por triacilglicerol (TAG) y ésteres de colesterol (CE), del ambiente acuoso del interior de la célula (1, 4, 5) (**Figura A.1**). Gracias al desarrollo de técnicas lipidómicas y proteómicas, en los últimos años se han identificado más de 100 especies de fosfolípidos en la monocapa de los LD, así como múltiples proteínas asociadas (6-8). En mamíferos, los fosfolípidos de colina (PC) son los más abundantes, suponiendo sobre un 60 % del total de la membrana de los LD, seguidos de los de etanolamina (PE) e inositol (PI) que suponen un 24 % y un 8 % respectivamente (9). Además, en determinados casos, se ha reportado la presencia de otros glicerofosfolípidos como PS y PA, así como lisofosfolípidos y esfingomielinas (4, 10-12).

Las distintas proteínas que se encuentran asociadas a los LD juegan importantes papeles en su biosíntesis y degradación, así como en el tráfico y movilización de sus lípidos. Entre las proteínas que se encuentran íntimamente asociadas a los LD destaca la llamada familia PAT, que incluye la Perilipina, la proteína relacionada con la diferenciación adiposa (ADRP o Adipofilina) y TIP47 (Tail-Interacting Protein de 47 KDa) (13). La perilipina fue la primera proteína de esta familia en describirse y es la más estudiada. Su nombre proviene del griego *perilipos*, que significa “que rodea a la grasa” y su función es precisamente actuar como encofrado para estabilizar los LD y proteger su núcleo de lípidos neutros de la acción de las lipasas. Por tanto, la función de esta proteína es clave en el control de la lipólisis, especialmente en adipocitos (14-16). La proteína relacionada con la diferenciación adiposa o adipofilina, también es una proteína estructural en la superficie de los LD, que no sólo se expresa durante la diferenciación

INTRODUCCIÓN

adipocítica como indica su nombre, sino que también se usa como marcador en la formación de LD en muchos otros sistemas celulares (13, 17). En cuanto a TIP47, sus funciones celulares no están tan estudiadas, aunque se cree que puede regular la lipólisis en músculo esquelético (18). Además, por homología de secuencia y funcional, se han descubierto otras proteínas asociadas a esta familia PAT en los LD como son OXPAT/MLDP y S3-12 que a día de hoy están mucho menos descritas (19, 20). El descubrimiento de esas nuevas proteínas adicionales a las 3 clásicas de la familia PAT ha hecho que, en la mayoría de trabajos, se sustituya esa nomenclatura clásica por la de perilipinas 1-5 (14).

Además de esa familia de las perilipinas, los LD presentan asociadas una gran cantidad de proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico, lo cual da idea de la gran importancia de estos orgánulos en la regulación lipídica global de la célula. Entre ellas destacan la triglicérido lipasa adiposa o ATGL, su co-activador CGI-58 (*Comparative Gene Identification-58*) (21), la lipasa sensible a hormonas o HSL (22), CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT) (23), lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT) (24), acil-CoA sintetasa de cadena larga 3 (ACSL3) (25), lipina-1 (26, 27) o la fosfolipasa A₂ citosólica de Grupo IVA (cPLA₂α) (28) entre otras.

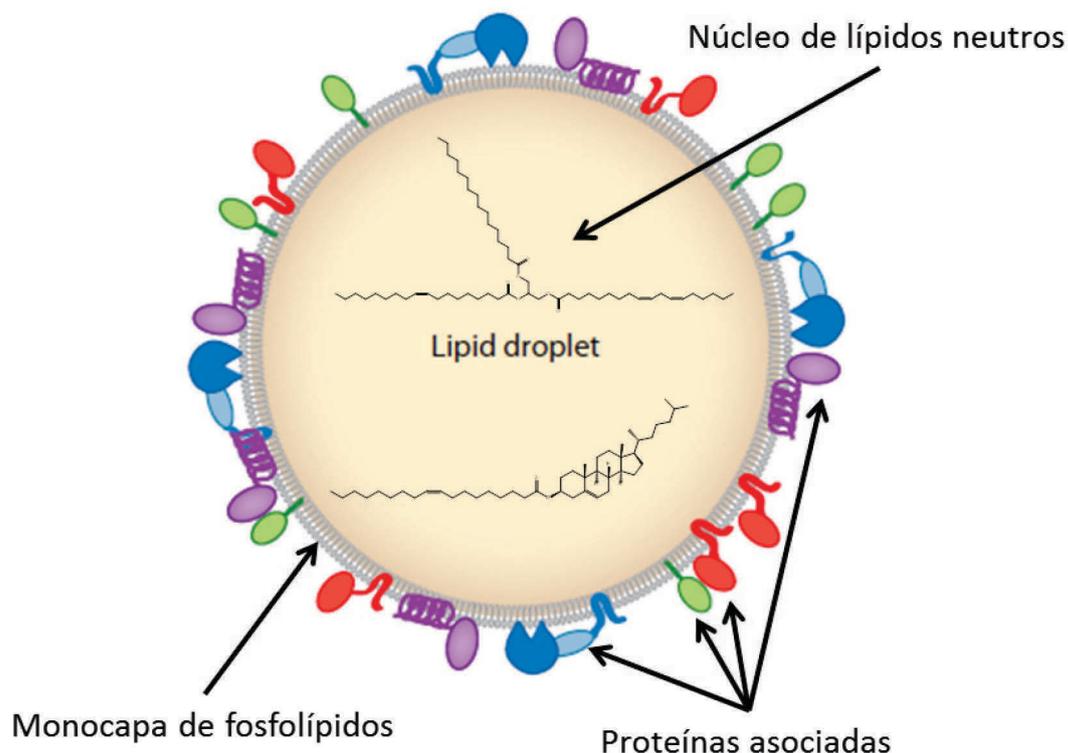


Figura A.1. Estructura y composición de una gota lipídica. Las gotas lipídicas con acumulaciones intra-citoplasmáticas de lípidos neutros, rodeadas por una monocapa de fosfolípidos que embebe una gran variedad de proteínas. Adaptado de Walther & Farese, 2012 (29).

En lo referido al núcleo de lípidos neutros, aunque en la mayor parte de células está formado por TAG y CE, la composición relativa de estos puede variar según el tipo celular. Por ejemplo, los LD adipocíticos presentan esencialmente TAG, mientras que las células espumosas derivadas de macrófagos tienen un alto contenido en CE (5). Además, pueden aparecer otros componentes como diacilglicerol u otros ésteres de esteroides (30, 31).

A.1.1.2. ASPECTOS GENERALES DE LA BIOSÍNTESIS DE GOTAS LIPÍDICAS

Como punto de partida, la formación de LD ha de ser estudiada en términos de la síntesis de sus componentes mayoritarios, los triacilglicérols y los ésteres de colesterol. Estos lípidos neutros son sintetizados de forma terminal en las membranas del retículo endoplásmico (RE) liso por las enzimas diacilglicerol aciltransferasas (DGAT) y acil-CoA:colesterol aciltransferasas (ACAT), donde se encuentran distribuidas homogéneamente, en respuesta a distintos estímulos como una sobrecarga de ácidos grasos libres, estrés de retículo o activación celular (32-34). Para ello, pueden tomar ácidos grasos provenientes de varios orígenes, por ejemplo de fuentes exógenas como las lipoproteínas del plasma o de fuentes endógenas como otros lípidos celulares (35-38). Una vez sintetizados, los lípidos neutros son secuestrados entre las dos capas de la membrana del retículo endoplásmico, que les proporciona un ambiente hidrofóbico. Las bicapas fosfolípídicas pueden acomodar hasta un 3 % de triacilglicerol y un 5 % de ésteres de colesterol (en porcentaje molar) antes de que la acumulación se haga termodinámicamente desfavorable y la fase de lípidos neutros acumulados se separe formando dominios esféricos de unos 25-28 nm de diámetro que permanecen encajados entre las dos capas de la membrana del retículo (1, 4, 39, 40). Esos microdominios son probablemente los precursores de los LD que posteriormente son liberados desde el retículo endoplásmico hacia el citoplasma tras una serie de cambios en la composición de la membrana del retículo altamente regulados que, acompañados de la síntesis de nuevos fosfolípidos, lípidos neutros y proteínas asociadas, favorecen el nacimiento del orgánulo (1, 4, 5, 39-42). La remodelación de los PL de las membranas del retículo parece ser el evento clave para el nacimiento de los LD, pues no se requiere una gran síntesis de más PL para la membrana del orgánulo en formación, sino un férreo control de la proporción entre la cantidad de PL y lípidos neutros que se sintetizan, para que el LD mantenga la forma esférica y las propiedades biofísicas durante su crecimiento (9) (Figura A.2).

INTRODUCCIÓN

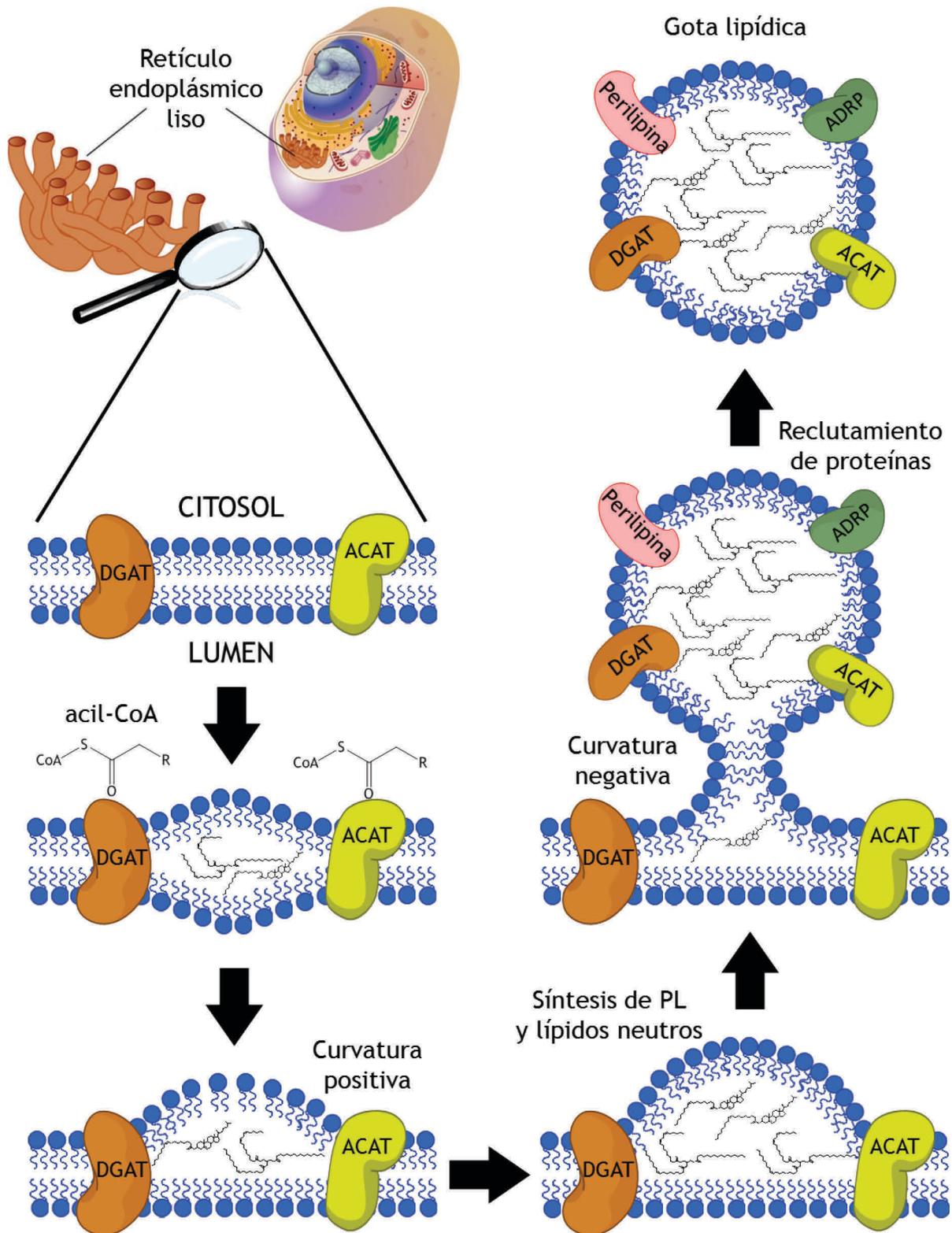


Figura A.2. Formación de una gota lipídica en las membranas del retículo endoplásmico liso. Ante una fuente de acil-CoA endógena o exógena, se acumulan lípidos neutros dentro de las membranas del retículo endoplásmico liso hasta que, tras una serie de cambios dinámicos en la conformación de las mismas, síntesis de más fosfolípidos y proteínas, la gota lipídica naciente es liberada hacia el citosol.

Una vez que las dos caras de la membrana del retículo se separan debido a la excesiva acumulación de lípidos neutros, primeramente se requiere una curvatura local positiva en la base de esa membrana para permitir el crecimiento de la gota lipídica naciente (4, 9, 39, 40) (**Figura A.2**). Una vez que se ha formado esa curvatura positiva en dominios locales de la membrana del retículo endoplásmico liso, la célula puede seguir sintetizando y acumulando más lípidos neutros dentro de la monocapa fosfolipídica, bien sintetizados por DGAT y ACAT localizadas en el propio retículo, o bien sintetizados en el mismo LD, pues se ha demostrado que contiene todas las enzimas necesarias para la síntesis de TAG y CE (43). La síntesis de nuevos PL para el correcto mantenimiento de la proporción fosfolípidos/lípidos neutros ha de ser paralela a ese proceso, y requiere la coordinación de numerosas enzimas involucradas tanto en la síntesis de PL *de novo* (ruta de *Kennedy*), como en la reacilación de los lisofosfolípidos (ciclo de *Lands*) (23, 40) (**Figura A.2, Figura A.3**). Una vez que el orgánulo ha crecido y está a punto de salir hacia el citoplasma, se requiere la recuperación de una curvatura neutral en la monocapa que confiera estabilidad al LD y proteja al núcleo hidrofóbico de la lipólisis (39, 40). Por último, antes de que el LD esté totalmente formado, es necesaria una curvatura local negativa en la base de la membrana del retículo endoplásmico que permita a la monocapa del LD naciente cerrarse completamente para ser liberada hacia el citoplasma, donde inicialmente mantiene una cierta conexión con las membranas del RE, antes de madurar y migrar hacia posiciones más centrales en la célula (39, 40) (**Figura A.2**).

Junto a la realización de esos procesos de remodelación de la membrana del retículo y de síntesis de fosfolípidos y lípidos neutros, la gota lipídica naciente va reclutando proteínas accesorias durante su biosíntesis que ayudan a su estabilización, control de la lipólisis y reclutamiento de otras proteínas, aunque las funciones de algunas de ellas continúan sin estar del todo despejadas (29, 40, 44). Un esquema global de las enzimas del metabolismo lipídico que intervienen en el proceso de biosíntesis de LD puede verse en la **Figura A.3**.

Sin embargo, aunque la mayoría de teorías comparten su origen en el retículo endoplásmico, sigue habiendo mucha controversia sobre los mecanismos de biosíntesis y expansión de los LD y se apuntan varias teorías para explicar las evidencias experimentales (1, 4, 5, 39, 40).

INTRODUCCIÓN

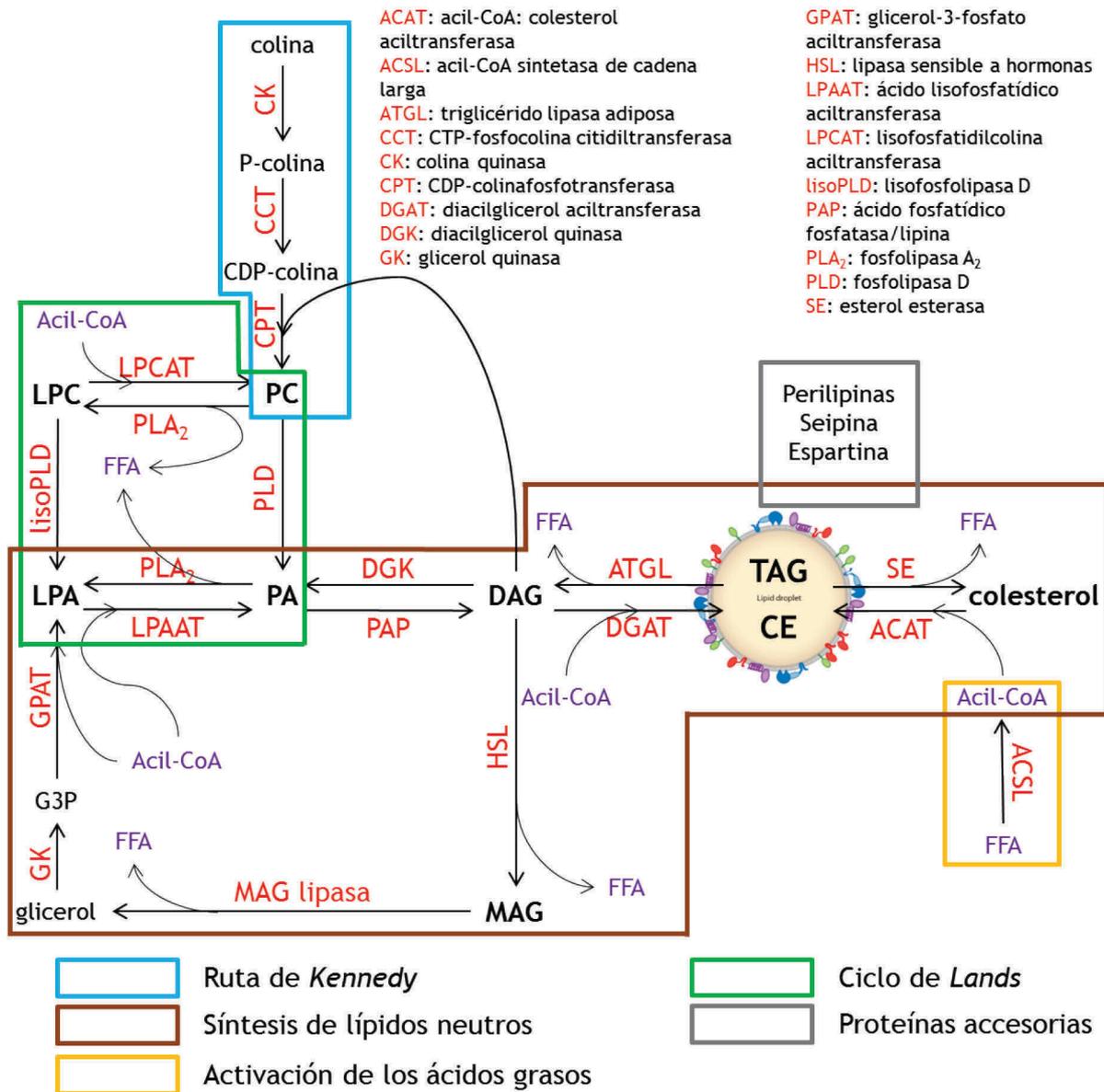


Figura A.3. Metabolismo lipídico y formación de gotas lipídicas. La síntesis de LD requiere la coordinación de múltiples rutas metabólicas, como la activación de los ácidos grasos provenientes de distintos orígenes (caja amarilla), la síntesis de lípidos neutros (caja marrón), el remodelado y síntesis de nuevos fosfolípidos (cajas verde y azul) y el reclutamiento de proteínas accesorias (caja gris). Resaltado en negrita aparecen las principales clases de lípidos que intervienen. Adaptado de Pol *et al*, 2012 (40).

FFA: Ácido graso libre.

A.1.1.3. HETEROGENEIDAD DE LAS GOTAS LIPÍDICAS E IMPLICACIÓN EN DISTINTOS PROCESOS CELULARES Y PATOLOGÍAS

El número y tamaño de los LD varía enormemente de unos tipos celulares a otros. Mientras que la mayoría de las células presentan varios LD pequeños (100-200 nm de diámetro), otras como los adipocitos del tejido adiposo blanco presentan un LD de hasta 100 μ m de diámetro que cubre prácticamente el volumen de toda la célula (3, 5, 45). Esa heterogeneidad también se ha observado entre células del mismo tipo, como hepatocitos de un mismo ratón (46) o adipocitos en diferenciación (47).

En los últimos años ha crecido exponencialmente el número de trabajos publicados que tratan sobre las gotas lipídicas, lo cual ha llevado a un cambio de su visión tradicional como simples reservorios celulares inertes de lípidos. El descubrimiento de su íntima relación con otros orgánulos celulares como mitocondrias, peroxisomas o retículo endoplásmico y su implicación en numerosas patologías ha contribuido decisivamente a la ampliación del estudio de sus funciones celulares, y así, a día de hoy, los LD se consideran orgánulos que además de ser almacenes de ácidos grasos para β -oxidación y biosíntesis de membranas, intervienen en muchos más procesos como el metabolismo lipídico global de la célula y el organismo, como plataformas para la distribución de proteínas, el tráfico intra- y extracelular de membranas, la señalización celular, la esteroidogénesis o la respuesta inflamatoria (2, 48-52).

En la mayoría de células los LD son escasos bajo condiciones basales, pero pueden ser sintetizados de forma rápida y crecer en número y tamaño en respuesta a ciertos estímulos. Uno de esos estímulos es la exposición a ácidos grasos externos, que la célula puede guardar en las gotas lipídicas en forma de TAG, un compuesto en general menos tóxico que los ácidos grasos libres, para prevenir su lipotoxicidad (46, 53, 54). Además se han descrito múltiples estímulos farmacológicos de estrés celular que también pueden promover la síntesis de LD (36, 55). Por el contrario, las células sometidas a privación de nutrientes pueden hacer uso de los ácidos grasos almacenados en los LD como recurso energético que les permita sobrevivir (56, 57).

Se ha demostrado que no todas las células tienen la misma capacidad para cargarse de lípidos y formar LD y, por ello, la formación de estos orgánulos en respuesta a ciertos estímulos cobra gran importancia fisiopatológica en células no adipocíticas, en las que la excesiva acumulación de LD puede estar relacionada con múltiples respuestas celulares anómalas como la resistencia a insulina (58-60), así como con los desequilibrios lipídicos que se producen en enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico como

obesidad, aterosclerosis, esteatohepatitis no alcohólica o diabetes tipo 2 (15, 55, 59, 61-64). Luego, en términos generales, tanto el defecto como el exceso en la formación de LD en células no adipocíticas pueden estar implicados en múltiples patologías, y por ello, su regulación se antoja clave en el manejo de las mismas. Además, en el tejido adiposo, que regula la homeostasis global de lípidos y glucosa, la correcta biosíntesis de los LD adipocíticos es un proceso clave para el buen mantenimiento de sus funciones en el organismo (15).

Aparte de su implicación en patologías relacionadas con el síndrome metabólico, la regulación de la formación de gotas lipídicas está ligada a muchas otras enfermedades como la nefrotoxicidad (65), los procesos neoplásicos (66, 67) o incluso a enfermedades neurodegenerativas, cuya etiología parece estar lejos del metabolismo lipídico, como la enfermedad de Parkinson (68) o la de Alzheimer (69). Además se ha demostrado que el ciclo vital de los virus de la hepatitis C y el dengue está estrechamente ligado al metabolismo de los LD de las células que infectan, y que el control farmacológico de la formación de esos LD puede ser una buena forma de reducir su replicación (70-76).

A.1.1.4. GOTAS LIPÍDICAS EN CÉLULAS INMUNES

Se ha observado una gran acumulación de LD en leucocitos como respuesta a la infección por múltiples microorganismos, así como en otros procesos de origen inflamatorio. Entre esos leucocitos se encuentran neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, monocitos y macrófagos que producen LD en respuesta a estímulos como ácidos grasos libres, lipoproteínas, eicosanoides, citoquinas, quimioquinas o agonistas de TLR (2, 3, 77-81).

Muchas son las evidencias que indican que los LD de leucocitos son orgánulos directamente involucrados en el control de la respuesta inflamatoria por parte de estas células (2, 3, 82-84). Entre ellas destaca que el ácido araquidónico (AA), un precursor esencial en la formación de mediadores inflamatorios de origen lipídico, se incorpora tanto a los PL como a los TAG de los LD de distintos leucocitos (85, 86). Además, la principal enzima responsable de su liberación de los PL, la cPLA₂ α (28) y la enzima encargada de su liberación de los TAG, la ATGL se localizan en estos orgánulos (86) junto a varias de las enzimas que catalizan la conversión del AA libre a eicosanoides, como COX-2, 5-LO o 15-LO (2, 3). Por otra parte, se ha descrito un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias asociada a un incremento de la formación de LD en monocitos (87, 88).

Atendiendo a esto, la relación entre la formación de LD en leucocitos y la respuesta inflamatoria está muy bien ilustrada en una enfermedad con un fuerte componente inflamatorio en la que intervienen un gran número de células inmunes como es la aterosclerosis (89-92).

A.1.2. ATEROSCLEROSIS, SÍNDROME METABÓLICO E INFLAMACIÓN

La aterosclerosis es la principal patología detrás de las enfermedades cardiovasculares, la primera causa de muerte en los países desarrollados (93). Algunos de sus factores de riesgo son la dislipidemia (altos valores de LDL, ácidos grasos libres y TAG y bajos valores de HDL en el plasma sanguíneo), la resistencia a insulina, el tabaquismo o la hipertensión, factores de riesgo que comparte con otras patologías como la esteatohepatitis no alcohólica, la obesidad o la diabetes tipo 2, por lo cual está incluida dentro de las enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (91, 92).

Asociada al desarrollo de esta enfermedad hay una componente inflamatoria que se hace especialmente evidente en el tipo más temprano de lesión, la llamada *fatty streak* o estría grasa, en la que esencialmente intervienen macrófagos derivados de monocitos y linfocitos T, pero que se mantiene en estadios posteriores de la enfermedad (91). De hecho, hay autores que la consideran una enfermedad inflamatoria crónica cuya progresión está relacionada con la mala resolución de la inflamación por las células inmunes que intervienen (89).

Esta enfermedad se puede desarrollar de forma asintomática durante décadas, consistiendo primeramente en un engrosamiento de la íntima, la capa más interna de los vasos sanguíneos, mediante el depósito de lípidos, células y matriz extracelular, produciendo las llamadas placas de ateroma, que provocan el estrechamiento y pérdida de elasticidad de los vasos sanguíneos. Con el tiempo, algunas de estas lesiones se puede necrotizar y calcificar, dando lugar a la rotura de la placa y la liberación de trombos, aumentando el riesgo de sufrir infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares o muerte súbita cardiaca (92).

Aunque hay varios tratamientos farmacológicos y quirúrgicos que mejoran el pronóstico de la enfermedad, a día de hoy sigue considerándose que la prevención de estados de dislipidemia, estrés oxidativo e inflamación crónica mediante un estilo de vida saludable, es la mejor forma de evitar esta patología (94).

A.1.3. PAPEL DE LOS MONOCITOS CIRCULANTES EN LA ATEROSCLEROSIS

A.1.3.1. INICIO DE LA ATEROGÉNESIS: MIGRACIÓN, DIFERENCIACIÓN A MACRÓFAGOS Y ACUMULACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial cuya patogénesis es provocada por un gran número de eventos en los que intervienen diversos tipos celulares, que pueden variar según el estadio de la enfermedad y, por lo tanto, no es fácil de modelizar. Dada la naturaleza de este trabajo, se hace especial hincapié en la función de los monocitos circulantes y los macrófagos en los que se diferencian tras su migración al sub-endotelio, así como en la formación de gotas lipídicas por estas células, como factores a tener en cuenta en el inicio de la enfermedad.

Los focos de aterosclerosis aparecen sobre todo en zonas de flujo circulatorio turbulento, como ramificaciones de arterias. Está ampliamente aceptado que el primer evento en la aterogénesis es la acumulación sub-endotelial de LDL, partículas similares en su configuración a los LD (conteniendo mayoritariamente CE) que transportan los lípidos en la sangre (92). Ante ello, se produce una respuesta inflamatoria mediada principalmente por las células endoteliales, que es mayor cuando las LDL están oxidadas. Este tipo celular, al activarse, se vuelve más permeable a la extravasación de las lipoproteínas, expresa moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1, produce quimioquinas atrayentes de leucocitos circulantes como MCP-1, transloca a su membrana plasmática receptores de adhesión como P-selectinas y libera citoquinas proinflamatorias, eicosanoides y AA (92, 95-100). La activación endotelial provoca la migración de los monocitos circulantes hacia el endotelio mediante la interacción de las P-selectinas con su ligando (PSGL-1) y su adhesión firme a través de la interacción de las integrinas de los monocitos (heterodímeros de CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29 o CD49d entre otros) con ICAM-1 y VCAM-1 (95, 101). Tras esa adhesión, los monocitos entran al espacio sub-endotelial, donde debido a la presencia de citoquinas como M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) se diferencian, adquiriendo fenotipos de macrófagos y/o células dendríticas. La principal función de esos macrófagos es la endocitosis de las LDL modificadas (oxidadas, acetiladas o lipóticamente modificadas) que se acumulan en la íntima, proceso que se cree que realizan a través de sus receptores *scavenger* (SR) como SRA o CD36, así como la generación de citoquinas, quimioquinas y especies reactivas de oxígeno que contribuyen a aumentar la activación inflamatoria y el estrés oxidativo en el

INTRODUCCIÓN

foco de aterogénesis, generando una retroalimentación positiva del proceso (91, 92, 102). La internalización de las LDL hace que los macrófagos formen una gran cantidad de gotas lipídicas intracelulares ricas en CE, pasando a denominarse células espumosas o *foam cells*, por la morfología que adquieren (103) (Figura A.4). Aunque los linfocitos, las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares pueden también formar LD, son las células espumosas derivadas de macrófagos las que contribuyen decisivamente a la formación de esas estrías grasas en la placa inicial de ateroma.

Finalmente, en un estado avanzado de la enfermedad, si los CE no son retirados de las células espumosas en un proceso dependiente de los niveles circulantes de HDL (104), estas células pueden entrar en apoptosis y colaborar en la formación de un núcleo necrótico dentro de la placa, aumentando el riesgo de ruptura de la placa y sus fatales consecuencias (91, 92).

INTRODUCCIÓN

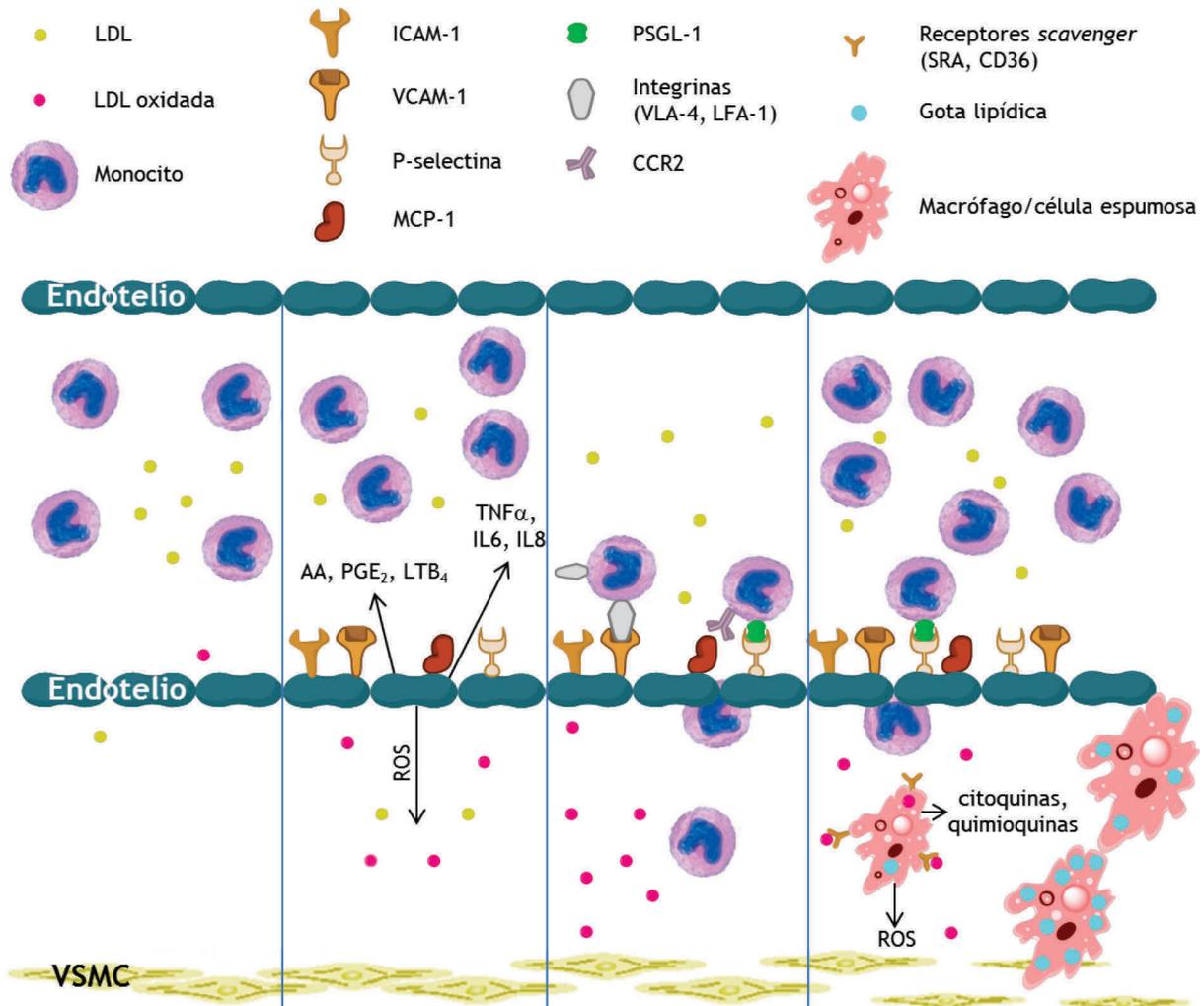


Figura A.4. Papel de los monocitos en el inicio de la aterosclerosis. Bajo la exposición prolongada a los factores de riesgo de la enfermedad, como la dislipidemia, se produce la activación de las células endoteliales, que resulta en su mayor permeabilidad al LDL, la expresión de moléculas de adhesión, secreción de quimioquinas, citoquinas, eicosanoides y AA. Eso provoca la migración de los monocitos circulantes hacia el endotelio y su extravasación. En el espacio sub-endotelial, los monocitos se diferencian a macrófagos, expresando receptores *scavenger* por los que endocitan las LDL previamente oxidadas, convirtiéndose en células espumosas, las principales contribuyentes a la formación de las estrías grasas en el inicio de la aterogénesis.

VSMC: Células musculares lisas vasculares. CCR2: Receptor de quimioquinas de tipo 2. PSGL-1: Glicoproteína ligando de P-selectinas 1. VLA-4: Antígeno muy tardío 4 (CD49d/CD29). LFA-1: Antígeno asociado a la función de linfocitos (CD11a/CD18). PGE₂: Prostaglandina E₂. LTB₄: Leucotrieno B₄. ROS: Especies reactivas de oxígeno.

A.1.3.2. FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN MONOCITOS CIRCULANTES

Aunque los monocitos/macrófagos, junto con las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares, son los actores clásicos en el desarrollo de la aterosclerosis, se han descubierto otras células sanguíneas que, aunque están presentes en mucha menor medida en las placas de ateroma, también intervienen en la enfermedad mediante la producción de citoquinas, especies reactivas de oxígeno o mieloperoxidasas. Entre ellas destacan plaquetas, mastocitos, neutrófilos, células dendríticas, algunas subpoblaciones de linfocitos T, y por supuesto, los monocitos circulantes (90, 105, 106).

El papel de los monocitos circulantes en aterosclerosis como precursores de los macrófagos que, tras cargarse de LD en el espacio sub-endotelial, se convierten en células espumosas, está claramente definido (89-92, 95, 107) (Figura A.4). Pero además, en los últimos años han surgido trabajos que proponen que los monocitos circulantes expuestos bien a productos de lipólisis de los TAG de las VLDL o bien por un estado de hipercolesterolemia, ambos factores de riesgo de aterosclerosis, acumulan un buen número de LD, lo cual está ligado al aumento de su expresión de moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas, resultando en un aumento de la infiltración sub-endotelial, mayor activación proinflamatoria y mayor riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares. De esa manera, se ha empezado a considerar que la formación de LD en monocitos circulantes podría ser tanto una diana terapéutica para la enfermedad, como un marcador de riesgo de la misma (87, 88, 108-111).

En ese sentido, hace más de 20 años se observó que los leucocitos circulantes de pacientes con hipercolesterolemia familiar presentaban “inclusiones citoplasmáticas lipídicas” comparados con los controles (112) y que los leucocitos de pacientes que sufrían aterosclerosis en las arterias coronarias acumulaban más TAG y CE (113). Con las técnicas actuales, se ha descrito que los monocitos humanos aislados de sangre periférica de pacientes en ayuno contienen un número muy escaso de LD, mientras que los monocitos aislados en periodo posprandial después del consumo de una dieta alta en grasa contienen un número mayor de LD (87, 114). Se cree que esa formación de LD es debida a los ácidos grasos libres liberados de los TAG de las VLDL ricas en este tipo de lípidos por las lipoproteínas lipasas ancladas a las células endoteliales y que, añadidos *in vitro* a las células, reproducen los resultados observados en monocitos *in vivo* (87, 88, 115, 116). Esa síntesis de LD por parte de las células circulantes va ligada a su activación proinflamatoria, encontrándose mayores niveles de expresión de TNF α , IL1 β e IL8 que en los monocitos de pacientes en ayuno (87). Además, se produce un incremento en la expresión de integrinas como CD11b, CD11c, CD18, CD29 y CD49d por parte de los

monocitos, lo que los hace más propensos a la adhesión a células endoteliales en cultivo no activadas (88) (**Figura A.5**). El hecho de que algunas rutas de señalización como ERK2 regulen tanto la síntesis de LD como la expresión de integrinas y la producción de citoquinas en estos modelos, sugiere que los tres procesos podrían ir ligados (87, 88).

De forma paralela, los ratones propensos a desarrollar aterosclerosis de forma espontánea como son los apoE^{-/-} y los LDb, que se caracterizan por altos niveles circulantes de LDL, presentan monocitos conteniendo LD (lo que los autores llaman *foamy monocytes* o monocitos espumosos) tras menos de una semana de dieta alta en grasa, aumentando su número si se mantiene la dieta (110). Incluso ante una dieta normal, los monocitos de ratones apoE^{-/-} acumulan más LD que los de sus correspondientes *wild type* (110). Al igual de lo que ocurre con los modelos humanos, la formación de LD en los monocitos circulantes en esos modelos de hipercolesterolemia va unida a la expresión de integrinas como CD11c, CD18 o CD29 (108-110) y de receptores de quimioquinas como CCR2 y CX₃CR1 (111), lo cual provoca un aumento de su adhesión a células endoteliales en experimentos *in vitro* (109, 111), así como su infiltración en lesiones ateroscleróticas nacientes en modelos *in vivo* (110). Además, la hipercolesterolemia hace que aumenten marcadores proinflamatorios de los monocitos como Tnf α , interferón γ , Il1 β , Il6 e Il8 (109, 110) (**Figura A.5**).

La confirmación de que existe una relación directa entre la formación de LD en monocitos y su contribución al desarrollo temprano de aterosclerosis en un modelo *in vivo* viene dada porque la eliminación de los monocitos espumosos circulantes (que son CD11c⁺) sin variar los niveles de los monocitos no cargados de LD (que son CD11c⁻) ni los niveles de macrófagos residentes en la arteria, mediante un tratamiento de 3 semanas con liposomas de clodronato, resulta en lesiones menores en el seno de la arteria aorta que en los ratones control (110). Estos resultados hacen que la formación de LD en monocitos circulantes sea un atractivo blanco farmacológico en la reducción del riesgo de aterosclerosis en sus primeros estadios.

En resumen, bajo factores de riesgo del síndrome metabólico, la aterogénesis no se debe solo a la acumulación de LD en los macrófagos cuando se convierten en células espumosas en el sub-endotelio, sino que además, los monocitos circulantes sintetizan LD en paralelo a citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión al endotelio convirtiéndose en células más aterogénicas (87, 88, 108-111) (**Figura A.5**). Eso hace que la formación de LD en monocitos circulantes pueda ser un buen marcador lipídico de riesgo cardiovascular sin pruebas invasivas (117) a la vez de una diana terapéutica de la enfermedad, como ya se considera a las células espumosas.

INTRODUCCIÓN

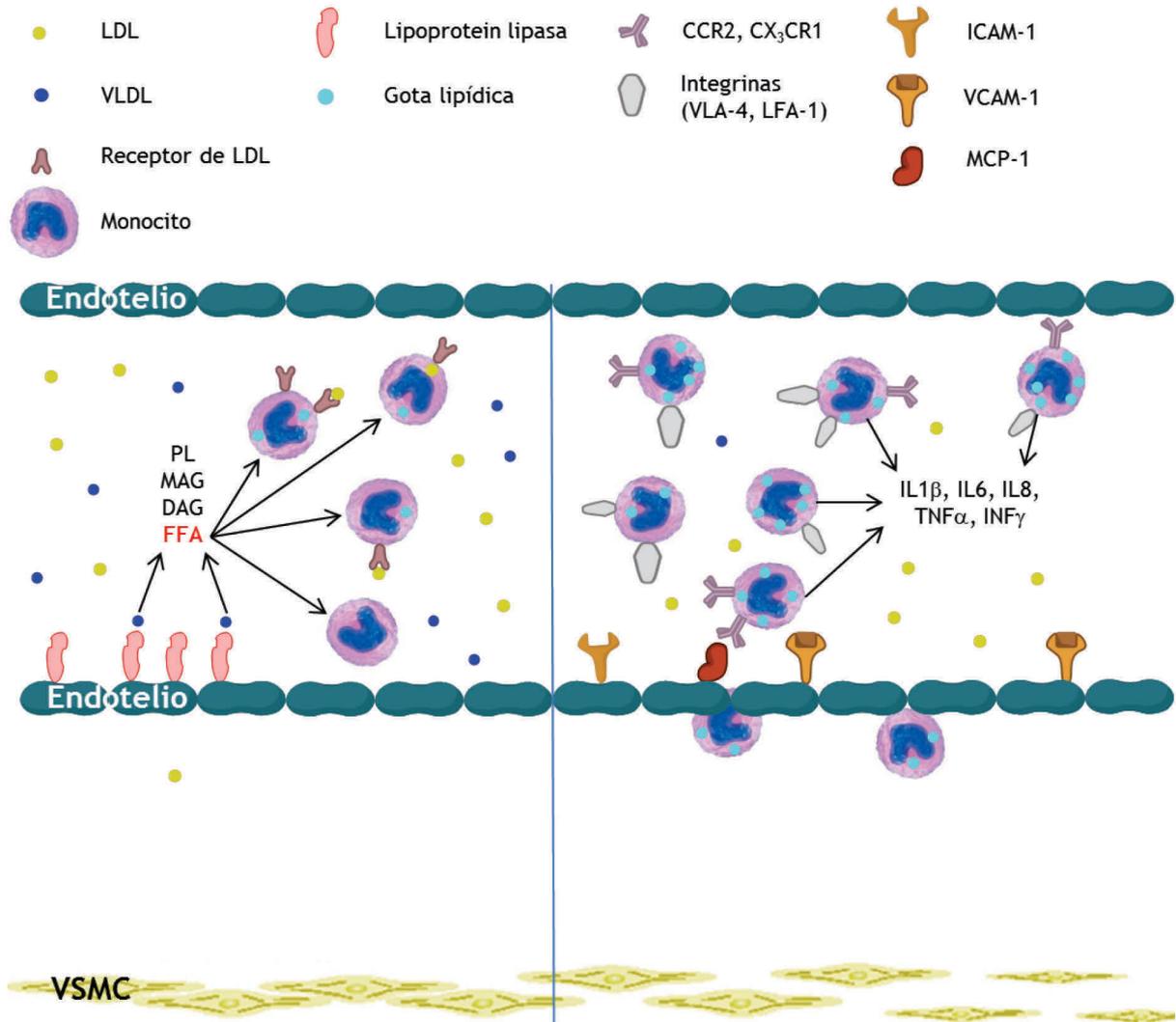


Figura A.5. Monocitos espumosos y aterosclerosis. Bajo un estado de dislipidemia, los monocitos circulantes pueden formar gotas lipídicas antes de extravasarse, bien a partir del exceso de LDL o bien mediante los ácidos grasos libre provenientes de la hidrólisis del TAG de las VLDL por las lipoprotein lipasas endoteliales. La formación de gotas lipídicas va unida a la activación proinflamatoria de los monocitos y la secreción de numerosas citoquinas. Así mismo, se produce un incremento en la expresión de integrinas y de receptores de quimioquinas como CCR2 y CX₃CR1, haciendo a los monocitos cargados de gotas lipídicas o monocitos espumosos más propensos a la extravasación en condiciones de no activación endotelial, aumentando el riesgo de lesión aterosclerótica.

VSMC: Células musculares lisas vasculares. CCR2: Receptor de quimioquinas de tipo 2. CX₃CR1: Receptor de quimioquinas CX3C de tipo 1. VLA-4: Antígeno muy tardío 4 (CD49d/CD29). LFA-1: Antígeno asociado a la función de linfocitos (CD11a/CD18). INF γ : Interferón gamma. FFA: Ácido graso libre.

A.1.3.3. EL AA LIBRE EN FOCOS DE ATEROSCLEROSIS COMO FACTOR DE RIESGO

El estado inflamatorio crónico asociado a la aterosclerosis (91) sugiere que el AA, un ácido graso de marcado carácter proinflamatorio que es liberado al torrente sanguíneo en situaciones fisiopatológicas durante la formación temprana de las estrías grasas, podría contribuir de manera importante a la formación de gotas lipídicas en los monocitos circulantes, convirtiéndolos en monocitos espumosos y haciéndolos más aterogénicos (110, 111). El AA libre es producido esencialmente por las células endoteliales activadas en presencia de las LDL oxidadas (96-100). Además, la acción de ciertas fosfolipasas A₂ secretadas (esencialmente las de los grupos X y V) asociadas a focos de aterosclerosis (102, 118), sobre los PL de las LDL nativas, produce la liberación de importantes cantidades de AA al torrente sanguíneo (119-121). Finalmente, las plaquetas reclutadas hacia el endotelio activado constituyen otra fuente de producción de AA libre en los focos de aterosclerosis (91) (**Figura A.6**).

Debido a que ya se han descrito marcadores lipídicos de activación inflamatoria en monocitos (122), alguno de ellos con importantes propiedades biológicas (123), sería de gran interés buscar marcadores similares de formación de LD con las herramientas que proporciona la avanzada técnica de la espectrometría de masas. Además, los trabajos anteriormente citados sobre formación de monocitos espumosos no estudian los cambios del metabolismo lipídico ni las rutas de señalización que llevan a la biosíntesis de LD en monocitos, por lo que se hace necesario un estudio a ese nivel.

INTRODUCCIÓN

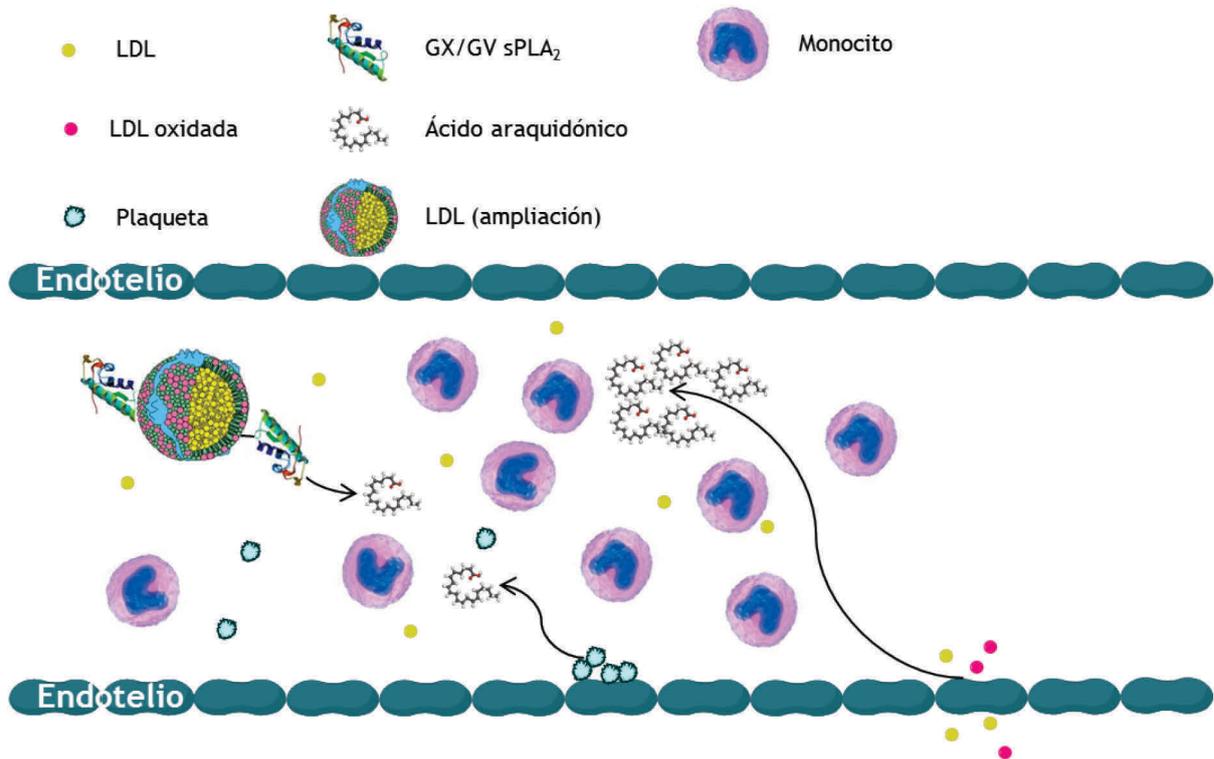


Figura A.6. *Ácido araquidónico libre en focos de aterosclerosis.* La activación endotelial resulta en la liberación por parte de estas células de grandes cantidades de AA libre al torrente circulatorio, así como el reclutamiento de plaquetas, que también pueden contribuir a la generación de AA. Las PLA₂ secretadas asociadas a los focos de aterosclerosis pueden catalizar la liberación del AA esterificado en los PL de las LDL.

A.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GOTAS LIPÍDICAS POR FOSFOLIPASAS A₂

A.2.1. FOSFOLIPASAS A₂

A.2.1.1. CLASIFICACIÓN

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son un grupo heterogéneo de enzimas que han sido clasificadas según criterios de homología de secuencia. La última actualización de su clasificación incluyó 16 grupos, muchos de ellos con varios subgrupos, dando lugar a más de 30 enzimas (124). Aunque la mayor parte de estas proteínas presenta actividad fosfolipasa A₂, es decir, hidroliza el ácido graso en la posición *sn*-2 de los glicerofosfolípidos, dando como productos un ácido graso libre y un 2-lisofosfolípido (Figura A.7), alguno de sus miembros presenta una baja o nula actividad PLA₂. Por el contrario, alguna de las enzimas de esta familia muestra otras actividades además de la PLA₂, como fosfolipasa A₁, lisofosfolipasa, transacilasa o triacilglicerol lipasa (124, 125).

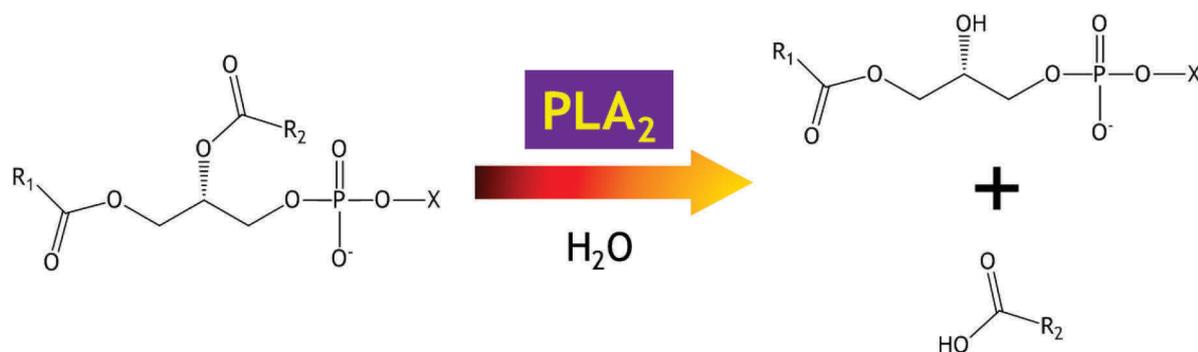


Figura A.7. Reacción de hidrólisis del ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 de un glicerofosfolípido, catalizada por una fosfolipasa A₂ (PLA₂). R₁: Ácido graso incorporado en la posición *sn*-1 del glicerol. R₂: Ácido graso incorporado en la posición *sn*-2 del glicerol. X: H, colina, etanolamina, inositol, serina, glicerol.

Hay una clasificación alternativa más simplificada de las PLA₂, que en muchas ocasiones es más conveniente y sencilla. En ella se dividen esas más de 30 enzimas en 6 grupos, de acuerdo a características bioquímicas y funcionales. Estos grupos incluyen las PLA₂ citosólicas dependientes de Ca²⁺ (cPLA₂), las PLA₂ citosólicas independientes de Ca²⁺ (iPLA₂), las PLA₂ secretadas dependientes de Ca²⁺ (sPLA₂), las acetil hidrolasas de factor activador de plaquetas (PAF-AH), la PLA₂ lisosomal (LPLA₂) y la PLA₂ específica de tejido adiposo (AdPLA₂) (124, 125).

Las PLA₂ se encuentran expresadas en prácticamente todas las células y tejidos y juegan papeles importantes en múltiples procesos biológicos e intervienen en el desarrollo de numerosas patologías. Acorde a esto, se han publicado muchas revisiones que cubren aspectos bioquímicos, reguladores, catalíticos y fisiológicos/fisiopatológicos de esta gran familia de enzimas (124-127), aunque este trabajo se centrará en presentar sus funciones como reguladores de la síntesis celular de gotas lipídicas.

A.2.1.2. ROLES DE LAS FOSFOLIPASAS A₂ EN RESPUESTA INFLAMATORIA Y METABOLISMO DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

De las 6 clases de PLA₂, se ha descrito que las cPLA₂ y sPLA₂ son cruciales en la movilización de AA, evento necesario para la síntesis de eicosanoides en respuesta a estímulos proinflamatorios (128, 129). La cPLA₂ de grupo IVA o cPLA₂α es la enzima clave en este proceso, pues muestra una marcada preferencia por hidrolizar los PL conteniendo AA (126). Entre las sPLA₂, las de los grupos IIA, V y X pueden amplificar la liberación de AA, bien liberando AA por ellas mismas o bien modulando el estado de activación de la cPLA₂α (130, 131). Las iPLA₂ no participan generalmente en la liberación de AA, pero en respuesta a agonistas específicos sí se han descrito como enzimas movilizadoras de AA (124, 132). Sin embargo, se cree que son importantes para la homeostasis celular de AA, pues proveen lisofosfolípidos aceptores de éste ácido graso en reacciones de reacilación (133-135). Los otros 3 grupos de PLA₂ tienen actuaciones mucho más específicas y presentan roles minoritarios en el metabolismo celular de ácidos grasos (125).

A.2.1.3. FOSFOLIPASAS A₂ Y GOTAS LIPÍDICAS: CONSIDERACIONES BÁSICAS

La íntima relación de algunas PLA₂, como la cPLA₂α, con los LD (28), así como el descubrimiento de que muchas de estas enzimas están involucradas en patologías donde la formación de LD juega un papel esencial (102, 118, 136) ha hecho que se haya publicado

un buen número de trabajos que proponen que las PLA₂ son reguladores esenciales en la síntesis de LD. Las PLA₂ actúan a distintos niveles en el proceso de biosíntesis de las gotas lipídicas, aunque de forma general pueden: (i) proveer ácidos grasos libres hidrolizados de PL de membrana para la síntesis de lípidos neutros (36-38, 137); (ii) modificar partículas que contienen PL, como las lipoproteínas, para facilitar su internalización por parte de las células (102, 120, 138-141); (iii) generar metabolitos que regulen las síntesis de los LD (57, 142) y (iv) ser reguladores directos de la formación del orgánulo (35, 143)

A.2.2. FOSFOLIPASAS A₂ CITOSÓLICAS Y GOTAS LIPÍDICAS

A día de hoy se han identificado 6 cPLA₂ en mamíferos, que se clasifican dentro del grupo IV de la familia de PLA₂ con los sufijos A-F (Tabla A.1). Estas enzimas se caracterizan por tener un alto peso molecular (64-114 KDa) y, con excepción de la del grupo IVC o cPLA₂γ, un dominio C2 de unión a Ca²⁺ en su extremo amino terminal que permite a estas enzimas translocarse a las membranas intracelulares. Requieren de concentraciones micromolares de Ca²⁺ para ejercer su actividad catalítica (124-126).

La enzima mejor caracterizada de este grupo es la de grupo IVA o cPLA₂α, que para su completa activación requiere, además de esas concentraciones de Ca²⁺, la fosforilación por ciertas quinasas y la asociación con fosfoinosítidos o ceramida-1 fosfato (144). Se ha demostrado que tras la activación de las células con una gran variedad de estímulos, esta enzima se transloca a membranas intracelulares como la membrana perinuclear, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los fagosomas, la membrana plasmática o las gotas lipídicas, donde se ha visto que interviene en distintos eventos relacionados con el tráfico intracelular de membranas (28, 83, 125, 126, 145-148).

A.2.2.1. PAPEL DE LA CPLA₂α EN LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN MACRÓFAGOS EXPUESTOS A LDL OXIDADAS

Cuando los macrófagos internalizan las LDL oxidadas (oxLDL) las derivan a sus lisosomas, donde una parte de sus CE puede ser hidrolizada por la acción de una lipasa ácida, siendo usado el colesterol libre producido para las necesidades de las membranas celulares. Cuando la cantidad de colesterol libre es excesiva para los requerimientos celulares, es reaclido con un ácido graso libre mediante la acción de la ACAT y almacenado en LD, cuya acumulación en los macrófagos acaba dando lugar a la formación de células espumosas. Las células usan este mecanismo energéticamente costoso, para

evitar la lipotoxicidad producida por el colesterol libre, una de las causas de la apoptosis de los macrófagos y la progresión de la placa aterosclerótica (92, 149, 150).

El hecho de que la composición de ácidos grasos de los CE de las células espumosas difiera del de las LDL, sugiere que parte de los ácidos grasos con los que se reaccila el colesterol libre no son los mismos que libera la lipasa ácida lisosomal y podrían provenir de fuentes endógenas de la célula (38). En ese sentido el inhibidor de cPLA₂ e iPLA₂ metil araquidonoil fluorofosfonato, pero no el de iPLA₂ bromoenol lactona, bloquea la síntesis de CE por oxLDL en macrófagos (38, 151), sugiriendo que alguna cPLA₂, probablemente la cPLA₂ α , esté implicada en la generación de ácidos grasos libres en esa reaccilación, pues esos inhibidores no afectan la actividad ACAT ni la tasa de internalización de las oxLDL en las células (38) (Tabla A.1). Estudios independientes ya habían mostrado que las oxLDL inducen la activación de la cPLA₂ α y la liberación de eicosanoides (152).

Se han propuesto dos mecanismos que regularían la formación de CE y posterior síntesis de LD mediada por la cPLA₂ en macrófagos expuestos a oxLDL. La primera es la activación de la síntesis de ceramidas *de novo* por la oxLDL (151, 153), cuyos niveles elevados, así como de su producto la ceramida-1-fosfato inducen la activación de la cPLA₂ α (154-156). El segundo mecanismo propuesto es la disponibilidad del producto oxidado del ácido linoleico, principal componente de las LDL, el ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE), que puede ser hidrolizado de las oxLDL por la PLA₂ asociada a lipoproteínas (PLA₂ de grupo VIIA o Lp-PLA₂) en los focos de aterosclerosis (157). El efecto activador del 13-HODE sobre la cPLA₂ α parece estar dado por su carácter aniónico, que favorecería la translocación de la enzima a las membranas para llevar a cabo su función hidrolítica (38, 158), como se ha reportado que ocurre con otros muchos lípidos aniónicos (144, 159, 160). El efecto del 13-HODE también puede explicarse a través de su incorporación a las membranas, que afectaría a sus propiedades biofísicas, incrementando la afinidad de la cPLA₂ α por los fosfolípidos de membrana (158).

A.2.2.2. PAPEL DE LA CPLA₂ α EN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS EN EL HÍGADO

El estudio de la regulación de la síntesis y acumulación de LD en el hígado tiene una gran importancia fisiopatológica debido a que este órgano es clave en el metabolismo general de lípidos neutros, el ensamblaje y secreción de lipoproteínas o la biosíntesis de colesterol. La formación anormal de LD en el hígado parece estar ligada a un amplio

INTRODUCCIÓN

número de patologías como la esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o infección por el virus de la hepatitis C (61, 64, 70-72, 161).

Mediante estudios hechos en ratones deficientes de $cPLA_2\alpha$ se ha visto que esta enzima está implicada en la deposición de TAG en el hígado bajo una dieta alta en grasa, protegiendo a los ratones de desarrollar esteatosis hepática (142) (Tabla A.1). El hecho de encontrar niveles circulantes de prostaglandina E_2 (PGE_2), un promotor de la síntesis de TAG en el hígado (162, 163), más bajos en los ratones *knockout* de $cPLA_2\alpha$ que en los *wild type*, hace pensar que la liberación de AA por esta enzima y su conversión en PGE_2 es el mecanismo a través del cual la $cPLA_2\alpha$ regularía la acumulación de TAG y LD en células hepáticas (142).

Además, el ciclo vital del virus de la hepatitis C está estrechamente ligado a las gotas lipídicas de los hepatocitos, así como a la secreción de VLDL (70-72), de ahí que los mecanismos de formación de LD hayan sido explorado como una posible estrategia terapéutica de la enfermedad (73, 164). Se cree que el virus de la hepatitis C aprovecha la maquinaria celular que conduce a la formación de LD en los hepatocitos para su ensamblaje, replicación y expansión, incluyendo en esa maquinaria a la $cPLA_2\alpha$ (74). Debido a ello, la inhibición de la enzima con pirrofenona resulta en una dramática bajada de la formación de LD así como de la infectividad del virus (74) (Tabla A.1). Curiosamente, una segunda PLA_2 citosólica, la $cPLA_2\gamma$, ha sido relacionada también con el ensamblaje y replicación de este virus, y la bajada de sus niveles de expresión también resulta en una menor infectividad del virus de la hepatitis C (75). El efecto de esta enzima parece deberse a que regula la formación de la tela membranosa (*membranous web*), una estructura derivada de las membranas del retículo endoplásmico que posee una forma y curvatura únicas, y que es esencial para la replicación del virus (71, 75). El hecho de que la $cPLA_2\gamma$ sea una enzima asociada al retículo endoplásmico y tenga naturaleza inducible en hepatocitos (165) ayudaría a explicar el aumento de su expresión tras la infección del virus de la hepatitis C y su rol en la formación de esa tela membranosa necesaria para la replicación del mismo a partir de las membranas del retículo.

Grupo	Nombre trivial	MW (KDa)	Tipo de enzima	Otra actividad catalítica	Papel en la formación de LD	Ref.
IVA	cPLA ₂ α	85	Citosólica, dependiente Ca ²⁺	Lisofosfolipasa, transacilasa	Inh: Bajada formación <i>foam cells</i> KO: Bajada TAG hígado Inh: Bajada formación LD en hígado	(38, 158) (142) (74)
IVB	cPLA ₂ β	114	Citosólica, dependiente Ca ²⁺			
IVC	cPLA ₂ γ	64	Citosólica, independiente Ca ²⁺	Lisofosfolipasa		
IVD	cPLA ₂ δ	91	Citosólica, dependiente Ca ²⁺			
IVE	cPLA ₂ ε	95	Citosólica, dependiente Ca ²⁺			
IVF	cPLA ₂ ζ	95	Citosólica, dependiente Ca ²⁺			

Tabla A.1. Clasificación, características e implicación de las PLA₂ citosólicas dependientes de Ca²⁺ (cPLA₂) en la formación de gotas lipídicas.

Inh: Inhibición química. KO: *Knockout*. MW: Masa molecular.

A.2.3. OTRAS FOSFOLIPASAS A₂ EN LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS

La iPLA₂β se ha descrito como la enzima clave en la síntesis de TAG previa a la formación de LD inducida por estímulos de estrés, al liberar ácidos grasos de los PL celulares para su esterificación en lípidos neutros (36). Por otra parte, la iPLA₂γ ha sido involucrada en la liberación de ácidos grasos de los PL de las membranas mitocondriales en miocardio de ratón, resultando en la acumulación de TAG, exacerbada por la reducción de la β-oxidación de ácidos grasos debida a los fallos funcionales provocados en las mitocondrias (137, 166).

Por su parte, varias PLA₂ secretadas se han encontrado en focos de aterosclerosis y su acción catalítica se ha relacionado con la formación de LD en macrófagos y la acumulación de células espumosas en modelos de la enfermedad (102, 118). Desde un punto de vista general, las sPLA₂ actúan modificando las lipoproteínas nativas circulantes a través de la hidrólisis de sus fosfolípidos, generando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos que modifican el tamaño, carga eléctrica, susceptibilidad hacia la oxidación y/o estado de agregación de las lipoproteínas nativas. Estos cambios facilitan su internalización por parte de los macrófagos, resultando en la acumulación de LD y en la formación de células espumosas por distintos mecanismos que dependen de la afinidad de las enzimas sPLA₂ por

INTRODUCCIÓN

los distintos sustratos. Las sPLA₂ de los grupos III, V y X se han mostrado eficientes en la hidrólisis de los PL de las partículas de LDL y posterior formación de LD en macrófagos (120, 138, 139, 167). Por su parte, la acción catalítica de la sPLA₂ de grupo IIA sobre los PL de las LDL facilita su migración al sub-endotelio resultando en un aumento de la formación de LD por parte de los macrófagos (140, 168). Además, la actuación de algunas de estas sPLA₂ sobre los PL de las partículas de HDL circulantes reduce su capacidad para retirar los CE de las células espumosas (169).

Otras PLA₂ como la de grupo VIIA (PLA₂ asociada a lipoproteína o Lp-PLA₂) o la de grupo XV (PLA₂ lisosomal) se han relacionado con la formación de células espumosas (170) y su fenotipo relacionado, la fosfolipidosis, en macrófagos (171, 172).

Un compendio sobre otras PLA₂ que intervienen en la biosíntesis de las gotas lipídicas en múltiples modelos celulares puede verse en Guijas *et al.* (173). El resumen de sus características bioquímicas e implicación en la formación de LD se muestra en la **Tabla A.2.**

Grupo	Nombre trivial	MW (KDa)	Tipo de enzima	Otra actividad catalítica	Papel en la formación de LD	Ref.
IA		13-15	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
IB	PLA ₂ pancreática	13-15	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
IIA		13-15	Secretada, dependiente Ca ²⁺		AE: Promueve formación LD en macrófagos SE: Induce formación de <i>foam cells</i>	(37) (140)
IIB		13-15	Secretada, dependiente Ca ²⁺	Inactiva		
IIC		15	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
IID		14-15	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
IIE		14-15	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
IIF		16-17	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
III		15-18	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
V		14	Secretada, dependiente Ca ²⁺		AE: Induce formación <i>foam cells</i>	(139, 174)
VIA	iPLA ₂ , iPLA ₂ β	88-90	Citosólica, independiente Ca ²⁺	PLA ₁ , lisofosfolipasa, PAF acetilhidrolasa, transacilasa	Inh, KD: Bajada formación LD por estímulos de estrés en células CHO-K1	(36)

INTRODUCCIÓN

VIB	iPLA ₂ γ	88	Citosólica, independiente Ca ²⁺		SE: Acumulación TAG en miocardio	(137)
VIIA	PAF-AH, Lp-PLA ₂	45	Secretada, independiente Ca ²⁺	Lipasa, esterasa, transacetilasa	SE: Atenuación formación <i>foam cells</i>	(141)
VIIIB	PAF-AH - II	40	Intracelular, independiente Ca ²⁺			
VIIIA	PAF-AH (α 1)	26	Independiente Ca ²⁺			
VIIIB	PAF-AH (α 2)	26	Independiente Ca ²⁺			
IX	Conodipina M	14	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
X		14	Secretada, dependiente Ca ²⁺		AE: Induce formación <i>foam cells</i> AE/SE: Induce formación LD en varios tipos celulares	(119, 121) (57, 167)
XIA		12.4	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
XIB		12.9	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
XIIA		19	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
XIIB		19.7	Secretada, dependiente Ca ²⁺	Inactiva	KO: Incremento TAG en hígado	(175)
XIII		<10	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
XIV		13-19	Secretada, dependiente Ca ²⁺			
XV	PLA ₂ lisosomal	45	Lisosomal, independiente Ca ²⁺	Transacilasa	KO: Induce formación <i>foam cells</i>	(172)
XVI	PLA ₂ de tejido adiposo	18	Dependiente/independiente Ca ²⁺	PLA ₁		

Tabla A.2. Clasificación, características e implicación de otras PLA₂ distintas a las cPLA₂ en la formación de gotas lipídicas.

AE: Adición externa. SE: Sobreexpresión. Inh: Inhibición química. KD: *Knockdown* (SiRNA). KO: *Knockout*. MW: Masa molecular.

A.3. EL ÁCIDO PALMITOLEICO Y SUS ISÓMEROS

Al igual de lo que ocurre con muchos ácidos grasos, el ácido graso 16:1 presenta diversos isómeros posicionales, siendo el mayoritario, así como el más estudiado, el ácido palmitoleico (16:1*n*-7). Se acepta que la mayor parte de ácido palmitoleico que aparece en los tejidos de mamíferos proviene de su síntesis a partir de 16:0 (**Figura A.8**), dado que los alimentos más comunes presentan cantidades muy bajas del mismo (176, 177). De hecho, se considera un marcador de la activación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (178). Este ácido graso aparece esterificado en lípidos más complejos en hígado y tejido adiposo especialmente, donde la síntesis *de novo* de ácidos grasos es mayor, así como en la mayoría de tejidos, aunque en menores concentraciones (176).

Otro isómero conocido del ácido graso 16:1 es el 16:1*n*-10 o ácido sapiénico, que se ha encontrado en glándulas sebáceas, pelo y uñas humanas, así como formando parte de algunos fosfolípidos del surfactante pulmonar (179-182). Este ácido graso también se forma *de novo* a partir de 16:0, pues no se conocen fuentes alimenticias del mismo (**Figura A.8**). A parte de esos dos isómeros, en el suero humano suele aparecer también el ácido *trans* palmitoleico o palmitelaídico (16:1*n*-7*t*), adquirido a través de la ingesta de productos lácteos y en menor medida de aceites vegetales parcialmente hidrogenados (183) (**Figura A.8**).

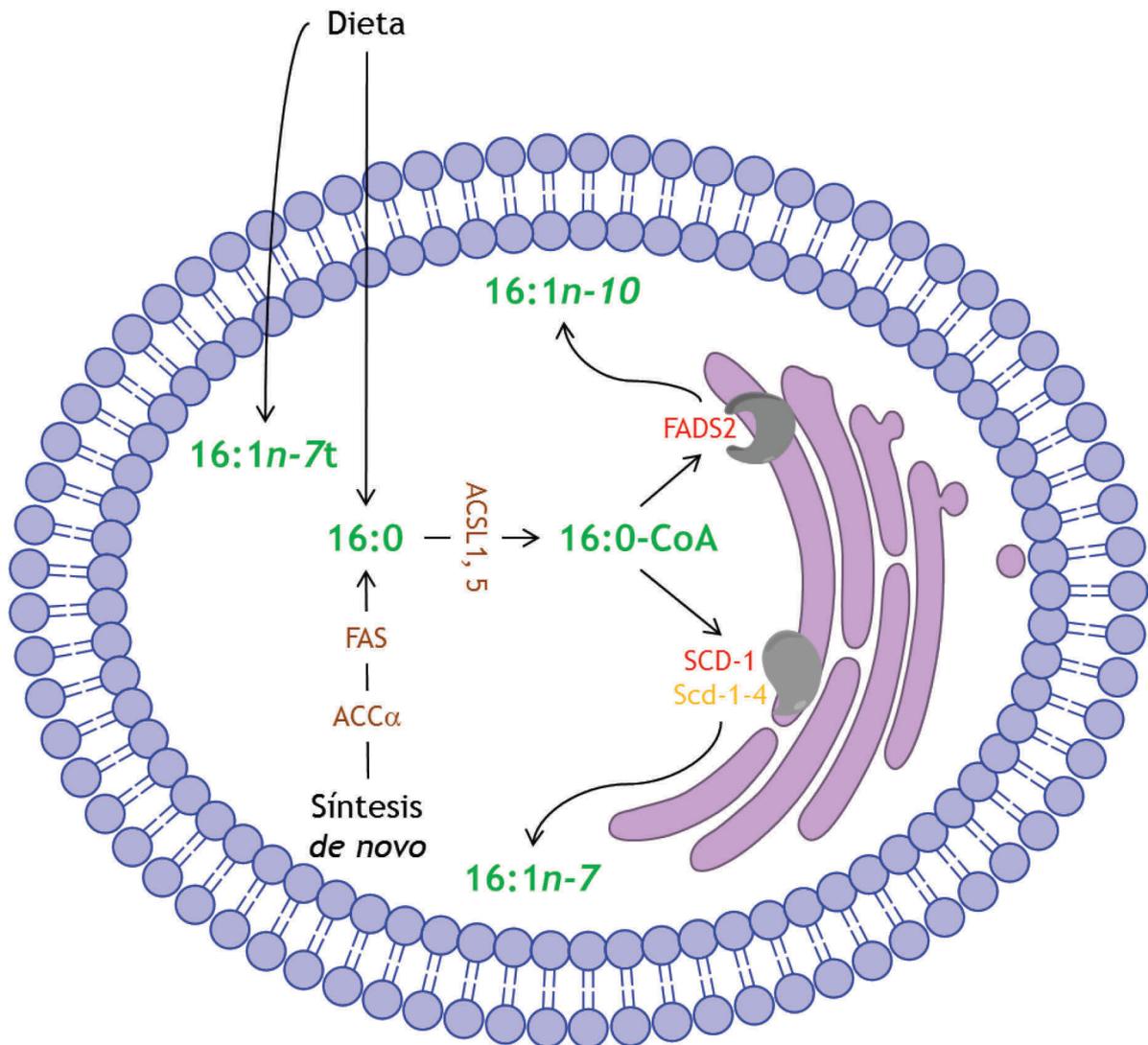


Figura A.8. Rutas metabólicas de formación de isómeros del ácido graso 16:1. El ácido palmítico (16:0) puede ser adquirido de la dieta o ser sintetizado *de novo* en el citoplasma tras la acción secuencial de las enzimas $ACC\alpha$ y FAS. Tras su activación mediante la tioesterificación a CoA vía ACSL, puede sufrir una desaturación entre sus carbonos 9 y 10 dando lugar a ácido palmitoleico (16:1*n*-7). Esa reacción se produce en el retículo endoplásmico por las enzimas esteroil-CoA desaturasas, un grupo de enzimas de la familia de proteínas unidas a membrana (en rojo las proteínas humanas y en naranja las de ratón). Además, en ciertos tejidos humanos, el 16:0 puede ser desaturado entre sus carbonos 6 y 7 dando lugar a ácido sapiénico (16:1*n*-10). Esa reacción también se produce en el retículo endoplásmico por la enzima desaturasa de ácidos grasos 2 (FADS2), también del grupo de las proteínas unidas a membrana. En humanos, el 16:1*n*-7t sólo puede ser adquirido a través de la dieta.

A.3.1. EL ÁCIDO PALMITOLEICO Y SU EFECTO EN SÍNDROME METABÓLICO

El ácido palmitoleico recibió escasa atención hasta el año 2008, cuando en ratones se describió que tras ser sintetizado *de novo* en el tejido adiposo era liberado al torrente sanguíneo, actuando en tejidos periféricos como una hormona lipídica o lipoquina, mejorando la sensibilidad a insulina en el músculo y previniendo la esteatosis hepática en hígado bajo una dieta alta en grasa (184). Curiosamente, a pesar de que el 16:1*n*-7 producido en tejido adiposo se debe a un aumento de su síntesis *de novo* en ese órgano, la reducción de la esteatosis hepática bajo dieta alta en grasa producida por el ácido graso se debía a la inhibición de la enzima lipogénica estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD-1) hepática (184).

Este resultado es altamente sorprendente debido a que hasta el momento se había aceptado que la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo era un factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a insulina o esteatosis hepática (58-60). Debido al gran impacto que tuvo ese trabajo, en los sucesivos años se intentó extender este resultado a otros modelos de ratón y humanos, con resultados contradictorios.

Además de lo ya descrito anteriormente, se ha comprobado que el ácido palmitoleico tiene efectos beneficiosos sobre la sensibilidad a insulina de células musculares (185), el incremento de la transcripción de PPAR γ en adipocitos (186), la viabilidad y proliferación de células β -pancreáticas (187) o el estrés de retículo en macrófagos (188). Además, algunos trabajos proponen que sus niveles circulantes son un buen marcador de sensibilidad a insulina (189). Esos resultados definen al 16:1*n*-7 como una lipoquina con efectos sistémicos beneficiosos en el síndrome metabólico.

Sin embargo otros trabajos, esencialmente epidemiológicos, han descubierto efectos totalmente contrarios del ácido palmitoleico. En ese sentido, se han relacionado altos valores de 16:1*n*-7 con estados de obesidad (190-192), pancreatitis (193), esteatosis hepática (194), factores de riesgo cardiometabólico (195) o enfermedad cardiovascular (196). Además, contrariamente a Stefan *et al.* (189), otro estudio más amplio propone que la sensibilidad a insulina en tejido periférico no está asociada con la disponibilidad de ácido palmitoleico en plasma de pacientes obesos, ni como ácido graso libre, ni como componente de los TAG de las VLDL (197). Finalmente, los valores elevados de 16:1*n*-7 en los eritrocitos se han relacionado con elevado riesgo de sufrir síndrome metabólico (198, 199).

Estos resultados contradictorios se han dado incluso dentro del mismo estudio. Por ejemplo, la suplementación con 16:1*n*-7 induce esteatosis en el hígado mediante la activación de su lipogénesis *de novo*, pero a su vez mejora la sensibilidad a insulina a nivel sistémico y tampona la producción de citoquinas proinflamatorias en hepatocitos y macrófagos. Estos resultados mostrarían que este ácido graso estaría disociando la inflamación de la esteatosis dentro del hígado (200). Otro estudio en pacientes muestra que valores más altos de ácido palmitoleico en plasma están asociados con menores niveles de LDL y mayores de HDL, reduciendo el riesgo cardiovascular; sin embargo, esos mismos niveles elevados de ácido graso se asocian con mayores valores circulantes de TAG y mayor resistencia a insulina (178).

La explicación para estos resultados podría venir de la fuente de producción del ácido palmitoleico, entre el sintetizado en el tejido adiposo y el sintetizado en el hígado, que podrían tener efectos opuestos. De esa manera, en un modelo animal en el que este ácido graso tiene efectos beneficiosos, sus altos valores en plasma se deben a la estimulación de su síntesis *de novo* en tejido adiposo, que suprime la misma en hígado y mejora la resistencia a insulina (178, 184). Sin embargo, cuando la síntesis *de novo* ha sido experimentalmente estimulada en humanos, es la síntesis hepática, y no la que se produce en tejido adiposo, la que contribuye de forma más clara al aumento de los niveles de ácido palmitoleico, que en muchos casos presenta efectos adversos en esos modelos (178, 184). Además, los efectos contrarios observados pueden provenir de que muchos estudios miden el ácido palmitoleico de forma distinta, es decir, cuando se considera que es una lipoquina se tiende a pensar que está en el flujo sanguíneo en forma de ácido graso libre y que su origen es de la lipólisis de TAG de tejido adiposo, pero puede presentarse esterificado en otras fuentes circulantes de lípidos como PL, TAG o CE, cuyo origen sería la secreción desde el hígado en forma de lipoproteínas y en las que podría tener efectos distintos. Luego, posibles tratamientos con este ácido graso requieren futuras investigaciones para clarificar los efectos metabólicos del mismo, así como para determinar exactamente cuál es la forma lipídica con actividad biológica del ácido graso y su fuente de síntesis (176, 178). En la **Tabla A.3** se muestra un resumen de sus efectos a nivel metabólico.

A.3.2. EL ÁCIDO PALMITOLEICO EN INFLAMACIÓN

Acorde al estado de inflamación de bajo grado asociado a los trastornos metabólicos previamente descritos, se ha asignado también al ácido palmitoleico una función en la respuesta inflamatoria. Así, se ha descrito que el 16:1*n*-7 producido en

tejido adiposo, además de mejorar la respuesta metabólica de hígado y músculo, también atenúa la respuesta inflamatoria del propio tejido adiposo (184).

De esa manera, el medio condicionado producido por macrófagos de ratón J774 tratados con ácido palmítico, un conocido activador de TLR4/2 (201), induce resistencia a insulina en células musculares, efecto que es revertido cuando se preincuban los macrófagos con 16:1*n*-7, dando lugar a un medio condicionado que sensibiliza a insulina las células musculares (202). Se cree que ese efecto protector del ácido palmitoleico se debe a que los macrófagos tratados con el mismo no producen una respuesta inflamatoria mediada por la secreción de $Tnf\alpha$ sobre las células musculares, contrariamente a lo que ocurre con el ácido palmítico (202). Además, el ácido palmitoleico revierte la expresión génica y proteica de *Nos2* y MCP-1 inducida por el 16:0 en los macrófagos (202). Una respuesta antiinflamatoria similar se ha observado en hepatocitos primarios de ratón gracias a la suplementación con 16:1*n*-7, que reduce la expresión de $NF\kappa B$, $Tnf\alpha$, *Il6* e *Il12* (200, 203).

Se han descrito efectos análogos en macrófagos derivados de médula ósea de ratón, en los cuales tanto la obesidad asociada a una dieta alta en grasa como el tratamiento con ácido palmítico provocan una activación proinflamatoria (aumento de la expresión génica y proteica de *Nos2*, *Cxcl1*, *Il6* y $Tnf\alpha$ y de la translocación al núcleo de $NF\kappa B$) que es revertida por su incubación *ex vivo* con 16:1*n*-7 (204). Este efecto podría deberse a la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) por el ácido palmitoleico, que puede antagonizar la inflamación producida por ácidos grasos saturados (204). Aunque en algunos modelos similares el ácido oleico reduce la activación proinflamatoria producida por el ácido palmítico (205), en este trabajo en particular, ni el ácido *trans* palmitoleico ni el ácido oleico logran reproducir la excelente respuesta antiinflamatoria del 16:1*n*-7 (204).

Estos trabajos proponen que el efecto del ácido palmitoleico sobre la activación proinflamatoria del macrófago podría venir dado por su polarización hacia un estado M2 antiinflamatorio (202, 204, 206). No parece que el efecto del 16:1*n*-7 se produzca como resultado de la inhibición de TLR4, dado que el ácido graso se comporta de forma antiinflamatoria *per se* en ausencia de palmítico (200, 202, 204), lo cual abre la posibilidad de que pueda actuar a través de un receptor que inicie una ruta de señalización que activase AMPK como por ejemplo GPR120, un conocido sensor de los efectos antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3 (207, 208).

A pesar de que todos los resultados sobre el efecto en inflamación del 16:1*n*-7 añadido de forma exógena van en la línea de que es un potente agente antiinflamatorio, en estudios epidemiológicos con pacientes se ha encontrado que sus altos valores en

eritrocitos sanguíneos (198) o en plasma (209) son un indicador de algunos marcadores de activación proinflamatoria como la proteína C reactiva. Los efectos del ácido palmitoleico en modelos de inflamación pueden consultarse en la **Tabla A.3**.

A.3.3. EL ÁCIDO PALMITOLEICO FORMANDO PARTE DE OTROS LÍPIDOS

Muchas de las controversias generadas por los efectos del 16:1 n -7 vienen dadas porque no se ha definido de forma exacta si realiza sus efectos como ácido graso libre o incorporado a lípidos más complejos cuya formación esté más estrechamente regulada y donde podría tener efectos biológicos distintos. En ese sentido se ha descubierto que la estimulación de fibroblastos 3T3 con factores de crecimiento promueve la síntesis de ácido palmitoleico y su incorporación en la posición *sn*-2 de moléculas de fosfatidilinositol mediante la ruta de síntesis *de novo* de fosfolípidos, comportándose como mitógeno e induciendo la proliferación celular (210). Sin embargo, aunque la suplementación de las células con ácido palmitoleico aumenta los niveles de PI conteniendo este ácido graso e induce la proliferación o la restaura en caso de que se bloquee su síntesis con un inhibidor de la SCD-1, no se descarta que el efecto mitogénico del ácido graso pueda ser a través de su forma libre o formando otras especies lipídicas (210). Además, otro trabajo del mismo grupo ha identificado que especies de PI conteniendo ácido palmitoleico son posibles mediadores de la homeostasis de RE en respuesta a estímulos de estrés (211).

Por último, recientemente se han descubierto en tejido adiposo, plasma e hígado de ratones y humanos una nueva familia de 16 lípidos bioactivos llamados ácidos grasos esterificados a ácidos grasos hidroxilados (FAHFA), varios de ellos presentando ácido palmitoleico y ácido palmitoleico oxidado (212). Su síntesis está regulada por la dieta y sus niveles están inversamente relacionados con estados de obesidad y resistencia a insulina. Además, concentraciones en el rango micromolar de alguno de estos compuestos son capaces de ejercer potentes efectos antiinflamatorios tanto *in vitro* como *in vivo* (reducción de Il1 β , Il12 y Tnf α), cosa que sus componentes por separado no son capaces de reproducir a concentraciones mayores (212). Este trabajo abre un nuevo paradigma sobre los posibles efectos del ácido palmitoleico en enfermedades metabólicas e inflamación, pues no sólo da importancia al ácido graso en sí, sino también a sus derivados hidroxilados, de forma análoga a lo que ocurre con los ácidos grasos poliinsaturados. Un resumen de la acción biológica de estos compuestos se puede consultar en la **Tabla A.3**.

INTRODUCCIÓN

Modelo animal	Forma bioquímica	Efecto biológico	Ref.
EFFECTOS METABÓLICOS DEL ÁCIDO PALMITOLEICO			
Ratón	Ácido graso libre	Prevención de esteatosis hepática Mejora de la sensibilidad a insulina en músculo	(184)
Ratón		Mejora de la sensibilidad a insulina en músculo	(185)
Humano		Incremento de la transcripción de PPAR γ en adipocitos	(186)
Humano		Protección de células β -pancreáticas de apoptosis y pérdida de función	(187)
Ratón		Alivio del estrés de retículo en macrófagos	(188)
Ratón		Mejora de la sensibilidad a insulina sistémica	(200)
Ratón		Inducción de esteatosis hepática	(200)
Ratón	Esterificado en fosfatidilinositol	Prevención del estrés de retículo en fibroblastos	(211)
Ratón	Formando parte de FAHFA	Mejora de la sensibilidad a insulina	(212)
EFFECTOS EN INFLAMACIÓN DEL ÁCIDO PALMITOLEICO			
Ratón		Reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias en hepatocitos y macrófagos	(200)
Ratón		Reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias en tejido adiposo	(184)
Ratón		Reversión de la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos	(202)
Ratón		Reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias en hepatocitos	(203)
Ratón		Reversión de la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos	(204)
Ratón	Formando parte de FAHFA	Reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos de tejido adiposo	(212)
OTROS EFECTOS BIOLÓGICOS DEL ÁCIDO PALMITOLEICO			
Rata		Inducción de daño en células pancreáticas	(193)
Ratón	Esterificado en fosfatidilinositol	Inducción de la proliferación celular de fibroblastos	(210)
ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS CON ÁCIDO PALMITOLEICO			
Humano	Ácido graso libre	Altos niveles en plasma se corresponden a mayor sensibilidad a insulina	(189)

INTRODUCCIÓN

Humano	Esterificados en lípidos totales	Altos niveles en plasma se relacionan con obesidad infantil	(190)
Humano	Esterificados en lípidos totales	Altos niveles en plasma se relacionan con grasa abdominal	(191)
Humano	Esterificado en lípidos totales	Altos niveles en tejido adiposo se relacionan con obesidad	(192)
Humano	Ácido graso libre y esterificado en TAG de VLDL	Altos niveles en plasma se corresponden con esteatosis hepática	(194)
Humano	Esterificado en CE	Altos niveles en plasma se corresponden con mayores niveles de proteína C reactiva	(195)
Humano	Esterificado en CE	Altos niveles en plasma están relacionados con mortalidad cardiovascular	(196)
Humano	Esterificado en lípidos totales	Altos niveles en eritrocitos se corresponden con alto riesgo de sufrir síndrome metabólico	(198, 199)
Humano	Esterificado en lípidos totales	Altos niveles en eritrocitos se corresponden con alto riesgo de sufrir diabetes	(199)
Humano	Esterificado en PL	Altos niveles en plasma están asociados a menor LDL y mayor HDL	(178)
Humano	Esterificado en PL	Altos niveles en plasma están asociados a elevado TAG y resistencia a insulina	(178)
Humano	Esterificado en lípidos totales	Altos niveles en plasma están asociados con marcadores de inflamación	(209)
Humano	Formando parte de FAHFA	Altos niveles en plasma están relacionados con sensibilidad a insulina	(212)

Tabla A.3. Efectos biológicos del ácido palmitoleico en diversos modelos y correlación de sus valores con distintas patologías.

Verde: Efectos beneficiosos. Rojo: efectos adversos.

En términos generales, el 16:1n-7 cumple los principales requerimientos para ser una hormona: contrariamente al resto de ácidos grasos, sus niveles en plasma cambian drásticamente bajo ciertas condiciones metabólicas (178, 184, 189, 191, 192, 212); su concentración en tejidos es baja a menos que se estimule la síntesis *de novo* (176, 184, 210); su eficacia en los tejidos diana se puede alcanzar a concentraciones micromolares (210, 212) y su síntesis está estrechamente regulada (210-212). Lo que parece claro es que para determinar de forma más exacta los efectos del ácido palmitoleico como lipoquina habrá que estudiar no sólo su disponibilidad en plasma, que genera resultados contradictorios, sino su distribución en fosfolípidos, FAHFA y otras clases de lípidos dentro de los tejidos, buscando las posibles formas químicas a través de las cuales lleva a cabo su efecto biológico (210-212).

A.3.4. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ISÓMEROS DEL ÁCIDO PALMITOLEICO

A.3.4.1. ÁCIDO SAPIÉNICO (16:1n-10)

El ácido sapiénico, secretado de las moléculas de triacilglicerol en las glándulas sebáceas, es un componente mayoritario del sebo humano, donde se ha descrito que es un potente agente frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (181, 182, 213). Se cree que el 16:1n-10 activa la cascada proteolítica de los estafilococos, pero no se conocen más mecanismos por los cuales el ácido graso lleva a cabo su función (213). Curiosamente, los efectos inhibitorios *in vitro* en el crecimiento de *S. aureus* que tiene el ácido sapiénico son cualitativamente reproducidos por concentraciones similares de ácido palmitoleico (213).

La presencia de este ácido graso es de esencial importancia en una enfermedad donde esa bacteria puede colonizar la piel, como la dermatitis atópica. Se ha descrito que la infección cutánea con *S. aureus* está relacionada con bajos niveles de ácido sapiénico en la piel, y que la aplicación tópica de este ácido graso resulta en la mejoría de la patología (214).

A.3.4.2. ÁCIDO PALMITELAÍDICO (16:1n-7t)

Debido a que los ácidos grasos *trans* no tienen origen endógeno, sino que son adquiridos a través de la dieta, los estudios realizados suelen ser epidemiológicos. En ese sentido, efectos cardiovasculares adversos se han asociado a la presencia de altos niveles de ácidos grasos *trans* en el plasma sanguíneo, aunque entre ellos los principales son los de 18 carbonos (215). Sin embargo, un estudio reciente muestra que altos niveles en plasma de ácido palmitelaídico están relacionados con menor adiposidad, mayores niveles de HDL, menores cantidades de TAG, menor proteína C reactiva y menor resistencia a insulina. Además, de forma general, el 16:1n-7t se asocia con un menor riesgo de sufrir diabetes (183). Debido a que este ácido graso se encuentra sobre todo en productos lácteos y no en grasas parcialmente hidrogenadas, como otros ácidos grasos *trans* de efectos nocivos, estos resultados explicarían en parte los beneficios metabólicos atribuidos a la ingesta de productos lácteos en otros estudios (216).

A.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La masa (m) y la carga eléctrica (z) son, junto con el *spin*, las 3 propiedades intrínsecas fundamentales de las partículas. Además, se han descubierto sólo 4 tipos de interacciones entre esas partículas: Nuclear fuerte, nuclear débil, gravitatoria y electromagnética. En base a esto, la espectrometría de masas es la técnica experimental capaz de separar moléculas según su relación masa/carga (m/z) usando para ello interacciones electromagnéticas (217, 218).

Todas las moléculas biológicas tienen masa distinta de cero, pero la mayoría de ellas presentan carga eléctrica neta nula, por lo tanto es necesario inducir de forma externa una carga eléctrica a las moléculas a analizar, proceso para el cuál se hace imprescindible el primer elemento de un espectrómetro de masas: la fuente de ionización, capaz de producir iones en fase gaseosa previamente a su separación en el analizador. Las fuentes de ionización se pueden dividir en 2 tipos; las fuentes de ionización fuertes, que al ionizar los analitos producen una fuerte fragmentación de los mismos, y las fuentes de ionización suave, que al ionizar el analito lo mantienen mayoritariamente en su forma molecular. Entre las primeras destaca la ionización por impacto electrónico mientras que entre las suaves las más usadas son la desorción/ionización asistida por láser en matriz (MALDI) y la ionización *electrospray* (219, 220). De forma general la entrada a la fuente de ionización suele estar acoplada a la salida de un proceso cromatográfico anterior que ayude a separar las moléculas de interés de otras y a reducir la supresión iónica.

El segundo elemento clave en un espectrómetro de masas es el analizador, capaz de separar los iones mediante campos electromagnéticos. Su principio de operación es sencillo: usar una magnitud física controlada cuyo valor dependa de la m/z de los analitos para separarlos. De esa forma se han desarrollados distintos analizadores como el de sector magnético, la trampa iónica, el cuadrupolo, el tiempo de vuelo, el *orbitrap* o la distancia de vuelo entre otros (217, 220, 221). En un espectrómetro de masas, estos analizadores pueden combinarse entre ellos, dando lugar a analizadores en tándem, que sirven para hacer estudios estructurales de las moléculas en procesos que incluyen su fragmentación inducida por colisión con un gas inerte. La variedad de analizadores y sus posibles combinaciones permiten una gran flexibilidad a la hora de analizar moléculas de muy distinta naturaleza. Finalmente, tras la separación, los iones pasan al detector del espectrómetro de masas, donde la carga eléctrica que poseen se aprovecha para convertir cada ion de una determinada m/z en una señal digital de una intensidad proporcional, generalmente mediante el uso de un electromultiplicador.

Aunque las primeras separaciones de iones por su m/z datan de inicios del siglo XX, ha sido en los últimos 50 años cuando esta tecnología ha avanzado considerablemente permitiendo excelentes límites de detección y resolución de la medida. Su aplicación al mundo de los lípidos, junto a técnicas de cromatografía cada vez más avanzadas, se ha ido extendiendo, hasta hacer que la lipidómica haya sido incluida al lado de otras ciencias “ómicas” clásicas (222, 223).

A.4.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) es una técnica experimental muy popular en muchos campos de la química analítica, incluyendo la lipidómica, empleada sobre todo para el análisis de los perfiles de ácidos grasos incorporados a lípidos más complejos.

La cromatografía de gases tiene una gran resolución en la separación de analitos. La muestra volatilizada es transportada por una fase móvil consistente en un gas inerte. La fase estacionaria es una columna capilar, generalmente de varios metros de longitud, que se encuentra dentro de un horno que posee un control de temperatura que va aumentando en rampa para permitir la separación de los analitos según su afinidad por la fase estacionaria antes de entrar al espectrómetro de masas (224) (**Figura A.9**).

Tras la separación cromatográfica, y antes de su análisis por espectrometría de masas, los analitos en fase gaseosa han de ser ionizados. En GC/MS se emplean dos métodos de ionización principalmente. El primero y más empleado es la ionización por impacto electrónico, en la que un flujo de electrones emitidos por un filamento es acelerado por un campo eléctrico permitiendo su interacción con las moléculas en fase gaseosa, ionizándolas mediante la generación de su catión radical. Durante este tipo de ionización se produce una gran transferencia de energía interna a las moléculas, resultando en su fragmentación (**Figura A.9**). La otra fuente habitualmente usada en GC/MS es la ionización química, que introduce en la fuente un gas de reacción que es primero ionizado por el flujo de electrones, interaccionando posteriormente con el analito y generando iones del mismo. Este tipo de ionización produce una fragmentación mucho menor que la de impacto electrónico (218).

El analizador usado más habitualmente para GC/MS es el de cuadrupolo. Su configuración es la de 4 conductores conectados 2 a 2 sobre los que se aplica una corriente alterna de radiofrecuencia por un lado y, superpuesta a ella, una corriente

continua generada por la aplicación de un voltaje constante entre los pares de conductores. Mientras que la corriente de radiofrecuencia actúa como guía de iones, permitiendo su avance a través del analizador sin seleccionarlos por su m/z , el voltaje aplicado para la generación de la corriente continua se llama voltaje de resolución debido a que para cada molécula con una m/z concreta sólo hay un voltaje de resolución que deja continuar esos iones hacia el detector. En ese sentido, el cuadrupolo actúa como un filtro de iones, que, o bien puede dejar pasar sólo iones de una determinada m/z , o mediante la variación continua del voltaje de resolución puede dejar pasar iones de un cierto rango de m/z , que es lo más habitual en GC/MS (218) (Figura A.9).

A.4.2. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En términos generales, la GC/MS fue la técnica estándar para todos los análisis lipídicos hasta los años 90 (225), en los que se desarrolló la fuente de ionización *electrospray*, que permitía el acoplamiento a la cromatografía de líquidos y por ello no necesitaba de un proceso previo de derivatización de los lípidos para hacerlos más volátiles y permitir su separación por cromatografía de gases. A día de hoy, si bien es cierto que para especies lipídicas más complejas el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS) es más común, para la cuantificación de ácidos grasos y su determinación estructural la técnica de GC/MS sigue siendo muy útil, debido a que gracias a la fragmentación producida bajo el impacto electrónico en la fuente de ionización, en el espectro de masas se puede obtener mucha información referida a aspectos estructurales de los ácidos grasos. Además, cuando se trata de separar ácidos grasos isoméricos, la cromatografía de gases suele ser un sistema más eficiente que la de líquidos a tal efecto. La GC/MS también proporciona una buena respuesta lineal, excelente reproducibilidad y las casas comerciales ofrecen todos los estándares analíticos de los ésteres metílicos de ácidos grasos a medir. Como desventaja respecto a HPLC/MS, la GC/MS requiere una preparación de la muestra más compleja que necesita más tiempo y cantidad de muestra debido al proceso de derivatización previo (224, 226).

INTRODUCCIÓN

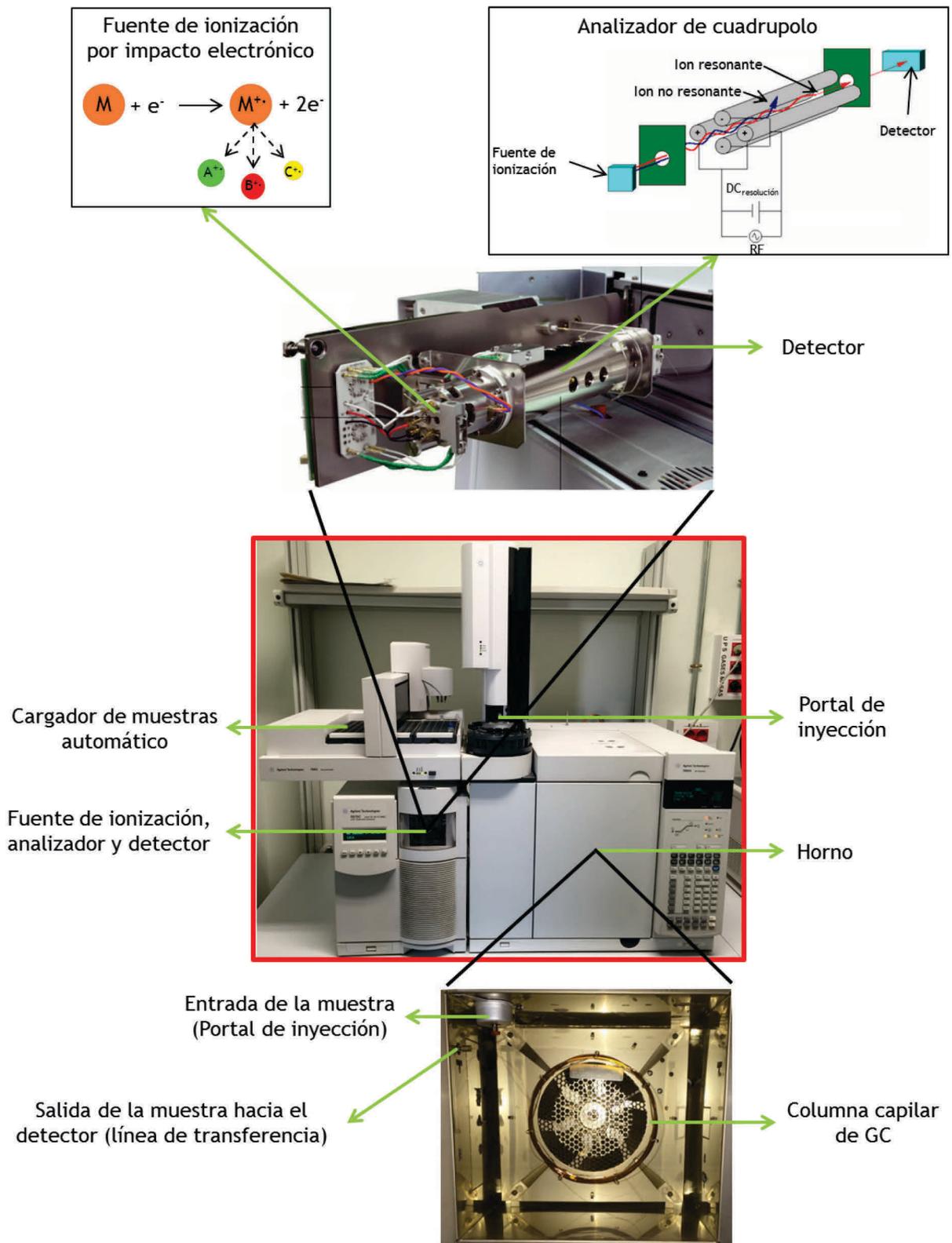


Figura A.9. Esquema de un equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas equipado con una fuente de ionización por impacto electrónico y un analizador de cuadrupolo. Se tomó como referencia el equipo empleado en este trabajo.

INTRODUCCIÓN

La derivatización más habitual para el análisis de ácidos grasos por GC/MS es su conversión a ésteres metílicos (FAME), compuestos que presentan las ventajas de una reacción química muy simple, excelentes propiedades cromatográficas y una amplia bibliografía de espectros (224, 227). Sin embargo, aunque para ácidos grasos saturados y con 3 o más insaturaciones, estos derivados presentan espectros de fragmentación por impacto electrónico característicos que permiten su identificación inequívoca, para FAME mono- y diinsaturados no es posible determinar la posición de los dobles enlaces, debido a que durante el proceso de ionización se deslocalizan los electrones de los mismos, formando fragmentos iguales para todos los ácidos grasos isoméricos (224, 227). Para solucionar este problema se han desarrollado otro tipo de estrategias que previenen esa migración de las cargas y generan espectros de fragmentación distintos para cada ácido graso. La primera estrategia es la derivatización del propio doble enlace del FAME usando disulfuro de dimetilo y yodo como catalizador (228). La segunda estrategia es usar derivatizaciones del extremo carboxilo terminal del ácido graso distintas al éster metílico con grupos funcionales que contengan nitrógeno, debido a la capacidad que tienen estos átomos de estabilizar la distribución de cargas y no permitir la migración de los dobles enlaces durante la ionización, generando espectros de fragmentación únicos para cada ácido graso. Entre ellos destacan la derivatización a pirrolididas (229), ésteres de 3-piridilcarbinol (230) y 4,4-dimetiloxazolinias (DMOX) (231-233). Además, se ha desarrollado un método usando ionización química en vez de impacto electrónico llamado CACI (del inglés *C*ovalent *A*dduct *C*hemical *I*onization) consistente en el análisis de los FAME mediante la fragmentación de los aductos que se producen tras su reacción en la fuente de ionización con un reactivo derivado del acetonitrilo que interacciona con sus dobles enlaces produciendo picos característicos de fragmentación según cada isómero (234). Un resumen de los distintos tipos de derivatizaciones de ácidos grasos que se usan en GC/MS puede observarse en la **Figura A.10**.

La elección del tipo de derivatización depende del tipo de análisis que se quiera hacer, e incluso, como es el caso de este trabajo, se puede hacer una primera derivatización para el análisis cuantitativo de los ácidos grasos y una segunda derivatización para su caracterización estructural. Otros aspectos sobre el análisis de ácidos grasos isoméricos por GC/MS se ampliarán en el apartado de resultados.

INTRODUCCIÓN

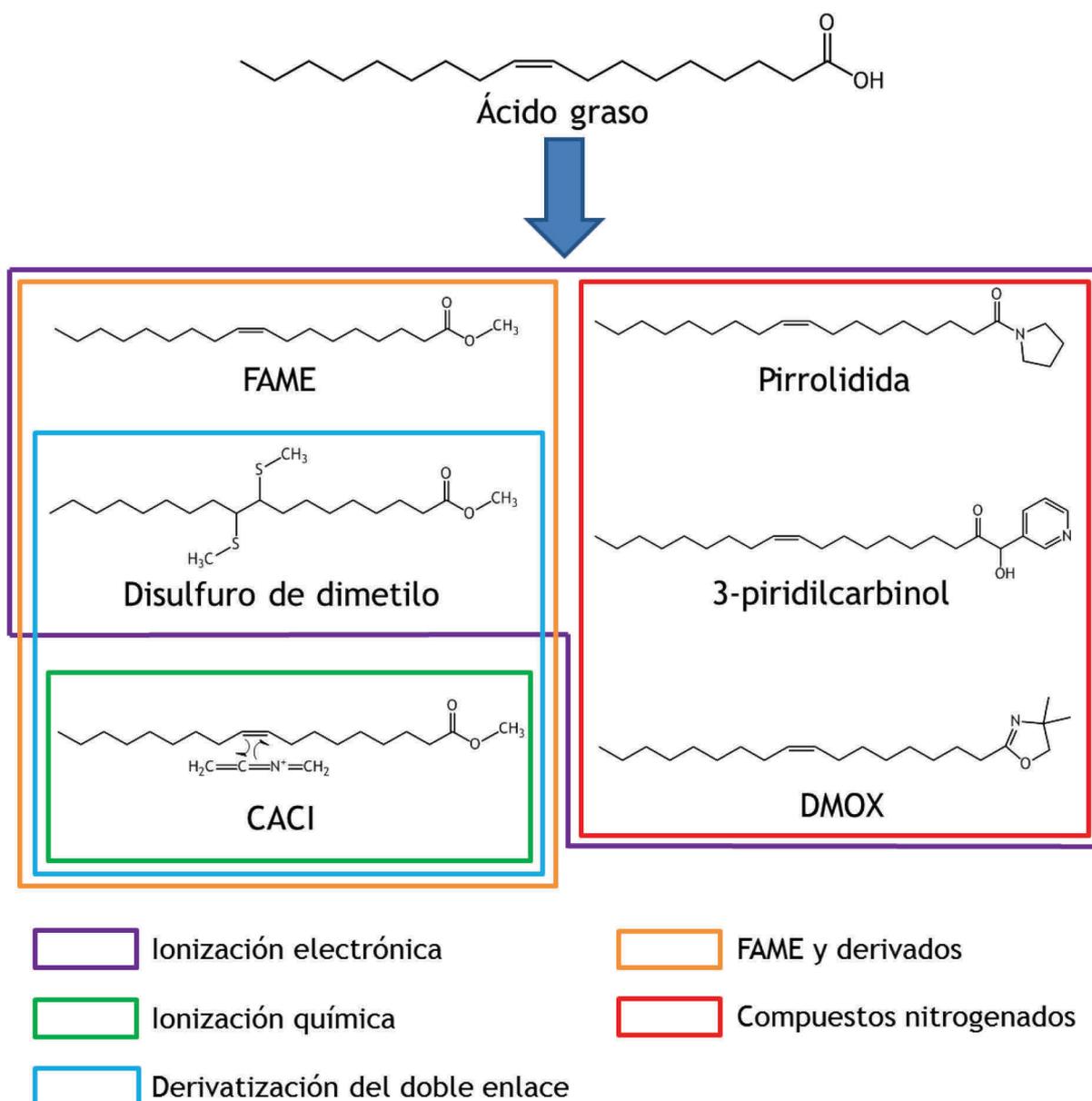


Figura A.10. Derivados químicos de los ácidos grasos para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Antes de su análisis, los ácidos grasos, bien en su forma libre, o esterificados en distintos lípidos, han de convertirse en compuestos más estables y volátiles. La elección del tipo de derivatización depende de las necesidades del análisis y puede incluir la síntesis de compuestos para su análisis en equipos que emplean ionización por impacto electrónico (caja morada) o ionización química (caja verde). La derivatización a ésteres metílicos de los ácidos grasos es la más común para análisis cuantitativos (caja naranja), pero análisis estructurales más profundos requieren la derivatización del doble enlace de los FAME (caja azul) o la síntesis de derivados nitrogenados de ácidos grasos (caja roja). Se tomó el ácido oleico como referencia para las representaciones.

CACI: Ionización química de aductos covalentes.

B. OBJETIVOS

OBJETIVOS

➤ Teniendo en cuenta el interés despertado por los recientes descubrimientos que describen a los monocitos espumosos como agentes clave en el desarrollo de la aterosclerosis, se plantea como primer objetivo general el estudio de la regulación de la formación de gotas lipídicas por ácido araquidónico en monocitos humanos circulantes en el contexto de la aterosclerosis. De forma más específica, los objetivos perseguidos en este punto del trabajo son:

1. Estudiar de forma comparativa si el AA libre promueve la síntesis de gotas lipídicas en monocitos humanos, y si es así, los cambios del metabolismo lipídico que llevan a la acumulación de ácidos grasos previa a la síntesis de los lípidos neutros que componen las gotas lipídicas.
2. Delimitar las rutas intracelulares de señalización que conducen a la formación de gotas lipídicas por AA en monocitos humanos.
3. Comparar la inducción de lípidos neutros con otras células y estímulos.

➤ Por otra parte, debido a la creciente bibliografía que muestra diversos efectos biológicos del ácido palmitoleico y el gran interés que ha generado al comportarse como una hormona de origen lipídico con efectos beneficiosos a nivel sistémico, se propone el estudio bioquímico y funcional de sus isómeros en células del sistema inmune innato. Este objetivo general consta de otros más específicos:

4. Establecer un método experimental que permita la completa caracterización de distintos isómeros de ácido palmitoleico mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas.
5. Estudiar la distribución de los isómeros del ácido palmitoleico en los lípidos de distintos tipos celulares y tejidos, así como sus rutas bioquímicas de síntesis en monocitos humanos.
6. Describir los posibles efectos biológicos de los principales isómeros del ácido palmitoleico.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

C.1. MATERIALES

C.1.1. CULTIVO CELULAR

Medio RPMI 1640 con L-Glutamina (Gibco)

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

FBS (Gibco)

Penicilina (Gibco)

Estreptomicina (Gibco)

Gentamicina (Lonza)

Ficoll-Paque (GE Healthcare)

Placas y frascos para cultivo celular (BD Biosciences)

Raspadores de células (BD Biosciences)

C.1.2. DISOLVENTES Y REACTIVOS LÍQUIDOS

C.1.2.1. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS

Agua milli-Q ultrapura (Millipore)

Cloroformo, calidad HPLC (Thermo Fisher)

Metanol, calidad HPLC (Thermo Fisher)

n-hexano, calidad HPLC (Sigma-Aldrich)

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

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

Dietil éter (Scharlab)

Ácido acético glacial (Scharlab)

Hidróxido de amonio 32 %, calidad HPLC (Merck)

C.1.2.2. DERIVATIZACIÓN DE LÍPIDOS

Metanol, anhidro 99.8 % (Sigma-Aldrich)

Tolueno, extrapuro (Scharlab)

Ácido clorhídrico 35 % (p/p) (Scharlab)

Ácido clorhídrico en metanol 3 N (Sigma-Aldrich)

2-amino-2-metil-1-propanol (Sigma-Aldrich)

Metóxido de sodio (Sigma-Aldrich)

Anhídrido trifluoroacético (Sigma-Aldrich)

Benceno, extrapuro (Scharlab)

Propionato de metilo (Sigma-Aldrich)

C.1.2.3. OTROS USOS

Etanol, absoluto (Scharlab)

Dimetil sulfóxido (DMSO), extrapuro (Scharlab)

Ácido sulfúrico, purísimo (Scharlab)

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

Azul de tripano (Sigma-Aldrich)

Líquido de centelleo (Beckman Coulter)

Ketamina (Merial)

Xilacina (Bayer)

C.1.3. REACTIVOS Y PRODUCTOS SÓLIDOS

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

Acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (Sigma-Aldrich)

Hidróxido de potasio (KOH) (Scharlab)

Hidróxido de sodio (NaOH) (Scharlab)

Cloruro de calcio (CaCl_2) (Scharlab)

Yodo (I_2) (Scharlab)

Sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich)

EDTA (ácido etildiaminotetraacético) (Scharlab)

Cloruro sódico (NaCl) (Scharlab)

Cloruro potásico (KCl) (Merck)

Fosfato de disodio (Na_2HPO_4) (Scharlab)

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (Scharlab)

Tris-base (Tris-(hidroximetil)-aminometano) (Scharlab)

Tris-HCl (Scharlab)

Tritón X-100 (Scharlab)

Butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma-Aldrich)
Placas de silicagel (Macherey-Nagel)
Membranas de celulosa para diálisis (Sigma-Aldrich)
Cubetas para espectrofotómetro (Kartell)
Filtros de 0.22 μM (Merck Millipore)

C.1.4. GASES

Nitrógeno, extrapuro (Air Liquide)
Helio, extrapuro (Air Liquide)
Argón, extrapuro (Air Liquide)
Dióxido de carbono, extrapuro (Air Liquide)

C.1.5. ESTÍMULOS

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

C.1.6. INHIBIDORES

Inhibidor de cPLA₂ α (Pirrofenona) (Calbiochem)
Inhibidor de ACSL1, 3, 4 (Triacsina C) (Enzo Life Sciences)
Inhibidor de JNK (SP600125) (Sigma-Aldrich)
Inhibidor de p38 (SB203580) (Calbiochem)
Inhibidor de ERK (PD98059) (Sigma-Aldrich)
Inhibidor de SCD-1 (Cay10566) (Cayman)
Inhibidor de ACC α (TOFA) (Sigma-Aldrich)
Inhibidor de SREBP-1, 2 (Fatostatin) (Cayman)
Inhibidor de CPT1 (Etomoxir) (Sigma-Aldrich)
Inhibidor de sPLA₂ (12-epi-scalaradial) (Biomol)
Inhibidor de iPLA₂ (Bromo-enol Lactona, BEL) (Sigma-Aldrich)
Inhibidor de COX (Indometacina) (Sigma-Aldrich)
Inhibidor de citocromo P450 (SKF-525A, proadifen) (Sigma-Aldrich)

C.1.7. LÍPIDOS

C.1.7.1. TRATAMIENTOS CELULARES

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

Ácido palmítico (16:0) (Sigma-Aldrich)

Ácido oleico (18:1 n -9) (Sigma-Aldrich)

Ácido oleico uniformemente deuterado ([U-²H]-18:1 n -9) (Sigma-Aldrich)

Ácido linoleico (18:2 n -6) (Sigma-Aldrich)

Ácido gamma-linolénico (18:3 n -6) (Sigma-Aldrich)

Ácido palmitoleico (16:1 n -7) (Sigma-Aldrich)

Ácido cis-7-hexadecenoico (16:1 n -9) (Larodan)

Ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n -3) (Sigma-Aldrich)

C.1.7.2. ESTÁNDARES INTERNOS PARA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

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

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

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

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

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

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

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

2-heptadecanoil-*sn*-glicerol (2-MAG(17:0)) (Avanti)

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)

C.1.7.3. PATRONES PARA SEPARACIÓN POR TLC

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

2-oleil-*sn*-glicerol (2-MAG(18:1 n -9)) (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(18:1n-9)) (Sigma-Aldrich)

C.1.7.4. ESTÁNDARES DE CALIBRACIÓN Y OPTIMIZACIÓN EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco)

Ácido cis-7-hexadecenoico éster metílico (Larodan)

Ácido cis-6-hexadecenoico éster metílico (Larodan)

Ácido cis-11-hexadecenoico éster metílico (Larodan)

Ácido trans-9-hexadecenoico éster metílico (Larodan)

Ácido cis-11-octadecenoico éster metílico (Sigma-Aldrich)

Ácido cis-7,10,13,16-docosatetraenoico éster metílico (Sigma-Aldrich)

Mezcla de especies de PE, procedente de leche (Acris)

Mezcla de especies de PI, sal de sodio, procedente de soja (Sigma-Aldrich)

Mezcla de especies de PS procedente de cerebro bovino (Sigma-Aldrich)

Polipropilenglicol (PPG) (AB Sciex)

Perfluorotributilamina (PFTBA) (Agilent)

C.1.7.5. LÍPIDOS MARCADOS CON ISÓTOPOS RADIATIVOS

[5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H]-ácido araquidónico, 210 Ci/mmol (GE Healthcare)

[9,10-³H]-ácido palmítico, 60 Ci/mmol (Perkin Elmer)

[1,2-¹⁴C]-ácido acético, 54.3 mCi/mmol (Perkin Elmer)

C.1.8. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (INMUNOBLOT)

Anticuerpo IgG de conejo policlonal frente a P(Ser505)-cPLA₂ α (Cell Signaling)

Anticuerpo IgG de conejo policlonal frente a P(Thr180/Tyr182)-p38 (Cell Signaling)

Anticuerpo IgG de conejo policlonal frente a P(Thr183/Tyr185)-JNK (Cell Signaling)

Anticuerpo IgG de conejo policlonal frente a P(Thr202/Tyr204)-p44/42 (Cell Signaling)

Anticuerpo IgG de conejo policlonal frente a Cox-2 (Cell Signaling)

Anticuerpo monoclonal de ratón frente a β -actina (Sigma-Aldrich)

Anticuerpo de burro anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano (GE Healthcare)

Anticuerpo de oveja anti IgG de ratón, conjugado con peroxidasa de rábano (GE Healthcare)

Marcadores de peso molecular (Bio-Rad)

Acrilamida/bis-acrilamida al 30 %, 37.5:1 (Bio-Rad)

Persulfato de amonio (APS) (Sigma-Aldrich)

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich)

Membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Merck Millipore)

Tween-20 (Scharlab)

Leche deslipidada (Sveltesse)

Ortovanadato sódico (Na_3VO_4) (Sigma-Aldrich)

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich)

Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich)

Glicerol (Scharlab)

Glicina (Scharlab)

Dodecilsulfato sódico (SDS) (Scharlab)

β -mercaptoetanol (Scharlab)

Azul de bromofenol (Scharlab)

Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico (CAPS) (Sigma-Aldrich)

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ECL) (Thermo Fisher)

Peróxido de hidrógeno (30 % p/p) (H_2O_2) (Scharlab)

C.1.9. EXTRACCIÓN DE RNA, SÍNTESIS DE cDNA, PCR Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Agarosa (Biotools)

Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich)

Colorante de carga para DNA (Fermentas)

Marcadores de peso molecular de DNA (Biotools)

TRIzol® (Thermo Fisher)

Cloroformo, grado biología molecular (Scharlab)

2-propanol, grado biología molecular (Scharlab)

Etanol, grado biología molecular (Scharlab)

Agua dietilpircarbonato (DEPC), libre de RNAsas (Thermo Fisher)

Decámeros cebadores aleatorios (Ambion)

Cebadores oligo (Ambion)

Inhibidor de RNAsa (Ambion)

Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Biotoools)

Tampón de reacción (Ambion)

Retrotranscriptasa de virus de la leucemia murina de Maloney (M-MLV) (Ambion)

DNA polimerasa de *Thermus thermophilus* (Ambion)

Tampón de reacción de la DNA polimerasa (Ambion)

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

C.1.10. MICROSCOPIA 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)

Cubres y portas (Thermo Fisher)

Paraformaldehído (EMS)

Sacarosa (Sigma-Aldrich)

Polivinil-alcohol (Sigma-Aldrich)

DABCO® (Sigma-Aldrich)

C.1.11. ELISA

Kit de ELISA para Il6 de ratón (eBioscience)

C.1.12. TAMPONES Y SOLUCIONES

NOMBRE	COMPOSICIÓN	USO
Tampón fosfato salino (PBS)	NaCl 136 mM KCl 2.7 mM Na ₂ HPO ₄ 8 mM KH ₂ PO ₄ 1.5 mM	Lavado de células Purificación de monocitos Base de otros tampones
PBS-Tween	PBS Tween-20 0.01 % (v/v)	Inmunoblot
	Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 NaCl 150 mM	

MATERIALES Y MÉTODOS

Tampón de lisis celular	Tritón X-100 0.5 % (v/v) Na ₃ VO ₄ 100 μM PMSF 1 mM Cóctel de inhibidores de proteasas 1X	Inmunoblot
Tampón detergente	PBS Tritón X-100 0.1 % (v/v)	Ensayos de radiactividad
Tampón de carga	Tris-HCl 156 mM, pH 6.8 Glicerol 50 % (v/v) Dodecilsulfato sódico 10 % (p/v) β-mercaptoetanol 20 % (p/v) Azul de bromofenol 0.002 % (p/v)	Inmunoblot
Tampón de electroforesis (I)	Tris-base 25 mM Glicina 0.2 mM Dodecilsulfato sódico 1 g/l	Inmunoblot
Tampón de electroforesis (II)	Tris-base 40 mM Ácido acético 0.1 % (p/v) EDTA 1 mM, pH 8 Bromuro de etidio 0.004 % (v/v)	Geles de agarosa para separación de DNA
Tampón de transferencia	CAPS 1 mM Se ajusta a pH 11	Inmunoblot
Solución de revelado	10 ml ECL 3.3 μl de H ₂ O ₂	Inmunoblot
Gelvatol	Polivinil-alcohol 9.6 % (p/v) Glicerol 24 % (v/v) DABCO® 2.5 % (p/v)	Microscopía de fluorescencia

Tabla C.1. Lista de tampones y soluciones usadas en el trabajo con su composición.

C.1.13. MATERIAL BIOLÓGICO

La mayor parte de experimentos se realizaron con monocitos humanos extraídos de sangre periférica. 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, como se indica en el apartado de métodos.

Los experimentos con macrófagos peritoneales, suero de ratón y distintos órganos y tejidos se realizaron con ratones de la cepa *Swiss Webster* que fueron criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Para los experimentos se emplearon indistintamente machos o hembras con edades comprendidas entre las 8 y las 12 semanas, pero sin mezclar sexos en el mismo experimento. Los ratones se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (21-24 °C), con un ciclo de luz oscuridad de 12 horas y fueron alimentados *ad libitum* con dieta de piensos especial para animales de laboratorio y con libre acceso a agua estéril (Consejo de Comunidades Europeas, 1986). Los protocolos del estudio fueron aprobados por el comité de ética de investigación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, y todos los experimentos fueron hechos siguiendo la normativa 86/609/ECC de la Comunidad Europea y la legislación española que regula la investigación animal (RD 1201/2005, BOE 252/34667-91, 2005), vigente para el uso y cuidado de animales de experimentación.

La línea celular de promonocitos humanos U937 fue amablemente cedida por el Dr. Patricio Aller, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en Madrid. Esta línea celular proviene de células malignas aisladas de la efusión pleural de un paciente caucásico de 37 años con linfoma histocítico (235).

C.2. EQUIPAMIENTO

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	<p><u>Equipos:</u></p> <p>Agilent 7890A (cromatógrafo de gases) (Agilent)</p> <p>Agilent 5975C (espectrómetro de masas de cuadrupolo) (Agilent)</p> <p><u>Columna:</u></p> <p>Agilent DB23 (60 m longitud x 250 μm diámetro interno, 0.15 μm de espesor de película) (Agilent)</p> <p><u>Software de control y análisis de datos:</u></p> <p>Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation (Agilent)</p>
Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo	<p><u>Equipos:</u></p> <p>Agilent G1329B (inyector automático) (Agilent)</p> <p>Agilent G1311C (bomba cuaternaria) (Agilent)</p> <p>API2000 (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo) (AB Sciex)</p> <p>Infinity 1033 (generador de gases) (Peak Scientific)</p> <p><u>Columna:</u></p> <p>HILIC (150 mm longitud x 3 mm diámetro, 3 μm de tamaño de partícula) (Fortis)</p> <p><u>Precolumna:</u></p> <p>Silica (20 mm longitud x 2.1 mm diámetro) (Supelco)</p> <p><u>Software de control y análisis de datos:</u></p> <p>Analyst v.1.5.2 (AB Sciex)</p>

Inmunoblot	<p><u>Equipos:</u></p> <p>MiniProtean® (sistema de electroforesis) (Bio-Rad)</p> <p>TransBlot® (sistema de transferencia) (Bio-Rad)</p> <p>VersaDoc 5000 (equipo de revelado) (Bio-Rad)</p> <p><u>Software de análisis:</u></p> <p>Quantity One v.4.5.2 (Bio-Rad)</p>
PCR	<p><u>PCR cuantitativa a tiempo real:</u></p> <p>ABI 7500 (AB life technologies)</p> <p><u>Software de análisis:</u></p> <p>7500 Software v2.3 (AB life technologies)</p> <p><u>PCR convencional:</u></p> <p>Mastercycler personal (Eppendorf)</p>
Microscopía de fluorescencia	<p><u>Equipo:</u></p> <p>Eclipse 90i equipado con una cámara DS-Ri1 (NIKON)</p> <p>Lámpara de excitación de mercurio HBO (OSRAM)</p> <p><u>Software de análisis:</u></p> <p>NIS- Elements (NIKON)</p> <p>Image J (http://imagej.nih.gov/ij)</p>

Sonicador de punta:

Vibracell™ 75115 (Bioblock Scientific)

Medida de absorbancia:

BioPhotometer Plus (Eppendorf)

Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher)

VERSAmax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices)

Reacciones a temperatura controlada:

Termobloque (Grant)

Baño con agitación SW22 (JULABO)

Evaporación de disolventes:

Concentrator 5301 (Eppendorf)

Balanza de precisión:

Explorer Pro (Ohaus)

Cubetas de cromatografía en capa fina:

Fungicrom Separating Chambers (Fungilab)

Medida de radiactividad por contaje de centelleo:

LS 6500 (Beckman Coulter)

Revelado de geles de agarosa:

GelDoc XR (Bio-Rad)

Bases de datos y software	<u>Espectrometría de masas:</u>
	Biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST 98 Mass Spectral Library)
	Base de datos de LIPID MAPS (http://www.lipidmaps.org/)
	Calculador de masas y estructuras de lípidos del Dr. Robert C. Murphy, de la Universidad de Colorado (http://pharmacology.ucdenver.edu/lipidcalc)
	The Lipid Library, proporcionada por la Sociedad Americana de Químicos del Petróleo (AOCS) (http://lipidlibrary.aocs.org)
	<u>Diseño de cebadores:</u>
	PrimerBank, proporcionado por el Hospital General de Massachusetts y Harvard Medical School (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank)
	<u>Análisis estadístico y representación de gráficas:</u>
	SigmaPlot v.11.0
	<u>Representación de estructuras químicas y biológicas:</u>
ChemDraw Professional v. 15.0	

Tabla C.2. Lista de equipos, software y bases de datos usados en el trabajo.

C.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

C.3.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS

C.3.1.1. EXTRACCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se mezcló el contenido de las bolsas de capas leucocitarias con PBS a una proporción 1:1 (v/v) y se vertió de forma suave sobre una capa de Ficoll-Paque en una proporción 2:1 (v/v). Se centrifugó a 750 x g durante 30 minutos sin freno para separar las células mononucleares del plasma y los glóbulos rojos. Se recogió la capa de células mononucleares y se lavó 3 veces con PBS centrifugando a 450 x g durante 10 minutos. En caso de recoger algún glóbulo rojo se lisó mediante un choque osmótico. Posteriormente las células se contaron y resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con gentamicina a una concentración de 40 µg/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 conteniendo el 5 % de CO₂ y se usaron al día siguiente tras lavar con PBS 3 veces a las 3-4 horas de plaquearlas y 1-2 horas antes de utilizarlas, para eliminar los linfocitos no adherentes.

La diferenciación de los monocitos a macrófagos se llevó a cabo mediante su incubación con el medio de cultivo de los monocitos suplementado con un 5 % (v/v) de suero humano inactivado por choque térmico, sin adición de ninguna citoquina externa, durante los días indicados en cada caso. Se lavaron las células con PBS y se cambió su medio de cultivo cada 2-3 días (26).

C.3.1.2. EXTRACCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN

Para obtener los macrófagos peritoneales residentes, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical tras la inhalación de CO₂. Posteriormente, tras retirar la piel del abdomen, se les inyectó 5 ml de PBS estéril frío en la cavidad peritoneal, y tras un leve masaje se recogió de nuevo y se pasó a un tubo tipo *falcon* de 50 ml. Las células peritoneales se lavaron con PBS mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos por 2 veces y se plaquearon en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de FBS inactivado por choque térmico, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. La población de macrófagos peritoneales se purificó lavando las células no adherentes con

PBS a las 3-4 horas de plaquearlas y los macrófagos se emplearon al día siguiente de la extracción.

C.3.1.3. EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS Y TEJIDOS DE RATÓN

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de 100 mg/kg ketamina y 5 mg/kg xilacina comprobando, mediante presión en las almohadillas de las patas posteriores, que el animal había llegado al plano quirúrgico de anestesia antes de proceder a la extracción tisular. Se abrió la caja torácica para exponer el corazón y éste se perfundió con PBS a temperatura ambiente mediante presión manual con ayuda de una jeringa. Para ello se introdujo la aguja en el ventrículo izquierdo y se hizo un pequeño corte en la aurícula derecha, de manera que se mantuviera la circulación saliendo el PBS por el atrio derecho. Se consideró suficiente la perfusión cuando el hígado y pulmones adquirieron un tono pálido.

Tras ello se procedió a la extracción de hígado, cerebro, corazón, pulmón, riñones, tejido adiposo blanco visceral, tejido adiposo pardo, músculo esquelético de cuádriceps femoral y bazo. Los tejidos se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C para su correcta conservación antes de los análisis lipídicos.

C.3.1.4. EXTRACCIÓN DE SUERO DE RATÓN

Los ratones se anestesiaron de igual forma que para el apartado anterior. Una vez que el ratón estuvo anestesiado se buscó el latido cardiaco, para posteriormente realizar una punción cardiaca con una jeringa de 1 ml con aguja de 25G ligeramente llena de aire. Una vez que se observó borbotear la sangre se recolectó la sangre del animal tirando del émbolo. Tras este método terminal de extracción se realizó la dislocación cervical al animal.

La sangre se dejó coagular durante 1 hora a temperatura ambiente, para posteriormente aislar el suero mediante la centrifugación de la sangre a 10000 x g durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante.

C.3.1.5. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR U937

El cultivo de estas células en suspensión se llevó a cabo usando como medio de crecimiento RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de FBS inactivado por choque

térmico, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C con una atmósfera húmeda conteniendo el 5 % de CO₂ a una concentración mínima de 0.2 millones de células por ml de medio y se diluyeron y pasaron a otro frasco cuando alcanzaron una concentración de 0.6 millones de células por cada ml de medio (cada 48-72 horas).

C.3.2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE CÉLULAS Y TEJIDOS

C.3.2.1. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN CÉLULAS

Se usó el protocolo descrito en 1959 por Bligh & Dyer (236). Las células se resuspendieron en un volumen de H₂O milli-Q (típicamente entre 150 y 200 µl) y se añadieron los estándares internos específicos de cada protocolo de medida. Posteriormente, se añadieron 3.75 volúmenes de cloroformo/metanol 1:2 (v/v) y tras agitar vigorosamente durante 120 segundos se incorporaron 1.25 volúmenes de cloroformo y 1.25 volúmenes de agua milli-Q, siendo la proporción final cloroformo/metanol/agua de 1:1:0.9 por volumen. De nuevo las muestras se agitaron durante 120 segundos y se centrifugaron a 5900 x g durante 5 minutos a 16 °C. Los lípidos permanecieron en la fase orgánica inferior, que se recogió a otro tubo. Finalmente se hizo una segunda extracción añadiendo 2 volúmenes de cloroformo y repitiendo todo el proceso, y se juntó con la fase orgánica anterior. Las muestras se evaporaron por centrifugación en vacío para su posterior procesamiento o análisis.

C.3.2.2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE TEJIDOS

Se usó una modificación del método de Folch (237) para extraer lípidos de tejidos. Primeramente se pesó una fracción del tejido u órgano y sobre ella se añadieron 20 µl de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) por cada miligramo de tejido. Se homogenizó el tejido dentro del disolvente mediante procedimientos mecánicos y se añadieron 5 µl de agua milli-Q por cada miligramo de tejido. Se agitó durante dos minutos y se centrifugó a 8000 5900 x g durante 5 minutos a 16 °C, para posteriormente recoger la fase inferior de cloroformo en un nuevo tubo. Se hizo una segunda extracción con 1 ml de cloroformo y se juntó con la anterior. Las muestras se evaporaron por centrifugación en vacío para su posterior procesamiento y análisis.

C.3.3. SEPARACIÓN DE CLASES DE LÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Este tipo de separación por TLC se llevó a cabo usando placas de sílice como fase estacionaria. Las placas fueron previamente activadas por calor mediante su colocación en una estufa a 70 °C durante al menos 4 horas, para eliminar todos los restos de agua que pudiesen tener adsorbido. Para conseguir saturar la atmósfera del interior de las cubetas con el vapor de la fase móvil elegida en cada caso, se desarrolló un trozo de papel de filtro con la fase móvil al menos 2 horas antes de introducir la placa de sílice con las muestras. Para pinchar las muestras en las láminas de sílice, los extractos lipídicos secos se resuspendieron en 20 µl de cloroformo/metanol 2:1 (v/v).

Como fase móvil se empleó una mezcla de *n*-hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (por volumen) (238). Los fosfolípidos no migraron de la posición de pinchado, mientras que los lípidos menos polares son los que más migraron con la fase móvil (**Figura C.1**). El tiempo de desarrollo fue de unos 55 minutos.

Cuando se quiso analizar la composición de MAG, previamente a la separación de lípidos neutros, se desarrolló la lámina de sílice 2 veces sucesivas con dietil éter hasta que esa fase móvil alcanzó una altura de 4 cm desde el borde inferior de la placa, obteniendo así una mejor separación entre PL, MAG y DAG (**Figura C.1**) (238)

El revelado de la placa se realizó cortando el trozo de lámina de sílice donde se habían pinchado los patrones de revelado conteniendo ácidos grasos insaturados e introduciéndolo en una cubeta de cristal con atmósfera de yodo, que al unirse a los lípidos con ácidos grasos insaturados reveló la posición de los mismos (**Figura C.1**) y por lo tanto de las correspondientes clases de lípidos de las muestras.

Las regiones correspondientes a cada clase de lípido de interés se rasparon de la placa y se recogieron en tubos tipo *ependorf* de 1.5 ml. La extracción de los lípidos adsorbidos se realizó mediante la adición de 1 ml de cloroformo/metanol 1:1 (v/v), la agitación durante 120 segundos y la precipitación de la sílice mediante centrifugación a 16100 x g y 16 °C, recogiendo la fase líquida superior. Se hizo una segunda extracción con 1 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se juntó con la fase orgánica anterior, que se evaporó por centrifugación en vacío para su posterior procesamiento.

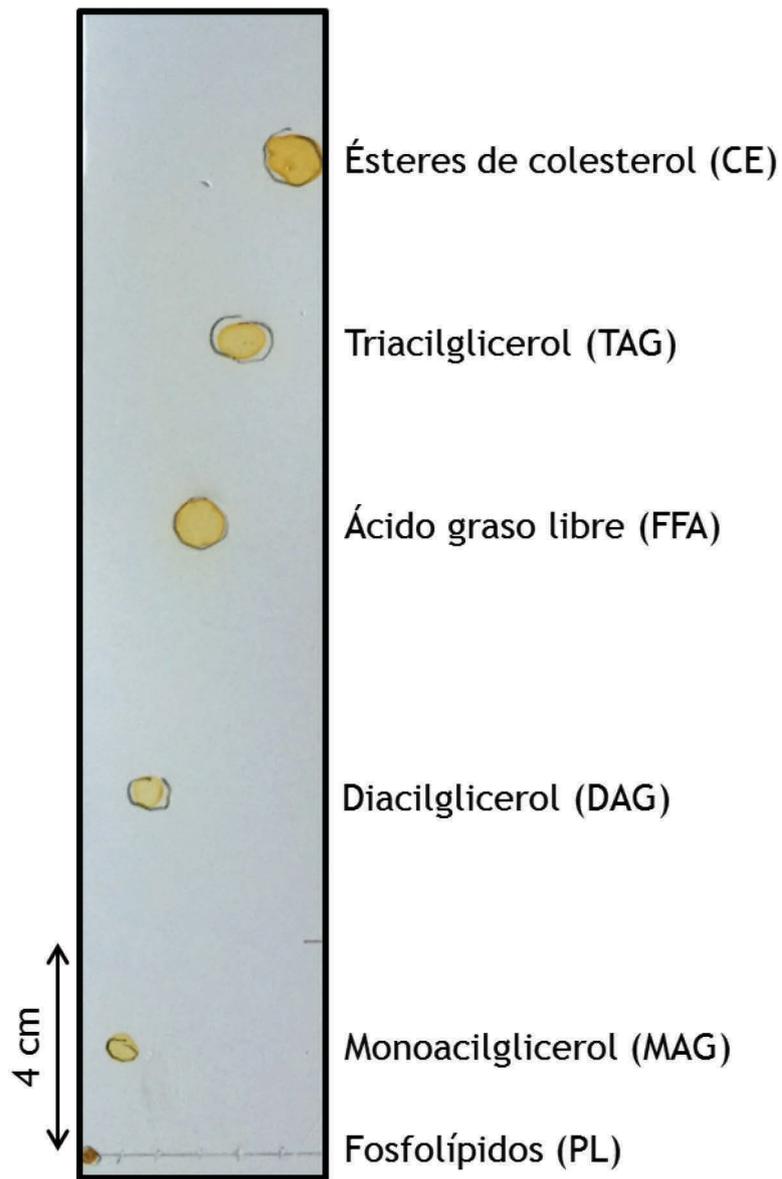


Figura C.1. Separación de distintas clases de lípidos por cromatografía en capa fina (TLC). La placa de sílice se activó a 70 °C durante 4 horas y se pincharon 2 μ l de cada estándar de clase de lípido conteniendo ácidos grasos insaturados. La placa se corrió 2 veces en dietil éter hasta alcanzar una altura de 4 cm y posteriormente se desarrolló hasta su altura máxima en el sistema *n*-hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (v/v/v). Los lípidos se tiñeron con vapores de yodo.

C.3.4. DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

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.

Para estos análisis se usaron extractos lipídicos correspondientes a 10 millones de células, a los que previamente se les había añadido 5 nmol de cada estándar interno, especies lipídicas análogas a las que se busca analizar pero conteniendo ácidos grasos que se ha comprobado que no están presentes en las muestras, como ácidos grasos de cadena impar (Apartado C.1.7.2).

C.3.4.1. DERIVATIZACIÓN A ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los extractos lipídicos, bien previamente separados por clases mediante TLC, o bien de forma intacta (en lo que se denomina transmetilación total de ácidos grasos celulares) se resuspendieron en 100 μ l de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se pasaron a tubos de cristal para la reacción. Seguidamente se añadió 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 neutralizó con 1 ml de 0.5 M HCl en solución acuosa y los FAME se extrajeron con 2 ml de *n*-hexano tras mezclar con *vortex* durante 30 segundos y centrifugar a 800 x g durante 5 minutos a 16 °C, recogiendo la fase orgánica superior. Este protocolo se utilizó para transmetilar los ácidos grasos esterificados en glicerolípidos (MAG, DAG, TAG), glicerofosfolípidos y transmetilación total.

Los ácidos grasos de los ésteres de colesterol se transmetilaron siguiendo un protocolo distinto (239). El residuo seco de CE se resuspendió en 400 μ l de propionato de metilo y se pasó a un tubo de cristal. Se añadieron 600 μ l de 0.84 M KOH en metanol anhidro y se dejó reaccionar durante 1 hora a 37 °C en baño con agitación. La reacción se neutralizó con 50 μ l de ácido acético y se añadió 1 ml de agua milli-Q y 2 ml de *n*-hexano para extraer los FAME.

Los ácidos grasos libres se transmetilaron mediante catálisis en medio ácido. Para ello, se resuspendió su residuo seco en 50 μl de tolueno y se pasó a un tubo de cristal. Se añadieron 450 μl de HCl en metanol anhidro al 0.5 % (p/v) y se dejó reaccionar a 45 °C durante 20 minutos. Se neutralizó con 450 μl de 0.137 M KOH en solución acuosa, se añadieron 500 μl de agua milli-Q y se extrajeron los FAME con 2 ml de *n*-hexano tras mezclar y centrifugar.

C.3.4.2. DERIVATIZACIÓN A 4,4-DIMETILOXAZOLINAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Como se ampliará en el apartado de resultados, la derivatización a FAME no permite la caracterización completa de algunos ácidos grasos. En esos casos, se requiere una posterior derivatización de los FAME a DMOX. A tal efecto, se han descrito varios métodos, implicando la mayoría reacciones muy agresivas a altas temperaturas, que se han demostrado muchas veces perjudiciales a la hora del análisis por GC/MS (232). Debido a ello, se adaptó un protocolo que usa condiciones mucho más moderadas (233). Se tomó el extracto seco de FAME y se resuspendió en 120 μl de 2-amino-2-metil-1-propanol en benceno al 50 % (w/v). Se añadieron 20 μl de metóxido de sodio y se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación en atmósfera de nitrógeno y oscuridad durante 16 horas. Tras esa incubación se formaron las 2-acil-metilpropanol amidas, compuestos intermedios entre los FAME y los DMOX. Para extraerlos se añadieron 0.5 ml de agua milli-Q y 0.5 ml de *n*-hexano/dietil éter 9:1 (v/v), y tras mezclar con *vortex* durante 30 segundos y centrifugar a 800 x g durante 5 minutos a 16 °C se recogió la fase orgánica superior y se pasó a otro tubo. Se repitió la extracción con otros 0.5 ml de *n*-hexano/dietil éter 9:1 (v/v), y se juntó con la fase orgánica anterior antes de evaporar mediante centrifugación en vacío. Ese residuo seco se resuspendió en 150 μl de anhídrido trifluoroacético y se dejó reaccionar a 50 °C durante 45 minutos en un tubo de vidrio para completar la reacción. Se evaporó con nitrógeno el anhídrido trifluoroacético y se añadió 1 ml de agua milli-Q para lavar los residuos de los reactantes y otro ml de *n*-hexano para extraer los DMOX, tras mezclar con *vortex* 30 segundos y centrifugar a 800 x g durante 5 minutos a 16 °C, recogiendo la fase superior. Se repitió una segunda extracción con otro ml de *n*-hexano, se juntó con la anterior y se evaporó por centrifugación en vacío, dejando las muestras preparadas para su posterior análisis por GC/MS.

C.3.4.3. ANÁLISIS DE ÉSTERES METÁLICOS Y 4,4-DIMETILOXAZOLINAS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El análisis de FAME y DMOX se llevó a cabo por GC/MS usando un equipo Agilent con inyección automática y analizador de cuadrupolo simple (Figura A.9, Apartado C.2) operando en modo de ionización por impacto electrónico, siendo los electrones acelerados con una energía de 70 eV. La columna usada para la separación de FAME y DMOX es un modelo Agilent DB23 (60 m longitud x 250 µm diámetro interno, 0.15 µm de espesor de película) cuya fase estacionaria es de (50 %-cianopropil)-metilpolisiloxano. El protocolo para la separación de derivados de ácidos grasos se adaptó primeramente de Abu *et al.* (240), y ha sido progresivamente optimizado para una mejor separación de los FAME y DMOX. La rampa de temperaturas puede verse en la Tabla C.3.

TIEMPO DE CARRERA CROMATOGRÁFICA (MINUTOS)	TEMPERATURA (°C)
0	50
1	50
6	175
32.67	215
34.67	235
39.67	235

Tabla C.3. Rampa de temperaturas empleada en el proceso de cromatografía de gases para la separación de FAME y DMOX.

La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 250 °C para que la muestra fuese rápidamente volatilizada, la temperatura de la línea de transferencia entre el final de la columna y la fuente de ionización del espectrómetro de masas se mantuvo a 250 °C, la temperatura del cuadrupolo se fijó a 150 °C y la de la fuente de ionización a 230 °C.

Como gas portador se usó helio, que se mantuvo a una presión constante de 26.1 libra fuerza por pulgada cuadrada (psi). Se inyectó en todos los casos 1 µl de muestra disuelta en *n*-hexano en modo *splitless*, es decir, sin división de la muestra.

La adquisición de datos en el analizador de espectrometría de masas se llevó a cabo a partir del minuto 5 desde que se inyecta la muestra para evitar monitorizar la señal producida por el disolvente en el que se encuentra la misma, así como para proteger el filamento de la fuente de ionización. La identificación de compuestos se realizó en modo TIC (corriente total de iones, del inglés *Total Ion Current*) haciendo un barrido de masas desde $m/z=0$ a $m/z=450$. En este modo de trabajo, la señal que aparece a cada tiempo de retención es la suma total de las señales de todos los iones del rango de m/z seleccionadas que están llegando al detector en ese momento. La identificación de cada compuesto se llevó a cabo mediante su tiempo de retención, comparando con el de los FAME y DMOX comerciales, así como con los fragmentos característicos producidos en la ionización por impacto electrónico, ampliamente descritos en la bibliografía (179, 224, 227, 231-233, 240-244). Los iones representativos para la identificación aparecen resumidos en la **Tabla C.4**, siendo $[M]^+$ la masa del ion molecular sin fragmentar.

La cuantificación de FAME se llevó a cabo en modo SIM (monitorización de iones seleccionados, del inglés *Selected Ion Monitoring*), usando para cada tipo de analito de interés sus iones fragmentos característicos (**Tabla C.4**).

La cuantificación de cada FAME se llevó a cabo mediante la integración del área bajo la curva de su pico cromatográfico. Para poder hacer un análisis cuantitativo exacto se hicieron líneas de calibrado con los FAME comerciales especificados en el apartado de materiales. El rango de cantidad de estándar con el que se hicieron las líneas fue desde 1 hasta 25 pmol. El rendimiento del proceso de extracción de lípidos, separación y derivatización se calculó respecto a la cantidad de estándares internos. Se hicieron nuevas líneas de calibrado cada vez que la variación de la señal respecto a la línea anterior era superior al 50 %.

La calibración del espectrómetro de masas se hizo con un estándar de perfluorotributilamina siguiendo las instrucciones del equipo.

TIPO DE ÁCIDO GRASO	DERIVADO	IONES PARA IDENTIFICACIÓN (m/z)	IONES PARA CUANTIFICACIÓN (m/z)
Saturados	FAME	74, 87, [M-29] ⁺ , [M-31] ⁺ , [M-43] ⁺	74, 87
Monoinsaturados	FAME	55, 74, 83, [M-32] ⁺ , [M-74] ⁺ , [M-116] ⁺	74, 83
Diinsaturados	FAME	67, 81, [M-31] ⁺ , [M-74] ⁺	67, 81
Poliinsaturados	FAME	67, 79, 91	67, 79, 91
Isómeros 16:1	FAME	55, 74, 83, 268.1, 236.2, 194.2, 152.2	268.1, 236.2, 194.2, 152.2
Isómeros 16:1	DMOX	113, 126, 166.1, 167.1, 168.1, 180.1, 194.1, 208.1, 264.1	Sólo cualitativo
Ácidos grasos deuterados derivados de [² H]-18:1n-9	FAME	62, 77, 94, [M-33] ⁺ , [M-77] ⁺ , [M-125] ⁺	62, 77, 94

Tabla C.4. Resumen de los iones característicos que se usan para la identificación y cuantificación de FAME y DMOX por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

[M]: Relación m/z del ion molecular

C.3.5. ANÁLISIS DE ESPECIES DE FOSFOLÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO

Esta técnica, de nueva implantación en el laboratorio, se usó para determinar todas las especies moleculares de PC, PE, PI, PS, PA y PG.

Se tomó un extracto lipídico correspondiente a 10 millones de células, obtenido por el método de Bligh & Dyer (236) para estos análisis, al que previamente a la extracción se añadieron 300 pmol de los correspondientes estándares internos (**Apartado C.1.7.2**).

El protocolo usado para la separación cromatográfica en fase normal se adaptó de Axelsen & Murphy, 2010 (245). Se usó una columna de fase HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) (150 mm longitud x 3 mm diámetro, 3 μm de tamaño de partícula) en la que se inyectaron 40 μl del extracto lipídico resuspendido en 50 μl de las condiciones iniciales (75 % fase A y 25 % fase B). Como fase móvil se empleó un gradiente de eluyente A (Hexanos/2-propanol, 30:40, v/v) y eluyente B (Hexanos/2-propanol/20 mM Acetato de amonio en H_2O , 30:40:7, por volumen) siguiendo el protocolo especificado en la **Tabla C.5**.

En flujo total a través de la columna se fijó a 400 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, que entraron a la fuente de ionización de tipo electrospray del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Los parámetros característicos de la fuente se fijaron de la siguiente forma: IS (Voltaje aplicado al spray de ionización)= -4500 V/+5500 V, CUR (Gas cortina)= 20 psi, GS1 (Gas de nebulización)= 35 psi, GS2 (Gas de desolvatación)= 65 psi, TEM (Temperatura de desolvatación)= 400 $^{\circ}\text{C}$.

Para la determinación cualitativa de especies de PL conteniendo el ácido graso 16:1, la adquisición se llevó a cabo en ionización negativa usando los métodos de adquisición *Precursor Ion* de $m/z= 253.2$, siendo detectadas las especies de PG, PI, PE, PS y PA como iones $[\text{M}-\text{H}]^-$, mientras que las especies de PC fueron detectadas como aductos acetato $[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$. Para cuantificar esas especies conteniendo 16:1 se usó el método de adquisición MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) operando en ionización negativa, asignando la masa ionizada del ion molecular o su aducto acetato para PC como ion padre en Q1 y la masa del 16:1 ionizado en negativo ($m/z= 253.2$) como transición en Q3.

TIEMPO DE CARRERA CROMATOGRÁFICA (MINUTOS)	ELUYENTE A (%)	ELUYENTE B (%)
0	75	25
5	75	25
15	40	60
20	5	95
40	5	95
41	75	25
50	75	25

Tabla C.5. *Gradiente de eluyentes en el análisis de clases de fosfolípidos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.*

Eluyente A: Hexanos/2-propanol, 30:40, v/v. Eluyente B: Hexanos/2-propanol/20 mM Acetato de amonio en H₂O, 30:40:7, v/v/v.

Para la realización de un fosfolipidoma general, se usó el método de adquisición Q1MS, con ionización negativa durante los primeros 32.5 minutos de carrera para todas las clases de fosfolípidos en forma de iones $[M-H]^-$, excepto PC, que se detecta a partir del minuto 32.5 con ionización positiva en forma de iones $[M+H]^+$. Un ejemplo de una figura de contorno donde se detectan múltiples especies de fosfolípidos puede observarse en la **Figura C.2**.

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) en ionización negativa y positiva según cada caso. Los fragmentos característicos y los métodos basados en ellos que se usan para el análisis han sido ampliamente descritos anteriormente (122, 246-248) y aparecen resumidos en la **Tabla C.6**.

La calibración de los cuadrupolos del equipo se realizó mediante una solución de polipropilenglicol, ajustando los parámetros electrónicos de los mismos para que ese estándar cumpliera las especificaciones de intensidad y anchura a mitad del pico (FWHH)

MATERIALES Y MÉTODOS

del equipo. La optimización de la señal dependiente de los parámetros característicos de cada clase de fosfolípido se realizó con los MIX de estándares especificados en el apartado de materiales. Los parámetros EP (potencial de entrada), FP (potencial de focalización), CXP (potencial de salida de la celda de colisión) y CAD (Gas de colisión) se mantuvieron constantes en todos los casos en valores de 10 V, 350 V, 10 V y 1 respectivamente, al no observarse variación de la señal al modificarlos.

La cuantificación de las especies de fosfolípidos se llevó a cabo mediante la integración del área bajo los picos cromatográficos y su posterior comparación con el área de los estándares internos, con los que previamente se realizaron líneas de calibrado externas inyectando cantidades entre 1 y 300 pmol.

CLASE DE PL	DP (V)	CE (V)	FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN
PC	+60 -45	+30 -75	+184	<i>Precursor Ion +184</i>
PE	+65 -60	+35 -60	[M+H-141] ⁺ -196	<i>Neutral Loss +141</i> <i>Precursor Ion -196</i>
PI	-100	-90	-241	<i>Precursor Ion -241</i>
PS	+55 -60	+30 -90	[M+H-185] ⁺ [M-H-87] ⁻	<i>Neutral Loss +185</i> <i>Neutral Loss -87</i>
PA	-65	-80	-153	<i>Precursor Ion -153</i>
PG	+60 -75	+60 -70	[M+H-172] ⁺	<i>Neutral Loss +172</i>

Tabla C.6. Fragmentos característicos producidos por cada clase de fosfolípidos tras la disociación inducida por colisión y modos de trabajo usados para su análisis. En algunas clases de fosfolípidos (PC, PE, PS, PG) aparecen valores negativos y positivos pues se puede usar ionización negativa y positiva de forma complementaria para su identificación por cabeza polar por una parte y la determinación de sus ácidos grasos por otra.

DP: *Declustering potencial*. CE: *Collision energy*. [M]: Relación m/z del ion molecular

C.3.6. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (INMUNOBLOT)

C.3.6.1. OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADOS CELULARES Y VALORACIÓN DE PROTEÍNA

Las células adherentes se lavaron 2 veces antes de ser raspadas en 200 μ l en tampón de lisis frío (Tabla C.1). Posteriormente se dejaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 16200 x g durante 10 minutos a 4 °C, recogiendo los sobrenadantes. Se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (249) y se tomó el volumen correspondiente a 50 μ g de proteína total al que se añadió el tampón de carga (Tabla C.1). Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos en el termobloque antes de cargar en los geles de acrilamida.

C.3.6.2. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó según el método descrito en Laemmli, 1970 (250). Se usaron geles de poliacrilamida/bis-acrilamida al 10 o el 12 % según la proteína a estudiar y se corrieron en tampón de electroforesis (I) (Tabla C.1) durante los primeros 20 minutos a 60 V y luego durante 1 hora más a 120 V.

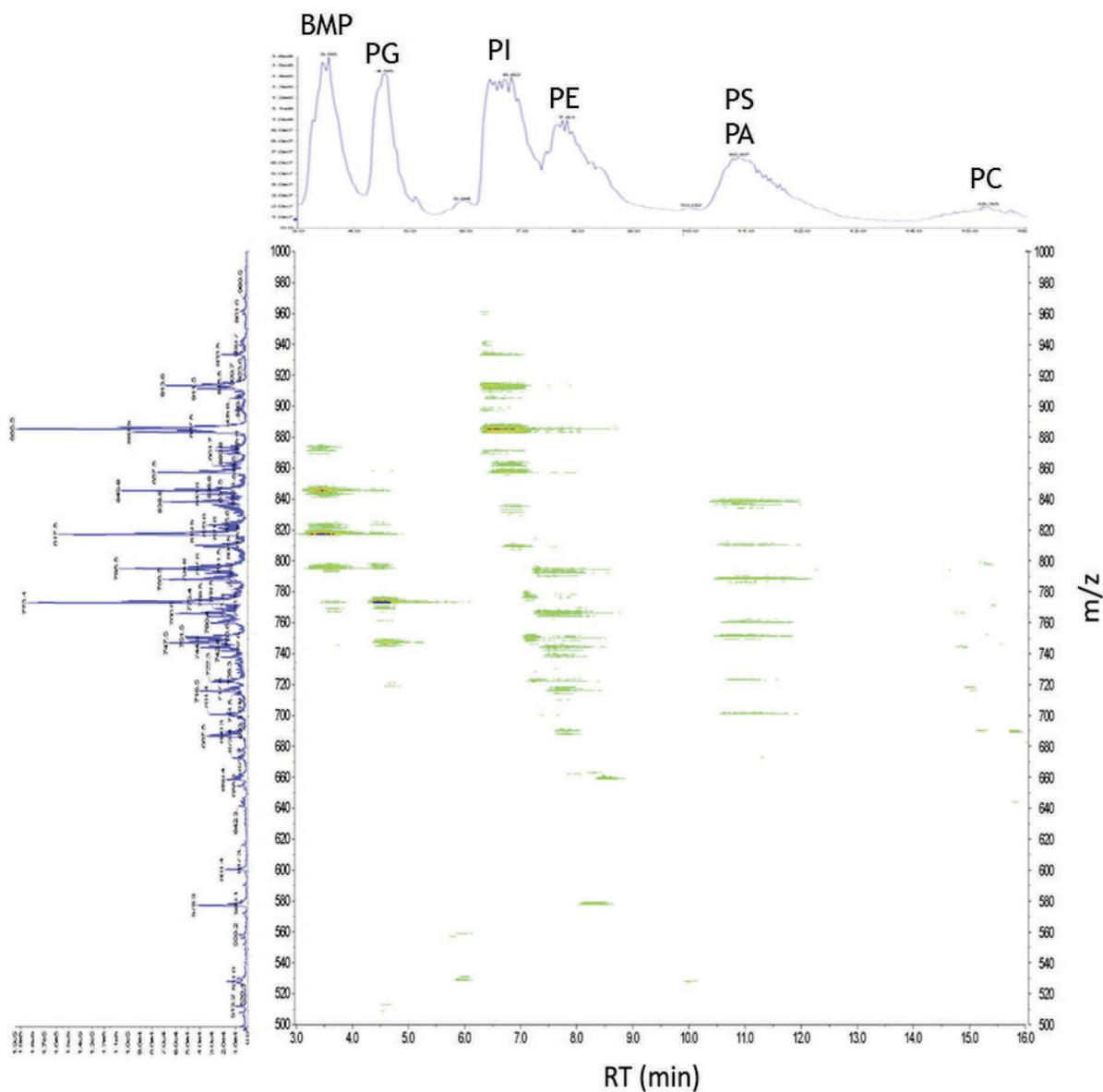


Figura C.2. Separación de distintas clases de fosfolípidos por cromatografía de líquidos de alta resolución y espectro de masas que generan. Imagen de contorno. En la parte superior aparecen los picos cromatográficos a los que eluyen las distintas clases de fosfolípidos. En la parte izquierda se muestran los picos representativos de las m/z medidas. En la parte central aparece un diagrama de colores (*contour plot*) que aúna ambos esquemas, pues cada punto corresponde a una especie molecular de fosfolípido de una m/z (eje de ordenadas), que eluye a cierto tiempo de retención (eje abcisas) y con una determinada intensidad según el color que presente, desde más débil (verde) a más intensa (rojo).

BMP: Bis(monoacilglicerol)fosfato.

C.3.6.3. TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A LAS MEMBRANAS DE FLUORURO DE POLIVINILIDENO (PVDF)

Una vez que las muestras corrieron completamente en el gel, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF usando una solución de transferencia (Tabla C.1). Este proceso se realiza mediante la aplicación del campo eléctrico creado por una intensidad de corriente de 300 mA durante 2 horas. La transferencia se realizó a 4 °C.

Para disminuir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario a la membrana de PVDF, se bloqueó con PBS-Tween conteniendo 5 % (p/v) de leche deslipidada o BSA, según el medio donde se diluya el anticuerpo primario, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente la membrana se lavó 2 veces con PBS antes de añadir el anticuerpo primario.

C.3.6.4. INCUBACIÓN CON LOS ANTICUERPOS PRIMARIO Y SECUNDARIO

Se incubó la membrana con el anticuerpo primario a las diluciones indicadas por el fabricante en cada caso (Tabla C.7). El tampón usado, el tiempo y la temperatura de incubación también se eligieron según las especificaciones proporcionadas por la casa comercial del anticuerpo (Tabla C.7). Seguidamente se retiró el anticuerpo primario y se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween. Tras ello, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano. El anticuerpo secundario se diluyó 1:5000 en PBS-Tween conteniendo leche deslipidada al 0.5 % (p/v) y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente. Una vez pasado ese tiempo, se desechó el anticuerpo secundario y se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween antes del revelado de la misma.

C.3.6.5. REVELADO DE LAS MEMBRANAS

Las membranas se incubaron con la solución de revelado (Tabla C.1) durante 1 minuto y se hizo la captura de la quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados a peroxidasa en el equipo *VersaDoc5000*, usando distintos tiempos de exposición según la proteína a analizar. La densitometría cuantitativa de las bandas de interés se llevó a cabo gracias al *software Quantity One* referenciando la proteína de interés respecto a un

control de carga que se mantiene invariable en todas las condiciones experimentales y que en este caso fue β -actina.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	TAMPÓN	TIEMPO (horas)	TEMPERATURA (°C)
P(Ser505)-cPLA ₂ α (h)	1:1000	5 % BSA	16	4
P(Thr180/Tyr182)-p38 (h)	1:1000	5 % BSA	16	4
P(Thr183/Tyr185)-JNK (h)	1:1000	5 % BSA	16	4
P(Thr202/Tyr204)-p44/42 (h)	1:1000	5 % BSA	16	4
Cox-2 (r)	1:1000	5 % BSA	1	20
β -actina (h, r)	1:20000	0.5 % Leche	1	20

Tabla C.7. *Parámetros de uso de los anticuerpos primarios empleados en el trabajo.*

(h) Humano, (r) Ratón.

C.3.7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNA Y DNA

C.3.7.1. EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción del RNA total correspondiente a 4 millones de células se eliminó el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con PBS. Se añadieron 850 μ l de TRIzol[®] a cada pocillo de placa de 6. Las células se rasparon y se pasaron a un tubo tipo *ependorf* para hacer la extracción de RNA según las instrucciones del fabricante (251). Brevemente, tras 5 minutos incubando a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ l de cloroformo y tras agitar en *vortex* durante 15 segundos, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12000 x g a 4 °C durante 15 minutos, se extrajo la fase acuosa, a la que se añadieron 500 μ l de 2-propanol. La mezcla se agitó en *vortex* 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, y el pellet de RNA se lavó con 1 ml de etanol en H₂O

DEPC al 70 % (v/v). Finalmente el RNA extraído se resuspendió en 10 μl de H₂O DEPC y se determinó su pureza y concentración midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en el *Nanodrop* (Tabla C.2).

C.3.7.2. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO

Para la síntesis de cDNA se partió del volumen correspondiente a 2 μg de RNA a los que se añadió 2 μl de cebadores aleatorios, 2 μl de cebadores oligo dT, y H₂O DEPC hasta completar un volumen total de 14.6 μl . Esa mezcla se calentó a 78 °C durante 3 minutos. Las muestras se colocaron en hielo 10 minutos y se les añadió 2 μl de tampón de reacción, 0.4 μl de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato a 25 mM, 2 μl de inhibidor de RNAsa (20 U/ μl) y 1 μl de la transcriptasa inversa de virus de la leucemia murina de Maloney (100 U/ μl), llegando el volumen final de la reacción a 20 μl exactos. La reacción se realizó a 43 °C durante 1 hora y posteriormente se inactivó la enzima a 92 °C durante otros 10 minutos. Finalmente se añadieron 380 μl de H₂O DEPC quedando la muestra diluida a una concentración de 5 ng/ μl , ya está preparada para la PCR.

C.3.7.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para la amplificación de DNA se usó el cDNA sintetizado anteriormente como molde (20 ng) al que se añadieron 0.8 μl de mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato, 20 pmol de los cebadores directos e inversos, 1 U de DNA polimerasa y 5 μl del tampón de reacción completando con H₂O DEPC hasta un volumen de 50 μl .

El programa de temperaturas usado para la amplificación del cDNA puede verse en la **Tabla C.8** y los cebadores usados en la **Tabla C.9**.

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)
1	95	600
35	95	30
	58	45
	72	30
1	72	600

Tabla C.8. Programa de temperaturas usado para la amplificación de cDNA por PCR convencional.

Una vez que el cDNA se amplificó se realizó su separación por electroforesis en geles de agarosa del 2 % (p/v). Junto a las muestras se colocaron los marcadores de peso molecular de DNA y se corrió el gel en tampón de electroforesis (II) (Tabla C.1) a 100 V durante 60 minutos. Aprovechando que el bromuro de etidio que se intercala entre los fragmentos de DNA es fluorescente cuando se excita con luz ultravioleta se observó la posición de los distintos genes de interés comparando con los marcadores de peso molecular en un sistema de documentación de geles *GelDoc* (Tabla C.2).

C.3.7.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (Q-RT-PCR)

Esta técnica permite cuantificar el cambio en los niveles de expresión de un gen, en términos de transcripción de su correspondiente mRNA, de unas células estimuladas respecto a un control sin estimular, en ambos casos normalizando respecto a un gen de referencia (*housekeeping*). Se partió del cDNA sintetizado como se detalla en el Apartado C.3.7.2, al que se le añadieron los cebadores directos e inversos (500 nM) (Tabla C.9). Para realizar la reacción de amplificación se usó un kit comercial llamado *Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR Master Mix* que contiene *SYBR Green*, Taq polimerasa, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato y un tampón de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo ABI7500 (Tabla C.2) siguiendo unas condiciones detalladas en la Tabla C.10.

PROTEÍNA	GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS
PCR CONVENCIONAL (HUMANOS)		
Acil-CoA sintetasa de cadena larga 1	<i>ACSL1</i>	5'-CCAGAAGGGCTTCAAGACTG-3' (DIRECTO) 5'-GCCTTCTCTGGCTTGTCAAC-3' (REVERSO)
Acil-CoA sintetasa de cadena larga 3	<i>ACSL3</i>	5'-CATCGCCATCTTCTGTGAGA-3' (DIRECTO) 5'-GGTGGCTTTCCATCAACAGT-3' (REVERSO)
Acil-CoA sintetasa de cadena larga 4	<i>ACSL4</i>	5'-CCGACCTAAGGGAGTGATGA-3' (DIRECTO) 5'-CCTGCAGCCATAGGTAAAGC-3' (REVERSO)
Acil-CoA sintetasa de cadena larga 5	<i>ACSL5</i>	5'-CACATTTGAGAAAGGCAGCA-3' (DIRECTO) 5'-ATGGACCCCTTTGATGATGA-3' (REVERSO)
Acil-CoA sintetasa de cadena larga 6	<i>ACSL6</i>	5'-ACCAGTGGCTGTCCTACCAG-3' (DIRECTO) 5'-GCTGATGTCCGCTGTATTGA-3' (REVERSO)
PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (HUMANOS)		
Acetil-CoA carboxilasa alfa	<i>ACACA</i>	5'-TCACACCTGAAGACCTTAAAGCC-3' (DIRECTO) 5'-AGCCCACACTGCTTGTACTG-3' (REVERSO)
Sintasa de ácidos grasos	<i>FASN</i>	5'-ACAGCGGGGAATGGGTACT-3' (DIRECTO) 5'-GACTGGTACAACGAGCGGAT-3' (REVERSO)
Estearoil-CoA desaturasa	<i>SCD</i>	5'-TTCCTACCTGCAAGTTCTACACC-3' (DIRECTO) 5'-CCGAGCTTTGTAAGAGCGGT-3' (REVERSO)
Elongasa de ácidos grasos 6	<i>ELOVL6</i>	5'-AACGAGCAAAGTTTGAAGTACTGAGG-3' (DIRECTO) 5'-TCGAAGAGCACCGAATATACTGA-3' (REVERSO)
Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1	<i>SREBF1</i>	5'- ACAGTGAAGTCCCTGGCCTAT-3' (DIRECTO) 5'- GCATGGACGGGTACATCTTCAA-3' (REVERSO)
Proteína de unión al elemento regulador de	<i>SREBF2</i>	5'- CTGCAACAACAGACGGTAATGA-3' (DIRECTO) 5'- CCATTGGCCGTTTGTGTGTCAG-3' (REVERSO)

MATERIALES Y MÉTODOS

esteroles 2		
Ciclofilina A	<i>PPIA</i>	5'-CAGACAAGGTCCCAAAGACAG-3' (DIRECTO) 5'-TTGCCATCCAACCACTCAGTC-3' (REVERSO)
PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RATÓN)		
Interleuquina 6	<i>Il6</i>	5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3' (DIRECTO) 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3' (REVERSO)
Interleuquina 12, sub-unidad alfa	<i>Il12a</i>	5'-CAATCACGCTACCTCCTCTTTT-3' (DIRECTO) 5'-CAGCAGTGCAGGAATAATGTTTC-3' (REVERSO)
Interleuquina 23, sub-unidad alfa	<i>Il23a</i>	5'-ATGCTGGATTGCAGAGCAGTA-3' (DIRECTO) 5'-ACGGGGCACATTATTTTTAGTCT-3' (REVERSO)
Interleuquina 1 beta	<i>Il1b</i>	5'-GCAACTGTTCTGAECTCAACT-3' (DIRECTO) 5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3' (REVERSO)
Factor de necrosis tumoral alfa	<i>Tnf</i>	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3' (DIRECTO) 5'-AGATAGCAAATCGGCTGACG-3' (REVERSO)
Óxido nítrico sintasa 2	<i>Nos2</i>	5'-CCAAGCCCTCACCTACTTCC-3' (DIRECTO) 5'-CTCTGAGGGCTGACACAAGG-3' (REVERSO)
Ciclooxigenasa 2	<i>Ptgs2</i>	5'-TGAGCAACTATTCCAAACCAGC-3' (DIRECTO) 5'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC-3' (REVERSO)
Proteína quimioatrayente de monocitos 1	<i>Ccl2</i>	5'-AGGTCCCATGTCATGCTTCTGG-3' (DIRECTO) 5'-CTGCTGCTGGTGATCCTCTTG-3' (REVERSO)
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>Gapdh</i>	5'-AGGTCCGTGTGAACGGATTTG-3' (DIRECTO) 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' (REVERSO)

Tabla C.9. Relación de oligonucleótidos cebadores directos e inversos usados para la amplificación de cDNA por PCR. El diseño de los oligonucleótidos se hizo usando la base de datos PrimerBank.

La cuantificación se llevó a cabo determinando el ciclo umbral (C_T) que se define como el ciclo de la reacción en el cuál la amplificación comienza a ser exponencial y aplicando el algoritmo $\Delta\Delta C_T$ (252), comparando el ciclo umbral del gen en estudio con el del gen de referencia, en este caso la ciclofilina A para humanos y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para ratón, para todas las condiciones experimentales representadas.

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)
1	95	180
40	95	12
	60	15
	72	28

Tabla C.10. Programa de temperaturas usado para la amplificación de cDNA por PCR cuantitativa a tiempo real.

C.3.8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Tras los tratamientos de las células, ya plaqueadas sobre los cristales para microscopía en placas de 6 pocillos, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se fijaron durante 20 minutos con 1 ml de paraformaldehído al 4 % en PBS con sacarosa al 3 %. Tras eliminar la solución de fijado, las células se lavaron 3 veces con PBS y se tiñeron los núcleos con una solución de DAPI en PBS a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y los lípidos neutros con BODIPY® 493/503 a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 10 minutos (253, 254). Tras lavar para eliminar el exceso de tinción 3 veces con PBS, los cristales se montaron en portas de microscopía con 25 μl de Gelvatol (Tabla C.1) para su análisis por microscopía de fluorescencia.

Para la monitorización de la fluorescencia se usaron los equipos especificados en la Tabla C.2. Para recuperar la fluorescencia emitida por el DAPI y el BODIPY® 493/503 se usó una combinación de filtros UV-2A (Ex 330-380; DM 400; BA 420) y B-2A (Ex 450-490; DM 505; BA 520). Las imágenes fueron volcadas en el *software* Image J, donde se unieron los canales azul (núcleos) y verde (lípidos neutros) en una imagen única RGB de 16 bits.

C.3.9. ENSAYOS DE RADIATIVIDAD

C.3.9.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD PLA₂

La actividad fosfolipasa A₂ dependiente de Ca²⁺ se midió usando una modificación del método descrito por Diez *et al.* (255). Los homogeneizados de monocitos, de los que previamente se habían precipitado los núcleos por centrifugación y se había medido su concentración de proteína, se incubaron a 37 °C durante 1-2 horas en 100 mM HEPES (pH 7.5) conteniendo 1.3 mM de CaCl₂ junto con membranas celulares marcadas con [³H]-AA (la cantidad correspondiente a 100000 dpm) que se usan como sustrato, en un volumen final de 150 µl, al que también se añadió 25 µM de bromoenol lactona para inhibir la actividad PLA₂ independiente de Ca²⁺ que pudiese haber (135). Antes del ensayo la membrana sustrato se calentó a 57 °C durante 5 minutos para inactivar la actividad transacilasa independiente de CoA (256). Tras la incubación a los tiempos indicados, la reacción se detuvo añadiendo cloroformo/metanol 1:2 (v/v) y los lípidos totales se extrajeron mediante el método de Bligh & Dyer (236) y se separaron por clases mediante la TLC de separación de lípidos neutros (**Figura C.1**), raspando de la sílice los puntos correspondientes a los ácidos grasos libres y midiendo la presencia de [³H]-AA libre por contaje de centelleo.

C.3.9.2. ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE [³H]-AA Y [³H]-16:0 A TRIACILGLICEROL

Los monocitos, preincubados con varias concentraciones de triacsina C, fueron marcados con 3 nM [³H]-AA o 7 nM [³H]-16:0 durante 30 minutos. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS conteniendo 0.5 mg/ml de BSA para eliminar el ácido graso no incorporado. Las células se rasparon en tampón detergente (**Tabla C.1**) y los lípidos totales se extrajeron mediante el método de Bligh & Dyer (236), para posteriormente ser separados mediante el sistema de TLC de lípidos neutros (**Figura C.1**). Finalmente se rasparon de la sílice los puntos correspondientes a los TAG y se analizó la incorporación de la marca radiactiva por contaje de centelleo.

C.3.9.3. ENSAYO DE MEDIDA DE SÍNTESIS *DE NOVO* DE ÁCIDOS GRASOS

Se adaptó un protocolo de Ma *et al.* (257). Se añadió [¹⁴C]-ácido acético (0.1 μCi/ml) como marcaje a las células al tiempo que los tratamientos indicados. Tras la incubación de 2 horas, las células se rasparon en el tampón detergente (Tabla C.1) y se extrajeron los lípidos totales mediante el método de Bligh & Dyer (236). En este caso, para diferenciar entre el acetato marcado que sirve para la síntesis *de novo* de ácidos grasos y el destinado a otros destinos metabólicos, la fracción total lipídica se sometió a transmetilación total en medio básico (Apartado C.3.4.1), separando por un lado la fracción lipídica conteniendo los FAME y la acuosa conteniendo los esqueletos de glicerol y colesterol (se comprobó previamente que el glicerol marcado radiactivamente se quedaba en la fase acuosa). Se tomó la fracción lipídica disuelta en *n*-hexano y se midió el porcentaje del [¹⁴C]-ácido acético que se había convertido en ácidos grasos durante el proceso por contaje de centelleo.

C.3.9.4. ENSAYO DE β-OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Se adaptó la idea de Antinozzi *et al.* (258). Previamente al experimento se había comprobado que el acetyl-CoA que se forma tras la β-oxidación completa de los ácidos grasos permanece en la fase acuosa de un Bligh & Dyer (236).

Para hacer este ensayo, se incubaron las células con [³H]-16:0 (0.25 μCi/ml) durante 1 hora. Tras el marcaje, las células se lavaron 3 veces con PBS conteniendo 0.5 mg/ml de BSA para eliminar el ácido grasos no incorporado y se realizaron los correspondientes tratamientos. Tras ello, las células se rasparon en agua milli-Q y los lípidos totales se extrajeron mediante el método de Bligh & Dyer (236), guardando por un lado la fase orgánica y por el otro la fase acuosa. Finalmente se midió la radiactividad de ambas fases por contaje de centelleo y se representaron los resultados como el porcentaje sobre la radiactividad total que se mide en la fase acuosa, lo cual da idea de la cantidad de [³H]-16:0 que ha sido β-oxidado a su producto hidrosoluble, el [³H]-acetyl-CoA.

C.3.10. OTRAS METODOLOGÍAS

C.3.10.1. ESTÍMULOS E INHIBIDORES

En los casos en los que se cultivaron las células en medio con suero, éste se sustituyó por medio sin suero durante 1 hora antes de la adición del tratamiento. En el caso de los monocitos, 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 los experimentos donde se usaron inhibidores químicos (**Apartado C.1.6**), éstos se añadieron 30 minutos antes de los estímulos.

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 y 1/2000 respectivamente, 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.

C.3.10.2. MEDICIÓN DE PROTEÍNA

Antes de la cuantificación de proteína para experimentos de lipidómica, las células recogidas en H₂O milli-Q se sonicaron 2 veces a una amplitud mínima del 23 % durante 18 segundos en hielo, en un sonicador de punta, para obtener homogeneizados.

La proteína se cuantificó usando el método de Bradford, 1976 (249) mediante el reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay*. Este método colorimétrico se basa en el cambio del máximo de absorbancia de 465 a 595 nm que sufre el azul de Coomassie G-250 cuando interacciona de forma no covalente en medio ácido con las proteínas. Por ello se mide la absorbancia a 595 nm, siendo mayor cuanto mayor es la cantidad de proteína en la muestra. Para cuantificar se hizo una línea de calibrado con BSA cada vez que se midió proteína, cubriendo absorbancias desde 1 hasta 11 µg de proteína, que sirvió para, mediante una extrapolación lineal, calcular la cantidad de proteína en nuestra muestra.

C.3.10.3. OXIDACIÓN DE LA LDL COMERCIAL

Se adaptó el protocolo descrito en (259, 260) para la oxidación fuerte y completa de la LDL. Brevemente, la LDL humana comercial se disolvió en PBS a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ y se oxidó con CuSO_4 10 μM a 37 °C durante 16 horas. La oxidación se neutralizó con EDTA y butilhidroxitolueno a unas concentraciones de 200 y 10 μM respectivamente. Para eliminar las sales, la LDL ya oxidada se introdujo en una membrana de celulosa y se dializó frente a PBS durante 24 horas a 4 °C, cambiando el PBS 2 veces. Todo este protocolo se realizó en condiciones de esterilidad.

Para comprobar que la LDL se había oxidado, se midió la formación de dienos conjugados, una de las consecuencias, aunque no la única, de la oxidación no enzimática de los ácidos grasos, cuya concentración (nmol/mg LDL) se obtuvo de dividir el valor de la absorbancia a 234 nm (máximo de absorbancia de los dienos conjugados) entre el producto del coeficiente de extinción molar de los hidroperóxidos con dienos conjugados ($29500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por el paso óptico (0.1 cm) por la concentración de oxidación del LDL (0.2 mg/ml).

C.3.10.4. MEDICIÓN DE INTERLEUQUINA 6 POR ELISA

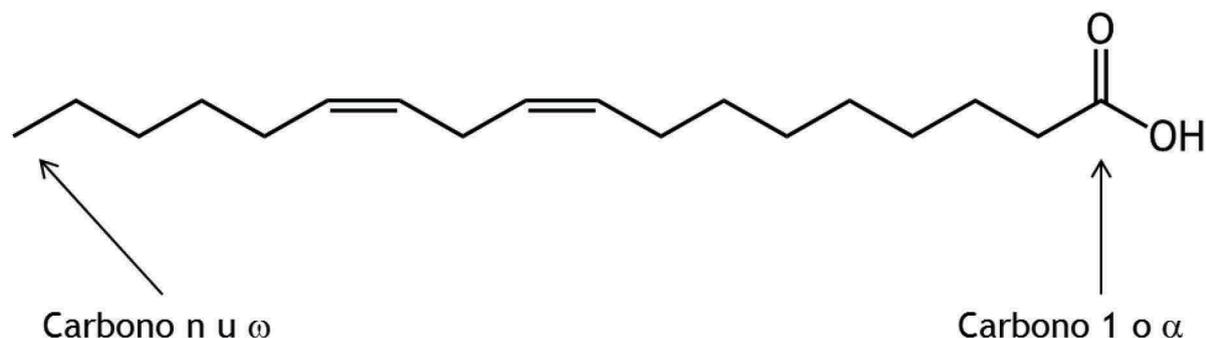
La cuantificación de los niveles de Il6 en suero de ratón se llevó a cabo mediante un ensayo de ELISA, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

C.3.11. PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La notación de las especies de lípidos se realizó siguiendo las directrices propuestas por el consorcio de lipidómica *LIPID MAPS* (261). Un ejemplo de la notación de un ácido graso de distintas formas se muestra en la **Figura C.3**.

En la mayoría de los experimentos de lipidómica los datos medidos por espectrometría de masas, presentados en forma de masa molar, se relativizaron respecto a la cantidad de proteína de la muestra que se procesa, que se intentó mantener similar en todas las condiciones de un mismo experimento. Los datos de tejidos extraídos de ratón se presentaron relativizados a masa de tejido. Los datos medidos en suero se presentaron relativizados a volumen de suero. Para comparar datos de experimentos distintos, en algunas ocasiones no se presentaron los datos en masa total sino en masa porcentual o en porcentaje de cambio de nuestra magnitud medida respecto a los datos control.

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces con incubaciones por duplicado o triplicado. Los valores mostrados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. 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 % (* $p < 0.05$).



Nombre trivial: **Ácido linoleico**

Nombre sistemático: **Ácido cis-9,12-octadecadienoico**

Notación abreviada (I): **18:2 $\Delta^{9,12}$**

Notación abreviada (II): **18:2 (ω -6)**

Notación abreviada (III): **18:2n-6**

Figura C.3. Ejemplo de las distintas nomenclaturas de los ácidos grasos. De entre las nomenclaturas abreviadas la IUPAC favorece el uso de la C:DBn-x (226). En las notaciones abreviadas, cuando no se indica, se entiende que el doble enlace está en configuración *cis*.

C: Número de carbonos. DB: Número de dobles enlaces.

D. RESULTADOS

D.1. REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS POR ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MONOCITOS HUMANOS

D.1.1. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO PROMUEVE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS NEUTROS E INCREMENTA LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN MONOCITOS HUMANOS

La exposición de monocitos humanos aislados de sangre periférica a bajas concentraciones micromolares de AA exógeno durante 2 horas resultó en un aumento significativo de los niveles celulares totales de TAG y CE (**Figura D.1**).

El análisis más detallado de la composición de ácidos grasos de estas dos clases de lípidos indicó que, además del AA, que se incorporaba esencialmente en TAG, otros ácidos grasos también aumentaron tras el tratamiento con AA exógeno, destacando el ácido palmítico (16:0) y el ácido graso 16:1 (**Figura D.2**). El estudio estructural, metabólico y funcional del ácido graso 16:1 se llevará a cabo en los siguientes apartados de resultados, debido a su especial naturaleza y características. Durante este apartado se denominará simplemente 16:1, sin especificar su isómero.

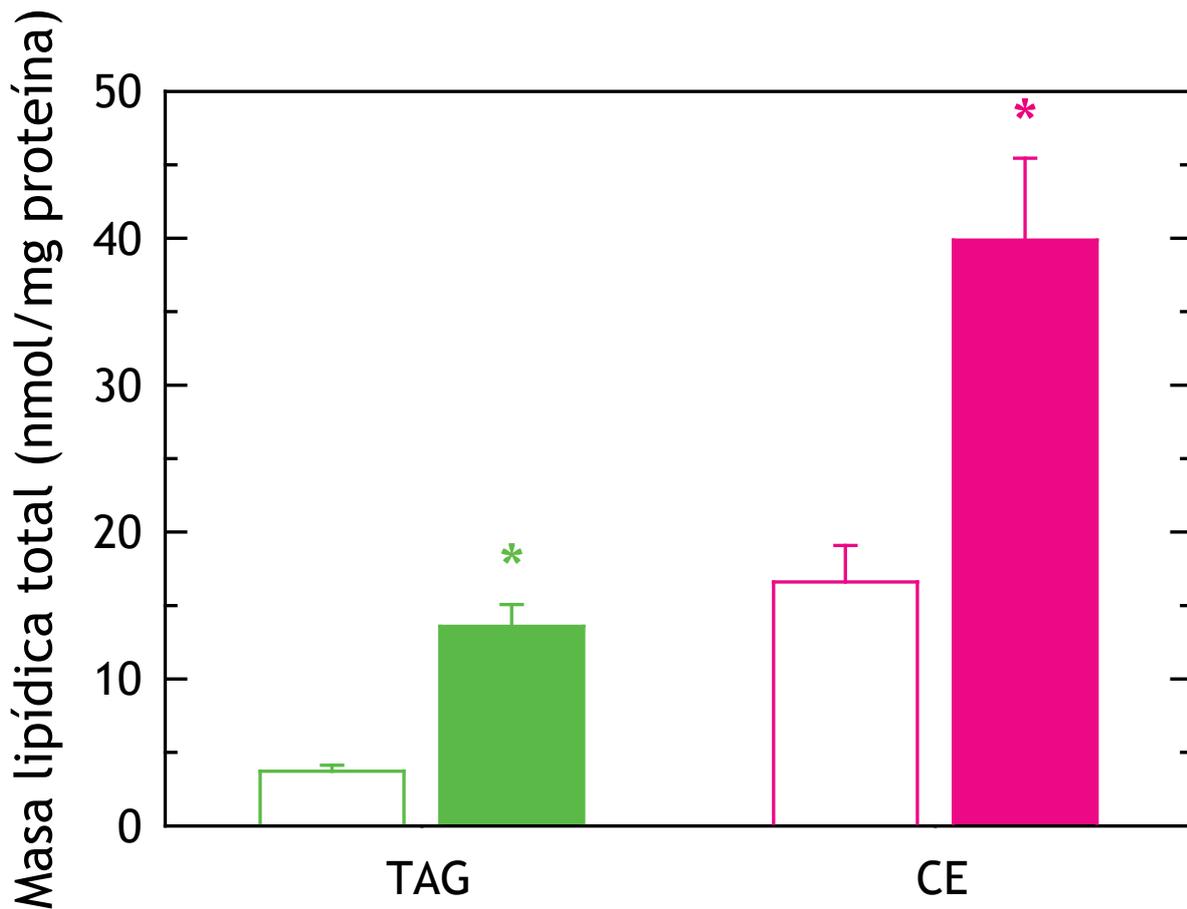


Figura D.1. El AA induce la síntesis de triacilglicerol (TAG) y ésteres de colesterol (CE) en monocitos humanos. Los monocitos se mantuvieron en medio sin suero (barras blancas) o se trataron con 10 µM AA durante 2 horas (barras coloreadas). Posteriormente los ácidos grasos en TAG y CE se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. El total de TAG se calculó sumando todos sus ácidos grasos esterificados y dividiendo entre 3.

Analizando estos resultados más en profundidad, se vio que el aumento del TAG se debía, por una parte, a una incorporación pasiva y directa del AA exógeno, y por otra parte, a un efecto activo del AA que provocaba la incorporación de otros ácidos grasos (Figura D.2-A). Esa componente activa se veía aún mejor al analizar la composición de los CE, pues en ese caso el AA apenas se incorporaba, y por lo tanto el aumento de esta clase de lípido se debía casi por completo a la incorporación de otros ácidos grasos (Figura D.2-B). De nuevo los ácidos grasos 16:0 y 16:1 fueron los que más aumentaron.

RESULTADOS

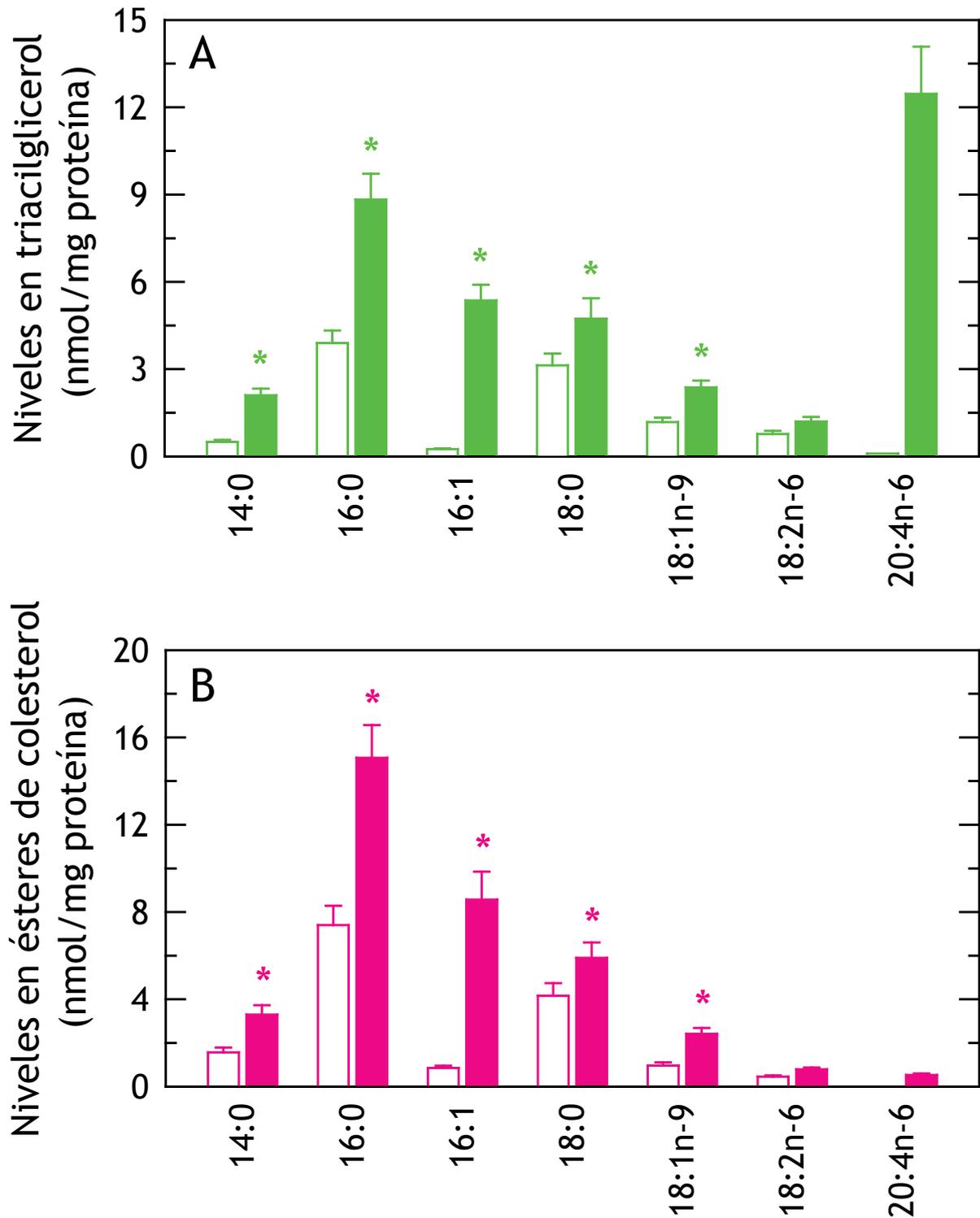


Figura D.2. El incremento de los niveles de TAG y CE por AA se debe principalmente al reclutamiento de otros ácidos grasos distintos al propio AA. Los monocitos se mantuvieron en medio sin suero (barras blancas) o se trataron con 10 μ M AA durante 2 horas (barras coloreadas). Posteriormente, los ácidos grasos en TAG (A) y CE (B) se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Para posteriormente tratar de caracterizar los mecanismos que había detrás de esa componente activa de incorporación de otros ácidos distintos al AA tras el tratamiento con éste, fue necesario separarla de la componente pasiva de incorporación de AA a TAG. Para ello se usó triacsina C (TC), un inhibidor de ciertas acil-CoA sintetasas de cadena larga (ACSL) (262). Según la bibliografía, las células de mamíferos contienen 5 isoformas de ACSL (144, 263), llamadas ACSL1, 3, 4, 5 y 6 y todas ellas aparecieron expresadas en monocitos humanos como se determinó por PCR, aunque la ACSL6 de forma muy ligera (**Figura D.3-A**). De estas 5 isoformas, las sensibles al inhibidor triacsina C son las ACSL1, ACSL3 y ACSL4 (262), habiéndose demostrado que todas ellas, aunque esencialmente la ACSL4, están implicadas en la incorporación de AA en los lípidos celulares (144, 263, 264). En base a esto, se comprobó que una concentración de 3 μ M de TC inhibía de forma casi completa la incorporación de AA en TAG (**Figura D.3-B**). Por otra parte, se vio que la TC inhibía solamente de forma parcial (≈ 70 %) la incorporación de 16:0 a TAG, reflejando que alguna de las ACSL implicadas en la incorporación de ese ácido graso, como por ejemplo la ACSL5 (263), es insensible al inhibidor (**Figura D.3-C**).

En la **Figura D.3-D** se muestra el efecto de la triacsina C en la distribución de ácidos grasos en TAG de monocitos humanos tratados con AA. Aún en presencia de TC, se observa un aumento significativo de la masa total de TAG (**Figura D.3-E**), pues a pesar de que la incorporación de AA se redujo un 95 % con el inhibidor, el aumento producido por el AA en el resto de ácidos grasos no se ve afectado (**Figura D.3-D**). El descenso de la masa de TAG total al impedir la incorporación directa del AA es de un 30 % comparado con los niveles sin TC (**Figura D.3-E**). Colectivamente, estos datos indican que la mayor parte de TAG producido tras la exposición de los monocitos a AA exógeno se debe a un mecanismo activo de señalización iniciado por el AA y no simplemente al incremento de la disponibilidad de este ácido graso por parte de las células.

RESULTADOS

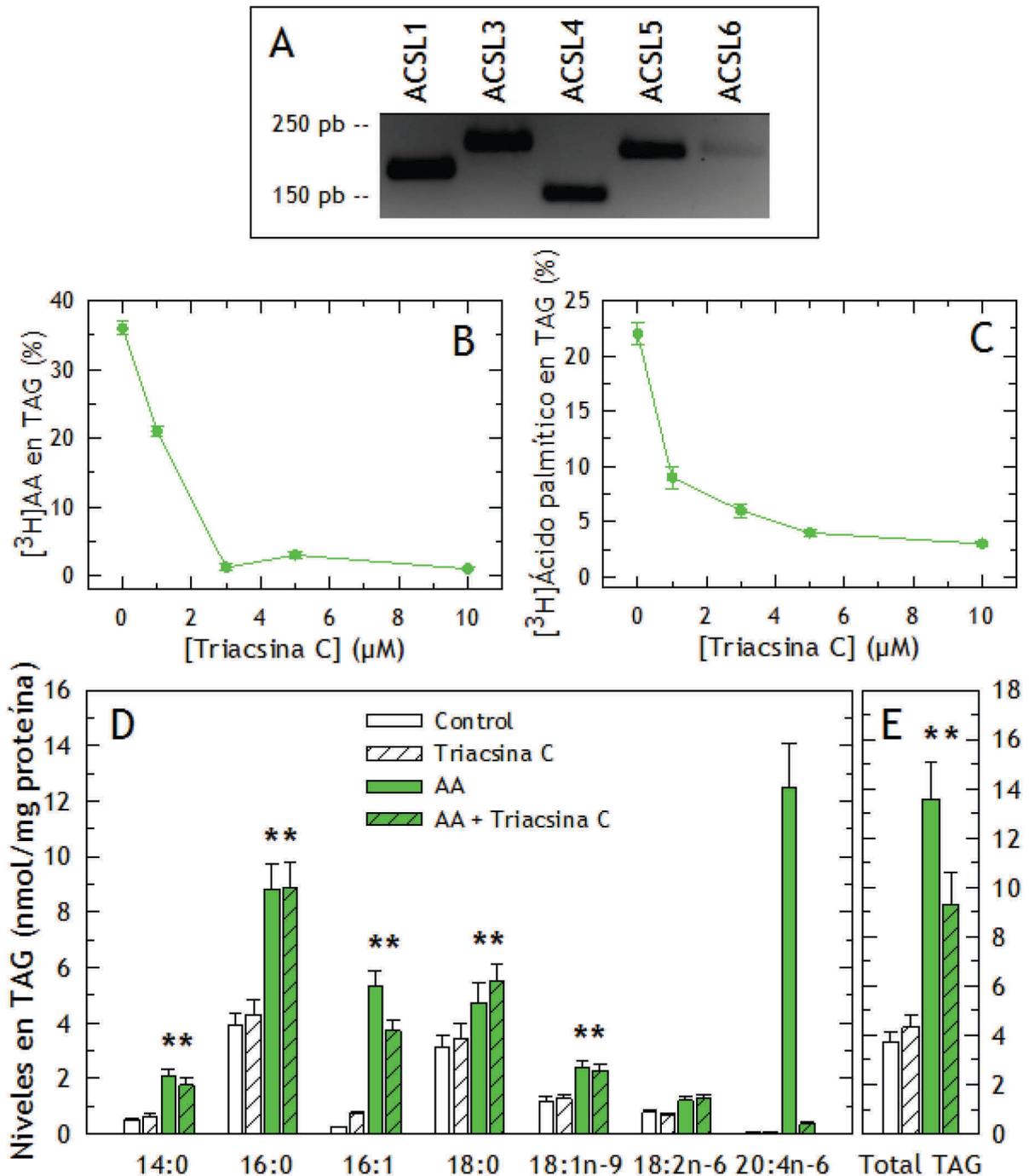


Figura D.3. Efecto de la triacsina C en la incorporación de ácidos grasos en triacilglicerol en monocitos humanos. (A) Análisis de los niveles de expresión génica de distintas ACSL por PCR. Los monocitos, preincubados con las concentraciones indicadas de TC durante 30 minutos se marcaron con 3 nM $[^3\text{H}]\text{-AA}$ (B) y 7 nM $[^3\text{H}]\text{-ácido palmítico}$ (C). Tras la extracción y separación de lípidos, se midieron los niveles de los ácidos grasos radiactivos incorporados en TAG por contaje de centelleo. Se representa el porcentaje de ácido graso marcado que se incorpora a TAG comparado respecto al total añadido. (D) Efecto de la TC en la distribución de ácidos grasos en TAG tras el tratamiento con 10 μM AA durante 2 horas medida por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol en FAME. (E) TAG total calculado como suma de todos los ácidos grasos dividida entre 3.

RESULTADOS

Para confirmar que esa síntesis de TAG se mantenía en el tiempo se llevaron a cabo tratamientos a tiempos más prolongados (**Figura D.4**), aunque en ausencia de TC, pues este inhibidor a tiempos largos afecta a la viabilidad celular debido a que su presencia hace que se acumulen grandes cantidades de AA libre, que resulta tóxico para las células (265). Se observó cómo el tratamiento de los monocitos con 10 μM AA a 14 y 24 horas aumentó la masa total de TAG hasta llegar a valores que parecen saturar a partir del primer tiempo (**Figura D.4-A**). Además, se representó el TAG total separando la componente que contiene AA y la que no lo contiene, observando que la masa de TAG producida por la señalización del AA incluso aumentó a tiempos largos y que, como ya se observó a las 2 horas de tratamiento, es ligeramente mayor a la producida por la propia incorporación del ácido graso a los TAG celulares (**Figura D.4-B**). Esto confirma que el efecto señalizador del AA sobre la síntesis de TAG no sólo sigue ocurriendo a tiempos largos, sino que incluso aumenta sus efectos.

En base a estos resultados, cuando posteriormente se estudiaron los mecanismos que regulan ese incremento de ácidos grasos en TAG y CE por AA en monocitos humanos a tiempos cortos de 2 horas, independientemente de la incorporación del propio ácido graso, siempre se hizo en presencia de triacsina C a una concentración de 3 μM añadida 30 minutos antes a las células. En esas condiciones se comprobó que el inhibidor por sí solo o junto a un ácido graso no era tóxico para los monocitos (no mostrado).

RESULTADOS

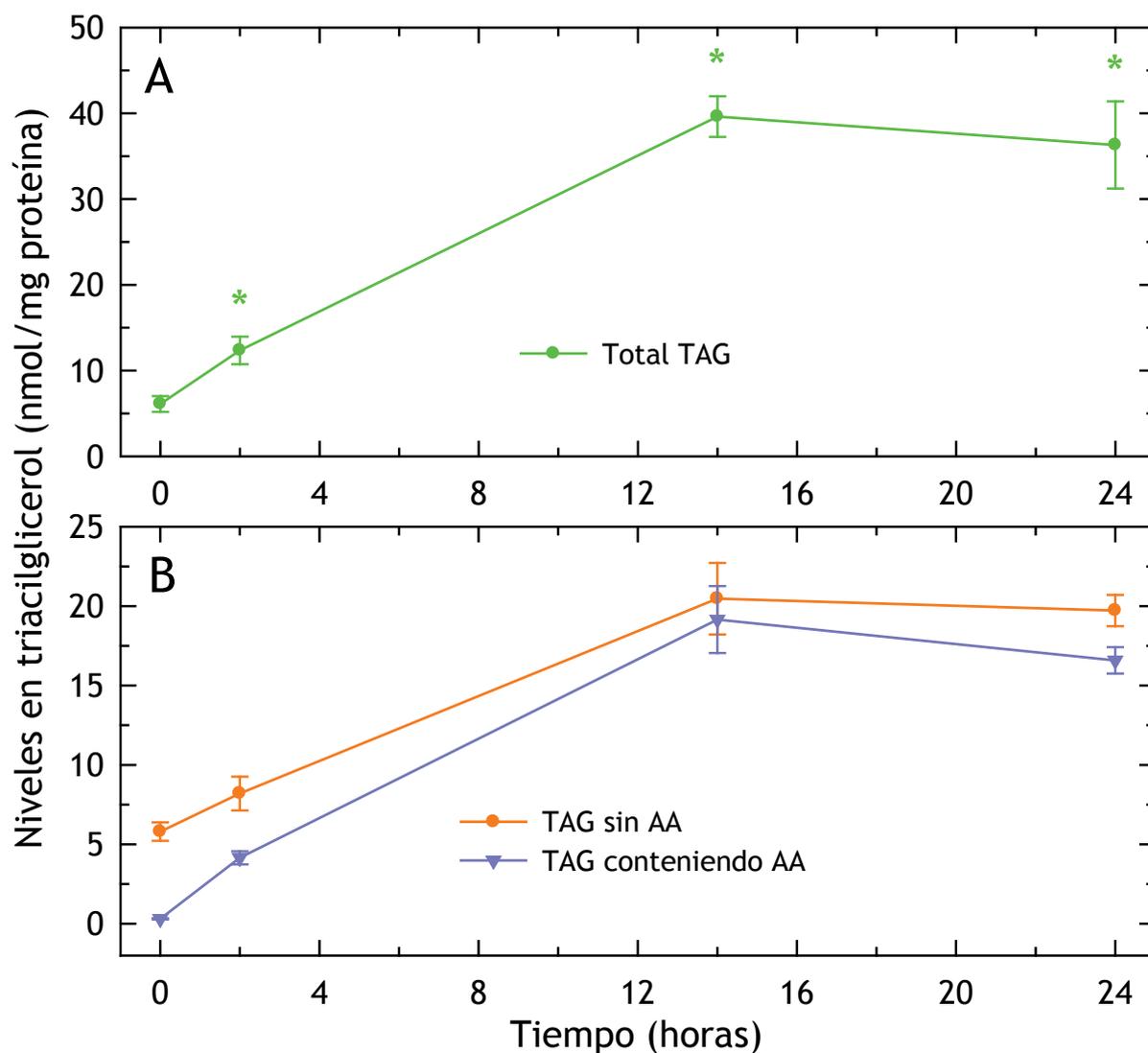


Figura D.4. El AA en períodos prolongados de incubación induce la síntesis de TAG. Los monocitos humanos se incubaron con 10 μM AA durante los tiempos indicados, siendo el control sin tratar el tiempo 0. Posteriormente se midieron los ácidos grasos en TAG por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres del glicerol en FAME. En cada caso, se calculó el TAG total sumando los ácidos grasos medidos en TAG y dividiendo entre 3.

Para estudiar si la síntesis de TAG y CE en monocitos humanos resultaba en la formación de gotas lipídicas se realizaron experimentos de microscopía de fluorescencia usando Bodipy®493/503 como sonda para visualizar los lípidos neutros que los componen (**Figura D.5**). Al contrario que los macrófagos humanos (26), los monocitos en reposo apenas presentaron gotas lipídicas. Sin embargo, la incubación de las células con AA 10 μ M durante 2 horas indujo una gran cantidad de gotas lipídicas, que también se observaron cuando se preincubaron las células con TC (**Figura D.5**).

También se investigó el efecto de otros ácidos grasos en la formación de gotas lipídicas en monocitos. El ácido palmítico, un ácido graso saturado, no indujo gotas lipídicas. Los ácidos grasos representativos de 1, 2 y 3 insaturaciones que se probaron (18:1*n*-9, 18:2*n*-6 y 18:3*n*-6) indujeron la formación de gotas lipídicas, aunque en menor grado de lo que lo hizo el AA. Pero lo más reseñable es que esa formación de gotas lipídicas, al contrario de lo que ocurría con el AA, quedó totalmente inhibida al tratar los monocitos con TC y con ello impedir la incorporación directa de esos ácidos grasos (**Figura D.5**). Eso significaría que los ácidos grasos 18:1*n*-9, 18:2*n*-6 y 18:3*n*-6 inducen la formación de gotas lipídicas sirviendo a las células como combustible lipídico y no iniciando ninguna señalización independiente de la incorporación del propio ácido graso, como sí estaría haciendo el AA.

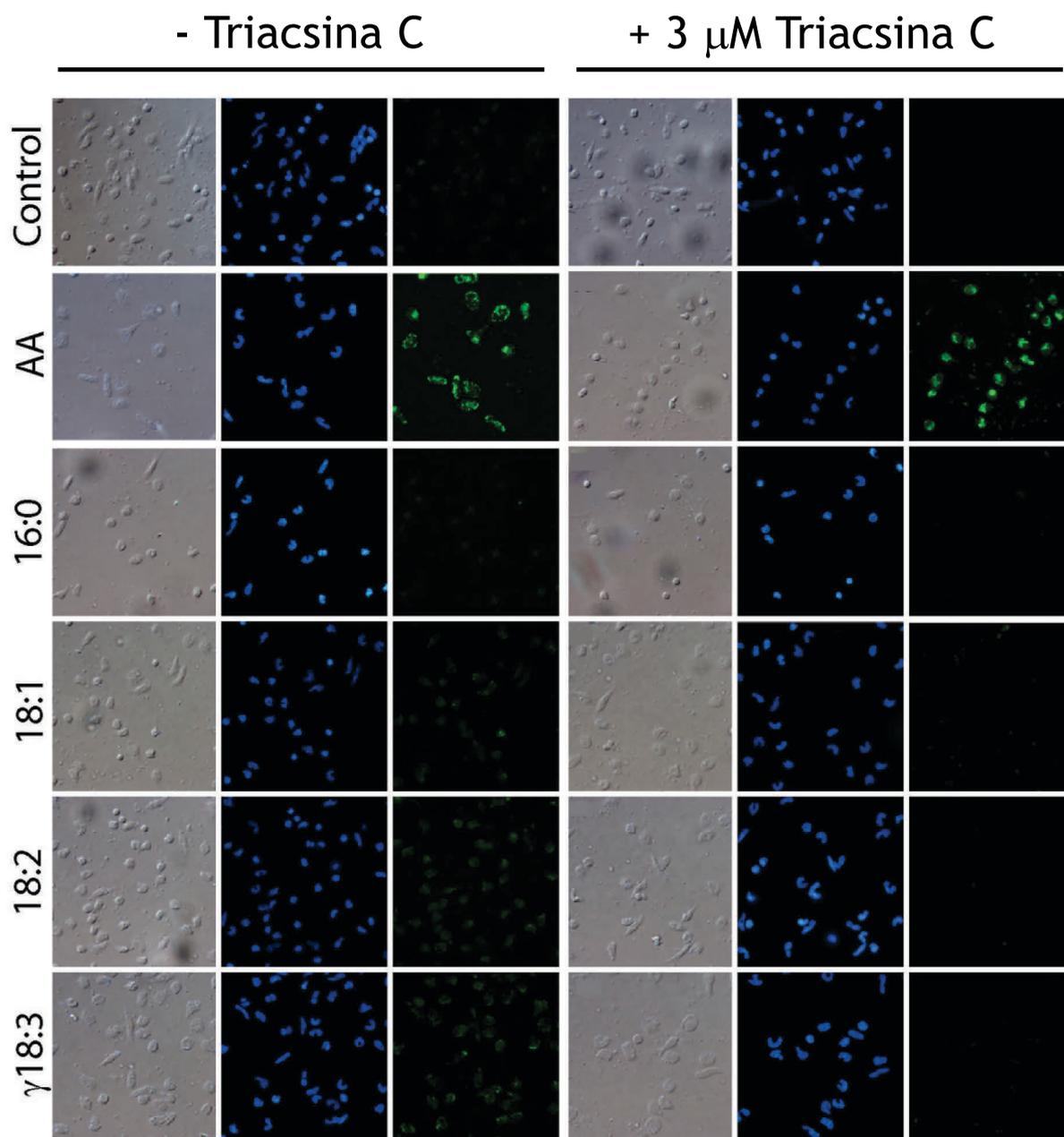


Figura D.5. Inducción de gotas lipídicas por AA y otros ácidos grasos en monocitos humanos. Los monocitos se trataron con AA, ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1n-9), ácido linoleico (18:2n-6) y ácido gamma-linolénico (18:3n-6) a una concentración de 10 μ M durante 2 horas en ausencia (columna izquierda) o presencia (columna derecha) de 3 μ M triacsina C. Tras la fijación y permeabilización, las células se tiñeron con Bodipy493/503 (2 μ g/ml) para marcar las gotas lipídicas (verde, paneles derechos) y con DAPI (1 μ g/ml) para marcar los núcleos (azul, paneles centrales) y se observaron al microscopio de fluorescencia. Los paneles izquierdos muestra la imagen Nomarski.

D.1.2. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INDUCE LA SÍNTESIS DE NOVO DE ÁCIDOS GRASOS EN MONOCITOS HUMANOS

Típicamente, los ácidos grasos que se incorporan a los lípidos neutros de las recién formadas gotas lipídicas, o bien provienen de las fuentes lipídicas inductoras de las mismas, como por ejemplo ácidos grasos libres o lipoproteínas del plasma (35, 45, 143, 266), o bien provienen de una reordenación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana que se incorporan en los lípidos neutros (36-38). En este caso, la primera opción queda descartada debido a que los experimentos se hacen en medio libre de suero y además preincubando con triacsina C para eliminar la incorporación directa del AA (**Figura D.3-D**). Sin embargo, la reordenación de los ácidos grasos celulares, desde los fosfolípidos hacia TAG y CE, principales componentes de las gotas lipídicas, no puede ser descartada a priori. Para explorar esta posibilidad se midió el perfil de ácidos grasos en los fosfolípidos celulares por GC/MS, sin encontrar diferencia significativa en ningún ácido graso (**Figura D.6-A**). Debido a que mediante esa técnica no se pueden determinar los ácidos grasos unidos por enlace éter al esqueleto de glicerol de los glicerofosfolípidos, que suelen ser especialmente abundantes en PC y en PE (122, 133), se hizo un estudio más detallado de alguna posible fuente fosfolipídica que pudiese servir como donador de ácidos grasos a TAG y CE mediante la medida de todas las especies de PC, PE y PI por HPLC/MS sin encontrar tampoco diferencias significativas en ninguna de ellas (**Figura D.6-B**). Por razones de simplicidad, debido a que se midieron más de 80 especies de fosfolípidos (38 de PC, 30 de PE y 15 PI), sólo se representa la suma total de todas ellas, separadas por clase de PL y en total (**Figura D.6-B**). Se puede observar que el total de especies de PC+PE+PI aumenta ligeramente, aunque no significativamente, tras el tratamiento, lo cual puede deberse a una ligera incorporación de AA a pesar de la presencia de TC (incorporación residual, como ya ocurría en TAG) a través de fosfolípidos de colina (**Figura D.6-B**). Por lo tanto, de forma colectiva estos datos sugieren que la estimulación con AA no está provocando una reordenación de los ácidos grasos de los fosfolípidos celulares hacia lípidos neutros, pues no se observan cambios significativos en ninguno de ellos (**Figura D.6**).

RESULTADOS

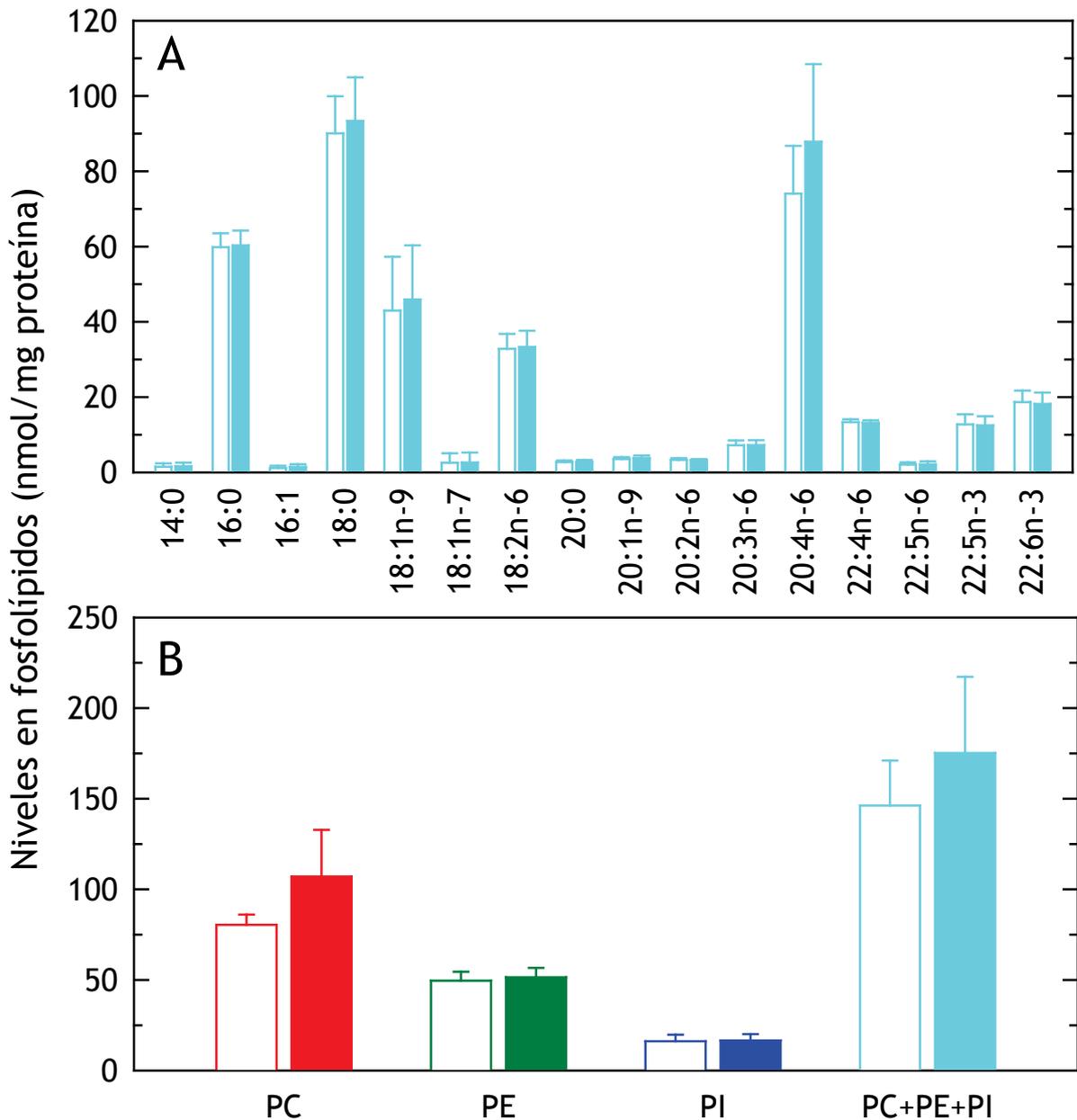


Figura D.6. Perfil de fosfolípidos al tratar los monocitos humanos con AA. Los monocitos humanos se mantuvieron en medio sin suero (barras blancas) o se trataron con 10 μM AA durante 2 horas (barras coloreadas). (A) Se midieron los ácidos grasos esterificados en fosfolípidos totales por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol en FAME. (B) Se midieron todas las especies moleculares de PC, PE y PI por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de triple cuadrupolo y se representó la suma de todas ellas por separado, así como la suma de todas las especies de PC+PE+PI. Todas las células fueron preincubadas con 3 μM triacsina C durante 30 minutos.

RESULTADOS

Otra de las posibilidades a explorar para explicar el origen de los ácidos grasos que se incorporan a las gotas lipídicas es la estimulación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos por el AA exógeno. Un dato coherente con el posible origen *de novo* de los ácidos grasos que se incorporan a TAG y CE es que de los medidos sólo aumentan significativamente los que pueden ser producidos por esta vía metabólica (14:0, 16:0, 18:0, 18:1*n*-9 y 16:1). Sin embargo, el ácido linoleico (18:2*n*-6), un ácido graso esencial que sólo puede ser adquirido mediante la dieta no varía apreciablemente (**Figura D.2**).

Para comenzar a estudiar esta hipótesis se midió el total de ácidos grasos esterificados en los monocitos humanos antes y después del tratamiento con AA. Se encontró que los monocitos basales presentaban 183 ± 11 nmol/mg proteína de ácidos grasos esterificados totales. El tratamiento de las células con $10 \mu\text{M}$ AA durante 2 horas (en presencia de TC) aumentó la cantidad de ácidos grasos endógenos esterificados casi un 20 %, hasta los 217 ± 7 nmol/mg proteína, indicando que la masa total de ácidos grasos que tenían las células después del tratamiento con AA aumentaba. De todos los medidos, solamente los ácidos grasos 14:0, 16:0 y 16:1 aumentaron significativamente tras el tratamiento. Cabe resaltar que estos 3 ácidos grasos pueden ser producidos *de novo* por la célula junto con los ácidos grasos 18:0 y 18:1*n*-9, que también aumentan, aunque sin alcanzar significación estadística. Ninguno de los ácidos grasos esenciales de las rutas metabólicas omega-6 y omega-3 sufrió variación alguna tras el tratamiento (**Figura D.7-A**). Dado que estos experimentos se realizaron en presencia de triacsina C, el aumento de los ácidos grasos no se podía dar por la incorporación del AA exógeno a distintas fuentes celulares, como se comprobó en la **Figura D.7-A**. Además tampoco parece que pueda proceder a partir de la fracción celular de ácido graso libre, dado que ésta es excesivamente baja, típicamente un 2-5 % del contenido total de ácidos grasos (por debajo de 10 nmol/mg proteína).

Por otra parte, ese aumento de los ácidos grasos totales tras la estimulación sí que podía venir dado por una disminución de la β -oxidación de los mismos desencadenada por el AA. Para comprobarlo, los monocitos fueron marcados radiactivamente con uno de sus ácidos grasos mayoritarios, en este caso [^3H]-ácido palmítico, a una concentración muy baja para no perturbar el metabolismo lipídico normal de las células, y tras estimular con AA $10 \mu\text{M}$ durante 2 horas, se midió el porcentaje de ese ácido graso que se había β -oxidado a [^3H]-acetil-CoA, según lo descrito en materiales y métodos (**Apartado C.3.9.4**), sin encontrar ningún cambio evidente (**Figura D.7-B**).

RESULTADOS

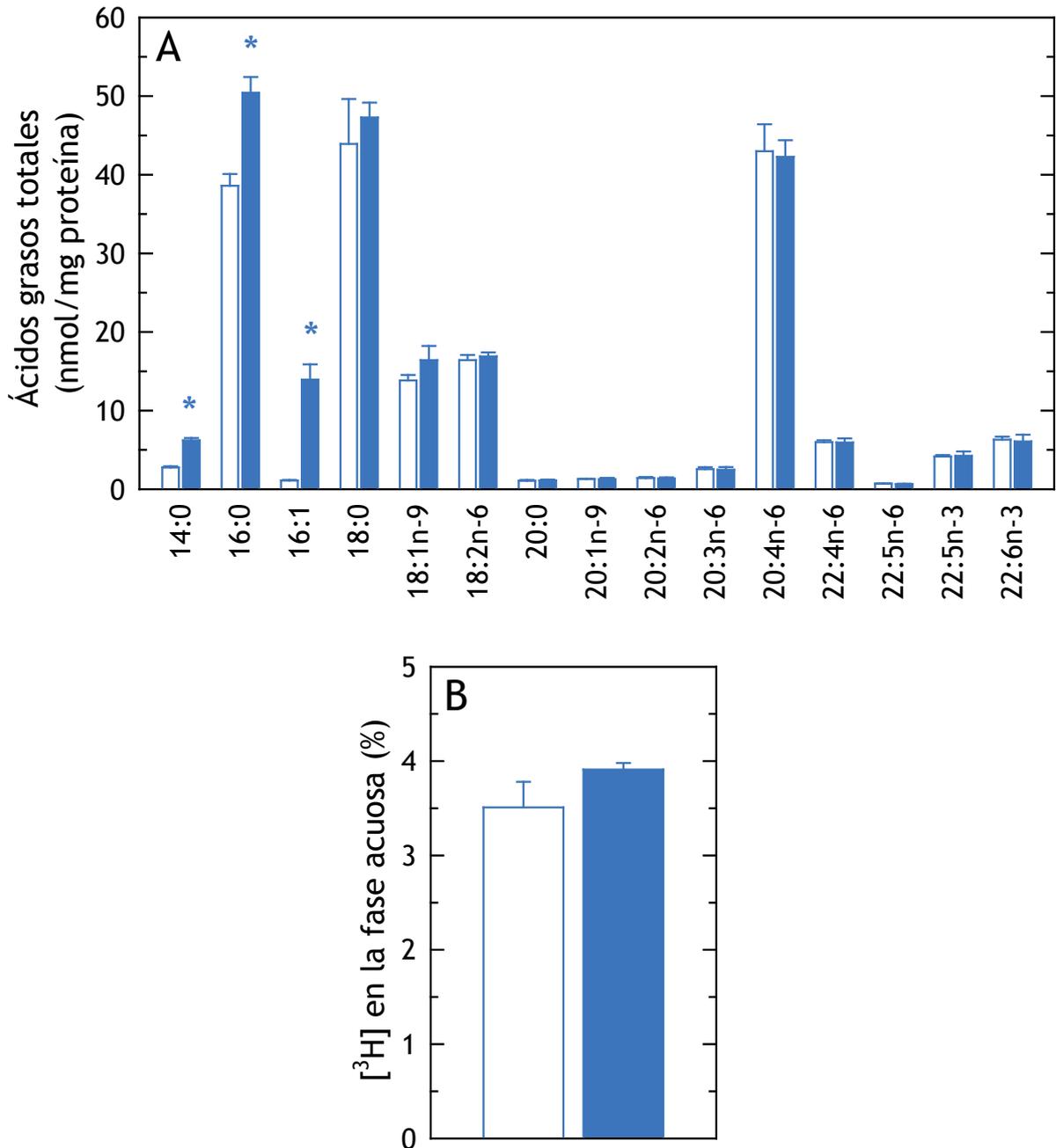


Figura D.7. El aumento de los ácidos grasos celulares totales en monocitos humanos tratados con AA no se debe a una disminución de su β -oxidación. (A) Los monocitos humanos se mantuvieron en medio sin suero (barras blancas) o se trataron con 10 μ M AA durante 2 horas (barras coloreadas) y se midieron los ácidos grasos esterificados totales por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. (B) Las células se incubaron con 7 nM [³H]-ácido palmítico durante 1 hora y se lavaron con BSA para eliminar el ácido graso no incorporado. Posteriormente se dejaron en medio sin suero (barras blancas) o se trataron con 10 μ M AA durante 2 horas (barras coloreadas). Tras la extracción, se midió la radiactividad en las fases acuosa y orgánica y se representó el porcentaje de [³H] encontrado en la fase acuosa en forma de [³H]-acetil-CoA respecto al total. Todas las células fueron preincubadas con 3 μ M triacina C durante 30 minutos.

RESULTADOS

Así pues, el hecho de encontrar más ácidos grasos esterificados tras el tratamiento con AA y que la β -oxidación de ácidos grasos no se vea afectada durante el proceso (Figura D.7) estaría apoyando la hipótesis de que esos ácidos grasos que se incorporan a las gotas lipídicas formadas por señalización de AA provienen de la síntesis *de novo*. Para confirmarlo de forma directa, las células se marcaron con [^{14}C]-ácido acético, que tras entrar a la célula es rápidamente convertido a [^{14}C]-acetil-CoA, y se midió el porcentaje de marcaje radiactivo que se había incorporado a los ácidos grasos (Apartado C.3.9.3). Tras el tratamiento con AA se observó un incremento significativo ($p < 0.003$) del ácido acético marcado con [^{14}C] que se había incorporado a ácidos grasos respecto a las células control (Figura D.8), quedando demostrada una activación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos por el AA exógeno.

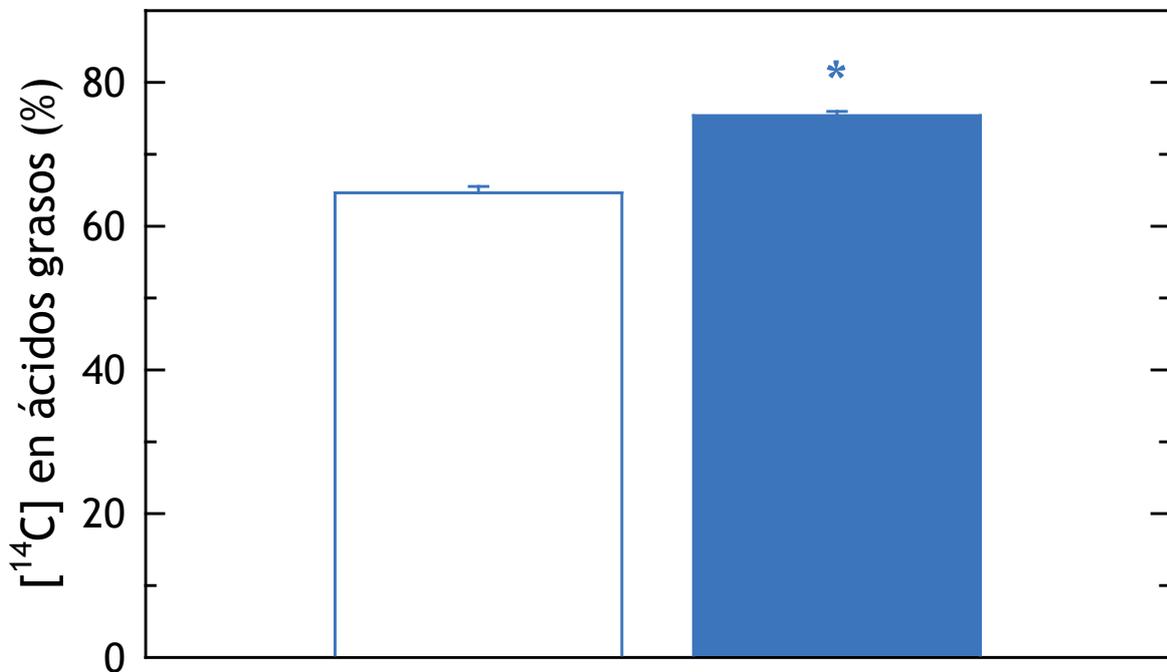


Figura D.8. Efecto del AA en la síntesis *de novo* de ácidos grasos en monocitos humanos. Las células se marcaron con [^{14}C]-ácido acético ($0.1 \mu\text{Ci/ml}$) y seguidamente se dejaron sin tratar (barra blanca) o se trataron con $10 \mu\text{M}$ AA durante 2 horas (barra coloreada). Tras la extracción de lípidos, se separaron los ácidos grasos del esqueleto de glicerol o colesterol mediante transmetilación en medio básico y se midió la radiactividad en las fases acuosa y orgánica, representándose el porcentaje de [^{14}C] incorporado a ácidos grasos respecto a su señal total. Todas las células fueron preincubadas con $3 \mu\text{M}$ triacsina C durante 30 minutos.

D.1.3. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO ACTIVA LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS *DE NOVO* DE ÁCIDOS GRASOS EN MONOCITOS HUMANOS

La síntesis *de novo* de ácidos grasos en mamíferos es un proceso en el cual las células pueden sintetizar ácido palmítico a partir del mediador metabólico acetil-CoA mediante una serie de reacciones secuenciales controladas por enzimas como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS). Una vez que se forma, el ácido palmítico puede sufrir reacciones de elongación y desaturación para dar lugar a otros ácidos grasos (16:1*n*-7, 18:0, 18:1*n*-9, etc) (177, 267-271). Toda la ruta metabólica está controlada por los factores de transcripción de las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP) (272-274).

Mediante el uso de PCR cuantitativa se observó un aumento, por el tratamiento con AA, de los niveles de mRNA transcrito de los genes codificantes para 4 enzimas claves en la síntesis *de novo* de ácidos grasos: acetil-CoA carboxilasa alfa (ACC α), sintasa de ácidos grasos (FAS), esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD-1) y elongasa de ácidos grasos de cadena muy larga 6 (ELOVL6) (Figura D.9). Además, se detectó un aumento significativo en los niveles transcritos de mRNA, tanto de SREPB-1, totalmente coherente con el hecho de que es un factor de transcripción clave en la expresión de estos genes que controlan la síntesis *de novo* de ácidos grasos, como en los niveles de SREBP-2, factor de transcripción relacionado con el control de la ruta de biosíntesis del colesterol, que podría estar regulando también la formación de ésteres de colesterol tras el tratamiento con AA (Figura D.9).

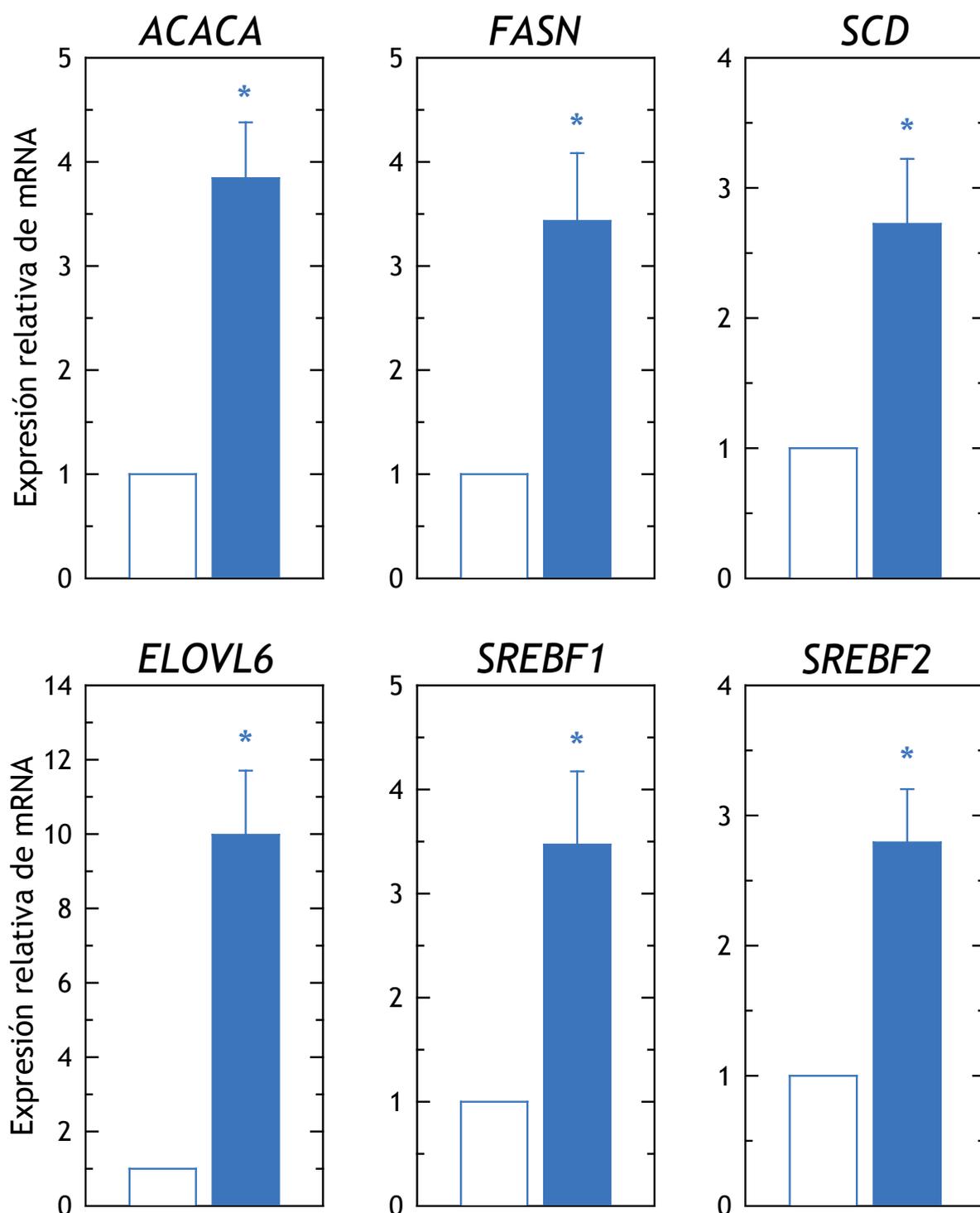


Figura D.9. Efecto del AA en la expresión génica de proteínas implicadas en la síntesis de novo de ácidos grasos en monocitos humanos. La expresión relativa de los genes en los controles (barras blancas) o en las células tratadas con 10 μM AA durante 2 horas (barras coloreadas) se determinó por PCR cuantitativa a tiempo real como se describe en materiales y métodos. Todas las células fueron preincubadas con 3 μM triacsina C durante 30 minutos.

ACACA: Acetil-CoA carboxilasa alfa. FASN: Sintasa de ácidos grasos. SCD: Estearoil-CoA desaturasa 1. ELOVL6: Elongasa de ácidos grasos 6. SREBF1: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1. SREBF2: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 2.

RESULTADOS

Para verificar si ese aumento de mRNA transcrito se correspondía con una implicación funcional de las proteínas para las que codifica, se llevaron a cabo experimentos usando inhibidores específicos de alguna de esas enzimas implicadas en la lipogénesis, como la ACC α , que cataliza el primer paso de la síntesis *de novo* de ácidos grasos mediante la síntesis de malonil-CoA a expensas de acetil-CoA (**Figura D.10-A**); la SCD-1, una delta-9 desaturasa que participa en la desaturación de los ácidos palmítico y esteárico dando lugar a los ácidos palmitoleico y oleico (**Figura D.10-B**); y los factores de transcripción SREBP-1 y -2 que controlan la expresión génica de esas proteínas involucradas en la lipogénesis *de novo* (**Figura D.10-C**). Se observó que el tratamiento con AA 10 μ M durante 2 horas aumentó los niveles totales de TAG, así como de los productos de desaturación de la SCD-1 esterificados en TAG (**Figura D.10**), como ya se había determinado anteriormente. La inhibición de la ACC α con TOFA (275) resultó en una disminución significativa de la masa total de TAG, reflejando que esa enzima está implicada en el proceso de síntesis de ácidos grasos estimulada por AA en monocitos humanos (**Figura D.10-A**). El uso del producto comercial Cay10566 (210), inhibidor de la SCD-1, resultó en la completa inhibición del aumento de los niveles de los ácidos grasos 16:1 y 18:1*n*-9 esterificados en TAG al tratar con AA, lo cual parece involucrar también a esta enzima en los procesos de desaturación de los ácidos grasos mayoritarios 16:0 y 18:0 que conducen a la acumulación de 16:1 y 18:1*n*-9 en los lípidos neutros de monocitos humanos estimulados con AA (**Figura D.10-B**). Por último, también se observó un descenso de los niveles del TAG total acumulado tras el tratamiento con AA al preincubar los monocitos con fatostatín (276), un inhibidor de los factores de transcripción SREBP-1 y -2, aunque no alcanzó significación estadística (**Figura D.10-C**).

De forma global se observa que el AA estaría activando la síntesis *de novo* de ácidos grasos por parte de los monocitos humanos, y que esos ácidos grasos estarían siendo usados por las células para la síntesis de lípidos neutros.

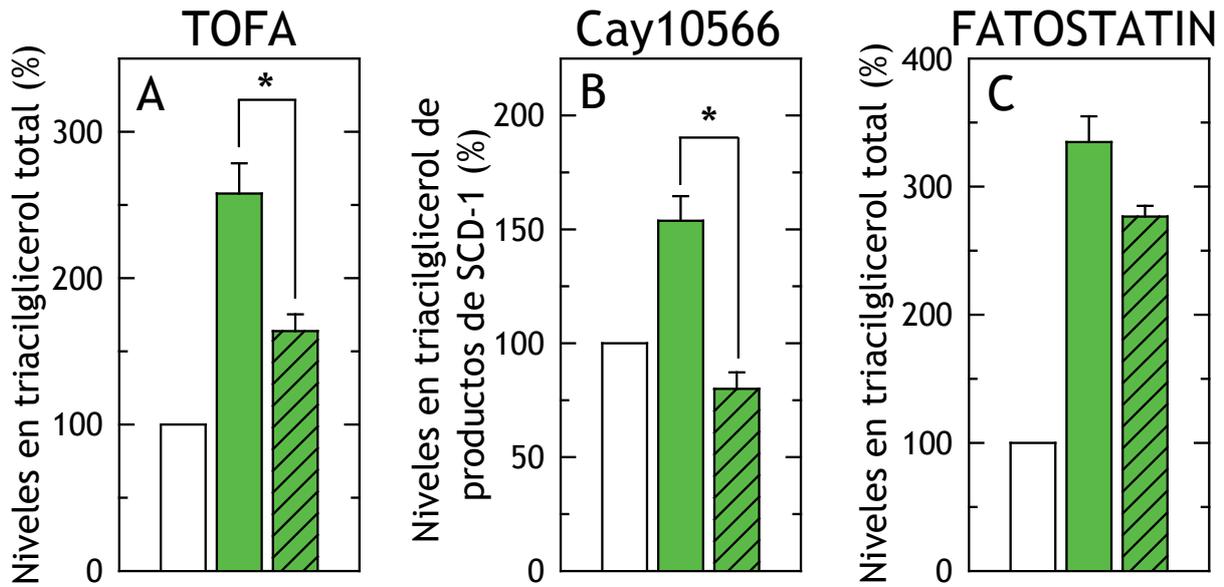


Figura D.10. Efecto de los inhibidores de enzimas de la síntesis de novo de ácidos grasos en los niveles de TAG acumulados en monocitos humanos tratados con AA. Las células se mantuvieron en medio sin suero (barras blancas) o se añadió 10 μM AA durante 2 horas en ausencia (barras coloreadas) o presencia (barras rayadas) de inhibidores específicos de la acetil-CoA carboxilasa alfa (TOFA 30 μM , panel A), la esteroil-CoA desaturasa 1 (Cay10566 3 μM , panel B) y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1 y 2 (Fatostatín 20 μM , panel C), añadidos 30 minutos antes del AA. Los ácidos grasos presentes en TAG se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol en FAME. En los paneles (A) y (C) se representa la variación del total de TAG, calculado como la suma de todos los ácidos grasos en cada caso dividido entre 3. En el panel (B) se representa el cambio de la suma de los productos de la esteroil-CoA desaturasa 1 (16:1 y 18:1) esterificados en TAG. Todas las células fueron preincubadas con 3 μM triacsina C durante 30 minutos. Los inhibidores por sí mismos no variaron los niveles de TAG y no se muestra por simplicidad en la representación.

D.1.4. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO QUE RESULTA EN LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA cPLA₂α POR UNA ACCIÓN CONJUNTA DE JNK Y p38

Es bien conocido y estudiado que muchas respuestas celulares a diversos estímulos implican la activación de la señalización lipídica mediada por la cPLA₂α (124, 125, 127, 128, 144, 277). Además, esta enzima ha sido identificada como clave en la síntesis de gotas lipídicas en varios modelos celulares recientes (35-38, 56, 143, 158, 278). La cPLA₂α puede ser inhibida de forma selectiva por pirrofenona, un compuesto que presenta una especificidad por esta enzima 100 veces mayor que por cualquier otra PLA₂ (279, 280). En la **Figura D.11** se observa cómo la preincubación de los monocitos humanos durante 30 minutos con pirrofenona a una concentración tan baja como 1 μM resultó en una fuerte inhibición de la síntesis de gotas lipídicas provocada por AA (siempre en presencia de triacsina C, para estudiar específicamente esa componente señalizadora del AA hacia la síntesis de gotas lipídicas).

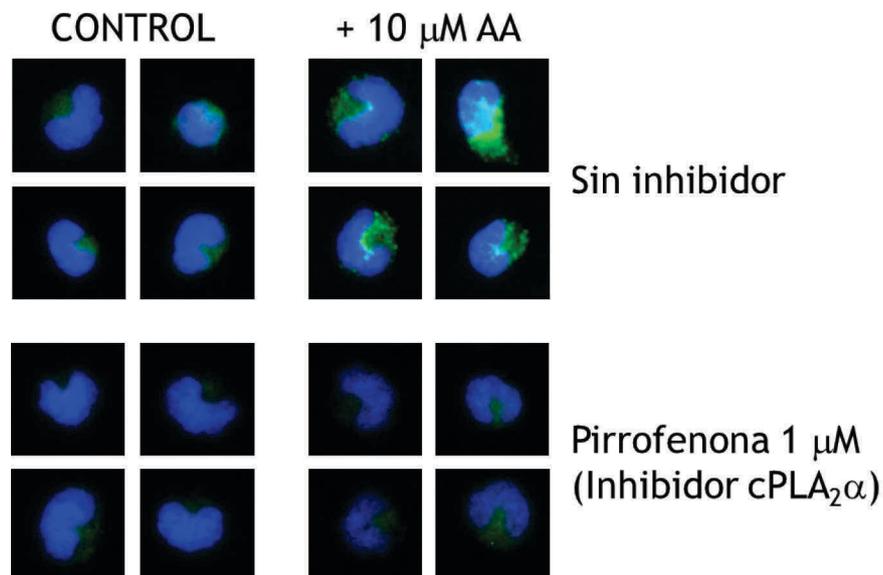


Figura D.11. Efecto de la pirrofenona en la formación de gotas lipídicas por AA en monocitos humanos. Los monocitos sin tratar (columna izquierda) o tratados con 10 μM AA durante 2 horas (columna derecha) se preincubaron en presencia de pirrofenona. Las células se tiñeron con Bodipy493/503 (2 μg/ml) y DAPI (1 μg/ml) para marcar las gotas lipídicas y los núcleos en verde y azul respectivamente y se observaron al microscopio de fluorescencia. Todas las células fueron preincubadas con 3 μM triacsina C durante 30 minutos.

RESULTADOS

Este resultado muestra que la cPLA₂α parece ser una enzima clave para la formación de gotas lipídicas por AA y que, probablemente, su ruta intracelular de activación esté siendo estimulada por el AA exógeno. Para verificar que la ruta de señalización de la cPLA₂α está activada, primero se estudió la fosforilación de la enzima en su residuo Ser⁵⁰⁵, que se asocia a un incremento de su actividad (144, 281, 282). Usando un anticuerpo anti-fosfo-cPLA₂α para reconocer de forma específica el residuo Ser⁵⁰⁵ fosforilado y no otros también susceptibles a la fosforilación, se observó que los niveles de fosforilación de la enzima en ese residuo aumentaron tras exponer las células a 1 y 2 horas de 10 μM AA. También se observó un cierto nivel de fosforilación bajo condiciones basales (**Figura D.12-A**). A continuación se hicieron ensayos de actividad enzimática *in vitro* (**Apartado C.3.9.1**). Así, se observó un aumento significativo en la actividad PLA₂ dependiente de Ca²⁺ en los homogeneizados de células tratadas con AA 10 μM durante 2 horas, comparadas con las células sin tratar (**Figura D.12-B**). Por el contrario no se encontraron cambios en la actividad PLA₂ independiente de Ca²⁺ entre homogeneizados de células control y tratadas con AA (**Figura D.12-B**). El incremento medido de la actividad PLA₂ dependiente de Ca²⁺ corresponde a la cPLA₂α dado que la preincubación con pirrofenona la inhibió completamente; sin embargo, el tratamiento con 5 μM de 12-epi-scalaradial, un inhibidor selectivo de las PLA₂ secretadas cuya actividad es también dependiente de Ca²⁺ (131) no produjo efecto ninguno (no mostrado).

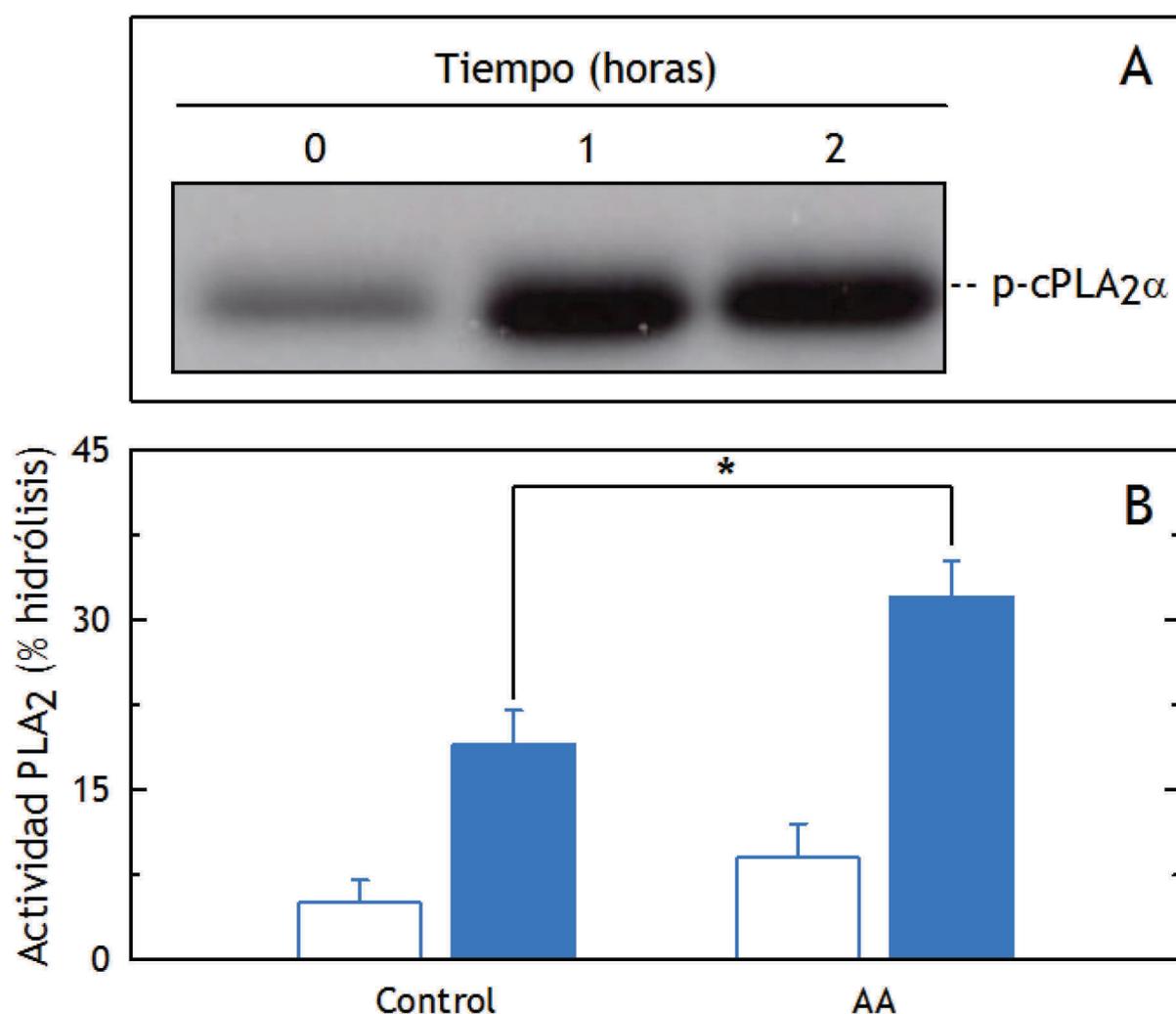


Figura D.12. La cPLA₂α se activa por el AA exógeno en monocitos humanos. (A) Inmunoblot de la fosforilación de la cPLA₂α en el residuo Ser⁵⁰⁵ cuando los monocitos se tratan a los tiempos indicados con 10 μM AA. (B) Ensayo de actividad PLA₂ de homogeneizados de monocitos. Los homogeneizados de células control y células tratadas con 10 μM AA durante 2 horas se prepararon como se indica en materiales y métodos y se midió la actividad PLA₂ en ausencia (barras blancas) o presencia (barras coloreadas) de 1 mM CaCl₂ en el tampón del sustrato. Todas las células fueron preincubadas con 3 μM triacsina C durante 30 minutos.

RESULTADOS

Para identificar qué quinasa o quinasas podrían estar implicadas en esa fosforilación de la cPLA₂ α en la Ser⁵⁰⁵ se utilizaron inhibidores de ciertas rutas de señalización que actúan anteriormente en la ruta metabólica de activación de la cPLA₂ α . El derivado de la metoxiflavona PD98059 se usó para inhibir la ruta de señalización de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK-1/2) (283); el piridinil-imidazol SB203580 se usó para la inhibición selectiva de las quinasas p38 (284) y el inhibidor de tipo antrapirazolona SP600125 se usó para bloquear la ruta de señalización de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (285). Experimentos preliminares indicaron que el AA exógeno induce una activación temprana de las quinasas p38 y JNK que se mantiene y amplifica hasta las 2 horas de tiempo (**Figura D.13**). Sin embargo, no se observó fosforilación de la quinasa ERK a ningún tiempo (no mostrado). Esto sugiere que p38 y JNK podrían estar involucradas en la fosforilación de la cPLA₂ α .

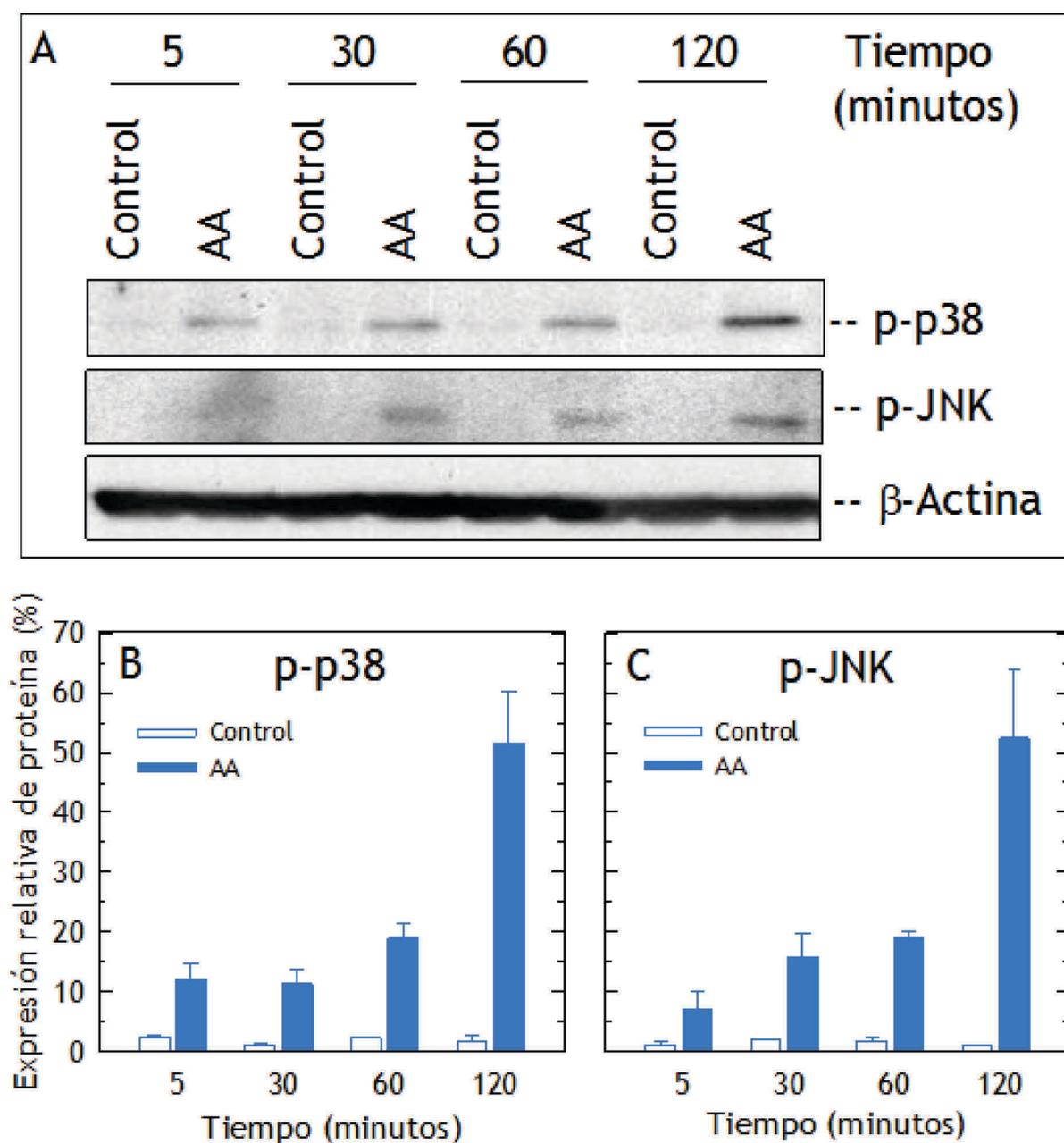


Figura D.13. El AA exógeno induce la fosforilación de la quinasas p38 y JNK en monocitos humanos. Las células se trataron con 10 μ M AA a los tiempos indicados y se midió la fosforilación de p38 y JNK por inmunoblot (A). La cuantificación de la fosforilación relativa de p38 (B) y JNK (C) fue llevada a cabo con el software *Quantity One*. Todas las células fueron preincubadas con 3 μ M triacsina C durante 30 minutos.

RESULTADOS

Para estudiar de forma directa si las rutas de señalización de p38 y JNK podrían regular la activación de la cPLA₂α, se hicieron experimentos de inmunoblot de la fosforilación de la cPLA₂α por AA en células preincubadas con los inhibidores anteriormente descritos. De acuerdo a la no implicación de la ruta ERK, se vio que su inhibidor específico PD98059 no variaba la fosforilación provocada por el AA (**Figura D.14**). Por otra parte, los inhibidores de p38 (SB203580) y JNK (SP600125) redujeron parcialmente la fosforilación de la enzima, pero sin dejarla en sus niveles basales. Sin embargo, cuando ambos inhibidores se añadieron de forma conjunta, la fosforilación de la cPLA₂α volvió a los niveles encontrados en las células control (**Figura D.14**). Colectivamente, estos datos sugieren que las rutas de señalización de p38 y JNK actúan en la activación por fosforilación de la cPLA₂α por el AA exógeno y que ese nivel de fosforilación en el residuo Ser⁵⁰⁵ resulta de la acción conjunta de ambas.

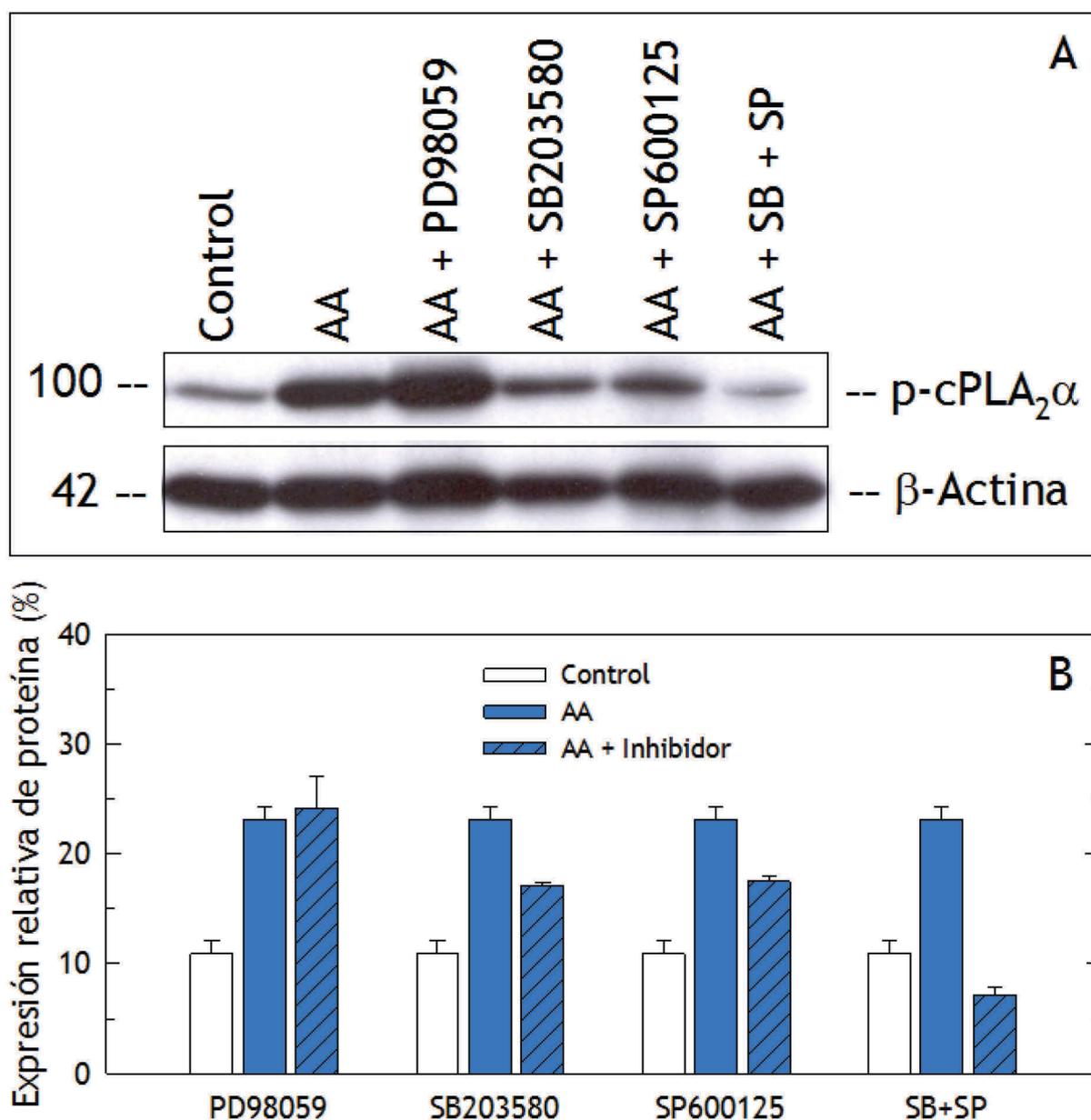


Figura D.14. Análisis de las quinasas implicadas en la fosforilación de la cPLA₂α en monocitos humanos. (A) Las células se mantuvieron en medio sin suero o se trataron con AA 10 μM durante dos horas en la ausencia o presencia de distintos inhibidores de las MAP quinasas como se indica. Se midió la fosforilación de la cPLA₂α en el residuo Ser⁵⁰⁵ por inmunoblot. En (B) se muestra la cuantificación de la fosforilación relativa de la cPLA₂α en ausencia o presencia de los distintos inhibidores llevada a cabo con el software *Quantity One*. Todas las células fueron preincubadas con 3 μM triacsina C durante 30 minutos.

PD98059: Inhibidor de ERK (10 μM). SB203580: Inhibidor de p38 (10 μM). SP600125: Inhibidor de JNK (10 μM).

RESULTADOS

Como ya se observó por microscopía de fluorescencia en la **Figura D.11**, la cPLA₂ α parece ser una enzima necesaria para la formación de gotas lipídicas por AA en monocitos humanos, pues su inhibición con pirrofenona resulta en la completa eliminación de la formación de estos orgánulos. Con el objeto de ampliar ese resultado y relacionar las rutas de activación de la cPLA₂ α con la formación de gotas lipídicas, se estudió si las MAPK influyen en la síntesis de los orgánulos. Usando sus inhibidores específicos se vio que la inhibición por separado de p38 con 10 μ M SB203580 o JNK con 10 μ M SP600125 no altera la formación de gotas lipídicas inducidas por AA en presencia de TC (**Figura D.15**), aunque cabe destacar que la tinción de lípidos neutros por el Bodipy493/503 se ve distinta al caso en el que no se preincuba con los inhibidores, mucho menos punteada y definida, lo cual podría indicar que se están sintetizando lípidos neutros a pesar de la presencia de estos inhibidores, pero que la formación de LD por el AA se podría estar viendo afectada en ese caso. Sin embargo, la preincubación de las células con ambos inhibidores al mismo tiempo resultó en la completa eliminación de las gotas lipídicas producidas por el AA (**Figura D.15**), de acuerdo con que las rutas de señalización de p38 y JNK que actúan en la activación de la cPLA₂ α permanecen bloqueadas al mismo tiempo, y por ello, la enzima presenta niveles basales de fosforilación (**Figura D.14**). Estos datos sugieren que el control de la fosforilación de la cPLA₂ α por parte de las MAPK p38 y JNK es un mecanismo importante para la formación de LD por AA en monocitos humanos.

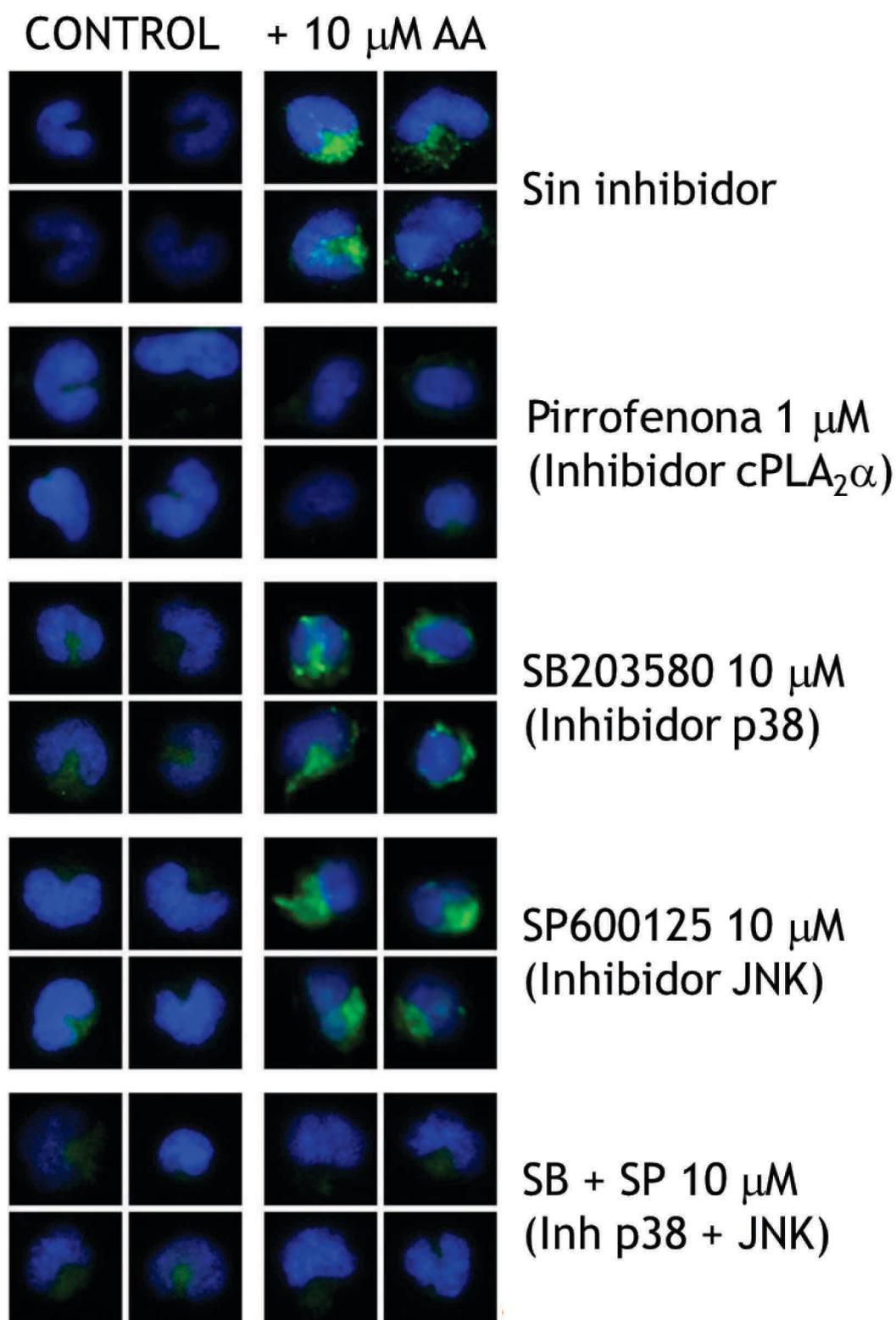


Figura D.15. Efecto de los inhibidores de las MAPK en la formación de gotas lipídicas por AA en monocitos humanos. Los monocitos sin tratar (columna izquierda) o tratados con 10 μM AA por 2 horas (columna derecha) se preincubaron en presencia de los inhibidores que se indican. Las células se tiñeron con Bodipy493/503 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para marcar las gotas lipídicas y los núcleos en verde y azul respectivamente y se observaron al microscopio de fluorescencia. Todas las células fueron preincubadas con 3 μM triacsina C durante 30 minutos.

Por último, se estudió si la formación de gotas lipídicas que se veía en la **Figura D.15** mediante la tinción con el colorante lipofílico Bodipy493/503 estaba relacionada con variaciones en los niveles de lípidos neutros de la célula, cuya síntesis es un evento necesario, aunque no suficiente, para la posterior formación de LD (35). En la **Figura D.16-A** se puede observar que los niveles de TAG y CE, que aumentan al tratar con AA, se mantienen cuando se preincuban los monocitos con los inhibidores de p38 (SB203580) y JNK (SP600125) por separado, mientras que cuando se usaron ambos inhibidores al mismo tiempo los niveles de lípidos neutros bajan de forma considerable al tratamiento con AA por sí solo, en concordancia con lo visto en la **Figura D.15**, aunque manteniendo valores ligeramente superiores a los basales. Por otra parte, la masa de cada ácido graso en TAG (**Figura D.16-B**), así como de su total (**Figura D.16-C**), disminuyó en las células tratadas con AA cuando se trataron con el inhibidor de la cPLA₂ α pirrofenona, aunque manteniéndose también en valores ligeramente superiores a los basales.

Luego en términos generales, el AA estaría activando las vías de señalización de p38 y JNK, cuyo efecto conjunto controlaría la activación de la cPLA₂ α por fosforilación en su residuo Ser⁵⁰⁵, evento que parece importante para la síntesis de lípidos neutros y posterior formación de gotas lipídicas en los monocitos humanos (**Figura D.11-Figura D.16**).

RESULTADOS

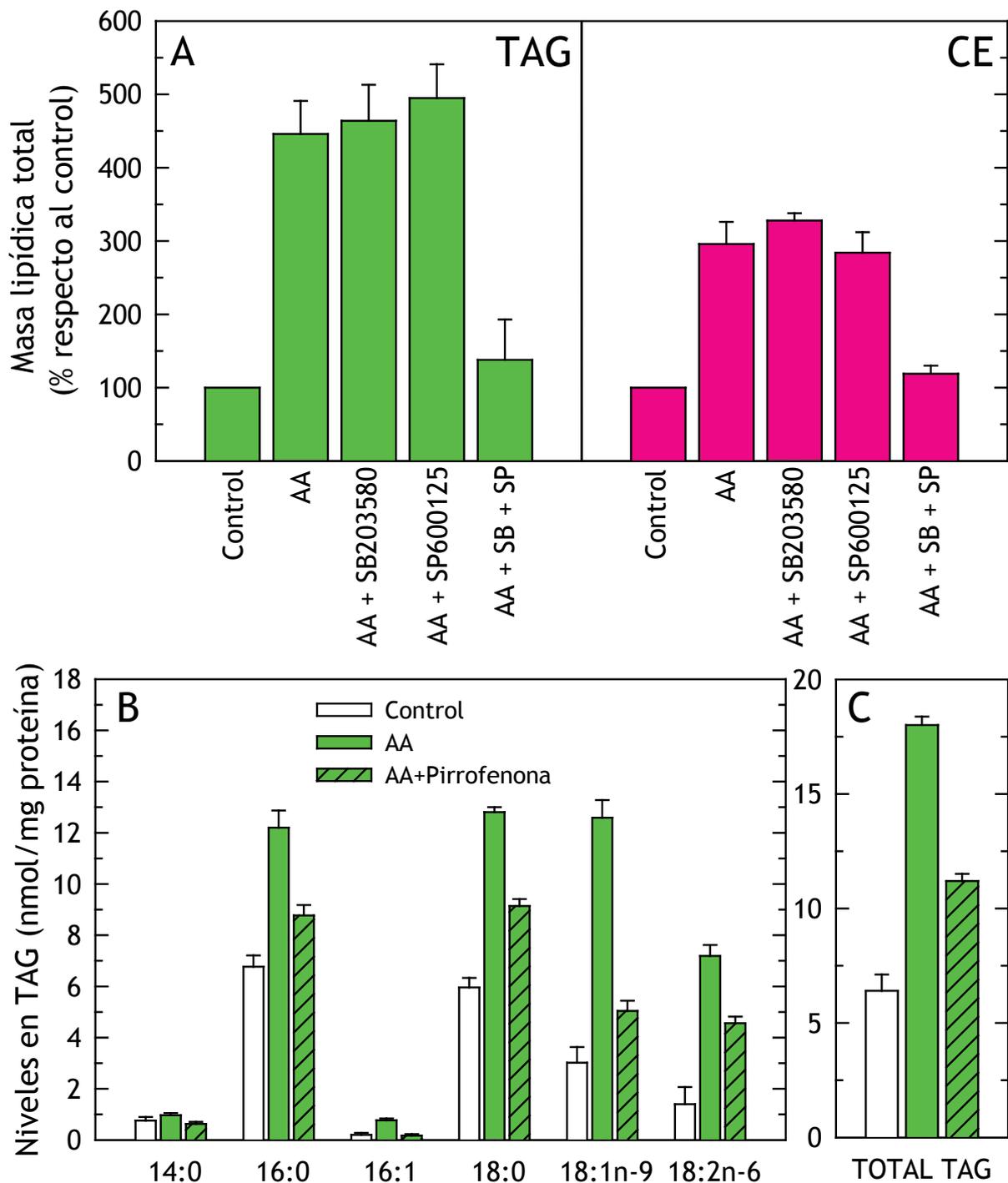


Figura D.16. Los niveles de lípidos neutros en monocitos estimulados con AA disminuyen al impedir la activación de la $cPLA_2\alpha$. Los monocitos se mantuvieron en medio sin suero o se añadió 10 μ M AA durante 2 horas en ausencia o presencia de los distintos inhibidores de p38 (SB203580, 10 μ M), JNK (SP600125, 10 μ M) y $cPLA_2\alpha$ (pirrofenona, 1 μ M), añadidos 30 minutos antes del AA. Los ácidos grasos presentes en TAG y CE se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en FAME. El total de TAG se calculó sumando todos sus ácidos grasos esterificados y dividiendo entre 3. Todas las células fueron preincubadas con 3 μ M triacsina C durante 30 minutos. Los inhibidores por sí mismos no variaron los niveles basales de TAG y CE y no se muestra por simplicidad en la representación.

D.1.5. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INDUCE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS NEUTROS EN MACRÓFAGOS HUMANOS Y MONOCITOS U937

Se intentó extender el principal estudio a los macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica con 5 % de suero humano durante 7 días. Así, en la **Figura D.17** se muestra que la incubación de los macrófagos con 10 μM AA durante 2 horas también indujo un incremento de la cantidad intracelular de los dos lípidos neutros principales de las gotas lipídicas TAG y CE. Haciendo un perfil de los ácidos grasos esterificados en TAG en las células control comparadas con las tratadas con AA se puede observar que hay ligeros incrementos en algunos ácidos grasos saturados y monoinsaturados, incluyendo el 16:1, que era el ácido graso que más aumentaba en términos cualitativos en los monocitos humanos (**Figura D.17-A**). En el caso de los CE se ve un aumento más claro de todos los ácidos grasos medidos, destacando de nuevo el 16:1 que aumenta su valor al doble (**Figura D.17-C**).

Cualitativamente estos resultados son similares a los encontrados en monocitos humanos (**Figura D.2**); sin embargo, como los macrófagos sin estimular contienen una cantidad de TAG muy superior a los monocitos (149 respecto a 4 nmol/mg proteína), el incremento en la cantidad de TAG no es tan acusado como el que se observaba en monocitos humanos. En el caso de los CE, que presentan valores basales similares en macrófagos humanos y monocitos en reposo (12 respecto a 17 nmol/mg proteína) el incremento que se observa al tratar con AA los macrófagos es mucho más evidente y alcanza valores cualitativos similares a los observados en monocitos humanos (**Figura D.2-B, Figura D.17-C**).

RESULTADOS

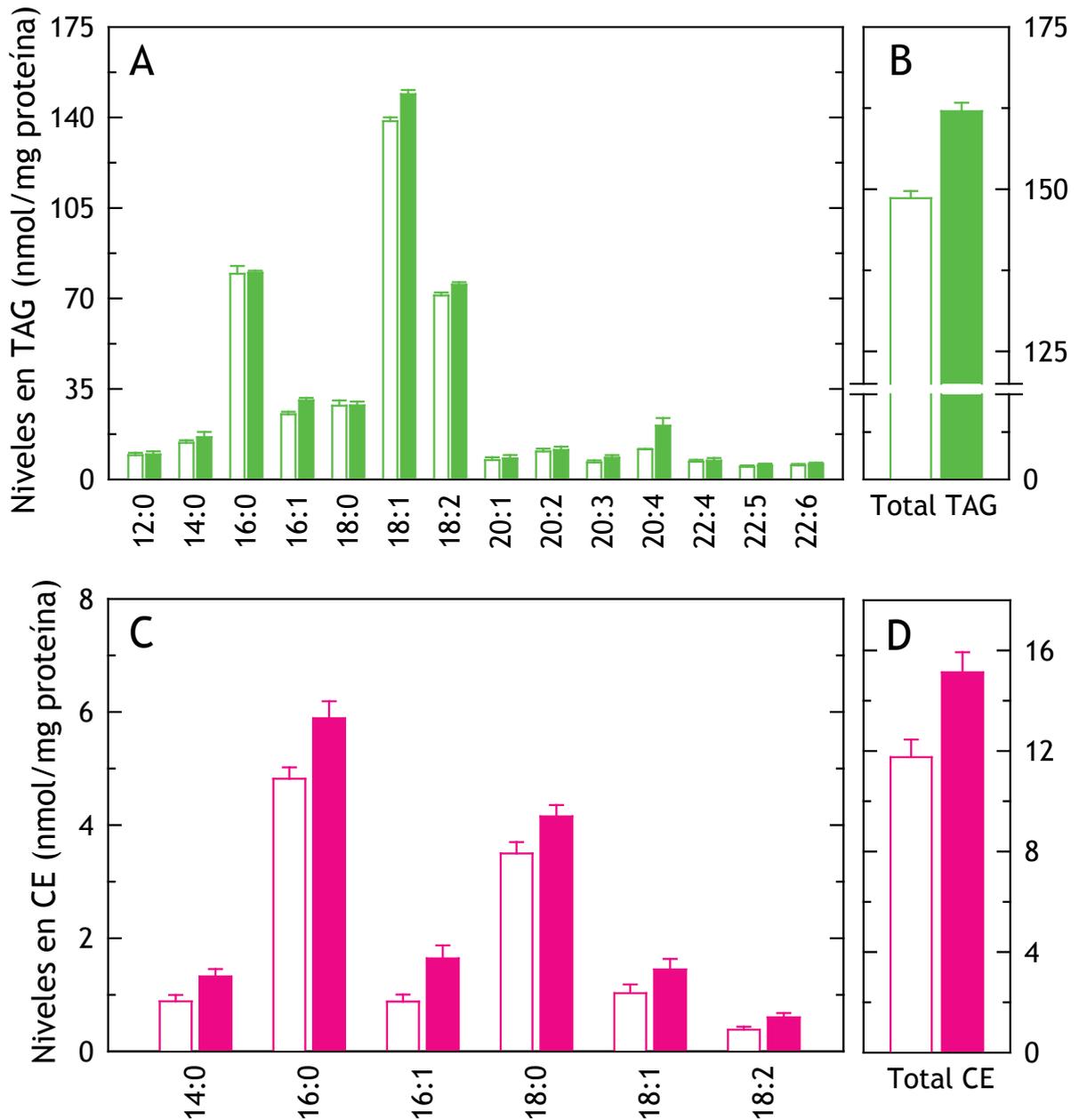


Figura D.17. Contenido celular de ácidos grasos en lípidos neutros de macrófagos humanos tratados con AA. Los macrófagos humanos se mantuvieron en medio libre de suero (barras blancas) o se trataron con 10 μ M AA durante 2 horas (barras coloreadas). Posteriormente los ácidos grasos de TAG (A) y CE (C) se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. En (B) se representa la masa total de TAG calculada como la suma de todos los ácidos grasos dividida entre 3. En (D) se representa la masa total de CE. En (A) se representan sólo los ácidos grasos mayoritarios encontrados en TAG sin especificar isómeros. Todas las células fueron preincubadas con 3 μ M triacsina C durante 30 minutos.

RESULTADOS

Estos estudios se extendieron también a la línea celular humana del linaje mieloide U937, comúnmente usada como modelo en el estudio de monocitos humanos (286, 287). En este caso, el tratamiento de las células U937 con 10 μM AA durante 2 horas no indujo aumentos de los niveles de TAG y CE celulares (**Figura D.18-A**). Sin embargo cuando se mantuvo el tratamiento con la misma concentración de AA a tiempos más largos se vio que ya a las 6 horas se produce un aumento de los CE y a las 24 horas hay incrementos significativos de los totales de ambos lípidos neutros (**Figura D.18-A**). Siguiendo esa misma cinética de activación con AA exógeno, se representó la masa total de AA esterificada en los PL a cada tiempo (**Figura D.18-B**). Se comprobó que las células U937 basales, como todas las líneas celulares, son deficientes en AA esterificado en PL comparadas con las células primarias, en este caso los monocitos (14 ± 3 respecto a 74 ± 13 nmol/mg proteína); sin embargo, el tratamiento con AA 10 μM hizo que sus fosfolípidos celulares se llenaran de AA alcanzando un nivel de saturación a partir de las 6 horas (**Figura D.18-B**), justo el tiempo a partir del cual comenzó la síntesis de lípidos neutros.

RESULTADOS

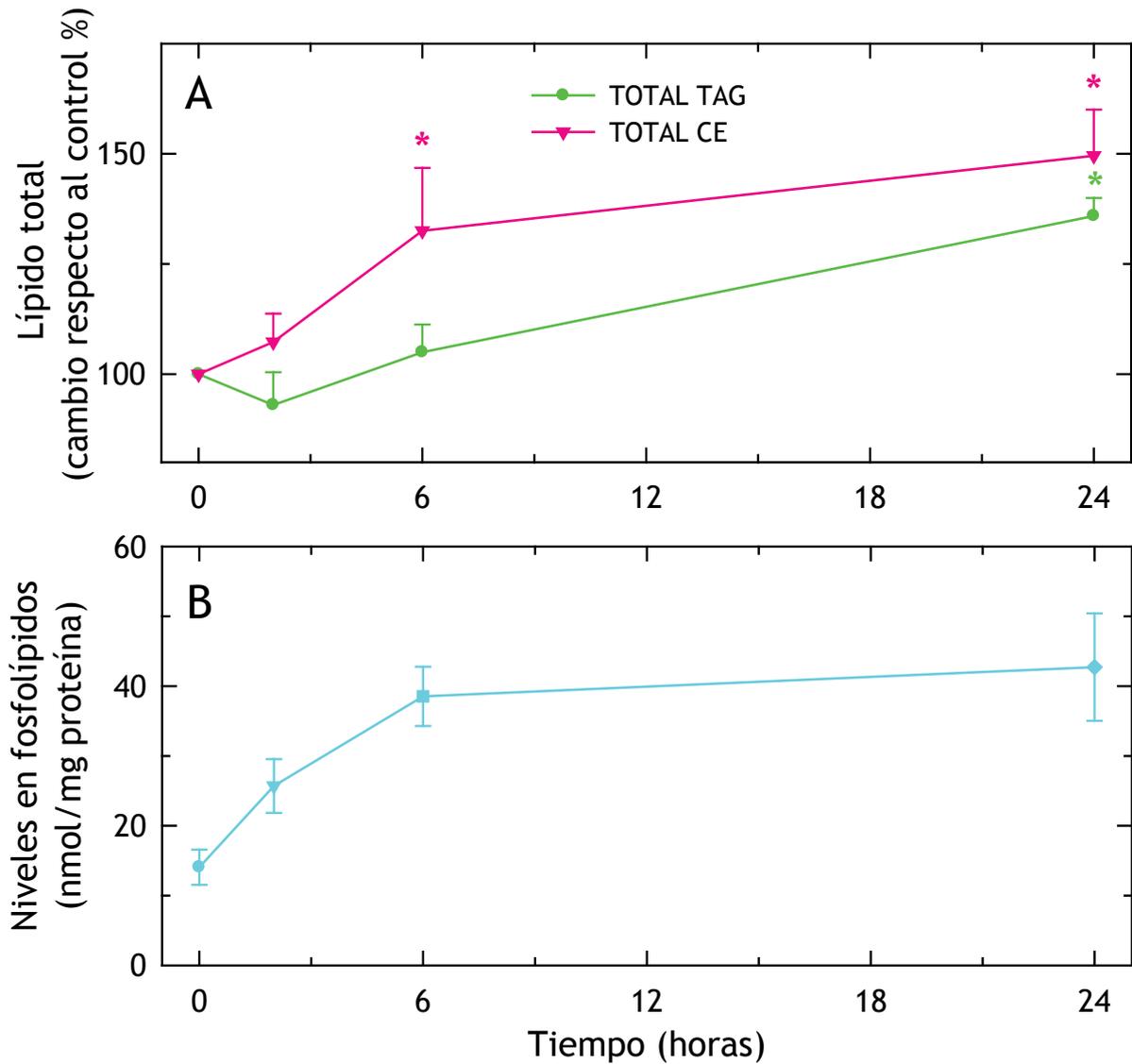


Figura D.18. Los niveles de TAG y CE de células U937 aumentan con tratamientos a tiempos largos de AA. Las células U937 se mantuvieron con medio incompleto (tiempo cero) o se estimularon con AA 10 μ M a los tiempos indicados midiendo posteriormente los ácidos grasos en TAG y CE (A) y PL (B). En (A) se representa la masa total de TAG como la suma de todos los ácidos grasos dividido entre 3 y la masa total de CE. Los valores están calculados como la variación porcentual respecto al control. Por razones de simplicidad se muestra la barra de error en una sola dirección. En (B) se representa la masa total de AA esterificado en los PL celulares a cada tiempo.

RESULTADOS

Para comprobar si a tiempos largos el AA estaba induciendo un acumulo de lípidos neutros mediante la componente señalizadora descrita en los apartados anteriores, se midió el perfil de ácidos grasos en TAG y CE en U937 control *versus* U937 enriquecidas con AA 10 μ M durante 24 horas. En el caso de los TAG se observó un incremento de todos los ácidos grasos medidos, siendo especialmente evidente el del ácido graso 16:1 (Figura D.19-A). Apenas hay incorporación de AA a pesar de la larga duración del tratamiento y de que no se añadió triacsina C antes de la estimulación, lo cual indica que esos lípidos neutros se están formando esencialmente por la componente señalizadora del AA. Observando el perfil de CE se puede comprobar que al igual que ocurría con monocitos humanos (Figura D.2-B), no hay incorporación de AA a esta clase de lípidos. Además, se observa un aumento de todos los ácidos grasos tras el tratamiento con AA a 24 horas, volviendo de nuevo a ser especialmente relevante en el caso del ácido graso 16:1 (Figura D.19-B).

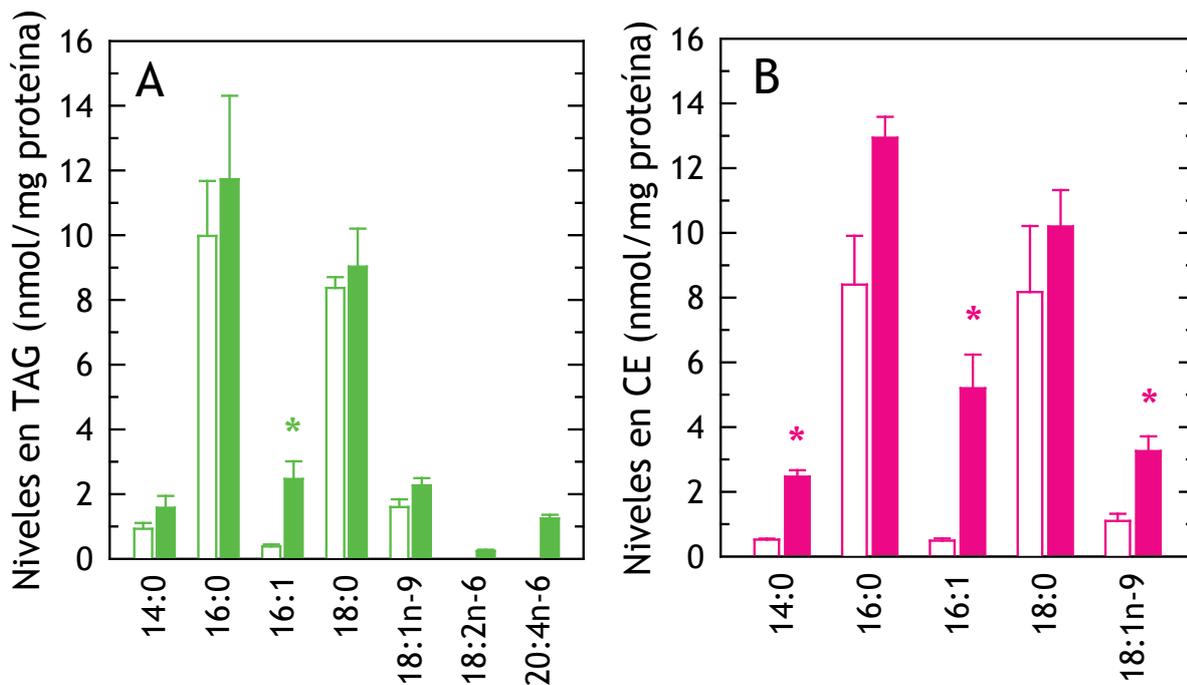


Figura D.19. Perfil de ácidos grasos en células U937 tratadas con AA durante 24 horas. Las células se mantuvieron en medio incompleto (barras blancas) o se trataron con 10 μ M AA durante 24 horas. Posteriormente se midieron los ácidos grasos en TAG (A) y CE (B) tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol respectivamente en ésteres metílicos de los ácidos grasos.

D.1.6. LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD OXIDADAS INDUCEN UN AUMENTO MÁS MODERADO DE LÍPIDOS NEUTROS EN MONOCITOS HUMANOS

Con el objeto de acotar un poco más el potencial en la inducción de lípidos neutros y gotas lipídicas en monocitos circulantes del AA libre, se sometió a estas células a un tratamiento con LDL oxidada, un estímulo clásico en modelos de aterosclerosis, que ya se ha demostrado como un potente inductor de gotas lipídicas *in vitro* en macrófagos humanos y de ratón (174, 288, 289).

La oxidación de la LDL se hizo según se describe en materiales y métodos (**Apartado C.3.10.3**). Posteriormente se comprobó la correcta oxidación de los ácidos grasos de sus lípidos mediante la medida de su absorbancia a 234 nm. Esta corresponde al máximo de absorbancia de los hidroperóxidos con dienos conjugados que se forman, una de las consecuencias, aunque no la única, de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (290). Se observó un aumento significativo de la absorbancia a 234 nm en la LDL oxidada comparado con la nativa, lo cual da idea de una mayor formación de hidroperóxidos en los ácidos grasos de la LDL al oxidarse (no mostrado). Además, de forma complementaria se comprobó mediante un análisis por GC/MS que los ácidos grasos poliinsaturados de la oxLDL prácticamente desaparecieron tras la oxidación (no mostrado).

El tratamiento de los monocitos con oxLDL se hizo a una concentración estándar de 50 µg/ml (38, 158) durante un tiempo de 2 horas, mucho más corto que los tratamientos habituales, que suelen ser de uno o más días de estimulación, pero que permite comparar directamente la inducción de la oxLDL con la del AA descrita en apartados precedentes.

Se observó que el tratamiento con oxLDL no induce ningún cambio en los ácidos grasos de los fosfolípidos celulares (**Figura D.20**), como ya se vio con el tratamiento con AA (**Figura D.6**), lo cual da cuenta de que los ácidos grasos de las partículas de LDL no se incorporan a los fosfolípidos celulares.

RESULTADOS

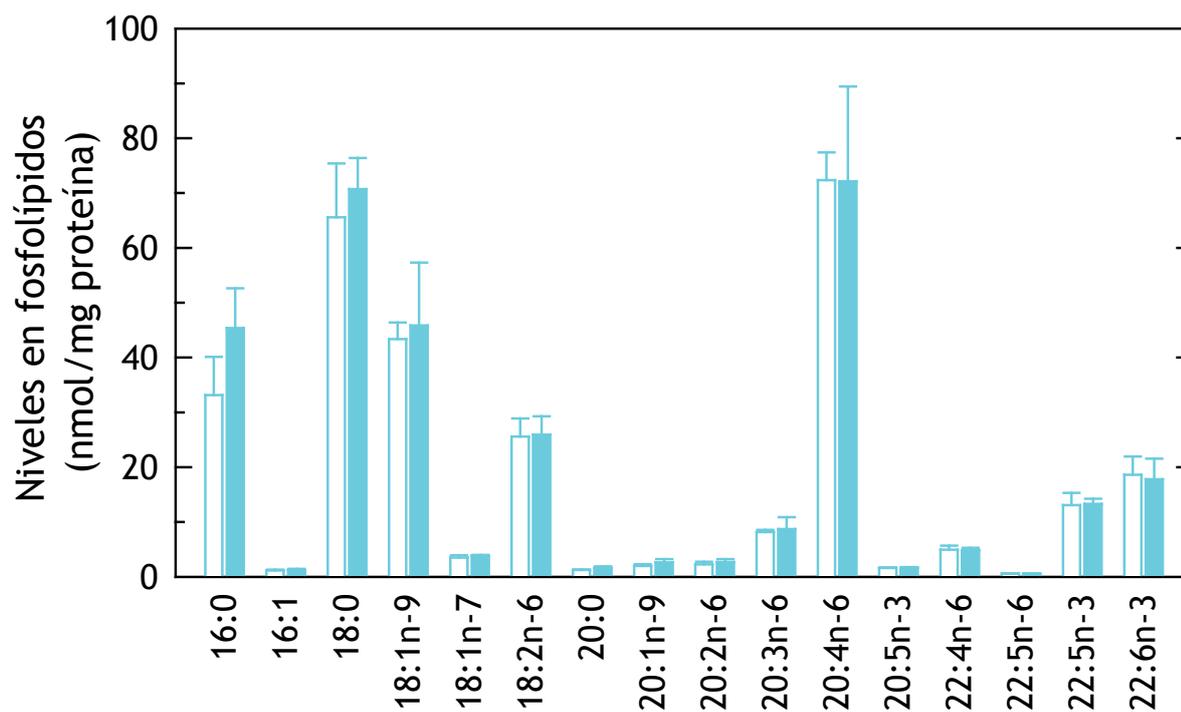


Figura D.20. Perfil de ácidos grasos en fosfolípidos de monocitos humanos tratados con LDL oxidada. (A) Las células se mantuvieron en medio sin suero (barras blancas) o se trataron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de LDL oxidada durante 2 horas (barras coloreadas) y se midieron los ácidos grasos esterificados en fosfolípidos por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol en FAME.

Al medir TAG y CE, principales componentes de las gotas lipídicas, se detectó un aumento del total de ambas clases de lípidos tras el tratamiento con oxLDL, así como de todos los ácidos grasos que los componen, volviendo a ser más aparente en el ácido graso 16:1, que aumentó un 140 % en TAG y un 87 % en CE (proporcionalmente, los que más lo hacen) (**Figura D.21**). Eso sí, el incremento de los totales de TAG y CE que se midió (**Figura D.21-B,D**) es mucho menor que el medido en monocitos tratados con AA 10 μ M al mismo tiempo de dos horas (en ese caso era de un 370 % para el total de TAG y un 240 % para el total de CE), lo cual sugiere que el AA libre tiene una gran potencia como inductor de gotas lipídicas en monocitos circulantes debido no sólo a su esterificación directa en TAG sino también, por una parte, a la activación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos que se acumulan posteriormente en los lípidos neutros que se están formando, y por otra, a la estimulación de las rutas de activación de la cPLA₂ α , enzima que parece clave en la biosíntesis de estos orgánulos.

Hay que tener en cuenta que los ácidos grasos oxidados de las lipoproteínas internalizadas no son analizables con el protocolo normal de GC/MS, por lo tanto, la medida que se muestra, esencialmente en ésteres de colesterol, puede estar algo infravalorada (291).

En resumen, el AA libre es, además de un precursor de moléculas de señalización proinflamatorias que ya se han descrito como factores de riesgo en la aterosclerosis (292-294), un potente estímulo para la formación de LD en monocitos circulantes, convirtiéndolos en monocitos espumosos (110, 111), y aumentando su potencial proaterogénico (108-111).

RESULTADOS

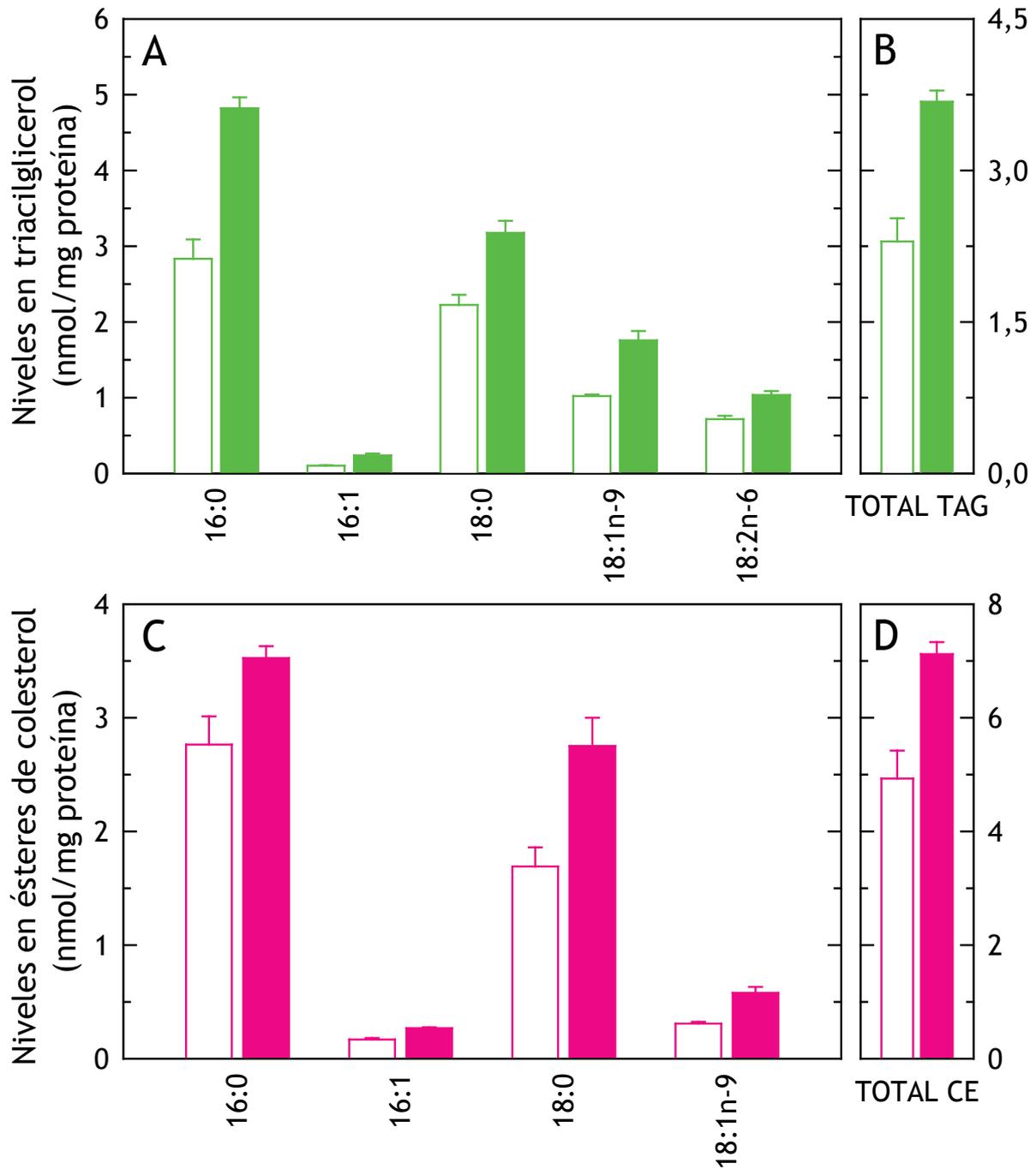


Figura D.21. Perfil de ácidos grasos en lípidos neutros de monocitos humanos tratados con LDL oxidada. Las células se mantuvieron en medio sin suero (barras blancas) o se trataron con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDL oxidada durante 2 horas (barras coloreadas) y se midieron los ácidos grasos esterificados en triacilglicerol (A) y ésteres de colesterol (C) por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en FAME. (B) La masa total de TAG se determinó sumando todos sus ácidos grasos y dividiendo entre 3. (D) Se muestra la masa total de CE.

D.2. 16:1n-9, UN ÁCIDO GRASO FORMADO POR LA β -OXIDACIÓN DEL ÁCIDO OLEICO, QUE SE ACUMULA EN LÍPIDOS NEUTROS

D.2.1. EL ISÓMERO DEL ÁCIDO GRASO 16:1 QUE AUMENTA EN LÍPIDOS NEUTROS AL ESTIMULAR CON AA LOS MONOCITOS ES 16:1n-9

A lo largo del anterior apartado de resultados, se ha demostrado que la estimulación de monocitos humanos con AA resultaba en una potente síntesis de lípidos neutros, que incorporaban ácidos grasos formados por la ruta de síntesis *de novo* y se acumulaban en gotas lipídicas. De entre los ácidos grasos que aumentan tras el tratamiento, tanto en monocitos, como en células U937 y macrófagos humanos, destaca uno que en todos los casos sufre grandes aumentos relativos, mucho mayores que los de cualquier otro ácido graso esterificado en TAG o CE, y que corresponde a un isómero del ácido graso 16:1 como se determinó por GC/MS tras su conversión en éster metílico (Figura D.2, Figura D.17, Figura D.19, Figura D.21). En la Tabla D.1 se muestra un resumen de los aumentos relativos observados en ese ácido graso 16:1 comparados con los aumentos relativos del total de TAG y CE en cada caso, pudiendo comprobar que en todas y cada una de las situaciones experimentales de síntesis de lípidos neutros con las que se trabaja, el incremento porcentual respecto a los niveles basales del ácido graso 16:1 es al menos el doble que el aumento relativo del total de TAG y CE medido.

RESULTADOS

TIPO CELULAR	ESTÍMULO	INCREMENTO 16:1 (%)	INCREMENTO TOTAL (%)
TRIACILGLICEROL			
Monocitos humanos	AA 10 μ M, 2 horas	2044	265
	oxLDL 50 μ g/ml, 2 horas	140	60
Macrófagos humanos	AA 10 μ M, 2 horas	20	9
U937	AA 10 μ M, 24 horas	550	36
ÉSTERES DE COLESTEROL			
Monocitos humanos	AA 10 μ M, 2 horas	908	140
	oxLDL 50 μ g/ml, 2 horas	87	44
Macrófagos humanos	AA 10 μ M, 2 horas	86	29
U937	AA 10 μ M, 24 horas	961	50

Tabla D.1. Estudio comparativo del aumento del isómero del ácido graso 16:1 en TAG y CE con el incremento de la masa total de ambas clases de lípidos al estimular las células. En cada caso, las células especificadas en la primera columna se trataron como se indica en la segunda columna y se midieron los ácidos grasos esterificados en TAG (panel superior) y CE (panel inferior) por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. En la tercera columna se muestra el incremento porcentual del ácido graso 16:1 esterificado en TAG y CE respecto a sus valores en las células en reposo. En la cuarta columna se muestra el incremento porcentual de la masa total de TAG y CE respecto a sus valores en células basales. El TAG total se calculó sumando todos sus ácidos grasos esterificados y dividiendo entre 3. Los CE totales se calcularon sumando todos sus ácidos grasos esterificados. El incremento porcentual se calculó tomando la media del valor correspondiente en cada caso, y por ello se muestra sin error estándar asociado.

Como se expuso en la introducción, de todos los isómeros del ácido graso 16:1, el más estudiado hasta ahora ha sido su isómero 16:1*n*-7, conocido también con el nombre de ácido palmitoleico. En los últimos años, el ácido palmitoleico ha sido descrito como una hormona lipídica producida desde el tejido adiposo capaz de mejorar otros efectos metabólicos a nivel sistémico (184), así como de actuar como un mitógeno cuando se encuentra esterificado en fosfolípidos de inositol (210) y de formar lípidos complejos con propiedades antidiabéticas (212); sin embargo, a día de hoy, hay evidencias de que alguno de sus efectos biológicos pueden ser contradictorios (197) (**Tabla A.3**).

En los espectros de TAG y CE de monocitos humanos obtenidos por GC/MS se vio que el único pico correspondiente a 16:1 no se correspondía exactamente al tiempo de retención del estándar comercial 16:1*n*-7 éster metílico. De hecho, cambiando el protocolo de cromatografía de gases para intentar obtener una mejor resolución entre ácidos grasos isoméricos, se observó que en ciertos tipos celulares que contienen una gran riqueza de ácidos grasos, como los macrófagos humanos diferenciados 14 días, aparecían hasta 3 picos distintos correspondientes a los ésteres metílicos de ácidos grasos 16:1 que se separaban cromatográficamente (**Figura D.22-A**) pero que tenían el mismo espectro de fragmentación entre sí, como se muestra en la **Figura D.22-B** (en ese caso particular se muestra el espectro de fragmentación del éster metílico del ácido graso 16:1*n*-7). Colectivamente, estos hechos invitaron a la reflexión de si ese ácido graso que aumentaba en TAG y CE era el palmitoleico u otro de sus isómeros.

Como ya se comentó en la introducción (**Apartado A.4.2**), los isómeros de ácidos grasos monoinsaturados derivatizados a FAME no se pueden distinguir mediante nuestro protocolo de GC/MS, dado que generan espectros de fragmentación iguales, por la migración de los electrones que forman los dobles enlaces, cuando se les somete al impacto electrónico (224, 227, 240) (**Figura D.22**). Todos los aspectos mecanísticos de la fragmentación se discutirán más adelante.

Debido a ese inconveniente, se ha de recurrir a su tiempo de retención para poder diferenciarlos. Gracias al cambio en el protocolo de cromatografía, con el que pudieron separarse claramente hasta 3 picos de ésteres metílicos de ácidos grasos 16:1 en un extracto celular (**Figura D.22-A**), cabía la posibilidad de separar el 16:1 incógnita de otros isómeros por tiempo de retención y así determinarlo inequívocamente.

RESULTADOS

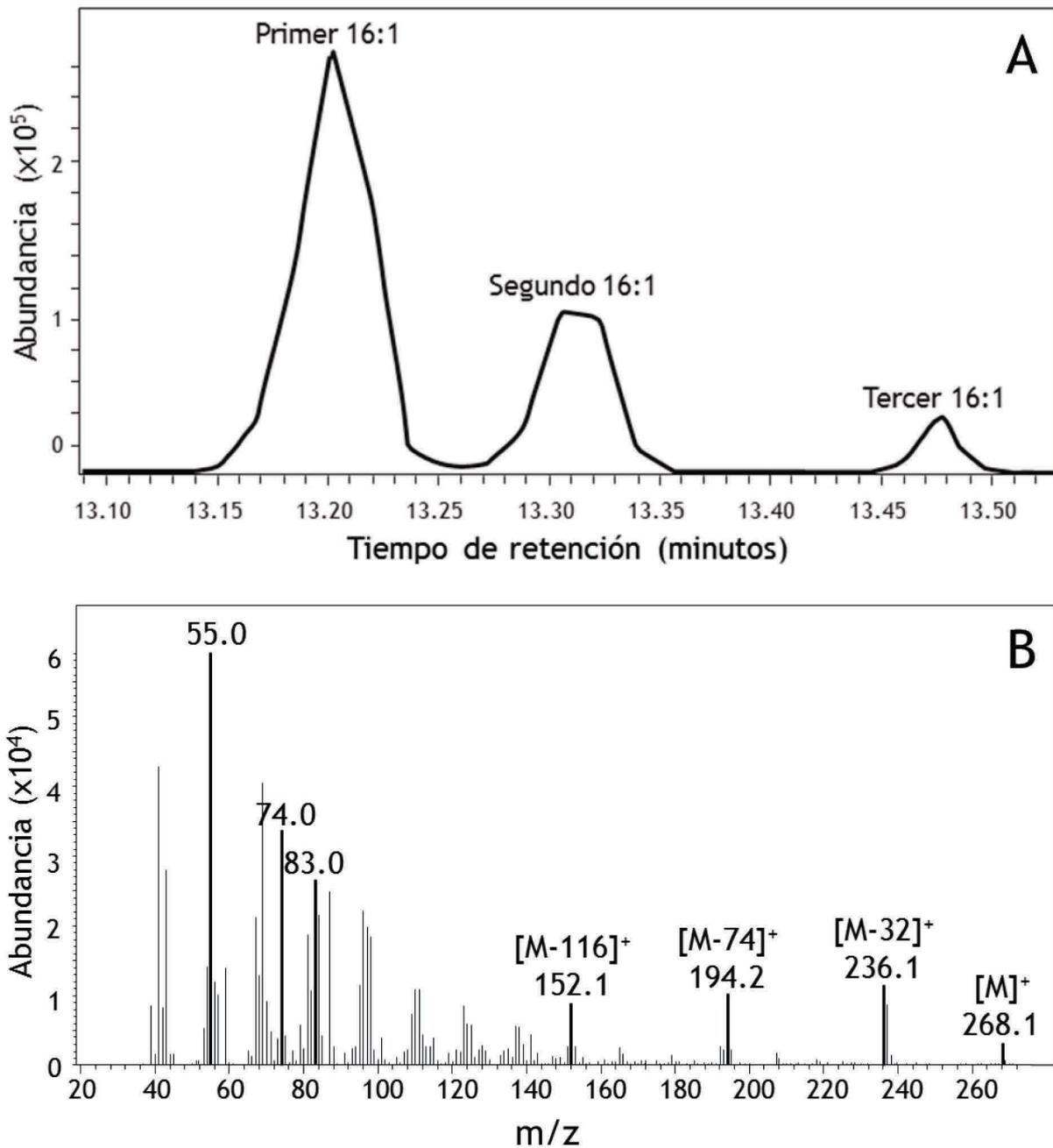


Figura D.22. Separación cromatográfica de 3 ésteres metílicos del ácido graso 16:1 distintos, y espectro de fragmentación representativo de todos ellos. (A) Cromatograma de la zona donde aparecen los ésteres metílicos del ácido graso 16:1 en un extracto lipídico total de macrófagos humanos diferenciados 14 días con 5 % de suero humano. Los ésteres de glicerol y colesterol se convirtieron en FAME y se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (B) Espectro de fragmentación por ionización por impacto electrónico del éster metílico del ácido graso 16:1*n*-7. El estándar comercial se analizó por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Resaltados aparecen los principales fragmentos diagnóstico.

[M]: Relación m/z del ion molecular.

Para poder determinar qué isómero de 16:1 corresponde a cada pico mostrado en la **Figura D.22-A** y posteriormente asignar un isómero concreto a nuestro pico incógnita en los monocitos, se adquirieron todos los ésteres metílicos de 16:1 comerciales disponibles en el mercado: 16:1*n*-9, 16:1*n*-10, 16:1*n*-5 y 16:1*n*-7*t*, además del 16:1*n*-7*c*, ya presente en el laboratorio. Cuando se inyectaron los estándares por separado en el cromatógrafo de gases se observó que el primero en eluir fue el 16:1*n*-7*t*, seguido del 16:1*n*-10 y 16:1*n*-9 (que no se separaban entre sí), el 16:1*n*-7*c* y el 16:1*n*-5. Todo ello es congruente con la teoría ya descrita de separación de FAME por GC/MS usando la columna analítica especificada en materiales y métodos (240), así como con anteriores resultados del grupo con otros isómeros de FAME conocidos (295), que demuestra que entre isómeros *cis* y *trans* siempre eluyen primero los *trans* (16:1*n*-7*t* eluye antes que 16:1*n*-7*c*) y que entre isómeros *cis* de un mismo FAME eluyen primero los que tienen el último doble enlace más lejos del extremo metilo terminal, como vemos en el hecho de que 16:1*n*-10/16:1*n*-9 eluyen antes que 16:1*n*-7, que a su vez eluye antes que 16:1*n*-5. En la **Figura D.23-A** se puede ver el orden de elución de todos ellos al inyectarlos conjuntamente en el cromatógrafo de gases.

Una vez que se tuvo una idea del tiempo de retención de cada éster metílico de los ácidos grasos 16:1 (**Figura D.23-A**), se comparó el pico incógnita que aparecía en TAG y CE de monocitos (**Figura D.23-B**) con los patrones, viendo claramente que el 16:1 incógnita no era 16:1*n*-7, sino que su tiempo de retención coincidía exactamente con el de los patrones de los ésteres metílicos de 16:1*n*-10 y 16:1*n*-9 (**Figura D.23**). A pesar de que con esto se descartaban muchas posibilidades, no era posible determinar inequívocamente el isómero de 16:1 que aparecía en TAG y CE de monocitos, pues aunque de todos los posibles, las opciones se habían reducido a sólo dos (16:1*n*-10 y 16:1*n*-9), no se podía discernir cuál de ellos era el pico incógnita, pues tras algunos cambios posteriores en el protocolo de cromatografía, en ningún caso se consiguió separar de forma efectiva los patrones de ambos FAME, lo cual no se ha logrado de forma eficiente ni usando una columna de 200 metros de longitud y otra fase estacionaria (296).

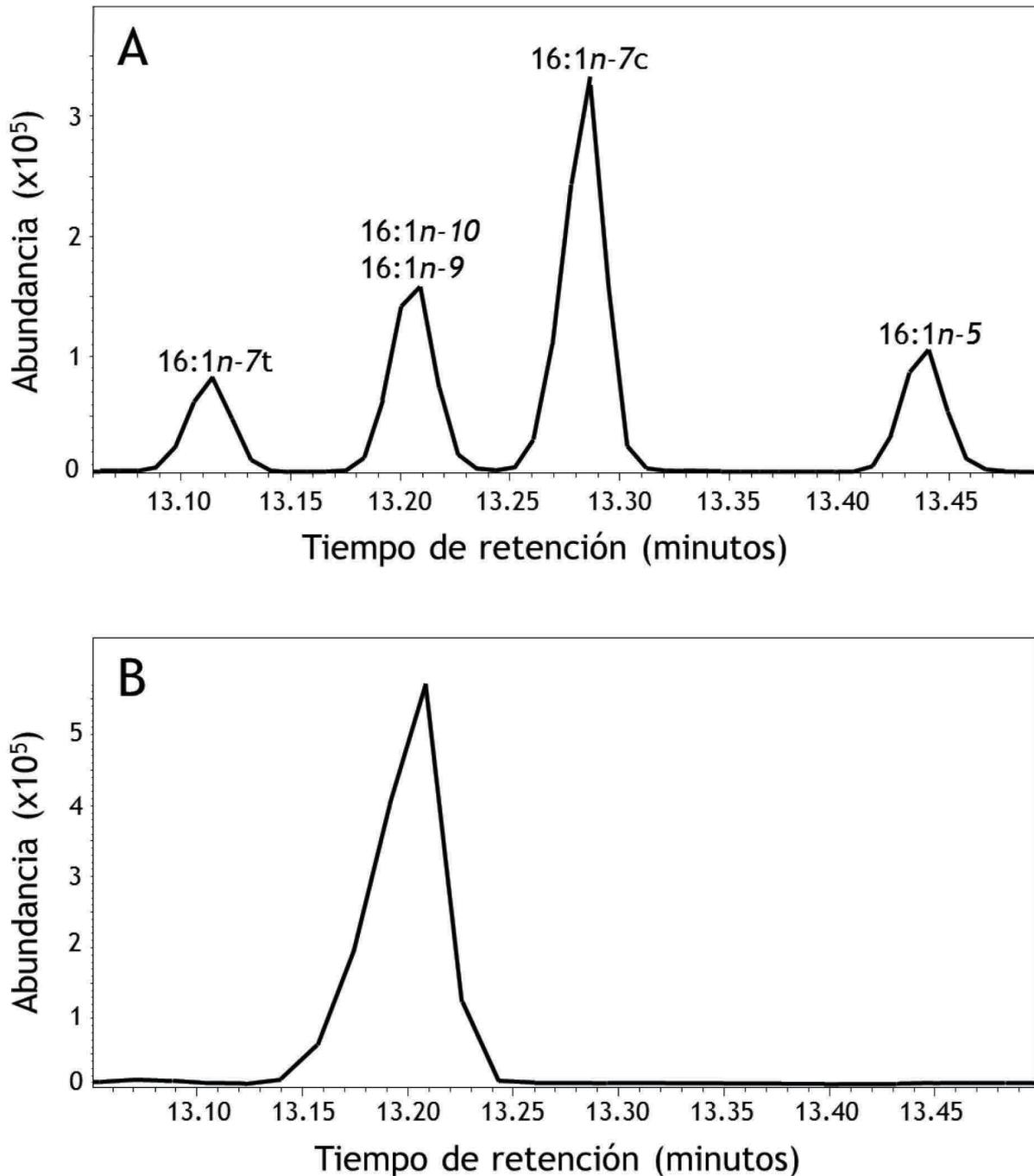


Figura D.23. El isómero del ácido graso 16:1 que aparece en TAG y CE de monocitos humanos coincide en tiempo de retención con los patrones de 16:1n-9 y 16:1n-10. (A) Cromatograma de la zona donde aparecen los ésteres metílicos de los isómeros 16:1 comerciales, medidos por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (B) Cromatograma representativo de la zona donde aparecen los ésteres metílicos de los isómeros 16:1 en TAG y CE de monocitos humanos. Los ésteres de glicerol y colesterol se convirtieron en FAME y se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Una vez descartada la determinación usando el tiempo de retención de los isómeros 16:1*n*-10 y 16:1*n*-9 convertidos a ésteres metílicos, debido a que son moléculas tan similares químicamente que es muy complicado separarlas incluso teniendo un sistema tan potente para ello como es la cromatografía de gases, se planteó el empleo de otro tipo de métodos que la espectrometría de masas proporciona para poder identificar la posición de los dobles enlaces de los ácidos grasos isoméricos y que consiste en la realización de otro tipo de derivatizaciones químicas de los ácidos grasos que hacen que los isómeros 16:1 presenten espectros de fragmentación distintos, al contrario de lo que ocurre con los FAME (**Figura A.10**). Para la determinación estructural del pico incógnita de 16:1 se optó por la derivatización a DMOX, pues aunque las reacciones químicas de derivatización son más largas y consumen más tiempo (**Aparatado C.3.4.2**), la resolución de los picos cromatográficos es más limpia que para las pirrolididas y 3-piridilcarbinol ésteres, se puede usar la misma columna de cromatografía para su análisis y además, como se parte de FAME para su derivatización, permite un doble análisis: primero se analiza una parte de la muestra como FAME de forma cuantitativa, y posteriormente, se derivatiza a DMOX el resto de la muestra y se analiza para obtener aspectos estructurales cualitativos de los picos que se habían observado anteriormente. La derivatización de los dobles enlaces con disulfuro de dimetilo quedó descartada pues apenas se han generado espectros de ácidos grasos con esta derivatización en la bibliografía y el CACI (ionización química de aductos covalentes) se descartó por una parte, porque implica el uso de ionización química en vez de ionización por impacto electrónico, sobre la cual no se tiene experiencia previa en el laboratorio, y por otra parte porque requiere un análisis en espectrometría de masas en tándem que no se puede realizar con la tecnología de la que se dispone. Un resumen esquematizado sobre los posibles métodos de caracterización estructural de isómeros del ácido graso 16:1 por GC/MS se muestra en la **Figura D.24**.

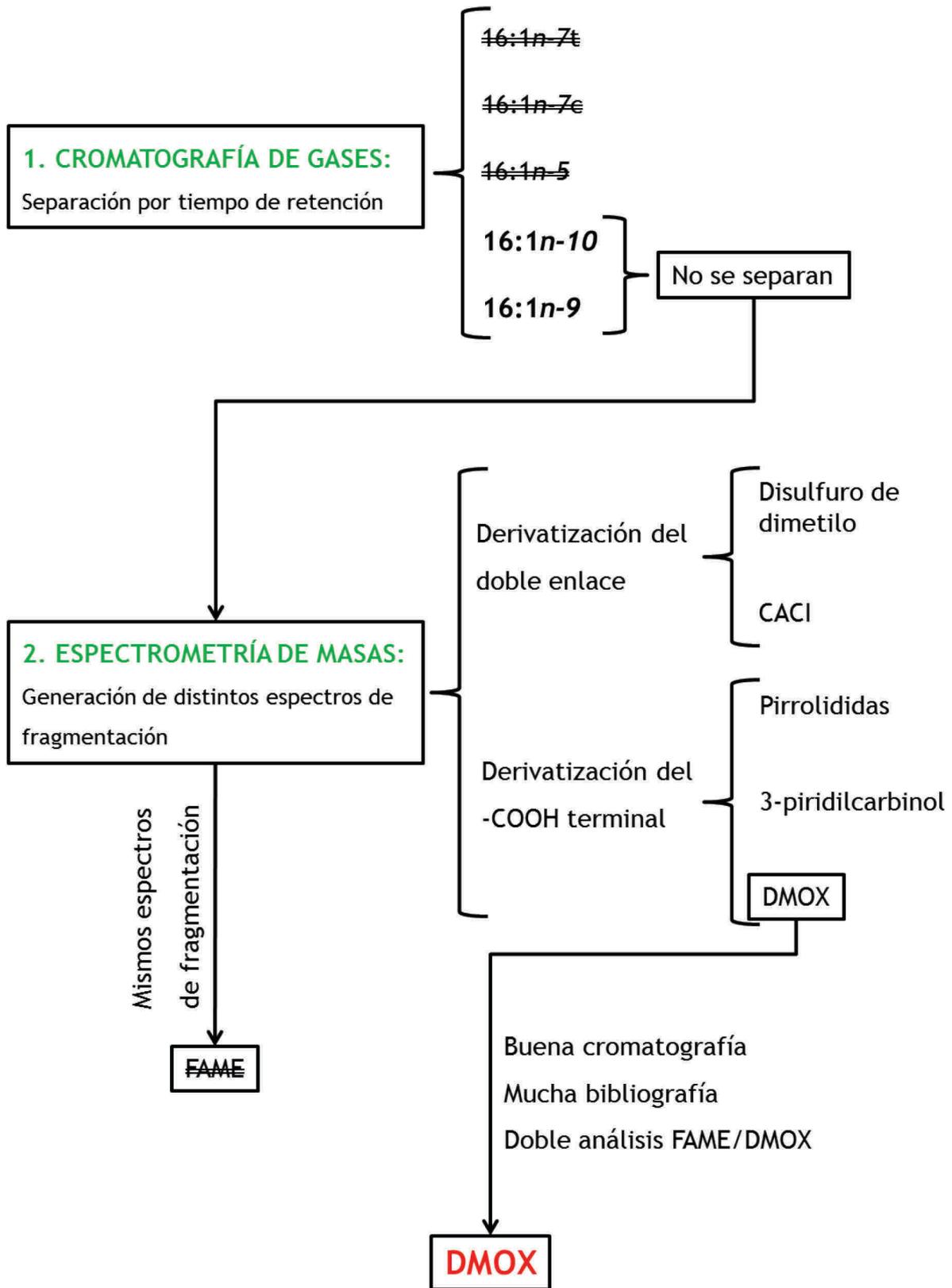


Figura D.24. Esquema de trabajo para la determinación del isómero del ácido graso 16:1. Se representan las distintas opciones y herramientas que la cromatografía de gases/espectrometría de masas proporciona para el análisis estructural de ácidos grasos. Las opciones que se van descartando aparecen tachadas. Para más detalles ver texto y/o Apartado A.4.2.

RESULTADOS

Una vez elegida la derivatización a DMOX como elemento de determinación estructural (**Figura D.24**) se derivatizaron los estándares comerciales de ésteres metílicos de 16:1*n*-10 y 16:1*n*-9 a 4,4-dimetiloxazolina de ácidos grasos según lo expuesto en materiales y métodos (**Apartado C.3.4.2**), obteniendo los espectros de fragmentación que se pueden ver en la **Figura D.25**, y que coincide con lo descrito en la bibliografía en el caso del 16:1*n*-10. Lo primero que cabe destacar es que los DMOX de 16:1*n*-10 y 16:1*n*-9 tampoco se separan cromatográficamente como ocurre con sus respectivos FAME y que eluyen a un tiempo de retención más tardío como ocurre con todos los FAME derivatizados a DMOX analizados en una columna de estas características (243).

Se puede observar que los picos base para los espectros de DMOX son el 113 y el 126, siendo el 113 el correspondiente a la reorganización de McLafferty (244), que se produce en muchos de los derivados de ácidos grasos cuando son analizados por GC/MS con ionización por impacto electrónico, como ocurre por ejemplo con el ion de $m/z = 74$ de los FAME; mientras que el 126 corresponde a una ciclación del extremo carboxilo derivatizado como se explica en (232). La intensidad relativa de esos dos iones base ya es diagnóstica, pues en el caso del 16:1*n*-10 (**Figura D.25-A**) el 126 es más intenso que el 113, mientras que para el 16:1*n*-9 (**Figura D.25-B**) la intensidad de ambos iones es similar. El ion molecular $[M]^+$ de $m/z = 307$ aparece con poca intensidad y a partir de él se puede ver el ion $[M-15]^+ = 292$ que corresponde a la fragmentación perdiendo el extremo metilo terminal del ácido graso, y a partir de ahí aparecen una serie de fragmentos separados por una m/z de 14 unidades que corresponden a los distintos fragmentos que se forman por la rotura por cada carbono de la cadena. Eso se cumple de forma regular en ambos DMOX, apareciendo claramente los fragmentos de $m/z = 278, 264, 250, 236, 222, 208$ y 194, hasta la $m/z = 180$. Teniendo en cuenta este patrón de fragmentación, Zhang (241) formuló una regla empírica para determinar la posición de los dobles enlaces de los ácidos grasos derivatizados a DMOX: “Si se encuentra una separación de m/z de 12 unidades de masa atómica en vez de las 14 habituales entre 2 picos vecinos de m/z par conteniendo los átomos de carbono $n-1$ y n del ácido graso, existe un doble enlace entre los carbonos n y $n+1$ de la cadena hidrocarbonada del ácido graso“. El problema es que esa regla no se cumple cuando los dobles enlaces se encuentran antes del carbono 7 del ácido graso (231, 232, 241, 242), por lo tanto podría ser válida para el 16:1*n*-9 (ácido cis-7-hexadecenoico), pero no para el 16:1*n*-10 (ácido cis-6-hexadecenoico). En ese último caso, se ha descrito que el ion de $m/z = 167$ es diagnóstico para los ácidos grasos con dobles enlaces en el carbono 6, así como que los iones de $m/z = 153$ y 139 son diagnósticos para los dobles enlaces en los carbonos 5 y 4 respectivamente (179, 243).

RESULTADOS

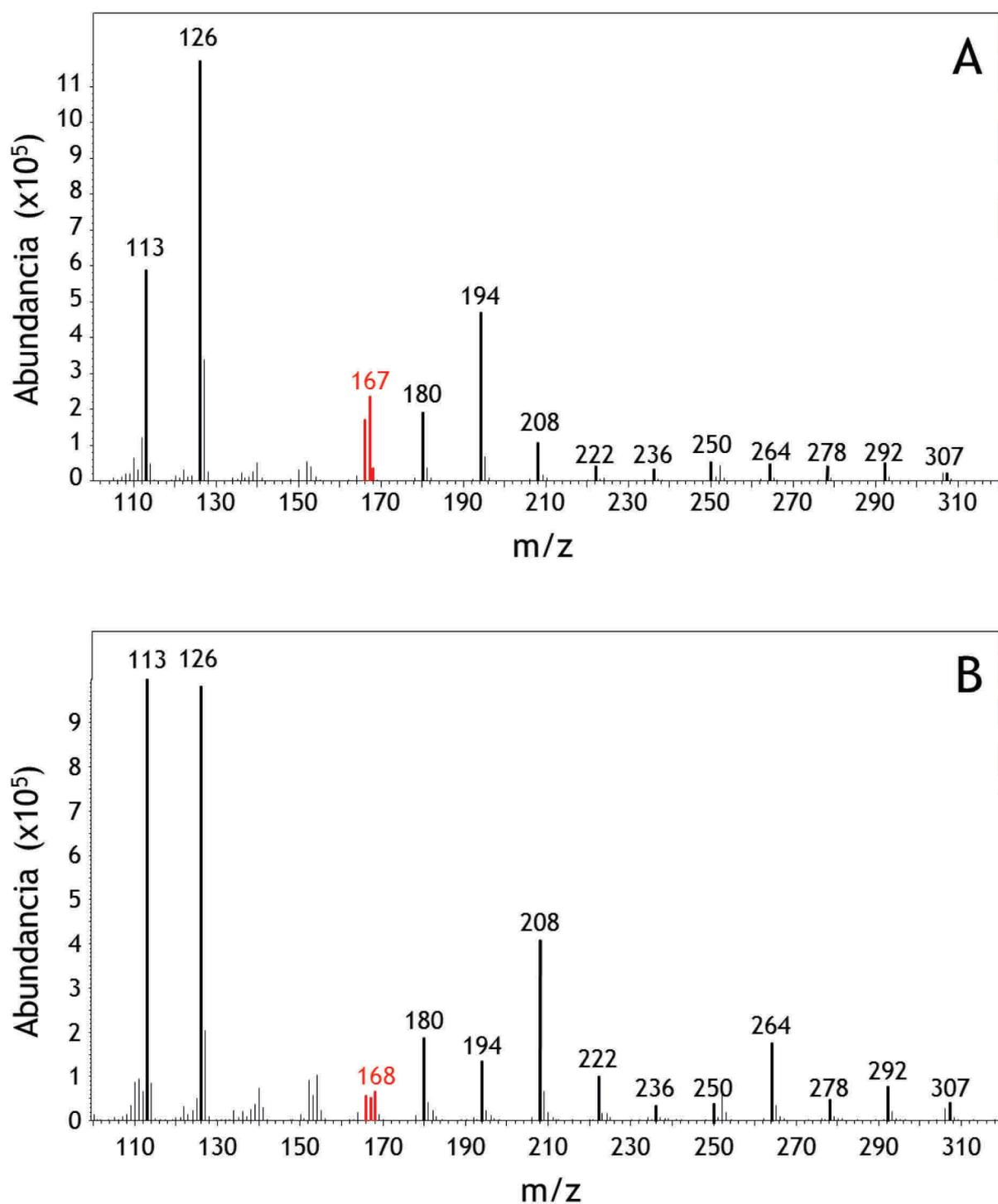


Figura D.25. Espectros de fragmentación de 16:1n-10 y 16:1n-9 como derivados a 4,4,-dimetiloxazolinas de ácidos grasos. Los patrones comerciales como ésteres metílicos de 16:1n-10 (A) y 16:1n-9 (B) se derivatizaron a DMOX y se analizaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Resaltados aparecen los principales fragmentos diagnóstico.

De hecho, efectivamente puede comprobarse cómo en el espectro de DMOX del 16:1*n*-10 aparece con intensidad el ion de $m/z = 167$ (**Figura D.25-A**), que se establecerá cómo ion diagnóstico para la identificación de este ácido graso. Por el contrario, en el espectro de DMOX del 16:1*n*-9, que al contrario que para el 16:1*n*-10 (179) nunca se había descrito, debe cumplirse la regla de Zhang (241). Por ello, si la $m/z = 307$ corresponde al ion molecular del ácido graso conteniendo los 16 carbonos, contando los fragmentos se puede ver que 15 carbonos corresponden a $m/z = 292$, 14 carbonos a $m/z = 278$, y así hasta $m/z = 180$ que corresponde a 7 carbonos. Ahí se para la sucesión de picos con 14 unidades de diferencia, pues el siguiente pico es el de $m/z = 168$, que correspondería a los 6 carbonos (**Figura D.25-B**). Por tanto, una vez que se encuentra una diferencia de 12 unidades entre los carbonos $n-1$ y n (6 y 7 carbonos) significa que el doble enlace está entre los carbonos n y $n+1$ (carbono 7 y 8) como así es para el 16:1*n*-9 (ácido cis-7-hexadecenoico). En la **Figura D.25** se muestran en rojo los iones 166, 167 y 168 pues al igual que la proporción 113/126 son diagnósticos para la determinación de esos ácidos grasos según lo explicado anteriormente. Además, como último elemento para la diferenciación de esos dos isómeros se puede observar la intensidad relativa de alguno de los otros iones que coinciden en ambos espectros, de esa manera la $m/z = 194$ es prominente en el espectro del 16:1*n*-10, mientras que los iones de m/z 208 y 264 son prominentes en el caso del 16:1*n*-9 (**Figura D.25**).

Teniendo en cuenta todo ello, se llevó a cabo la derivatización a DMOX de un extracto lipídico total de monocitos humanos, obteniendo el espectro de fragmentación que puede verse en la **Figura D.26-A**. Claramente se observa que el espectro de fragmentación como DMOX del 16:1 incógnita (**Figura D.26-A**) se corresponde con el del DMOX del 16:1*n*-9 (**Figura D.25-B**). Además de coincidir con su patrón comercial, se cumplen todos los criterios definidos anteriormente para el 16:1*n*-9 derivatizado a DMOX: los picos base son 113 y 126, que tienen similar tamaño, se observa la separación de 12 unidades de masa atómica entre los fragmentos 180 y 168 que corresponde a la presencia de un doble enlace entre los carbonos 7 y 8 y se puede apreciar que los fragmentos de $m/z = 208$ y 264 son altos, mientras que el 194 es bajo. La explicación mecanística de la formación de todos los fragmentos obtenidos en ese espectro puede verse en la **Figura D.26-B**.

Para confirmar el resultado obtenido en el extracto lipídico total de monocitos, se analizó el isómero 16:1 separando por clases de lípidos previamente, es decir, en fosfolípidos, mono-, di- y triacilglicerol y ésteres de colesterol, determinando también que lo que aparecía en esas clases de lípidos era 16:1*n*-9. Cabe destacar que en fosfolípidos de monocitos humanos aparece otro 16:1, que es el 16:1*n*-7, fácilmente separable del 16:1*n*-9 por cromatografía de gases.

RESULTADOS

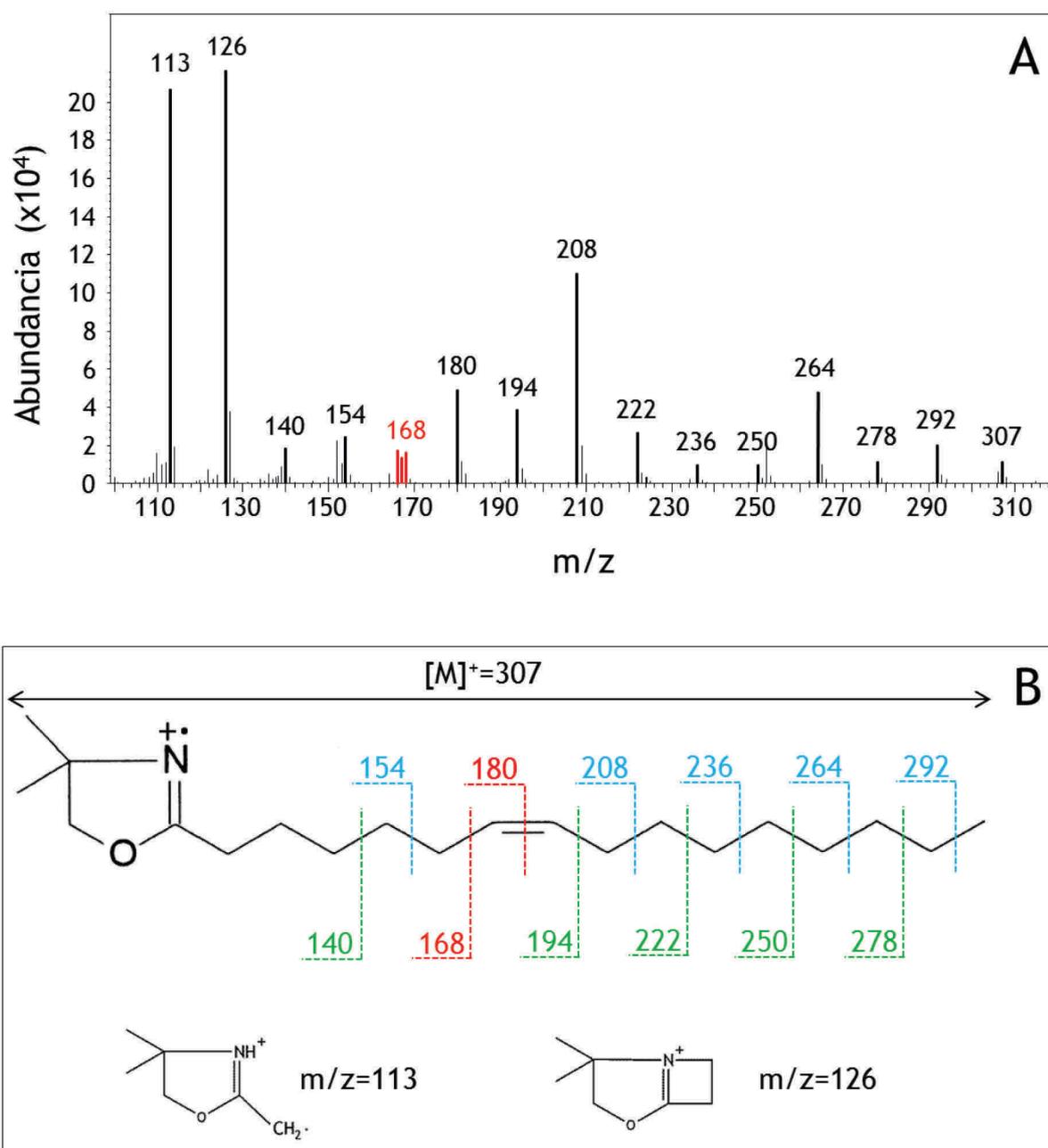


Figura D.26. Fragmentación del pico correspondiente al ácido graso 16:1 incógnita derivatizado a 4,4-dimetiloxazolina en monocitos humanos. (A) Espectro de fragmentación del pico correspondiente al isómero desconocido de 16:1 en un extracto lipídico total de monocitos humanos que se muestra como representativo de los experimentos hechos. Tras extracción por el método de Bligh & Dyer (236) las muestras se transmetilaron y posteriormente se derivatizaron a DMOX para su análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (B) Explicación mecánica del espectro de fragmentación del 16:1n-9 como DMOX.

Resaltados aparecen los principales fragmentos diagnóstico. [M]: Relación m/z del ion molecular.

RESULTADOS

Una vez que la metodología estaba bien definida, se hicieron estudios análogos para el resto de tipos celulares y sueros en los que se midieron ácidos grasos con la intención de determinar si el isómero que aparece es $16:1n-10$ o $16:1n-9$. Los resultados se resumen en la **Tabla D.2**. En todos los casos el isómero que se detecta es $16:1n-9$. Por razones de simplicidad no se muestran los espectros de fragmentación de DMOX analizados.

Con todo ello, el hecho de que aparezca otro isómero del ácido graso $16:1$ aparte del palmitoleico del que muy poco o nada se sabe hasta ahora, en este tipo de células inmunes, y que además aumente sus valores en situaciones fisiopatológicas de forma muy superior al resto de ácidos grasos, plantea la pregunta de si podría tener roles biológicos en estas células, así como abre la puerta para el estudio de sus rutas metabólicas de síntesis o su distribución dentro de los lípidos de la célula.

MATERIAL BIOLÓGICO	ISÓMERO $16:1$ ($16:1n-10/16:1n-9$)
CÉLULAS	
Monocitos humanos	$16:1n-9$
Macrófagos humanos	$16:1n-9$
U937	$16:1n-9$
SUEROS	
Suero humano	$16:1n-9$

Tabla D.2. Resumen de la identificación del isómero del ácido graso $16:1$ en distintos tipos celulares y sueros con los que se trabaja. En cada caso se derivatizó un extracto lipídico a DMOX y se determinó el isómero en cada caso atendiendo al espectro de fragmentación correspondiente obtenido por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

D.2.2. EL ÁCIDO GRASO 16:1 n -9 SE ACUMULA EN LÍPIDOS NEUTROS DE MONOCITOS HUMANOS DE FORMA BASAL

El hecho de encontrar niveles cuantificables de 16:1 n -9 en monocitos humanos, así como de observar que en TAG y CE aparecía solamente ese isómero y no el 16:1 n -7, que, por otra parte, sí aparecía esterificado en los PL totales, sugirió un estudio sobre la abundancia y distribución de este nuevo ácido graso entre los lípidos celulares.

Antes de nada, cabe aclarar que lo que genéricamente aparece como 16:1 en la **Figura D.6-A**, en la **Figura D.7-A** y en la **Figura D.20**, que se corresponden con el perfil de ácidos grasos en fosfolípidos de monocitos y al perfil de ácidos grasos totales, es la suma de 16:1 n -9 y 16:1 n -7, pues aunque en TAG y CE sólo aparece un pico de 16:1 que se corresponde con el 16:1 n -9, en PL y por tanto en el total de lípidos, además de 16:1 n -9 aparece también 16:1 n -7. Las distribuciones y cantidades relativas de ambos se mostrarán en las figuras posteriores.

Si se representa la masa total de cada isómero del ácido graso 16:1 esterificado en monocitos humanos en estado basal puede observarse que la masa de 16:1 n -9 es más de 3 veces la de 16:1 n -7 (**Figura D.27**), lo cual sugiere que el 16:1 n -9 podría tener un papel en estas células, como ya se ha asignado al ácido palmitoleico en macrófagos (202, 204). También en la **Figura D.27** se representa el porcentaje de cada isómero de 16:1 sobre el total de ácidos grasos esterificados en la célula, observando que aunque el 16:1 n -9 predomina sobre el 16:1 n -7, su valor supone aproximadamente el 1 % del total de ácidos grasos celulares, con lo cual puede considerarse un ácido graso minoritario en términos generales. El 16:1 n -9 se detectó también como ácido graso libre (no así el 16:1 n -7) en los monocitos en estado basal, aunque con valores despreciables respecto a su valor esterificado (menos del 5 %), por lo que no se tendrá en cuenta para estudiar su distribución.

RESULTADOS

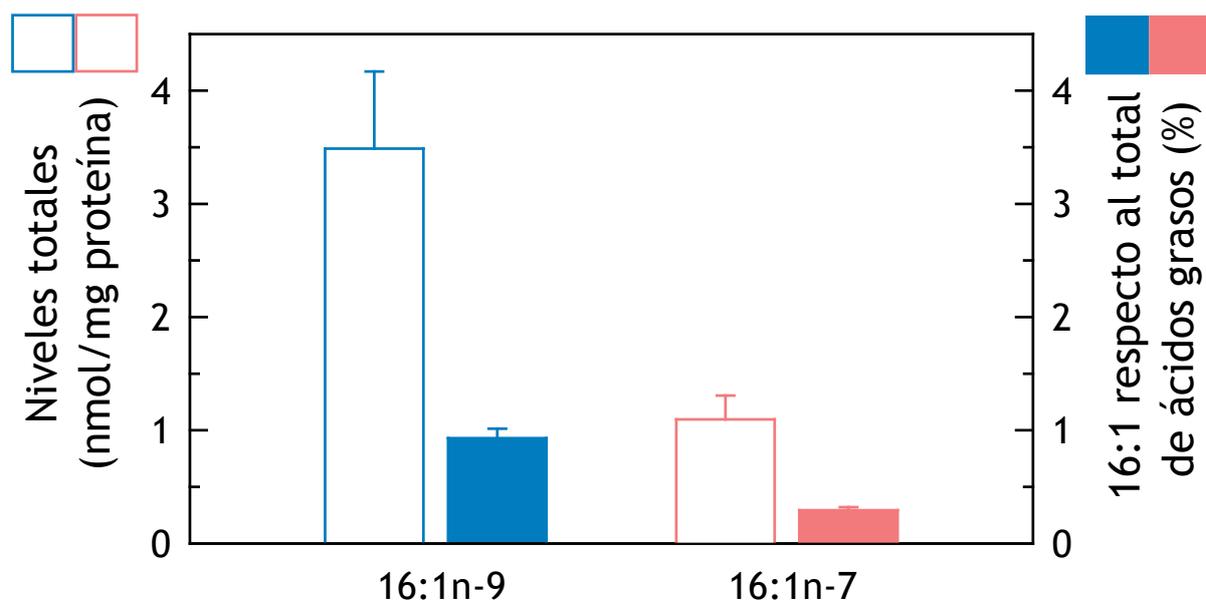


Figura D.27. Valores totales de isómeros del ácido graso 16:1 en monocitos humanos en estado basal. Se midieron los ácidos grasos esterificados totales de monocitos humanos sin ningún tratamiento por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol a ésteres metílicos de los ácidos grasos. Las barras blancas se corresponden con los valores totales de ambos ácidos grasos (eje de la izquierda), mientras que las barras coloreadas se corresponden a los valores porcentuales de cada ácido graso respecto al total de ácidos grasos esterificados (eje de la derecha).

RESULTADOS

Cuando se separó por cromatografía en capa fina el extracto lipídico total en 5 de las principales clases de lípidos (PL, MAG, DAG, TAG y CE) y se procedió a analizar sus ácidos grasos, se observó que el 16:1*n*-9 tiene una clara preferencia por presentarse esterificado en lípidos neutros, dado que el 75 % de su masa total se encuentra entre CE, TAG y DAG, mientras que solamente un 21 % aparece esterificado en fosfolípidos (**Figura D.28-A, B**). Por su parte, el 16:1*n*-7 solamente aparece en los PL de los monocitos humanos y no se detecta esterificado en ninguna otra clase de lípido celular (**Figura D.28-A, B**). Esa distribución basal de 16:1*n*-9 es particular de ese ácido graso, pues si se representa la distribución relativa de los 6 ácidos grasos mayoritarios en monocitos se ve cómo los saturados mayoritarios (16:0 y 18:0) se encuentran esterificados en PL en una proporción de entre el 50 y el 75 % y luego están más o menos distribuidos de forma homogénea entre el resto de clases de lípidos (**Figura D.28-C**). Los ácidos grasos monoinsaturados (18:1*n*-9) y diinsaturados (18:2*n*-6) representativos se encuentran esterificados preferentemente en PL de una forma más marcada aún (más de un 80 %) (**Figura D.28-C**). En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios (20:4*n*-6 y 22:6*n*-3) la proporción en PL supera el 90 % para el AA y el 99 % para el DHA y apenas aparecen en forma minoritaria en TAG (**Figura D.28-C**). No se representó el resto de ácidos grasos detectados (hasta 16 en total) pues ninguno aparece en una clase lipídica que no sean los PL, con la excepción del ácido mirístico (14:0) del que se encontraron pequeñas cantidades en lípidos neutros y presenta una distribución similar al 16:0 y 18:0.

Realmente, la distribución del 16:1*n*-9 y su preferencia hacia lípidos neutros es sorprendente, puesto que si se analiza la cantidad de ácidos grasos totales presentes por clase de lípido, se concluye que un 80 % de los ácidos grasos que tienen las células se encuentran esterificados en PL y solamente un 7 % y un 6 % en CE y TAG respectivamente (**Figura D.28-D**). La distribución del resto de ácidos grasos, incluido el 16:1*n*-7, y su esterificación preferente en PL sí es coherente con lo mostrado en la **Figura D.28-D**, pero el 16:1*n*-9 se sale de esa norma. Además, sorprende que un ácido graso que apenas representa el 1 % de los totales celulares (**Figura D.27**) pueda ser detectado en clases de lípidos muy minoritarias como DAG o incluso MAG, donde generalmente sólo aparecen ácidos grasos mayoritarios de la célula como 16:0, 18:0, 18:1*n*-9 y 18:2*n*-6.

RESULTADOS

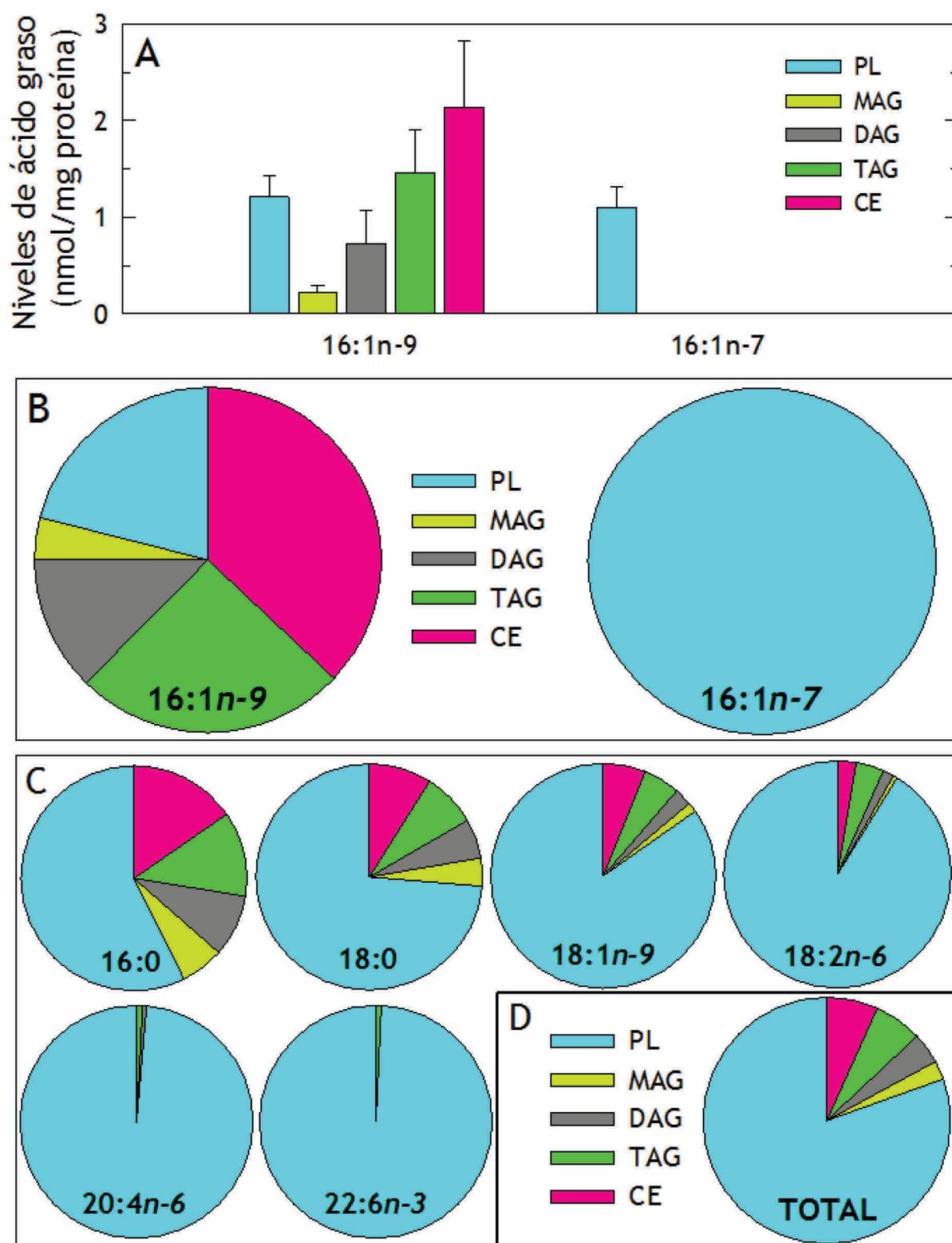


Figura D.28. Distribución comparativa de isómeros del ácido graso 16:1 en monocitos humanos en estado basal. Se midió la masa de ácidos grasos en cada clase de lípido por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Distribución en valores totales (A) y porcentuales (B) de los 2 isómeros de 16:1 encontrados en monocitos humanos. (C) Distribución porcentual de los ácidos grasos mayoritarios en monocitos. (D) Total de ácidos grasos que presenta cada una de las clases de lípidos en monocitos humanos.

RESULTADOS

Seguidamente se estudió la incorporación del 16:1*n*-9 a los principales lípidos celulares, en comparación con el 16:1*n*-7. Puede observarse que tras incubar los monocitos con 10 μ M de cada ácido graso por separado y dejarlo incorporar durante 2 horas, tanto el 16:1*n*-9, como el 16:1*n*-7 se incorporaron esencialmente a TAG en cantidades similares. De igual forma, se observa una incorporación parecida de ambos ácidos grasos a los PL celulares. Sin embargo, sólo hay incorporación a CE por parte del 16:1*n*-9, aunque en valores muy pequeños comparados con las otras 2 clases de lípidos (Figura D.29). El hecho de que la incorporación sea esencialmente a TAG puede deberse a que a esa concentración de 10 μ M la incorporación de estos ácidos grasos a los fosfolípidos vía reacciones de desacilación/reacilación (ciclo de *Lands*) esté saturada y, por ello, los isómeros del ácido graso 16:1 se estén incorporando a las células vía ruta *de novo* de síntesis de TAG, incorporándose 3 ácidos grasos secuencialmente a glicerol-3 fosfato, ácido lisofosfatídico y DAG, siendo el producto final de esta ruta metabólica el TAG (144, 297-299).

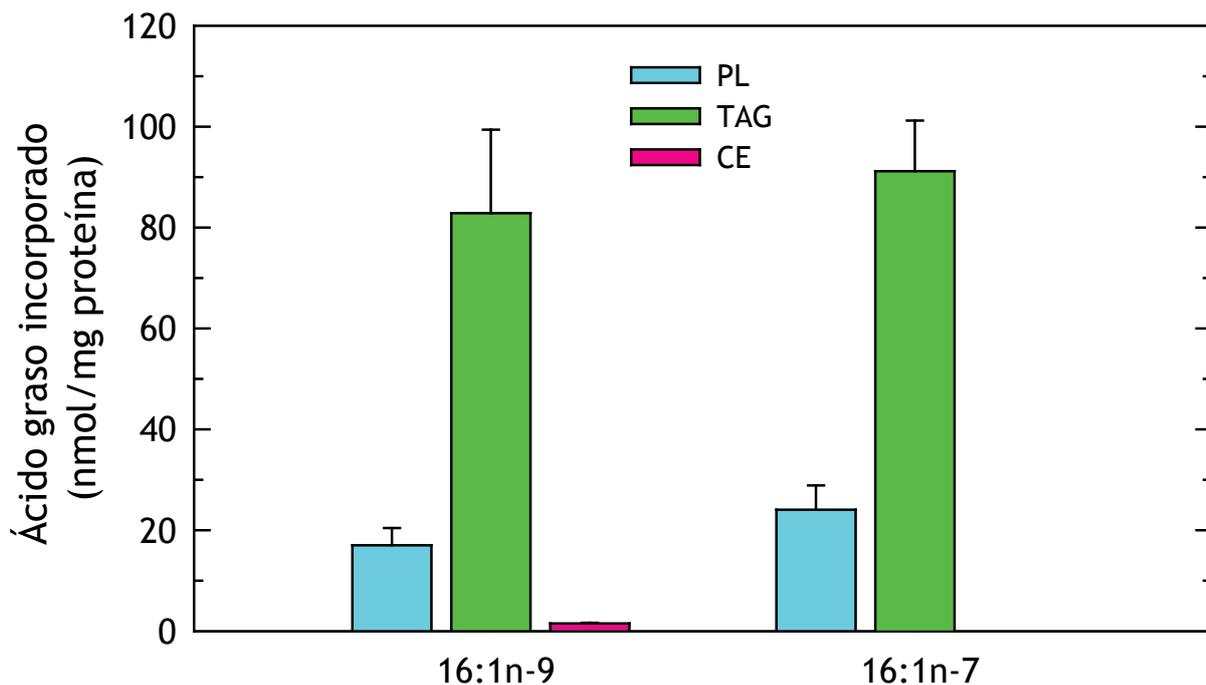


Figura D.29. Incorporación de los ácidos grasos 16:1*n*-9 y 16:1*n*-7 en las principales clases de lípidos en monocitos humanos. Las células se mantuvieron en medio sin suero o se incubaron con los correspondientes ácidos grasos a una concentración de 10 μ M durante 2 horas y los isómeros 16:1 esterificados en PL, TAG y CE se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en FAME. Para cuantificar la incorporación de cada ácido graso, se representa la diferencia entre los valores medidos en las células tratadas con el ácido graso menos los valores encontrados en las células control.

Por lo tanto, examinando esos datos, no existen diferencias apreciables en la incorporación de ambos isómeros del ácido graso 16:1 si se atiende a las clases de lípidos totales, como sí ocurría en su distribución en las células en estado basal. Para hacer un análisis más pormenorizado sobre la incorporación de ambos ácidos grasos, se separaron los PL totales en las 6 principales subclases de PL: PC, PE, PI, PS, PA y PG y se midieron todas las especies de los mismos que contenían 16:1 mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (**Apartado C.3.5**). Es importante puntualizar que mediante esta técnica se pueden identificar de forma inequívoca todas las especies que contienen el ácido graso 16:1, pero que no permite distinguir si es 16:1*n*-9 y 16:1*n*-7. A pesar de esa dificultad técnica, sabiendo que los valores basales de ambos isómeros de 16:1 en PL son muy pequeños, que la masa de ambos es muy similar (**Figura D.28-A**), y que además no hay variación de los valores del isómero contrario al del tratamiento, se estaría en condiciones de hacer la siguiente aproximación: se asume que tras los tratamientos con 16:1*n*-9 y 16:1*n*-7, las especies de PL conteniendo 16:1 que se forman contienen única y exclusivamente ese ácido graso con el que se incubaron. Por ejemplo, se asume que la especie en estado basal PC(16:0/16:1) es una mezcla de las especies PC(16:0/16:1*n*-9) y PC(16:0/16:1*n*-7), pero la especie que se forma en las células tratadas con 16:1*n*-9 es solamente PC(16:0/16:1*n*-9), mientras que la que se forma tras el tratamiento con 16:1*n*-7 es PC(16:0/16:1*n*-7). Con ello, restando los valores de las especies obtenidas tras el tratamiento de sus valores basales, se obtendrá la incorporación de cada ácido graso a las distintas especies de PL.

Cuando se analizó la incorporación de ambos ácidos grasos, se observó una incorporación similar en términos totales (9.5 ± 0.3 nmol/mg proteína el 16:1*n*-9 y 8.8 ± 1.3 nmol/mg proteína en el caso del 16:1*n*-7) y en el orden de magnitud de lo mostrado en la **Figura D.29**. Si se hace un estudio más profundo de la incorporación a las distintas clases de fosfolípidos se puede ver cómo existe una preferencia del 16:1*n*-9 por incorporarse a especies de PA, mientras que el 16:1*n*-7 se incorpora esencialmente a PC (**Figura D.30-A**). PC y PA ya son las 2 clases de PL en las que estos ácidos grasos se encuentran esterificados de forma basal (no mostrado). No se observan grandes cambios en el resto de clases de fosfolípidos, donde apenas se incorporan si se compara con las 2 anteriores.

RESULTADOS

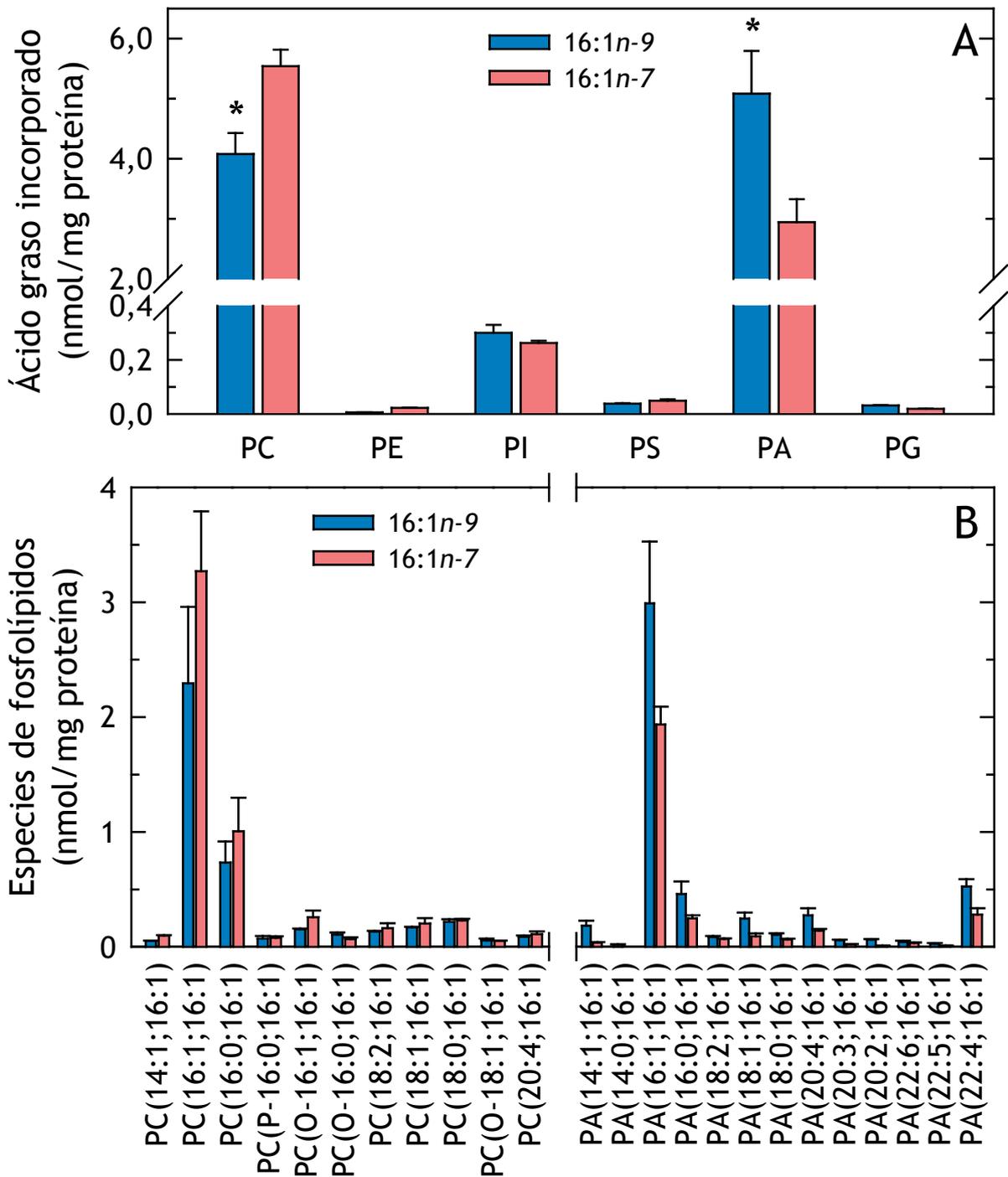


Figura D.30. Incorporación de los ácidos grasos 16:1n-9 y 16:1n-7 en las principales clases de fosfolípidos en monocitos humanos. Las células se mantuvieron en medio sin suero o se trataron con los ácidos grasos a una concentración de 10 μ M durante 2 horas y se midieron las especies de fosfolípidos conteniendo 16:1 por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Cada barra representa la diferencia entre los valores de esa especie en las células tratadas con 16:1n-9 o 16:1n-7 menos el valor de la misma especie en las células control. (A) Suma de la masa de todas las especies de cada clase de fosfolípido. (B) Especies de PC y PA conteniendo 16:1. La posición asignada a los ácidos grasos es arbitraria y por ello se separan con punto y coma.

En la **Figura D.30-B** se muestran todas las especies de PC y PA conteniendo 16:1 detectadas. En ella se puede observar que, aunque la formación de muchas especies varía según el ácido graso con el que se tratan las células, la diferencia de incorporación de ambos ácidos grasos que se observaba en el total (**Figura D.30-A**) se debe sobre todo a la distinta formación de las especies mayoritarias PC(16:1/16:1) y PA(16:1/16:1), que según el tratamiento contendrían 16:1*n*-9 o 16:1*n*-7. Cabe destacar que al contrario que la mayoría de especies de PC y PA mostradas, que sí se detectaron en las células sin tratar aunque en cantidades bajas, no se detectó la especie PC(16:1/16:1) en las células control y se midieron cantidades ínfimas (3×10^{-4} nmol/mg proteína) de la especie PA(16:1/16:1).

Colectivamente, se aprecian diferencias en los patrones de distribución e incorporación de los isómeros 16:1*n*-9 y 16:1*n*-7 a los lípidos celulares que podrían ser fisiopatológicamente relevantes.

D.2.3. EL ÁCIDO GRASO 16:1*n*-9 SE FORMA A PARTIR DE LA β -OXIDACIÓN DE ÁCIDO OLEICO

El siguiente paso en la caracterización de este ácido graso fue estudiar su origen metabólico. Si bien se conoce que el ácido palmitoleico (16:1*n*-7) es el producto principal de la desaturación directa del ácido palmítico vía estearoil-CoA desaturasa, una $\Delta 9$ desaturasa (177) (**Figura A.8**), el origen metabólico del 16:1*n*-9 parece bastante más complicado de descifrar, incluso en términos teóricos. El 16:1*n*-9 no puede proceder directamente del ácido palmítico, pues hasta el día de hoy no se ha demostrado la existencia de enzimas con actividad $\Delta 7$ desaturasa en mamíferos (177). Otra posibilidad es que el origen del 16:1*n*-9 sea vía elongación del ácido graso 14:1*n*-9 mediante una de las múltiples elongasas presentes en humanos (177). Esta hipótesis parece bastante improbable, debido a que nunca se ha observado 14:1*n*-9 en monocitos humanos basales (**Figura D.7-A**) y apenas aparecen trazas en suero humano, pudiéndose detectar sólo en niveles muy bajos en tejidos como la retina, donde aparece acilando algunas de sus proteínas (300-302). Además, debido a su escasez en fuentes alimenticias, la síntesis de ese ácido graso 14:1*n*-9 debería darse a partir del 14:0 (que aparece en bajas cantidades tanto en monocitos como en suero humano) vía FADS1 ($\Delta 5$ desaturasa), una enzima que muestra una mayor preferencia por desaturar ácidos grasos de cadena más larga (entre 20 y 24 carbonos) (177). La tercera hipótesis que se maneja es que el 16:1*n*-9 pueda producirse a partir de un ciclo de β -oxidación de ácido oleico (18:1*n*-9, OA).

Para empezar a investigar esta hipótesis se enriquecieron las células con ácido oleico para comprobar si aumentaban los niveles de 16:1*n*-9. Se añadieron concentraciones fisiológicas de este ácido graso para no dañar las células, que se estimaron teniendo en cuenta que se midió una concentración de 18:1*n*-9 total esterificado en suero humano de 2 mM y que el medio de cultivo contiene un 5 % (v/v) de suero, siendo la concentración final de OA en un medio de cultivo con suero de 100 μ M aproximadamente. El enriquecimiento con OA se hizo a concentraciones incluso menores que esas, de 10 y 50 μ M. Con ello se observó que la suplementación con OA del medio de cultivo sin suero de monocitos resultó en un aumento considerable de la incorporación de dicho ácido graso, así como en el aumento de los niveles de 16:1*n*-9 en lípidos totales. Merece la pena destacar la diferencia de 2 órdenes de magnitud entre la incorporación del OA y del 16:1*n*-9, cuyo aumento en los 3 casos supone entre un 1 y un 2 % del aumento de OA (**Figura D.31**). Con ello se tiene la primera evidencia de que el 16:1*n*-9 podría formarse a partir del 18:1*n*-9 en monocitos humanos.

RESULTADOS

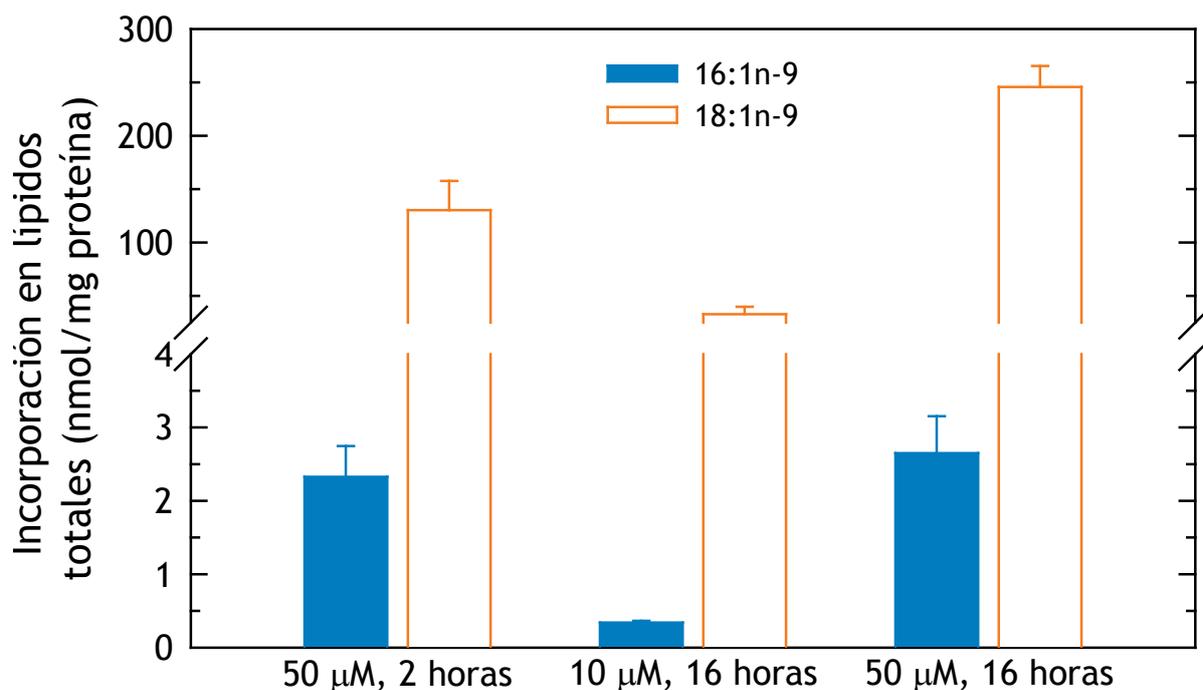


Figura D.31. La suplementación de los monocitos humanos con ácido oleico induce aumentos de los niveles del ácido graso 16:1n-9 en lípidos totales. Las células se mantuvieron sin tratar o se incubaron con ácido oleico a las concentraciones y tiempos indicados en el eje de abscisas, se extrajeron los lípidos totales y se midieron los niveles de 18:1n-9 y 16:1n-9 por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. Se representa la diferencia entre los valores medidos en las células suplementadas con ácido oleico y los valores medidos en las células control en cada caso.

RESULTADOS

Para confirmar de forma directa que el 16:1*n*-9 proviene del ácido oleico, se marcaron los monocitos humanos con ácido oleico uniformemente deuterado, esto es, un ácido oleico comercial cuyos 34 átomos de hidrógeno han sido sustituidos por deuterios y que debido a ello tiene una masa molecular de 316.3 u en vez de las 282.3 u del ácido oleico normal.

Antes de realizar el marcaje de las células y para ayudar a la comprensión de los espectros que puedan obtenerse, ambos ácidos grasos se derivatizaron a sus ésteres metílicos, para observar la diferencia en el patrón de fragmentación como FAME del [²H]-18:1*n*-9 (**Figura D.32-A**) comparado con el del 18:1*n*-9 (**Figura D.32-B**). En principio se observa cómo el ion molecular del éster metílico de [²H]-18:1*n*-9 es 33 u mayor que el del éster metílico de 18:1*n*-9 (329 por 296) (**Figura D.32**). Que la diferencia sea de 33 u en vez de 34 u, que es el número de deuterios que tiene el ácido graso marcado, se debe a que el deuterio del grupo carboxilo terminal se pierde en la reacción de transmetilación, quedando solo 33. Además, los fragmentos que se forman durante el impacto electrónico para el 18:1*n*-9 ([M-32]⁺, [M-74]⁺ y [M-116]⁺), y que son comunes en todos los ácidos grasos monoinsaturados como FAME, no se corresponden con los fragmentos formados en la fragmentación del [²H]-18:1*n*-9 ([M-33]⁺, [M-77]⁺ y [M-125]⁺) debido a la presencia de esos deuterios en la cadena hidrocarbonada del ácido graso. De igual manera, los fragmentos diagnóstico mayoritarios de m/z= 55, 74, 83 en el ácido oleico endógeno, son reemplazados por los fragmentos de m/z= 62, 77, 94 en el [²H]-18:1*n*-9. La explicación mecanística de la formación de estos fragmentos en ácidos grasos monoinsaturados deuterados derivatizados a FAME, comparados con sus correspondientes ácidos grasos endógenos se dará más adelante.

Además de presentar un espectro de fragmentación totalmente distinto, el ácido oleico uniformemente deuterado se separa cromatográficamente del endógeno de forma muy clara (el endógeno tiene un tiempo de retención de 16.48 minutos por 15.92 del deuterado), lo cual permite integrar su área bajo la curva en el cromatograma y cuantificar su presencia en los lípidos celulares, así como la de sus derivados, mediante la realización de una línea de calibrado externa, hecha con su estándar analítico a varias concentraciones.

RESULTADOS

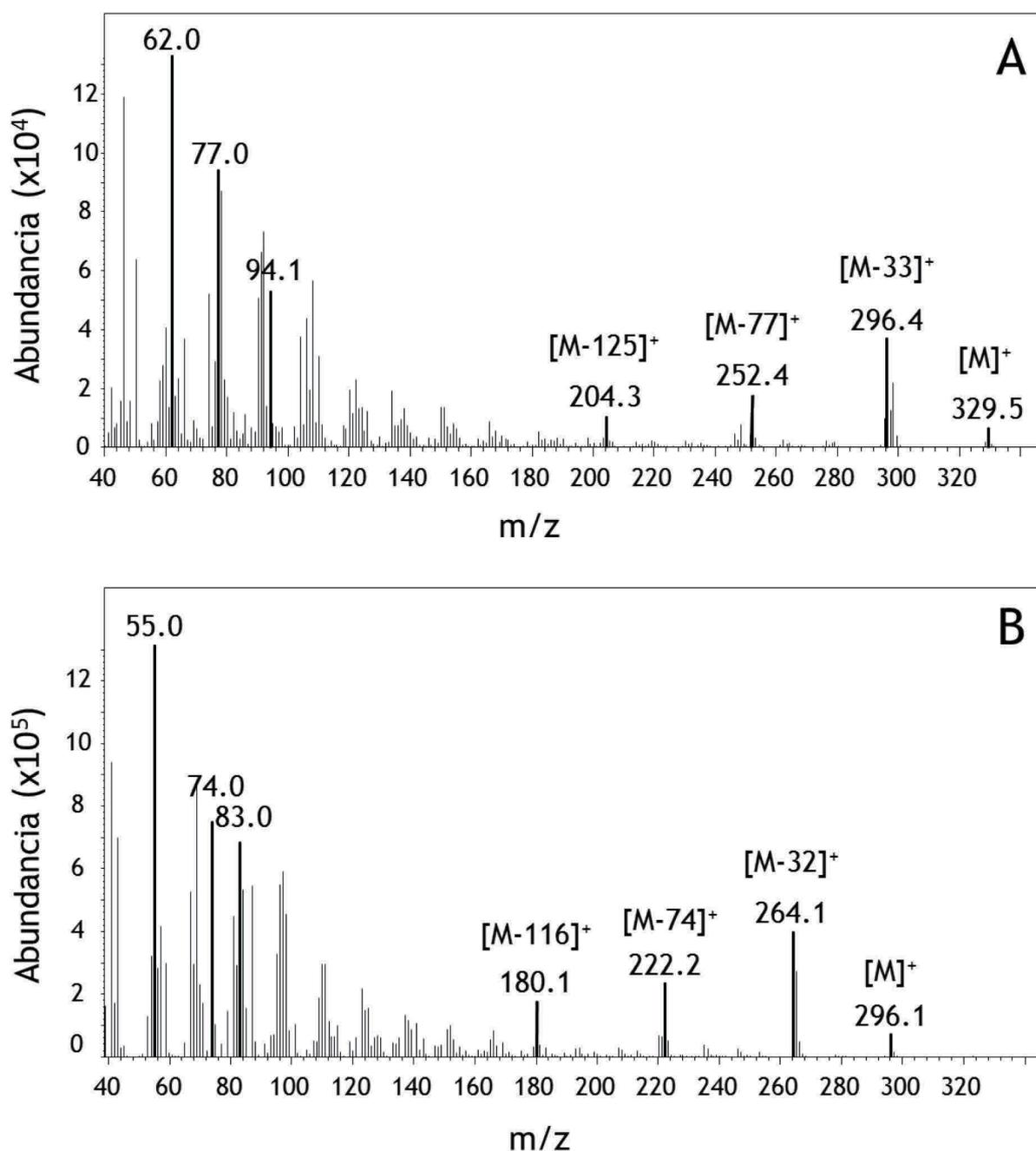


Figura D.32. Espectros de fragmentación del ácido oleico deuterado y endógeno como ésteres metílicos. Los patrones comerciales de $[^2\text{H}]-18:1n-9$ (A) y $18:1n-9$ (B) se transmetilaron en medio ácido y se analizaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Resaltados aparecen los principales fragmentos diagnóstico.

[M]: Relación m/z del ion molecular.

RESULTADOS

Dado que para la identificación de los compuestos se usa una técnica experimental basada en su masa molecular, el marcaje con isótopos estables permite rastrear, además de la molécula introducida a la célula, las que derivan del metabolismo de ésta, de forma sencilla e inequívoca (123, 287, 303). Debido a ello, el marcaje celular con 50 μM $[\text{}^2\text{H}]-18:1n-9$ durante 2 horas resultó en la incorporación del mismo a los lípidos celulares (no mostrado), ya que se detectó su correspondiente éster metílico por GC/MS en un extracto lipídico total por comparación con su espectro de fragmentación previamente analizado (**Figura D.32-A**); así como en la detección de su derivado, el ácido graso $[\text{}^2\text{H}]-16:1n-9$ (**Figura D.33**). Sabiendo que el ácido oleico uniformemente deuterado tiene 34 deuterios, es de suponer que tras ser acortado pierde 4 de ellos correspondientes a dos metilenos de su cadena hidrocarbonada, quedando con 30 deuterios (la fórmula química del 16:1n-9 es $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$, luego quedaría también uniformemente deuterado), que finalmente serían 29 en su correspondiente éster metílico, pues al igual que con el oleico deuterado, el hidrógeno de su extremo carboxilo terminal se pierde en la reacción de transmetilación, o incluso se puede perder mucho antes, en la tioesterificación del ácido graso a CoA antes de incorporarse a los lípidos celulares.

La estructura teórica propuesta para el éster metílico de $[\text{}^2\text{H}]-16:1n-9$ que se formaría a partir de oleico deuterado se muestra en la **Figura D.33-A**. En su espectro de fragmentación se puede ver el ion molecular de $m/z= 297.3$, justamente la masa molecular del 16:1n-9 endógeno convertido a éster metílico que es de 268 u más el exceso de masa que introducen los 29 deuterios ($268+29= 297$) (**Figura D.33-B**). Aparece una serie de picos diagnóstico totalmente análogos a los que aparecían para el $[\text{}^2\text{H}]-18:1n-9$ (**Figura D.32-A**) y que se pasan a estudiar a continuación. Tanto el fragmento de $m/z= 77$ como el pico que se forma por la pérdida del mismo de la molécula completa, de $m/z= 220= 297-77$ se deben a la ya comentada reorganización de McLafferty que tiene lugar en prácticamente todos los derivados de ácidos grasos sometidos a impacto electrónico (244). La reorganización se produce cuando un átomo de deuterio del carbono C4 de la cadena del ácido graso migra hacia el grupo carboxilo terminal a través de un estado de transición intermedio como el que se muestra en la **Figura D.33-C**. El hecho de que la m/z de ese ion sea 77 en vez de 74 como se describe para los FAME se debe precisamente a la presencia de 3 deuterios en el fragmento que se forma (**Figura D.33-C**). Por otra parte también se observa la pérdida de un fragmento de $m/z= 33$, dando lugar al pico de $m/z= 297-33= 264$, que correspondería a la pérdida del grupo metoxi terminal más un deuterio, como se muestra en la **Figura D.33-D**. La presencia de ese deuterio en vez de un hidrógeno, como es habitual para los FAME monoinsaturados no marcados con isótopos estables, hace que la pérdida observada sea de 33 u en vez de las 32 habituales. Además, el pico de $m/z= 172$, formado por la pérdida de un fragmento de 125 u del ion molecular

RESULTADOS

(297-125= 172) se justifica por la fragmentación que se produce entre el quinto y el sexto carbono de la cadena hidrocarbonada a la que se añade un deuterio (**Figura D.33-D**). La presencia de 9 deuterios en ese fragmento explica que el fragmento medido tenga una $m/z = 125$ en vez de una $m/z = 116$ como ocurre con el éster metílico del ácido graso no deuterado. Por otra parte, la presencia del pico mayoritario de $m/z = 62$, así como del fragmento de $m/z = 94$ se entiende por la formación de cadenas hidrocarbonadas que presentan la fórmula general $[C_nD_{2n-1}]$, siendo respectivamente $n = 4$ (para el fragmento de $m/z = 62$) y $n = 6$ (para el fragmento de $m/z = 94$). Ese tipo de fragmentos son muy abundantes en ácidos grasos monoinsaturados como ésteres metílicos (224, 227, 240), y aparecen en el ácido graso no deuterado con una $m/z = 55$ (62-7 deuterios) y $m/z = 83$ (94-11 deuterios). No se dibuja la estructura del fragmento porque no es posible localizar de forma exacta el doble enlace, debido a la deslocalización del mismo que se produce cuando se ioniza la molécula por impacto electrónico (224, 227, 240).

Con todo ello, se puede afirmar que el origen metabólico del ácido graso 16:1 n -9 es a partir del ácido oleico. Los siguientes pasos en la caracterización del proceso metabólico serán, primero determinar la distribución por clase de lípido de ese [2H]-16:1 n -9 que se está formando una vez que se ha caracterizado su espectro de fragmentación en un extracto lipídico total, y posteriormente, estudiar si la conversión del 18:1 n -9 a 16:1 n -9 se produce por β -oxidación, así como determinar qué tipo de β -oxidación se produce en caso de que así sea.

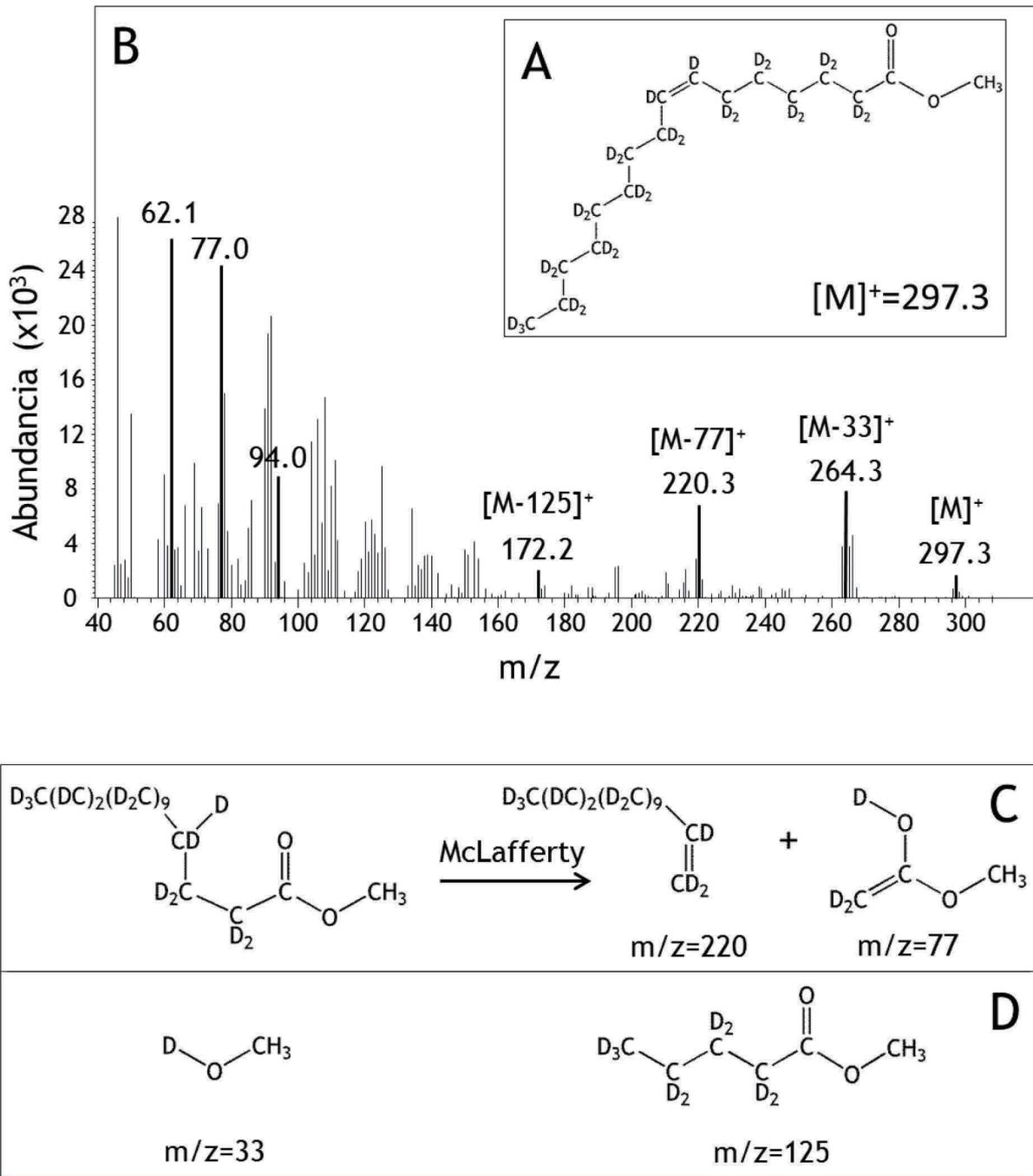


Figura D.33. Espectro de fragmentación del ácido graso $[^2\text{H}]\text{-16:1n-9}$ como éster metílico en monocitos humanos. Los monocitos humanos se incubaron con $50\ \mu\text{M}$ $[^2\text{H}]\text{-18:1n-9}$ durante 2 horas, se extrajeron los lípidos y se midieron los ácidos grasos esterificados totales por GC/MS tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. (A) Estructura teórica propuesta para el éster metílico de $[^2\text{H}]\text{-16:1n-9}$. (B) Espectro de fragmentación del éster metílico de $[^2\text{H}]\text{-16:1n-9}$ por GC/MS. Resaltados aparecen los principales fragmentos diagnóstico. (C) Reorganización de McLafferty. (D) Explicación mecánica de los principales fragmentos que se forman.

D: Átomo de deuterio que sustituye al hidrógeno (H) del ácido graso endógeno. [M]: Relación m/z del ion molecular.

RESULTADOS

Para cuantificar la incorporación a cada clase de lípido del [^2H]-16:1*n*-9 producido por las células, se aprovecha que al igual de lo que ocurría entre el [^2H]-18:1*n*-9 y el 18:1*n*-9 endógeno convertidos a ésteres metílicos, el [^2H]-16:1*n*-9 y el 16:1*n*-9 también se separan cromatográficamente de forma muy efectiva (el tiempo de retención del 16:1*n*-9 es de 13.20 minutos, como se veía en la **Figura D.23**, mientras que el tiempo de retención del [^2H]-16:1*n*-9 es de 12.69 minutos), con lo cual se puede integrar y cuantificar ese pico cromatográfico de 16:1*n*-9 deuterado. Para la cuantificación de los ácidos grasos deuterados se monitorizaron sus fragmentos característicos de $m/z= 62, 77$ y 94 (**Tabla C.4**).

Se puede observar cómo al igual que ocurría con la adición de ácido oleico no deuterado (**Figura D.31**), la incorporación total del ácido oleico deuterado a lípidos celulares (256 ± 37 nmol/mg proteína) excede 2 órdenes de magnitud la masa total incorporada de su derivado, el [^2H]-16:1*n*-9 (1.41 ± 0.29 nmol/mg proteína) (**Figura D.34-A**). Atendiendo a la incorporación por clase de lípido, en ambos casos la fuente mayoritaria a la que se esterifica el ácido graso deuterado es el TAG, siendo casi un 75 % del total, seguido por los PL, que constituyen aproximadamente un 25 % (**Figura D.34-B**). Además, el [^2H]-16:1*n*-9 se encuentra esterificado de forma minoritaria en DAG (menos de un 3 %) y no aparece en su fuente mayoritaria endógena, los CE (**Figura D.34**).

Este patrón de incorporación del [^2H]-16:1*n*-9 es muy similar al que se observó cuando era añadido directamente de forma exógena (**Figura D.29**). La esterificación en DAG se puede explicar porque se está incorporando mayoritariamente a TAG, debido a que el DAG es un precursor metabólico mayoritario, lo cual también concuerda con su incorporación mayoritaria a PA cuando se añade exógenamente (**Figura D.30**). Eso sí, en ambos casos, la distribución del 16:1*n*-9 incorporado difiere de la encontrada de forma basal, indicando que probablemente la célula no se encuentre en condiciones de equilibrio y que la incorporación a CE, o degradación a MAG se produzcan por mecanismos que ocurran a tiempos más largos.

RESULTADOS

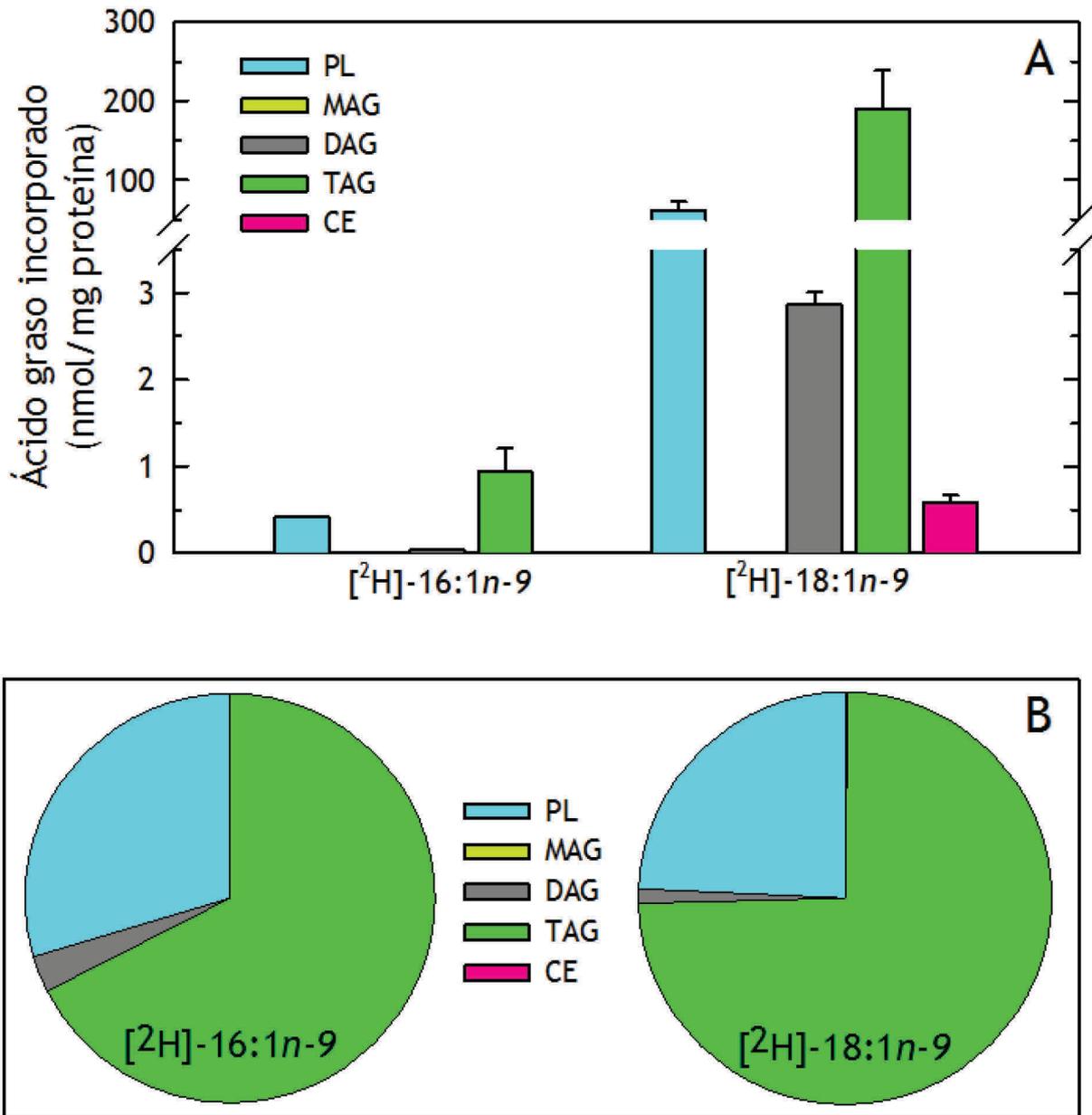


Figura D.34. Incorporación del ácido graso [²H]-18:1n-9 y su derivado [²H]-16:1n-9 en las distintas clases de lípidos en monocitos humanos. Las células se trataron con 50 μM [²H]-18:1n-9 durante dos horas y tras la extracción de lípidos y separación por clases se midieron los niveles de [²H]-18:1n-9 y [²H]-16:1n-9 esterificados por cromatografía de gases/espectrometría de masas, tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en FAME. (A) Incorporación de cada ácido graso deuterado en valores totales. (B) Distribución porcentual de los ácidos grasos deuterados en cada clase de lípido medida.

RESULTADOS

Una vez que se comprobó mediante el marcaje con el ácido graso deuterado que el 16:1*n*-9 provenía del ácido oleico, se exploró la hipótesis más plausible de que se formase por un ciclo de β -oxidación. Para ello se empleó etomoxir, un inhibidor irreversible de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), una enzima localizada en la membrana mitocondrial externa que se encarga de unir el acil-CoA citosólico a carnitina para formar acilcarnitina y transportar de esta forma los ácidos grasos hacia la matriz de la misma para su posterior β -oxidación. Dado que el sistema de importación de ácidos grasos al interior del peroxisoma (el otro orgánulo donde se puede producir la β -oxidación) no requiere esta enzima, la inhibición de la CPT1 afecta solamente a la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos (304). En trabajos anteriores, el etomoxir ya se ha mostrado efectivo en la inhibición de la β -oxidación mitocondrial (56, 305) y, por lo tanto, se usó como herramienta para determinar si el 16:1*n*-9 proviene del 18:1*n*-9 tras un ciclo de β -oxidación del mismo en la mitocondria.

Se trataron los monocitos humanos con 50 μ M de 18:1*n*-9 durante 2 horas, condiciones en las que ya se ha comprobado que se inducen importantes aumentos de 16:1*n*-9 (**Figura D.31** y **Figura D.34**), en ausencia o presencia de 30 μ M etomoxir, añadido a las células 30 minutos antes del ácido graso. En este caso, el añadir el inhibidor un tiempo antes cobra aún más importancia que con otros inhibidores, dado que se ha demostrado que el etomoxir ha de unirse a CoA para ser efectivo como inhibidor (306). Primeramente se observa que, como en el resto de experimentos donde las células eran suplementadas con ácido oleico, se produce una gran incorporación del mismo a los lípidos celulares, que no se ve modificada por la presencia de etomoxir (**Figura D.35-A**). Esa incorporación de 18:1*n*-9 va acompañada de un incremento de los niveles de 16:1*n*-9 (de nuevo entre un 1 y un 2 % del OA que se incorpora) que se ve significativamente reducido en las células preincubadas con etomoxir antes de añadir el ácido oleico (**Figura D.35-B**). El etomoxir no modifica los niveles de ningún otro ácido graso medido (no mostrado).

Por ello, la evidencia experimental parece indicar que el 16:1*n*-9 que proviene del 18:1*n*-9 lo hace vía un ciclo de β -oxidación, y que además esa β -oxidación se produciría en la mitocondria, pues la CPT1 no participa en la β -oxidación peroxisomal (307, 308).

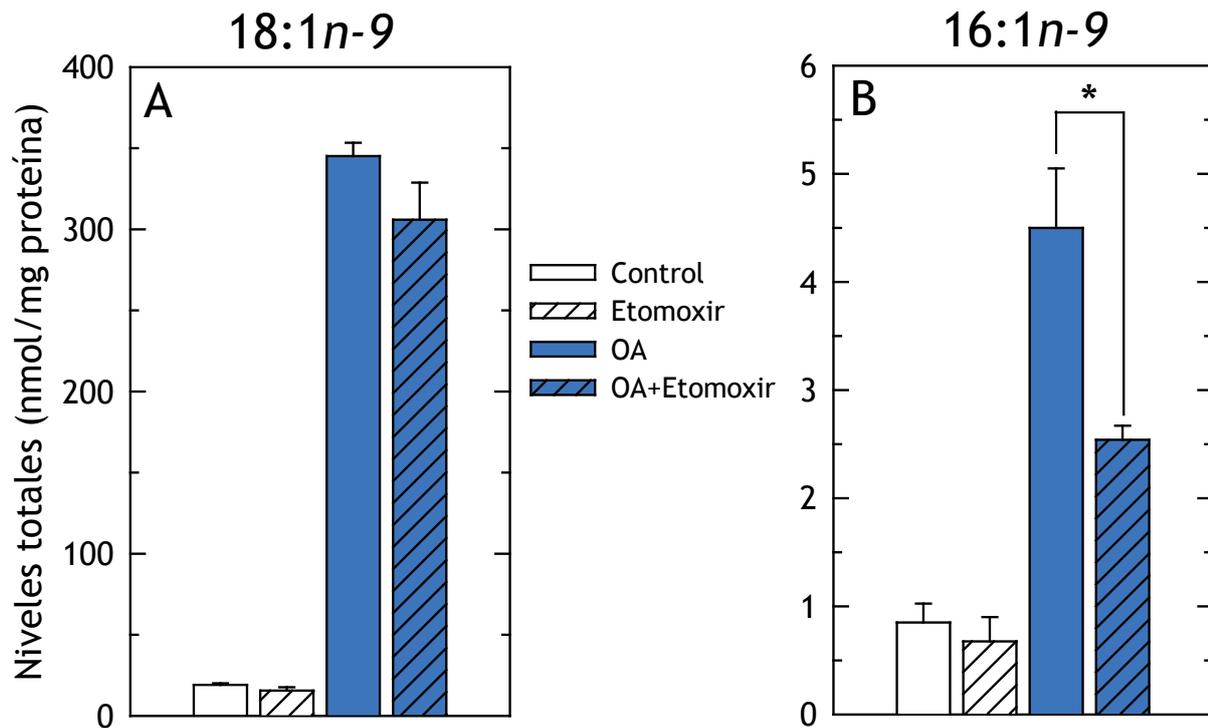


Figura D.35. El etomoxir inhibe la formación del ácido graso 16:1n-9 a partir de ácido oleico en monocitos humanos. Las células se mantuvieron en medio incompleto (barras blancas) o se incubaron con 50 μ M de ácido oleico durante 2 horas (barras azules) en ausencia o presencia (barras rayadas) de 30 μ M etomoxir. Tras la extracción de lípidos, se midieron los ácidos grasos esterificados totales por cromatografía de gases/espectrometría de masas, tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. Cuando correspondió, el etomoxir se añadió a las células 30 minutos antes que el ácido oleico.

Por último, una vez que se estableció que el 16:1*n*-9 proviene de la β -oxidación del ácido oleico en monocitos humanos, se comprobó que estos datos eran coherentes con el modelo de trabajo propuesto en el apartado anterior de resultados. Según ese modelo, el tratamiento de los monocitos humanos con AA induce la síntesis de gotas lipídicas, donde los lípidos neutros que las componen toman los ácidos grasos producidos por la estimulación de la síntesis *de novo* de los mismos por el propio AA. Esa síntesis *de novo* explicaría el incremento en TAG y CE de 14:0, 16:0, 18:0 y 18:1*n*-9 (Figura D.2), pero no explica completamente la gran acumulación de 16:1*n*-9, pues este ácido graso no podría sintetizarse *de novo* de forma directa mediante las enzimas estudiadas (ACC α , FAS, SCD-1, ELOVL6), sino que incluiría también un último paso de β -oxidación. Debido a ello, en células activadas con AA, el 16:1*n*-9 debería formarse, o bien por una mayor disponibilidad de su sustrato el 18:1*n*-9, cosa que ocurre, pues aumentaba al tratar con AA (Figura D.2); o bien por una mayor tasa de β -oxidación del 18:1*n*-9 hacia 16:1*n*-9 al tratar con AA; o incluso por una combinación de ambos mecanismos. Para explorar esta posibilidad se marcaron las células durante 10 minutos con [²H]-18:1*n*-9 para permitir su incorporación, antes de estimularlas con 10 μ M AA durante 2 horas. Se observó que la tasa de oleico deuterado β -oxidado a [²H]-16:1*n*-9 es el doble en los monocitos que eran tratados con el AA (Figura D.36).

Colectivamente, esto parece indicar que la tasa de β -oxidación de ácido oleico hacia 16:1*n*-9 aumentaría al estimular las células con AA y concuerda con los grandes aumentos relativos que sufría el 16:1*n*-9 en los monocitos incubados con AA, que no podían explicarse sólo a partir de una mayor disponibilidad de ácido oleico.

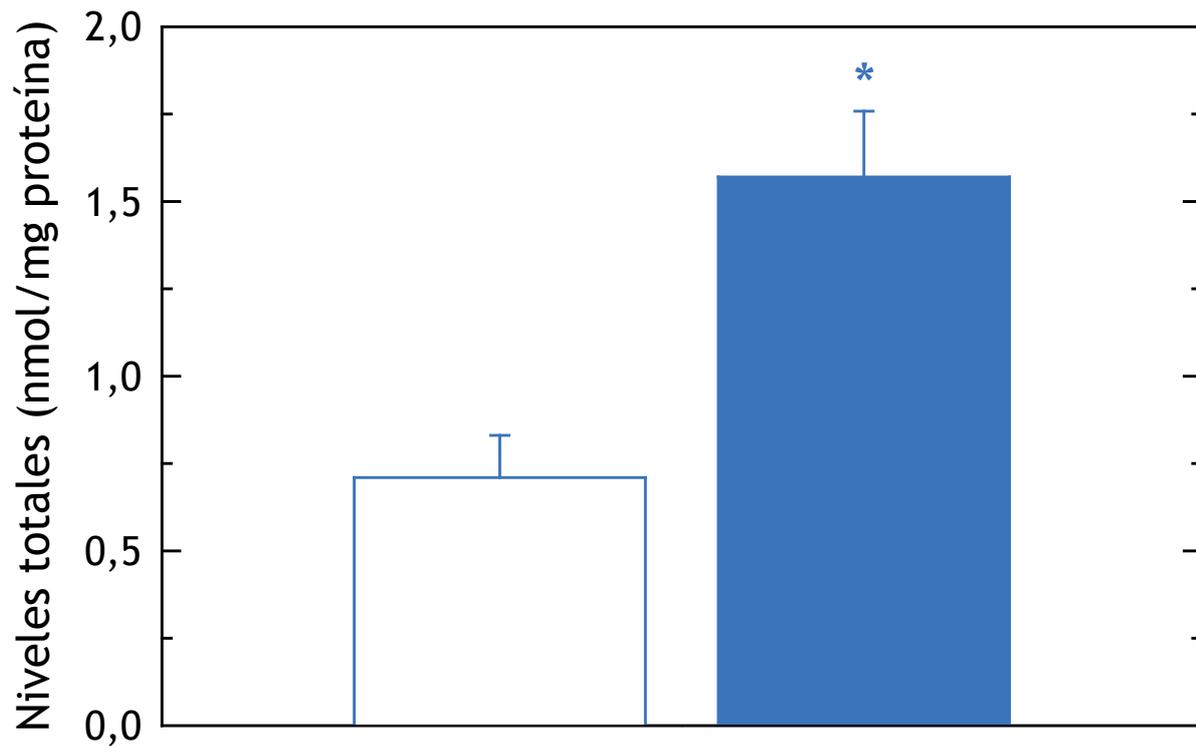


Figura D.36. Efecto del AA en la β -oxidación del ácido graso $[^2\text{H}]-18:1n-9$ a $[^2\text{H}]-16:1n-9$ en monocitos humanos. Las células se marcaron con $50 \mu\text{M}$ $[^2\text{H}]-18:1n-9$ y se trataron en ausencia (barra blanca) o presencia (barra coloreada) de $10 \mu\text{M}$ AA durante 2 horas. Los niveles totales de $[^2\text{H}]-16:1n-9$ se midieron por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. El $[^2\text{H}]-18:1n-9$ se añadió a las células 10 minutos antes que el AA.

D.3. EL ÁCIDO GRASO 16:1 n -9 PRESENTA POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO EN RATÓN

D.3.1. EL ÁCIDO GRASO 16:1 n -9 TAMBIÉN APARECE EN RATÓN, MOSTRANDO PREFERENCIA POR LA ACUMULACIÓN EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos funcionales del ácido graso 16:1 n -9, se determinó su distribución a nivel sistémico para observar si su enriquecimiento en las células inmunes era extensible a otras células y/o tejidos y así poder acotar en qué tipo de funciones biológicas podría estar involucrado este ácido graso. El estudio en humanos resultó inviable debido a la dificultad para conseguir órganos y tejidos, por lo que se llevó a cabo esta tarea en ratón. Además, dado que el aislamiento de monocitos de sangre periférica de ratón requiere unas cantidades inasumibles de animales, se establecieron los macrófagos peritoneales residentes (mRPM) del mismo como modelo de célula mononuclear del sistema fagocítico para comparar con otros tejidos extraídos del mismo ratón como fueron hígado, cerebro, corazón, pulmón, riñón, tejido adiposo blanco y pardo, músculo esquelético y bazo.

Primeramente se observó que en los cromatogramas correspondientes a un extracto de lípidos totales de mRPM aparecía otro isómero además del 16:1 n -7 que coincidía en tiempo de retención con los patrones de 16:1 n -9 y 16:1 n -10 como ésteres metílicos, y que se denominó en un principio 16:1 n -x (**Figura D.37-A**). La posterior derivatización de esa muestra a DMOX para la total caracterización del ácido graso, confirmó que el isómero 16:1 incógnita se correspondía con el patrón de fragmentación de 16:1 n -9, al igual que ocurría con los monocitos y macrófagos humanos, quedando así determinado de forma completa (**Figura D.37-B**).

RESULTADOS

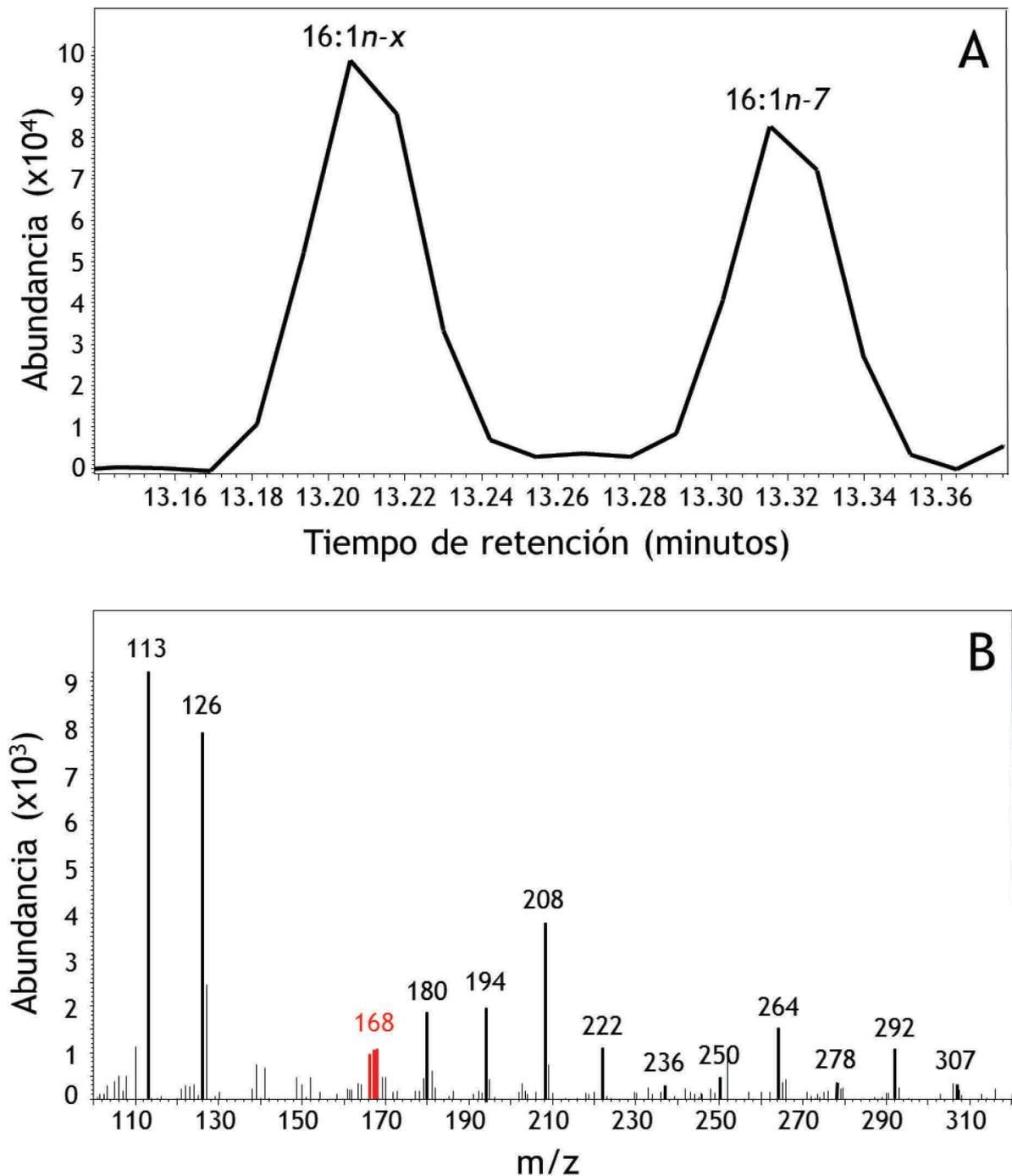


Figura D.37. Los macrófagos peritoneales de ratón presentan el ácido graso 16:1n-9. Se tomó un extracto lipídico total de macrófagos peritoneales de ratón y se analizaron sus ácidos grasos por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en FAME. (A) Se muestra la zona del cromatograma que corresponde a los tiempos de retención de los ésteres metílicos de los isómeros de 16:1. (B) Se muestra el espectro de fragmentación del isómero 16:1 incógnita del panel A como DMOX. Resaltados aparecen los principales fragmentos diagnóstico.

RESULTADOS

El mismo análisis de ese pico en PL, TAG y CE de mRPM por separado arrojó el mismo resultado; en todos los casos era 16:1*n*-9. Además, se caracterizó ese isómero en todos los órganos y tejidos que se usaron en esta parte del trabajo, así como en el suero de ratón, obteniendo de nuevo en todos los casos que el isómero que aparece aparte del 16:1*n*-7, es el 16:1*n*-9, como se resume en la **Tabla D.3**. No se muestran los espectros de fragmentación como DMOX de todos los picos por razones de simplicidad.

MATERIAL BIOLÓGICO	ISÓMERO 16:1 (16:1 <i>n</i> -10/16:1 <i>n</i> -9)
CÉLULAS	
Macrófagos peritoneales de ratón	16:1 <i>n</i> -9
Lavado peritoneal de ratón	16:1 <i>n</i> -9
Hígado, cerebro, corazón, pulmón, riñón, WAT, BAT, músculo y bazo de ratón	16:1 <i>n</i> -9
SUEROS	
Suero de ratón	16:1 <i>n</i> -9

Tabla D.3. Resumen de la identificación del isómero del ácido graso 16:1 en ratón. En cada caso se derivatizó un extracto lipídico a DMOX y se determinó el isómero atendiendo al espectro de fragmentación correspondiente obtenido por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

WAT: Tejido adiposo blanco. BAT: Tejido adiposo pardo.

RESULTADOS

Una vez que se determinó que el 16:1*n*-9 también aparecía en ratón, se realizó un análisis cuantitativo, siempre comparando con el 16:1*n*-7, de los niveles del mismo en las 3 principales clases de lípidos que presentan las células: PL, TAG y CE. En la **Figura D.38** se representan los valores de ambos isómeros como suma de sus medidas en PL+TAG+CE (que se ha comprobado en numerosas medidas anteriores que contienen más del 90 % de los ácidos grasos celulares). Para homogeneizar la cuantificación, debido a que para células se calculan los valores relativizados a masa de proteína, para tejidos se hace relativizado a masa de tejido y para suero se muestra relativizado a volumen de suero, se representó el porcentaje que constituyen estos dos isómeros 16:1 sobre el total de ácidos grasos, lo cual permite comparar directamente sus valores en todas las fuentes biológicas disponibles (**Figura D.38**). Además, aparte de la medida en macrófagos peritoneales purificados (**Apartado C.3.1.2**) se analizaron también todas las células del propio lavado peritoneal recién extraído del animal, cuya composición, según estudios hechos en ratones FVB/NJ, es de un 67 % de macrófagos residentes, presentando bajas cantidades de otras células mononucleares e ínfimas de células polimorfonucleares (309).

Con todo ello, se puede observar que todos los órganos y tejidos del ratón presentaban al menos 3 veces más ácido palmitoleico que 16:1*n*-9, excepto el lavado peritoneal que presenta valores similares y los mRPM que tienen 4 veces más 16:1*n*-9 que 16:1*n*-7 (**Figura D.38-A**). Atendiendo a la presencia de estos dos ácidos grasos en el suero sanguíneo de los mismos ratones, se puede ver que hay 4 veces más ácido palmitoleico que 16:1*n*-9 (**Figura D.38-B**), lo cual es concordante con la proporción de órganos y tejidos. Además, mirando los valores totales, los mRPM son, de todos los sistemas biológicos estudiados, el que presentaba una mayor cantidad porcentual de 16:1*n*-9 sobre el total de ácidos grasos, seguidos por el pulmón y el tejido adiposo blanco (**Figura D.38**).

RESULTADOS

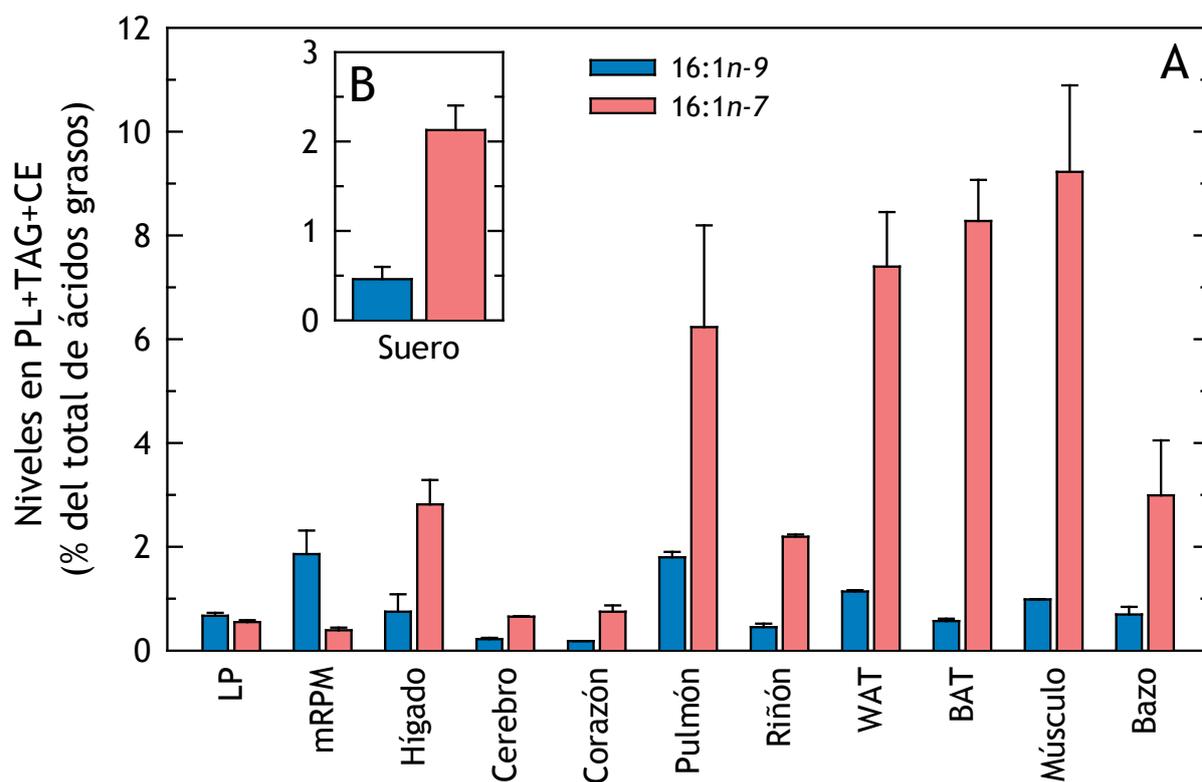


Figura D.38. Niveles totales de los isómeros del ácido graso 16:1 en distintas células, órganos y tejidos de ratón. Se tomó un extracto de cada muestra y tras la extracción de lípidos y separación por clases se midieron sus ácidos grasos por cromatografía de gases/espectrometría de masas, tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en ésteres metílicos de los ácidos grasos. Los valores se muestran en porcentaje de cada ácido graso respecto al total de ácidos grasos, en PL+TAG+CE. (A) Células, tejidos y órganos de ratón. (B) Suero de ratón.

LP: Lavado peritoneal. WAT: Tejido adiposo blanco. BAT: Tejido adiposo pardo.

RESULTADOS

Una vez que se realizó el análisis cuantitativo de la masa de cada isómero, se estudió su distribución en las 3 principales clases de lípidos. Lo primero a resaltar de ese análisis, es que los mRPM presentan 16:1*n*-9 en PL, TAG y CE. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha detectado 16:1*n*-7 en los PL en esas células, al igual de lo que se reportó en los monocitos humanos. Por el contrario, ambos isómeros son detectados en los PL, TAG y CE del resto de órganos y tejidos, con la excepción del tejido adiposo blanco, que no presentaba 16:1*n*-7 en sus CE (**Figura D.39**).

Al considerar la distribución de los isómeros 16:1 entre los PL, se puede ver que hay bastante más 16:1*n*-7 que 16:1*n*-9 esterificado en todas las fuentes biológicas, excepto para los mRPM (**Figura D.39-A**). En lo referido a TAG, se observa una tendencia aún más clara. Excepto para los mRPM que sólo tienen 16:1*n*-9, el resto de órganos y tejidos tienen una mucha mayor cantidad de ácido palmitoleico, destacando el tejido adiposo y el músculo esquelético (**Figura D.39-B**). Por último, en la distribución de 16:1 en los CE se observa que para los tejidos y órganos los valores de ambos isómeros son muy bajos comparados con los medidos en PL y TAG y que no hay ninguna tendencia clara sobre la predominancia de uno u otro ácido graso, aunque sorprende que tejidos con mucho más 16:1*n*-7 que 16:1*n*-9 total, como cerebro, corazón y bazo (**Figura D.38**), presenten valores mayores de 16:1*n*-9 en sus CE (**Figura D.39-C**). Mención aparte merecen los macrófagos peritoneales residentes que sólo esterifican 16:1*n*-9 en sus CE y en valores más de 10 veces superiores al resto de órganos y tejidos (**Figura D.39**), de nuevo mostrando una gran preferencia de este ácido graso para esterificarse en los CE de células inmunes.

RESULTADOS

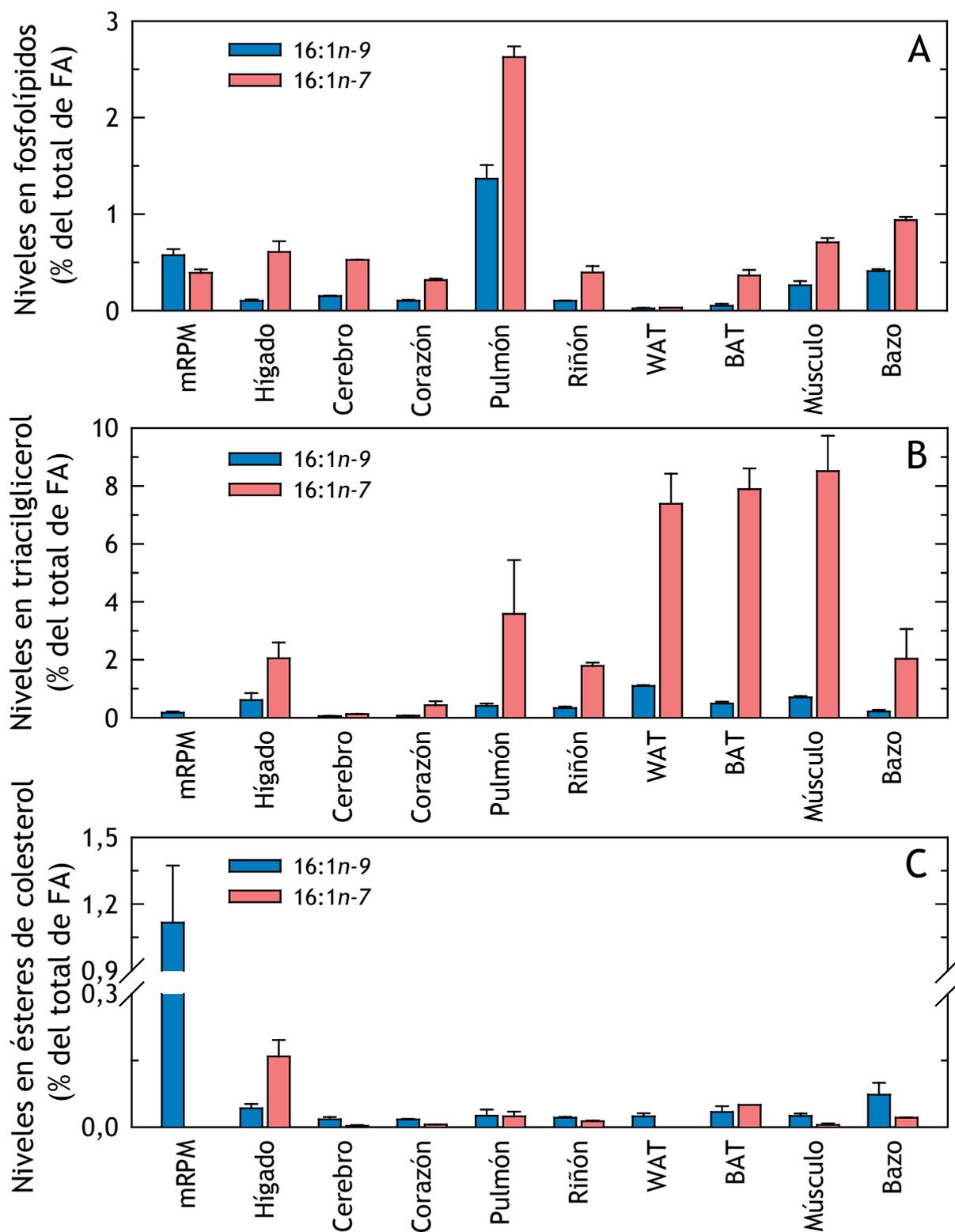


Figura D.39. Niveles de los isómeros del ácido graso 16:1 en distintas células, órganos y tejidos de ratón por clase de lípido. Se tomó un extracto de cada muestra y tras la extracción de lípidos y separación por clases se midieron sus ácidos grasos en PL (A), TAG (B) y CE (C) por cromatografía de gases/espectrometría de masas, tras convertir los ésteres de glicerol y colesterol en FAME.

WAT: Tejido adiposo blanco. BAT: Tejido adiposo pardo.

RESULTADOS

Finalmente, estudiando la distribución de ambos ácidos grasos en las distintas muestras biológicas se observa claramente que sólo en los mRPM hay una clara diferencia entre cómo se distribuye el 16:1*n*-9 y el 16:1*n*-7 entre los lípidos celulares (**Figura D.40**). Como en los monocitos, la fuente mayoritaria de 16:1*n*-9 en los mRPM son los CE, aunque en este caso seguidos de los PL y TAG, mientras que el 16:1*n*-7 se encuentra sólo en PL, en cantidades similares al 16:1*n*-9 esterificado en PL (**Figura D.40**), también como ocurría en los monocitos (**Figura D.28-A**). Por el contrario, si se observa el resto de órganos y tejidos se puede ver que aunque la masa de uno respecto a otro isómero varía en términos totales, la distribución entre PL, TAG y CE es muy similar en términos cualitativos, es decir, en todos los casos el 16:1*n*-7 se encuentra esterificado en TAG y PL de forma preferencial y de manera minoritaria en CE, proporción que se mantiene cualitativamente en cada tipo celular si se estudia el 16:1*n*-9 (**Figura D.39**).

Se ha demostrado que el 16:1*n*-9 aparece también en ratón, presentándose en cantidades apreciables en sus macrófagos peritoneales, en las que es más abundante que el ácido palmitoleico. Además presenta una distribución en mRPM muy similar a los monocitos y que difiere totalmente de la distribución de 16:1*n*-7, cosa que no ocurre en el resto de órganos y tejidos.

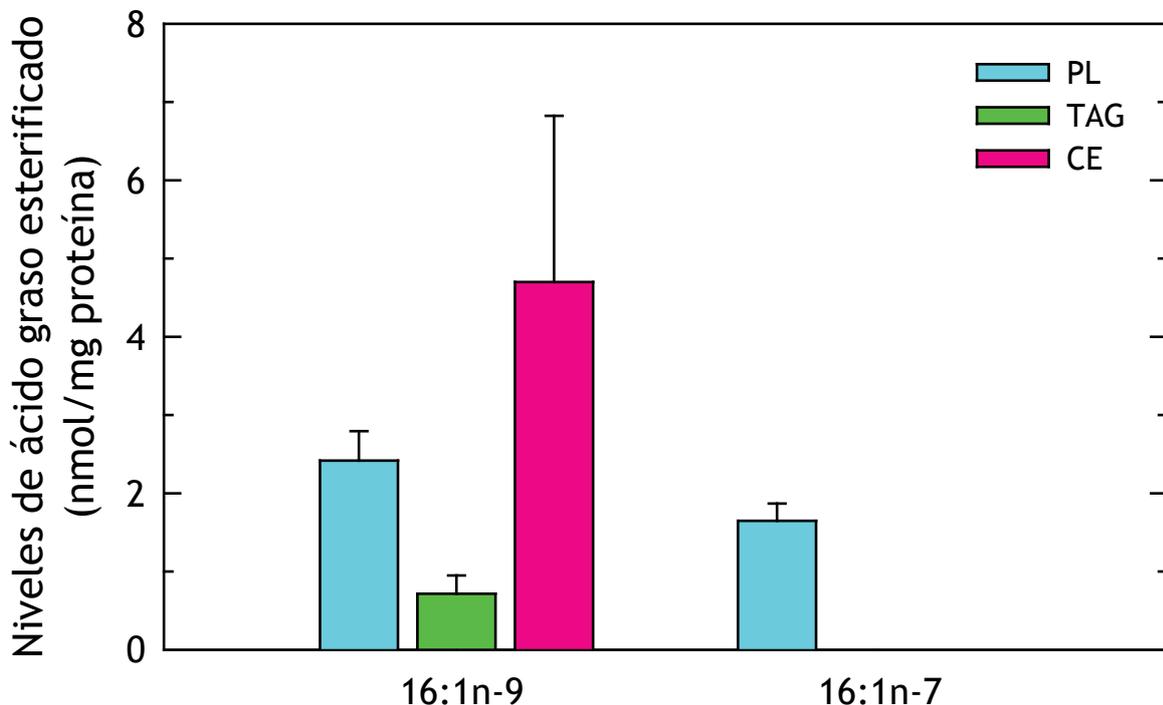


Figura D.40. Distribución de los isómeros del ácido graso 16:1 en macrófagos peritoneales de ratón. Tras la extracción y separación de lípidos se midió su composición en ácidos grasos por cromatografía de gases/espectrometría de masas tras la conversión de los ésteres de glicerol y colesterol en FAME.

D.3.2. EL 16:1*n*-9 SE COMPORTA COMO UN ÁCIDO GRASO ANTIINFLAMATORIO EN MODELOS DE RATÓN

Para indagar sobre el efecto de los isómeros 16:1 en la respuesta inflamatoria mediada por los macrófagos peritoneales de ratón, se usó un modelo de activación *in vitro* de la respuesta inmune innata con el estímulo bacteriano lipopolisacárido (LPS). Para estudiar los posibles efectos del 16:1*n*-9 en esa activación de los macrófagos, se preincubaron las células con 10 μ M del mismo durante 2 horas para permitir su enriquecimiento. Además, a efectos comparativos, se preincubaron los macrófagos peritoneales con 16:1*n*-7, que en modelos *in vitro* de ratón se ha demostrado que reduce la respuesta inflamatoria; así como con DHA, un ácido graso que presenta un gran potencial antiinflamatorio (207, 310, 311).

La estimulación con LPS produjo una fuerte respuesta inflamatoria por parte de los macrófagos como se refleja en la expresión de genes relacionados con la misma (**Figura D.41**). El 16:1*n*-9 reduce de forma potente la respuesta inflamatoria producida por el LPS en todos los casos, mientras que el ácido palmitoleico, aunque también reduce los niveles de transcripción de los genes, sólo alcanza significación estadística para los correspondientes a $Tnf\alpha$ y $Nos2$ (**Figura D.41**). Además, el efecto antiinflamatorio del 16:1*n*-9 es mayor que el del 16:1*n*-7 para los 8 marcadores, siendo significativo para los genes codificantes de $Il6$, $Il23a$ y $Tnf\alpha$. La preincubación con DHA resultó en una fuerte inhibición de la respuesta inflamatoria, como ya se ha reportado en la bibliografía. Aunque 2 marcadores no alcanzasen significación estadística en la inhibición por 16:1*n*-9, la tendencia de su respuesta es la misma que para el resto. Cabe destacar que para algunos genes, el efecto antiinflamatorio producido por la incubación con 16:1*n*-9 es prácticamente igual de potente que el del DHA (**Figura D.41**).

RESULTADOS

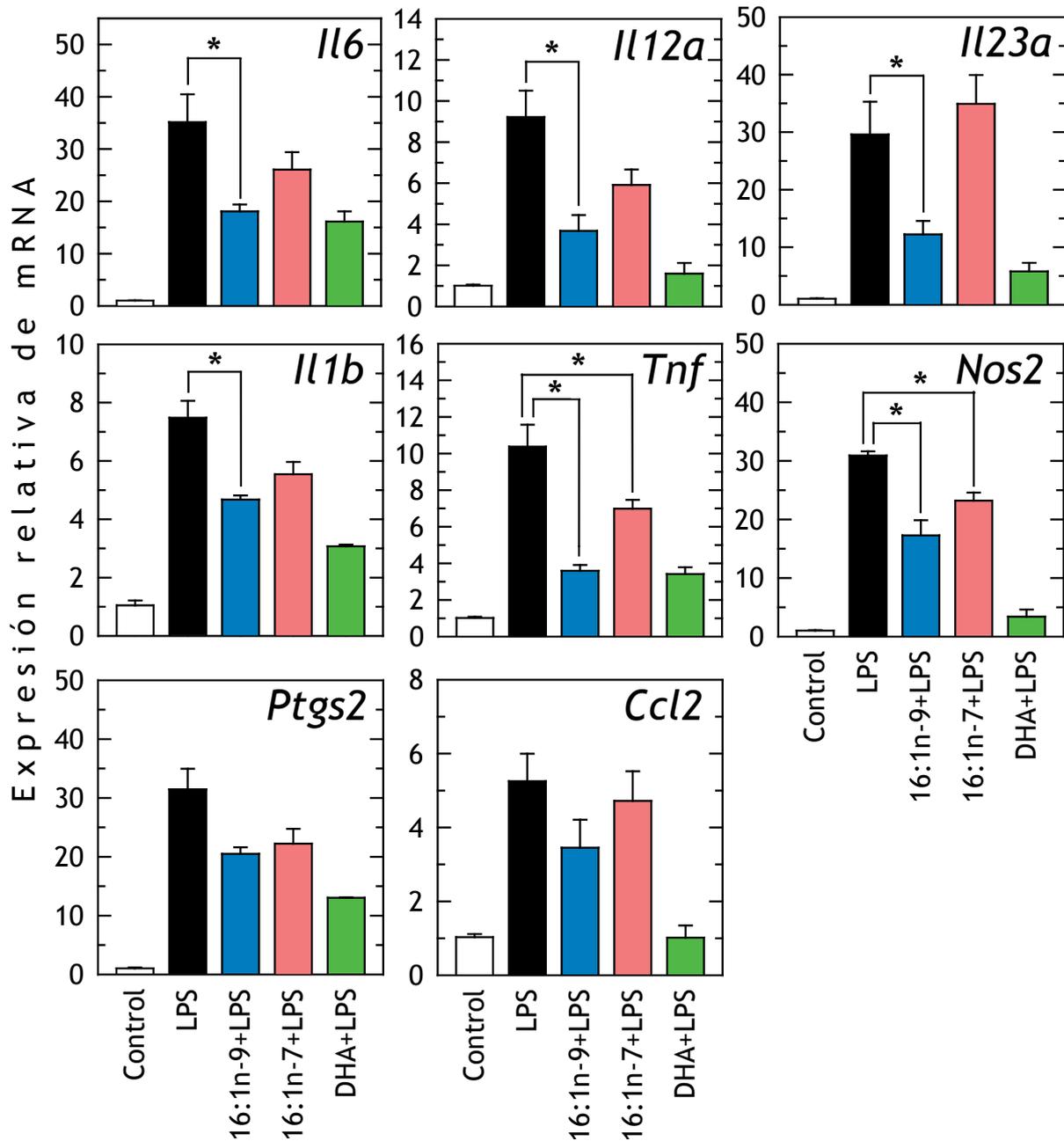


Figura D.41. Efecto de la preincubación con distintos ácidos grasos en la expresión génica de moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales de ratón. Se incubaron las células con los ácidos grasos a una concentración de 10 μ M durante 2 horas antes de retirarlos y añadir el LPS a una concentración de 100 ng/ml durante 6 horas. Se determinó la expresión relativa de los genes por PCR cuantitativa a tiempo real como se describe en materiales y métodos. Los ácidos grasos por sí mismos no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de expresión. *Il6*: Interleuquina 6. *Il12a*: Interleuquina 12, sub-unidad alfa. *Il23a*: Interleuquina 23, sub-unidad alfa. *Il1b*: Interleuquina 1 beta. *Tnf*: Factor de necrosis tumoral alfa. *Nos2*: Óxido nítrico sintasa 2. *Ptgs2*: Ciclooxygenasa 2. *Ccl2*: Proteína quimioatrayente de monocitos 1.

Para comprobar la relevancia de los resultados anteriores se llevaron a cabo experimentos *in vivo*, administrando a los ratones tanto el ácido graso como la endotoxina por vía intraperitoneal en dosis sub-letales al tiempo de sacrificio de 6 horas (312). Se tomó como referencia la Il6, dado que es la que más aumenta *in vitro* tras el tratamiento con LPS y presenta una respuesta modelo (**Figura D.41**). Además se sabe que tiene un efecto pleiotrópico y su modulación está involucrada en numerosas patologías con componente inflamatoria (313).

Para comprobar si ese cambio en la expresión génica de los macrófagos peritoneales se traduce en cambio proteico, se midieron los niveles de Il6 en suero mediante ELISA. Se encontró que esos niveles de Il6 aumentaban con el LPS, mientras que eran potentemente inhibidos por el enriquecimiento intraperitoneal con el ácido graso 16:1*n*-9, aunque no por el enriquecimiento con 16:1*n*-7 o DHA (**Figura D.42**).

Colectivamente, estos resultados muestran que el enriquecimiento de células inmunes con 16:1*n*-9 tiene efectos antiinflamatorios, que comparativamente son mayores a los producidos por el 16:1*n*-7 e incluso en algunos casos, similares o superiores a los producidos por el DHA. Dado que la biosíntesis, enriquecimiento, distribución e incorporación de los isómeros 16:1 son distintos, se requieren futuros estudios para asignar si sus diferencias bioquímicas podrían influir en su comportamiento biológico.

RESULTADOS

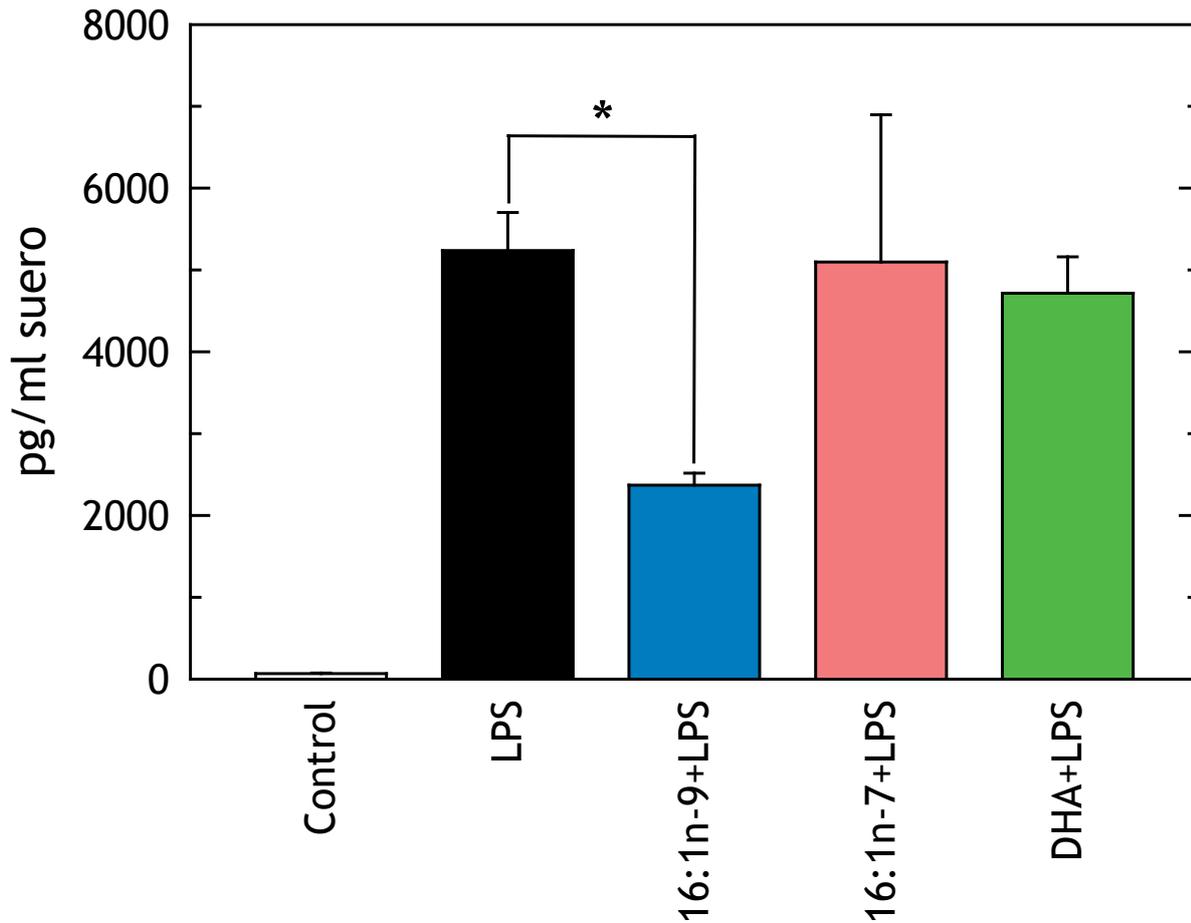


Figura D.42. Efecto del enriquecimiento con distintos ácidos grasos en la expresión proteica de la interleuquina 6 en suero de ratón. El ácido graso fue administrado vía peritoneal a los ratones a una concentración de 20 mg/kg y se dejó incorporar durante 1 hora previamente a administrar el LPS a una concentración de 5 mg/kg durante 6 horas antes de sacrificar los animales. Se aisló el suero de ratón como se indica en materiales y métodos y se midieron sus niveles de interleuquina 6 por ELISA.

E. DISCUSIÓN

E.1. REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS POR ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN MONOCITOS HUMANOS

E.1.1. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO PROMUEVE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS NEUTROS E INCREMENTA LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN MONOCITOS HUMANOS

En este trabajo se ha mostrado que el AA libre induce de forma rápida y muy potente la formación de LD en monocitos humanos a través de dos mecanismos distintos: (i) mediante la incorporación del AA exógeno a los TAG, y (ii) mediante la movilización de otros ácidos grasos obtenidos de fuentes endógenas hacia TAG y también CE. La incorporación directa del AA puede ser un mecanismo de la célula para evitar su lipotoxicidad en forma libre (53, 54), proporcionar un sustrato para β -oxidación con fines energéticos en caso de privación de nutrientes (56, 57) y/o tener otra fuente celular de AA además de los PL para la síntesis de eicosanoides (86). El segundo mecanismo parece la consecuencia de la activación de la señalización intracelular por parte del AA. Ambas rutas se pueden dissociar mediante el uso de triacsina C, un inhibidor de las ACSL1, 3, 4, que elimina casi completamente la primera ruta, dejando intacta la segunda. Además, el uso de este inhibidor muestra que la ruta de señalización es la principal contribuyente a la síntesis de LD por AA, incluso a tiempos de hasta 24 horas, donde la incorporación directa de AA alcanza su nivel máximo. La preincubación de las células con triacsina C permitió el estudio específico de la componente de señalización del AA. El uso y especificidad de este inhibidor se seguirán discutiendo más adelante.

La formación de LD por AA había sido descrita en células epiteliales (78) así como en neutrófilos (85), pero no se estudió ninguna ruta de señalización que condujera a esa formación. En ambos casos, el AA se usó a concentraciones de 10 μ M y a tiempos cortos (1-4 horas) suficientes para saturar el número de LD que se formaban por célula. En un estudio lipidómico a gran escala se ha medido que la concentración basal de AA como ácido graso libre en el plasma sanguíneo es 3 μ M (314), por lo cual cabe pensar que en un foco de iniciación de aterosclerosis con las células endoteliales activadas (96-100), la concentración pueda ser incluso mayor que los 10 μ M que se usaron. Cuando se hizo una

dosimetría de formación de LD por AA a concentraciones mayores (hasta 100 μM) se observó un comportamiento saturante a partir de esa concentración de 10 μM (no mostrado), como ya había sido demostrado anteriormente (85). El hecho de no usar BSA, proteína que compleja los ácidos grasos libres durante su transporte por el flujo sanguíneo, también parece apropiado, dado que el AA producido durante la activación endotelial, sale al torrente sanguíneo en su forma libre y es rápidamente encarado por los monocitos circulantes (**Figura A.6**). Debido a todo ello, se usó una concentración de 10 μM AA libre sin complejar con albúmina durante 2 horas como estímulo y la triacsina C para estudiar específicamente la ruta de señalización por AA.

Cuando se comparó la formación de LD inducida por el AA con la que producían otros ácidos grasos representativos según el número de dobles enlaces, se observó que inducían un número mucho menor de LD, siendo el 18:3 n -6 el ácido graso que más LD producía, seguido por el 18:2 n -6 y el 18:1 n -9. Finalmente el ácido palmítico (16:0) apenas indujo la síntesis de LD. Esto va en concordancia con lo publicado en neutrófilos, donde el AA era el mejor inductor de LD, seguido de los ácidos grasos con un menor número de dobles enlaces, mientras que los saturados apenas producían (85).

Además, contrariamente a lo que pasa con el AA, la incubación previa de los monocitos con TC inhibió los LD formados por 18:3 n -6, 18:2 n -6 y 18:1 n -9. Eso evidencia que esos ácidos grasos están formando LD simplemente incorporándose a los TAG de las células, y que por lo tanto, la inhibición de la formación de sus correspondientes acil-CoA mediante TC, impidiendo su esterificación en TAG, resulta en la completa eliminación de la formación de LD. En hepatocitos (45, 266), macrófagos (315) y mastocitos (316) estimulados con ácido oleico, la formación de LD también ha demostrado ser dependiente de la presencia de TC.

Se puede observar que los LD producidos por el AA en ausencia de TC aparecen más punteados que los formados en presencia del inhibidor. Esto puede ser debido a que los lípidos neutros que componen los LD presentan una composición de ácidos grasos distinta, pues los TAG de los LD en ausencia de TC presentan un gran enriquecimiento de AA, mientras que los preincubados con TC apenas presentan AA. Eso puede hacer que tengan distinta fluidez y que su densidad y unión al fluoróforo sean distintas.

E.1.2. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INDUCE LA SÍNTESIS DE NOVO DE ÁCIDOS GRASOS EN MONOCITOS HUMANOS

En ausencia de una fuente lipídica externa como ocurre en este trabajo, en el que no hay suero en el medio de cultivo y el AA no se incorpora por la presencia de TC, varios autores proponen que para la formación de LD en respuesta a distintos estímulos la célula relocaliza ácidos grasos desde otras fuentes celulares, esencialmente fosfolípidos, para sintetizar TAG y CE y almacenarlos en los LD, probablemente como un mecanismo de supervivencia ante esa situación de privación de nutrientes, que permite convertir los ácidos grasos de PL estructurales en ácidos grasos susceptibles para β -oxidación (56, 57). Se cree que algunas PLA₂, tanto secretadas (317), como citosólicas independientes (36) y dependientes de Ca²⁺ (38) pueden mediar este proceso, liberando de las membranas ácidos grasos que, tras activarse con CoA, se incorporan a DAG y colesterol libre por la acción de las enzimas DGAT y ACAT, acumulándose en el núcleo de los LD. Además, otra enzima como la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) puede catalizar la transacilación independiente de CoA de ácidos grasos desde fosfolípidos hacia colesterol libre, de forma independiente a las PLA₂, aunque su participación en ese proceso parece improbable dado que se expresa preferentemente en el hígado y está asociada a lipoproteínas (318).

La medida de ácidos grasos en PL por dos técnicas experimentales complementarias, no arrojó dato alguno que apoyase esa hipótesis, al no observarse cambios significativos. El incremento de la actividad de la cPLA₂ α observado en la **Figura D.12** tampoco es concordante con una relocalización de ácidos grasos, pues los TAG y CE que se forman en presencia de TC no contienen AA, el principal sustrato de esta enzima. Luego parece que esa activación de la cPLA₂ α por el AA tiene otros fines en la célula.

Los esfingolípidos, otra posible fuente endógena de ácidos grasos, que al tener el ácido graso unido por enlace amida en vez de éster no son hidrolizados en la reacción de transmetilación, tampoco parecen ser la fuente donadora de ácidos grasos para lípidos neutros debido a su escasa cantidad en las células comparado con los glicerofosfolípidos (223), que no explicaría el gran aumento de TAG y CE tras la estimulación con AA.

Tras descartar esta hipótesis se observó que el incremento del número total de ácidos grasos que aparecía en las células tras el tratamiento se debía a un aumento en el uso del mediador metabólico acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos, descartándose cambios en la β -oxidación de un ácido graso mayoritario como el palmítico tras la estimulación con AA. Eso hace pensar que la síntesis *de novo* de ácidos grasos pueda estar estimulada y ser la responsable del aumento de TAG y CE para la formación de LD.

E.1.3. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO ACTIVA LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS *DE NOVO* DE ÁCIDOS GRASOS EN MONOCITOS HUMANOS

La síntesis *de novo* de ácidos grasos es un proceso anabólico altamente regulado que se produce en el citoplasma, por el cual las células pueden sintetizar ácido palmítico (16:0) a partir de acetil-CoA proveniente de múltiples procesos celulares, mediante una serie de reacciones secuenciales que incluyen la acción de las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC) y sintasa de ácidos grasos (FAS) (Figura E.1). Esta ruta forma parte de un proceso global mayor llamado lipogénesis *de novo*, una ruta metabólica no reversible que se activa cuando la disponibilidad de glucosa en el organismo supera sus necesidades de forma prolongada (267-269).

La ACC cataliza la carboxilación dependiente de biotina de acetil-CoA dando lugar a malonil-CoA, que a la postre es la molécula que cede 2 carbonos en la síntesis de ácido palmítico por la FAS. En mamíferos hay 2 enzimas ACC, la ACC α y ACC β , siendo la primera, codificada por el gen *ACACA*, la implicada en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (267, 268). La FAS, codificada por el gen *FASN*, es una proteína multifuncional con 6 dominios catalíticos distintos más una proteína transportadora de acilos que transporta el sustrato entre esos dominios, que cataliza la elongación de acetil-CoA (2 carbonos) a ácido palmítico (16 carbonos) dependiente de NADPH como cofactor, mediante 7 ciclos repetidos usando malonil-CoA como sustrato (269). Aunque cada proteína FAS tiene todos los elementos para la síntesis del ácido palmítico, sólo es funcional cuando se presenta en forma de homodímero (270) (Figura E.1).

Por PCR cuantitativa se estudiaron los niveles de expresión génica de esas enzimas, encontrándose aumentos de ambas tras el tratamiento con AA. Además, el incremento de la transcripción del gen de la ACC α , se tradujo en cambios de su actividad catalítica, como se comprobó usando su inhibidor TOFA. La elección del inhibidor químico de la ACC en vez del de la FAS se debe a que su actividad catalítica es mucho menor, considerándose que la ACC es la enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos (267). De hecho, es considerada una enzima clave para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, donde la síntesis de ácidos grasos suele estar disparada (268).

El ácido palmítico sintetizado *de novo*, al igual que cualquier ácido graso de la célula, puede sufrir posteriores reacciones de elongación y desaturación por enzimas de la familia de las proteínas unidas a membranas, localizadas en el retículo endoplásmico y que pueden presentar distintos patrones de expresión y afinidad por sustratos. Su

elongación hacia ácido esteárico (18:0), otro de los que más aumenta en LD al tratar con AA, es llevada a cabo por la elongasa de ácidos grasos de cadena muy larga 6 (ELOVL6) (177, 271) (**Figura E.1**), cuyos niveles de transcripción también aumentan al estimular con AA. Además, el 18:0 puede ser desaturado mediante la esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD-1, codificada en humanos en el gen *SCD*), una Δ^9 -desaturasa que lo convierte a ácido oleico (18:1 n -9) (177) (**Figura E.1**), otro de los ácidos grasos que aumenta en TAG y CE, lo cual es coherente con el incremento de sus niveles de transcripción, así como la bajada de la formación de sus productos al usar su inhibidor específico Cay10566.

La regulación a nivel transcripcional de ACC α , FAS, ELOVL6 y SCD-1 es llevada a cabo esencialmente por el factor de transcripción de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP-1c) (**Figura E.1**), que junto a SREBP-1a y SREBP-2 controlan la expresión de hasta 33 genes del metabolismo lipídico, incluyendo la suya misma (267-269, 272-274). Debido a ello, también se observa un aumento de la transcripción del gen codificante para SREBP-1c (*SREBF1*) y para SREBP-2 (*SREBF2*) tras el tratamiento con AA. Mientras que SREBP-1c controla la síntesis *de novo* de ácidos grasos en respuesta a estímulos lipogénicos (su isoforma por transcripción alternativa SREBP-1a está constitutivamente expresada y se encarga de mantener un nivel basal de síntesis de lípidos), SREBP-2 controla los genes que regulan la síntesis de colesterol (272-274), lo cual sería concordante con los incrementos en los niveles de CE observados tras el tratamiento con AA. El uso del inhibidor de ambos fatostatin (276), que impide que su proteína accesoria SCAP (SREBP *cleavage-activating protein*) escolte al SREBP inmaduro desde el RE hacia el Golgi, donde se produce su activación proteolítica que lo convierte en su forma nuclear madura (**Figura E.1**), hace descender los niveles totales de TAG, pero sin alcanzar significación estadística.

Que esa bajada de la masa total de TAG no sea más pronunciada a pesar del uso del inhibidor fatostatin puede deberse a que la ACC y la FAS, además de ser reguladas transcripcionalmente por la translocación de SREBP en su forma madura al núcleo, también pueden ser reguladas por fosforilación o de forma alostérica, en procesos controlados por distintas hormonas, moléculas de señalización celular o nutrientes. Por ejemplo, la ACC α presenta 8 residuos de fosforilación, que al ser fosforilados por quinasas como la AMPK o la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, reducen su actividad catalítica. La insulina induce la desfosforilación de la ACC α , mientras que el glucagón o la epinefrina actúan de forma contraria (268). Además, esta proteína puede ser alostéricamente activada por citrato y reprimida por ácidos grasos de cadena larga (268). Otros factores de transcripción también pueden regular la expresión de ACC y FAS (267-269). Por tanto, cualquiera de estos mecanismos podría ser activado por el AA y estar

manteniendo parte de la actividad de las enzimas lipogénicas en presencia de fatostatín, explicando que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos sea solamente parcial. Mecanismos sinérgicos durante la lipogénesis implicando varios factores de transcripción han sido observados en adipocitos en diferenciación (319).

Paradójicamente, está ampliamente aceptado que los ácidos grasos de cadena larga son agentes inhibitorios de la lipogénesis *de novo* (267-269). De forma más concreta, el AA inhibe la transcripción de genes codificantes de enzimas implicadas en lipogénesis *de novo* como ACC α y FAS en hepatocitos (320, 321). Además, la suplementación con AA reduce la actividad SCD-1 en distintos tipos celulares (184, 322, 323). El hecho de que en este trabajo el AA produzca un efecto totalmente contrario puede deberse a que en la bibliografía el AA se usa a tiempos mucho más largos (≥ 24 horas) por lo que la incorporación del ácido graso a la célula puede estar produciendo una supresión de la lipogénesis *de novo* mediante un efecto puramente competitivo, al incorporar la célula una gran cantidad de lípidos externos. Sin embargo, en este trabajo, el AA, y más aún en presencia de TC, donde no se incorpora a los lípidos celulares, estaría realizando un efecto señalizador y estimulando la lipogénesis *de novo*, al no tener la célula un exceso de ácidos grasos que le haga activar sus mecanismos inhibitorios sobre una mayor síntesis de lípidos. La activación de ciertas rutas de señalización celular a pesar de la no incorporación del propio ácido graso apoyaría esta teoría.

El hecho de encontrar la lipogénesis activada en un modelo de formación de monocitos espumosos, es concordante con muchos otros que describen que tanto la formación de LD, como la lipogénesis *de novo* están activadas en enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico como diabetes tipo 2, aterosclerosis o esteatosis hepática (191, 198, 200, 268, 324, 325). De hecho, se ha empezado a considerar que la intervención de las vías metabólicas de síntesis de ácidos grasos, así como de β -oxidación, puede ser una interesante diana farmacológica para el tratamiento y prevención de estas enfermedades (326).

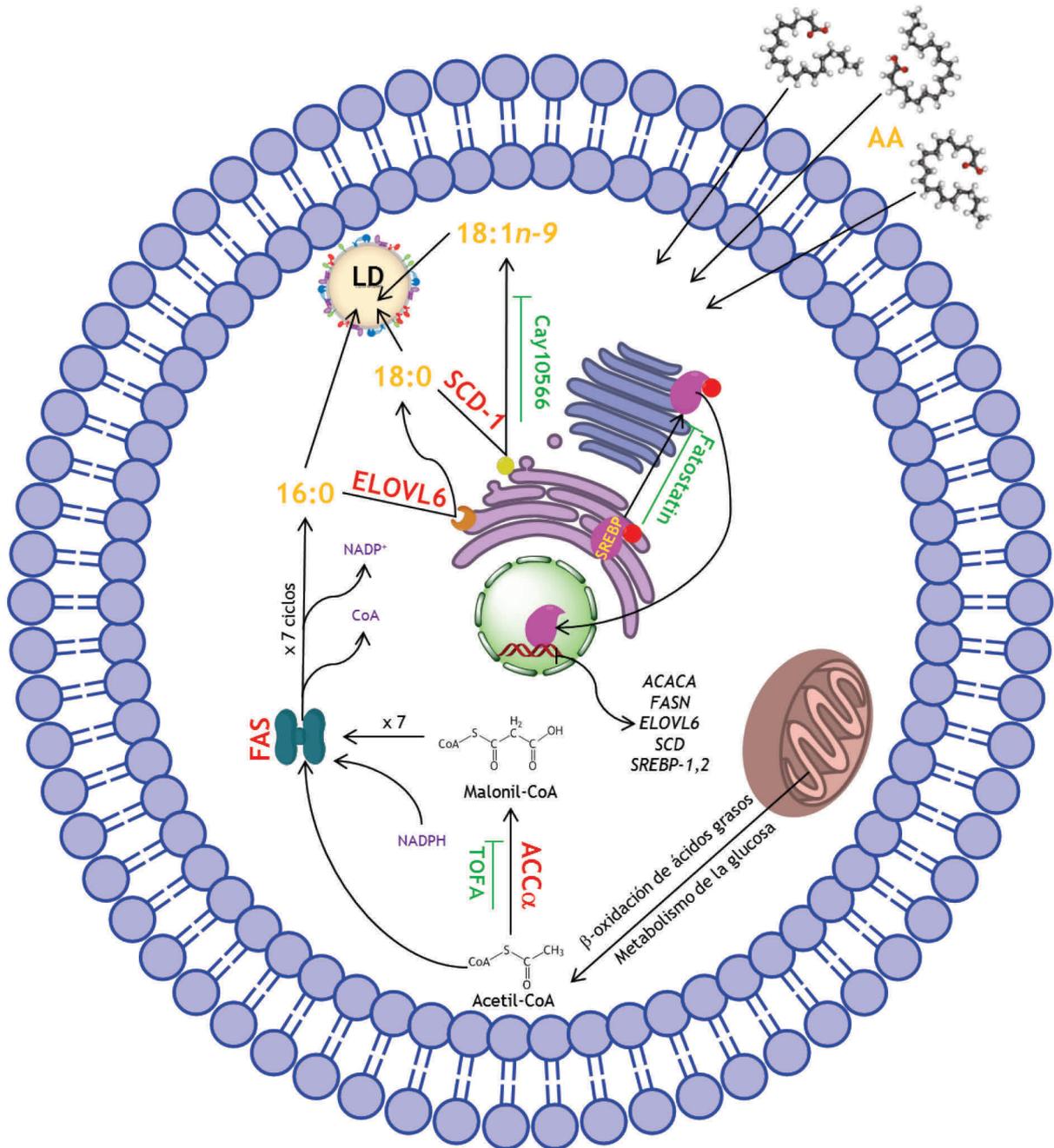


Figura E.1. El AA estimula la *síntesis de novo* de ácidos grasos. Ante el tratamiento con AA exógeno, la enzima citosólica FAS elonga una molécula de acetil-CoA proveniente de distintos destinos celulares hacia 16:0 usando malonil-CoA como fuente de carbonos mediante 7 ciclos repetidos. El 16:0 puede elongarse en el retículo endoplásmico hacia 18:0 mediante la enzima ELOVL6, que a su vez puede ser desaturado hacia 18:1n-9 por la enzima SCD-1. Esos ácidos grasos sintetizados *de novo* se incorporan a los lípidos neutros almacenados en las gotas lipídicas que se forman. La lipogénesis *de novo* está controlada por los factores de transcripción SREBP. En verde aparecen los inhibidores usados en el trabajo, y el punto de la ruta de biosíntesis en el que actúan.

E.1.3.1. INFLUENCIA DE LA INHIBICIÓN DE LAS ACSL CON TRIACSINA C EN LA SÍNTESIS *DE NOVO* DE ÁCIDOS GRASOS

Mención aparte merece el efecto que la TC tiene sobre la incorporación de los ácidos grasos sintetizados *de novo* en el citoplasma a los lípidos neutros para la formación de LD. Tras su acción catalítica que incluye más de 50 reacciones, la FAS libera al citoplasma ácido palmítico en su forma libre (270). Antes de incorporarse a cualquier lípido, ser β -oxidado, sufrir elongaciones y/o desaturaciones o palmitoilar ciertas proteínas, el ácido graso libre ha de ser activado mediante su tioesterificación a coenzima A, reacción dependiente de ATP y Mg^{2+} que es llevada a cabo por la familia de las acil-CoA sintetasas (ACS). La principal sub-familia de ACS son las acil-CoA sintetasas de cadena larga (ACSL), pues sus sustratos son ácidos grasos de entre 16 y 22 carbonos, los mayoritarios en la célula. Hay 5 ACSL en humanos (1, 3, 4, 5, 6) cada una con varias isoformas resultado del procesamiento alternativo, dando lugar a un total de 13 enzimas (327) (**Figura E.2**). La triacsina C inhibe las isoformas ACSL1, 3 y 4, luego dado que es la ACSL4 la que presenta mayor preferencia por activar AA, y que la ACSL3 en menor medida y la ACSL1 en macrófagos también están implicadas en el metabolismo de AA (144, 263), es fácilmente explicable su efecto inhibitorio en la incorporación de AA exógeno del tratamiento a los lípidos celulares, especialmente TAG. De hecho, la TC se considera un inhibidor específico de las araquidonoil-CoA sintetasas. El AA también puede ser sustrato para la ACSL6, no inhibible por TC, pero su afinidad es baja y esa isoforma se expresa sobre todo en cerebro y levemente en monocitos (144, 263) (**Figura D.3-A**). Por otra parte, el ácido palmítico que se sintetiza *de novo* y que bien por sí mismo o tras su conversión en otros ácidos grasos (18:0, 18:1 n -9, etc.) es el principal componente de los LD que se forman tras el tratamiento con AA, también ha de ser activado previamente, siendo la ACSL1 y en menor medida la ACSL5 las que han mostrado una mayor afinidad para la síntesis de palmitoil-CoA (144, 263). Como se muestra en la **Figura D.3-C**, la TC reduce un 70 % la incorporación de 16:0 exógeno a TAG, lo cual es coherente con la inhibición de la ACSL1 por la TC, siendo la ACSL5 la que permitiría esa incorporación de 16:0 exógeno de un 30 % aproximadamente. De modo análogo, el 16:0 citoplasmático producido por síntesis *de novo* debería también sufrir una bajada importante de su incorporación a los TAG celulares (al igual que el resto de ácidos grasos que dependen de su metabolismo) al preincubar con TC, pues se impediría la formación de palmitoil-CoA catalizada por la ACSL1. Sin embargo, en la **Figura D.3-D** se puede observar que la presencia de TC no varía los niveles de 16:0 incorporados a TAG tras el tratamiento con AA. La explicación a este sorprendente resultado puede venir dada por la teoría propuesta

desde el grupo dirigido por Coleman que, basándose en la gran cantidad de isoformas de ACSL, presentando muchas preferencia por el mismo sustrato, sus distintos patrones de expresión y localización subcelular, y sobre todo, los destinos metabólicos tan distintos del acil-CoA, que van desde β -oxidarse en la mitocondria a incorporarse a moléculas de TAG en el retículo endoplásmico, propone que cada isoforma de ACSL estaría segmentando los reservorios celulares de acil-CoA y lanzándolos por rutas metabólicas distintas mediante mecanismos que aún se desconocen (263, 328-330) (**Figura E.2**). Esa teoría se ha basado en múltiples trabajos que han demostrado que la inhibición de ciertas formas de ACSL bloquea unas rutas metabólicas de utilización de ácidos grasos y no otras. De especial interés para la explicación de los resultados resulta el trabajo que muestra que ante el tratamiento con ácidos grasos externos, la TC inhibe la síntesis *de novo* de PL, TAG, DAG y CE a partir de glicerol-3 fosfato y colesterol libre, pero no inhibe la formación de PL mediante reacilación de lisofosfolípidos, poniendo de manifiesto que hay al menos dos reservorios celulares de acil-CoA, uno inhibible por TC y otro que no lo es, que no se mezclan dentro de la célula y que pueden ser selectivamente usados por distintas aciltransferasas (264). Algo similar podría estar pasando con el ácido palmítico que se añade externamente a la célula para hacer el ensayo de actividad de la **Figura D.3-C**, comparado con el producido por síntesis *de novo*; mientras que el primero estaría en gran parte siendo tioesterificado por alguna ACSL dependiente de TC (probablemente la ACSL1), el segundo estaría siendo activado por alguna ACSL no inhibible por TC (probablemente la ACSL5) antes de convertirse en otros ácidos grasos o incorporarse hacia TAG y CE, y por ello, su formación tras el tratamiento con AA sería independiente de la presencia de triacsina C en el sistema. Otra interpretación a la que es susceptible esta teoría es que al estar las ACSL localizadas en distintos compartimentos subcelulares según la ruta metabólica a la que se vaya a lanzar el acil-CoA formado, no todas ACSL sean accesibles para la triacsina C, lo cual explicaría que estuviese inhibiendo unas rutas metabólicas y no otras. Aunque falta por probar directamente esta teoría de la compartimentación de las fracciones celulares de acil-CoA, las evidencias experimentales que se han demostrado hasta hoy, hacen que cada día sea un concepto más aceptado y atractivo en el campo del metabolismo lipídico.

DISCUSIÓN

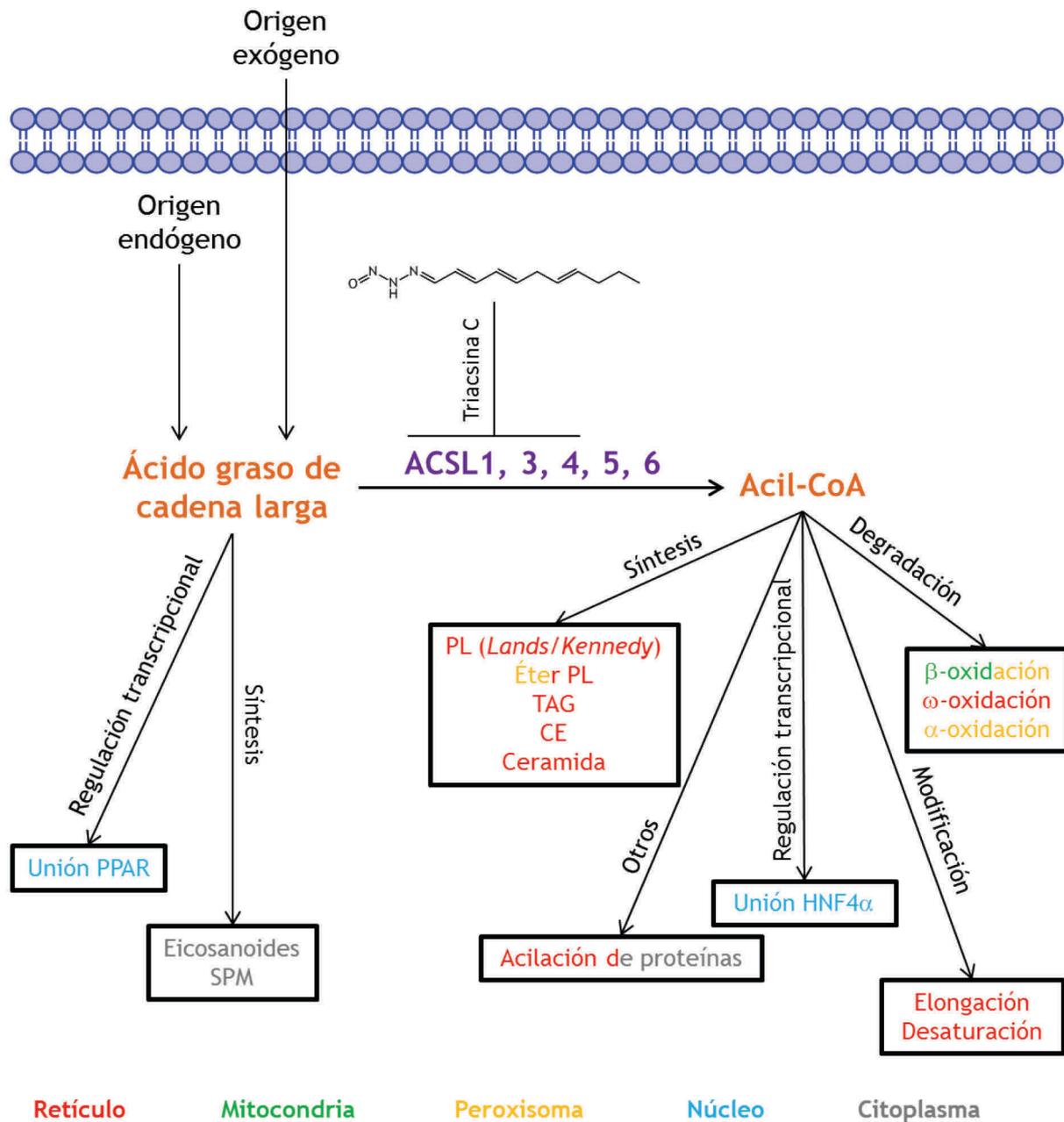


Figura E.2. Destinos metabólicos de los ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga son activados a acil-CoA mediante una de las isoformas de las acil-CoA sintetetas de cadena larga (ACSL). Los ácidos grasos libres son ligando de los receptores nucleares PPAR y ciertos ácidos grasos poliinsaturados como el AA, EPA o DHA pueden ser metabolizados hacia un gran número de moléculas bioactivas. Los acil-CoA pueden ser ligandos transcripcionales, sustratos para distintos tipos de oxidación, sufrir elongaciones y desaturaciones, ser incorporados a lípidos más complejos y ser usados para acilar proteínas. Adaptado de Grevenoged *et al.* (263).

HNF4α: Factor nuclear de hepatocito 4 alfa. SPM: Mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación.

En colores aparece la localización subcelular en la que tienen lugar estos procesos. Si son varias se indica en 2 colores.

E.1.4. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO QUE RESULTA EN LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA cPLA₂α POR UNA ACCIÓN CONJUNTA DE JNK Y p38

E.1.4.1. RUTAS DE ACTIVACIÓN DE LA cPLA₂α EN LA SÍNTESIS DE LD

Los resultados presentados muestran que el AA exógeno activa las rutas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) de p38 y JNK, que mediante un efecto sinérgico llevan a cabo la fosforilación del residuo Ser⁵⁰⁵ de la cPLA₂α resultando en la activación de la misma, cuyo efecto es necesario para la síntesis de LD.

Es conocido que la fosforilación de la cPLA₂α es llevada a cabo por las familias de MAPK, variando según el tipo celular y estímulo. Entre ellas están las quinasas reguladas por señales extracelulares p42 y p44 (ERK-1 y ERK-2), las quinasas p38 o las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (144). Parece que esa fosforilación de la cPLA₂α ocurre mucho antes de que las células comiencen a sintetizar los LD en respuesta al estímulo y su inhibición bloquea la formación de estos orgánulos de forma ostensible en varios modelos celulares además del presentado en este trabajo (35-38, 56, 143, 158, 278). De hecho, en muchos casos, la fosforilación de la cPLA₂α en su residuo Ser⁵⁰⁵, además de ser necesaria, resulta suficiente para la formación de LD bajo ciertos estímulos de estrés celular, incluso sin aumento de los niveles intracelulares de Ca²⁺ (36). Esto es consistente con los trabajos que muestran que patógenos como bacterias, hongos o virus, que son reconocidos por TLR y pueden activar las vías de señalización de las MAPK y la cPLA₂α en células inflamatorias en ausencia de aumentos sostenidos de Ca²⁺ intracelular (131, 331, 332) son potentes inductores de LD en esas células (3, 74, 77, 79, 81). Esta formación de LD va acompañada de la translocación de la cPLA₂α a la superficie de los orgánulos, desde donde puede regular y/o amplificar la respuesta inflamatoria de estas células mediante la liberación del AA presente en los PL de su monocapa (78, 83).

Aunque en este trabajo se ha demostrado que son p38 y JNK, pero no ERK, las MAPK activadas por el AA exógeno, contribuyendo ambas a la fosforilación de la cPLA₂α y síntesis de LD, otros han descrito que la adición de suero a células en cultivo provoca la rápida activación de las 3 rutas de señalización de las MAPK, aunque sólo la activación de JNK estaría contribuyendo a la fosforilación de la cPLA₂α en el residuo Ser⁵⁰⁵ (35). Además, la inducción de LD por suero también induce la activación de la enzima ceramida quinasa

(CERK), dando lugar a un aumento de los niveles de ceramida-1 fosfato, que estaría regulando la activación de la $cPLA_2\alpha$ (143). Curiosamente, la bajada de expresión de la CERK no sólo impide la fosforilación de la $cPLA_2\alpha$ y consecuente síntesis de LD, sino que también impide la activación de la ruta de JNK (56, 143), sugiriendo que con independencia de cualquier efecto directo de la ceramida-1 fosfato sobre la $cPLA_2\alpha$ debido a su carácter aniónico (154), este mediador lipídico podría estar regulando otros eventos que ocurren anteriormente en la ruta de activación de la fosfolipasa.

En el trabajo presentado, además de JNK, se observa que p38 también tiene un efecto sobre la fosforilación de la $cPLA_2\alpha$ en la Ser⁵⁰⁵. La inhibición de una de las rutas resulta en la reducción de los niveles de fosforilación de la $cPLA_2\alpha$, aunque manteniendo valores superiores a los basales, lo cual hace que se sigan sintetizando LD. Sin embargo, la preincubación de las células con los inhibidores de ambas rutas resulta en la completa supresión de todas esas respuestas celulares, lo cual hace pensar que p38 y JNK actúan de forma cooperativa para mediar la activación de la $cPLA_2\alpha$ y síntesis de LD provocadas por el AA. Debido a que ambas quinasas regulan la fosforilación de la fosfolipasa en el mismo residuo, es tentador pensar que los efectos podrían deberse a la fosforilación de una enzima que actúe aguas abajo de ambas MAPK y que posteriormente activase la $cPLA_2\alpha$ en el residuo Ser⁵⁰⁵ llevando a la síntesis de LD. Esta situación sería análoga a la propuesta en cardiomiocitos estimulados con ATP, en los que se ha descrito que la inhibición de la quinasa activada por mitógenos y estrés 1 (MSK-1), una enzima que es fosforilada/activada por p38 y ERK1/2 al mismo tiempo, resulta en la inhibición de la activación celular dependiente de la $cPLA_2\alpha$ (333), proponiendo que MSK-1 es quien primero recibe la fosforilación de p38 y ERK1/2 y luego activa la $cPLA_2\alpha$. Efectos sinérgicos similares de p38 y ERK1/2 en la activación de la $cPLA_2\alpha$ se ha encontrado en condrocitos estimulados también con ATP, aunque sin demostrar la implicación de la MSK-1 en la activación de la $cPLA_2\alpha$ (334). Por otra parte, en células renales se ha observado que p38 y JNK son las MAPK encargadas de mediar el efecto biológico producido por la $cPLA_2\alpha$ (335), de forma análoga a este trabajo.

En resumen, con los datos que se tienen, aunque cabe la posibilidad de que p38 y JNK estén activando una quinasa intermedia que a su vez regule la activación de la $cPLA_2\alpha$ y la formación de LD, la posibilidad de que p38 y JNK estén fosforilando directamente el residuo Ser⁵⁰⁵ de forma independiente a cualquier otra quinasa no puede ser descartada (**Figura E.3**).

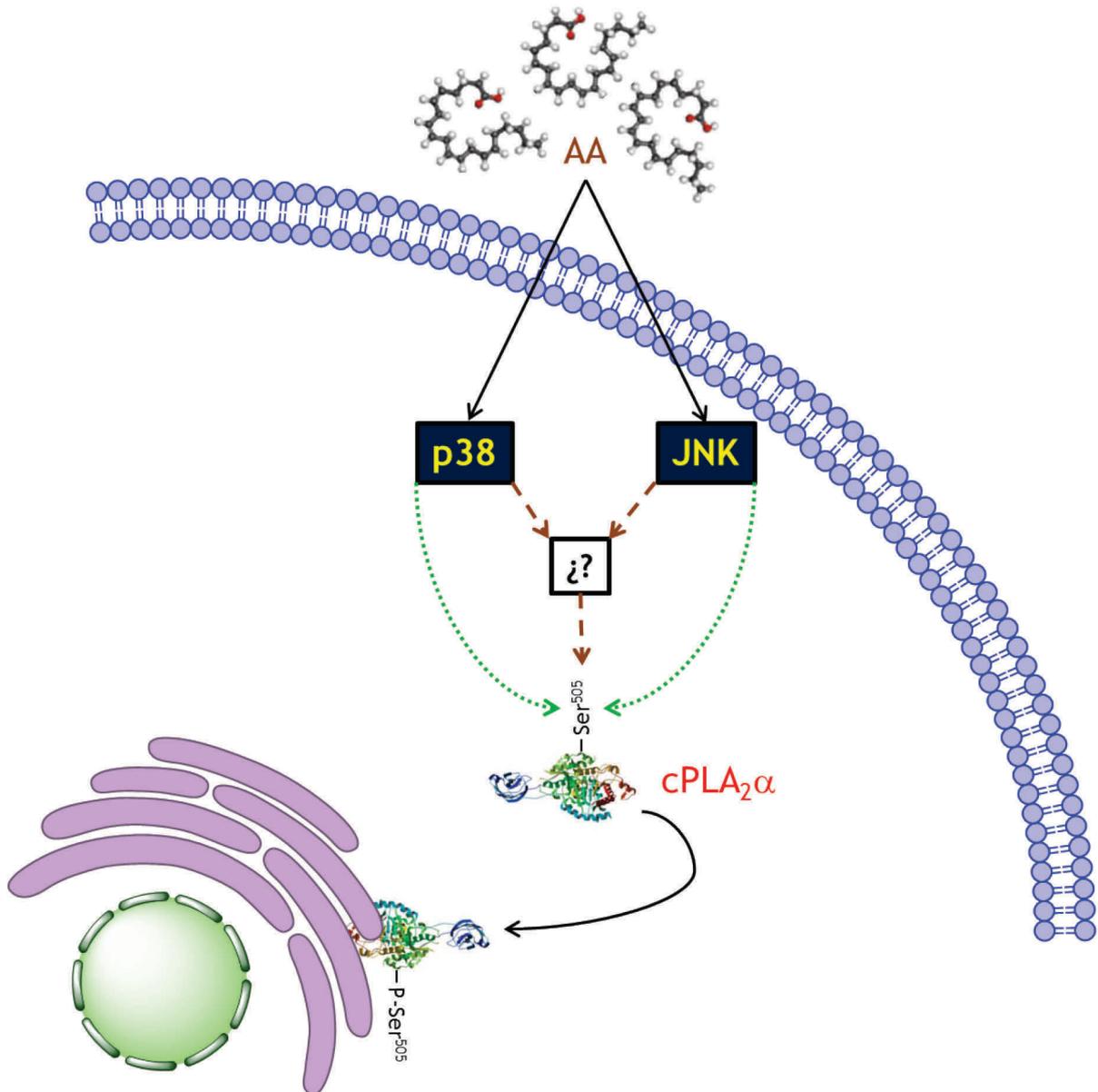


Figura E.3. *Rutas metabólicas sugeridas de activación de la cPLA₂α en la síntesis de gotas lipídicas.* El AA exógeno promueve la activación de las rutas de señalización de p38 y JNK y la fosforilación de la cPLA₂α en su residuo Ser⁵⁰⁵ mediante un efecto sinérgico de ambas. Esa fosforilación puede ser directa, pues se sabe que ambas quinasas fosforilan a la cPLA₂α en ese residuo (flechas verdes), o indirecta, pues JNK y p38 podrían estar fosforilando una quinasa intermedia que sería la última causante de la fosforilación de la fosfolipasa (flechas marrones). La fosforilación de la cPLA₂α en el residuo Ser⁵⁰⁵, junto a otros eventos como el incremento de los niveles de Ca²⁺ o su asociación a lípidos aniónicos, la hace más susceptible a la translocación a membranas intracelulares como las del retículo endoplásmico.

E.1.4.2. MECANISMOS POR LOS QUE LA $cPLA_2\alpha$ REGULA LA SÍNTESIS DE LD

Una vez discutidas las rutas intracelulares de señalización que conducen a la activación de la $cPLA_2\alpha$ y la síntesis de LD, conviene discutir cuáles serían los mecanismos por los que esta enzima, que según un buen número de trabajos (35, 36, 56, 143, 278) resulta necesaria para la formación de LD, actúa dentro de las células. El hecho de que paralelamente a la fosforilación de la $cPLA_2\alpha$ haya un incremento de su actividad catalítica *in vitro* hace pensar que su rol en la formación de los LD podría ser dependiente de su actividad fosfolipasa A_2 . Como ya se comentó, no hay cambios apreciables en los PL de membrana tras la estimulación con AA, por lo tanto su función no es proveer ácidos grasos de membranas para la formación de LD, como ocurre en otros casos (36, 38, 317), sino que parece que podría ser llevar a cabo ciertas funciones de remodelado de fosfolípidos en el retículo endoplásmico que, en términos biofísicos, ayuden al nacimiento del orgánulo.

De forma general, las PLA_2 se translocan a diversas membranas celulares tras la activación celular, donde además de su función clásica en el control de los niveles de AA libre, pueden, por ejemplo, regular la forma y curvatura del retículo endoplásmico y el Golgi mediante el control de la proporción entre PL y lisofosfolípidos de sus membranas, permitiendo a esos orgánulos ejercer de forma correcta sus funciones celulares como la formación de túbulos membranosos en el Golgi, el transporte de vesículas desde el retículo al Golgi, procesos de fisión de membranas o exocitosis (146, 148, 336, 337). Análogamente, en los monocitos tratados con AA, la $cPLA_2\alpha$ se translocaría a las membranas del retículo endoplásmico liso, y podría estar ejerciendo efectos regulatorios similares en sus membranas al tiempo que se alcanza la concentración crítica de lípidos neutros acumulados (35, 36, 56, 143, 278) (Figura E.4).

La función esencial de la $cPLA_2\alpha$ en la propia formación del orgánulo podría explicarse en términos biofísicos. Una vez que las dos caras de la membrana del retículo se separan debido a la excesiva acumulación de lípidos neutros, se requiere una curvatura positiva en la base de esa membrana para permitir el crecimiento del LD naciente. La membrana del RE está compuesta esencialmente por PC, un fosfolípido que presenta una forma cilíndrica, y cuya acumulación en la membrana hace que tenga una curvatura neutra. Además, la membrana del RE contiene PE en una menor proporción, una clase de fosfolípido que genera una curvatura de membrana negativa (4, 9). Por otra parte, estudios biofísicos han demostrado que la acumulación de lisofosfolípidos, moléculas que presentan una forma de cuña cónica, como liso-PC, liso-PE y liso-PA, inducen una fuerte curvatura positiva local en las zonas de la membrana dónde se acumulan, lo cual es

favorable en términos de brote del orgánulo (4, 9, 39, 40, 338-340). Dado que los lisofosfolípidos son generados por PLA₂, parece que la cPLA₂α podría regular la formación de los LD en este punto de su biosíntesis (**Figura E.4**).

Además, la síntesis de nuevos PL para el correcto mantenimiento de la proporción fosfolípidos/lípidos neutros durante el crecimiento del orgánulo requiere la coordinación de numerosas enzimas involucradas tanto en la síntesis de PL *de novo*, como en la reacilación de los lisofosfolípidos anteriormente sintetizados (23, 40), proceso en el que las PLA₂ también están directamente implicadas (144, 341). En este sentido se ha descubierto que las moléculas de PC de la monocapa de los LD están más enriquecidas en ácidos grasos monoinsaturados que las de la membrana del retículo (9), lo cual pone de manifiesto la gran importancia del reciclado de ácidos grasos en fosfolípidos para lograr la correcta composición en este punto de la síntesis de los LD (**Figura E.4**).

La estabilización de la monocapa del LD creciente requiere la reacilación de los lisofosfolípidos de forma cónica formados anteriormente, para dar lugar a PL con forma cilíndrica. Estas reacciones son llevadas a cabo por enzimas como las lisofosfolípido aciltransferasas dependientes de CoA, algunas de las cuales también han sido asociadas a LD (24, 39, 40) (**Figura E.4**).

Finalmente, la generación de la curvatura negativa en la base del LD naciente antes de ser liberado viene dada por la biosíntesis de PA, cuya acumulación local genera de forma espontánea una fuerte curvatura negativa (4, 339). El PA puede ser generado por varias vías metabólicas que incluyen la acción de la fosfolipasa D, enzima que ha sido implicada en la síntesis de los LD, probablemente mediante su acción sobre el control de los niveles de PA (10, 11) (**Figura E.4**). Además, la lipina-1, una fosfohidrolasa de PA, se ha encontrado asociada a los LD (26) y su inhibición también influye en la formación de los orgánulos (26, 27). Mientras que estos efectos de la lipina-1 se piensa que son debidos a su control sobre los niveles de PA, el descubrimiento de que esta enzima regula la activación de la cPLA₂α (26) hace que esta última también pueda ser importante en la formación de las gotas lipídicas en este punto de su biosíntesis.

El hecho de que el uso de pirrofenona inhiba la síntesis de LD visibles, pero deje niveles de TAG mayores que en los controles indicaría que cuando la cPLA₂α permanece inhibida la célula sigue sintetizando lípidos neutros en cierta medida, probablemente para acomodar los ácidos grasos sintetizados *de novo* que se están formando, pero al no poder formar el LD, esos lípidos neutros se quedarían en el retículo de forma dispersa. Además, el uso de los inhibidores de p38 o JNK por separado, aunque no cambia los niveles de lípidos neutros producidos por el AA, da lugar a unas estructuras microscópicas distintas a las que aparecen en las células control, presentando una forma más dispersa y menos

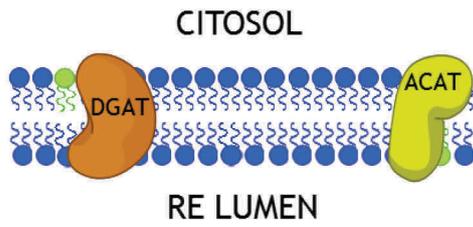
punteada. Análogamente, se ha observado que la inhibición de la actividad de la $cPLA_2\alpha$ por varias vías resulta en la ablación de la síntesis de LD sin cambiar los niveles celulares de lípidos neutros (de hecho pasan de localizarse en el citoplasma dentro de los LD a estar asociados a membranas) y dando lugar a estructuras túbulo-vesiculares aberrantes en las membranas del retículo, señal de acumulación de lípidos neutros sin formación de LD (35). Además, la inhibición de otras enzimas que intervienen en los cambios biofísicos de membrana durante el nacimiento del orgánulo como son la lipina-1 (26, 27) o las LPCAT (342) resulta en cambios del tamaño y número de los LD sin provocar cambios en los niveles de TAG. De igual manera, el silenciamiento del ortólogo de la lipina-1 en levaduras también resulta en una bajada de la formación de LD, sin cambios en los niveles de lípidos neutros, provocando su acumulación en el retículo (343). Finalmente, cambios en la composición de los PL de membrana en células epiteliales mamarias se han relacionado con variaciones en el tamaño y secreción de LD, sin cambios en su contenido de TAG (344). Colectivamente, estos resultados apoyan que la síntesis de lípidos neutros es un evento necesario, pero no suficiente, para la formación de LD y que enzimas como la $cPLA_2\alpha$ son necesarias para la síntesis de LD actuando a nivel de remodelación de los fosfolípidos del retículo endoplásmico liso, donde se cree que nacen estos orgánulos (Figura E.4).

Curiosamente, la fosforilación de la $cPLA_2\alpha$ en el residuo Ser⁵⁰⁵ también se requiere para la translocación de la enzima a los fagosomas en macrófagos expuestos a estímulo fagocítico (147). Dado que se ha encontrado una estrecha asociación entre los LD y el fagosoma en células inmunes activadas (79), es posible que la $cPLA_2\alpha$ juegue papeles regulatorios similares en la maduración del fagosoma de los que juega en el nacimiento de los LD en células inmunoinflamatorias.

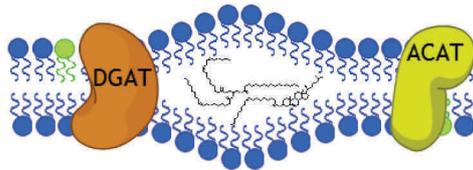
Figura E.4. *Mecanismos por los cuales la $cPLA_2\alpha$ podría regular la biosíntesis de gotas lipídicas.* La inducción de una curvatura de membrana positiva en la base del retículo endoplásmico liso mediante el control de la proporción PL/lisofosfolípidos por la $cPLA_2\alpha$ se indica en el paso 3. La $cPLA_2\alpha$ también podría regular el nacimiento de LD en otros puntos de su biosíntesis. Para más detalles ver el texto.

Los lisofosfolípidos están dibujados en rosa, el ácido fosfatídico en verde y el resto de fosfolípidos en azul.

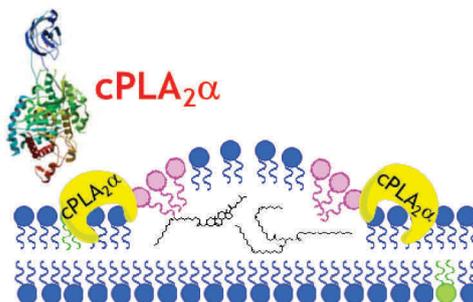
1. ESTRUCTURA NORMAL DEL RE



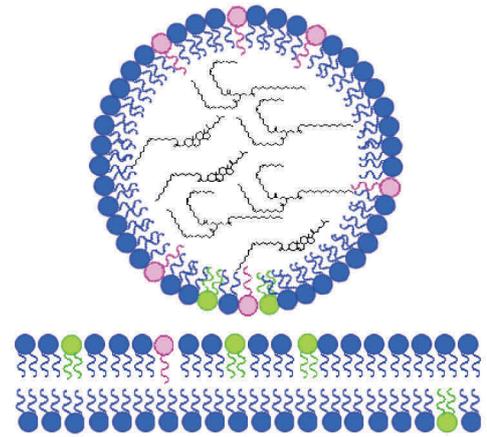
2. SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS



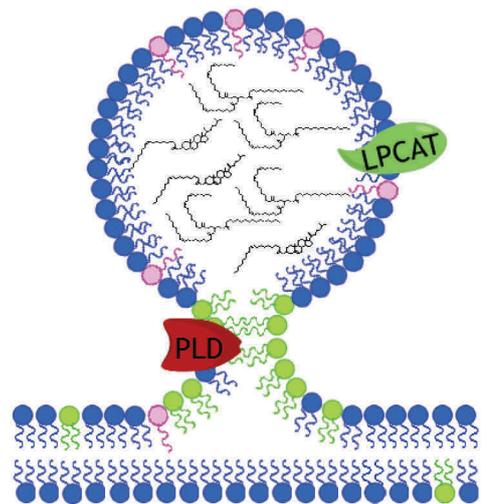
3. CURVATURA POSITIVA LOCAL EN LA BASE



6. GOTA LIPÍDICA NACIENTE



5. CURVATURA LOCAL NEGATIVA



4. SÍNTESIS Y REMODELADO DE FOSFOLÍPIDOS

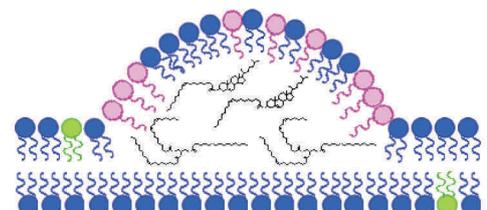


Figura E.4. Mecanismos por los cuales la $cPLA_2\alpha$ podría regular la biosíntesis de gotas lipídicas. Descripción de la figura en página anterior.

E.1.5. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INDUCE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS NEUTROS EN MACRÓFAGOS HUMANOS Y MONOCITOS U937

Los macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica son actores clave en la aterosclerosis a todos los niveles, desde la formación inicial de la estría grasa mediante la acumulación de LD ricos en CE en su interior convirtiéndose en células espumosas, a la generación de un núcleo necrótico dentro de la placa de ateroma en lesiones avanzadas cuando entran en apoptosis, pasando por la continua generación de citoquinas proinflamatorias (89-92).

Mediante el uso de monocitos diferenciados *in vitro* durante 7 días con 5 % suero humano se intentó estudiar si los efectos que el AA tiene en la formación de lípidos neutros en monocitos circulantes eran reproducibles en macrófagos maduros, células más semejantes a las células espumosas. Aunque la inducción es menor que para los monocitos, se observa que el AA en presencia de TC provoca la formación de TAG y sobre todo CE en estos macrófagos, probablemente también mediante la estimulación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, pues son los ácidos grasos producidos por esta vía los que más aumentan con el tratamiento. Aun así, la exposición de macrófagos ya extravasados a ácidos grasos libres no parece ser el mecanismo principal que tienen para acumular lípidos, pues en ese caso, la simple presencia de lipoproteínas del suero durante los 7 días de cultivo *in vitro* (Figura D.2, Figura D.17-B), así como las lipoproteínas modificadas durante el mismo tiempo (345) inducen la acumulación de muchos más lípidos neutros (TAG en el primer caso y CE en el segundo) y LD que los que induce el AA libre.

En la línea celular U937 se observa un comportamiento similar a los monocitos, pero a tiempos largos, en los cuales el AA también induce la síntesis de lípidos neutros de forma independiente a la propia incorporación del ácido graso. El hecho de que la síntesis de lípidos neutros comience en el momento en el que el AA alcanza valores de saturación en los PL es análogo a lo descrito para la velocidad de remodelado de AA en estas mismas células U937, cuya respuesta biológica se iguala a la de los monocitos primarios sólo cuando se enriquecen sus PL con AA (286).

La ausencia de TC en el tratamiento en estos experimentos se justifica porque su inclusión no permitiría al AA incorporarse a los PL hasta saturar su contenido. Además la incorporación del AA a TAG a pesar de la ausencia del inhibidor es mínima y el aumento en el TAG total se debe esencialmente al incremento de los otros ácidos grasos presentes.

E.1.6. LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD OXIDADAS INDUCEN UN AUMENTO MÁS MODERADO DE LÍPIDOS NEUTROS EN MONOCITOS HUMANOS

Se ha determinado que las LDL oxidadas inducen la formación de lípidos neutros en monocitos circulantes, pero en menor medida de lo que lo hace el AA. La concentración a la que se usa la oxLDL es la estándar para experimentos similares y se eligió el tiempo de 2 horas de estimulación, en primer lugar para poder hacer la comparación directa con la inducción producida por el AA y en segundo lugar porque ya se había visto que a tiempos cortos, de una hora de tratamiento, la oxLDL era internalizada por monocitos circulantes en ratón (108). De esa forma se observó que la oxLDL producía un incremento de los ácidos grasos en TAG y CE que, según la bibliografía, se traducía en la formación de LD (108), aunque bastante más moderado que el que producía el AA en presencia de TC. Es cierto que una gran cantidad de los ácidos grasos poliinsaturados de las LDL se oxidan durante el proceso y eso podría hacer que no fuesen medidos por GC/MS, aunque también lo es que experimentos preliminares no muestran ácidos grasos oxidados incorporados a los lípidos celulares tras el tratamiento. Además, el hecho de que paralelamente al incremento de TAG y CE no exista un aumento de PL, sería coherente con la idea de que no se está minorando la medida de TAG y CE, y hace pensar que a esos tiempos tan cortos, las oxLDL actúan también activando la célula para que sintetice LD y no sólo es internalizado de forma pasiva por la misma, pues en ese caso también mostraría niveles superiores de ácidos grasos en PL.

De forma general, se infiere que los monocitos, que tienen escasos LD basales, responden de forma más rápida y potente al AA libre que a un estímulo más clásico de aterosclerosis como son las LDL oxidadas, probablemente activándose y volviéndose más proaterogénicos (87, 88, 108-111). En ese sentido, el estímulo lipídico fisiopatológico de aterosclerosis más adecuado para los monocitos circulantes sería el AA, pues aunque las lipoproteínas pueden sufrir oxidaciones u otras modificaciones en el torrente sanguíneo, es cuando migran al subendotelio cuando se produce una fuerte oxidación de las mismas por las especies reactivas de oxígeno generadas por las células activadas que intervienen en la aterogénesis, seguida de su internalización por las células que allí se encuentran. En ese caso, es ya el monocito extravasado y diferenciado a macrófago, más cargado de lípidos que el circulante, el que se enfrentaría a las oxLDL, endocitándolas y convirtiéndose en una célula espumosa (288). El hecho de que durante la diferenciación monocito/macrófago se produzca un aumento en la expresión de los receptores *scavenger*

de clase A y clase B, principales receptores por los cuales es internalizada la oxLDL (346) hace pensar que es el AA, u otros ácidos grasos libres en menor medida (87, 88) quienes inducen de forma más potente y rápida la síntesis de LD en monocitos circulantes, convirtiéndoles en lo que ha empezado a denominarse monocitos espumosos (110, 111), promoviendo su activación proinflamatoria y extravasación el sub-endotelio, donde ya con las características fenotípicas de un macrófago maduro empiezan a formar LD por la internalización más lenta de una gran cantidad de lipoproteínas modificadas, acabando de convertirse en una célula espumosa.

E.1.7. OBSERVACIONES FINALES SOBRE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN MONOCITOS HUMANOS

Una de las principales incógnitas de esta parte del trabajo fue determinar si el efecto biológico de formación de LD por la activación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la cPLA₂ α es llevado a cabo por el propio AA o por alguno o varios de sus múltiples metabolitos oxigenados. Es bien conocido que el AA, por tener 4 dobles enlaces, es susceptible de sufrir distintas reacciones de oxigenación por vías enzimáticas (ciclooxigenasas, lipoxigenasas, enzimas citocromo P450) o no enzimáticas que resulten en la formación de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano, lipoxinas o isoprostanos entre otros, compuestos llamados eicosanoides. Estas moléculas presentan múltiples funciones en la respuesta inflamatoria dependiendo del tipo celular, el estímulo o el tiempo de actuación al que llevan a cabo su función, que suele darse de forma paracrina o autocrina a través de distintos receptores específicos (347). Debido a ello es tentador pensar que tras entrar a la célula, el AA pueda sufrir alguna de estas oxidaciones y que alguno de estos productos esté haciendo la función biológica en vez del ácido graso en sí, por ejemplo mediante su unión a los receptores nucleares PPAR, de los que son reconocidos agonistas, y cuya activación se ha implicado con el incremento de la lipogénesis (348) o en la expresión de la translocasa de ácidos grasos de cadena larga CD36 (349). Aunque en la memoria no se muestra, se hicieron experimentos preliminares usando los inhibidores no selectivos de las enzimas citocromo P450 (proadifen) y ciclooxigenasas-1 y -2 (indometacina) sin encontrar ninguna diferencia en la síntesis de LD respecto a los controles tratados sólo con AA, luego parece que el efecto es mediado por el ácido graso en sí y no por sus derivados oxigenados formados por esas vías enzimáticas. Otros trabajos ya apuntaban en ese sentido, siendo el AA exógeno capaz de formar LD incluso en presencia de inhibidores de ciclooxigenasas y lipoxigenasas (35, 78, 85, 316).

Aunque prontamente se descartase que algún producto por oxidación enzimática del AA estuviese involucrado en el efecto biológico del ácido graso, lo que no se puede descartar es que algún producto formado por la oxidación no enzimática espontánea del AA estuviese involucrado en sus efectos biológicos. En ese sentido, se ha observado recientemente en el laboratorio que el AA proporcionado por la casa comercial contenía casi un 20 % de productos oxidados que aumentaban hasta un 35-40 % tras varias semanas desde su apertura, a pesar de estar almacenado en atmósfera inerte y en presencia del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT). Se encontraron hasta 17 productos oxigenados del AA, incluyendo hidróxidos (HETE), epóxidos (EET), hidroperóxidos (HpETE) y cetonas (oxoETE) (350). Aunque no se detectaron grandes diferencias entre experimentos con AA

de distintos días de almacenamiento, bien es cierto que este importante aumento de la fracción oxidada del AA hace que en el futuro pueda estudiarse si alguno de los 17 compuestos, o varios de ellos, tienen actividad biológica en la formación de LD en monocitos humanos. El primer problema de estos experimentos es que al formarse no enzimáticamente incluso en presencia de antioxidantes, no hay inhibidores químicos que permitan disminuir la síntesis espontánea de cada uno de ellos. Pero el mayor problema que presentan estos ensayos es la separación de esos compuestos por cromatografía de líquidos de alta resolución, pues todos ellos son una mezcla racémica de isómeros ópticos, por lo tanto, no sólo se necesita separar unas especies de otras, sino que una vez aisladas se requiere el uso de cromatografía quiral para determinar qué isómero óptico podría presentar la actividad biológica.

En global, los resultados muestran a la $cPLA_2\alpha$ como una enzima central en la formación de LD, cuya deficiencia provoca graves trastornos a la célula a la hora de sintetizar estos orgánulos, incluso aunque tenga los lípidos neutros necesarios para hacerlo. La formación de LD en distintas células es una de las causas de muchas patologías relacionadas con el síndrome metabólico, por ello en un modelo de formación de LD relacionado con los factores de riesgo del síndrome metabólico como es éste, puede pensarse que el control farmacológico de la formación de LD en monocitos y su conversión en monocitos espumosos mediante la regulación de la $cPLA_2\alpha$ podría ser un buen punto para la atenuación del riesgo de aterosclerosis. Curiosamente, estudios hechos en ratones *knockout* de $cPLA_2\alpha$ han determinado que son más resistentes a la acumulación de grasa abdominal (351), así como al desarrollo de esteatosis (142) y fibrosis hepática (352), que sus correspondientes hermanos *wild type* bajo una dieta alta en grasa, incluso sin presentar diferencias en sus niveles de insulina, glucosa, FFA, HDL o colesterol total en el plasma (351). Análogamente a estos estudios, el mismo grupo de trabajo ha encontrado que los ratones *knockout* de $cPLA_2\alpha$ presentan lesiones ateroscleróticas de menor tamaño en la arteria aorta bajo dieta alta en grasa, sin diferencias en los valores séricos de HDL (353). Además, como se comentó en la introducción, la $cPLA_2\alpha$ también parece una enzima clave en la formación de LD en respuesta a oxLDL por parte de los macrófagos ya infiltrados (38, 151, 158). Colectivamente, parece que la falta de $cPLA_2\alpha$ protege a los ratones frente a enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, habiendo fijado con este trabajo uno de los mecanismos por los cuales esta enzima podría estar interviniendo en la iniciación de la aterosclerosis incluso antes de que los monocitos se infiltren al sub-endotelio.

De forma similar, se ha descrito que otras PLA_2 intervienen en la patogénesis de la aterosclerosis, facilitando la internalización de lipoproteínas por los macrófagos y

DISCUSIÓN

promoviendo la acumulación de células espumosas (**Tabla A.2**). De hecho, algunas de ellas han sido exploradas como dianas terapéuticas, y a tal efecto se han desarrollado estudios en pacientes con enfermedad cardiovascular con *varespladib*, un inhibidor de algunas PLA₂ secretadas (354) y *darapladiv*, un inhibidor de la PLA₂ asociada a lipoproteínas (Lp-PLA₂) (355), aunque con resultados poco prometedores hasta el momento.

E.2. 16:1 n -9, UN ÁCIDO GRASO FORMADO POR LA β -OXIDACIÓN DEL ÁCIDO OLEICO, QUE SE ACUMULA EN LÍPIDOS NEUTROS

E.2.1. EL ISÓMERO DEL ÁCIDO GRASO 16:1 QUE AUMENTA EN LÍPIDOS NEUTROS AL ESTIMULAR CON AA LOS MONOCITOS ES 16:1 n -9

Al analizar la composición de TAG y CE incrementados en todas las situaciones experimentales se observaba que había un ácido graso, denominado 16:1, que aumentaba mucho más que los otros, siendo especialmente evidente en los monocitos tratados con AA en presencia de TC, donde los TAG y CE se veían aumentados de media un 265 y 140 % respectivamente, mientras que ese ácido graso aumentaba un 2094 y 908 %, sin sufrir cambios en PL.

Mediante la optimización del protocolo de cromatografía de gases combinada con una derivatización del éster metílico del ácido graso a 4,4-dimetiloxazolina, se determinó que el ácido graso en cuestión era el 16:1 n -9 y que en TAG y CE de monocitos era el único isómero de 16:1 que aparecía. Esto es importante a la hora de establecer marcadores sencillos de formación de monocitos espumosos, pues el gran incremento de este ácido graso en lípidos neutros es paralelo a la formación de LD en monocitos circulantes.

Este descubrimiento parece sorprendente, dado que en la bibliografía no se han encontrado más de 6 artículos, todos epidemiológicos, en los que se mide directamente este ácido graso y se le da cierto sentido biológico, apareciendo en lípidos de eritrocitos y plasma sanguíneo humano (199, 356-360). El problema es que estos trabajos que se mencionan no consiguieron ni una separación cromatográfica ni realizaron una derivatización apropiada para identificar la presencia del ácido graso 16:1 n -9 en plasma y células sanguíneas, que aunque muy probable por lo que se explicará a continuación, no quedaba probada. El estudio lipídico a gran escala del plasma humano realizado por la plataforma *LIPID MAPS* especificaba que en plasma de pacientes sanos, el único isómero 16:1 detectado como ácido graso libre era el 16:1 n -7 (314). Estas medidas se hicieron de forma análoga a las del presente trabajo, pero derivatizando el ácido graso a ésteres de pentafluorobenzilo y usando ionización química, que en principio proporciona una mejor

sensibilidad de detección (361). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el 16:1*n*-9 aparezca esterificado en otros lípidos del plasma, donde el método utilizado para su medida no permite separar entre isómeros (314). Como se especifica en la **Tabla D.2**, se detectó la presencia de 16:1*n*-9 esterificado en los lípidos de suero humano de donantes sanos, junto al isómero mayoritario 16:1*n*-7 e incluso junto a un tercer isómero, el ácido graso 16:1*n*-5. La proporción 16:1*n*-7/16:1*n*-9 medida en lípidos totales de suero humano es de aproximadamente 4.3, en el orden de magnitud de la proporción entre ambos isómeros descrita tanto en PL de plasma, que está entre 4 y 6 (356-358), como en forma de ácido graso libre que es de 2.1 (360).

Con todo ello, debido a la poca información que existe sobre el ácido graso 16:1*n*-9, que podría constituir un buen marcador sanguíneo de formación de LD en monocitos dados sus grandes aumentos, se caracterizaron bioquímicamente su distribución y rutas de biosíntesis, así como sus posibles efectos biológicos.

E.2.2. EL ÁCIDO GRASO 16:1 n -9 SE ACUMULA EN LÍPIDOS NEUTROS DE MONOCITOS HUMANOS DE FORMA BASAL

En monocitos se observa que, mientras que el 16:1 n -7 aparece solamente esterificado en PL, el 16:1 n -9 se encuentra esterificado preferencialmente en lípidos neutros de forma basal, lo cual constituye una diferencia fundamental cuando se compara con el resto de ácidos grasos medidos, que están esterificados de forma preferencial en PL, la clase de lípidos más común en estas células.

Cuando se midieron los valores esterificados totales de este ácido graso se observó que los monocitos tienen unas 3 veces más 16:1 n -9 que 16:1 n -7 contrariamente a la idea general que se tiene de que entre los isómeros 16:1, el ácido palmitoleico suele ser el que aparece en células de forma mayoritaria. El hecho de que en el suero humano, en el que se encuentran los monocitos hasta su extracción, haya 4 veces más 16:1 n -7 que 16:1 n -9, sugiere que en la formación de este último en los monocitos pueda haber un fuerte factor biosintético (sobre la síntesis de 16:1 n -7 ya se sabe que existe, pues proviene de 16:0 por la acción de SCD-1) más allá de la internalización pasiva de las lipoproteínas del suero, que supondría que ambos ácidos grasos se encontrasen dentro de la célula en proporciones similares a las que presentan en el suero.

La incorporación de ambos ácidos grasos a PL, TAG y CE cuando se enriquecen los monocitos con una concentración de 10 μ M es similar para ambos isómeros, incorporándose preferentemente en TAG, probablemente porque sus PL estén saturados de estos ácidos grasos y se active la ruta de síntesis *de novo* de TAG (144, 297-299). Resulta sorprendente que, a pesar de ser la fuente mayoritaria de 16:1 n -9 esterificado, el ácido graso 16:1 n -9 no se incorpore apenas a CE, aunque sí lo hace en mayor medida que el 16:1 n -7, que no se incorpora en absoluto. Los altos niveles basales de la especie CE(16:1 n -9) pueden deberse a que tras su incorporación a TAG o PL, el ácido graso se transaccile de alguna manera hacia colesterol libre, por ejemplo mediante la acción de la encima lecitina:colesterol aciltransferasa (318), reacción que es posible que ocurra a tiempos mayores que las 2 horas que se dejan los ácidos grasos incorporando en estos experimentos. También es posible que, debido al origen endógeno del 16:1 n -9, las enzimas que intervengan en su distribución una vez formado sean distintas a las que permiten su incorporación exógena a los lípidos celulares.

Cuando se hace un análisis pormenorizado de la incorporación de cada ácido graso a cada subclase de PL mayoritaria, se observa que el 16:1 n -7 tiene preferencia a incorporarse en PC, mientras que el 16:1 n -9 se incorpora más rápidamente en PA. Ya se

había demostrado que el ácido palmitoleico se incorporaba a especies de PC, PE, PI, PS y PG en fibroblastos de ratón (210), pero nada se sabía sobre la incorporación del 16:1*n*-9 a estos PL. Estas diferencias podrían tener algún tipo de relevancia fisiopatológica, pues mientras que PC es un fosfolípido esencialmente estructural, PA tiene un rol más señalizador y metabólico en la célula, y es precursor de uno de los principales destinos del 16:1*n*-9 que son los TAG, además de otros PL. Curiosamente, aunque son cambios muy ligeros, las dos clases de fosfolípidos que, además de PC, se forman a partir de DAG, que son PE y PS, se enriquecen más en 16:1*n*-7; mientras que las dos clases de PL que se forman a partir de PA, que son PI y PG están más enriquecidas en 16:1*n*-9 que en ácido palmitoleico, lo cual apuntaría a que estas diferencias observadas en la incorporación a las distintas clases de fosfolípidos podría tener cierto significado biológico en la acción de ambos ácidos grasos, aunque se requiere una investigación más profunda para afirmarlo taxativamente.

E.2.3. EL ÁCIDO GRASO 16:1*n*-9 SE FORMA A PARTIR DE LA β -OXIDACIÓN DE ÁCIDO OLEICO

En el trabajo se ha descrito que el 16:1*n*-9 es formado por los monocitos humanos a expensas de la β -oxidación del ácido oleico, y que esa tasa de β -oxidación está aumentada cuando las células son tratadas con AA (Figura E.5).

Cuando se añade a las células ácido oleico a concentraciones fisiológicas se observa que el ácido graso se incorpora rápidamente a los lípidos celulares, resultando en la incorporación también de 16:1*n*-9, aunque en unas concentraciones de entre un 1 y un 2 % del ácido oleico total incorporado. La única referencia de un trabajo parecido mostraba que la incubación de células de retina de ranas con ácido oleico radiactivo también se traducía en la incorporación de este ácido graso a los lípidos de las mismas, observándose que aproximadamente un 4 % de la señal total señal aparecía en forma de un ácido graso que, sin demostrar, denominaban 16:1*n*-9 (301). Luego, los valores de retroconversión del ácido oleico en 16:1*n*-9 son muy similares a los descritos en este trabajo. De hecho, en un sistema biológico como el suero humano se observa que la masa total de 16:1*n*-9 respecto a la masa de 18:1*n*-9 es de un 2.4 % (48 respecto a 2006 nmol/ml suero).

Posteriormente, con el marcaje con el ácido oleico deuterado, se determinó inequívocamente que el 16:1*n*-9 proviene del 18:1*n*-9, probablemente tras un solo ciclo de β -oxidación.

La β -oxidación de los ácidos grasos es un proceso catabólico en el cual, tras una serie de 4 reacciones químicas, un acil-CoA es “cortado” entre sus carbonos 2 y 3 (β y γ) dando lugar a un acil-CoA de dos carbonos menos, una molécula de acetil-CoA, una molécula de FADH₂ y otra de NADH (362). En mamíferos, la β -oxidación se puede dar tanto en la mitocondria como en el peroxisoma, y aunque la bioquímica de ambos procesos es muy similar, el sustrato a β -oxidar y la finalidad biológica suelen ser bien distintas, y muchas veces vienen determinados por los mecanismos de importación de los acil-CoA al interior de los orgánulos. Mientras que en la mitocondria se β -oxidan de forma completa ácidos grasos de cadena larga (16-22 carbonos) con una finalidad energética, pues el mismo orgánulo puede usar el acetil-CoA y el poder reductor producido para obtener energía en forma de ATP (363, 364); en el peroxisoma, que carece de esos sistemas de obtención de energía, se β -oxidan de forma parcial ácidos grasos de cadena muy larga (más de 22 carbonos) así como otros compuestos similares como ácidos grasos ramificados, eicosanoides, o ácidos dicarboxílicos con distintos fines, como proporcionar sustratos

adecuados para β -oxidación mitocondrial, biosíntesis de ácidos grasos esenciales o eliminación de metabolitos oxigenados bioactivos (177, 307, 308).

Atendiendo a la teoría, habría conflictos sobre en qué orgánulo estaría siendo β -oxidado el ácido oleico, pues si bien la β -oxidación parcial es característica del peroxisoma, los ácidos grasos de 18 carbonos son importados a la mitocondria de forma mucho más efectiva (307, 308, 362-364). Para intentar discernir entre uno u otro sistema hay que tener en cuenta los procesos bioquímicos que rigen la importación de ácidos grasos a ambos orgánulos. Así, se sabe que la mitocondria importa los acil-CoA a su matriz mediante el sistema de la carnitina palmitoiltransferasa (CPT). Este sistema está formado por 3 enzimas, la CPT1 que es una proteína transmembrana situada en la membrana mitocondrial externa que cataliza la transferencia del ácido graso tioesterificado a CoA (acil-CoA) a una molécula de carnitina (acilcarnitina), permitiendo que pase a través del espacio intermembrana (**Figura E.5**). Además, se requiere una translocasa de carnitina-acilcarnitina para transportar la acilcarnitina a la matriz mitocondrial, donde la CPT2, que está situada en la membrana mitocondrial interna, revierte la acción realizada por la CPT1 (363, 364). Sin embargo, la entrada del acil-CoA al peroxisoma no se conoce exactamente a día de hoy. Aunque se han descubierto proteínas integrales de membrana que median el transporte activo o la difusión a través de la membrana, no usan el sistema CPT para la importación de ácidos grasos (307, 365). Así, se considera que la CPT1 es la enzima limitante en la β -oxidación mitocondrial y, por ello, se ha usado como diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades relacionadas con un deficiente metabolismo energético. A tal efecto, se han desarrollado múltiples inhibidores de la enzima, destacando su inhibidor irreversible etomoxir (304) (**Figura E.5**), cuyo efecto es capaz de producir un cambio del metabolismo energético de la célula desde el uso de ácidos grasos para la producción de ATP hacia la utilización de glucosa, lo cual ha demostrado ser un mecanismo eficiente para mejorar los síntomas de la diabetes tipo 2 (324), la insuficiencia cardíaca congestiva (325) o la progresión de células tumorales (305, 366). En este caso, el uso de 30 μM de etomoxir resultó en una bajada significativa de la formación de 16:1*n*-9 a partir de 18:1*n*-9, indicando que la β -oxidación parcial del ácido oleico se estaría produciendo, al menos en parte, en la mitocondria (**Figura E.5**). Aunque esto aporta evidencia de que la β -oxidación parcial del ácido oleico se produce en ese orgánulo, la ausencia de trabajos que propongan que existe β -oxidación parcial en la mitocondria y la formación residual de 16:1*n*-9 a pesar de la presencia del inhibidor, hacen pensar que parte de esa β -oxidación se pueda estar llevando a cabo en el peroxisoma. Para determinarlo de forma definitiva se requieran posteriores estrategias para inhibir la β -oxidación peroxisomal.

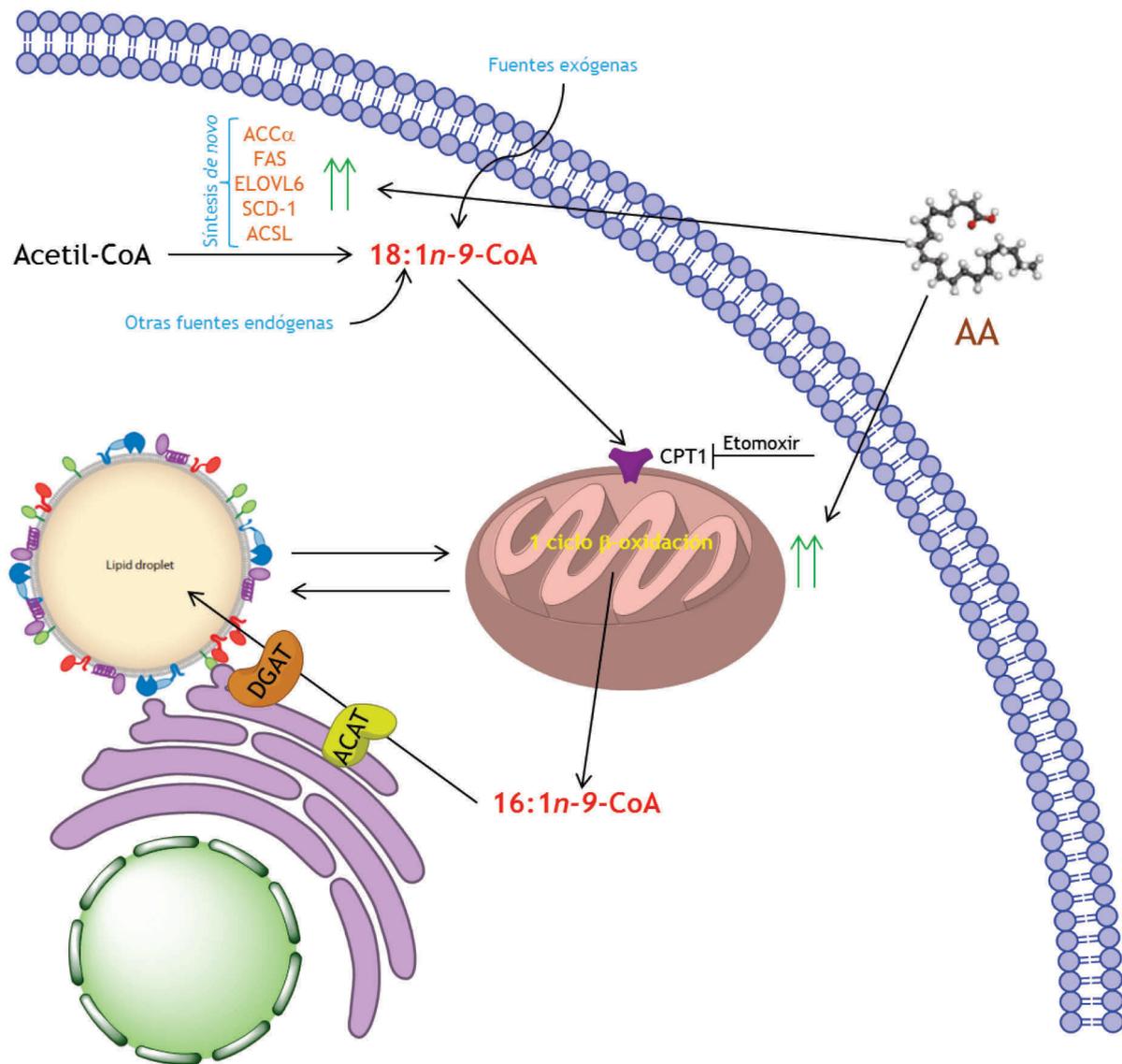


Figura E.5. Posibles mecanismos de *síntesis del ácido graso 16:1n-9*. El ácido oleico celular, proveniente de distintos orígenes, entra vía sistema de importación de la cartinina palmitoiltransferasa (CPT) a la mitocondria, donde sufre un ciclo de β -oxidación dando lugar a 16:1n-9. Tras salir de la mitocondria, el ácido graso se incorpora preferentemente en los lípidos neutros que componen las gotas lipídicas celulares. En presencia de AA, tanto la *síntesis de novo* de ácido oleico, como su β -oxidación hacia 16:1n-9 están aumentadas, explicando la gran incorporación de este ácido graso a las gotas lipídicas que se están formando por el AA. Algunos trabajos proponen que existen sitios de contacto directo entre LD y mitocondrias desde los cuales podrían salir los ácidos grasos de la lipólisis de los TAG directamente hacia la β -oxidación, regresando posteriormente a los LD ya acortados (367, 368).

La β -oxidación de ácido oleico hacia $16:1n-9$ se produce a un mayor ritmo cuando las células están tratadas con AA, lo cual proporciona un sentido global al proceso de formación de LD acompañado de grandes incrementos de $16:1n-9$ en monocitos estimulados con AA (**Figura E.5**). Se ha observado que el ácido oleico en lípidos neutros aumenta tras el tratamiento con AA, por lo tanto se puede pensar que ese incremento de $16:1n-9$ cuando se tratan con AA las células se deba a que los monocitos tienen más sustrato para β -oxidar y no a que esa tasa de β -oxidación esté aumentada por la presencia de AA. Esa hipótesis parece improbable porque el aumento de ácido oleico tras el tratamiento con AA es de 2.6 nmol/mg proteína mientras que el aumento de $16:1n-9$ tras el tratamiento es de 12.8 nmol/mg proteína (**Figura D.7-A**). Luego teniendo en cuenta que cuando se aumentó el ácido oleico disponible que la célula tenía para β -oxidar, como mucho un 2 % se metabolizó a $16:1n-9$ (serían 0.05 nmol/mg proteína en este caso), el aumento de sustrato no explicaría satisfactoriamente el gran incremento de $16:1n-9$ observado. No se pudo confirmar si el ácido oleico que está aumentando su β -oxidación en las células proviene directamente de la síntesis *de novo* de ácidos grasos o del reservorio endógeno de las células, ni de qué fuente celular de lípidos está siendo hidrolizado antes de convertirse a $16:1n-9$. En lo referido a esto último, se ha encontrado una estrecha relación física y funcional entre los LD y las mitocondrias que sugieren que el transporte de lípidos entre un orgánulo y otro pueda ser bidireccional (367-369) (**Figura E.5**), especialmente en condiciones de privación de nutrientes (56). Esta evidencia unida a que tanto el $18:1n-9$ como el $16:1n-9$ deuterado que se forma se incorporan preferentemente a TAG, constituyente fundamental de los LD, hace pensar que esa clase de lípidos pueda ser la fuente celular mayoritaria que las células usan para la β -oxidación de ácido oleico a $16:1n-9$.

E.2.4. OBSERVACIONES FINALES SOBRE EL ÁCIDO GRASO 16:1*n*-9

Una de los resultados más llamativos de este trabajo en su conjunto es que bajo el mismo estímulo, los monocitos forman LD incorporando por una parte ácidos grasos que provienen de la síntesis *de novo*, y por otra parte, un ácido graso que proviene de la β -oxidación parcial de ácido oleico. No es habitual que la célula active de forma paralela vías anabólicas y catabólicas, pues tiene un coste energético no aprovechado, por lo que presenta mecanismos para evitarlo. Entre ellos destaca la acción de la ACC β , que al contrario de la ACC α , no interviene en la síntesis *de novo* sino en la β -oxidación de los ácidos grasos. Esta enzima, situada en la membrana mitocondrial externa, genera una fracción celular de malonil-CoA que actúa como inhibidor alostérico fisiológico de la CPT1. Al igual que su otra isoforma, la ACC β está controlada a nivel transcripcional por SREBP-1, luego cuando está aumentada la lipogénesis *de novo* como en este caso, también aumenta la transcripción del gen codificante de la ACC β , generando una fracción de malonil-CoA (que no se mezcla con el producido por la ACC α) que inhibe la entrada de ácidos grasos a la mitocondria y con ello su β -oxidación (267, 268, 363, 364). El hecho de que siga produciéndose 16:1*n*-9 por β -oxidación a pesar que la síntesis *de novo* de ácidos grasos esté aumentada por el AA, puede deberse a que la CPT1 además de estar regulada por malonil-CoA también puede ser regulada por fosforilación, nitración o a nivel de expresión génica, pudiendo el AA estar activando la CPT1 a través de alguno de estos mecanismos (363, 364).

Que el 16:1*n*-9 se forme a partir de un ácido graso tan mayoritario como el oleico, que está presente en la dieta y a su vez puede ser sintetizado *de novo* por las células, hacer pensar que este nuevo ácido graso que se ha caracterizado, simplemente aparece en las células por un exceso de ácido oleico. Sin embargo, hay varias evidencias que indican que no es así: (i) En suero, la proporción 16:1*n*-9/18:1*n*-9 es de un 2.4 %, mientras que en monocitos basales es un 7.9 % (Figura D.7-A) lo cual indica que los monocitos no sólo lo toman del suero pasivamente, sino que activan sus rutas de biosíntesis, hasta presentar 3 veces más en sus lípidos de este ácido graso que de ácido palmitoleico. (ii) Si fuese una cuestión general que ante un exceso de ciertos ácidos grasos la célula los β -oxidase parcialmente, otros ácidos grasos presentes de forma mayoritaria en los monocitos como 18:2*n*-6 o 20:4*n*-6, que incluso están en cantidades superiores al ácido oleico (Figura D.7-A), deberían dar lugar a ácidos grasos como 16:2*n*-6 o 18:4*n*-6, que no se han detectado ni en monocitos ni en otros tipos celulares, tal vez porque las células no los

DISCUSIÓN

necesiten. Algo similar ocurre cuando se incuban retinas de rana con distintos ácidos grasos, encontrándose que sólo se produce la retroconversión por β -oxidación parcial de ciertos ácidos grasos y no otros, dando lugar a ácidos grasos acortados en carbonos que curiosamente son los que usan esas células para acilar ciertas proteínas importantes para su función. Luego parece que las células solo β -oxidan parcialmente ciertos ácidos grasos para dar lugar a otros que necesitan para realizar su función biológica (301). Evidencias experimentales posteriores mostraron que, efectivamente, el ácido graso 16:1*n*-9 no está presente de forma igual en todos los tejidos y podría tener una función relevante en células del sistema fagocítico mononuclear.

E.3. EL ÁCIDO GRASO 16:1n-9 PRESENTA POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO EN RATÓN

E.3.1. EL ÁCIDO GRASO 16:1n-9 TAMBIÉN APARECE EN RATÓN, MOSTRANDO PREFERENCIA POR LA ACUMULACIÓN EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

Se ha demostrado que en todos los tejidos de ratón, excepto en células peritoneales y macrófagos peritoneales aislados, el isómero 16:1 dominante es el ácido palmitoleico, mostrándose una proporción 16:1n-7/16:1n-9 muy similar a la encontrada en suero o incluso con más enriquecimiento de 16:1n-7 en ciertos tejidos como el adiposo o el músculo. Dado que se ha descrito que los valores de 16:1n-9 en suero son muy bajos, el hecho de que en macrófagos peritoneales aparezca en cantidades 4 veces superiores a los niveles de ácido palmitoleico sugiere que esas células lo están sintetizando activamente, al igual que hace por ejemplo el tejido adiposo con el 16:1n-7 (176, 178, 184). Análogamente, dado que se ha descrito que el ácido palmitoleico, activamente sintetizado por el tejido adiposo en ciertas situaciones, tiene una función en síndrome metabólico e inflamación, esos datos sugieren que el 16:1n-9, activamente sintetizado en células inmunes en respuesta a ciertos estímulos, podría tener una función biológica mediada por estas células.

El hecho de que las células del lavado peritoneal, que en ratones sin estimular contienen un 67 % de macrófagos residentes y un 33 % de otro tipo de células inmunes (309), tengan un menor enriquecimiento en 16:1n-9 que en 16:1n-7 que la población de macrófagos purificada, sugiere que son estas células y no otros leucocitos mononucleares o polimorfonucleares las que acumulan grandes cantidades de ese ácido graso, como ya se observó en los monocitos circulantes de los que provienen.

En lo referido a la distribución por clase de lípidos de los 2 isómeros, se puede observar que en todos los tejidos, excepto los mRPM, la distribución en PL, TAG y CE de 16:1n-7 y 16:1n-9 es muy similar. Sin embargo, en macrófagos, el 16:1n-9 presenta una distribución muy distinta al ácido palmitoleico, de manera análoga a lo que ocurría en monocitos humanos, de nuevo sugiriendo que en estas células esos 2 isómeros podrían presentar roles no redundantes.

E.3.2. EL 16:1*n*-9 SE COMPORTA COMO UN ÁCIDO GRASO ANTIINFLAMATORIO EN MODELOS DE RATÓN

Se ha observado que, añadido de forma exógena, el 16:1*n*-9 disminuye la producción de moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria en modelos de ratón. Ya se había descrito que la adición de 16:1*n*-7 a macrófagos de ratón reducía la expresión de múltiples marcadores de inflamación como Tnf α , Nos2, MCP-1, Cxcl1, Il6 y NF κ B aumentados tras el tratamiento con ácido palmítico o una dieta alta en grasa (200, 202, 204). En este caso, se usa un estímulo inflamatorio como el LPS en vez de uno metabólico como el 16:0, para confirmar que el 16:1*n*-7 reduce la expresión génica de Tnf α , Nos2 e Il6. Comparativamente, el ácido graso 16:1*n*-9 actúa de forma más potente que el 16:1*n*-7, inhibiendo tanto los niveles de expresión de los marcadores proinflamatorios como los niveles séricos de Il6, incluso en algunos casos más que el control positivo usado, el DHA (310).

El hecho de que el DHA no tenga apenas efecto sobre los niveles de Il6 en suero a pesar de que *in vitro* reduce su expresión génica en macrófagos peritoneales, puede tener múltiples explicaciones. Una de ellas es que tras la inyección del estímulo inflamatorio, la cantidad de macrófagos en la cavidad peritoneal baja desde un 67 % de los animales control a un 16 % a las 4 horas, infiltrándose hasta un 80 % de células polimorfonucleares, que serían las que están mediando principalmente la producción de Il6 en ese momento (309). Hay estudios contradictorios respecto a ello, pues si bien en algunos trabajos en humanos la suplementación con DHA no reduce los niveles en suero de IL6 (370), en otros realizados en ratón sí lo hace (371, 372). Precisamente, la fortaleza del 16:1*n*-9 como ácido graso antiinflamatorio reside en que, al menos para la medida de Il6, se comporta de igual forma en el modelo *in vitro* como en el modelo *in vivo* y su acción parece no estar restringida a un único tipo celular, sino que podría afectar a distintas células implicadas en la respuesta.

Algunos trabajos han propuesto que el comportamiento antiinflamatorio que presentan ciertos ácidos grasos en respuesta a estímulos de TLR se debe a sus efectos sobre el propio receptor, impidiendo la activación del mismo por el estímulo inflamatorio (310). Otros estudios proponen que el efecto podría darse de forma independiente al bloqueo del receptor, pues el ácido graso tiene efecto antiinflamatorio *per se*, sin necesidad de posteriores estímulos (200, 202, 204). Aunque no se han hecho experimentos para confirmarlo, es probable que el efecto del 16:1*n*-9 observado no tenga lugar por el bloqueo del receptor, pues en los experimentos *in vitro*, el ácido graso se retira del medio

de cultivo antes de la adición del LPS, por lo que se supone que ya se encuentra en el interior de la célula en forma de acil-CoA libre o incorporado a lípidos más complejos.

Otro asunto a dirimir es si los ácidos grasos en ausencia de LPS están teniendo efecto biológico sobre la activación celular, lo cual no parece probable. En este sentido se realizó una prueba de expresión génica de los 8 marcadores de activación inflamatoria por qPCR y un inmunoblot de Cox-2 tratando las células con los 3 ácidos grasos y no se observaron diferencias en el efecto de estos ácidos grasos sobre la expresión génica o proteica de estos marcadores respecto a las células sin ácido graso (no mostrado).

Muy pocas son las referencias en la bibliografía sobre el ácido graso 16:1*n*-9, siendo la mayoría estudios epidemiológicos hechos con sangre periférica de pacientes. Se han relacionado los altos valores de 16:1*n*-9 esterificado en los PL del plasma (356) y en las membranas de los eritrocitos sanguíneos (359) con mayor riesgo de sufrir paro cardíaco repentino pero no otros eventos cardiovasculares. Además, altos niveles de 16:1*n*-9 en eritrocitos se asocian a un incremento de la probabilidad de sufrir síndrome metabólico (199). Finalmente, otro estudio ha descrito los altos niveles de 16:1*n*-9 libre en plasma como marcador de pacientes con síndrome metabólico (360). Colectivamente, estos datos son coherentes con la síntesis de 16:1*n*-9 por parte de los monocitos humanos paralelamente a su conversión en monocitos espumosos, un evento relacionado con los desequilibrios lipídicos producidos en el síndrome metabólico y los problemas cardiovasculares. De hecho, sería muy interesante poder acceder a sangre de pacientes con estas patologías y medir especies de lípidos neutros conteniendo 16:1*n*-9 en sus monocitos en comparación con donantes sanos, para confirmar si lo observado en plasma y eritrocitos en esos trabajos es reproducible en estas células, donde la formación de ese ácido graso ya ha sido caracterizada.

Existe un claro paralelismo entre los efectos biológicos observados en ambos isómeros del ácido graso 16:1. El 16:1*n*-9 es un ácido graso antiinflamatorio más potente aún que el 16:1*n*-7 en modelos de ratón cuando se le añade de forma exógena, pero sus altos valores en plasma y eritrocitos humanos están relacionados con efectos metabólicos adversos en estudios epidemiológicos (199, 356, 359, 360), de forma análoga a lo que se ha descrito para el ácido palmitoleico, pero con mucha menos bibliografía generada hasta el momento.

Una explicación en relación al comportamiento de los isómeros 16:1, que podría explicar los resultados contradictorios que se han encontrado hasta el momento entre estudios en los que se añade el ácido graso de forma exógena y estudios epidemiológicos, es que su efecto biológico se relacione con la forma en la que se encuentra en ácido graso dentro de la célula (como ácido graso libre, esterificado en otros lípidos o formando

DISCUSIÓN

metabolitos oxigenados, entre otras). En el caso del ácido palmitoleico se ha descubierto que tiene efectos biológicos en su forma libre (184), formando parte de fosfolípidos de PI (210, 211) o hidroxilado formando parte de FAHFA (212). Por tanto, el futuro trabajo deberá ir dirigido a determinar la forma biológica activa del ácido graso 16:1 n -9. En ese sentido, ya se ha detectado un marcador de activación de los monocitos que contiene el ácido graso 16:1, la especie fosfolipídica PE(16:1/20:4), que aumenta sus niveles tras activar las células con el estímulo fúngico zimosán (122), y que podría tener cierta relevancia en la respuesta inflamatoria como se ha descrito para otro de los marcadores de activación de monocitos/macrófagos, la especie PI(20:4/20:4) (123).

F. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- Regarding the first general goal, the study of the regulation of lipid droplet formation by arachidonic acid in human monocytes in the context of their conversion into foamy monocytes in a model of atherosclerosis, the obtained results led to the following conclusions:
1. AA induced neutral lipid synthesis and lipid droplet formation in human monocytes, to a greater extent than other tested fatty acids. On one hand, neutral lipid synthesis was due to the direct AA incorporation into cellular TAG, and on the other hand, to the incorporation of other fatty acids towards TAG and CE molecules. Both pathways can be dissociated by using triacsin C, an acyl-CoA synthetases inhibitor.
 2. AA stimulated the *de novo* fatty acid synthesis in human monocytes. Fatty acids synthesized by such pathway were used to neutral lipid synthesis by cells.
 3. AA promoted cPLA₂α phosphorylation at Ser⁵⁰⁵ by a simultaneous effect of p38 and JNK. This is a key event prior to lipid droplet biosynthesis by human monocytes.
 4. AA also induced neutral lipid synthesis in human monocyte-differentiated macrophages. Similarly, oxidized LDL promoted neutral lipid accumulation in human monocytes, although to a lesser extent than AA.
- Regarding the second general goal, which was the study of palmitoleic acid isomers in innate immune cells, the experimental evidences generated the following results:
5. The most increased fatty acid in neutral lipids of monocytes and macrophages challenged to atherosclerosis stimuli was a palmitoleic acid isomer. The design and application of an experimental method for its analysis allowed the determination of the fatty acid 16:1*n*-9.
 6. Unlike palmitoleic acid and the rest of cellular fatty acids, 16:1*n*-9 was esterified in neutral lipids in human monocytes. These cellular lipids were more enriched in 16:1*n*-9 than in palmitoleic acid, showing differences in their incorporation patterns into phospholipid classes.
 7. The fatty acid 16:1*n*-9 was formed from oleic acid by partial β-oxidation in mitochondria in human monocytes. The conversion rate was increased when cells were exposed to AA.

CONCLUSIONS

8. The fatty acid 16:1*n*-9 was detected in mouse tissues and organs, and it was especially abundant in peritoneal macrophages, where it was esterified to a greater proportion than palmitoleic acid.
9. Either the *in vitro* preincubation of mouse peritoneal macrophages, or the *in vivo* enrichment of peritoneal cells with the fatty acid 16:1*n*-9, reduced the gene and protein expression of pro-inflammatory cytokines in response to LPS.

G. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murphy, D. J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* **40**: 325-438.
2. Bozza, P. T., W. Yu, J. F. Penrose, E. S. Morgan, A. M. Dvorak, and P. F. Weller. 1997. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *The Journal of experimental medicine* **186**: 909-920.
3. Bozza, P. T., K. G. Magalhaes, and P. F. Weller. 2009. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 540-551.
4. Thiam, A. R., R. V. Farese, Jr., and T. C. Walther. 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 775-786.
5. Walther, T. C., and R. V. Farese, Jr. 2009. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 459-466.
6. Fei, W., L. Zhong, M. T. Ta, G. Shui, M. R. Wenk, and H. Yang. 2011. The size and phospholipid composition of lipid droplets can influence their proteome. *Biochem Biophys Res Commun* **415**: 455-462.
7. Grillitsch, K., M. Connerth, H. Kofeler, T. N. Arrey, B. Rietschel, B. Wagner, M. Karas, and G. Daum. 2011. Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: lipidome meets proteome. *Biochim Biophys Acta* **1811**: 1165-1176.
8. Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, and T. Fujimoto. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* **277**: 44507-44512.
9. Penno, A., G. Hackenbroich, and C. Thiele. 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* **1831**: 589-594.
10. Marchesan, D., M. Rutberg, L. Andersson, L. Asp, T. Larsson, J. Boren, B. R. Johansson, and S. O. Olofsson. 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.
11. Andersson, L., P. Bostrom, J. Ericson, M. Rutberg, B. Magnusson, D. Marchesan, M. Ruiz, L. Asp, P. Huang, M. A. Frohman, J. Boren, and S. O. Olofsson. 2006. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *Journal of cell science* **119**: 2246-2257.
12. Blouin, C. M., S. Le Lay, A. Eberl, H. C. Kofeler, I. C. Guerrero, C. Klein, X. Le Liepvre, F. Lasnier, O. Bourron, J. F. Gautier, P. Ferre, E. Hajduch, and I. Dugail. 2010. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J Lipid Res* **51**: 945-956.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

13. 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.
14. Kimmel, A. R., D. L. Brasaemle, M. McAndrews-Hill, C. Sztalryd, and C. Londos. 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.
15. Le Lay, S., and I. Dugail. 2009. Connecting lipid droplet biology and the metabolic syndrome. *Prog Lipid Res* **48**: 191-195.
16. Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1991. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* **266**: 11341-11346.
17. Straub, B. K., B. Gyoengyoesi, M. Koenig, M. Hashani, L. M. Pawella, E. Herpel, W. Mueller, S. Macher-Goeppinger, H. Heid, and P. Schirmacher. 2013. Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology* **62**: 617-631.
18. Macpherson, R. E., R. Vandenboom, B. D. Roy, and S. J. Peters. 2013. Skeletal muscle PLIN3 and PLIN5 are serine phosphorylated at rest and following lipolysis during adrenergic or contractile stimulation. *Physiological reports* **1**: e00084.
19. Yamaguchi, T., S. Matsushita, K. Motojima, F. Hirose, and T. Osumi. 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.
20. Wolins, N. E., J. R. Skinner, M. J. Schoenfish, A. Tzekov, K. G. Bensch, and P. E. Bickel. 2003. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem* **278**: 37713-37721.
21. Lass, A., R. Zimmermann, M. Oberer, and R. Zechner. 2011. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* **50**: 14-27.
22. Shen, W. J., S. Patel, H. Miyoshi, A. S. Greenberg, and F. B. Kraemer. 2009. Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis. *J Lipid Res* **50**: 2306-2313.
23. Krahmer, N., Y. Guo, F. Wilfling, M. Hilger, S. Lingrell, K. Heger, H. W. Newman, M. Schmidt-Supprian, D. E. Vance, M. Mann, R. V. Farese, Jr., and T. C. Walther. 2011. Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab* **14**: 504-515.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

24. Moessinger, C., L. Kuerschner, J. Spandl, A. Shevchenko, and C. Thiele. 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.
25. Poppelreuther, M., B. Rudolph, C. Du, R. Grossmann, M. Becker, C. Thiele, R. Ehehalt, and J. Fullekrug. 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.
26. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gomez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J Immunol* **186**: 6004-6013.
27. Sembongi, H., M. Miranda, G. S. Han, S. Fakas, N. Grimsey, J. Vendrell, G. M. Carman, and S. Siniosoglou. 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.
28. Yu, W., P. T. Bozza, D. M. Tzizik, J. P. Gray, J. Cassara, A. M. Dvorak, and P. F. Weller. 1998. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* **152**: 759-769.
29. Walther, T. C., and R. V. Farese, Jr. 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual review of biochemistry* **81**: 687-714.
30. Suzuki, M., Y. Ohsaki, T. Tatematsu, Y. Shinohara, T. Maeda, J. Cheng, and T. Fujimoto. 2012. Translation inhibitors induce formation of cholesterol ester-rich lipid droplets. *PLoS One* **7**: e42379.
31. Miller, W. L., and H. S. Bose. 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res* **52**: 2111-2135.
32. Coleman, R. A., and D. P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* **43**: 134-176.
33. Buhman, K. F., M. Accad, and R. V. Farese. 2000. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* **1529**: 142-154.
34. Wilfling, F., H. Wang, J. T. Haas, N. Kraemer, T. J. Gould, A. Uchida, J. X. Cheng, M. Graham, R. Christiano, F. Frohlich, X. Liu, K. K. Buhman, R. A. Coleman, J. Bewersdorf, R. V. Farese, Jr., and T. C. Walther. 2013. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets. *Developmental cell* **24**: 384-399.

35. Gubern, A., J. Casas, M. Barcelo-Torns, D. Barneda, X. de la Rosa, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2008. Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem* **283**: 27369-27382.
36. Gubern, A., M. Barcelo-Torns, J. Casas, D. Barneda, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2009. Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A2. *J Biol Chem* **284**: 5697-5708.
37. Leiguez, E., J. P. Zuliani, A. M. Cianciarullo, C. M. Fernandes, J. M. Gutierrez, and C. Teixeira. 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 Leukoc Biol* **90**: 155-166.
38. Akiba, S., Y. Yoneda, S. Ohno, M. Nemoto, and T. Sato. 2003. Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification. *J Lipid Res* **44**: 1676-1685.
39. Wilfling, F., J. T. Haas, T. C. Walther, and R. V. Jr. 2014. Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **29C**: 39-45.
40. Pol, A., S. P. Gross, and R. G. Parton. 2014. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* **204**: 635-646.
41. Dixit, S. S., A. Pincus, B. Guo, and G. W. Faris. 2012. Droplet shape analysis and permeability studies in droplet lipid bilayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **28**: 7442-7451.
42. Xu, N., S. O. Zhang, R. A. Cole, S. A. McKinney, F. Guo, J. T. Haas, S. Bobba, R. V. Farese, Jr., and H. Y. Mak. 2012. The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J Cell Biol* **198**: 895-911.
43. Kuerschner, L., C. Moessinger, and C. Thiele. 2008. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic* **9**: 338-352.
44. Tan, J. S., C. J. Seow, V. J. Goh, and D. L. Silver. 2014. Recent advances in understanding proteins involved in lipid droplet formation, growth and fusion. *J Genet Genomics* **41**: 251-259.
45. Fujimoto, Y., J. Onoduka, K. J. Homma, S. Yamaguchi, M. Mori, Y. Higashi, M. Makita, T. Kinoshita, J. Noda, H. Itabe, and T. Takanoa. 2006. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull* **29**: 2174-2180.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

46. Herms, A., M. Bosch, N. Ariotti, B. J. Reddy, A. Fajardo, A. Fernandez-Vidal, A. Alvarez-Guaita, M. A. Fernandez-Rojo, C. Rentero, F. Tebar, C. Enrich, M. I. Geli, R. G. Parton, S. P. Gross, and A. Pol. 2013. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Current biology : CB* **23**: 1489-1496.
47. Heid, H., S. Rickelt, R. Zimbelmann, S. Winter, H. Schumacher, Y. Dorflinger, C. Kuhn, and W. W. Franke. 2014. On the formation of lipid droplets in human adipocytes: the organization of the perilipin-vimentin cortex. *PLoS One* **9**: e90386.
48. Fujimoto, T., Y. Ohsaki, J. Cheng, M. Suzuki, and Y. Shinohara. 2008. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* **130**: 263-279.
49. Martin, S., and R. G. Parton. 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 373-378.
50. Murphy, S., S. Martin, and R. G. Parton. 2009. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 441-447.
51. Krahmer, N., R. V. Farese, Jr., and T. C. Walther. 2013. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO molecular medicine* **5**: 905-915.
52. Kraemer, F. B., V. K. Khor, W. J. Shen, and S. Azhar. 2013. Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* **371**: 15-19.
53. Listenberger, L. L., X. Han, S. E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, Jr., D. S. Ory, and J. E. Schaffer. 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3077-3082.
54. van Herpen, N. A., and V. B. Schrauwen-Hinderling. 2008. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav* **94**: 231-241.
55. Lee, J. S., R. Mendez, H. H. Heng, Z. Q. Yang, and K. Zhang. 2012. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *American journal of translational research* **4**: 102-113.
56. Cabodevilla, A. G., L. Sanchez-Caballero, E. Nintou, V. G. Boiadjieva, F. Picatoste, A. Gubern, and E. Claro. 2013. Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled beta-oxidation of fatty acids. *J Biol Chem* **288**: 27777-27788.
57. Pucer, A., V. Brglez, C. Payre, J. Pungercar, G. Lambeau, and T. Petan. 2013. Group X secreted phospholipase A(2) induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival. *Mol Cancer* **12**: 111.
58. Boren, J., M. R. Taskinen, S. O. Olofsson, and M. Levin. 2013. Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med* **274**: 25-40.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

59. Shulman, G. I. 2014. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N Engl J Med* **371**: 1131-1141.
60. Morigny, P., M. Houssier, E. Mouisel, and D. Langin. 2015. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*.
61. Chavez-Tapia, N. C., N. Rosso, and C. Tiribelli. 2012. Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC gastroenterology* **12**: 20.
62. Vernier, S., A. Chiu, J. Schober, T. Weber, P. Nguyen, M. Luer, T. McPherson, P. E. Wanda, C. A. Marshall, N. Rohatgi, M. L. McDaniel, A. S. Greenberg, and G. Kwon. 2012. beta-cell metabolic alterations under chronic nutrient overload in rat and human islets. *Islets* **4**: 379-392.
63. Zhang, X., and K. Zhang. 2012. Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Lipid Droplet Formation and Type II Diabetes. *Biochemistry research international* **2012**: 247275.
64. Sahini, N., and J. Borlak. 2014. Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. *Prog Lipid Res* **54**: 86-112.
65. Li, S., K. Nagothu, G. Ranganathan, S. M. Ali, B. Shank, N. Gokden, S. Ayyadevara, J. Megyesi, G. Olivecrona, S. S. Chugh, S. Kersten, and D. Portilla. 2012. Reduced kidney lipoprotein lipase and renal tubule triglyceride accumulation in cisplatin-mediated acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **303**: F437-448.
66. Menendez, J. A., and R. Lupu. 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **7**: 763-777.
67. Bozza, P. T., and J. P. Viola. 2010. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **82**: 243-250.
68. Cole, N. B., D. D. Murphy, T. Grider, S. Rueter, D. Brasaemle, and R. L. Nussbaum. 2002. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* **277**: 6344-6352.
69. Hutter-Paier, B., H. J. Huttunen, L. Puglielli, C. B. Eckman, D. Y. Kim, A. Hofmeister, R. D. Moir, S. B. Domnitz, M. P. Frosch, M. Windisch, and D. M. Kovacs. 2004. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **44**: 227-238.
70. Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**: 1089-1097.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

71. Rouille, Y., F. Helle, D. Delgrange, P. Roingeard, C. Voisset, E. Blanchard, S. Belouzard, J. McKeating, A. H. Patel, G. Maertens, T. Wakita, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* **80**: 2832-2841.
72. McLauchlan, J. 2009. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 552-559.
73. Syed, G. H., and A. Siddiqui. 2011. Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and hepatitis C virus. *Hepatology* **54**: 1936-1946.
74. Menzel, N., W. Fischl, K. Hueging, D. Bankwitz, A. Frentzen, S. Haid, J. Gentsch, L. Kaderali, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2012. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* **8**: e1002829.
75. Xu, S., R. Pei, M. Guo, Q. Han, J. Lai, Y. Wang, C. Wu, Y. Zhou, M. Lu, and X. Chen. 2012. Cytosolic phospholipase A2 gamma is involved in hepatitis C virus replication and assembly. *J Virol* **86**: 13025-13037.
76. Samsa, M. M., J. A. Mondotte, N. G. Iglesias, I. Assuncao-Miranda, G. Barbosa-Lima, A. T. Da Poian, P. T. Bozza, and A. V. Gamarnik. 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* **5**: e1000632.
77. Huang, Y. L., J. Morales-Rosado, J. Ray, T. G. Myers, T. Kho, M. Lu, and R. S. Munford. 2014. Toll-like receptor agonists promote prolonged triglyceride storage in macrophages. *J Biol Chem* **289**: 3001-3012.
78. Moreira, L. S., B. Piva, L. B. Gentile, F. P. Mesquita-Santos, H. D'Avila, C. M. Maya-Monteiro, P. T. Bozza, C. Bandeira-Melo, and B. L. Diaz. 2009. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 156-165.
79. Melo, R. C., and A. M. Dvorak. 2012. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog* **8**: e1002729.
80. Weller, P. F., P. T. Bozza, W. Yu, and A. M. Dvorak. 1999. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol* **118**: 450-452.
81. Feingold, K. R., M. R. Kazemi, A. L. Magra, C. M. McDonald, L. G. Chui, J. K. Shigenaga, S. M. Patzek, Z. W. Chan, C. Londos, and C. Grunfeld. 2010. ADRP/ADFP and

Mal1 expression are increased in macrophages treated with TLR agonists. *Atherosclerosis* **209**: 81-88.

82. Bozza, P. T., W. Yu, and P. F. Weller. 1997. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **92 Suppl 2**: 135-140.

83. Khatchadourian, A., S. D. Bourque, V. R. Richard, V. I. Titorenko, and D. Maysinger. 2012. Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Biochim Biophys Acta* **1821**: 607-617.

84. Dichlberger, A., S. Schlager, P. T. Kovanen, and W. J. Schneider. 2015. Lipid droplets in activated mast cells - a significant source of triglyceride-derived arachidonic acid for eicosanoid production. *Eur J Pharmacol*.

85. Weller, P. F., S. W. Ryeom, S. T. Picard, S. J. Ackerman, and A. M. Dvorak. 1991. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol* **113**: 137-146.

86. Dichlberger, A., S. Schlager, K. Maaninka, W. J. Schneider, and P. T. Kovanen. 2014. Adipose triglyceride lipase regulates eicosanoid production in activated human mast cells. *J Lipid Res* **55**: 2471-2478.

87. den Hartigh, L. J., J. E. Connolly-Rohrbach, S. Fore, T. R. Huser, and J. C. Rutledge. 2010. Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes. *J Immunol* **184**: 3927-3936.

88. den Hartigh, L. J., R. Altman, J. E. Norman, and J. C. Rutledge. 2014. Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NFkappaB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**: H109-120.

89. Tabas, I. 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* **10**: 36-46.

90. Weber, C., A. Zernecke, and P. Libby. 2008. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* **8**: 802-815.

91. Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**: 115-126.

92. Moore, K. J., and I. Tabas. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* **145**: 341-355.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

93. Pagidipati, N. J., and T. A. Gaziano. 2013. Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement. *Circulation* **127**: 749-756.
94. Steinberg, D., C. K. Glass, and J. L. Witztum. 2008. Evidence mandating earlier and more aggressive treatment of hypercholesterolemia. *Circulation* **118**: 672-677.
95. Osterud, B., and E. Bjorklid. 2003. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* **83**: 1069-1112.
96. Lupo, G., A. Nicotra, G. Giurdanella, C. D. Anfuso, L. Romeo, G. Biondi, C. Tirolo, B. Marchetti, N. Ragusa, and M. Alberghina. 2005. Activation of phospholipase A(2) and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1735**: 135-150.
97. Lupo, G., G. Assero, C. D. Anfuso, A. Nicotra, M. Palumbo, G. Cannavo, M. Renis, N. Ragusa, and M. Alberghina. 2002. Cytosolic phospholipase A2 mediates arachidonoyl phospholipid hydrolysis in immortalized rat brain endothelial cells stimulated by oxidized LDL. *Biochim Biophys Acta* **1585**: 19-29.
98. Herbert, S. P., A. F. Odell, S. Ponnambalam, and J. H. Walker. 2009. Activation of cytosolic phospholipase A2- α as a novel mechanism regulating endothelial cell cycle progression and angiogenesis. *J Biol Chem* **284**: 5784-5796.
99. Jiang, J. X., S. J. Zhang, Y. K. Xiong, Y. L. Jia, Y. H. Sun, X. X. Lin, H. J. Shen, Q. M. Xie, and X. F. Yan. 2015. EETs Attenuate Ox-LDL-Induced LTB4 Production and Activity by Inhibiting p38 MAPK Phosphorylation and 5-LO/BLT1 Receptor Expression in Rat Pulmonary Arterial Endothelial Cells. *PLoS One* **10**: e0128278.
100. Wong, J. T., K. Tran, G. N. Pierce, A. C. Chan, K. O, and P. C. Choy. 1998. Lysophosphatidylcholine stimulates the release of arachidonic acid in human endothelial cells. *J Biol Chem* **273**: 6830-6836.
101. Moore, K. J., F. J. Sheedy, and E. A. Fisher. 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* **13**: 709-721.
102. Karabina, S. A., S. Gora, R. Atout, and E. Ninio. 2010. Extracellular phospholipases in atherosclerosis. *Biochimie* **92**: 594-600.
103. Li, A. C., and C. K. Glass. 2002. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* **8**: 1235-1242.
104. Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., B. J. Ansell, P. Barter, M. J. Chapman, J. W. Heinecke, A. Kontush, A. R. Tall, and N. R. Webb. 2015. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

105. Vanderlaan, P. A., and C. A. Reardon. 2005. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J Lipid Res* **46**: 829-838.
106. Nording, H. M., P. Seizer, and H. F. Langer. 2015. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol* **6**: 98.
107. Ghattas, A., H. R. Griffiths, A. Devitt, G. Y. Lip, and E. Shantsila. 2013. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *J Am Coll Cardiol* **62**: 1541-1551.
108. Wu, H., R. M. Gower, H. Wang, X. Y. Perrard, R. Ma, D. C. Bullard, A. R. Burns, A. Paul, C. W. Smith, S. I. Simon, and C. M. Ballantyne. 2009. Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* **119**: 2708-2717.
109. Gower, R. M., H. Wu, G. A. Foster, S. Devaraj, I. Jialal, C. M. Ballantyne, A. A. Knowlton, and S. I. Simon. 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.
110. Xu, L., X. Dai Perrard, J. L. Perrard, D. Yang, X. Xiao, B. B. Teng, S. I. Simon, C. M. Ballantyne, and H. Wu. 2015. Foamy monocytes form early and contribute to nascent atherosclerosis in mice with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**: 1787-1797.
111. Foster, G. A., L. Xu, A. A. Chidambaram, S. R. Soderberg, E. J. Armstrong, H. Wu, and S. I. Simon. 2015. CD11c/CD18 Signals Very Late Antigen-4 Activation To Initiate Foamy Monocyte Recruitment during the Onset of Hypercholesterolemia. *J Immunol*.
112. Dresel, H. A., D. P. Via, M. Stohr, U. Elchner, A. Gnasso, A. Postiglione, N. Blin, J. Augustin, and G. Schettler. 1986. Observations on leukocytes from patients with severe familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* **6**: 259-264.
113. Tertov, V. V., O. S. Kalenich, and A. N. Orekhov. 1992. Lipid-laden white blood cells in the circulation of patients with coronary heart disease. *Exp Mol Pathol* **57**: 22-28.
114. Varela, L. M., A. Ortega, B. Bermudez, S. Lopez, Y. M. Pacheco, J. Villar, R. Abia, and F. J. Muriana. 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.
115. Lopez, S., S. Jaramillo, L. M. Varela, A. Ortega, B. Bermudez, R. Abia, and F. J. Muriana. 2013. p38 MAPK protects human monocytes from postprandial triglyceride-rich lipoprotein-induced toxicity. *J Nutr* **143**: 620-626.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

116. Alipour, A., A. J. van Oostrom, A. Izraeljan, C. Verseyden, J. M. Collins, K. N. Frayn, T. W. Plokker, J. W. Elte, and M. Castro Cabezas. 2008. Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 792-797.
117. Gratchev, A., I. Sobenin, A. Orekhov, and J. Kzhyshkowska. 2012. Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases. *Immunobiology* **217**: 476-482.
118. Rosenson, R. S., and E. Hurt-Camejo. 2012. Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *Eur Heart J* **33**: 2899-2909.
119. Hanasaki, K., K. Yamada, S. Yamamoto, Y. Ishimoto, A. Saiga, T. Ono, M. Ikeda, M. Notoya, S. Kamitani, and H. Arita. 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.
120. Sato, H., R. Kato, Y. Isogai, G. Saka, M. Ohtsuki, Y. Taketomi, K. Yamamoto, K. Tsutsumi, J. Yamada, S. Masuda, Y. Ishikawa, T. Ishii, T. Kobayashi, K. Ikeda, R. Taguchi, S. Hatakeyama, S. Hara, I. Kudo, H. Itabe, and M. Murakami. 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.
121. Karabina, S. A., I. Brocheriou, G. Le Naour, M. Agrapart, H. Durand, M. Gelb, G. Lambeau, and E. Ninio. 2006. Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB J* **20**: 2547-2549.
122. Balgoma, D., A. M. Astudillo, G. Perez-Chacon, O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J Immunol* **184**: 3857-3865.
123. Gil-de-Gomez, L., A. M. Astudillo, C. Meana, J. M. Rubio, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J Immunol* **190**: 5169-5177.
124. Dennis, E. A., J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magrioti, and G. Kokotos. 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* **111**: 6130-6185.
125. Murakami, M., Y. Taketomi, Y. Miki, H. Sato, T. Hirabayashi, and K. Yamamoto. 2011. Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* **50**: 152-192.
126. Ghosh, M., D. E. Tucker, S. A. Burchett, and C. C. Leslie. 2006. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res* **45**: 487-510.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

127. Leslie, C. C. 2015. Cytosolic phospholipase A2: Physiological function and role in disease. *J Lipid Res* **56**: 1386-1402.
128. Balsinde, J., M. V. Winstead, and E. A. Dennis. 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* **531**: 2-6.
129. Leslie, C. C. 2004. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem Cell Biol* **82**: 1-17.
130. Han, W. K., A. Sapirstein, C. C. Hung, A. Alessandrini, and J. V. Bonventre. 2003. Cross-talk between cytosolic phospholipase A2 alpha (cPLA2 alpha) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA2 regulates cPLA2 alpha activity that is responsible for arachidonic acid release. *J Biol Chem* **278**: 24153-24163.
131. Ruiperez, V., A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Coordinate regulation of TLR-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A2s. *J Immunol* **182**: 3877-3883.
132. Balsinde, J., and M. A. Balboa. 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* **17**: 1052-1062.
133. Gil-de-Gomez, L., A. M. Astudillo, C. Guijas, V. Magrioti, G. Kokotos, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A2s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **192**: 752-762.
134. Perez, R., R. Melero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 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.
135. Balsinde, J., I. D. Bianco, E. J. Ackermann, K. Conde-Frieboes, and E. A. Dennis. 1995. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8527-8531.
136. Hui, D. Y. 2012. Phospholipase A(2) enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* **23**: 235-240.
137. Mancuso, D. J., X. Han, C. M. Jenkins, J. J. Lehman, N. Sambandam, H. F. Sims, J. Yang, W. Yan, K. Yang, K. Green, D. R. Abendschein, J. E. Saffitz, and R. W. Gross. 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.

138. Hanasaki, K., T. Ono, A. Saiga, Y. Morioka, M. Ikeda, K. Kawamoto, K. Higashino, K. Nakano, K. Yamada, J. Ishizaki, and H. Arita. 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.

139. Wooton-Kee, C. R., B. B. Boyanovsky, M. S. Nasser, W. J. de Villiers, and N. R. Webb. 2004. Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 762-767.

140. Ghesquiere, S. A., M. J. Gijbels, M. Anthonsen, P. J. van Gorp, I. van der Made, B. Johansen, M. H. Hofker, and M. P. de Winther. 2005. Macrophage-specific overexpression of group IIa sPLA2 increases atherosclerosis and enhances collagen deposition. *J Lipid Res* **46**: 201-210.

141. Turunen, P., J. Jalkanen, T. Heikura, H. Puhakka, J. Karppi, K. Nyysönen, and S. Ylä-Herttuala. 2004. Adenovirus-mediated gene transfer of Lp-PLA2 reduces LDL degradation and foam cell formation in vitro. *J Lipid Res* **45**: 1633-1639.

142. Ii, H., N. Yokoyama, S. Yoshida, K. Tsutsumi, S. Hatakeyama, T. Sato, K. Ishihara, and S. Akiba. 2009. Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A2-knockout mice. *PLoS One* **4**: e8089.

143. Gubern, A., M. Barcelo-Torns, D. Barneda, J. M. Lopez, R. Masgrau, F. Picatoste, C. E. Chalfant, J. Balsinde, M. A. Balboa, and E. Claro. 2009. JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A2. *J Biol Chem* **284**: 32359-32369.

144. Perez-Chacon, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 1103-1113.

145. Wooten, R. E., M. C. Willingham, L. W. Daniel, C. C. Leslie, L. C. Rogers, S. Sergeant, and J. T. O'Flaherty. 2008. Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2alpha fluorescent proteins. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 1544-1550.

146. Leslie, C. C., T. A. Gangelhoff, and M. H. Gelb. 2010. Localization and function of cytosolic phospholipase A2alpha at the Golgi. *Biochimie* **92**: 620-626.

147. Casas, J., C. Meana, E. Esquinas, M. Valdearcos, J. Pindado, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2009. Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A2 to phagosomes in human macrophages. *J Immunol* **183**: 2767-2774.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

148. Ha, K. D., B. A. Clarke, and W. J. Brown. 2012. Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1821**: 1078-1088.
149. Tabas, I. 2000. Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. *Biochim Biophys Acta* **1529**: 164-174.
150. Feng, B., P. M. Yao, Y. Li, C. M. Devlin, D. Zhang, H. P. Harding, M. Sweeney, J. X. Rong, G. Kuriakose, E. A. Fisher, A. R. Marks, D. Ron, and I. Tabas. 2003. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol* **5**: 781-792.
151. Kitatani, K., M. Nemoto, S. Akiba, and T. Sato. 2002. Stimulation by de novo-synthesized ceramide of phospholipase A(2)-dependent cholesterol esterification promoted by the uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Cell Signal* **14**: 695-701.
152. Panini, S. R., L. Yang, A. E. Rusinol, M. S. Sinensky, J. V. Bonventre, and C. C. Leslie. 2001. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *J Lipid Res* **42**: 1678-1686.
153. Halasiddappa, L. M., H. Koefeler, A. H. Futerman, and A. Hermetter. 2013. Oxidized phospholipids induce ceramide accumulation in RAW 264.7 macrophages: role of ceramide synthases. *PLoS One* **8**: e70002.
154. Stahelin, R. V., P. Subramanian, M. Vora, W. Cho, and C. E. Chalfant. 2007. Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase a2 via a novel site in the C2 domain. *J Biol Chem* **282**: 20467-20474.
155. Lamour, N. F., P. Subramanian, D. S. Wijesinghe, R. V. Stahelin, J. V. Bonventre, and C. E. Chalfant. 2009. Ceramide 1-phosphate is required for the translocation of group IVA cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin synthesis. *J Biol Chem* **284**: 26897-26907.
156. Huwiler, A., B. Johansen, A. Skarstad, and J. Pfeilschifter. 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.
157. Tyurin, V. A., N. Yanamala, Y. Y. Tyurina, J. Klein-Seetharaman, C. H. Macphee, and V. E. Kagan. 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

158. Akiba, S., H. Ii, Y. Yoneda, and T. Sato. 2004. Translocation of phospholipase A2 to membranes by oxidized LDL and hydroxyoctadecadienoic acid to contribute to cholesteryl ester formation. *Biochim Biophys Acta* **1686**: 77-84.
159. Casas, J., M. A. Gijon, A. G. Vigo, M. S. Crespo, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 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.
160. Subramanian, P., M. Vora, L. B. Gentile, R. V. Stahelin, and C. E. Chalfant. 2007. Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A2 via distinct and separate mechanisms. *J Lipid Res* **48**: 2701-2708.
161. Yao, Z., H. Zhou, D. Figeys, Y. Wang, and M. Sundaram. 2013. Microsome-associated luminal lipid droplets in the regulation of lipoprotein secretion. *Curr Opin Lipidol* **24**: 160-170.
162. Enomoto, N., K. Ikejima, S. Yamashina, A. Enomoto, T. Nishiura, T. Nishimura, D. A. Brenner, P. Schemmer, B. U. Bradford, C. A. Rivera, Z. Zhong, and R. G. Thurman. 2000. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G100-106.
163. Perez, S., P. Aspichueta, B. Ochoa, and Y. Chico. 2006. The 2-series prostaglandins suppress VLDL secretion in an inflammatory condition-dependent manner in primary rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 160-171.
164. Felmler, D. J., and T. F. Baumert. 2013. Hepatitis C virus co-opts innate immunity component for lipid droplet formation. *J Hepatol* **59**: 1118-1120.
165. Ishihara, K., K. Tachibana, A. Kuroda, A. Terakawa, S. Baba, S. Kanai, and S. Akiba. 2011. Triacylglycerol deposition with group IVC phospholipase A2 expression in oleate- and linoleate-stimulated Huh-7 hepatocytes. *Biol Pharm Bull* **34**: 191-196.
166. Han, X., H. Cheng, D. J. Mancuso, and R. W. Gross. 2004. Caloric restriction results in phospholipid depletion, membrane remodeling, and triacylglycerol accumulation in murine myocardium. *Biochemistry* **43**: 15584-15594.
167. Curfs, D. M., S. A. Ghesquiere, M. N. Vergouwe, I. van der Made, M. J. Gijbels, D. R. Greaves, J. S. Verbeek, M. H. Hofker, and M. P. de Winther. 2008. Macrophage secretory phospholipase A2 group X enhances anti-inflammatory responses, promotes lipid accumulation, and contributes to aberrant lung pathology. *J Biol Chem* **283**: 21640-21648.
168. Webb, N. R., M. A. Bostrom, S. J. Szilvassy, D. R. van der Westhuyzen, A. Daugherty, and F. C. de Beer. 2003. Macrophage-expressed group IIA secretory

phospholipase A2 increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 263-268.

169. Ishimoto, Y., K. Yamada, S. Yamamoto, T. Ono, M. Notoya, and K. Hanasaki. 2003. Group V and X secretory phospholipase A(2)s-induced modification of high-density lipoprotein linked to the reduction of its antiatherogenic functions. *Biochim Biophys Acta* **1642**: 129-138.

170. Tsimikas, S., L. D. Tsironis, and A. D. Tselepis. 2007. New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 2094-2099.

171. Abe, A., M. Hiraoka, and J. A. Shayman. 2007. A role for lysosomal phospholipase A2 in drug induced phospholipidosis. *Drug Metab Lett* **1**: 49-53.

172. Shayman, J. A., R. Kelly, J. Kollmeyer, Y. He, and A. Abe. 2011. Group XV phospholipase A(2), a lysosomal phospholipase A(2). *Prog Lipid Res* **50**: 1-13.

173. Guijas, C., J. P. Rodriguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochim Biophys Acta* **1841**: 1661-1671.

174. Boyanovsky, B. B., D. R. van der Westhuyzen, and N. R. Webb. 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.

175. Guan, M., L. Qu, W. Tan, L. Chen, and C. W. Wong. 2011. Hepatocyte nuclear factor-4 alpha regulates liver triglyceride metabolism in part through secreted phospholipase A(2) GXIIB. *Hepatology* **53**: 458-466.

176. Hodson, L., and F. Karpe. 2013. Is there something special about palmitoleate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **16**: 225-231.

177. Guillou, H., D. Zadavec, P. G. Martin, and A. Jacobsson. 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* **49**: 186-199.

178. Mozaffarian, D., H. Cao, I. B. King, R. N. Lemaitre, X. Song, D. S. Siscovick, and G. S. Hotamisligil. 2010. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am J Clin Nutr* **92**: 1350-1358.

179. Destailats, F., M. Guitard, and C. Cruz-Hernandez. 2011. Identification of Delta6-monounsaturated fatty acids in human hair and nail samples by gas-chromatography-mass-spectrometry using ionic-liquid coated capillary column. *J Chromatogr A* **1218**: 9384-9389.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

180. Longmuir, K. J., C. Resele-Tiden, and M. E. Rossi. 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.
181. Fischer, C. L., D. R. Blanchette, K. A. Brogden, D. V. Dawson, D. R. Drake, J. R. Hill, and P. W. Wertz. 2014. The roles of cutaneous lipids in host defense. *Biochim Biophys Acta* **1841**: 319-322.
182. Drake, D. R., K. A. Brogden, D. V. Dawson, and P. W. Wertz. 2008. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res* **49**: 4-11.
183. Mozaffarian, D., H. Cao, I. B. King, R. N. Lemaitre, X. Song, D. S. Siscovick, and G. S. Hotamisligil. 2010. Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: a cohort study. *Ann Intern Med* **153**: 790-799.
184. Cao, H., K. Gerhold, J. R. Mayers, M. M. Wiest, S. M. Watkins, and G. S. Hotamisligil. 2008. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* **134**: 933-944.
185. Dimopoulos, N., M. Watson, K. Sakamoto, and H. S. Hundal. 2006. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J* **399**: 473-481.
186. Sauma, L., K. G. Stenkula, P. Kjolhede, P. Stralfors, M. Soderstrom, and F. H. Nystrom. 2006. PPAR-gamma response element activity in intact primary human adipocytes: effects of fatty acids. *Nutrition* **22**: 60-68.
187. Maedler, K., J. Oberholzer, P. Bucher, G. A. Spinas, and M. Y. Donath. 2003. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* **52**: 726-733.
188. Erbay, E., V. R. Babaev, J. R. Mayers, L. Makowski, K. N. Charles, M. E. Snitow, S. Fazio, M. M. Wiest, S. M. Watkins, M. F. Linton, and G. S. Hotamisligil. 2009. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med* **15**: 1383-1391.
189. Stefan, N., K. Kantartzis, N. Celebi, H. Staiger, J. Machann, F. Schick, A. Cegan, M. Elcnerova, E. Schleicher, A. Fritsche, and H. U. Haring. 2010. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* **33**: 405-407.
190. Okada, T., N. Furuhashi, Y. Kuromori, M. Miyashita, F. Iwata, and K. Harada. 2005. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am J Clin Nutr* **82**: 747-750.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

191. Paillard, F., D. Catheline, F. L. Duff, M. Bouriel, Y. Deugnier, M. Pouchard, J. C. Daubert, and P. Legrand. 2008. Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **18**: 436-440.
192. Gong, J., H. Campos, S. McGarvey, Z. Wu, R. Goldberg, and A. Baylin. 2011. Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am J Clin Nutr* **93**: 186-191.
193. Samad, A., A. James, J. Wong, P. Mankad, J. Whitehouse, W. Patel, M. Alves-Simoes, A. K. Siriwardena, and J. I. Bruce. 2014. Insulin protects pancreatic acinar cells from palmitoleic acid-induced cellular injury. *J Biol Chem* **289**: 23582-23595.
194. Lee, J. J., J. E. Lambert, Y. Hovhannisyan, M. A. Ramos-Roman, J. R. Trombold, D. A. Wagner, and E. J. Parks. 2015. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr* **101**: 34-43.
195. Petersson, H., L. Lind, J. Hulthe, A. Elmgren, T. Cederholm, and U. Riserus. 2009. Relationships between serum fatty acid composition and multiple markers of inflammation and endothelial function in an elderly population. *Atherosclerosis* **203**: 298-303.
196. Warensjo, E., J. Sundstrom, B. Vessby, T. Cederholm, and U. Riserus. 2008. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. *Am J Clin Nutr* **88**: 203-209.
197. Fabbrini, E., F. Magkos, X. Su, N. A. Abumrad, N. Nejedly, C. C. Coughlin, A. L. Okunade, B. W. Patterson, and S. Klein. 2011. Insulin sensitivity is not associated with palmitoleate availability in obese humans. *J Lipid Res* **52**: 808-812.
198. Zong, G., X. Ye, L. Sun, H. Li, Z. Yu, F. B. Hu, Q. Sun, and X. Lin. 2012. Associations of erythrocyte palmitoleic acid with adipokines, inflammatory markers, and the metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. *Am J Clin Nutr* **96**: 970-976.
199. Zong, G., J. Zhu, L. Sun, X. Ye, L. Lu, Q. Jin, H. Zheng, Z. Yu, Z. Zhu, H. Li, Q. Sun, and X. Lin. 2013. Associations of erythrocyte fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of metabolic syndrome in a cohort study of middle-aged and older Chinese. *Am J Clin Nutr* **98**: 319-326.
200. Guo, X., H. Li, H. Xu, V. Halim, W. Zhang, H. Wang, K. T. Ong, S. L. Woo, R. L. Walzem, D. G. Mashek, H. Dong, F. Lu, L. Wei, Y. Huo, and C. Wu. 2012. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS One* **7**: e39286.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

201. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Pena, L. Gil-de-Gomez, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J Biol Chem* **287**: 10894-10904.
202. Talbot, N. A., C. P. Wheeler-Jones, and M. E. Cleasby. 2014. Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance.
203. Souza, C. O., A. A. Teixeira, E. A. Lima, H. A. Batatinha, L. M. Gomes, M. Carvalho-Silva, I. T. Mota, E. L. Streck, S. M. Hirabara, and J. C. Rosa Neto. 2014. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPARalpha. *Mediators Inflamm* **2014**: 582197.
204. Chan, K. L., N. J. Pilon, D. M. Sivaloganathan, S. R. Costford, Z. Liu, M. Theret, B. Chazaud, and A. Klip. 2015. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *J Biol Chem* **290**: 16979-16988.
205. Pardo, V., A. Gonzalez-Rodriguez, C. Guijas, J. Balsinde, and A. M. Valverde. 2015. Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation. *J Biol Chem* **290**: 11663-11677.
206. Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **122**: 787-795.
207. Oh, D. Y., S. Talukdar, E. J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, P. Li, W. J. Lu, S. M. Watkins, and J. M. Olefsky. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**: 687-698.
208. Kim, N., J. O. Lee, H. J. Lee, H. I. Kim, J. K. Kim, Y. W. Lee, S. K. Lee, S. J. Kim, S. H. Park, and H. S. Kim. 2015. Endogenous Ligand for GPR120, Docosahexaenoic Acid, Exerts Benign Metabolic Effects on the Skeletal Muscles via AMP-activated Protein Kinase Pathway. *J Biol Chem* **290**: 20438-20447.
209. Perreault, M., K. Roke, A. Badawi, D. E. Nielsen, S. A. Abdelmagid, A. El-Sohemy, D. W. Ma, and D. M. Mutch. 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.
210. Koeberle, A., H. Shindou, T. Harayama, and T. Shimizu. 2012. Palmitoleate is a mitogen, formed upon stimulation with growth factors, and converted to palmitoleoyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem* **287**: 27244-27254.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

211. Koeberle, A., C. Pergola, H. Shindou, S. C. Koeberle, T. Shimizu, S. A. Laufer, and O. Werz. 2015. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in linking stearyl-CoA desaturase-1 activity with endoplasmic reticulum homeostasis. *FASEB J* **29**: 2439-2449.
212. Yore, M. M., I. Syed, P. M. Moraes-Vieira, T. Zhang, M. A. Herman, E. A. Homan, R. T. Patel, J. Lee, S. Chen, O. D. Peroni, A. S. Dhaneshwar, A. Hammarstedt, U. Smith, T. E. McGraw, A. Saghatelian, and B. B. Kahn. 2014. Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. *Cell* **159**: 318-332.
213. Arsic, B., Y. Zhu, D. E. Heinrichs, and M. J. McGavin. 2012. Induction of the staphylococcal proteolytic cascade by antimicrobial fatty acids in community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **7**: e45952.
214. Takigawa, H., H. Nakagawa, M. Kuzukawa, H. Mori, and G. Imokawa. 2005. Deficient production of hexadecenoic acid in the skin is associated in part with the vulnerability of atopic dermatitis patients to colonization by *Staphylococcus aureus*. *Dermatology* **211**: 240-248.
215. Mozaffarian, D., M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer, and W. C. Willett. 2006. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **354**: 1601-1613.
216. Tremblay, A., and J. A. Gilbert. 2009. Milk products, insulin resistance syndrome and type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr* **28 Suppl 1**: 91S-102S.
217. Paul, W. 1990. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Reviews of Modern Physics* **62**: 531-540.
218. de Hoffmann, E., and V. Stroobant. 1999. *Mass Spectrometry, Principles and Applications* Wiley.
219. Fenn, J., M. Mann, C. Meng, S. Wong, and C. Whitehouse. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64-71.
220. Glish, G. L., and R. W. Vachet. 2003. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 140-150.
221. Dennis, E. A., A. W. Gundlach-Graham, C. G. Enke, S. J. Ray, A. J. Carado, C. J. Barinaga, D. W. Koppenaal, and G. M. Hieftje. 2013. How constant momentum acceleration decouples energy and space focusing in distance-of-flight and time-of-flight mass spectrometries. *J Am Soc Mass Spectrom* **24**: 690-700.
222. Dennis, E. A. 2009. Lipidomics joins the omics evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2089-2090.
223. Dennis, E. A., R. A. Deems, R. Harkewicz, O. Quehenberger, H. A. Brown, S. B. Milne, D. S. Myers, C. K. Glass, G. Hardiman, D. Reichart, A. H. Merrill, Jr., M. C. Sullards,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- E. Wang, R. C. Murphy, C. R. Raetz, T. A. Garrett, Z. Guan, A. C. Ryan, D. W. Russell, J. G. McDonald, B. M. Thompson, W. A. Shaw, M. Sud, Y. Zhao, S. Gupta, M. R. Maurya, E. Fahy, and S. Subramaniam. 2010. A mouse macrophage lipidome. *J Biol Chem* **285**: 39976-39985.
224. Christie, W. W. 1998. Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33**: 343-353.
225. Murphy, R. C. 1993. Mass spectrometry of lipids Plenum Press.
226. Murphy, R. C. 2014. Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids Royal Society of Chemistry.
227. Eder, K. 1995. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J Chromatogr B Biomed Appl* **671**: 113-131.
228. Francis, G. W. 1981. Alkylthiolation for the determination of double-bond position in unsaturated fatty acid esters. *Chemistry and Physics of Lipids* **29**: 369-374.
229. Andersson, B. A. 1978. Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides. *Prog Chem Fats Other Lipids* **16**: 279-308.
230. Harvey, D. J. 1998. Picolinyl esters for the structural determination of fatty acids by GC/MS. *Mol Biotechnol* **10**: 251-260.
231. Hamilton, J. T., and W. W. Christie. 2000. Mechanisms for ion formation during the electron impact-mass spectrometry of picolinyl ester and 4,4-dimethyloxazoline derivatives of fatty acids. *Chem Phys Lipids* **105**: 93-104.
232. Spitzer, V. 1996. Structure analysis of fatty acids by gas chromatography--low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives--a review. *Prog Lipid Res* **35**: 387-408.
233. Svetashev, V. I. 2011. Mild method for preparation of 4,4-dimethyloxazoline derivatives of polyunsaturated fatty acids for GC-MS. *Lipids* **46**: 463-467.
234. Van Pelt, C. K., B. K. Carpenter, and J. T. Brenna. 1999. Studies of structure and mechanism in acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *J Am Soc Mass Spectrom* **10**: 1253-1262.
235. Sundstrom, C., and K. Nilsson. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **17**: 565-577.
236. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.
237. Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**: 497-509.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

238. Fuchs, B., R. Suss, K. Teuber, M. Eibisch, and J. Schiller. 2011. Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. *J Chromatogr A* **1218**: 2754-2774.
239. Ichihara, K., C. Yamaguchi, H. Nishijima, and K. Saito. 2003. Preparation of FAME from sterol esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**: 833-834.
240. Abu, E. O., and I. Oluwatowaju. 2009. Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **80**: 189-194.
241. Zhang, J. Y., Q. T. Yu, B. N. Liu, and Z. H. Huang. 1988. Chemical modification in mass spectrometry IV—2-alkenyl-4,4-dimethyloxazolines as derivatives for the double bond location of long-chain olefinic acids. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry* **15**: 33-44.
242. Christie, W. W., G. W. Robertson, W. C. McRoberts, and J. T. G. Hamilton. 2000. Mass spectrometry of the 4,4-dimethyloxazoline derivatives of isomeric octadecenoates (monoenes). *European Journal of Lipid Science and Technology* **102**: 23-29.
243. Fay, L., and U. Richli. 1991. Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethyloxazoline derivatization. *Journal of Chromatography A* **541**: 89-98.
244. McLafferty, F. W. 1959. Mass Spectrometric Analysis. Molecular Rearrangements. *Analytical Chemistry* **31**: 82-87.
245. Axelsen, P. H., and R. C. Murphy. 2010. Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J Lipid Res* **51**: 660-671.
246. Hsu, F. F., and J. Turk. 2009. Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: mechanisms of fragmentation and structural characterization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 2673-2695.
247. Hsu, F. F., and J. Turk. 2000. Charge-remote and charge-driven fragmentation processes in diacyl glycerophosphoethanolamine upon low-energy collisional activation: a mechanistic proposal. *J Am Soc Mass Spectrom* **11**: 892-899.
248. Pulfer, M., and R. C. Murphy. 2003. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev* **22**: 332-364.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

249. 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.
250. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
251. Rio, D. C., M. Ares, Jr., G. J. Hannon, and T. W. Nilsen. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* **2010**: pdb prot5439.
252. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
253. Spangenburg, E. E., S. J. Pratt, L. M. Wohlers, and R. M. Lovering. 2011. Use of BODIPY (493/503) to visualize intramuscular lipid droplets in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 598358.
254. Celada, A., A. Cruchaud, and L. H. Perrin. 1983. Assessment of immune phagocytosis of Plasmodium falciparum infected red blood cells by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. A method for visualizing infected red blood cells ingested by phagocytes. *J Immunol Methods* **63**: 263-271.
255. Diez, E., F. H. Chilton, G. Stroup, R. J. Mayer, J. D. Winkler, and A. N. Fonteh. 1994. Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A2 enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate. *Biochem J* **301 (Pt 3)**: 721-726.
256. Winkler, J. D., C. M. Sung, C. F. Bennett, and F. H. Chilton. 1991. Characterization of CoA-independent transacylase activity in U937 cells. *Biochim Biophys Acta* **1081**: 339-346.
257. Ma, J., R. Yan, X. Zu, J. M. Cheng, K. Rao, D. F. Liao, and D. Cao. 2008. Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells. *J Biol Chem* **283**: 3418-3423.
258. Antinozzi, P. A., L. Segall, M. Prentki, J. D. McGarry, and C. B. Newgard. 1998. Molecular or pharmacologic perturbation of the link between glucose and lipid metabolism is without effect on glucose-stimulated insulin secretion. A re-evaluation of the long-chain acyl-CoA hypothesis. *J Biol Chem* **273**: 16146-16154.
259. Boullier, A., Y. Li, O. Quehenberger, W. Palinski, I. Tabas, J. L. Witztum, and Y. I. Miller. 2006. Minimally oxidized LDL offsets the apoptotic effects of extensively oxidized LDL and free cholesterol in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 1169-1176.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

260. Gillotte-Taylor, K., A. Boullier, J. L. Witztum, D. Steinberg, and O. Quehenberger. 2001. Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* **42**: 1474-1482.
261. Fahy, E., S. Subramaniam, R. C. Murphy, M. Nishijima, C. R. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. J. Wakelam, and E. A. Dennis. 2009. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **50 Suppl**: S9-14.
262. Tomoda, H., K. Igarashi, and S. Omura. 1987. Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins. *Biochim Biophys Acta* **921**: 595-598.
263. Grevenkoed, T. J., E. L. Klett, and R. A. Coleman. 2014. Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annu Rev Nutr* **34**: 1-30.
264. Igal, R. A., P. Wang, and R. A. Coleman. 1997. Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA. *Biochem J* **324 (Pt 2)**: 529-534.
265. Perez, R., X. Matabosch, A. Llebaria, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2006. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J Lipid Res* **47**: 484-491.
266. Fujimoto, Y., H. Itabe, T. Kinoshita, K. J. Homma, J. Onoduka, M. Mori, S. Yamaguchi, M. Makita, Y. Higashi, A. Yamashita, and T. Takano. 2007. Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. *J Lipid Res* **48**: 1280-1292.
267. Kim, K. H. 1997. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* **17**: 77-99.
268. Wakil, S. J., and L. A. Abu-Elheiga. 2009. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res* **50 Suppl**: S138-143.
269. Jensen-Urstad, A. P., and C. F. Semenkovich. 2012. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta* **1821**: 747-753.
270. Chirala, S. S., and S. J. Wakil. 2004. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* **39**: 1045-1053.
271. Jakobsson, A., R. Westerberg, and A. Jacobsson. 2006. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* **45**: 237-249.
272. Horton, J. D., N. A. Shah, J. A. Warrington, N. N. Anderson, S. W. Park, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12027-12032.

273. Horton, J. D. 2002. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* **30**: 1091-1095.
274. Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**: 331-340.
275. Guseva, N. V., O. W. Rokhlin, R. A. Glover, and M. B. Cohen. 2011. TOFA (5-tetradecyl-oxy-2-furoic acid) reduces fatty acid synthesis, inhibits expression of AR, neuropilin-1 and Mcl-1 and kills prostate cancer cells independent of p53 status. *Cancer Biol Ther* **12**: 80-85.
276. Kamisuki, S., Q. Mao, L. Abu-Elheiga, Z. Gu, A. Kugimiya, Y. Kwon, T. Shinohara, Y. Kawazoe, S. Sato, K. Asakura, H. Y. Choo, J. Sakai, S. J. Wakil, and M. Uesugi. 2009. A small molecule that blocks fat synthesis by inhibiting the activation of SREBP. *Chem Biol* **16**: 882-892.
277. Shimizu, T. 2009. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 123-150.
278. Du, L., R. W. Hickey, H. Bayir, S. C. Watkins, V. A. Tyurin, F. Guo, P. M. Kochanek, L. W. Jenkins, J. Ren, G. Gibson, C. T. Chu, V. E. Kagan, and R. S. Clark. 2009. Starving neurons show sex difference in autophagy. *J Biol Chem* **284**: 2383-2396.
279. Ono, T., K. Yamada, Y. Chikazawa, M. Ueno, S. Nakamoto, T. Okuno, and K. Seno. 2002. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A2alpha, pyrrophenone. *Biochem J* **363**: 727-735.
280. Flamand, N., S. Picard, L. Lemieux, M. Pouliot, S. G. Bourgoin, and P. Borgeat. 2006. Effects of pyrrophenone, an inhibitor of group IVA phospholipase A2, on eicosanoid and PAF biosynthesis in human neutrophils. *Br J Pharmacol* **149**: 385-392.
281. Leslie, C. C. 1997. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **272**: 16709-16712.
282. Gijon, M. A., D. M. Spencer, A. L. Kaiser, and C. C. Leslie. 1999. Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Cell Biol* **145**: 1219-1232.
283. Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, and A. R. Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**: 27489-27494.

284. Cuenda, A., J. Rouse, Y. N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T. F. Gallagher, P. R. Young, and J. C. Lee. 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* **364**: 229-233.
285. Bennett, B. L., D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning, and D. W. Anderson. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13681-13686.
286. Astudillo, A. M., G. Perez-Chacon, D. Balgoma, L. Gil-de-Gomez, V. Ruiperez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim Biophys Acta* **1811**: 97-103.
287. Balgoma, D., O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2008. Calcium-independent phospholipase A₂-mediated formation of 1,2-diarachidonoyl-glycerophosphoinositol in monocytes. *FEBS J* **275**: 6180-6191.
288. Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo, and J. L. Witztum. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **320**: 915-924.
289. Szilagyi, K., A. B. Meijer, A. E. Neele, P. Verkuijden, M. Leitges, S. Dabernat, E. Forster-Waldl, K. Boztug, A. Belot, T. W. Kuijpers, G. Kraal, M. P. de Winther, and T. K. van den Berg. 2014. PKCdelta is dispensible for oxLDL uptake and foam cell formation by human and murine macrophages. *Cardiovasc Res* **104**: 467-476.
290. Esterbauer, H., G. Striegl, H. Puhl, and M. Rotheneder. 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* **6**: 67-75.
291. Hutchins, P. M., E. E. Moore, and R. C. Murphy. 2011. Electrospray MS/MS reveals extensive and nonspecific oxidation of cholesterol esters in human peripheral vascular lesions. *J Lipid Res* **52**: 2070-2083.
292. Riccioni, G., M. Back, and V. Capra. 2010. Leukotrienes and atherosclerosis. *Curr Drug Targets* **11**: 882-887.
293. Pratico, D. 2008. Prostanoid and isoprostanoid pathways in atherogenesis. *Atherosclerosis* **201**: 8-16.
294. Gomez, I., N. Foudi, D. Longrois, and X. Norel. 2013. The role of prostaglandin E₂ in human vascular inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **89**: 55-63.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

295. Astudillo, A. M., G. Perez-Chacon, C. Meana, D. Balgoma, A. Pol, M. A. del Pozo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Altered Arachidonate Distribution in Macrophages from Caveolin-1 Null Mice Leading to Reduced Eicosanoid Synthesis. *J. Biol. Chem.* **286**: 35299-35307.
296. Fardin-Kia, A. R., P. Delmonte, J. K. Kramer, G. Jahreis, K. Kuhnt, V. Santercole, and J. I. Rader. 2013. Separation of the fatty acids in menhaden oil as methyl esters with a highly polar ionic liquid gas chromatographic column and identification by time of flight mass spectrometry. *Lipids* **48**: 1279-1295.
297. Kennedy, E. P., and S. B. Weiss. 1956. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* **222**: 193-214.
298. Chilton, F. H., A. N. Fonteh, M. E. Surette, M. Triggiani, and J. D. Winkler. 1996. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta* **1299**: 1-15.
299. Lands, W. E. 1958. Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J Biol Chem* **231**: 883-888.
300. Neubert, T. A., R. S. Johnson, J. B. Hurley, and K. A. Walsh. 1992. The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. *J Biol Chem* **267**: 18274-18277.
301. DeMar, J. C., Jr., T. G. Wensel, and R. E. Anderson. 1996. Biosynthesis of the unsaturated 14-carbon fatty acids found on the N termini of photoreceptor-specific proteins. *J Biol Chem* **271**: 5007-5016.
302. DeMar, J. C., Jr., and R. E. Anderson. 1997. Identification and quantitation of the fatty acids composing the CoA ester pool of bovine retina, heart, and liver. *J Biol Chem* **272**: 31362-31368.
303. Ecker, J., and G. Liebisch. 2014. Application of stable isotopes to investigate the metabolism of fatty acids, glycerophospholipid and sphingolipid species. *Prog Lipid Res* **54**: 14-31.
304. Lopaschuk, G. D., S. R. Wall, P. M. Olley, and N. J. Davies. 1988. Etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase I inhibitor, protects hearts from fatty acid-induced ischemic injury independent of changes in long chain acylcarnitine. *Circ Res* **63**: 1036-1043.
305. Schlaepfer, I. R., L. Rider, L. U. Rodrigues, M. A. Gijon, C. T. Pac, L. Romero, A. Cimic, S. J. Sirintrapun, L. M. Glode, R. H. Eckel, and S. D. Cramer. 2014. Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Mol Cancer Ther* **13**: 2361-2371.

306. Selby, P. L., and H. S. Sherratt. 1989. Substituted 2-oxiranecarboxylic acids: a new group of candidate hypoglycaemic drugs. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 495-500.
307. Hunt, M. C., V. Tillander, and S. E. Alexson. 2014. Regulation of peroxisomal lipid metabolism: the role of acyl-CoA and coenzyme A metabolizing enzymes. *Biochimie* **98**: 45-55.
308. Wanders, R. J. 2014. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* **98**: 36-44.
309. Bannenberg, G. L., N. Chiang, A. Ariel, M. Arita, E. Tjonahen, K. H. Gotlinger, S. Hong, and C. N. Serhan. 2005. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* **174**: 4345-4355.
310. Snodgrass, R. G., S. Huang, I. W. Choi, J. C. Rutledge, and D. H. Hwang. 2013. Inflammasome-mediated secretion of IL-1beta in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol* **191**: 4337-4347.
311. Serhan, C. N. 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**: 92-101.
312. Meana, C., L. Pena, G. Lorden, E. Esquinas, C. Guijas, M. Valdearcos, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2014. Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J Immunol* **193**: 4614-4622.
313. Rossi, J. F., Z. Y. Lu, M. Jourdan, and B. Klein. 2015. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin Cancer Res* **21**: 1248-1257.
314. Quehenberger, O., A. M. Armando, A. H. Brown, S. B. Milne, D. S. Myers, A. H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K. N. Jones, S. Kelly, R. L. Shaner, C. M. Sullards, E. Wang, R. C. Murphy, R. M. Barkley, T. J. Leiker, C. R. Raetz, Z. Guan, G. M. Laird, D. A. Six, D. W. Russell, J. G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, and E. A. Dennis. 2010. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res* **51**: 3299-3305.
315. Namatame, I., H. Tomoda, H. Arai, K. Inoue, and S. Omura. 1999. Complete inhibition of mouse macrophage-derived foam cell formation by triacsin C. *J Biochem* **125**: 319-327.
316. Dichlberger, A., S. Schlager, J. Lappalainen, R. Kakela, K. Hattula, S. J. Butcher, W. J. Schneider, and P. T. Kovanen. 2011. Lipid body formation during maturation of human mast cells. *J Lipid Res* **52**: 2198-2208.
317. Leiguez, E., K. C. Giannotti, V. Moreira, M. H. Matsubara, J. M. Gutierrez, B. Lomonte, J. P. Rodriguez, J. Balsinde, and C. Teixeira. 2014. Critical Role of TLR2 and

MyD88 for Functional Response of Macrophages to a Group IIA-Secreted Phospholipase A2 from Snake Venom. *PLoS One* **9**: e93741.

318. Calabresi, L., S. Simonelli, M. Gomaschi, and G. Franceschini. 2012. Genetic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **222**: 299-306.

319. Zhang, G. H., J. X. Lu, Y. Chen, P. H. Guo, Z. L. Qiao, R. F. Feng, S. E. Chen, J. L. Bai, S. D. Huo, and Z. R. Ma. 2015. ChREBP and LXRA α mediate synergistically lipogenesis induced by glucose in porcine adipocytes. *Gene* **565**: 30-38.

320. Xu, J., M. T. Nakamura, H. P. Cho, and S. D. Clarke. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem* **274**: 23577-23583.

321. Mater, M. K., A. P. Thelen, and D. B. Jump. 1999. Arachidonic acid and PGE2 regulation of hepatic lipogenic gene expression. *J Lipid Res* **40**: 1045-1052.

322. Mutch, D. M., M. Grigorov, A. Berger, L. B. Fay, M. A. Roberts, S. M. Watkins, G. Williamson, and J. B. German. 2005. An integrative metabolism approach identifies stearoyl-CoA desaturase as a target for an arachidonate-enriched diet. *FASEB J* **19**: 599-601.

323. Ramanadham, S., S. Zhang, Z. Ma, M. Wohltmann, A. Bohrer, F. F. Hsu, and J. Turk. 2002. Delta6-, Stearoyl CoA-, and Delta5-desaturase enzymes are expressed in beta-cells and are altered by increases in exogenous PUFA concentrations. *Biochim Biophys Acta* **1580**: 40-56.

324. Foley, J. E. 1992. Rationale and application of fatty acid oxidation inhibitors in treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **15**: 773-784.

325. Holubarsch, C. J., M. Rohrbach, M. Karrasch, E. Boehm, L. Polonski, P. Ponikowski, and S. Rhein. 2007. A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study. *Clinical science* **113**: 205-212.

326. Ameer, F., L. Scandiuzzi, S. Hasnain, H. Kalbacher, and N. Zaidi. 2014. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* **63**: 895-902.

327. Watkins, P. A., D. Maignel, Z. Jia, and J. Pevsner. 2007. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J Lipid Res* **48**: 2736-2750.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

328. Ellis, J. M., J. L. Frahm, L. O. Li, and R. A. Coleman. 2010. Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr Opin Lipidol* **21**: 212-217.
329. Cooper, D. E., P. A. Young, E. L. Klett, and R. A. Coleman. 2015. Physiological Consequences of Compartmentalized Acyl-CoA Metabolism. *J Biol Chem* **290**: 20023-20031.
330. Lewin, T. M., J. H. Kim, D. A. Granger, J. E. Vance, and R. A. Coleman. 2001. Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem* **276**: 24674-24679.
331. Balsinde, J., M. A. Balboa, W. H. Li, J. Llopis, and E. A. Dennis. 2000. Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A2 by phosphatidylinositol bisphosphate levels. *J Immunol* **164**: 5398-5402.
332. Gijon, M. A., D. M. Spencer, A. R. Siddiqi, J. V. Bonventre, and C. C. Leslie. 2000. Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation. *J Biol Chem* **275**: 20146-20156.
333. Aimond, F., J. M. Rauzier, C. Bony, and G. Vassort. 2000. Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K⁺ current ITREK in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **275**: 39110-39116.
334. Berenbaum, F., L. Humbert, G. Bereziat, and S. Thirion. 2003. Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes. *J Biol Chem* **278**: 13680-13687.
335. Han, H. J., M. J. Lim, and Y. J. Lee. 2004. Oxalate inhibits renal proximal tubule cell proliferation via oxidative stress, p38 MAPK/JNK, and cPLA2 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: C1058-1066.
336. Brown, W. J., K. Chambers, and A. Doody. 2003. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* **4**: 214-221.
337. San Pietro, E., M. Capestrano, E. V. Polishchuk, A. DiPentima, A. Trucco, P. Zizza, S. Mariggio, T. Pulvirenti, M. Sallese, S. Tete, A. A. Mironov, C. C. Leslie, D. Corda, A. Luini, and R. S. Polishchuk. 2009. Group IV phospholipase A(2)alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport. *PLoS Biol* **7**: e1000194.
338. Fuller, N., and R. P. Rand. 2001. The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys J* **81**: 243-254.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

339. Kooijman, E. E., V. Chupin, N. L. Fuller, M. M. Kozlov, B. de Kruijff, K. N. Burger, and P. R. Rand. 2005. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* **44**: 2097-2102.
340. Zanghellini, J., F. Wodlei, and H. H. von Grunberg. 2010. Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet. *J Theor Biol* **264**: 952-961.
341. Astudillo, A. M., D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta* **1821**: 249-256.
342. Moessinger, C., K. Klizaite, A. Steinhagen, J. Philippou-Massier, A. Shevchenko, M. Hoch, C. S. Ejsing, and C. Thiele. 2014. Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage. *BMC Cell Biol* **15**: 43.
343. Adeyo, O., P. J. Horn, S. Lee, D. D. Binns, A. Chandrahas, K. D. Chapman, and J. M. Goodman. 2011. The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* **192**: 1043-1055.
344. Cohen, B. C., A. Shamay, and N. Argov-Argaman. 2015. Regulation of lipid droplet size in mammary epithelial cells by remodeling of membrane lipid composition-a potential mechanism. *PLoS One* **10**: e0121645.
345. Asmis, R., and J. Jelk. 2000. Vitamin E supplementation of human macrophages prevents neither foam cell formation nor increased susceptibility of foam cells to lysis by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 2078-2086.
346. Geng, Y., T. Kodama, and G. K. Hansson. 1994. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb* **14**: 798-806.
347. Dennis, E. A., and P. C. Norris. 2015. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **15**: 511-523.
348. Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, and R. M. Evans. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**: 803-812.
349. Huang, J. T., J. S. Welch, M. Ricote, C. J. Binder, T. M. Willson, C. Kelly, J. L. Witztum, C. D. Funk, D. Conrad, and C. K. Glass. 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400**: 378-382.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

350. Bermúdez Arias, M. Á. 2015. Mecanismos de activación de monocitos humanos por derivados oxidados del ácido araquidónico. *Trabajo Fin de Master, Universidad de Valladolid*.
351. Ii, H., S. Hatakeyama, K. Tsutsumi, T. Sato, and S. Akiba. 2008. Group IVA phospholipase A2 is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver. *Prostaglandins & other lipid mediators* **86**: 12-17.
352. Ishihara, K., A. Miyazaki, T. Nabe, H. Fushimi, N. Iriyama, S. Kanai, T. Sato, N. Uozumi, T. Shimizu, and S. Akiba. 2012. Group IVA phospholipase A2 participates in the progression of hepatic fibrosis. *FASEB J* **26**: 4111-4121.
353. Ii, H., N. Hontani, I. Toshida, M. Oka, T. Sato, and S. Akiba. 2008. Group IVA phospholipase A2-associated production of MMP-9 in macrophages and formation of atherosclerotic lesions. *Biol Pharm Bull* **31**: 363-368.
354. Stoekenbroek, R. M., J. J. Kastelein, and G. K. Hovingh. 2013. Recent failures in antiatherosclerotic drug development: examples from the thyroxin receptor agonist, the secretory phospholipase A2 antagonist, and the acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor programs. *Curr Opin Lipidol* **24**: 459-466.
355. Stafforini, D. M., and G. A. Zimmerman. 2014. Unraveling the PAF-AH/Lp-PLA2 controversy. *J Lipid Res* **55**: 1811-1814.
356. Wu, J. H., R. N. Lemaitre, F. Imamura, I. B. King, X. Song, D. Spiegelman, D. S. Siscovick, and D. Mozaffarian. 2011. Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr* **94**: 431-438.
357. King, I. B., R. N. Lemaitre, and M. Kestin. 2006. Effect of a low-fat diet on fatty acid composition in red cells, plasma phospholipids, and cholesterol esters: investigation of a biomarker of total fat intake. *Am J Clin Nutr* **83**: 227-236.
358. Ma, W., J. H. Wu, Q. Wang, R. N. Lemaitre, K. J. Mukamal, L. Djousse, I. B. King, X. Song, M. L. Biggs, J. A. Delaney, J. R. Kizer, D. S. Siscovick, and D. Mozaffarian. 2015. Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr* **101**: 153-163.
359. Lemaitre, R. N., I. B. King, N. Sotoodehnia, R. H. Knopp, D. Mozaffarian, B. McKnight, T. D. Rea, K. Rice, Y. Friedlander, T. S. Lumley, T. E. Raghunathan, M. K. Copass, and D. S. Siscovick. 2010. Endogenous red blood cell membrane fatty acids and sudden cardiac arrest. *Metabolism* **59**: 1029-1034.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

360. Dai, L., C. M. Goncalves, Z. Lin, J. Huang, H. Lu, L. Yi, Y. Liang, D. Wang, and D. An. 2015. Exploring metabolic syndrome serum free fatty acid profiles based on GC-SIM-MS combined with random forests and canonical correlation analysis. *Talanta* **135**: 108-114.
361. Quehenberger, O., A. M. Armando, and E. A. Dennis. 2011. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **1811**: 648-656.
362. Kunau, W. H., V. Dommès, and H. Schulz. 1995. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* **34**: 267-342.
363. Rufer, A. C., R. Thoma, and M. Hennig. 2009. Structural insight into function and regulation of carnitine palmitoyltransferase. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2489-2501.
364. Zammit, V. A. 2008. Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life* **60**: 347-354.
365. Antonenkov, V. D., and J. K. Hiltunen. 2012. Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim Biophys Acta* **1822**: 1374-1386.
366. Galluzzi, L., O. Kepp, M. G. Vander Heiden, and G. Kroemer. 2013. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 829-846.
367. Barbosa, A. D., D. B. Savage, and S. Siniosoglou. 2015. Lipid droplet-organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **35**: 91-97.
368. Goodman, J. M. 2008. The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem* **283**: 28005-28009.
369. Herms, A., M. Bosch, B. J. Reddy, N. L. Schieber, A. Fajardo, C. Ruperez, A. Fernandez-Vidal, C. Ferguson, C. Rentero, F. Tebar, C. Enrich, R. G. Parton, S. P. Gross, and A. Pol. 2015. AMPK activation promotes lipid droplet dispersion on detyrosinated microtubules to increase mitochondrial fatty acid oxidation. *Nat Commun* **6**: 7176.
370. Muldoon, M. F., B. Laderian, D. C. Kuan, S. M. Sereika, A. L. Marsland, and S. B. Manuck. 2015. Fish oil supplementation does not lower C-reactive protein or interleukin-6 levels in healthy adults. *J Intern Med*.
371. Tomasdottir, V., A. Vikingsson, J. Freysdottir, and I. Hardardottir. 2013. Dietary fish oil reduces the acute inflammatory response and enhances resolution of antigen-induced peritonitis. *J Nutr Biochem* **24**: 1758-1765.
372. Kim, J., M. E. Carlson, G. A. Kuchel, J. W. Newman, and B. A. Watkins. 2015. Dietary DHA reduces downstream endocannabinoid and inflammatory gene expression and epididymal fat mass while improving aspects of glucose use in muscle in C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond)*.

