



Universidad de Valladolid

Caracterización de las especies de fosfolípidos en macrófagos de ratón por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

ALUMNO: JUAN GONZÁLEZ VALDIVIESO

TUTOR: JESÚS BALSINDE RODRÍGUEZ

Índice:

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 4 |
| 1.1. Consideraciones previas y nomenclatura | 4 |
| 1.2. El ácido araquidónico y su movilización en células inflamatorias | 5 |
| 1.3. Cromatografía líquida de alta resolución | 9 |
| 1.4. Espectrometría de masas | 10 |
| 2. Objetivos | 11 |
| 3. Materiales y métodos | 12 |
| 4. Resultados | 15 |
| 5. Discusión | 23 |
| 6. Conclusiones | 26 |
| 7. Bibliografía | 27 |

Lista de abreviaturas:

| | |
|-------------------|---|
| AA | Ácido araquidónico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CoA | Coenzima A |
| cPLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ citosólica dependiente de calcio |
| CoA-IT | Transacilasa independiente de coenzima A |
| CR3 | Receptor 3 del complemento |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| ESI | Ionización por electrospray |
| FBS | Suero fetal bovino |
| GC | Cromatografía de gases |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| iPLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ citosólica independiente de calcio |
| IUPAC | Unión internacional de química pura y aplicada |
| LC | Cromatografía líquida |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MS | Espectrometría de masas |
| m/z | masa/carga |
| PAF | Factor activador de plaquetas |
| PC | Fosfatidilcolina |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PGG ₂ | Prostaglandina G ₂ |
| PGH ₂ | Prostaglandina H ₂ |
| PI | Fosfatidilinositol |
| PKC | Proteína Kinasa C |
| PLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ |
| PMA | Forbol miristato acetato |
| PS | Fosfatidiserina |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| TLC | Cromatografía en capa fina |
| TLR | Receptor tipo Toll |
| TXA ₂ | Tromboxano A ₂ |

1. Introducción

1.1 Consideraciones previas y nomenclatura:

Los ácidos grasos se abrevian en función del número de carbonos y de dobles enlaces que poseen. De acuerdo con la nomenclatura recomendada por la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), el nombre abreviado de los ácidos grasos consta del número de carbonos de la cadena hidrocarbonada, seguido del número de dobles enlaces existentes entre los carbonos. Finalmente, se indica la familia a la que pertenece el ácido graso, para lo cual se calcula el número de carbonos que hay entre el último doble enlace y el metilo terminal de la molécula. Para ello se resta al número total de carbonos de la molécula (n) el número del carbono en el que se halla el último doble enlace. En el caso, por ejemplo, del ácido araquidónico, el cálculo es el siguiente: 20 (número de carbonos) – 14 (número del carbono del último doble enlace) = 6 (número de carbonos existente entre el carbono del último doble enlace y el carbono final). Por lo tanto, la forma corta de nombrar al ácido araquidónico sería (20:4 n -6) (Figura 1).

Una nomenclatura muy extendida pero desaconsejada por la IUPAC (aunque a efectos prácticos las diferencias son mínimas), es la nomenclatura omega (ω), mediante la cual los ácidos grasos insaturados se clasifican en familias dependiendo del carbono en el que se localiza el primer doble enlace contando desde el final de la molécula (lo que va en contra de las recomendaciones de la IUPAC). De esta forma, el último doble enlace del ácido araquidónico se localiza en el sexto carbono desde el final, por lo que este ácido es del tipo omega-6 (ω -6).

Por otro lado, los glicerofosfolípidos se nombran de la siguiente manera: la letra P (fosfatidil) más la inicial de la cabeza polar del fosfolípido seguidas de los dos ácidos grasos esterificados en las posiciones sn -1 y sn -2 respectivamente, indicados como número de carbonos: número de dobles enlaces. Un ejemplo sería el PC (16:0/20:4) o especie de fosfatidilcolina (PC) con ácido palmítico (16:0) esterificado en posición sn -1 y ácido araquidónico (20:4) unido en posición sn -2. El prefijo O- antes del primer ácido graso de un fosfolípido indica que la cadena hidrocarbonada de la posición sn -1 está unido mediante un enlace éter, mientras que el prefijo P- indica la unión a través de un enlace vinil-éter.

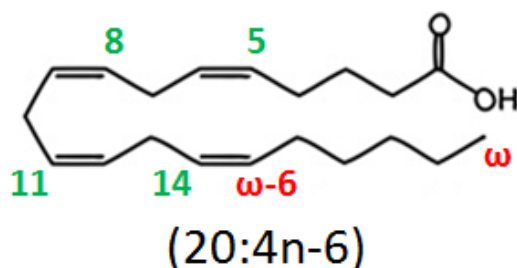


Figura 1. Estructura del ácido araquidónico, compuesto por 20 átomos de carbono entre los cuales se encuentran 4 insaturaciones, localizados en los carbonos 5, 8, 11 y 14 (en color verde en la figura). En color rojo se muestran los carbonos omega y omega-6.

1.2 El ácido araquidónico y su movilización en células inflamatorias:

El ácido araquidónico, abreviado 20:4 *n*-6 como se ha indicado en el apartado anterior (figura 1), es un ácido graso esencial que puede obtenerse directamente de la dieta o, por el contrario, ser sintetizado a partir del ácido linoleico (18:2*n*-6), a través de las reacciones catalizadas por las enzimas Δ 6-desaturasa, elongasa y Δ 5-desaturasa, localizadas principalmente en el hígado aunque también pueden encontrarse en otros tejidos [1, 2].

El ácido araquidónico es un lípido bioactivo muy importante para el organismo, ya que puede metabolizarse para la generación de eicosanoides, moléculas con propiedades pro y antiinflamatorias. Existen cuatro rutas diferentes de metabolismo del ácido araquidónico: la ciclooxigenasa, las lipoxigenasas, el citocromo P450 y las reacciones no enzimáticas con especies reactivas de oxígeno [1].

Mediante la ruta metabólica de la ciclooxigenasa se genera tromboxano A₂ (TXA₂) y varias prostaglandinas, con importantes funciones biológicas como la modulación del tono muscular liso, la permeabilidad vascular, la fiebre o la agregación plaquetaria [3]. La segunda ruta metabólica es la vía de la lipoxigenasas, mediante la cual se forman los leucotrienos, las hepoxilinas, las lipoxinas, y los ácidos hidroxeicosatetraenoicos. Los ácidos epoxieicosatrienoicos y dihidroxieicosatrienoicos son formados como consecuencia del metabolismo del ácido araquidónico por las enzimas del grupo citocromo P450. Estos compuestos han sido asociados con propiedades antiinflamatorias en enfermedades cardiovasculares [4].

La última ruta, y única no enzimática, involucrada en la producción de eicosanoides es la reacción del ácido araquidónico con especies reactivas de oxígeno. A través de esta vía se generan los isoprostanos, compuestos estructuralmente similares a las prostaglandinas.

Los niveles de ácido araquidónico varían considerablemente entre los distintos tipos celulares. Se ha comprobado que las células en cultivo, por ejemplo las células U937, línea celular promonocítica humana, poseen niveles de ácido araquidónico menores en comparación con células primarias como los monocitos humanos o los macrófagos peritoneales de ratón [5,6]. Esta deficiencia en ácido araquidónico es debida al crecimiento continuo de estas células en medios de cultivo con bajo contenido en ácido linoleico.

La distribución del ácido araquidónico en las células se regula mediante un equilibrio entre incorporación, liberación y remodelación desde los fosfolípidos [7].

La figura 2 muestra la incorporación del ácido araquidónico en los fosfolípidos. Esta incorporación comienza con la tioesterificación con coenzima A (CoA) por la acción de las acil-CoA sintetasas, activando así el grupo carboxilo del ácido graso [8]. El siguiente paso en la incorporación es la esterificación del ácido graso en la posición *sn*-2 del glicerofosfolípido. Esta acción es llevada a cabo por las enzimas lisofosfolípido acil CoA aciltransferasas [9].

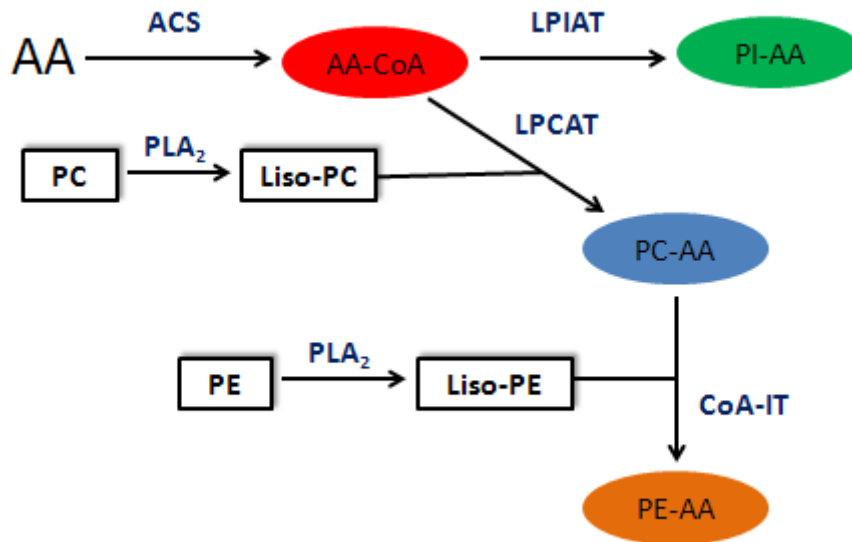


Figura 2. Incorporación del ácido araquidónico en fosfolípidos. ACS: Acil:CoA Sintetasa; LPIAT: lisofosfatidilinositol: acil-CoA aciltransferasa; LPCAT: lisofosfatidilcolina: acil-CoA aciltransferasa; PLA₂: Fosfolipasa A₂; CoA-IT: Transacilasa independiente de coenzima A.

Una vez que el ácido araquidónico se encuentra incorporado en los fosfolípidos, forma depósitos estables o puede eventualmente ser liberado, principalmente en células estimuladas, por acción de una o varias fosfolipasas A₂. Los niveles de ácido araquidónico libre celular son controlados por el ciclo de Lands, consistente en reacciones de desacilación y reacilación. Por un lado, las fosfolipasas A₂ (PLA₂) hidrolizan los ácidos grasos que se encuentran unidos en la posición *sn*-2 del esqueleto de glicerol de los glicerofosfolípidos generando en consecuencia el ácido graso libre y el correspondiente lisofosfolípido. Por otra parte, las aciltransferasas dependientes de coenzima A catalizan las reacciones de reacilación, reincorporando el ácido graso libre en distintos lisofosfolípidos para formar nuevos fosfolípidos.

En células en estado de reposo, sin estimulación, las reacciones de reacilación predominan sobre las de desacilación de manera que los niveles de ácido araquidónico libre son bajos. Sin embargo, en las células estimuladas, la liberación de ácido araquidónico domina sobre las reacciones de reacilación. Aún así, los niveles de reacilación bajo condiciones de estimulación son importantes, de manera que tan sólo una pequeña parte del ácido araquidónico liberado por la enzima PLA₂ es convertido en eicosanoides, incorporándose el resto en fosfolípidos [10,11].

Existen más de 30 enzimas con actividad fosfolipasa A₂, que han sido agrupadas en 16 grupos siguiendo criterios de homología de secuencia [12]. Desde un punto de vista funcional, todas estas enzimas se pueden clasificar en cinco familias principales. Estas familias son las PLA₂ citosólicas dependientes de calcio (cPLA₂), las PLA₂ secretadas dependientes de calcio (sPLA₂), las PLA₂ citosólicas independientes de calcio (iPLA₂), las acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas y, en último lugar, las PLA₂s lisosomales. Las dos primeras familias han sido relacionadas con la movilización de ácido araquidónico mediada por receptor en respuesta a varios estímulos. En este sentido, se ha propuesto a la fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de calcio del grupo IVA (cPLA₂α) como la enzima crítica en la movilización del ácido araquidónico dependiente de estímulo y, en función del tipo celular y las condiciones

de estimulación, se cree que alguna sPLA₂ podría participar amplificando el efecto de la cPLA₂α [13,14].

La disposición final en el equilibrio de los ácidos grasos en los fosfolípidos se obtiene a través de las rutas de *nov*o de biosíntesis de fosfolípidos o mediante la remodelación desde unos fosfolípidos a otros gracias a las reacciones de transacilación. En el caso del ácido araquidónico, la distribución apropiada del ácido graso en las distintas clases de fosfolípidos se consigue a través de las reacciones de transacilación [15]. Estas reacciones de transacilación están catalizadas por la enzima transacilasa independiente de coenzima A (CoA-IT), que transfiere ácidos grasos poliinsaturados desde la posición *sn*-2 de un fosfolípido donador a la posición *sn*-2 de un lisofosfolípido aceptor sin ser esta actividad dependiente de Ca²⁺, Mg²⁺, coenzima A o ATP [16]. La enzima transfiere ácido araquidónico desde especies de PC (principalmente, aunque no únicamente, de tipo diacil) a especies plasmalógenas de PE preferentemente, aunque también puede transacilarse a especies diacil-PE [17]. La CoA-IT parece estar regulada negativamente por los niveles de ácido araquidónico intracelular.

En células U937 enriquecidas con ácido araquidónico, la actividad de la transacilasa independiente de coenzima A disminuye respecto a las mismas células sin tratar (deficientes en ácido araquidónico *per se*), si bien la afinidad de la enzima por el sustrato no se ve alterada [6]. Winkler y colaboradores demostraron en neutrófilos que una actividad enzimática no es inhibida directamente por sus fosfolípidos sustrato o por sus fosfolípidos producto [16].

En consecuencia, los niveles de expresión de la CoA-IT podrían estar afectados por alguna especie de fosfolípido con ácido araquidónico esterificado presente en las células enriquecidas con AA y ausente en las células sin enriquecer. De acuerdo con esta hipótesis la CoA-IT no actuaría únicamente en la transacilación, sino que tendría un importante papel a la hora de controlar los niveles de ácido araquidónico. El bloqueo de la transacilasa independiente de coenzima A, que conduce a la inhibición de la remodelación de AA entre las distintas clases de fosfolípidos, produce un descenso en la liberación de AA y en la formación de eicosanoides [18].

Además, se ha descubierto que la apoptosis puede ser inducida por el bloqueo de la remodelación de fosfolípidos conteniendo ácido araquidónico, de tal manera que esa alteración en la redistribución del AA en los fosfolípidos representa una señal que controla la capacidad proliferativa de las células [19,20].

La movilización de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana ocurre tras la estimulación de los macrófagos, entre otros tipos celulares, con estímulos de la respuesta inmune innata como el zimosán, preparado de la pared celular de levaduras y estímulo fagocítico de las células [21,22].

El zimosán está compuesto por β-glucanos, mannanos, manoproteínas y quitinas, siendo reconocido por diferentes receptores presentes en los macrófagos, entre los que se encuentran dectina-1, TLR-2, TLR-6, los receptores de manosa o los receptores *scavenger* [8]. El zimosán, al igual que otros patógenos, puede ser opsonizado, es decir, ser recubierto por una serie de moléculas que están presentes en el suero denominadas opsoninas, como las inmunoglobulinas G y las proteínas del sistema de complemento, por ejemplo el receptor 3 del complemento (CR3). Dichas moléculas, al igual que el zimosán, pueden ser reconocidos por receptores de membrana.

El zimosán constituye por tanto un estímulo muy potente y rápido que provoca la activación de la enzima cPLA₂α, de manera que dicha enzima potencia la desacilación de fosfolípidos, produciendo ácido araquidónico libre. Indirectamente, la cPLA₂α forma lisofosfolípidos, posibles aceptores potenciales de parte de ese ácido araquidónico

libre (figura 3). Una parte del AA libre generado se destinará a la producción de eicosanoides [23].

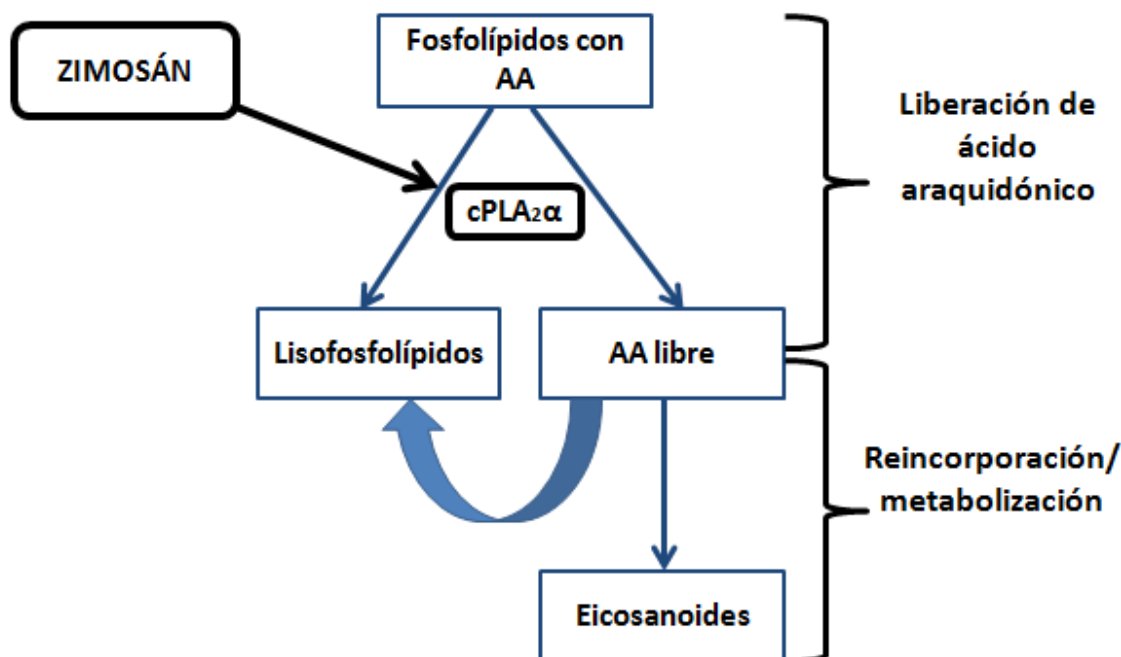


Figura 3. Efectos de la estimulación celular con zimosán. El zimosán activa la cPLA₂α, enzima responsable de la liberación de ácido araquidónico libre desde los fosfolípidos. Ese AA se puede reincorporar en lisofosfolípidos o metabolizar generando eicosanoides. AA: Ácido araquidónico; cPLA₂α: Fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de calcio.

La estimulación de las células con zimosán produce cambios en los niveles de ácido araquidónico incorporado en las distintas clases de fosfolípidos. De acuerdo con esto, Gil-de-Gómez y colaboradores comprobaron cómo, al estimular los macrófagos con zimosán o con lipopolisacárido junto con zimosán, la movilización neta de ácido araquidónico se produce a partir de especies de PC, PI y PS. De esta manera, los niveles de AA en especies de PC y PI disminuyen tras la estimulación con zimosán. Sin embargo, los niveles de ácido araquidónico en especies de PE permanecen estables a pesar de esta estimulación [24].

Las especies de PE constituyen el principal reservorio de ácido araquidónico, lo cual no significa que no sean sustrato de las enzimas que realizan esa liberación (cPLA₂), sino que, aunque las especies de PE son utilizadas como fuente de AA libre mediante su desacilación, el ácido araquidónico presente en las especies de diacil-PC es transacilado preferentemente por la CoA-IT hacia los plasménidos de PE, de manera que se contrarresta el efecto de la desacilación manteniendo los niveles constantes gracias a la rápida reposición del ácido araquidónico esterificado en especies de PE desde especies PC. De este modo, los niveles de ácido araquidónico en especies de PE se mantienen por un equilibrio entre la hidrólisis realizada por la cPLA₂α y la transacilación por la CoA-IT.

La pirrofenona, inhibidor selectivo de la cPLA₂, evita que la estimulación con zimosán reduzca los niveles de ácido araquidónico incorporado en especies de PC y PI, ya que en presencia del inhibidor la fosfolipasa no podrá actuar sobre los fosfolípidos [25].

1.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

La cromatografía es un método de separación físico-químico de los distintos componentes de una muestra, siendo detectados según van eluyendo a distintos tiempos

Los diferentes componentes de la muestra son transportados en una fase líquida a través de una fase estacionaria. Los compuestos eluyen de la columna a diferentes tiempos en función de la mayor o menor interacción de las moléculas con la fase estacionaria quedando retenidas en la columna un determinado tiempo hasta que se dan las características necesarias (pH, polaridad del disolvente, etc) para que eluyan y salgan de la columna, momento en el que son detectadas.

Como resultado se obtiene el cromatograma, en el que se indica la detección de un compuesto eluyendo a un tiempo determinado de la columna sin proporcionar información de la composición de cada compuesto. Para conocer la identidad del compuesto se usa su espectro de masas. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se conoce como tiempo de retención y es considerado como una propiedad característica de un compuesto en unas fases móvil y estacionaria determinadas. La eficiencia de separación de la columna depende del diámetro de partícula y el tamaño de poro de las partículas. Cuanto menor es el tamaño de partícula y más homogénea la distribución del tamaño de partícula en la fase estacionaria, mejor es la separación. En la figura 4 se muestra un ejemplo de cromatograma, donde se representa la intensidad de los picos correspondientes a los distintos compuestos frente al tiempo de retención.

Los glicerofosfolípidos se pueden separar por HPLC tanto en fase normal como en fase reversa. La fase normal utiliza fases estacionarias polares, separando los glicerofosfolípidos por la cabeza polar. Así, los compuestos menos polares eluyen antes que aquellos compuestos más polares. En fase reversa (la utilizada en este estudio) se utilizan fases estacionarias apolares, constituidas generalmente por cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono, de manera que permite la separación de los glicerofosfolípidos por sus cadenas laterales. De este modo los glicerofosfolípidos con menor número de carbonos y más dobles enlaces eluyen primero. La fase reversa es especialmente útil para la separación de especies con la misma cabeza polar y m/z pero con distintas cadenas laterales.

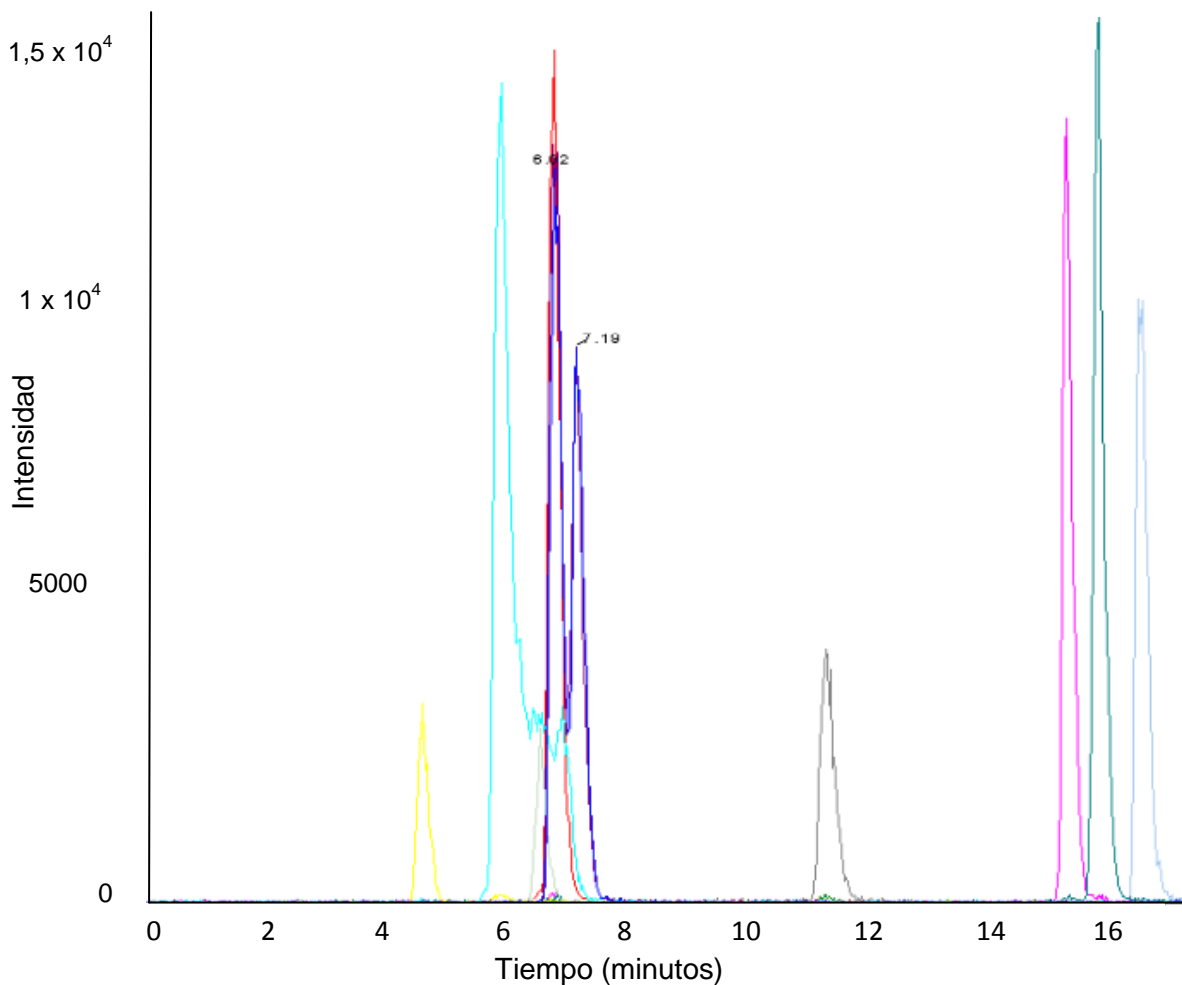


Figura 4. Cromatograma de una mezcla de eicosanoides. Cada pico corresponde a un compuesto de una mezcla (muestra biológica), eluyendo cada uno a un tiempo determinado.

1.4 Espectrometría de masas (MS):

La espectrometría de masas es una técnica basada en la detección de moléculas por la relación m/z (la relación entre la masa molecular y la carga eléctrica de cualquier molécula) permitiendo una gran capacidad de identificación de diferentes moléculas.

Un espectrómetro de masas está compuesto por una fuente de ionización, donde se forman los iones gaseosos, un analizador de masas, que separa los iones en función de su masa respecto a su carga (m/z) y un detector que mide el flujo iónico. Para los análisis mostrados en este trabajo se ha utilizado un espectrómetro de masas con un analizador de trampa iónica.

Ionización de la molécula

El proceso comienza con la entrada del líquido por un capilar fino para, mediante la aplicación de un gas de nebulización formar un spray. Se aplica un potencial eléctrico de manera que se proporciona carga eléctrica a las gotas del spray, que van disminuyendo su tamaño por la aplicación de calor. En el momento en el que la fuerza de repulsión eléctrica es mayor que la fuerza de cohesión de la gota se elimina el disolvente y se produce la formación del gas iónico. Finalmente, ese gas iónico entra en la zona de vacío.

Trampa iónica

En la trampa de iones la fragmentación se produce por transmisión de energía cinética al ión que se pretende fragmentar. El choque con el gas de colisión aumenta la energía interna de la molécula y produce una fragmentación dependiente de su estructura. Esta técnica permite la posibilidad de realizar más de un ciclo de aislamiento y fragmentación (MS^n), consiguiendo una mayor caracterización estructural de las moléculas.

Es necesario separar previamente los compuestos presentes en la muestra para mejorar la obtención de información estructural. La técnica analítica de separación es la cromatografía, de la que existen diferentes modalidades: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos (LC) entre la que destaca por su gran capacidad de análisis, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

2. Objetivos :

-Determinar el papel de la enzima CoA-IT en la liberación de ácido araquidónico desde especies de PE.

-Estudiar la implicación de las enzimas fosfolipasa A_2 citosólica independiente de calcio (iPLA₂) y fosfolipasa A_2 citosólica dependiente de calcio (cPLA₂) en la liberación de ácido araquidónico esterificado en los fosfolípidos.

3. Materiales y métodos:

3.1 Condiciones de cultivo de células RAW 264.7

Las células RAW 264.7, línea celular de macrófagos de ratón, fueron obtenidas de American Type Culture Collection (Rockville MD). Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (Invitrogen) 10% (v/v), penicilina 100 U/ml (Invitrogen), estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM (Lonza) a 37° C, en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂.

3.2 Obtención de macrófagos peritoneales de ratón

Los ratones Swiss Webster fueron sacrificados por dislocación cervical tras ser adormecidos en cámara de dióxido de carbono. Tras abrir la piel abdominal, se inyectaron en la cavidad peritoneal 5 ml de PBS 1x frío con una jeringuilla con agujas tipo 25G para poder despegar los macrófagos, y posteriormente se recogió el PBS introducido en la cavidad peritoneal. Los macrófagos se centrifugaron y se plaquearon 2 millones de células/pocillo en placas de 6 pocillos.

Las células se mantuvieron en 2 ml de medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Invitrogen) previamente inactivado por calor (20 minutos a 56°C) y 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomycin, a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y con 5% CO₂ durante 16 horas para permitir la adherencia de los macrófagos. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados con PBS. Cuando se utilizaron los inhibidores, se añadieron al medio de incubación 30 minutos antes de la estimulación celular con zimosán (Sigma-Aldrich).

3.3 Preparación del zimosán

Se disolvieron las partículas de zimosán en PBS, se hirvieron durante 60 minutos y se lavaron tres veces con PBS. El pellet final se resuspendió en PBS a 20mg/ml y se congeló. Las alícuotas de zimosán a una concentración final de 20 mg/ml se disolvieron en medio sin suero y se sonicaron con la ayuda de un sonicador de tip dos pulsos de 15 segundos cada uno a una intensidad del 25% antes de su adición a las células. Para la preparación del zimosán opsonizado, las partículas de zimosán se incubaron con suero fresco de ratón (10 mg/ml suero) durante 20 minutos a 37 °C, se centrifugaron y se lavaron tres veces con PBS. Finalmente se resuspendieron en medio sin suero y se sonicaron con la ayuda de un sonicador de tip dos pulsos de 15 segundos cada uno a una intensidad del 25% antes de su adición a las células.

3.5 Adición de los inhibidores

En este estudio se han utilizado los inhibidores SK&F98625 (dietil 7-(3,4,5-trifenil-2-oxo-2,3-dihidroimidazol-1il) para inhibir la CoA-IT, pirrofenona para la inhibición de la cPLA₂α y FKGK18 (1,1,1-trifluoro-6- (naftalen-2-il) hexan-2-ona) como inhibidor de la enzima iPLA₂. El inhibidor SK&F98625 fue sintetizado y proporcionado por el Dr. Alfonso Pérez (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Valladolid). La pirrofenona fue sintetizada y proporcionada por el Dr. Amadeu Llebaria (Instituto de Investigaciones Químicas y Medioambientales, CSIC, Barcelona). El inhibidor FKGK18 fue proporcionado por el Dr. George Kokotos (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Atenas). Los inhibidores se añadieron 30 minutos antes de la estimulación celular.

3.6 Medición de la cantidad de proteína

Para determinar la cantidad de proteína total de los lisados celulares se utilizó el método Bradford (Biorad), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. La recta de calibrado se realizó con diluciones de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron previamente sonicadas con la ayuda de un sonicador de tip con dos pulsos de 15 segundos cada uno a una intensidad de 25%.

3.7 Extracción lipídica por el método Bligh & Dyer

Para extraer los lípidos de las muestras se siguió el protocolo descrito por Bligh & Dyer [26]. Las muestras deben tener un estándar interno para ser analizadas. En este trabajo se usaron como estándares internos las especies PC(15:0/15:0), PE(12:0/12:0) y PI(16:0/16:0). Se añadieron 3,75 volúmenes de cloroformo/metanol (Scharlau) 1:2 (v/v) sobre las muestras y se agitó fuertemente. Posteriormente se añadieron 1,25 volúmenes de cloroformo y de agua MilliQ (Millipore) y se agitó de nuevo. Tras centrifugarlo para separar las fases, se extrajo la fase inferior. Se realizó una segunda extracción añadiendo 2 volúmenes de cloroformo. Se centrifugó al vacío hasta sequedad antes de usar las muestras.

3.8 Separación de las clases de fosfolípidos

Para la separación de las clases de fosfolípidos se utilizó el sistema cloroformo/metanol/ amoniaco al 28% (65:25:5, v.).

3.9 Medición de la remodelación de [³H]AA en fosfolípidos

Las células fueron marcadas con [³H]AA (1 μ M; 0.25 μ Ci/ml) (Amersham) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron 4 veces con medio con 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino para eliminar el ácido araquidónico no esterificado. Posteriormente las células se incubaron en medio sin suero a 37 °C durante los tiempos indicados. Los lípidos se extrajeron según el protocolo de Bligh & Dyer y separaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

3.10 Acoplamiento HPLC-MS

La separación cromatográfica de los glicerofosfolípidos se realizó en un sistema de HPLC compuesto por un sistema de bombas binaria con desgasificador en línea y régimen de gradiente Hitachi LaChrom Elite L-2130 y un inyector Hitachi Autosampler L-2200 acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Bruker Esquire 6000®. El efluente procedente del HPLC entra a la cámara de electronebulización (ESI) del espectrómetro de masas pasando antes por un separador de caudal. La presión del gas de nebulización se ajustó a 30 psi, el caudal del gas de secado a 4 l/min y la temperatura del gas de secado a 350 C. La calibración de la trampa iónica se realizó mediante el protocolo del propio equipo con la solución Tunning Mix (Agilent).

El análisis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Balgoma y colaboradores [26] con ligeras modificaciones. Los lípidos totales extraídos por el método de Bligh & Dyer fueron disueltos en metanol/agua (9:1 v/v). Para la separación cromatográfica se usó la columna Supelcosil LC-18 (Sigma-Aldrich) protegida con una precolumna Supelguard LC-18 (Sigma-Aldrich). La fase móvil que se utilizó fue un gradiente del eluyente A (metanol/agua/hexano/hidróxido de amonio al 30%, 87,5:10,5:1,5:0,5 v/v/v/v), eluyente B (metanol/hexano/hidróxido de amonio al 30%, 87,5:12:0,5 v/v/v/v), y eluyente C (metanol/agua, 9:1 v/v). El volumen de inyección fue de 80 l y la velocidad de flujo fue 0,5 ml/min que fue dividido antes de entrar al espectrómetro de masas,

dejando pasar un flujo de 0,2 ml/min. Las especies de PI y PE se detectaron en modo negativo como $[M-H]^-$ con corriente de capilar +3500 V a lo largo de los primeros 23 minutos. Las especies de PC se detectaron como $[M+H]^+$ desde el minuto 23 al 40 con corriente de capilar -4000 V. La identificación de las especies de PC se realizó en modo negativo mediante la adición de ácido acético después de la columna con un flujo de 100 μ l/h, condiciones en las que se produce el aducto $[M+CH_3CO_2]^-$. El rango de m/z rastreado para los experimentos de identificación fue m/z 150-1000 y para los experimentos de detección 450-1000. Para la identificación de cada especie se usó la base de datos RCM lipid calculator (<http://pharmacology.ucdenver.edu/lipidcalc>).

4. Resultados:

Se realizó un primer experimento en células RAW 264.7, línea celular de macrófagos de ratón, con el fin de estudiar la incorporación del ácido araquidónico en las distintas clases de fosfolípidos y su remodelación.

En la figura 5 se muestra la distribución del ácido araquidónico en los diferentes tipos de fosfolípidos. En este conjunto de experimentos se utilizó el inhibidor de la enzima CoA-IT SK&F98625 (dietil7-(3,4,5-trifenil-2-oxo-2,3-dihidroimidazol-1il). En condiciones de ausencia del inhibidor de la CoA-IT SK&F98625, el ácido araquidónico se incorporó en los fosfolípidos según lo descrito por la bibliografía, incorporándose en primer lugar en especies de PC para, posteriormente, disminuir los niveles de AA en PC y aumentar en PE de manera simultánea. Los niveles de ácido araquidónico en PI se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo. Al añadir el inhibidor SK&F98625 en una concentración de 10 μM , se apreció la misma dinámica de incorporación del AA, disminuyendo no obstante la bajada de los niveles de ácido araquidónico en PC y la subida simultánea en especies de PE.

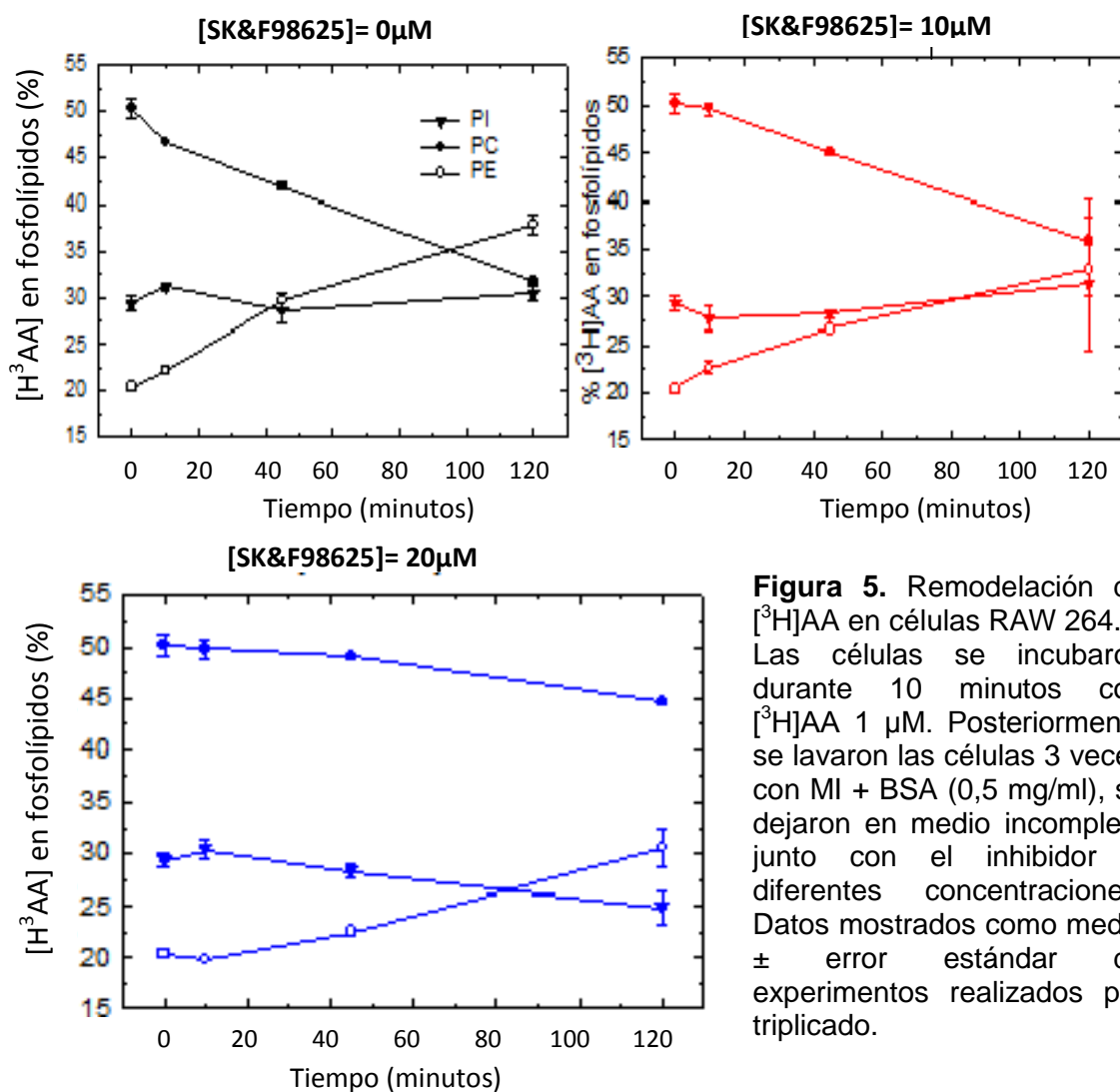


Figura 5. Remodelación de $[^3\text{H}]\text{AA}$ en células RAW 264.7. Las células se incubaron durante 10 minutos con $[^3\text{H}]\text{AA}$ 1 μM . Posteriormente se lavaron las células 3 veces con MI + BSA (0,5 mg/ml), se dejaron en medio incompleto junto con el inhibidor a diferentes concentraciones. Datos mostrados como media \pm error estándar de experimentos realizados por triplicado.

Con una concentración 20 μM de inhibidor se evitó la transacilación de ácido araquidónico desde las especies de PC a las especies de PE, pudiendo apreciar cómo los niveles de ácido araquidónico en especies PC permanecieron constantes mientras que los niveles de AA en PE sufrieron un ligero aumento.

Posteriormente se realizó este mismo experimento en macrófagos peritoneales de ratón, con el objetivo de estudiar la remodelación del ácido araquidónico en células primarias (figura 6). En ausencia del inhibidor de la transacilasa independiente de coenzima A, los niveles de AA en especies de PC, destino inmediato del ácido araquidónico, disminuyeron de forma simultánea al aumento de los niveles de AA en especies de PE. Los niveles de las especies de PI se mantuvieron constantes, sin experimentar variaciones con el paso del tiempo.

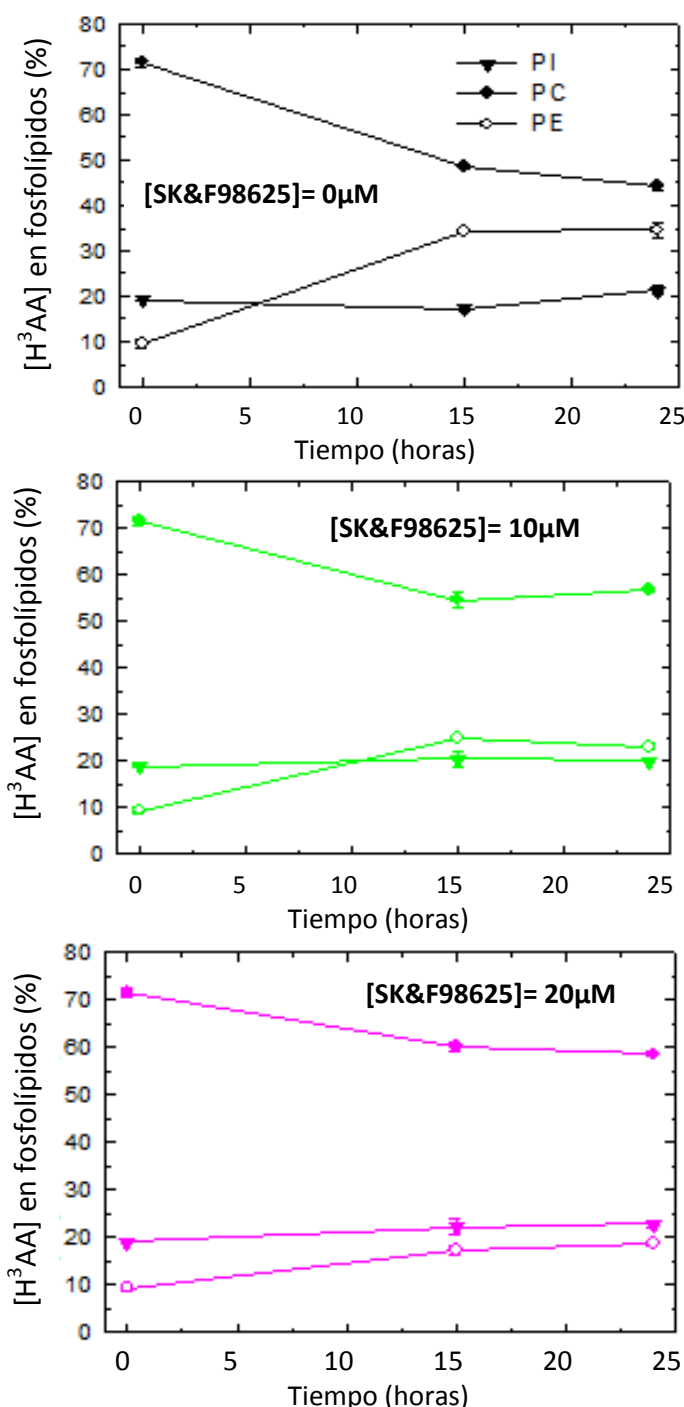


Figura 6. Remodelación de [³H]AA en macrófagos peritoneales de ratón. Las células se incubaron durante 30 min con [³H]AA 1 μM . Posteriormente se lavaron las células 3 veces con MI + BSA (0,5 mg/ml), y se incubaron en medio incompleto con el inhibidor a diferentes concentraciones. Las células se recogieron a diferentes tiempos, se extrajo el contenido lipídico mediante Bligh & Dyer y se separaron las clases de fosfolípidos (PI, PC y PE) mediante TLC, contando la radioactividad de las porciones correspondientes. Datos mostrados como media \pm error estándar de experimentos realizados por triplicado.

A partir de una concentración de inhibidor SK&F98625 de 10 μM , la transacilación llevada a cabo por la enzima CoA-IT fue inhibida, ya que los niveles de ácido araquidónico esterificado en especies de PC experimentaron un menor descenso, permaneciendo casi constantes. En relación a las especies de PE con ácido araquidónico esterificado, sus niveles sufrieron un ligero aumento, manteniéndose en valores muy similares a los de las especies de fosfatidilinositol y muy lejos de los valores de PC. Así, se comprobó como la concentración de 10 μM de inhibidor era suficiente para evitar la transacilación de ácido araquidónico desde especies de PC a especies de PE. Los niveles de ácido araquidónico unido a especies de PI se mantuvieron constantes a lo largo de todo el experimento. Además, se probó una concentración mayor de inhibidor de la CoA-IT, 20 μM , pero no se observaron diferencias en la remodelación del ácido araquidónico en las distintas clases de fosfolípidos.

Aunque se comprobó cómo la dinámica de incorporación del ácido araquidónico era igual en células RAW 264.7, línea celular de macrófagos, y células primarias como los macrófagos peritoneales de ratón, resultó significativa la diferencia en la duración del tiempo de remodelación de fosfolípidos en ambos tipos celulares. Esta diferencia es probablemente debida a la constante división realizada por las células de la línea celular RAW 264.7, con un metabolismo lipídico mucho más activo que células en estado de no división como son los macrófagos peritoneales de ratón.

El siguiente paso fue el estudio, también en macrófagos peritoneales de ratón, de la liberación de ácido araquidónico y el efecto del zimósán, preparado de la pared celular de levaduras y estímulo fagocítico de las células, sobre esa liberación (figura 7). La estimulación de los macrófagos con zimósán provocó un aumento en la liberación de ácido araquidónico, potenciando la desacilación de los fosfolípidos. Ese ácido araquidónico liberado tiene dos posibles destinos. El AA libre puede reaclilarse en lisofosfolípidos generados por las fosfolipasas A_2 en las reacciones de desacilación.

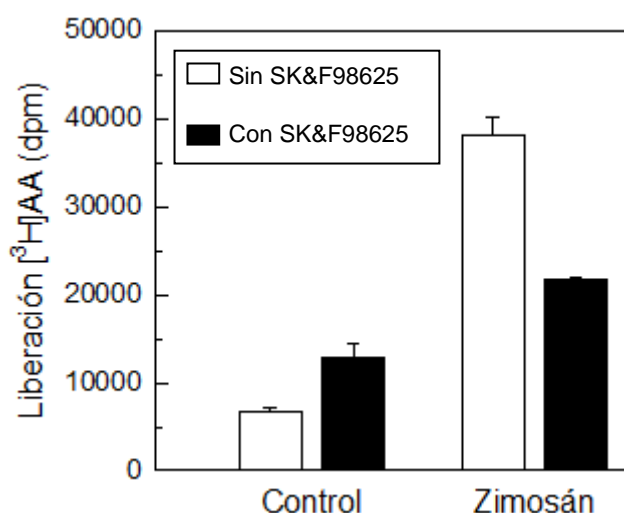


Figura 7. Liberación de $[^3\text{H}]\text{AA}$ de macrófagos peritoneales de ratón. Los macrófagos peritoneales se incubaron durante 16 horas con $[^3\text{H}]\text{AA}$ (0,25 $\mu\text{Ci/ml}$). Posteriormente se hicieron 3 lavados con medio incompleto con BSA (0,5 mg/ml). Tras 1 h en medio incompleto, las células se incubaron con zimósán durante 2 horas, en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de SK&F98625 10 μM (el inhibidor se añadió 30 minutos antes de la estimulación celular). Tras 2 horas de estimulación, el sobrenadante se recogió y se cuantificó la liberación de ácido araquidónico marcado con ayuda de un contador de centelleo. Datos mostrados como media \pm error estándar de experimentos realizados por triplicado.

Además, una parte menor del ácido araquidónico liberado se metabolizará para producir eicosanoides por cualquiera de las cuatro rutas metabólicas descritas anteriormente, la cicloxigenasa, las lipoxigenasas, el citocromo P450 y las reacciones no enzimáticas con especies reactivas de oxígeno (figura 3). La incubación de las células con zimósán en presencia del inhibidor SK&F98625 disminuyó la liberación de ácido araquidónico respecto a la liberación provocada por la estimulación con zimósán en ausencia de SK&F98625 casi un 50%.

El perfil de las especies de glicerofosfolípidos que contienen ácido araquidónico de los macrófagos peritoneales de ratón se midió por un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas (figura 8). Los lípidos fueron identificados determinando la producción de un fragmento con m/z 303, correspondiente al ácido araquidónico, en experimentos de MSⁿ.

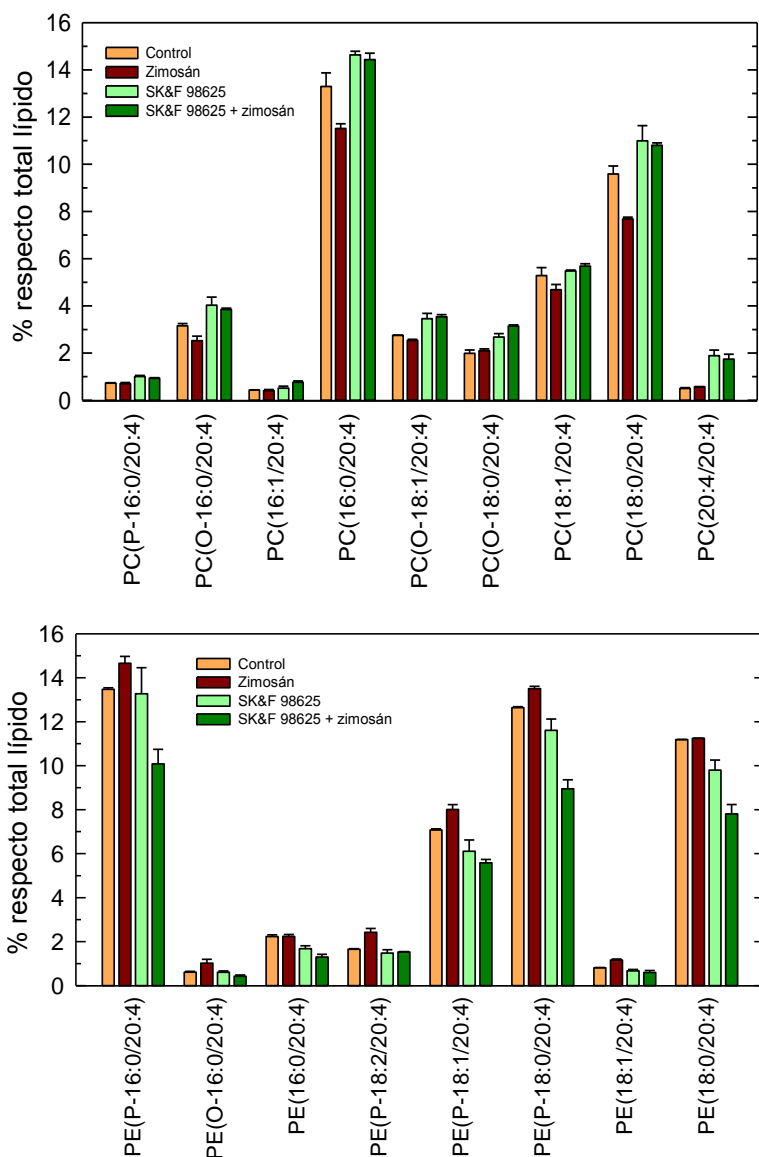


Figura 8. Efecto de SK&F98625 en el perfil de fosfolípidos conteniendo AA de macrófagos peritoneales estimulados con zimósán mediante el análisis con HPLC-MS. Los macrófagos peritoneales se incubaron con zimósán durante 1 hora en ausencia o presencia del inhibidor a 10 μ M (añadido 30 minutos antes de la estimulación celular). Datos mostrados como media \pm error estándar.

En los macrófagos peritoneales de ratón en condiciones control las especies mayoritarias de PC y PE conteniendo ácido araquidónico fueron: PC(16:0/20:4), PE(P-16:0/20:4), PE(P-18:0/20:4), PE(18:0/20:4), PC(18:0/20:4) y PE(P-18:1/20:4).

La estimulación de los macrófagos con zimosán provocó una disminución en el contenido celular de ácido araquidónico en fosfolípidos. Al aplicar a las células esta estimulación, las especies de PC conteniendo ácido araquidónico mayoritarias sufrieron disminuciones en sus niveles. Sin embargo, las principales especies de PE con ácido araquidónico esterificado no experimentaron en sus niveles este descenso provocado por la estimulación con zimosán.

Estos cambios en los niveles de los fosfolípidos conteniendo ácido araquidónico producidos por la acción de las enzimas PLA_2 y CoA-IT ya fueron descritos en monocitos humanos y células U937 por Astudillo y colaboradores (7).

Además, se quiso estudiar cómo afectaba la inhibición de la enzima CoA-IT, responsable de la transacilación del ácido araquidónico desde especies de PC a especies de PE, a los niveles de las distintas clases de fosfolípidos en los macrófagos peritoneales de ratón (figura 8).

El tratamiento con el inhibidor de la enzima CoA-IT de los macrófagos estimulados con zimosán provocó, como era esperable, una disminución significativa en los niveles de las especies de PE conteniendo ácido araquidónico así como un aumento en los niveles de las especies de PC conteniendo AA. Ese aumento experimentado en las especies de PC se produjo en un orden similar al experimentado por las células tratadas con el inhibidor únicamente.

Una vez estudiada la remodelación de los fosfolípidos conteniendo ácido araquidónico, el siguiente paso se encaminó al estudio de las enzimas implicadas en la liberación de AA y su relación con las distintas clases de fosfolípidos. Para estudiar las actividades de las enzimas $cPLA_2$ e $iPLA_2$ se utilizaron los inhibidores selectivos pirrofenona y FKGK18, respectivamente. La pirrofenona inhibe la actividad enzimática de la $cPLA_2\alpha$ disminuyendo la liberación de ácido araquidónico sin afectar a otras fosfolipasas del tipo A_2 [24,27]. El inhibidor FKGK18 (1,1,1-trifluoro-6-(naftalen-2-il) hexan-2-ona) ha sido descrito como un potente y específico inhibidor de la enzima $iPLA_2$ [28].

En primer lugar se estudiaron los fosfolípidos conteniendo ácido araquidónico (figura 9). La inhibición de la enzima $cPLA_2$ con pirrofenona restableció los niveles de fosfolípidos de PC parcialmente a niveles propios de células sin estimular. Sin embargo, se vio cómo la inhibición de la $iPLA_2$ con FKGK18 no restableció los niveles de PC a valores característicos de células sin estimular, sin encontrar diferencias entre la inhibición y la no inhibición de esta enzima, sugiriendo que la $iPLA_2$ no interviene en este proceso.

Respecto a las especies de PE, las cuales no vieron disminuidos sus niveles por la estimulación con zimosán, ni la inhibición de la $cPLA_2$ ni la de la $iPLA_2$ variaron los niveles de estos fosfolípidos, descartando así la implicación de la $iPLA_2$ en la liberación de ácido araquidónico desde especies de PE. De forma contraria, la $cPLA_2$ sí participa aunque no se aprecie disminución neta en las especies de PE debido a la transacilación por la CoA-IT, ya que las especies de fosfatidiletanolamina se encuentran en una situación de equilibrio entre la desacilación mediada por la $cPLA_2$ y la transacilación gracias a la transacilasa independiente de coenzima A.

En cuanto a las especies de PI, la incubación de las células con pirrofenona reversionó parcialmente los niveles de esta clase de fosfolípidos.

Estos datos, en conjunto, sugieren que la pérdida de ácido araquidónico de las especies de PC está mediada por las enzimas $cPLA_2$ y CoA-IT, mientras que la liberación de AA desde especies de PI lo está únicamente por la $cPLA_2$.

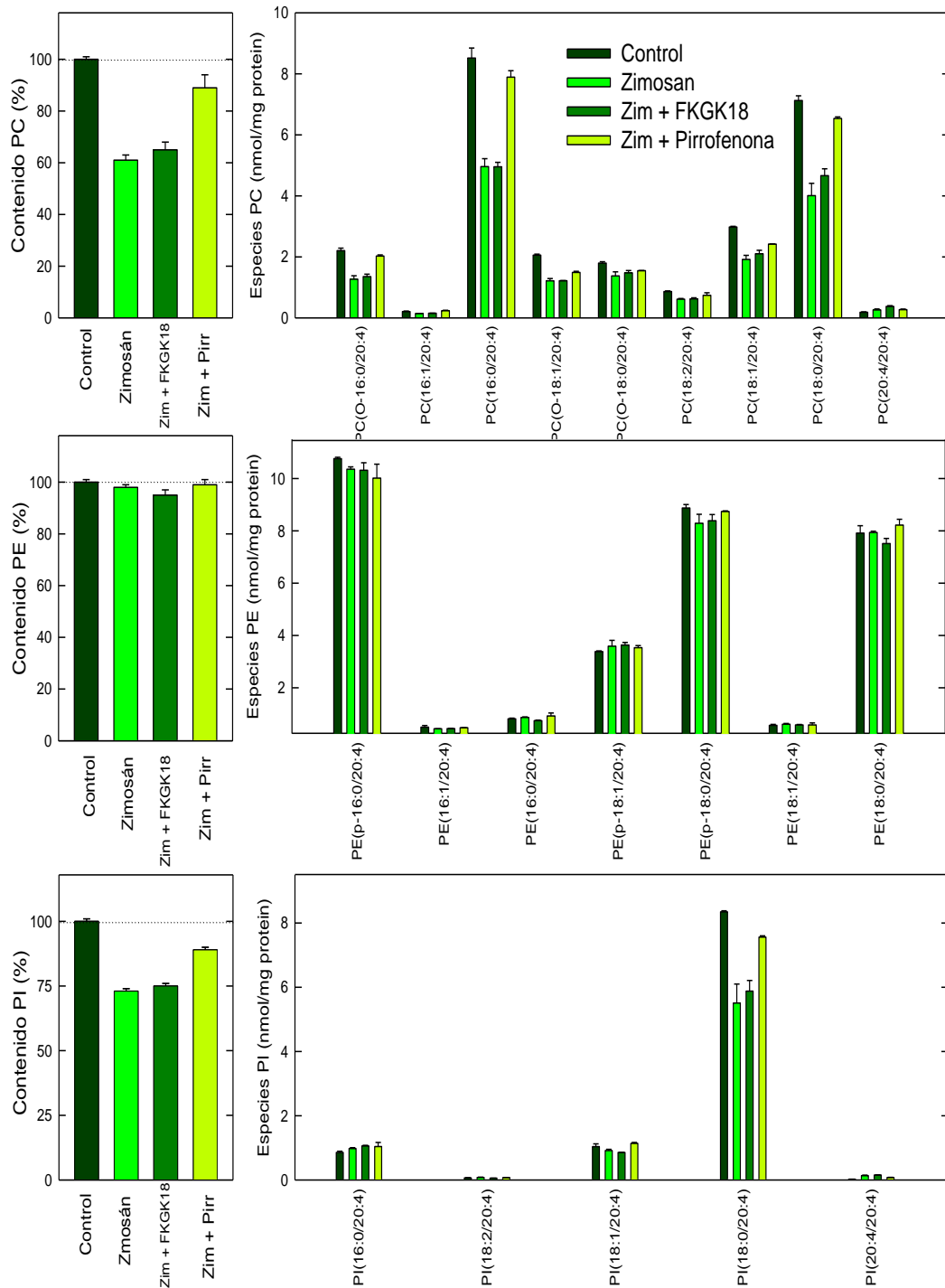


Figura 9. Efecto de la pirrofenona y FKGK18 en el perfil de fosfolípidos conteniendo AA de macrófagos peritoneales estimulados con zimosán mediante el análisis con HPLC-MS. Los macrófagos peritoneales se incubaron con zimosán durante 1 hora en presencia y ausencia de los inhibidores FKGK18 (10 μ M) y pirrofenona (1 μ M) añadidos 30 minutos antes de la estimulación celular. Datos mostrados como media \pm error estándar de experimentos realizados por triplicado.

El siguiente paso en este estudio fue la determinación del papel de las enzimas cPLA₂ e iPLA₂ en fosfolípidos sin ácido araquidónico unido (figura 10).

La estimulación de los macrófagos peritoneales de ratón con zimosán provocó un descenso en los niveles de PC, mientras que los niveles de PE no disminuyeron como consecuencia de dicha activación. Los niveles de PC no se vieron alterados por la inhibición de la cPLA₂ con pirrofenona. Sin embargo, la inhibición de la iPLA₂ con FKGK18 resultó en la reversión de los niveles de PC a niveles característicos de células sin estimular.

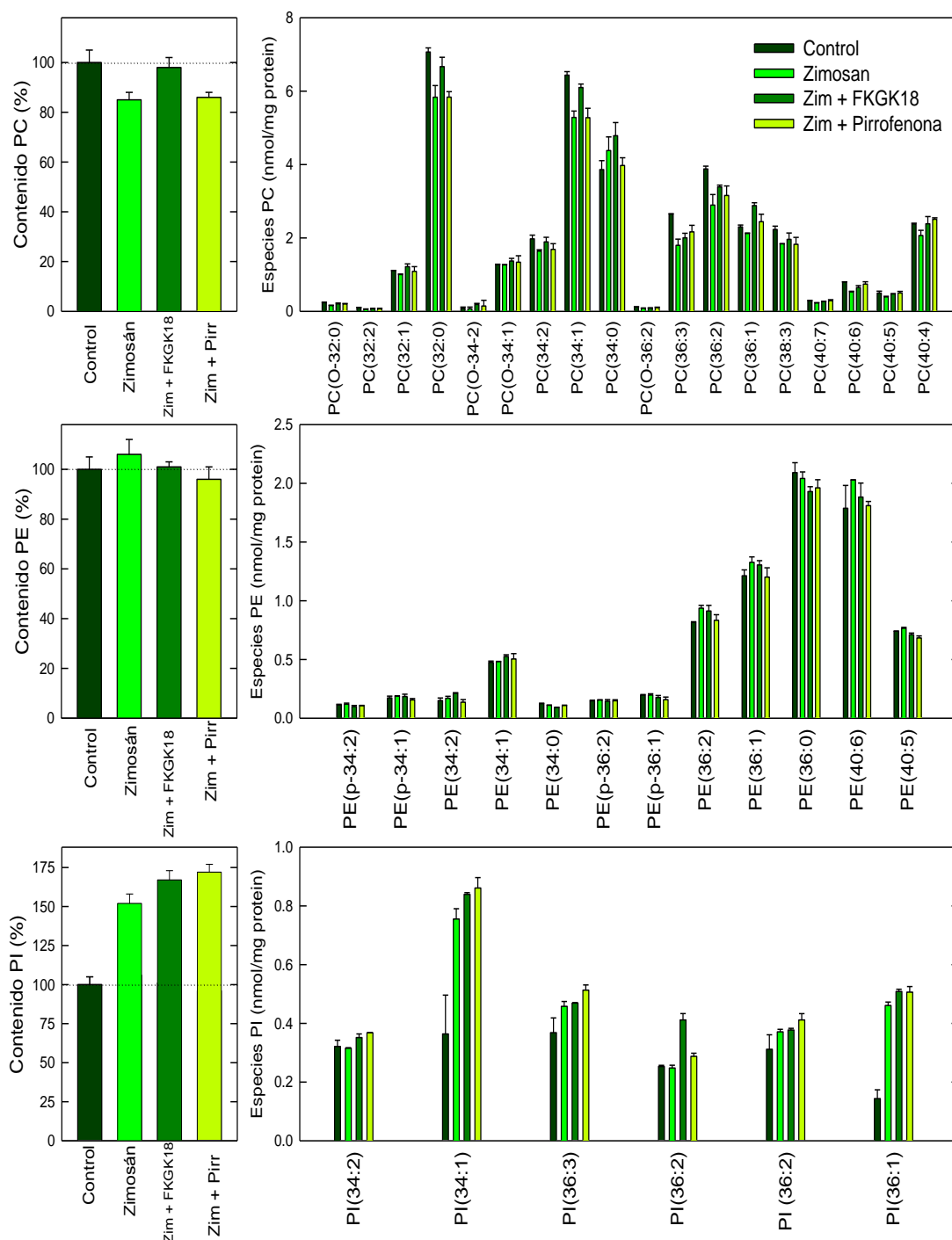


Figura 10. Efecto de la pirrofenona y FKGK18 en el perfil de fosfolípidos sin contener AA de macrófagos peritoneales estimulados con zimosán mediante análisis con HPLC-MS. Los macrófagos peritoneales se incubaron con zimosán durante 1 hora en presencia y ausencia de los inhibidores FKGK18 (10 μ M) y pirrofenona (1 μ M) añadidos 30 minutos antes de la estimulación celular. Datos mostrados como media \pm error estándar de experimentos realizados por triplicado.

Por el contrario, los niveles de PE no sufrieron variaciones en sus niveles como consecuencia de la inhibición de la cPLA₂ y la iPLA₂ por separado. Los niveles de PI experimentaron aumentos significativos como resultado de la estimulación de las células con zimosán, tanto en presencia como en ausencia de la inhibición de cPLA₂ e iPLA₂.

Estos datos, en conjunto, demuestran la preferencia de la enzima cPLA₂ por los fosfolípidos con ácido araquidónico esterificado, mientras que la iPLA₂ demostró tener preferencia por los fosfolípidos sin AA unido.

Al estudiar el perfil de las especies cuyos niveles variaron al inhibir la iPLA₂ con FKGK18, se comprobó cómo la reversión de la disminución de los niveles de las especies de PC producida por la inhibición de la iPLA₂ se produjo principalmente en las especies PC (32:0) y PC (34:1).

Finalmente, tras descubrir el aumento en los niveles de especies de fosfatidilinositol sin ácido araquidónico esterificado como consecuencia de la estimulación con zimosán, se quiso estudiar qué especies de PI experimentaban dicho incremento. La figura 11 muestra cómo la estimulación de los macrófagos peritoneales de ratón tanto con zimosán como con zimosán opsonizado (potenciando la respuesta celular mediante la activación de receptores de opsoninas) resultó en el aumento en los niveles de las especies de PI, principalmente en las especies PI(34:1) y PI(36:1). Además, los incrementos experimentados por esas dos especies resultaron mayores como consecuencia de la estimulación con zimosán opsonizado respecto a la estimulación con zimosán.

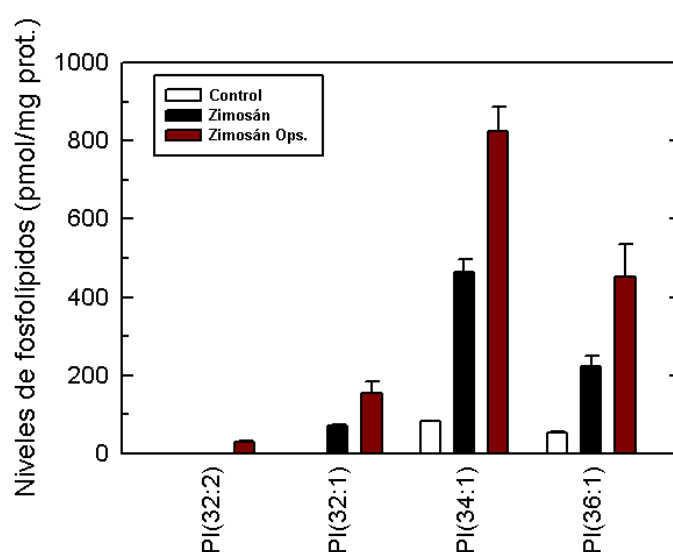


Figura 11. Efecto de la estimulación con zimosán y zimosán opsonizado en el perfil de fosfolípidos de PI con ácido palmítico (16:0) y/o oleico (18:1) esterificado de macrófagos peritoneales de ratón mediante análisis con HPLC-MS. Datos mostrados como media \pm error estándar de experimentos realizados por triplicado.

5. Discusión:

En este trabajo se ha estudiado la composición de las especies de glicerofosfolípidos en macrófagos peritoneales de ratón y su remodelación, así como el papel de las enzimas implicadas en dicha remodelación. Para ello hemos utilizado la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas para analizar los cambios en los niveles de fosfolípidos conteniendo ácido araquidónico y su respuesta al zimósán.

El ácido araquidónico se incorpora a tiempos cortos en las especies de PC mayoritariamente, mientras que las especies de PI constituyen un reservorio minoritario. Tras un tiempo de remodelación durante el cual transcurre la acción de la transacilasa independiente de coenzima A, el nivel de ácido araquidónico esterificado en las especies de PC disminuye de forma simultánea con el aumento de los niveles de AA contenido en las especies de PE, reservorio totalmente minoritario antes de dicha remodelación llevada a cabo por la CoA-IT. Los niveles de ácido araquidónico en las especies de PI permanecen constantes, lo cual sugiere que la transacilación del AA es independiente de las especies de PI, transfiriéndose desde especies de PC a especies de PE.

Se ha podido comprobar cómo la transacilación se comporta de la misma forma tanto en una línea celular de macrófagos de ratón como es RAW 264.7, como en células primarias como son los macrófagos peritoneales de ratón. Resulta significativa la diferencia en el tiempo de duración de la remodelación en estos dos tipos celulares, siendo mucho mayor la duración en macrófagos peritoneales (25 horas) respecto a células RAW 264.7 (2 horas). Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos en monocitos humanos y células U937 por Astudillo y colaboradores (7).

Para estudiar la remodelación del ácido araquidónico entre las distintas clases de fosfolípidos, se utilizó SK&F98625, inhibidor de la enzima que cataliza la transacilación desde especies de PC a especies de PE, la CoA-IT. La incubación de las células con el inhibidor resultó, como era esperable, en un aumento de los niveles de las especies de PC conteniendo ácido araquidónico así como un descenso en los niveles de especies de PE con AA esterificado. Estos resultados demuestran el sentido de la reacción catalizada por la CoA-IT, siendo las especies de PC las donadoras del ácido araquidónico transferido a las especies de PE.

Se comprobó, mediante la estimulación de las células con zimósán y marcaje previo con ácido araquidónico radioactivo, cómo el zimósán, preparado de la pared celular de levaduras y estímulo fagocítico reconocido por múltiples receptores celulares, constituye un potente estímulo responsable de la liberación de ácido araquidónico.

La estimulación con zimósán provocó la bajada de los niveles de especies de PC en los macrófagos peritoneales, mientras que los niveles de PE no se vieron disminuidos por la estimulación. El hecho de que las especies de PE no disminuyan sus niveles como consecuencia de la estimulación con zimósán sugiere que las especies de PE están sujetas a un ciclo de desacilación/reacilación, no existiendo pérdida neta de AA desde ellas. De acuerdo con esto, al inhibir la enzima CoA-IT, responsable de la transacilación de ácido araquidónico desde PC a PE, los niveles de fosfolípidos de PE con AA esterificado disminuyeron, ya que en esas condiciones las especies de PE no pueden ser transaciladas por la CoA-IT.

Al estudiar la liberación del ácido araquidónico y cómo se ve afectada por la inhibición de la CoA-IT, se comprobó que en células estimuladas con zimosán en condiciones de inhibición de la CoA-IT con SK&F98625, los niveles de ácido araquidónico liberado disminuyeron, demostrando que se produce liberación de ácido araquidónico desde las especies de PE, liberación que se encuentra enmascarada en condiciones normales por las reacciones de transacilación. Además, el hecho de que en macrófagos en reposo la inhibición de la CoA-IT aumente la cantidad de ácido araquidónico libre puede deberse a la ausencia de formación de lisofosfolípidos de PC en estas condiciones, posibles aceptores del AA libre, ó a la abundancia de PC, sustrato de la iPLA₂, existiendo mayor liberación de ácido araquidónico libre basal.

El siguiente objetivo del estudio fue conocer la implicación de las enzimas cPLA₂ e iPLA₂ en la liberación de ácido araquidónico esterificado en los distintos fosfolípidos. Para ello se utilizaron la pirrofenona y FKGK18, inhibidores selectivos de la cPLA₂ e iPLA₂, respectivamente.

La inhibición de la cPLA₂ con pirrofenona revirtió parcialmente la liberación del ácido araquidónico contenido en especies de PC y PI provocada por la estimulación con zimosán. Por el contrario, la inhibición de la iPLA₂ con FKGK18 no revirtió la liberación de AA contenido ni en especies de PC ni de PI. Estos datos, en conjunto, sugieren que la liberación de ácido araquidónico esterificado en las especies de PC y PI está mediada por las enzimas cPLA₂ y CoA-IT (en el caso de PC) pero no por la enzima iPLA₂, como se puede observar en la figura 12 a modo de resumen.

En relación a los fosfolípidos sin ácido araquidónico esterificado, se comprobó cómo la inhibición de iPLA₂ pero no de cPLA₂ revirtió la disminución en el contenido de PC provocada por la estimulación celular con zimosán. Al observar las especies individuales que ven revertidos sus niveles por la inhibición de la iPLA₂ con FKGK18, se comprobó que dicha enzima parecía tener preferencia por las especies PC(32:0) y PC(34:1).

Por otra parte, los niveles de las especies de PI sin ácido araquidónico unido incrementaron sus valores en respuesta a la estimulación con zimosán, incrementándose ese aumento por las inhibiciones de las enzimas cPLA₂ e iPLA₂. Este aumento de los niveles de fosfatidilinositol es debido a la producción celular por la ruta *de novo*, ya que la célula tiene grandes requerimientos de fosfatidilinositol, necesario para la formación de fosfatidilinositol 4,5-difosfato, que será hidrolizado por la fosfolipasa C dando lugar a inositol trifosfato y diacilglicerol, mensajeros muy importantes en diversas rutas de señalización celular.

Los niveles de las especies de PE, tanto con ácido araquidónico esterificado como sin ácido araquidónico unido, permanecieron estables, sin alterarse por la estimulación celular con zimosán ni por la inhibición de la cPLA₂ o de la iPLA₂. Esa estabilidad en los niveles de las especies de PE se debe a que esta clase de fosfolípidos se encuentra en equilibrio entre la liberación de ácido araquidónico esterificado y la transacilación de AA procedente de PC principalmente.

Con estos resultados, podemos concluir que la cPLA₂ tiene preferencia por los fosfolípidos de PC y PI conteniendo ácido araquidónico, así como la enzima iPLA₂ por los fosfolípidos de PC sin ácido araquidónico unido, principalmente por aquellas especies con ácido palmítico esterificado.

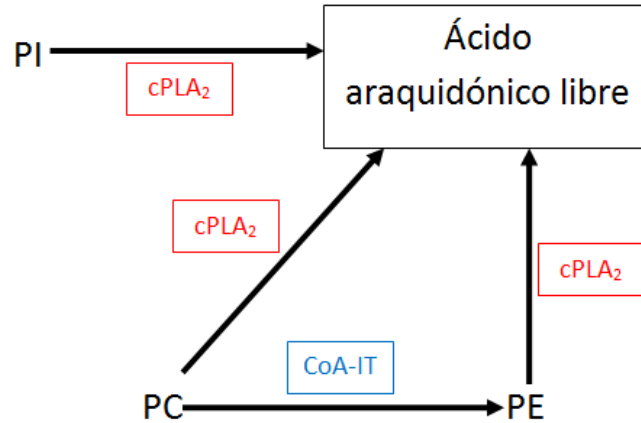


Figura 12. Liberación de ácido araquidónico desde los diferentes tipos de fosfolípidos y enzimas implicadas. cPLA₂: Fosfolipasa A₂; CoA-IT: Transacilasa independiente de coenzima A.

Finalmente, se decidió estudiar el efecto de la activación de los macrófagos peritoneales de ratón con zimósán y con zimósán opsonizado sobre las principales especies de fosfatidilinositol, descubriendo que dicha estimulación provocó un aumento en los niveles de las principales especies de PI, especialmente en las especies PI(34:1) y PI(36:1).

Por último, este trabajo demuestra la utilidad de la lipidómica como herramienta para el estudio e identificación de especies de fosfolípidos en células en reposo y estimuladas y su posible uso como enfoque complementario a otras técnicas bioquímicas o inmunológicas.

6. Conclusiones

- La reacción de transacilación catalizada por la CoA-IT utiliza las especies de PC como donadoras del ácido araquidónico para transferirlo a las especies de PE.
- La estimulación de los macrófagos peritoneales de ratón con zimosán provoca la disminución en los niveles de las especies de PC, al contrario que en las especies de PE, las cuales no sufren ese descenso.
- Las especies de PE sí son sustrato de las reacciones de liberación de ácido araquidónico, aunque se mantienen en un equilibrio entre las reacciones de desacilación y las de transacilación, por lo que no se aprecia liberación neta desde especies de PE.
- La liberación de ácido araquidónico esterificado en las especies de PC y PI está mediada por las enzimas cPLA₂ y CoA-IT (en el caso de PC) pero no por la enzima iPLA₂.
- La enzima cPLA₂ tiene preferencia por los fosfolípidos de PC y PI conteniendo ácido araquidónico
- La enzima iPLA₂ tiene preferencia por los fosfolípidos de PC sin ácido araquidónico unido, principalmente por aquellas especies con ácido palmítico esterificado.
- La estimulación de los macrófagos peritoneales de ratón con zimosán y con zimosán opsonizado produce un aumento en los niveles de las principales especies de PI, especialmente en las especies PI(34:1) y PI(36:1).

7. Bibliografía:

1. Astudillo, A.M., D. Balgoma, M.A. Balboa, J.Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 249-256.
2. Zhou, L., A. Nilsson. 2001. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J. Lipid Res.* 42: 1521-1542.
3. Stables, M.J., D.W. Gilroy. 2011. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution, *Prog. Lipid Res.* 50: 35–51.
4. Spector, A.A., X. Fang, G.D. Snyder, N.L. Weintraub. 2004. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function, *Prog. Lipid Res.* 43: 55–90.
5. Blank, M.L., Z.L. Smith, F. Snyder. 1992. Contributing factors in the trafficking of [³ H] arachidonate between phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 262–272.
6. Astudillo, A.M., G.Pérez-Chacón, D. Balgoma, L. Gil-de-Gómez, V. Ruipérez, C. Guijas, M.A. Balboa, 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.
7. McArthur, M.J., B.P. Atshaves, A. Frolov, W.D. Foxworth, A.B. Kier, F. Schroeder. 1999. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J. Lipid Res.* 40: 1371-1383.
8. Pérez-Chacón, G., A.M. Astudillo, D. Balgoma, M.A. Balboa, J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases, *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103–1113.
9. Shindou, H., M. Eto, R. Morimoto, T. Shimizu. 2009. Identification of membrane Oacyltransferase family motifs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383: 320–325.
10. Lands, W.E.M. 2000. Stories about acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta* 1483: 1–14.
11. Chilton, F.H., A. N. Fonteh, M. E. Surette, M. Triggiani, J. D. Winkler. 1996. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1299: 1–15.
12. Six, D.A., E.A. Dennis. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization, *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 1–19.
13. Balsinde, J., M.V. Winstead, E.A. Dennis. 2002. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Letters* 531: 2-6.
14. Gijón, M.A., D.M. Spencer, A.R. Siddiqi, J.V. Bonventre, 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.
15. MacDonald, J.I., H. Sprecher. 1991. Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1084: 105–121.
 16. Winkler, J.D., C.M. Sung, C.F. Bennet, F.H. Chilton. 1991. Characterization of CoA-independent transacylase activity in U937 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1081(3):339-46.
 17. Hermansson, M., K. Hokynar, P. Somerharju. 2011. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells, *Prog. Lipid Res.* 50: 240–257.
 18. Winkler, J.D., A.N. Fonteh, C.M. Sung, J.D. Heravi, A.B. Nixon, M. Chabot-Fletcher, D. Griswold, L.A. Marshall, F.H. Chilton. 1995. Effects of CoA-independent transacylase inhibitors on the production on the production of lipid inflammatory mediators. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274(3):1338-47.
 19. Surette, M.E., J. D. Winkler, A.N. Fonteh, F.H. Chilton. 1996. Relationship between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry.* 35(28): 9187-9196.
 20. Pérez, R., X. Matabosch, A. Llebaria, M.A. Balboa, J. Balsinde. 2005. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J. Lipid Res.* 47(3): 484-491.
 21. Balsinde, J., B. Fernández, and E. Diez. 1990. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* 144: 4298-4304.
 22. Balsinde, J., B. Fernández, J. A. Solís-Herruzo, and E. Diez. 1992. Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1136: 75–82.
 23. Underhill, D.M. 2003. Macrophage recognition of zimosán particles. *J. Endotoxin Res.* 9: 176-180.
 24. Gil-de-Gómez, L., A.M. Astudillo, C. Meana, J.M. Rubio, C. Guijas, M.A. Balboa, J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J. Immunol.* 190: 5169-5177.
 25. Balgoma, D., A.M. Astudillo, G. Pérez-Chacón, O. Montero, M.A. Balboa, J. Balsinde. 2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* 184: 3857-3865.
 26. Bligh, E.G., W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
 27. Guijas, C., A.M. Astudillo, L. Gil-de-Gómez, J.M. Rubio, M.A. Balboa, J.B. Balsinde. 2012. Phospholipid sources for adrenic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages: comparison with arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1821: 1386-1393.

28. Kokotos, G., Y.H. Hsu, J.E. Burke, C. Baskakis, C.G. Kokotos, V. Magrioti, E.A. Dennis. 2010. Potent and selective fluoroketone inhibitors of group VIA calcium-independent phospholipase A₂. *J. Med. Chem.* 53: 3602-3610.