



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

TESIS DOCTORAL

**Estudio lipidómico de la activación y
maduración de células dendríticas.
Efecto del ácido araquidónico y de los
isómeros del ácido hexadecenoico**

Presentada por Laura Pereira de Blas para
optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Jesús Balsinde Rodríguez

Dra. María Ángeles Balboa García



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



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^a Laura Pereira de Blas, Graduada en Química por la Universidad de Valladolid y Máster en Investigación Biomédica por la Universidad de Valladolid, ha realizado bajo su dirección los estudios y experimentos necesarios para la elaboración de la memoria titulada “Estudio lipídómico de la activación y maduración de células dendríticas. Efecto del ácido araquidónico y de los isómeros del ácido hexadecenoico”, 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

Valladolid, 2022

A MI FAMILIA

FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda para la contratación predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León (convocatoria de 2017), cofinanciada por el Fondo Social Europeo y desarrollada con el apoyo de los siguientes proyectos de investigación:

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

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

- Guijas, C., Bermúdez, M.A., Meana, C., Astudillo, A.M., Pereira, L., Fernández-Caballero, L., Balboa, M.A. & Balsinde J. (2019) Neutral lipids are not a source of arachidonic acid for lipid mediator signaling in human foamy monocytes. *Cells* 8: 941.

- Astudillo, A.M., Meana, C., Guijas, C., Pereira, L., Lebrero, P., Balboa, M.A. & Balsinde, J. (2018) Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *Journal of Lipid Research* 59: 237-249.
- Vázquez, P., Hernández-Sánchez, C., Escalona-Garrido, C., Pereira, L., Contreras, C., López, M., Balsinde, J., de Pablo, F., & Valverde, Á. M. (2018). Increased FGF21 in brown adipose tissue of tyrosine hydroxylase heterozygous mice: implications for cold adaptation. *Journal of Lipid Research*, 59, 2308–2320.

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

Póster:

- Lipid droplet accumulation within dendritic cells as a determinant of their immune functions to an inflammatory process. Laura Pereira, María Balboa and Jesús Balsinde. Reunión anual CIBERDEM (3-4 noviembre de 2021). Mataró, España.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS XIII

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... 19

1. SISTEMA INMUNE 21

1.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS..... 22

1.2. PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO 26

2. GOTAS LIPÍDICAS 35

2.1. ¿CÓMO SE FORMAN Y CRECEN LAS GOTAS LIPÍDICAS? 37

2.2. DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LAS GOTAS LIPÍDICAS 40

2.3. INTERACCIÓN ENTRE LAS GOTAS LIPÍDICAS Y OTROS ORGÁNULOS INTERNOS EN LA
INMUNIDAD. 41

2.4. GOTAS LIPÍDICAS Y FUNCIÓN INMUNE 43

3. ISÓMEROS DEL 16:1 47

3.1. IMPLICACIÓN DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LOS TRASTORNOS METABÓLICOS 49

3.2. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN CÉLULAS INMUNES 50

CAPÍTULO II. OBJETIVOS 53

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS 57

1. MATERIALES..... 59

1.1. MEDIO DE CULTIVO..... 59

1.2. SOLUCIONES Y BUFFERS 60

1.3. REACTIVOS LÍQUIDOS Y DISOLVENTES 60

1.4. PRODUCTOS Y REACTIVOS SÓLIDOS..... 62

1.5. LÍPIDOS 62

1.6. ESTÍMULOS 64

1.7. MATERIAL DE MICROSCOPÍA 65

1.8. ANTICUERPOS.....	65
1.9. PCR CUANTITATIVA (QPCR).....	66
1.10. EQUIPAMIENTO	68
1.11. MATERIAL BIOLÓGICO	69
2. MÉTODOS	71
2.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS.....	71
2.2. TRATAMIENTOS CELULARES	74
2.3. MEDICIÓN DE PROTEÍNA	75
2.4. ANÁLISIS DE LÍPIDOS.....	76
2.5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNA Y DNA	82
2.6. MICROSCOPIA CONFOCAL	84
2.7. CITOMETRÍA DE FLUJO	85
2.8. ENSAYOS DE RADIOACTIVIDAD.....	87
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	88
<u>CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....</u>	89
1. CARACTERIZACIÓN LIPIDÓMICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	91
1.1. CARACTERIZACIÓN LIPIDÓMICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS	91
1.2. DIFERENCIAS LIPIDÓMICAS ENTRE LOS MONOCITOS HUMANOS Y LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DERIVADAS DE MONOCITOS	99
1.3. COMPARACIÓN LIPIDÓMICA ENTRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS Y LA LÍNEA CELULAR DC2.4.....	100
1.4. PERFIL LIPIDÓMICO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURAS.....	106
2. EFECTOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	109
2.1. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO PROMUEVE EL INCREMENTO DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN LÍPIDOS NEUTROS.....	109
2.2. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INDUCE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	116
2.3. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EXÓGENO DISMINUYE LA FAGOCITOSIS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS	122

2.4. LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS SE VE AUMENTADA EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EXPUESTAS A ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EXÓGENO	125
2.5. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO IMPIDE LA TRANSLOCACIÓN DE MHC-I A LA SUPERFICIE CELULAR EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	126
2.6. LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO SE VE DISMINUIDA POR ACCIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	130
3. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	132
3.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS 16:1 EN DISTINTAS ESPECIES LIPÍDICAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS	132
3.2. INCORPORACIÓN DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LAS DISTINTAS CLASES DE LÍPIDOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS	139
3.3 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN CÉLULAS ACTIVADAS POR LPS..	142
3.4. RESPUESTA INFLAMATORIA DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	144
3.5. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 PREVIENEN LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN LAS CÉLULAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS	147
<u>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....</u>	<u>151</u>
1. CARACTERIZACIÓN LIPIDÓMICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	153
2. EFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LAS FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	157
3. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	165
<u>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....</u>	<u>171</u>
<u>CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>175</u>

ABREVIATURAS

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

ATGL: Lipasa adipocítica de triglicéridos

APC: Célula presentadora de antígeno

BSA: Albúmina de suero bovino

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CE: Éster de colesterol

CoA: Coenzima A

COX: Ciclooxygenasa

cPLA₂: Fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de Ca²⁺ de grupo IVA

DAG: Diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamoni-2-fenilindol

DC: Célula dendrítica

DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa

DHA: Ácido docosahexaenoico

DMDS: Dimetildisulfuro

DNA: Ácido desxirribonucleico

ELOVL: Elongasa de ácidos grasos de cadena muy larga

ER: Retículo endoplasmático

FADS: Desaturasa de ácidos grasos

FAHFA: Ácidos grasos esterificados a ácidos grasos hidroxilados

FAME: Éster metílico de un ácido graso

FAS: Sintetasa de ácidos grasos

FBS: Suero fetal bovino

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il-etanosulfónico

HLA: Complejo de histocompatibilidad en humanos, del inglés *human leucocytic antigen*

HSL: Lipasa sensible a hormonas

HSP: Proteína de choque térmico

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IMDM: Medio de Dulbecco modificado por Iscove

LDs: Gotas lipídicas

LPS: Lipopolisacárido

MAG: Monoacilglicerol

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

moDC: Célula dendrítica derivada de monocitos humanos

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

m/z: Relación masa/carga

NK: Célula *Natural Killer*

NOS2: Óxido nítrico sintasa 2

AO: Ácido oleico

PA: Ácido fosfatídico

PBS: Tampón fosfato salino

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Fosfatidiletanolamina

PI: Fosfatidilinositol

PL: Fosfolípido

PLIN: Perilipinas

POLY (I:C): Ácido poliinosínico-policitídílico

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

PS: Fosfatidilserina

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI: Medio *Roswell Park Memorial Institute*

SCD: Esteroil-CoA desaturase

SREBP: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides

TAG: Triacilglicerol

TAP: Transportador asociado con el procesamiento de antígenos

TLC: Cromatografía en capa fina

TLR: Receptor tipo *toll*

Nombre sistemático	Nombre trivial	Notación abreviada
Ácido dodecanoico	Ácido láurico	12:0
Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	14:0
Ácido pentadecanoico	Ácido pentadecílico	15:0
Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	16:0
Ácido cis-6-hexadecenoico	Ácido sapiénico	16:1n-10
Ácido cis-7-hexadecenoico	Ácido hipogeico	16:1n-9
Ácido cis-9-hexadecenoico	Ácido palmítico	16:1n-7
Ácido heptadecanoico	Ácido margárico	17:0
Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	18:0
Ácido cis-9-ocadecenoico	Ácido oleico	18:1n-9
Ácido cis-11-octadecenoico	Ácido cis-vaccénico	18:1n-7
Ácido cis-9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico	18:2n-6
Ácido cis-6,9,12-octadecatrienoico	Ácido γ -linolénico	18:3n-6
Ácido cis-9,12,15-octadecatrienoico	Ácido α -linolénico	18:3n-3
Ácido eicosanoico	Ácido araquídico	20:0
Ácido cis-11-eicosaenoico	Ácido gondoico	20:1n-9
Ácido cis-11,14-eicosadienoico	Ácido dihomolinoleico	20:2n-6
Ácido cis-5,8,11-eicosatrienoico	Ácido <i>Mead</i>	20:3n-9
Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico	Ácido dihomo- γ -linolénico	20:3n-6
Ácido cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ácido araquidónico	20:4n-6
Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ácido timnodónico (EPA)	20:5n-3
Ácido cis-13-docosenoico	Ácido erúxico	22:1n-9
Ácido cis-7,10,13,16-docosatetraenoico	Ácido adrénico	22:4n-6
Ácido cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico	Ácido osbond	22:5n-6
Ácido cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico	Ácido clupanodónico	22:5n-3
Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Ácido cervónico (DHA)	22:6n-3

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune se clasifica en dos tipos dependiendo de la rapidez y la especificidad de la reacción: sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. El primero se caracteriza por una respuesta rápida y no específica, mientras que el sistema adaptativo es preciso y con memoria, pero necesita días o semanas para desarrollarse. Aunque se haga una separación y diferenciación de los dos sistemas, ambos tienen que funcionar conjuntamente para resolver el proceso inflamatorio.

El sistema innato da respuesta a daños locales o a patógenos mediante barreras físicas, químicas (citoquinas, proteínas del plasma y complemento) y microbiológicas como células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células que liberan mediadores inflamatorios (basófilos, mastocitos y eosinófilos), células NK (*natural killer*) y células dendríticas (1,2) (**Figura 1**).

Las respuestas del sistema adaptativo implican la proliferación de células B y células T tras su activación como respuesta a la presentación de antígeno por parte de las llamadas células presentadoras de antígeno (en inglés, APC) (**Figura 1**). Las células T activan a las células B y macrófagos y actúan matando células infectadas por virus, mientras que las células B secretan los anticuerpos específicos encargados de eliminar los patógenos extracelulares (2,3).

Las células APC, en concreto los macrófagos y las células dendríticas, tienen un papel importante en la unión entre el sistema innato y el adaptativo ya que son los encargados de la presentación de antígeno a linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Por tanto, las APC son capaces de iniciar, estimular y polarizar la respuesta del sistema inmune adaptativo para combatir a los patógenos (4).

Para ello, las células detectan patrones moleculares asociados a patógenos expresados en los microorganismos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Al activarse los PRR comienza una cascada de señalización intracelular que conlleva, en última instancia, la liberación de citoquinas y otros mediadores que

promueven la resolución del problema y la activación y polarización del sistema inmune adaptativo (5).

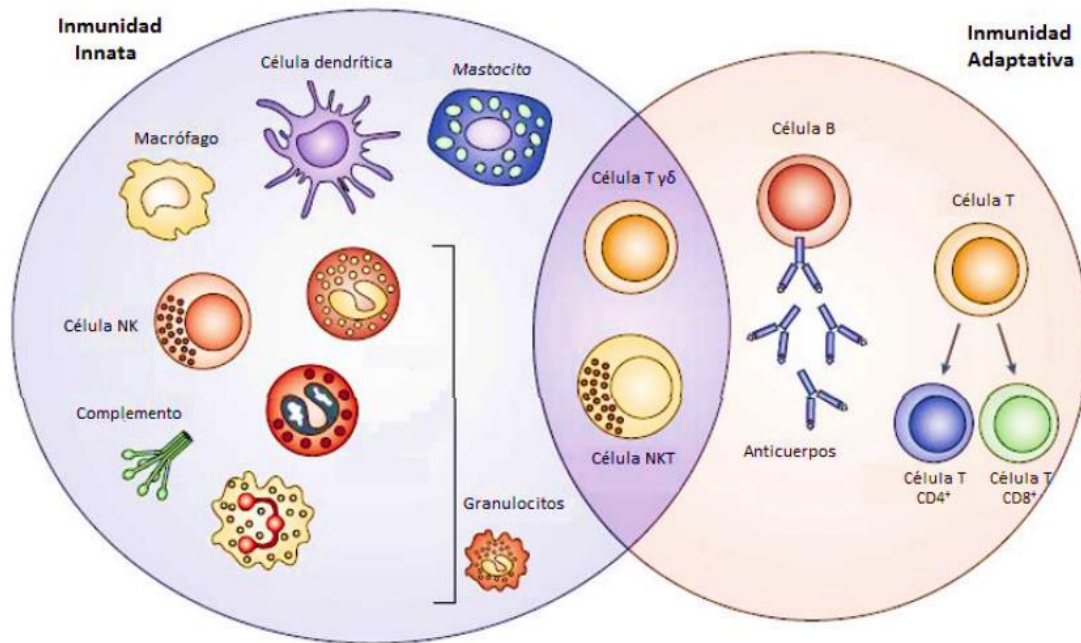


Figura 1. Clasificación del sistema inmune. Células representativas de la inmunidad innata y adaptativa. Adaptado de Dranoff (6).

1.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés), llamadas así por sus proyecciones en forma de dendritas, son responsables de la iniciación de las respuestas inmunitarias adaptativas y funcionan como “centinelas” del sistema inmunitario. En 1973 fueron identificadas por primera vez por Steinman y Cohn gracias a su morfología característica y a su capacidad de activar linfocitos T vírgenes (7).

1.1.2. Poblaciones de células dendríticas

Las células dendríticas son una población muy heterogénea clasificada en diferentes subconjuntos. Esta clasificación se basa en un conjunto de características como el fenotipo, la firma genética clave, incluyendo factores de transcripción críticos, TLRs y otras moléculas funcionalmente relevantes incluyendo quimioquinas y receptores de lectina de tipo C y ontogenia (8,9). Actualmente se pueden clasificar en tres grandes grupos: *steady-state* DCs, células dendríticas inflamatorias y células de Langerhans (**Figura 2**).

A su vez, las *steady-state* DCs se pueden clasificar en células dendríticas convencionales (cDCs) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs). Estas células se identifican por la falta de expresión de marcadores de células T, células B, células NK, una alta expresión de MHC II y la falta de marcadores de monocitos (9). Su diferenciación depende de la citoquina Flt3L (10).

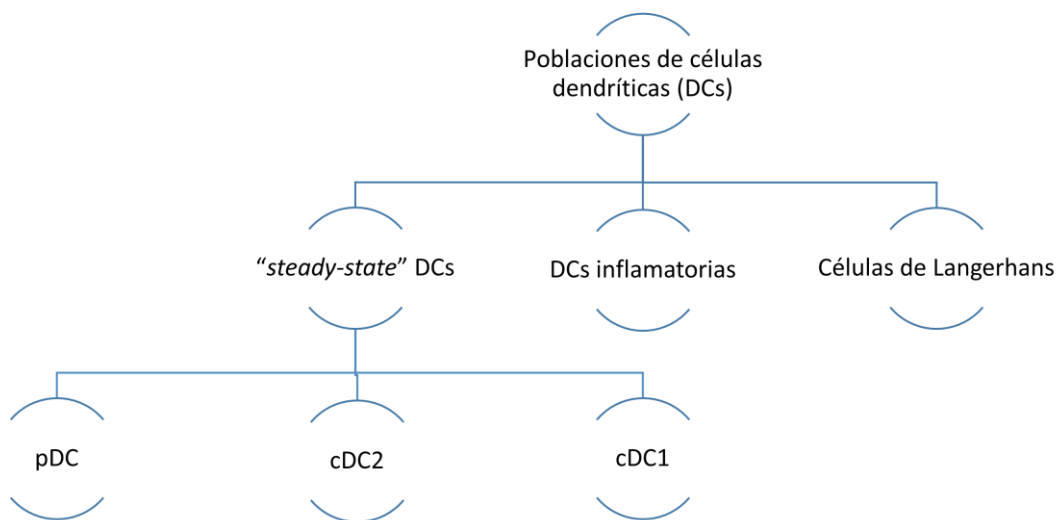


Figura 2. Clasificación simplificada de las poblaciones de células dendríticas

Las células dendríticas convencionales (cDC) se clasifican en dos poblaciones: cDC1 y cDC2 (**Figura 2**). Las células convencionales DC1 se caracterizan por la expresión de un receptor de lectina tipo C Clec9 y el receptor de quimioquinas XCR1 mientras que las convencionales DC2 expresan la proteína reguladora de señal α (SIRP α) (11). Las cDC1 se conocen generalmente como células que realizan la presentación cruzada de antígenos de células muertas mejorando la respuesta inmune antitumoral en modelos de ratón. Sin embargo, en humanos sigue en controversia su rol en la presentación cruzada. Estas células juegan un papel crítico en la inducción de la inmunidad durante infecciones bacterianas o virales, para combatir la tumorigénesis y alérgenos. Por otro lado, las cDC2 son la mayor población de DC presentes en diferentes tejidos y órganos humanos. Expresan gran variedad de TLRs y son capaces de responder a un gran número de señales de daño desde nucleótidos hasta polisacáridos. También expresan altos niveles de NLRPs y otras moléculas asociadas a la señalización inflamatoria (12). Estas células se encuentran distribuidas en la región de las células B en los nodos linfáticos y están asociadas a la presentación de antígenos a células T CD4⁺. También son conocidas como fuertes inductoras de la respuesta inmune Th17 y de células T reguladoras en el intestino y timo.

La tercera y última población de las DC *steady-state* son las células plasmacitoides caracterizadas por su habilidad de producir grandes cantidades de IFN de tipo I después de su activación con DNA metilado o con virus (13). Se ha relacionado a este tipo celular con varias enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso y la psoriasis al estar produciendo grandes cantidades de IFN-I al activarse por reconocimiento de nucleótidos propios (14,15).

Otro grupo de células dendríticas son las células de Lagerhans (LCs) (**Figura 2**). Las LCs poseen un fenotipo de célula dendrítica pero origen embrionario y capacidad de autoproliferación (16). Estas células se restringen específicamente a la epidermis y están conservadas en todas las especies reportadas (17), poseen una morfología velada típica con largas dendritas y se caracterizan por la presencia de gránulos de Birbeck y la expresión de langerina o CD207 (18). Las LCs tienen la capacidad de migrar a los nodos linfáticos para iniciar la respuesta inmune contra toxinas microbianas (19). Se ha

relacionado a estas células con la dermatitis atópica al promover el desarrollo de poblaciones de células T proalérgicas (20).

Finalmente, la última población está constituida por las células inflamatorias o células derivadas de monocitos (moDCs) (**Figura 2**), que aparecen con la diferenciación de los monocitos clásicos CD14⁺ y no clásicos CD16⁺ ante una respuesta inflamatoria (21) y que se tratarán en el apartado siguiente.

1.1.3. Células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs)

Como ya se ha mencionado, las moDCs se diferencian a partir de monocitos debido a citoquinas y quimioquinas presentes en el ambiente inflamatorio tras una infección (21). La primera evidencia vino del trabajo de Sallusto y Lanzavecchia, que generaron DCs a partir de monocitos humanos de sangre (22). Estas células expresan altos niveles de MHC-II, diferentes moléculas de coestimulación y CD11c. Se pueden encontrar en cualquier tejido expuesto a una infección y son capaces de migrar a los nodos linfáticos a través de CCR2, presentar antígenos a las células T y dar lugar a una respuesta inmune.

Las moDCs humanas se caracterizan por la falta de expresión de marcadores específicos de linaje, altos niveles de HLA-DR, CD11c y otros marcadores de superficie como CD1a, CD14, BDCA1. Se ha visto que estas células generadas *in vitro*, diferenciadas usando citoquinas como GM-CSF e IL-4, poseen un perfil transcriptómico similar a las moDCs *in vivo* (23). Numerosos estudios *ex vivo* e *in vivo* han demostrado que las moDCs son capaces de presentar antígenos a células T CD4⁺ (24–27). Las moDCs también pueden presentar antígenos exógenos a células T CD8⁺ en un proceso conocido como presentación cruzada. Se ha observado que las moDCs purificadas que han capturado antígenos *in vivo* pueden presentarlos *ex vivo* vía presentación cruzada a las células T CD8⁺ (28–31). En cuanto a los mecanismos intracelulares implicados, las moDCs utilizan tanto la vía citosólica como la vacuolar para la presentación cruzada, a diferencia de las DCs residentes que utilizan principalmente la vía citosólica (28).

Las mDCs se han descrito en varias situaciones patológicas inflamatorias: dermatitis atópica, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis y ascitis tumoral (23,32–35).

1.2. PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO

Las células dendríticas son consideradas las células profesionales de presentación de antígeno (APC) por excelencia y juegan un papel importante en la unión entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo (1,9).

Los péptidos extracelulares son presentados por las APCs después de su internalización, procesamiento y carga en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase II que se encuentran en la membrana celular con el fin de activar a las células T CD4⁺. Por otra parte, los antígenos intracelulares como bacterias, parásitos, virus o antígenos tumorales, después de una proteólisis citoplasmática, los péptidos resultantes son cargados a las moléculas de MHC de clase I en el retículo endoplasmático (ER) que posteriormente serán transportados a la membrana plasmática para la presentación a células T CD8⁺ (36,37). Existe un tercer proceso de presentación de antígenos conocido con el término presentación cruzada por el cual, antígenos exógenos se presentan vía MHC de clase I para el inicio de respuestas de células T CD8⁺ (38,39).

1.2.1. Presentación clásica vía MHC-I

Todas las células nucleadas expresan moléculas MHC de clase I y presentan fragmentos proteicos de origen citosólico y/o nuclear en la superficie celular. Las moléculas de MHC-I se expresan en casi todas las células nucleadas. Los genes que codifican a dichas moléculas son tres en ratón (H2-D, H2-K y H2-L) y otros tres diferentes en humanos (HLA-A, HLA-B y HLA-C) (40).

La presentación vía MHC-I o presentación directa se refiere al proceso por el cual los péptidos antigénicos que se generan dentro del citosol por el proteasoma, se translocan al ER y se cargan a las moléculas de MHC de clase I para su posterior presentación a los linfocitos T CD8⁺ en la superficie celular (36,37) (**Figura 3**). El proteasoma es responsable de la mayoría de los procesos no lisosomales de degradación de proteínas intracelulares y su actividad catalítica es la responsable de la generación de la mayoría de los péptidos presentados por MHC-I (41,42). Después de la proteólisis citosólica, los péptidos se reclutan en el ER por el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP), que está constituido por dos subunidades: TAP1 y TAP2 (42) (**Figura 3**). En el ER, la molécula de MHC-I se ensambla junto a la llamada β_2 -microglobulina (β_2m) (43). La unión con el péptido logra la estabilización de MHC clase I debido a su inserción en el surco de unión de péptidos, que acomoda péptidos de 8–9 aminoácidos. Cuando el MHC-I no tiene péptidos unidos que lo estabilicen, se une, junto con TAP, a las proteínas ERp57, tapasina y calnexina-calreticulina que constituyen el complejo PLC (del inglés *peptide-loading complex*) (43,44). La función del complejo PLC es la translocación de los antígenos proteolizados hacia el ER, así como su carga en las moléculas de MHC de clase I. La última proteína del ER asociada al procesamiento de los péptidos es la aminopeptidasa del ER asociada al procesamiento de antígeno, ERAAP en ratón y ERAP-1 en humano. Esta proteína se encargará de cortar los péptidos de más de 8-11 residuos de aminoácidos que provienen de TAP ya que una longitud mayor no es compatible con la molécula de MHC-I (45,46).

Cuando los péptidos se unen al MHC-I, las chaperonas se liberan y el complejo péptido-MHC-I deja el ER y se transloca hacia la superficie celular para su posterior presentación (36,37) (**Figura 3**). Por el contrario, los péptidos que no logran asociarse con el MHC-I en el ER regresan al citosol para su degradación (47) y las moléculas de MHC-I serán o bien degradadas en el citosol por el proteasoma (48) o recicladas por un mecanismo dependiente de la glucoproteína transferasa-1 de UDP-glucosa (UGT1) que permite que la molécula de MHC-I pueda acceder de nuevo al complejo PLC para cargar nuevos péptidos vía tapasina (49,50).

1.2.2. Presentación clásica vía MHC-II

A diferencia de MHC-I, la molécula de MHC-II se expresa constitutivamente en células dendríticas, macrófagos y linfocitos B; y bajo condiciones inflamatorias se expresa en ciertos tipos de células endoteliales y epiteliales. Los genes que codifican esta proteína en humanos son tres genes polimórficos (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR) y en ratones dos (I-A y I-E) (50). Las moléculas de MHC-I y MHC-II tienen muchas similitudes, pero una de sus mayores diferencias es el hueco de unión del péptido ya que en las moléculas de MHC-II está abierto permitiendo la unión de péptidos largos entre 10-30 residuos.

La síntesis y formación de MHC-II se realiza en el ER, donde dos cadenas transmembrana, α y β , se unen y se asocian con la proteína de cadena invariante (Ii) que actúa como un pseudopéptido para la estabilización y restricción del MHC-II (50) (**Figura 3**). La movilización del complejo Ii-MHC-II al compartimento endosomal tardío denominado compartimento de MHC-II (MIIC) todavía no está determinado si sería a través del aparato de Golgi o a través de superficie celular (51,52). Posteriormente, proteasas llamadas catepsinas digieren Ii dejando un fragmento residual de 24 aminoácidos llamado CLIP (del inglés *Class II-associated Invariant chain Peptide*) en el surco de unión a péptidos del MHC-II. En el mismo compartimento, los antígenos extracelulares son degradados y, por último, el péptido se une a la molécula MHC-II. En el MIIC, las moléculas MHC de clase II requieren el factor de intercambio de péptidos HLA-DM (H2DM en ratones) que cataliza el intercambio del CLIP por un péptido específico derivado de una proteína degradada en la vía endosomal (53) (**Figura 3**).

Una vez que se estabiliza el complejo MHC-II-péptido, se transporta a la membrana plasmática donde se dará lugar la presentación de antígeno a linfocitos T CD4⁺ que se activan y dan lugar a la cascada inmunológica.

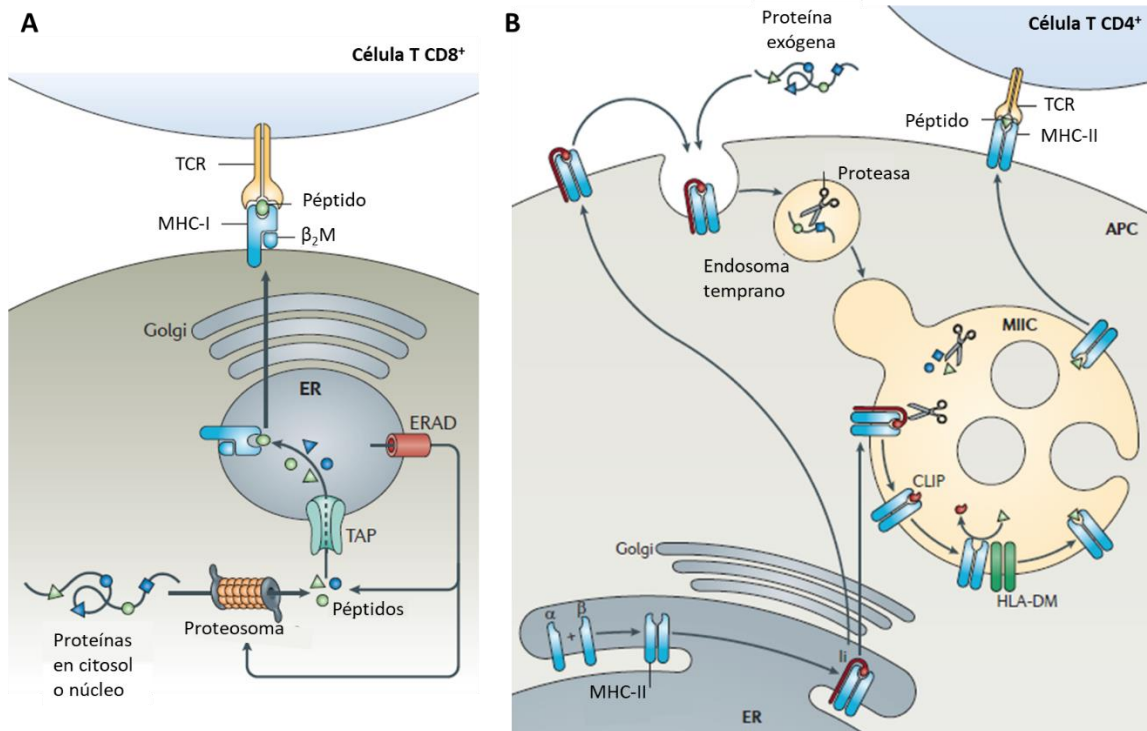


Figura 3. Las vías básicas de presentación de antígenos del MHC-I y MHC-II. (A) La presentación de antígeno por moléculas MHC-I. Primero, los antígenos son degradados por el proteosoma, se translocan a través de TAP al ER y se carga en las moléculas de MHC-I. Los complejos péptido-MHC-I son liberados del ER y transportados a través del aparato de Golgi a la membrana plasmática para la presentación de antígenos a células T CD8⁺. (B) MHC-II se forma por el ensamblaje de las cadenas α y β en el ER y forman un complejo con la cadena invariante (Ii). El heterotrímero Ii-MHC-II se transporta hasta el MIIC. Las proteínas endocitadas y la Ii son degradadas por las proteasas residentes en el MIIC. El fragmento de Ii, CLIP, permanece en el surco de unión al péptido de MHC-II y se intercambia por un péptido antigénico con la ayuda de HLA-DM. Los complejos péptidos-MHC-II son transportados a la membrana plasmática para presentar péptidos antigénicos a células T CD4⁺. β 2m: β 2-microglobulina; ERAD: proteína de degradación asociada al ER; TCR: receptor de células T; APC: célula presentadora de antígeno. Adaptado de Neefjes J et al (36).

1.2.3. Presentación cruzada

Una de las rutas “no clásicas” de procesamiento y presentación de antígeno es la conocida como presentación cruzada (38,39). Las células dendríticas son consideradas el tipo celular más eficiente en cuanto a presentación cruzada de antígeno, pero dicha capacidad puede variar entre los diferentes subconjuntos de DCs. En cuanto a las moDCs, son muy eficientes en condiciones inflamatorias, sin embargo, el mecanismo subyacente parece diferir de las cDCs (28,54).

Actualmente se han descrito dos vías de presentación de antígeno conocidas como ruta “vacuolar” y ruta “citosólica” (39) (**Figura 4**). La ruta “citosólica” es sensible a inhibidores del proteasoma, lo que sugiere que las proteínas endocitadas o fagocitadas tienen que llegar al citosol donde son degradadas por el proteasoma (55). Por otro lado, la ruta “vacuolar”, es resistente a inhibidores del proteasoma pero sensible a inhibidores de proteasas del lisosoma lo que sugiere que tanto el procesamiento como la carga del antígeno ocurre en compartimentos endocíticos (56). Cómo contribuyen ambas rutas a la presentación cruzada de antígeno todavía no se ha determinado, pero sí parece tener un papel más importante la ruta citosólica para la presentación cruzada *in vivo* (56–58).

En la ruta citosólica, los péptidos generados por el proteasoma pueden ser transportados al ER mediante TAP1 y TAP2 para posteriormente anclarse a las moléculas de MHC-I (**Figura 4**). Sin embargo, no hay evidencia directa de que la carga de péptidos en MHC-I se produce en el ER. El reclutamiento de TAP y de las moléculas de MHC-I a fagosomas y endosomas sugiere que la carga de péptidos podría ocurrir también en compartimentos endocíticos (59,60). Además, los polipéptidos generados por el proteasoma necesitan ser cortados por peptidasas amino-terminales para ser cargados en las moléculas de MHC-I. Se ha demostrado que las peptidasas involucradas en este proceso de la presentación cruzada son la aminopeptidasa asociada a ER 1 (ERAP1) y la aminopeptidasa sensible a la insulina endosomal (IRAP) (61,62).

Para iniciar la presentación cruzada las DCs internalizan antígenos extracelulares a partir de diferentes mecanismos: fagocitosis, endocitosis y macropinocitosis. La degradación del antígeno ocurre en un proceso con muchas etapas y, dependiendo de la naturaleza de antígeno, el mecanismo de internalización y la ruta (vacuolar o citosólica) puede darse lugar en endo/fagosomas o en el ER. Una de las características principales de los compartimentos fagocíticos en las DCs es su baja capacidad degradativa tanto *in vivo* como *in vitro* debido a una baja actividad de sus proteasas en comparación con otras células fagocíticas como los macrófagos (63). Por lo tanto, se ha asociado una menor degradación de los antígenos con una mayor presentación cruzada (63,64), de tal manera que antígenos como la ovoalbúmina, que son internalizados por el receptor de manosa, se dirigen a los endosomas tempranos, lo que favorece la presentación cruzada (65).

Esta disminución de la proteólisis en DCs se debe, principalmente, a unos menores niveles de proteasas lisosomales en los endosomas y fagosomas y a una menor actividad de dichas proteasas debido a un pH alto en esos compartimentos (alrededor de 7.5). El pH de los endo/lisosomas se regula a través de dos sistemas: bomba de protones vacuolar dependiente de ATP (v-ATPasa) que regula los niveles de H⁺, y NADPH oxidasa 2 (NOX2) que consumiría los protones para la producción de ROS disminuyendo la acidificación. En un estado basal, las DCs poseen una menor actividad de la v-ATPasa comparando con los macrófagos y una mayor actividad de NOX2 (63,66,67). NOX2 también regula el pH fagosomal en moDCs, ya que pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (causada por un defecto genético en NOX2) tienen un aumento de la acidificación fagosomal que conlleva a la alteración de la presentación cruzada de antígeno (66).

Sin embargo, las DCs también presentan antígenos exógenos a linfocitos T CD4⁺ vía MHC-II en un proceso que requiere, a diferencia de la presentación cruzada, una mayor degradación de antígeno. ¿Cómo las DCs son capaces de diferenciar ambas rutas? Todos los estudios sugieren que toma una ruta u otra de presentación en función de los compartimentos intracelulares a los que llega el antígeno dependiendo del receptor de membrana involucrado en el proceso (65). Por ejemplo, una internalización vía receptores de manosa que conlleva una carga del antígeno en endosomas tempranos da lugar a una buena presentación cruzada, mientras que, una internalización vía macropinocitosis hacia endosomas tardíos daría lugar a una presentación vía MHC-II.

En la vía citosólica, los antígenos se exportan al citosol desde compartimentos endocíticos después de ser internalizados, pero el mecanismo por el cual ocurre esto no está bien caracterizado (68–70). Muchos estudios indican que la maquinaria para la retrotranslocación de proteínas mal plegadas desde el ER hasta el citosol (ERAD) junto con las proteínas Sec61 y p97 son necesarias para la exportación de antígenos al citosol, así como para la presentación cruzada de antígeno (71). La proteína Hdr1, una ubiquitina ligasa de ER, también se ha propuesto como candidata para el transporte de antígenos al citosol, ya que su silenciamiento mediante siRNA altera tanto de la translocación del antígeno como de la presentación cruzada (72). Trabajos recientes también involucran a la proteína de choque térmico 90 (HSP90) en la presentación cruzada de antígeno (73).

HSP90 se une al complejo ERAD en el lado citosólico del ER, y las proteínas internalizadas, que necesitan desplegarse antes de su translocación al citosol, se repliegan en el citosol con la ayuda de HSP90 (74,75).

También se han sugerido mecanismos alternativos como la disrupción de la membrana de los endosomas debido a la peroxidación de los lípidos permitiendo la salida de antígenos al citosol (76,77) o el enriquecimiento de esas membranas de esfingomielina durante la formación de gotas lipídicas facilitando también la ruptura de la membrana (78,79).

Una vez que los antígenos alcanzan el citosol son degradados por el proteasoma o el inmunoproteasoma (59,80,81) y después son transportados hacia el orgánulo de presentación cruzada (**Figura 4**). Si los antígenos proteolizados son procesados y cargados en el MHC-I dentro del ER, del fagosoma o de otros compartimentos endocíticos todavía está en estudio. Sin embargo, independientemente del sitio de proceso y carga del antígeno, los péptidos son transportados hacia el orgánulo de la presentación cruzada.

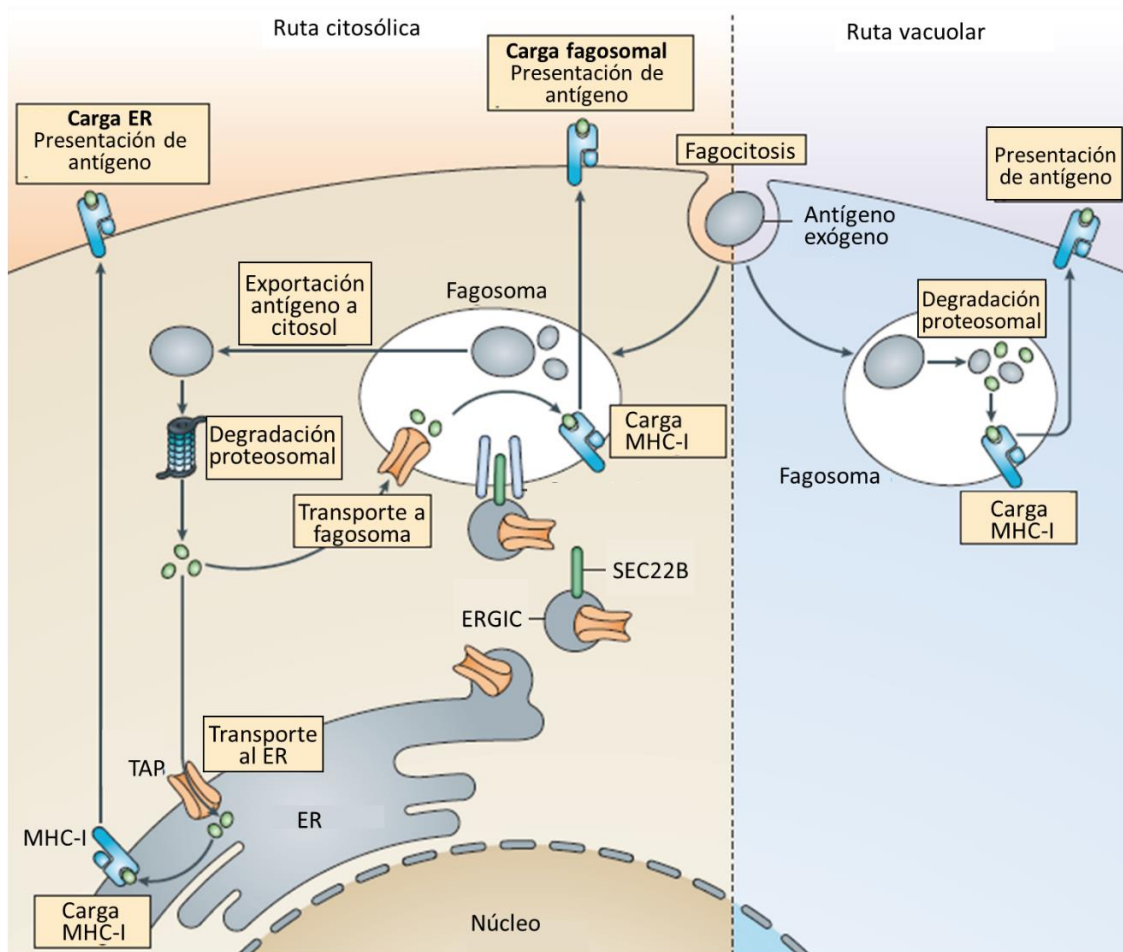


Figura 4. Rutas intracelulares para la presentación cruzada de antígeno en células dendríticas. Después de la fagocitosis exógena los antígenos pueden exportarse al citosol, donde son procesados por el proteasoma. Los antígenos procesados pueden luego cargarse en moléculas del MHC-I en el retículo endoplásmico (ER) (vía citosólica con carga de ER) o regresar al fagosoma para ser cargado en moléculas del MHC-I (vía citosólica con carga fagosómica). La proteína SEC22B, que se localiza en el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC) media el reclutamiento de un subconjunto de componentes del ER, incluido el transportador asociado con el antígeno procesamiento (TAP), a los fagosomas. Alternativamente, los antígenos exógenos pueden degradarse en el fagosoma, donde luego los péptidos generados se cargan en moléculas del MHC-I (vía vacuolar). Adaptada de Joffre OP et al (39).

1.2.4. Presentación cruzada en la inmunidad y el cáncer

La presentación de antígeno ha estado implicada en las respuestas inmunes contra diferentes y múltiples patógenos. Sin embargo, durante las infecciones, las células T CD8⁺ pueden activarse tanto por presentación cruzada como por presentación clásica directa vía MHC-I cuando las propias DC están infectadas (39,82). Las

contribuciones de estas dos vías de activación de células T CD8⁺ depende en gran medida del tipo de antígeno.

Varios estudios han sugerido la relevancia de la presentación cruzada de antígeno en el control de infecciones virales, bacterianas o parasitarias (83–85). Por otro lado, en un ambiente aterosclerótico, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos representan hasta el 50 % de los leucocitos en las placas humanas avanzadas y dominan las respuestas inmunitarias tempranas en las lesiones de los ratones, pero su papel en la aterosclerosis sigue sin resolverse (86–89). Los marcadores de presentación cruzada se correlacionaron con un fenotipo de mayor carga e inestabilidad de la placa lo que apunta a un papel potencial para la presentación cruzada en la progresión y desestabilización de la placa en aterosclerosis humana y de ratón (87). Sin embargo, la inactivación completa del gen CD8 en ratones ApoE^{-/-} susceptibles a la aterosclerosis, lo que presumiblemente afecta tanto a la CD8 α ⁺ DC como a la función de las células T CD8⁺, no condujo a la reducción esperada de la aterosclerosis (87). Otros datos sugieren un rol protector de las células T citotóxicas en la aterosclerosis ya que la disminución de células T CD8⁺ debido a una deficiencia en el MHC-I por la interrupción del gen de la β_2m mostraron un aumento de la aterosclerosis en un 150 % (88). Ban-hock et al. muestran que la eliminación de las células T CD8⁺ usando anticuerpos monoclonales contra CD8 α o CD8 β en ratones ApoE^{-/-} mejora la aterosclerosis (86).

Por otro lado, el papel de la presentación cruzada en la inmunidad antitumoral esta poco esclarecida, aunque en los últimos años muchos estudios destacan la relevancia de este mecanismo (90–95). Células deficientes en WDFY4, una proteína que se cree que participa durante la presentación cruzada, no daba lugar a respuestas inmunitarias de células T CD8⁺ lo que conlleva al descontrol del crecimiento tumoral (96). Un defecto de CD8⁺ DC compromete gravemente a las respuestas de las células T CD8⁺ a tumores inmunogénicos lo que demuestra que la presentación cruzada tiene un papel importante en respuestas inmunes antitumorales (92,94). En resumen, la presentación cruzada parece jugar un papel crítico no solo por provocar respuestas citotóxicas CD8⁺ sino también regulando el resultado de terapias antiinmunes.

2. GOTAS LIPÍDICAS

Las gotas lipídicas o *Lipid Droplets* (LDs) son orgánulos que se pueden encontrar en la mayoría de las células eucariotas, aunque su tamaño puede variar desde 0.1 a 5 μm en células no adipocitarias hasta 100 μm en adipocitos. Inicialmente, se consideró que las LDs eran meramente depósitos de lípidos que participaban de manera pasiva en la homeostasis de la energía celular. Sin embargo, actualmente, las LDs se reconocen como orgánulos dinámicos que facilitan procesos metabólicos tanto en salud como en enfermedades como obesidad, aterosclerosis, cáncer, diabetes mellitus de tipo 2 y regulación inmune (97–100). El interés en la biología celular de este orgánulo se ha incrementado exponencialmente en la última década debido a la relación entre las LDs y el desarrollo de enfermedades metabólicas (101,102).

Las LDs son orgánulos esféricos compuestos de una monocapa de fosfolípidos (PL) que rodea un núcleo compuesto de lípidos neutros donde podemos encontrar, principalmente, ésteres de colesterol (CE) y triacilgliceroles (TAG). Sin embargo, la ratio entre TAG/CE varía dentro de la misma célula y entre distintos tipos celulares donde podemos encontrar que los adipocitos contienen principalmente TAG mientras que los macrófagos espumosos tienen altos contenidos de ésteres de esteroides (103–106) (**Figura 5**).

En cuanto a la monocapa lipídica, numerosos análisis por espectrometría de masas han revelado algunas características únicas de los fosfolípidos. En las LDs de mamíferos se han identificado cientos de especies de fosfolípidos siendo la clase más abundante la fosfatidilcolina (PC, 60%), seguido de la fosfatidiletanolamina (PE, 24%) y del fosfatidilinositol (PI, 4%) (107,108). Pero también se han descrito otras especies como fosfatidilserina, esfingomiélna y lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina con ácidos grasos insaturados (105).

Hasta la fecha, se han descrito cientos de proteínas asociadas a la monocapa fosfolipídica de las LDs. Estas proteínas están implicadas en procesos muy diferentes como funciones estructurales, metabólicas, reguladoras y de tráfico de membrana

(109), y pueden unirse a ésta a través de hélices anfipáticas, anclajes lipídicos o mediante estructuras de tipo horquilla (110). Las primeras proteínas que se identificaron fueron las perilipinas (PLIN1-5) y, desde entonces, gracias a estudios de biología celular y proteómica se han descubierto otras enzimas del metabolismo lipídico, GTPasas y otras proteínas relacionadas con el sistema inmune con funciones fundamentales para la movilización de sus lípidos como para la estabilización estructural de las gotas lipídicas (111–113).

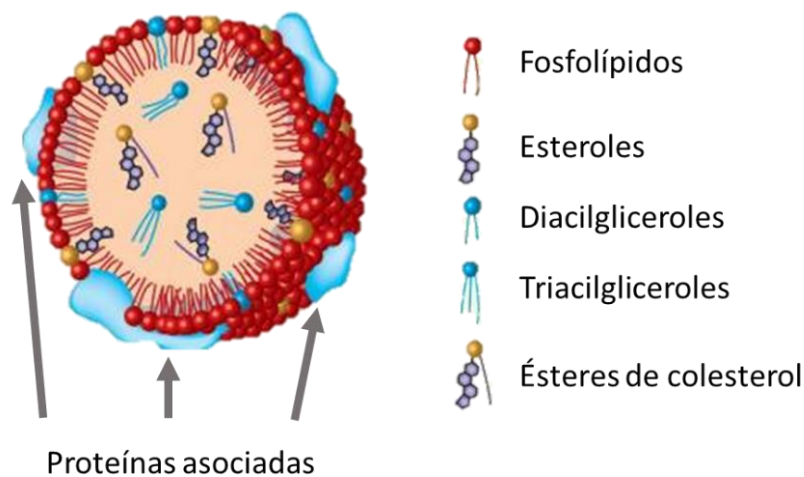


Figura 5. Estructura y composición de una gota lipídica. Las LDs están formadas por un núcleo de lípidos neutros (TAG, CE) rodeado de una monocapa de fosfolípidos que contiene numerosas proteínas asociadas. Adaptado de Guo Y et al (106).

Entre todas las proteínas presentes en las LDs cabe destacar la perilipina-1 (PLIN1), la adipofilina (ADRP, PLIN2) y TIP47 (*Tail-Interacting Protein* de 47 KDa, PLIN3), que conjuntamente forman la llamada familia PAT (114). La PLIN1 es una de las proteínas relacionadas con la estabilización de las LDs y protección de sus lípidos neutros de la acción de las lipasas (115). La proteína PLIN2 está relacionada con la diferenciación de los adipocitos y se usa como marcador de formación de LDs ya que es la más representada en todos los tipos celulares (116). Por último, PLIN3 parece estar relacionada con la lipólisis en músculo esquelético (117,118). También se han descrito otras proteínas asociadas a la familia PAT como son la PLIN4 (S3-12) y la PLIN5 (OXPAT/MLDP) que se encuentran en las gotas lipídicas. La primera se ha asociado a la

estabilización de las LDs al interactuar con los TAG cuando la monocapa de PLs es limitada, mientras que la segunda parece estar implicada en la protección contra el daño mitocondrial y el estrés de retículo en el hígado (119,120).

Además de la familia de las PAT, se han descrito numerosas proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico en la membrana de las LDs. Entre todas ellas podemos encontrar la triglicérido lipasa adiposa (ATGL) (121,122), la lipasa sensible a hormonas (HSL) (123), citidina trifosfato:fosfolipasa citidiltransferasa (CCT) (124), lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT) (125), acil-CoA sintetasa de cadena larga 3 (ACSL3) (126), lipina-1 (127), ciclooxigenasa (128) o la fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de Ca²⁺ de grupo IVA (cPLA₂α) (129,130).

2.1. ¿CÓMO SE FORMAN Y CRECEN LAS GOTAS LIPÍDICAS?

Es la principal pregunta de la biología de las gotas lipídicas, ya que el mecanismo preciso de su formación es todavía desconocido. El modelo más prevalente establece su origen en el ER, donde se encuentran las enzimas que catalizan el último paso para la síntesis de TAG y CE como son la diacilglicerol aciltransferasas (DGAT-1 y 2) y la acil-CoA:colesterol aciltransferasas (ACAT) (131–133). Ambas DGAT poseen estructuras, localizaciones y funciones fisiológicas diferentes. Mientras que la DGAT1 se encuentra exclusivamente en el ER y puede esterificar sustratos como diacilglicerol, retinol, monoacilglicerol y alcoholes de cadena larga (134,135), la DGAT2 se puede encontrar tanto en el ER como en las LDs y está implicada en la síntesis de TAG a partir de ácidos grasos derivados de la síntesis *de novo* (134,136). En cuanto al mecanismo relacionado con la formación de CE a partir de la ACAT hay muy pocos estudios que aporten información.

Según este modelo, las LDs surgen por la acumulación por encima del límite de solubilidad de lípidos neutros entre la bicapa de la membrana del ER seguida de una gemación orientada al citoplasma (**Figura 6-A**). Dichas enzimas pueden tomar los ácidos grasos de fuentes exógenas como lipoproteínas o de fuentes endógenas como la

redistribución o la estimulación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos en respuesta a distintos estímulos como la activación celular, el estrés de retículo o un aumento de los ácidos grasos libres (132,137–139).

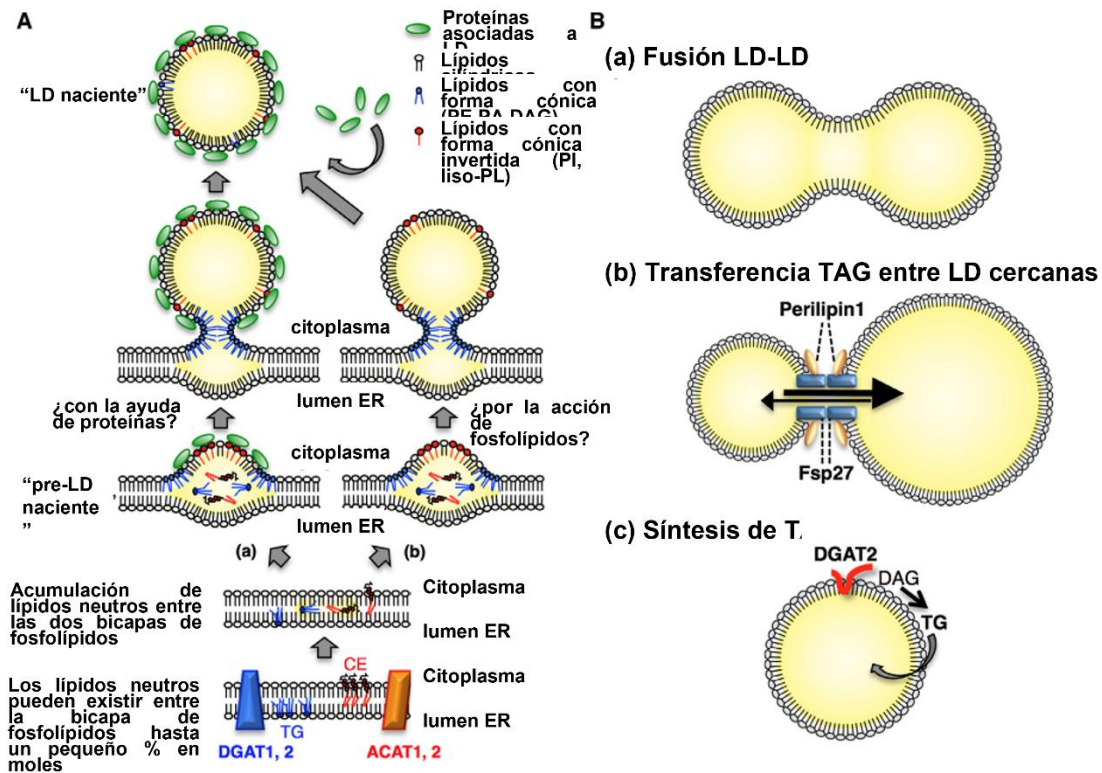


Figura 6. Proceso de formación y crecimiento de las gotas lipídicas. (A) Los lípidos neutros se acumulan entre las dos capas de fosfolípidos para formar las pre-LD nacientes que, por una mayor acumulación de TAG y CE, se convierten en gotas lipídicas nacientes con o sin la intervención de proteínas asociadas a las LDs. (B) Mecanismos de crecimiento de las LDs que incluyen (a) fusión entre LDs, (b) transferencia de contenido lipídico entre LDs cercanas mediante una estructura tipo puente, y (c) síntesis de lípidos neutros en la propia LD. Adaptado de Ohsaki et al (140)

Una segunda etapa de la formación de las LDs es la creación de un microdominio compuesto de lípidos neutros en la bicapa lipídica del ER. En la bicapa se puede albergar hasta un 3% de TAG y un 5% de CE en forma soluble antes de que sea termodinámicamente inestable y se produzca el desprendimiento de esos microdominios hacia el citosol (103,141,142). Las proteínas involucradas en la formación de esos microdominios de lípidos neutros no están confirmadas, pero una de las principales candidatas es FIT2. FIT2 es capaz de unir lípidos como DAG y TAG y

posiblemente esté involucrada en la formación de los microdominios (143). Otra proteína que parece estar involucrada en este proceso es TIP47 que estabiliza a las LDs en las primeras etapas (144). En este punto, la remodelación de diferentes especies de fosfolípidos del ER y la proporción PL/lípidos neutros son claves para la estabilidad de esta estructura y la generación de la curvatura necesaria en la membrana para estabilizar la acumulación de lípidos neutros y permitir su crecimiento (145).

A continuación, las dos caras de la membrana del ER se van separando por la excesiva acumulación de lípidos neutros. En este punto, con el fin de formar una curvatura positiva, se acumulan fosfolípidos con forma de cono invertido (PI, PS) en la monocapa de la gota lipídica naciente, mientras que los lípidos con forma cilíndrica (PC) o cónica (PE, PA, DAG) quedarían fuera de la estructura. La cPLA₂ α genera lisofosfolípidos (liso-PA y liso-PC), con forma de cono invertido, a partir de fosfolípidos (PA y PC) jugando un papel esencial promoviendo la biogénesis de las LDs (138,145,146). Además, la acumulación de PE en la zona de contacto con el ER y su estructura en forma de cono permitiría la formación de una evaginación estable de la monocapa externa de la membrana del ER y consecuentemente la formación de la LD hacia el citosol (147).

A la vez que va creciendo el nuevo orgánulo aumentando su cantidad de lípidos neutros, se produce la síntesis de fosfolípidos por la ruta *de novo* y la remodelación de sus cadenas de ácidos grasos a través del ciclo de Lands para mantener el ratio correcto para la estabilización de la estructura (124). Una vez que la LD está prácticamente formada, se necesita una curvatura neutra seguida de una curvatura local negativa en la base de la membrana del ER que permita el cierre completo de la gota lipídica y su posterior liberación hacia el citosol (145,148). En este proceso 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.

Una vez formadas las LDs, éstas pueden experimentar procesos de crecimiento que, a diferencia de la formación, se pueden estudiar usando métodos de imágenes. Las LDs parecen crecer mediante tres mecanismos diferentes: fusión LD-LD, transferencia de lípidos entre LDs y síntesis de lípidos neutros in situ (**Figura 6-B**). La fusión entre LDs

no suele ser usual, pero puede ocurrir con condiciones específicas (149). La transferencia de lípidos entre LDs suele ser un proceso más lento que la fusión, y ocurre mediante una estructura de puente con la proteína FSP27 donde los lípidos se transfieren de las LDs pequeñas a las más grandes (150). El último mecanismo de crecimiento está asociado a la síntesis *de novo* de los lípidos neutros. Como ya se ha mencionado, la DGAT2 localizada en la superficie de las LDs estaría implicada en este proceso (133).

Sin embargo, el mecanismo exacto de formación de las gotas lipídicas no se ha demostrado todavía, posiblemente porque el tamaño inicial de las LDs se ha postulado que podría ser alrededor de 20 nm (151), muy por debajo de la resolución actual de la microscopía óptica. Por tanto, hasta que no se mejoren los métodos microscópicos, especialmente los no invasivos, no se podrá esclarecer muchas de las preguntas sobre la formación y crecimiento de las LDs.

2.2. Diversidad funcional de las gotas lipídicas

Las gotas lipídicas se consideran orgánulos multifuncionales que están integrados con múltiples procesos celulares. No es sorprendente que las LDs de diferentes tipos de células u obtenidas bajo diferentes estímulos o estados metabólicos puedan diferir mucho en su composición de proteínas y lípidos (152,153). Incluso, dentro de una misma célula se han observado diferentes subpoblaciones de LDs. En adipocitos, las LDs nacientes están compuestas preferentemente con PLIN3 y PLIN4, mientras que, en las LDs establecidas, PLIN1 y PLIN2 son más dominantes (154,155). Todo esto sugiere que las gotas lipídicas, al igual que orgánulos secretorios, pueden tener un proceso de maduración.

La heterogeneidad de las LDs también es evidente en la composición lipídica. En un estudio se demostró que dentro de una célula, la composición de lípidos de las gotas individuales variaba significativamente, y lo que llamó más la atención, también se observaron diferencias dentro de una sola gota (156). Con la mejora de los estudios

proteómicos, también se han identificado nuevas proteínas asociadas con las LDs (112), lo cual proporciona más marcadores para estos orgánulos y todo ello ayuda a comprender mejor las interacciones de las LDs con el ER, peroxisomas, endosomas, lisosomas y membrana plasmática (157–159).

2.3. INTERACCIÓN ENTRE LAS GOTAS LIPÍDICAS Y OTROS ORGÁNULOS INTERNOS EN LA INMUNIDAD.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las gotas lipídicas interactúan con otros orgánulos celulares como núcleo, mitocondria, peroxisomas, ER, lisosomas y autofagosomas (160) y dichas interacciones dependen del contexto y del tejido (**Figura 7**).

Respecto a su interacción con el núcleo, la proteína FSP27 que se encuentra en las LDs, interactúa con el factor nuclear NFAT5 de las células T secuestrándolo en el citoplasma previniendo su translocación hacia el núcleo (161), pero el rol en la inmunidad de esta interacción todavía no está claro. PLIN5 también coordina la expresión de genes por la vía extracelular induciendo la señalización de PI3K/Akt/ERK dando lugar a la translocación de Nrf2 al núcleo y la transcripción de enzimas antioxidantes (162); o translocándose al núcleo donde se asocia con SIRT1 y PGC-1 α para mediar la transcripción de genes que incrementan el catabolismo de ácidos grasos y la respiración mitocondrial (163). La translocación de PLIN5 al núcleo también estimula la lipólisis de las LDs y coordina el suministro de ácidos grasos para la oxidación de ácidos grasos (FAO) (164). La última interacción estudiada entre LDs y núcleo es a través de la enzima CCT α . Esta enzima se transloca a la superficie de las LDs bajo exposición de ácido oleico provocando la síntesis de PC expandiendo la LD (124).

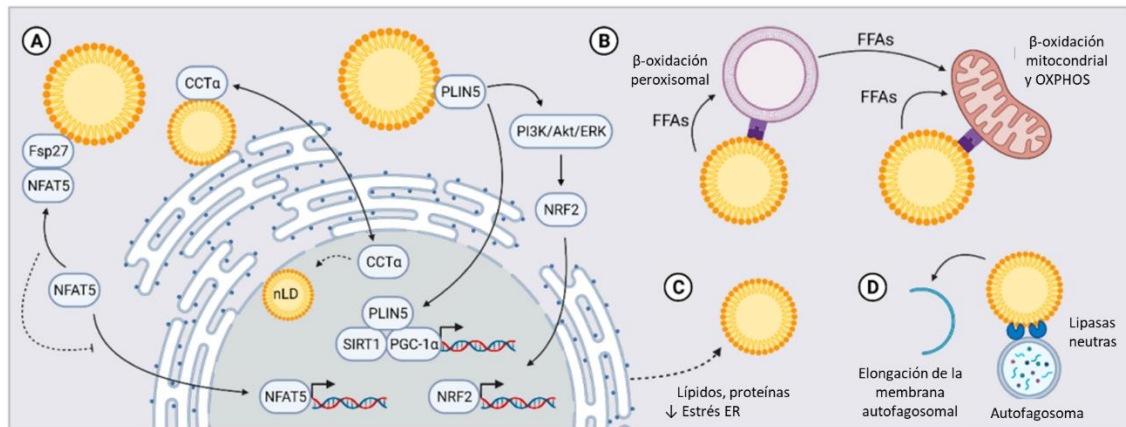


Figura 7. Interacciones de las LDs con otros orgánulos regulando las respuestas inmunes. (A) Las gotas lipídicas interactúan con el núcleo regulando la translocación de factores de transcripción (NFAT5, PLIN5) o enzimas de la síntesis lipídica (CCT α). (B) Transferencia directa de ácidos grasos desde las LDs hacia la mitocondria o el peroxisoma. (C) El traspaso de lípidos y proteína del ER a las LDs ayudan a disminuir el estrés de ER y amortigua la activación inmunológica. (D) Interacciones de las LD con los autofagosomas sirven para estabilizar las lipasas neutras. Además, las LDs promueven el alargamiento de la membrana del autofagosoma. Abreviaturas: nLD (LD nuclear), ácido graso libre (FFA) y fosforilación oxidativa (OXPHOS). Adaptado de Boucher et al. (98).

La translocación de PLIN5 también mejora la lipólisis de las LDs y la captación de ácidos grasos por la mitocondria vía CPT-1. Además, los TAG de las LDs pueden liberarse a través de lipofagia y lipólisis neutra, usándose posteriormente por las mitocondrias para la oxidación de ácidos grasos (FAO) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (165–167). Sin embargo, las interacciones entre las LD-mitocondria están poco estudiadas y no se conoce el impacto que pueden tener en las funciones de las células inmunes.

En las células de mamíferos, los peroxisomas y las mitocondrias comparten la capacidad de realizar la β -oxidación. En los peroxisomas se procesan ácidos grasos ramificados y de cadena muy larga. Los ácidos grasos generados por la β -oxidación peroxisomal pueden, a partir de entonces, suministrar energía al metabolismo mitocondrial (168). Además, la actividad del peroxisoma se correlaciona con la proliferación celular y la activación inmunológica (169). Las LDs interactúan con estos orgánulos para promover el tráfico de ácidos grasos vía M1 Spastin (proteína en LDs) y ABCD1 (proteína en peroxisomas) (170). Los peroxisomas y las LDs comparten muchas funciones de producción de mediadores anti y proinflamatorios como eicosanoides, resolvinas o plasmalógenos por lo que se especula que se acoplarían para dar respuestas sinérgicas (169).

Se conoce que, como respuesta a estrés de retículo, se acumulan LDs pero la interacción que regula este proceso no está todavía descrita (171,172). Mientras que, en levaduras, las LDs disminuyen el estrés de retículo a través de la eliminación de lípidos y proteínas mal plegadas, este proceso no se ha descrito todavía en células inmunes para mitigar la activación (173).

Por último, en hepatocitos y macrófagos se han descrito interacciones entre lisosomas y LDs que se asemejan al proceso de microautofagia (174,175). Además de la lipofagia, también se han descrito interacciones entre autofagia y las LDs, siendo éstas últimas una fuente de lípidos para la elongación de las membranas autofagosomas en ciertas condiciones (176,177). Pero cómo esto puede impactar en las funciones metabólicas inmunes todavía es desconocido.

2.4. GOTAS LIPÍDICAS Y FUNCIÓN INMUNE

Estos orgánulos parecen ser esenciales para mantener los requisitos metabólicos de las respuestas inmunes, y tienen un rol vital en la presentación cruzada de antígeno, la respuesta de IFN y la producción de mediadores inflamatorios y resolución de los patógenos. Se han visto implicadas en la modulación de las funciones inmunes de los macrófagos y las células dendríticas.

Las LDs también pueden secuestrar lípidos oxidados con el fin de proteger a la célula del daño oxidativo, pero un exceso de acumulación de estos lípidos puede perjudicar al metabolismo de las LDs o a las funciones de las proteínas asociadas a las LDs.

2.4.1. Gotas lipídicas como sitios de biosíntesis de eicosanoides y lípidos inflamatorios.

Los eicosanoides, originados por la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, son moléculas lipídicas con numerosas funciones biológicas y cuya producción está altamente regulada. Estas moléculas se unen a proteínas G o receptores nucleares dando lugar a la activación de vías de señalización (178).

El AA es el principal precursor para la síntesis de eicosanoides. Se pueden producir una gran variedad de eicosanoides a través de cuatro vías principales: (i) la vía de la ciclooxigenasa (COX), que produce prostaglandinas y tromboxano; (ii) la vía de la lipoxigenasa (LOX), que produce leucotrienos, HETES y HPETE; (iii) la vía del citocromo P450 (CYP450), que produce ETT y DHETE; y (iv) reacciones de oxidación no enzimáticas que producen isoprostanos y HETEs.

Las LDs son una fuente de ácido araquidónico para la producción de mediadores lipídicos. La mayor vía de liberación de AA *in situ* de los fosfolípidos es a través de la enzima cPLA₂ α que puede dar lugar a la producción de eicosanoides o se puede reciclar de nuevo en los lípidos neutros de las LDs, especialmente en TAG (179). Otra ruta a partir de la cual se moviliza AA sería a través de la acción de la fosfolipasa A₂ secretada (sPLA₂) sobre los fosfolípidos de la monocapa (180–182). Por último, el AA también podría ser liberado del TAG del núcleo de las LDs a través de la ATGL para la producción de mediadores lipídicos (183,184). Por lo tanto, parece probable que existan numerosas rutas que gobiernen la dinámica del AA en las LDs, y que la contribución de cada ruta puede variar en función del tejido, la célula o el estímulo.

Uno de los metabolitos más estudiados del AA es la prostaglandina E₂ (PGE₂), que posee un rol importante en varios mecanismos para la inducción de respuestas inmunes. Se ha visto que PGE₂ interrumpe las primeras etapas de la diferenciación de la célula dendrítica contribuyendo a su disfunción local y sistémica (185,186). Además, recientemente se ha demostrado que PGE₂-DC representan células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) capaces de suprimir las respuestas de CTL (187).

Sin embargo, cuando se habla de células dendríticas maduras, la PGE₂ posee efectos más complejos. La PGE₂ aumenta la expresión de CCR7 en moDC sin embargo, estudios recientes han demostrado que este efecto media la supresión de CCL19 disminuyendo la atracción de células T naive (188).

2.4.2. Rol de las gotas lipídicas en la presentación cruzada

Las gotas lipídicas pueden estar afectando a la presentación cruzada. Se ha visto que una GTPasa relacionada con el sistema inmunitario de 47 kDa (Irgm3) se asocia a PLIN2 en las LDs regulando la presentación cruzada de antígeno lo que permite que las células dendríticas presenten antígenos exógenos vía MHC-I mediando la activación de células T CD8⁺ citotóxicas (79). Además, poblaciones de células dendríticas hepáticas con acumulación lipídica activan a las células T, células NK y NKT, bloqueando la síntesis de ácidos grasos y disminuyendo su inmunogenicidad (189). Recientemente, en otro estudio donde usan adyuvantes basados en saponinas, se ha observado un incremento en las respuestas de las células T mejorando la presentación de antígeno por parte de células dendríticas que aumentan su contenido en LDs (190).

No obstante, los mecanismos por los cuales las LDs ejercen un efecto positivo sobre la presentación cruzada de antígeno no son conocidos. Se ha planteado la hipótesis de que Irgm3 esté implicado en la translocación del antígeno al citosol (191) y también se ha sugerido que la liberación de AA de las LDs puede activar la NADPH oxidasa, mejorando así la acidificación de los compartimentos endosomales requeridos para la proteólisis del antígeno y la presentación cruzada (192,193).

Sin embargo, por el contrario, la acumulación de LDs en las células dendríticas en un ambiente tumorigénico se ha asociado a una disminución en la presentación cruzada de antígeno. La acumulación de lípidos y, más especialmente, de TAGs truncados y oxidados en las LDs resulta en el reclutamiento de una chaperona, la proteína de choque térmico 70 (Hsp70), que se ve atrapada por la LD debido a su unión covalente (194,195). Esta unión es posible por los grupos electrofílicos altamente

reactivos de los grupos truncados y las cadenas oxidadas que predominan en la superficie de las LDs. Se ha visto que esto da lugar a un menor tráfico del MHC-I a la membrana plasmática y por tanto una disminución de la presentación cruzada de antígeno (194). En células de cáncer de colon tratadas con quimioterapéuticos, se ha visto que, otra chaperona, la proteína de unión a Ca^{2+} , la calreticulina (CALR) también se ve atrapada en las LDs perjudicando la función inmune. Al atrapar CALR, se inhibe su translocación donde sirve como señal de “cómeme” dando lugar a una disminución de la eliminación de células cancerosas muertas por parte de las células dendríticas y una menor activación de células T (196). De manera similar, las LDs se ven enriquecidas por RAB GTPasas con la estimulación con LPS, algunas de las cuales han estado involucradas en la presentación cruzada de antígenos.

Las LDs también están involucradas en el intercambio de proteínas con el núcleo, como histonas (197), perilipin 5 (PLIN5) (163) y el factor de transcripción factor nuclear de las células T activadas 5 (NFAT5) (161) afectando al ensamblaje de la cromatina, la regulación de la expresión de genes y la defensa antibacteriana.

El contraste de las funciones de las LDs en la presentación cruzada de antígeno resalta la naturaleza dinámica de las LDs en respuesta a señales ambientales y metabólicas. Las implicaciones conocidas de la presentación de cruzada de antígenos en el aumento de las respuestas de las células T citotóxicas en muchas infecciones patógenas y enfermedades neoplásicas justifican la realización de más estudios que investiguen el papel de las LDs en la presentación cruzada de antígeno.

3. ISÓMEROS DEL 16:1

Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) son biomarcadores emergentes de salud y, en particular, la ratio entre ácidos grasos saturados y monoinsaturados (SFA/MUFA) constituye una propiedad importante para la fluidez de las membranas biológicas. Una desregulación de dicho ratio debido a una disminución de los niveles de MUFAs puede ayudar al desarrollo de enfermedades como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes o cáncer (198,199). Entre los MUFA, cabe destacar la familia de ácidos grasos hexadecenoicos (16:1) por sus beneficios en la salud. El ácido palmitoleico (16:1n-7) es el isómero mayoritario y, posiblemente por ello, el más estudiado. Recientemente se han encontrado otros isómeros posicionales del ácido palmitoleico, como el ácido sapiénico (16:1n-10) y el ácido hipogeico (16:1n-9) (200–203). El ácido sapiénico solo se relacionaba con muestras de sebo, cabello y uñas humanas, pero recientemente se ha descrito en los fosfolípidos de la membrana de glóbulos rojos en humanos, en los ésteres de colesterol del plasma y en células fagocíticas del sistema inmune tanto humanas como de ratón (202,204–206). El ácido hipogeico ha sido identificado en monocitos y macrófagos espumosos humanos, así como en otras células fagocíticas (201,202).

Las vías bioquímicas para la obtención de las tres familias de ácidos grasos (n-10, n-9 y n-7) a partir del ácido palmítico se representan en la **Figura 8**. En mamíferos, el ácido palmitoleico se forma a partir de la acción de la esteroil-CoA desaturasa (SCD) con actividad Δ^9 desaturasa sobre el ácido palmítico. Su posterior elongación da lugar al ácido vaccénico (18:1n-7). En los seres humanos, la biosíntesis del palmitoleico se produce principalmente en el hígado y tejido adiposo donde se esterifica en lípidos más complejos (207).

El ácido hipogeico o 16:1n-9 se obtiene a partir de la β -oxidación parcial del ácido oleico (18:1n-9), obtenido tras una elongación y posterior desaturación del ácido palmítico (**Figura 8**).

Por último, la familia n-10, agregada más recientemente a este escenario, se forma por la transformación del ácido palmítico por la $\Delta 6$ desaturasa (FADS2) en ácido sapiénico seguido del paso de elongación a ácido cis-8-octadecaenoico. Vale la pena señalar que la síntesis de novo de un PUFA, el ácido sebaleico (ácido cis-5,8-octadecadienoico), solo puede ocurrir con la serie de ácidos grasos n-10 (Figura 8). El ácido palmítico y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3 y n-6 son competidores por la enzima $\Delta 6$ desaturasa, y la partición del ácido palmítico entre las vías $\Delta 9$ y $\Delta 6$ desaturasa comienza a considerarse como una vía metabólica clave en salud y enfermedades (208).

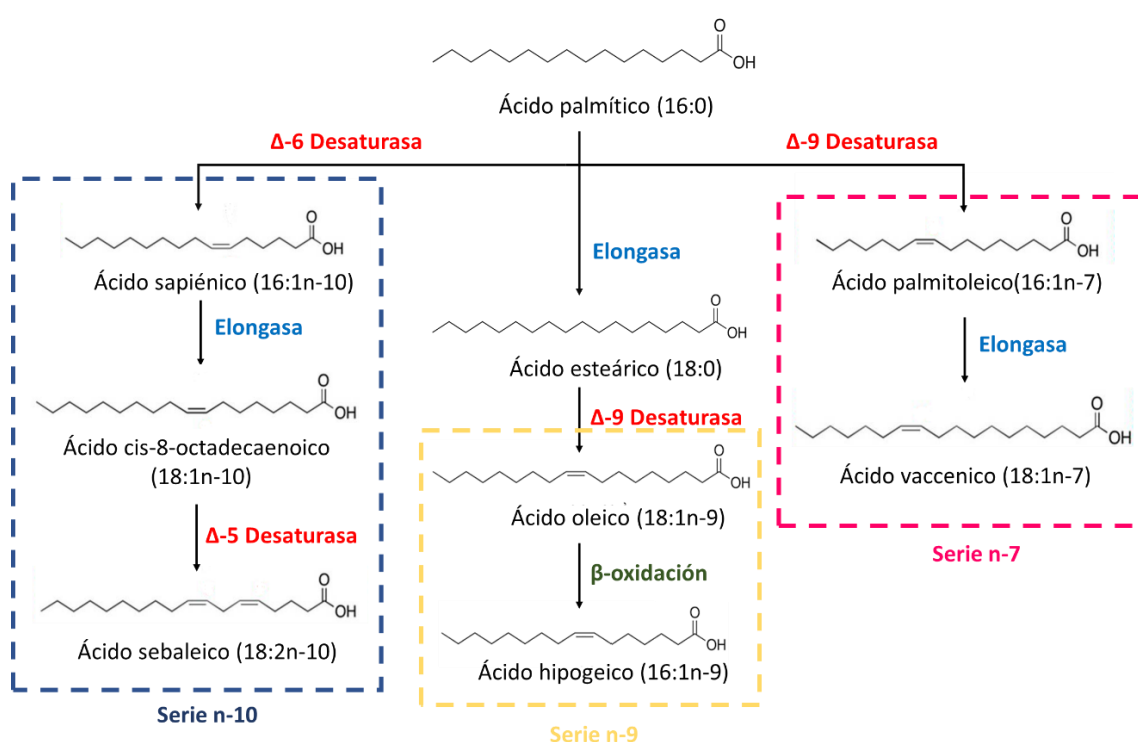


Figura 8. Rutas biosintéticas de las tres series a partir del ácido palmítico. Serie n-10 (azul), el ácido sapiénico se forma por actividad de la $\Delta 6$ -desaturasa, le sigue un paso de elongación a ácido cis-8-octadecaenoico y por último se forma el ácido sebaleico a través $\Delta 5$ -desaturasa. Serie n-9 (amarillo), la formación del ácido hipogeico se produce por la β -oxidación parcial del ácido oleico, que se forma a partir de la elongación y la acción de la $\Delta 9$ desaturasa del ácido palmítico. Serie n-7 (rosa) formada mediante un primer paso por acción de la $\Delta 9$ -desaturasa obteniendo ácido palmitoleico, seguido de una elongación a ácido vaccénico.

3.1. IMPLICACIÓN DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LOS TRASTORNOS METABÓLICOS

El ácido palmitoleico ha recibido mucho interés recientemente por sus prometedoras acciones antiinflamatorias que podrían ayudar a mejorar las enfermedades metabólicas. En 2008, Cao et al. pusieron a este ácido graso en el centro de atención cuando lo describieron como una hormona lipídica o “lipocina” que puede coordinar respuestas metabólicas entre tejidos (209). Desde entonces, se ha estudiado ampliamente la relación entre la cantidad de palmitoleato en los tejidos y los lípidos en la sangre y su relación con las enfermedades metabólicas humanas, como la obesidad (210,211), la resistencia a la insulina (212,213) y la diabetes (214).

A pesar de los numerosos estudios realizados con el ácido palmitoleico y sus isómeros, se han obtenido resultados contradictorios (207,215). En modelos de ratón se ha demostrado que el 16:1n-7 generalmente se comporta como un mediador antiinflamatorio. Se ha observado que reduce la inflamación del tejido adiposo, mejora las respuestas metabólicas del hígado, tiene efectos beneficiosos sobre la sensibilidad a insulina además de prevenir la lipogénesis y la acumulación de grasa en el hígado (216–218). Otros estudios mostraron sus efectos beneficiosos en la sensibilidad a insulina en células musculares (216), en la viabilidad y proliferación de células B pancreáticas (219) y en el estrés de ER en macrófagos (220). También se ha descubierto que desencadena la cascada de señalización para prevenir la polarización de macrófagos proinflamatorios inducida por el alto contenido de grasas (218). El 16:1n-7 reduce la inflamación del tejido adiposo en ciertos modelos de ratón, y ayuda a mejorar las respuestas metabólicas del hígado y los músculos al afectar a las vías de señalización de la proteína quinasa activada por AMP (218).

Sin embargo, estudios epidemiológicos en humanos han producido resultados diferentes. Altos niveles de este ácido graso en los eritrocitos se asocian a un perfil adverso de adipocinas y marcadores inflamatorios y un mayor riesgo de síndrome metabólico en la población china (221). Esto concuerda con otros datos epidemiológicos que informan que los altos niveles de ácido palmitoleico están asociados con trastornos

metabólicos (222,223). Perreault et al. también han descrito una asociación positiva entre los niveles de ácido palmitoleico en circulación con marcadores de inflamación entre la población joven de Canadá (224). Sin embargo, otros estudios mostraron que la disminución de este ácido graso en plasma y en VLDL no está asociado con la resistencia a insulina en hígado o tejido adiposo en pacientes obesos (225) y se ha demostrado que el 16:1n-7 incrementa la transcripción de PPAR γ en adipocitos humanos lo cual reduce los niveles de glucosa en sangre y mejora otros componentes del síndrome metabólico en pacientes con diabetes tipo 2 (226).

En conclusión, según el conocimiento actual, está claro que el papel del ácido palmitoleico depende en gran medida del "área de actuación" y de su procedencia ya que es importante si el ácido palmitoleico proviene de la dieta o si se produce endógenamente. A todo esto, se suma el hallazgo de nuevos isómeros del ácido palmitoleico, como el ácido hipogeico y el ácido sapiénico, en células del sistema inmune con carácter antiinflamatorio. La identificación analítica de manera inequívoca de los isómeros puede llegar a ser complicada (227) por lo que, se ha planteado la hipótesis de que los diferentes efectos del 16:1n-7 pueden ser debidos, en parte, a la presencia algún isómero de este ácido graso no identificado correctamente.

3.2. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN CÉLULAS INMUNES

El ácido palmitoleico por ser el isómero más conocido ha sido muy estudiado. Se ha observado que en macrófagos de ratón este ácido graso revierte los efectos del ácido palmítico (217,218). Rosa Neto et al. han determinado una respuesta antiinflamatoria similar tras el enriquecimiento con 16:1n-7 de hepatocitos de ratón que reduce la expresión de NF κ B, Tnf α , Il6 e Il12 (228).

Recientemente en células fagocíticas del sistema inmune innato tanto de origen humano como murino se ha identificado, además de la presencia de ácido palmitoleico y ácido hipogeico, un tercer isómero, el ácido sapiénico (202). Este último ácido graso

se encuentra a niveles muy bajos en monocitos y macrófagos humanos lo cual hace difícil imaginar un papel importante en la inmunidad. Sin embargo, lo más significativo de este estudio es la presencia de niveles relativamente altos de este isómero en macrófagos peritoneales de ratón y en líneas celulares macrofágicas de ratón, cuando este ácido graso se consideraba solo presente en cantidades significativas en humanos (202). Pero, a diferencia del 16:1n-7 y 16:1n-9, se necesitan altas concentraciones de 16:1n-10 exógeno para observar el efecto antiinflamatorio que poseen los otros dos isómeros.

El ácido sapiénico, como ya se ha mencionado, es un componente mayoritario del sebo humano, donde se ha estudiado su acción antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas (229,230). Por otra parte, el ácido sapiénico ha llamado la atención como un nuevo marcador de la plasticidad de las células cancerosas (200,231–233). Un estudio reciente, ha identificado la biosíntesis de ácido sapiénico como una fuente alternativa de ácidos grasos monoinsaturados en diferentes líneas celulares de cáncer de ratón y humano (231). El enriquecimiento de células Caco-2 (modelo de cáncer de colon humano) con ácido sapiénico da lugar a un aumento de la fluidez de la membrana y de la supervivencia celular y a la biosíntesis por elongación y desaturación de la familia n-10 (200,233). Además de presentar los efectos biofísicos comentados, el ácido sapiénico puede influir en la cascada EGFR/AKT/mTOR, que es una vía fundamental presente de forma ubicua en los tumores para mantener el crecimiento, la supervivencia y la metástasis (232).

En cuanto al 16:1n-9, aparte de los efectos antiinflamatorios observados en células del sistema inmune, la mayoría de los estudios realizados con dicho ácido graso son epidemiológicos. El 16:1n-9 se ha sugerido como un nuevo biomarcador de células espumosas, y así ayudar a identificar situaciones de riesgo temprano para la aterosclerosis (201). En otros estudios se identifica a este ácido graso como un marcador del síndrome metabólico (234,235) y se asocian sus altos niveles con un mayor riesgo de paro cardíaco súbito (236,237).

Un tema clave en esta área de investigación es determinar si los isómeros del 16:1 ejercen sus acciones como ácidos grasos libres per se o, en su lugar, se

convierten/incorporan a otra estructura lipídica para realizar su actividad biológica. Cuando se enriquecen macrófagos con los distintos isómeros del 16:1 se observa que el 80 % se incorpora en fosfolípidos siendo la especie de fosfatidilcolina (PC) la más abundante en dichos ácidos grasos (202). La mayoría del 16:1 presente en los macrófagos se acumula en una sola especie molecular de fosfolípidos, PC (16:0/16:1), desde donde se libera en condiciones de activación celular (203,238). La liberación de estos isómeros del 16:1 se realiza a través de una vía regulada por la fosfolipasa A₂ independiente de calcio de grupo VIA (iPLA₂-VIA) y, debido al carácter antiinflamatorio de los ácidos grasos 16:1, es concebible que la liberación regulada de dichos ácidos grasos constituya un paso importante para la resolución de los procesos inflamatorios (203,239).

Además, aunque la mayor parte del 16:1 liberado permanece en forma de ácido graso libre, se ha observado que una parte pequeña pero significativa se utiliza en reacciones de remodelación de ácidos grasos de fosfolípidos para enriquecer PI con 16:1 (203). Koeberle et al. han establecido recientemente que el PI que contiene 16:1 posee propiedades similares a las de un factor de crecimiento cuando se agrega a cultivos de células similares a fibroblastos (240).

Parece que otra parte del 16:1 movilizado de la fracción de fosfolípidos se dirige a una familia de lípidos con propiedades antiinflamatorias y antidiabéticas, los denominados FAHFA (241,242). Es interesante hacer notar que, de los tres FAHFA que contienen 16:1 identificados en macrófagos en reposo, solo uno de ellos, 16:1/OH-18:0, aumenta en las células activadas (203). Esto sugiere algún tipo de especificidad en la formación de tales especies, lo que sería compatible con que desempeñaran un papel biológico específico.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

Debido a la controversia sobre el efecto de las gotas lipídicas en las funciones de las células dendríticas y su implicación en el desarrollo de respuestas inmunes, como primer objetivo general se plantea el estudio de la formación de gotas lipídicas por acción del ácido araquidónico y sus efectos en las células dendríticas. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos.

1. Realizar un estudio lipidómico en células dendríticas derivadas de monocitos humanos y en la línea celular murina DC2.4.
2. Determinar si el ácido araquidónico exógeno promueve la síntesis de gotas lipídicas en células dendríticas.
3. Describir los posibles efectos del ácido araquidónico libre en las funciones inmunes de las células dendríticas.

Por otra parte, teniendo en cuenta la importancia de los ácidos grasos monoinsaturados en la inflamación y a los estudios previos del laboratorio que muestran los efectos antiinflamatorios de los isómeros del 16:1 en células fagocíticas inmunes, se propone el estudio funcional de estos isómeros en las células dendríticas. Como objetivos específicos:

4. Estudiar la distribución de los isómeros del 16:1 en los lípidos de las células dendríticas, así como su remodelación tras estímulos proinflamatorios.
5. Describir la actividad biológica de los isómeros del 16:1 en la respuesta inflamatoria.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MEDIO DE CULTIVO

Medio Roswell Park Memorial Institute RPMI 1640 con L-glutamina (Gibco)

Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Sigma-Aldrich)

Penicilina (Gibco)

Estreptomina (Gibco)

Suero fetal bovino (FBS) (Gibco)

β -mercaptoetanol (Scharlau)

Puromicina (Fisher)

G418 (Geneticina) (Gibco)

Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)

Medio de gradiente de densidad OptiPrep™ (Stemcell)

Placas y frascos de cultivo celular (BD Biosciences, Thermo Fisher Scientific)

Tubos Falcon (BD Biosciences, Thermo Fisher Scientific)

Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Immunotools)

Interleuquina 4 (IL-4) (Immunotools)

Tripsina EDTA 0,05% 1x (Thermo Fisher)

1.2. SOLUCIONES Y BUFFERS

Solución	Composición	Uso
<i>Tampón fosfato salino (PBS)</i>	NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, KH ₂ PO ₄ 1.5 mM	Lavado de células Aislamiento de monocitos humanos Origen de otras disoluciones
<i>Gelvatol</i>	Polivinil-alcohol 9.6% (p/v) Glicerol 24% (v/v) DABCO® 2.5% (p/v)	Microscopía confocal
<i>Tampón HBS</i>	HEPES 10mM, 0.8% NaCl, pH=7.4	Aislamiento de monocitos humanos Base para otros tampones
<i>Solución A</i>	EDTA 0.1 mM 0.5% BSA, HBS	Purificación de monocitos humanos
<i>Solución ρ</i>	Solución A:OptiPrep (3:1) (v/v)	Purificación de monocitos humanos
<i>Solución de saponina</i>	saponina 0.01%	Permeabilización celular

Tabla 1. Lista de soluciones y buffers con su composición y uso en el trabajo.

1.3. REACTIVOS LÍQUIDOS Y DISOLVENTES

1.3.1. Extracción, separación y análisis de lípidos

Agua milli-Q, ultrapura (Millipore)

Cloroformo, grado Optima® LC/MS (Fisher Scientific)

Metanol, grado Optima® LC/MS (Fisher Scientific)

n-hexano, grado Optima® LC/MS (Fisher Scientific)

Dietiléter (Scharlau; Barcelona, Spain)

Etanol 96% (V/V) (Scharlau)

Ácido acético glacial (Scharlau)

Hidróxido de amonio 28%, Optima® LC/MS grade (Scharlau)

1.3.2. Derivatización lipídica

Metanol, anhidro 99.8% (Sigma-Aldrich)

Tolueno extra puro (Scharlau)

Ácido clorhídrico 35% (Scharlau)

Dimetil disulfuro (DMDS) (Sigma-Aldrich)

Tiosulfato de sodio 1M ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (Panreac)

Yodo en dietil éter 6% (w/v)

1.3.3. Otros usos

Etanol biología molecular (Scharlau)

Reactivo de Bradford (*Bio-Rad protein assay Dye Reagent Concentrate*) (Bio-Rad)

Ácido sulfúrico, extrapuro (Scharlau)

Tritón X-100 (Scharlau)

Líquido de centelleo (Beckman Coulter)

1.4. PRODUCTOS Y REACTIVOS SÓLIDOS

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

Yodo (Scharlau)

Hidróxido de potasio (KOH) (Scharlau)

Cloruro de sodio (NaCl) (Scharlau)

Sulfato de sodio (Na₂SO₄) (Panreac)

Butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma-Aldrich)

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Scharlab)

(4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfónico (HEPES) (Scharlau)

Placas de silicagel para cromatografía de placa fina (Macherey-Nagel)

Cubetas para espectrofotometría (Kartell Labware)

Filtros de jeringa (Merck Millipore)

1.5. LÍPIDOS

1.5.1. Estándares para espectrometría de masas

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

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

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

1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoinositol (PI(14:0/14:0)) (Cayman)

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

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

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

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

1.5.2. Estándares externos para la separación por cromatografía en capa fina

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

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

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

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

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

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

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

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

Fosfatidilinositol de hígado bovino (PI) (Avanti)

1.5.3. Estándares de calibración y optimización en espectrometría de masas

Mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco)

Ácido cis-7-hexadecenoico, éster metílico (16:1n-9c) (Larodan)

Ácido cis-11-octadecenoico, éster metílico (18:1n-7) (Larodan)

Ácido cis-7,10,13,16-docosatetraenoico, éster metílico (22:4n-6) (Sigma-Aldrich)

1.5.4. Tratamientos celulares

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

Ácido cis-6-hexadecenoico (16:1n-10) (Larodan)

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

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

Ácido cis-9-octadeneoico (18:1n-9) (Sigma-Aldrich)

1.5.5 Lípidos marcados isotópicamente

Ácido [5,6,8,9,11,12,14,15-³H]araquidónico (actividad específica >180 Ci/mmol)
(PerkinElmer)

1.6. ESTÍMULOS

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

Zimosán (Sigma-Aldrich)

PAM3CSK4

Flagelina

FSL-1

Imiquimod (Invivogen)

POLY I:C (Ácido poliinosínico-policitidílico, Sigma Aldrich)

ODN2395 (Invivogen)

LTA (Invivogen)

Zimosán A (*S. cerevisiae*) BioParticles™, Alexa Fluor™ 488 conjugado (ThermoFisher)

Zimosán A (*S. cerevisiae*) BioParticles™, Alexa Fluor™ 594 conjugado (ThermoFisher)

Ovalbúmina (OVA) 257-264 (Sigma-Aldrich)

1.7. MATERIAL DE MICROSCOPIA

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

Paraformaldehído (PFA) 37%

Sacarosa (Sigma-Aldrich)

4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-Diazo-s-Indaceno (BODIPY®493/503)
(ThermoFisher)

Polivinil-alcohol (Sigma-Aldrich)

DABCO® (Sigma-Aldrich)

Cubres y portas (Erie Scientific Company)

1.8. ANTICUERPOS

Anticuerpo monoclonal *mouse* CD40 (HM40-3), FITC (eBioscience)

Anticuerpo monoclonal *mouse* CD80 (B7-1), FITC (eBioscience)

Anticuerpo monoclonal *mouse* MHCI (H-2Kb), FITC (eBioscience)

Isotipo control *Mouse* IgG2a kappa (eBM2a), FITC (eBioscience)

Isotipo control IgG *Armenian Hamster*, FITC (eBioscience)

1.9. PCR CUANTITATIVA (QPCR)

1.9.1. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y qPCR

Trizol® (Invitrogen)

Cloroformo, grado biología molecular (Scharlau)

Etanol, grado biología molecular (Scharlau)

2-propanol, grado biología molecular (Scharlau)

Kit Verso cDNA (Fisher Scientific)

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

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

1.9.2. Oligonucleótidos cebadores directos e inversos

<i>Gen</i>	Secuencia de los cebadores directos (F, <i>forward</i>) y reversos (R, <i>reverse</i>)
<i>Gapdh</i>	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3' 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'
<i>Il6</i>	5'-TAGTCCTTCCACCCCAATTTCC-3' 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
<i>Ccl2</i>	5'-TTA AAA ACC TGG ATC GGA ACC AA-3' 5'-GCA TTA GCT TCA GAT TTA CGG GT-3'
<i>Nos2</i>	5'-CCAAGCCCTCACCTACTTCC-3' 5'-CTCTGAGGGCTGACACAAGG-3'
<i>Ptgs2</i>	5'-TGAGCAACTATTCCAAACCAGC-3' 5'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC-3'

Tabla 2. Relación de oligonucleótidos cebadores directos e inversos usados para la amplificación de cDNA por PCR en ratón.

<i>Gen del humano</i>	Secuencia de los cebadores directos (F, <i>forward</i>) y reversos (R, <i>reverse</i>)
<i>ACTINA</i>	F: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'
<i>IL6</i>	F: 5'-AAATTCGGTACATCCTCGACGG-3' R: 5'-GGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCT-3'
<i>PTGS2</i>	F: 5'-GTGCAACACTTGAGTGGCTAT-3' R: 5'-AGCAATTTGCCTGGTGAATGAT-3'
<i>IL1B</i>	F: 5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3' R: 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'
<i>IL12B</i>	5'-CAGCAGTTGGTCATCTCTTGG-3' 5'-GGTCCAGGTGATACCATCTTCT-3'
<i>PLIN2</i>	5'-TTGCAGTTGCCAATACCTATGC-3' 5'-CCAGTCACAGTAGTCGTCACA-3'
<i>ACACA</i>	5'-TCACACCTGAAGACCTTAAAGCC-3' 5'-AGCCCACACTGCTTGTACTG-3'
<i>SERBF1</i>	5'-ACAGTGACTTCCCTGGCCTAT-3' 5'-GCATGGACGGGTACATCTTCAA-3'
<i>SERBF2</i>	5'-CTGCAACAACAGACGGTAATGA-3' 5'-CCATTGGCCGTTTGTGTCAG-3'
<i>ELOVL6</i>	5'-AACGAGCAAAGTTTGAAGTACTGAGG-3' 5'-TCGAAGAGCACCGAATATACTGA-3'
<i>FASN</i>	5'-ACAGCGGGGAATGGGTAAT-3' 5'-GACTGGTACAACGAGCGGAT-3'

Tabla 3. Relación de oligonucleótidos cebadores directos e inversos usados para la amplificación de cDNA por PCR en humano.

1.10. EQUIPAMIENTO

1.10.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Cromatógrafo de gases - Agilent 7890A

Espectrómetro de masas de cuadrupolo simple - Agilent 5975C

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

Software de análisis de datos: Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation

1.10.2. PCR cuantitativa (qPCR)

ABI7500 (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA)

Software de análisis: 7500 Software v2.3

1.10.3. Otro equipamiento

Sonicación: Vibracell™75115 (Bioblock Scientific)

Espectrofotometría: BioPhotometer Plus (Eppendorf)

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

Evaporación de disolventes: Concentrator 5301 (Eppendorf)

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

Reacciones a temperatura controlada: Termobloque (Grant)

Baño con agitación SW22 (Julabo)

Balanza de precisión: Explorer Pro (Ohaus)

Microscopía confocal:

Leica TCS SP5X

Software de análisis: Image J

Medida de radiactividad por contaje de centelleo

LS 6500 (Beckman Coulter)

1.11. MATERIAL BIOLÓGICO

Para realizar este trabajo, en la mayor parte de los experimentos se utilizaron tanto células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDCs) como la línea celular murina DC2.4.

Las células moDCs se obtuvieron por diferenciación de monocitos humanos extraídos y purificados de la mezcla de 3 capas leucocitarias (*buffy coats*) de donantes sanos O⁺ recogidos del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, como se indica en el siguiente apartado de métodos.

La línea celular de células dendríticas de ratón DC2.4 fue obtenida de MerckMilipore. Las células DC2.4 se han creado transduciendo células aisladas de médula ósea de ratones C57BL/6 con vectores retrovíricos que expresan el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos murinos (GM-CSF) y los oncogenes myc y raf.

Los experimentos de proliferación de células T CD8⁺ se realizaron con células T OT-I 17 α β cedidas por el Dr. Javier Casas (243). Los hibridomas 17 α β que expresan OT-I TCR se produjeron mediante transfección retroviral de células 58 $\alpha^{-}\beta^{-}$ deficientes en TCR con CD8 α y CD8 β y OT-1 TCR α (V α 2) y TCR β (V β 5) cadenas. Las células 58 $\alpha^{-}\beta^{-}$ son una variante TCR negativa de la línea celular de hibridoma de células T D0-11.10 (244). El OVA-TCR-1 (OT-I) está compuesto por cadenas TCR α (V α 2) y TCR β (V β 5)

reorganizadas y reconoce el péptido OVA agonista (SIINFEKL) con alta afinidad, pero no el péptido VSV (RGYVYQGL), cuando cualquiera sea presentado por H-2Kb.

Las líneas celulares fueron analizadas periódicamente para la detección de micoplasma usando el kit de detección *Mycoplasma Gel* (Biotools).

2. MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS.

2.1.1 Aislamiento de monocitos humanos de sangre periférica

Con el fin de aislar las células mononucleares, las bolsas de capas leucocitarias se diluyeron en proporción 1:1 (v:v) con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, esta mezcla se añadió lentamente sobre una capa de Ficoll-Paque en una proporción 2:1 (v:v) y se centrifugaron a 750 x g durante 30 minutos sin freno obteniendo las distintas fases (**Figura 9**). Se recogieron los anillos correspondientes a las células mononucleares con pipeta pasteur y se realizó un lavado con PBS centrifugando durante 10 minutos a 450 x g. Con el objetivo de obtener PBMCs enriquecidos en monocitos, se realizaron dos gradientes de densidad de separación. Para ello, el precipitado celular obtenido anteriormente se resuspendió en 3 ml de Optiprep y se creó un gradiente de densidades añadiendo, sin mezclar, 7 ml de Ficoll-Paque, 20 ml de la solución A y 1 ml de HBS. Se centrifugó durante 25 minutos a 750 x g sin freno formándose dos anillos: el superior que contiene los monocitos y el inferior con los linfocitos. De nuevo, el anillo de monocitos se recuperó, se lavó con PBS y el gradiente de densidad se repitió para obtener una población de monocitos de alta pureza.

Posteriormente, las células se contaron, se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con 10% (v:v) de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y se plaquearon a razón de 30 millones por placa de cultivo primario. Las células se dejaron adherir durante 2 horas en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂.

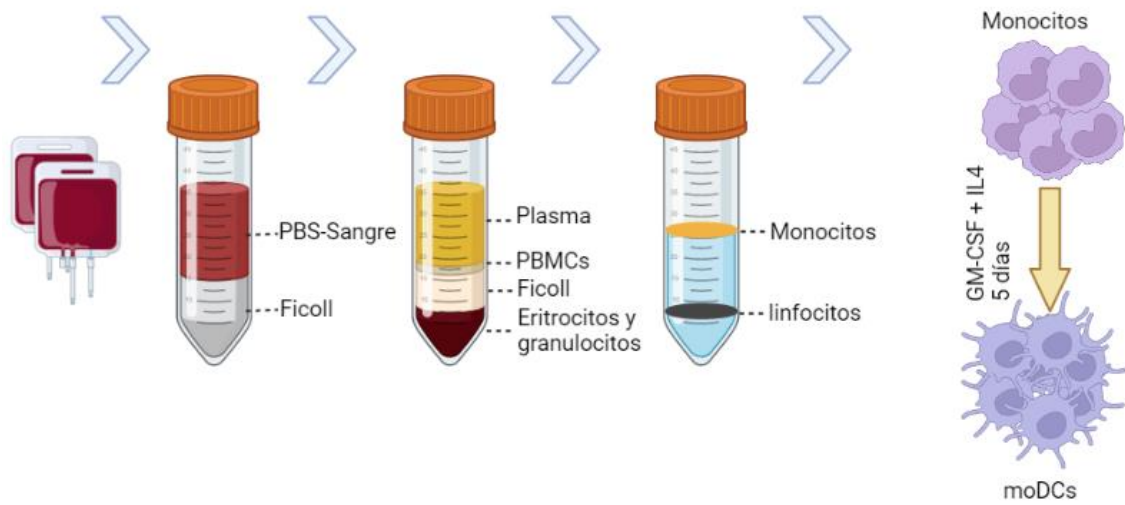


Figura 9. Esquema del proceso de obtención de células dendríticas humanas.

2.1.2. Diferenciación de los monocitos aislados de sangre periférica a células dendríticas.

Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDCs) se obtuvieron mediante la diferenciación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Para diferenciar los monocitos a células dendríticas inmaduras, se aislaron siguiendo la descripción anterior y, tras las 2 horas de adhesión, se retiraron las células no adheridas por aspiración del medio. Para dar lugar a la diferenciación, se les cambió el medio a RPMI 1640 suplementado con 10% (v:v) de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4 (245). Se incubaron durante 5 días a 37°C y el 5% de CO₂ en atmósfera.

2.1.3. Diferenciación de los monocitos aislados de sangre periférica a macrófagos humanos

Los macrófagos humanos se obtuvieron mediante la incubación de los monocitos, aislados de sangre periférica siguiendo la descripción anterior, en medio RPMI con 5% de suero humano y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina durante 2 semanas en ausencia de citoquinas exógenas. El medio de cultivo se cambió cada 3 días.

2.1.4. Cultivo de la línea celular DC2.4

Las células DC2.4 adherentes se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 . Cada 48-72 horas las células se levantan con la ayuda de Tripsina y se diluyen en una proporción 1:20 y se pasaron a otro frasco. Para los experimentos las células se plaquean en placas de diferentes pocillos dependiendo del experimento en medio de cultivo suplementado con un 0.5% de suero.

2.1.5. Cultivo de la línea celular T

Las células T adherentes se cultivaron en medio IMDM suplementado con con 10% (v/v) de FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/estreptomina y 50 mM de β - mercaptoetanol. Para la selección se utilizaron 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 (para $\text{TCR}\alpha$) y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina (para $\text{TCR}\beta$). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 . Cada 48-72 horas las células se diluyen en una proporción 1:20 y se pasan a otro frasco.

2.2. TRATAMIENTOS CELULARES

Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos se encuentran en cultivo con medio con suero por lo que 1 hora antes de los tratamientos, éste se sustituyó por medio sin suero.

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

Cuando se trataron las células con ácidos grasos disueltos en etanol nunca se superaron las proporciones 1:1000, respecto al volumen total de medio en el que se encontraban las células. De igual manera se añadieron los mismos volúmenes de disolvente a las células control.

2.2.1. Maduración de las células dendríticas

Las células dendríticas se maduraron con 200 ng/ml de LPS en el caso de las moDCs y con 1 µg/ml de LPS para las DC2.4 durante 48 y 24 horas respectivamente.

Para los ensayos de proliferación celular, las células dendríticas DC2.4 tras su exposición a ácido araquidónico fueron estimuladas durante toda la noche con 1 µg/ml de LPS y, tras su maduración, se incubaron con 10 µg/ml con OVA durante 4 horas. Después de todas las incubaciones, las células dendríticas se lavan tres veces con PBS y se co-cultivan con las células T OT-I durante 5 días.

2.2.2. Preparación de zimosán

Para la preparación del zimosán, las partículas se resuspendieron en PBS y se hirvieron durante 60 minutos a 100°C, tras lo cual se centrifugaron durante 30 minutos a 3220 x g y se lavaron tres veces. El precipitado se resuspendió a 20 mg/ml en PBS y se congeló hasta su uso. Antes de su uso, el zimosán se sonicó tres veces durante 15 segundos y se diluyó en medio libre de suero (246).

2.2.3. Estimulación a través de TLR

Las células dendríticas derivadas de monocitos se estimularon durante 24 horas con los estímulos de los diferentes TLRs que se muestran en la **Tabla 4**.

<i>Estímulo</i>	Concentración usada	TLR
<i>LPS</i>	200 ng/ml	TLR4
<i>Zimosán</i>	200 µg/ml	TLR2
<i>PAM3CSK4</i>	1 µg/ml	TLR1/2
<i>Flagelina</i>	50 ng/ml	TLR5
<i>FSL-1</i>	1 µg/ml	TLR2/6
<i>Imiquimod</i>	5 µg/ml	TLR7
<i>POLY I:C</i>	25 µg/ml	TLR3
<i>ODN2395</i>	1 µM	TLR9
<i>LTA</i>	1 µg/ml	TLR2

Tabla 4. Estímulos de los diferentes TLR.

2.3. MEDICIÓN DE PROTEÍNA

Las células recogidas en 1:1 MeOH:H₂O miliQ se sonicaron dos veces a una amplitud de 23% durante 15 segundos en hielo en un sonicador de punta con el fin de obtener muestras homogéneas para su posterior cuantificación de proteína.

La proteína se midió utilizando el método de Bradford (247) mediante el reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay*. Esta técnica colorimétrica se basa en la variación de absorbancia de 465 a 595 nm producida por el cambio de color del Coomassie G-250 cuando interacciona con las proteínas. La concentración de las proteínas se cuantifica mediante la ley de Lambert-Beer midiendo la absorbancia a 595 nm. Cada vez que se mide proteína de una muestra se realiza una curva de calibrado midiendo la señal de

absorbancia de un rango de 1 a 15 μg de BSA y, aplicando la regresión lineal, se obtiene la recta que relaciona valores de absorbancia con valores de concentración y que permite calcular la cantidad de proteína de nuestra muestra.

2.4. ANÁLISIS DE LÍPIDOS

2.4.1. Extracción de lípidos

Los lípidos totales fueron extraídos siguiendo el protocolo de Bligh & Dyer (247). Para ello, las células se resuspendieron en H_2O :metanol 1:1 (v/v) y se añadieron los estándares internos necesarios. Para realizar la extracción, se añadieron 3.75 volúmenes (en relación a la fase acuosa inicial) de cloroformo:metanol 1:2 (v/v), se agitó durante 1 minuto, se añadieron 1.25 volúmenes de H_2O mili-Q y 1.25 volúmenes de cloroformo, se agitó de nuevo y se centrifugó a 5900 x g durante 5 minutos a 16°C para separar la fase acuosa y la fase orgánica. Se extrajo la fase orgánica que contiene los lípidos y se realizó una segunda extracción añadiendo a la fase acuosa 2 volúmenes de cloroformo, se volvió a centrifugar y se juntó la nueva fase orgánica con la anterior y se evaporaron para su posterior procesamiento o para el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

2.4.2. Separación de clases de lípidos por cromatografía en capa fina.

La separación de las diferentes clases de lípidos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de sílice como fase estacionaria previamente activada con calor en una estufa a 60°C durante 16 horas. Las muestras que contienen los extractos lipídicos secos se resuspendieron en 20 μl de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se pincharon en la placa de sílice. Los estándares correspondientes a cada clase de lípidos se pincharon en ambos lados de la placa de sílice.

Para la separación de fosfolípidos de lípidos neutros se utilizó como fase móvil una mezcla de n-hexano/diétil eter/ácido acético 70:30:1 (v/v/v). Una vez introducida la placa de sílice con las muestras, se dejó pasar aproximadamente 55 minutos observando como los lípidos menos polares (CE, TAG) son los que más migran mientras que los fosfolípidos (polares) apenas migran del punto de aplicación. (**Figura 10**).

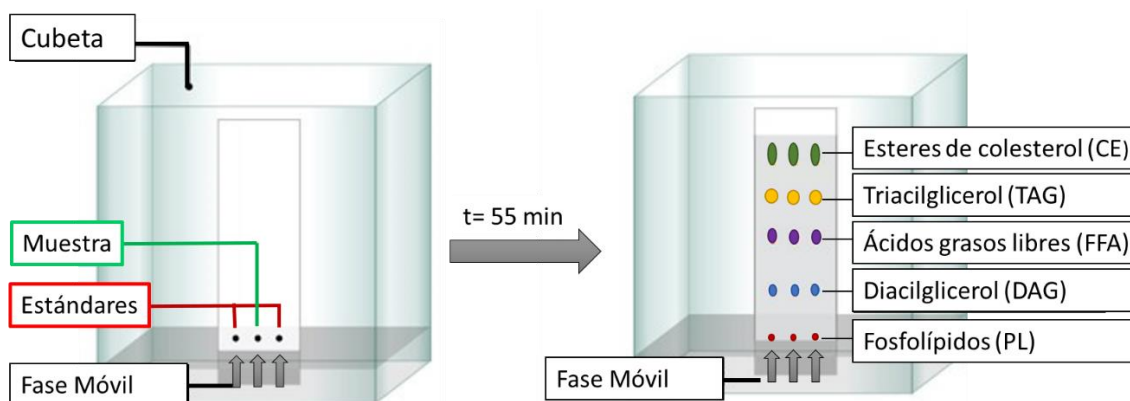


Figura 10. Esquema del proceso de separación de lípidos neutros mediante TLC.

Por otro lado, para separar las distintas clases de fosfolípido (PC, PE, PI y PS), la placa de sílice se impregnó primero con cloroformo/metanol 1:1 (v/v) durante 3 horas y, una vez seca, con ácido bórico (H_3BO_3) en etanol/ H_2O 1:1 (v/v) durante 5 horas. Una vez pre-tratada la placa, se aplicaron las muestras y los estándares, se introdujo en la cubeta y las clases de fosfolípidos se separaron migrando dos veces en el sistema cloroformo/metanol/hidróxido de amonio 28% 60:37.5:4 (v/v/v). (**Figura 11**).

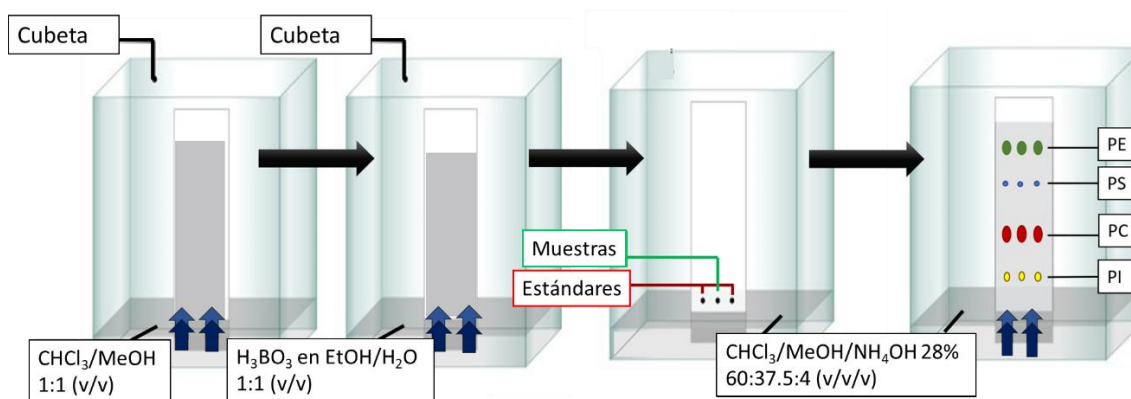


Figura 11. Esquema del proceso de separación de las distintas clases de fosfolípidos mediante TLC

Para ambos casos, una vez que se separan las distintas clases de lípidos, se recortaron las zonas de la placa donde se encontraban los estándares y se introdujeron en una cubeta de cristal con vapores de yodo, que al unirse a los ácidos grasos insaturados reveló la posición de estos mediante la aparición de manchas marrones. Los factores de retención de los estándares se utilizaron para localizar los lípidos de interés en la TLC.

Para extraer los lípidos de interés de la sílice, se raspó la porción correspondiente a cada clase de lípido y se llevó a un tubo de 2 ml donde se procedió a la extracción. Para ello, se añadió 1 ml de cloroformo/metanol 1:1 (v/v), se agitó durante 1 minuto y se precipitó la sílice centrifugando a $13400 \times g$ durante 5 minutos a 16°C . La fase orgánica líquida superior se recogió y se volvió a realizar una segunda extracción con 1 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v). Ambas fases orgánicas se juntaron y se evaporaron hasta sequedad para continuar con el proceso.

2.4.3. Derivatización de ácidos grasos

i) Derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos

Los ácidos grasos no son volátiles por lo que no podrían ser trasladados por la fase móvil gaseosa a través de la columna del GC-MS. Por ello, antes de su análisis por el cromatógrafo de gases, es preciso un paso previo de derivatización donde los ácidos

grasos reaccionan para dar lugar a esteres metílicos, compuestos volátiles que permiten su análisis por el GC-MS.

Para realizar la transesterificación de ácidos grasos esterificados, los extractos lipídicos totales o previamente separados por TLC, se resuspendieron en 50 μ l de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se traspasaron a un tubo de vidrio de tapón roscado. Posteriormente, se añadieron 500 μ l de KOH 0.5 M en metanol anhidro y se calentó en un baño con agitación durante 1 hora a 37°C. Una vez finalizada la reacción, se neutralizó con 500 μ l de 0.5 M HCl en solución acuosa, y los esteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se extrajeron dos veces con 1 ml de hexano. Para ello, se mezcló durante 30 segundos en un agitador, se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos a 16°C y se recogió la fase orgánica.

ii) Derivatización de los esteres metílicos a aductos de dimetil disulfuro

La derivatización de los esteres metílicos de los ácidos grasos a aductos de dimetil disulfuro (DMDS) se llevó a cabo con una modificación del procedimiento descrito por Sansone et al (247). Las muestras que contienen los FAME, previamente analizados por el GC-MS, se traspasan a un vial ámbar con tapón roscado donde se añadieron 100 μ l DMDS y dos gotas de una solución de yodo en dietiléter al 6 % (w/v) y se dejó en atmósfera de N₂. Se dejó reaccionar en un baño en agitación a 40°C durante toda la noche.

Para la extracción de los aductos de DMDS, se añadió 900 μ l de hexano y 900 μ l de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) al 5 % de agua, se agitó en el vortex hasta que la solución perdió color y se centrifugó a la máxima revolución durante 2 minutos. Para arrastrar posibles restos de yodo, se vuelven a añadir 100 μ l de Na₂S₂O₃ a la fase orgánica y se vuelve a extraer la fase orgánica como se ha descrito anteriormente con un paso de centrifugación. Posteriormente se seca la fase orgánica añadiendo sulfato de magnesio anhidro y las muestras se vuelven a centrifugar para eliminar la fase sólida. Finalmente, la fase orgánica se evapora por centrifugación en vacío para su posterior análisis por el GC-MS.

2.4.4. Análisis de FAMES de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis de FAMES se realizó gracias a un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. El cromatógrafo de gases está equipado con un inyector automático (Agilent 7693 autosampler) y una columna Agilent DB-23 [(50%-cianopropil)-metilpolisiloxano] cuya rampa de temperaturas utilizada se puede ver en la **Tabla 5**.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de carrera (minutos)</i>
50	1
175	6
215	32.67
235	34.67
235	39.67

Tabla 5. Rampa de temperaturas empleada en el proceso de cromatografía de gases para la separación de FAME.

El espectrómetro contiene un analizador de cuadrupolo simple que opera en modo de impacto electrónico ionizando los ácidos grasos con un haz de electrones con una energía de 70 eV (EI, 70 eV). El resto de los parámetros asignados se muestran en la **Tabla 6**.

<i>Temperatura puerto de inyección</i>	250°C
<i>Temperatura de la fuente de ionización</i>	250°C
<i>Temperatura del cuadrupolo</i>	150°C
<i>Temperatura de la fuente de ionización</i>	230°C
<i>Gas portador</i>	Helio
<i>Presión del gas portador</i>	26.1 psi

Tabla 6. Parámetros utilizados para el analizador.

En todos los casos, se inyectó 1 μl de muestra disuelta en n-hexano sin división de la muestra (en modo *splitless*).

2.4.5. Análisis de DMDS de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para el análisis por GC-MS de los aductos de DMDS se utiliza prácticamente el mismo protocolo de análisis utilizado para los ésteres metílicos con una única diferencia en la rampa de temperatura. En este caso, la rampa de temperatura también comienza en 50 $^{\circ}\text{C}$ y va aumentando a razón de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 250 $^{\circ}\text{C}$, y esta temperatura se mantiene durante 20 minutos con el fin de separar los derivados de DMDS de los 16:1, identificados tanto por tiempo de retención como por los diferentes espectros de fragmentación que se pueden observar en la **Figura 12**.

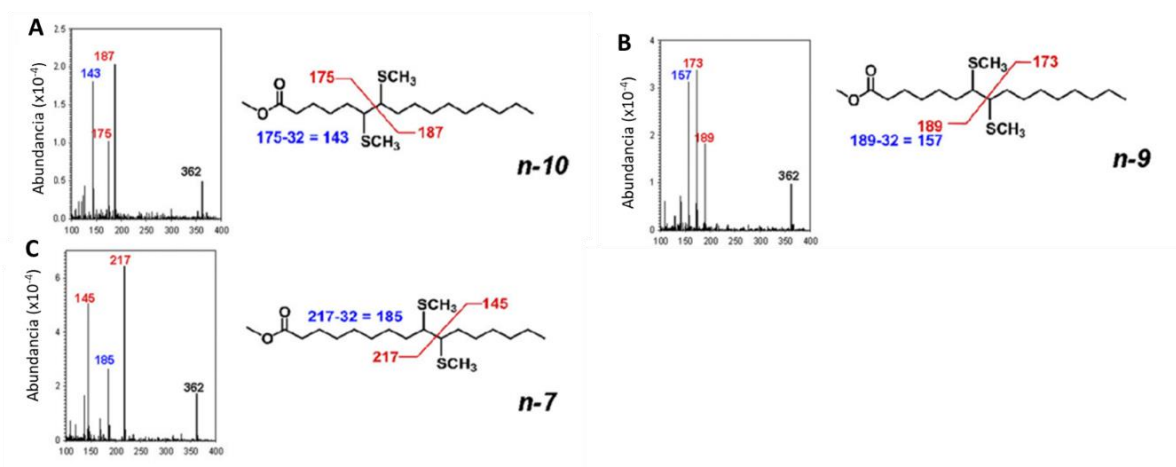


Figura 12. Espectros de fragmentación de los diferentes isómeros del 16:1. Espectros de masas correspondientes a los isómeros n-10 (A), n-9 (B), n-7 (C) que indican el ion molecular (M^+) y tres picos de diagnóstico (fragmento correspondiente a la parte terminal de metilo de la molécula, fragmento que contiene el grupo carboxilo y este último con la pérdida de metanol). Adaptado de Astudillo et al (202).

2.5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNA Y DNA

5.5.1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se siguieron las instrucciones del reactivo comercial para aislar RNA. Para ello, se eliminó el medio de cultivo de las células y se añadieron 500 μ l de TRIzol a cada pocillo. Tras esperar 5 minutos, las células se pasaron a *eppendorfs*, se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitaron durante 12 segundos y se dejaron incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Con el fin de separar las fases, se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C, se extrajo la fase acuosa con el RNA y se añadieron 200 μ l de isopropanol. Las muestras se volvieron a agitar durante 12-15 segundos y se dejaron reposar durante 9 minutos. Tras otra centrifugación de 12000 x g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido de RNA se lavó con 1ml de etanol al 75 % en H₂O-DEPC. Se agitó en vortex y se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante posteriormente y dejando secar el RNA durante 13 minutos. El RNA se resuspendió en 20 μ l de H₂O-DEPC y se calentó en un bloquer a 58°C. Por último, se determinó su pureza y concentración en un *Nanodrop* midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

5.5.2. Síntesis de DNA complementario

La formación de cDNA se realizó mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa utilizando un kit de *Verso cDNA*. Brevemente, se partió de 1 μ g de RNA en un volumen final de 5.5 μ l al que se le añadió los reactivos mostrados en la **Tabla 7** hasta llegar a un volumen final de 10 μ l. La mezcla se incubó durante 1 hora a 42°C y la reacción se paró con la inactivación de la enzima calentando las muestras a 95°C durante 3 minutos.

Reactivo	Volumen
<i>RNA (en H₂O DEPC)</i>	5.5 µl
<i>5X buffer síntesis cDNA</i>	2 µl
<i>RT enhancer</i>	0.5 µl
<i>dNTP mix</i>	0.5 µl
<i>Verso enzima mix</i>	0.5 µl
<i>Cebador de RNA</i>	0.5 µl
Volumen final	10 µl

Tabla 7. Reactivos utilizados para la síntesis de DNA complementario.

5.5.3. Cuantificación del RNA mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Para cuantificar los cambios en los niveles de expresión de los distintos genes de interés se utilizó la técnica qPCR. Para ello, se partió de 20 ng de cDNA sintetizado como se explica en el apartado anterior y se utilizaron los reactivos del kit comercial *Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix*. Junto con los reactivos se añadieron 0.5 µM de los cebadores directos e inversos obteniendo un volumen final de 10 µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo ABI7500 siguiendo las condiciones mostradas en la **Tabla 8**. Con el fin de cuantificar los niveles de los genes, se determinó el ciclo umbral (C_T), es decir, aquel en el que la fluorescencia supera el umbral donde la amplificación empieza a ser exponencial, y se aplicó el algoritmo $\Delta\Delta C_T$ (248) comparando así el C_T del gen de interés con el C_T del gen de referencia. Los genes de referencia en este trabajo fueron la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gadph*) en ratón y *ACTINA* en humanos.

<i>Número de ciclos</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
1	95	3 minutos
	95	15 segundos
40	60	1 minuto
	72	28 segundos

Tabla 8. Programa de temperatura para la amplificación de cDNA por PCR cuantitativa.

2.6. MICROSCOPIA CONFOCAL

2.6.1. Análisis de gotas lipídicas

Las células incubadas sobre los cristales de microscopía en placas de seis pocillos se lavaron tres veces con PBS para retirar el medio de cultivo. Posteriormente, se fijaron durante 20 minutos con 500 μ l de paraformaldehído al 4% con sacarosa al 3%. Tras los 20 minutos, se lavan los cristales repetidas veces con PBS y se procede a la tinción de los núcleos con 1 μ g/ml de DAPI durante 10 minutos y los lípidos neutros con 2 μ g/ml de BODIPY 493/503 durante 15 minutos. Para eliminar el exceso de las tinciones, los cristales se lavan tres veces con PBS y se procede a su montaje en portas de microscopía con 25 μ l de Gelvatol.

Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X utilizando un objetivo HCX PL APO CS de inmersión en aceite, 63 \times , 1,4 NA. La fluorescencia de BODIPY 498/503 se monitorizó con un láser de luz blanca que excitaba a 490 nm, y la emisión de fluorescencia se recogió entre 502 nm y 555 nm. La fluorescencia de DAPI se excitó con un láser de diodo azul a 405 nm y la emisión se recogió entre 419 nm y 475 nm. Para el análisis y cuantificación de la fluorescencia se utilizó el *software* Image J.

2.6.2. Ensayos de fagocitosis

Las células sembradas sobre los cristales se estimularon durante 30 minutos a 37 °C con zimosán marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 594 (4 partículas/célula). Posteriormente se realizan tres lavados con PBS y se transfieren los cristales a nuevos pocillos donde se incuban 30 minutos para permitir la fagocitosis completa de las partículas de zimosán. La reacción se para con la fijación de las células con 4% paraformaldehído en PBS durante 15 minutos. Posteriormente, las células se lavan tres veces con PBS y se procede a la tinción de los núcleos con 1 µg/ml de DAPI en PBS durante 10 minutos. Para eliminar el exceso de las tinciones, las células se lavan tres veces con PBS y se procede al montaje de los cristales en portas de microscopía con 25 µl de Gelvatol.

Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X utilizando un objetivo HCX PL APO CS de inmersión en aceite, 63x, 1,4 NA. La fluorescencia de zimosán Alexa Fluor 594 se midió con un láser de luz blanca que excitaba a 490 nm, y la emisión de fluorescencia se recogió entre 610 nm y 630 nm. La fluorescencia de DAPI se excitó con un láser de diodo azul a 405 nm y la emisión se recogió entre 419 nm y 475 nm. Para el análisis se utilizó el *software* Image J donde se unieron los canales azul y rojo en una sola imagen. El índice fagocítico se calculó dividiendo el número de fagosomas por el número total de células en un campo, que fue multiplicado por el porcentaje de células fagocíticas (249).

2.7 CITOMETRÍA DE FLUJO

2.7.1. Análisis de formación de gotas lipídicas

Las células estimuladas se recogen de los pocillos por incubación durante 4 minutos con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido se lavó dos veces con PBS y se fijaron las células con PFA

4% + 3% sacarosa durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se tiñeron con 2 $\mu\text{g/ml}$ BODIPY 493/503 durante 15 minutos a 37°C. Por último, se realizaron dos lavados con PBS centrifugando de nuevo a 300 x g durante 5 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 500 μl de PBS para su posterior análisis con un citómetro FACS Gallios (Beckman Coulter) usando un láser de excitación de 488 nm y un filtro de emisión 525 BP 40 (detector FL-1). Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Kaluza, versión 1.3 (Beckman Coulter).

2.7.2. Análisis de marcadores de maduración de las células dendríticas

Las células estimuladas se recogen de los pocillos y, tras dos lavados con PBS, se incuban durante 45 minutos con 90 μl de 5% de FBS en PBS a 4°C. Posteriormente, se añaden 10 μl del anticuerpo correspondiente a la concentración indicada por el fabricante durante 45 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavan tres veces con PBS y se resuspenden en 500 μl de PBS para su posterior análisis por el citómetro FACS Gallios (Beckman Coulter) usando un láser de excitación de 488 nm y un filtro de emisión 525 BP 40 (detector FL-1). Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Kaluza, versión 1.3 (Beckman Coulter).

2.7.3. Ensayos de permeabilización de células y medida de MHC-I

Las células estimuladas se recogen de los pocillos y, tras dos lavados con PBS, se fijan con 4% de PFA durante 10 minutos y se vuelven a lavar tres veces con PBS. Posteriormente, se permeabilizan las células con una solución al 0,1% de saponina durante 30 minutos. A partir de este punto, todas las incubaciones posteriores tienen que ir acompañadas de la solución de saponina ya que su efecto es reversible. A continuación, se sigue el procedimiento descrito anteriormente, las células se incuban durante 45 minutos con 90 μl de 5% de FBS en saponina al 0.1% a 4°C y después, se añaden 10 μl del anticuerpo antiMHC-I a la concentración indicada por el fabricante durante 45 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavan tres veces

con PBS y se resuspenden en 500 μ l de PBS para su posterior análisis con un citómetro FACS Gallios (Beckman Coulter) usando un láser de excitación de 488 nm y un filtro de emisión 525 BP 40 (detector FL-1). Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Kaluza, versión 1.3 (Beckman Coulter).

2.8. ENSAYOS DE RADIOACTIVIDAD

2.8.1. Ensayos de incorporación de [3 H]AA

Para radiomarcarse las células dendríticas, se incubaron durante 30 minutos con 0,15 μ Ci/ml [3 H]AA. Después de este período, el AA radiactivo no incorporado se eliminó lavando las células cuatro veces con medio sin suero que contiene 0,5 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos. Se recogieron las células a los tiempos estipulados y tras centrifugaciones y lavados con medio sin suero que contiene 0,5 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos, las muestras se mezclan con 3 ml de líquido de centelleo y se mide la radiactividad por recuento de centelleo líquido en el contador de centelleo LS 6500.

2.8.2. Ensayos de proliferación mediante [3 H]timidina

Las células DC2.4 y OT-I co-cultivadas se marcaron con 0.1 μ Ci/ml [3 H]timidina durante 16 horas a 37°C. Posteriormente, las células se recogieron de los pocillos y se centrifugaron a 300 x g durante 20 segundos a temperatura ambiente. El pellet obtenido se lavó dos veces con PBS y se resuspendieron en 100 μ l de Tritón X-100. Por último, se añadieron 3 ml de líquido de centelleo para su posterior análisis con un contador LS 6500.

2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces con duplicados o triplicados biológicos. Los valores mostrados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para realizar la comparación estadística entre los datos se utilizó el test *t de Student* para muestras despareadas y se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas entre los datos que presentaban una confianza estadística mayor del 95% (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN LIPIDÓMICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas juegan un papel muy importante en la inflamación actuando como “centinelas” del sistema inmune. Recientemente, se ha observado que los cambios en la composición y metabolismo lipídicos pueden afectar a las funciones de las células dendríticas, remarcando la importancia de los lípidos en el transcurso de los procesos inflamatorios (250,251). Por lo tanto, el primer objetivo fue el estudio lipidómico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de las células dendríticas utilizadas en este trabajo.

1.1. CARACTERIZACIÓN LIPIDÓMICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS

Con el fin de estudiar el comportamiento de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos, se analizaron los perfiles basales de los ácidos grasos de las diferentes fracciones lipídicas celulares, es decir, glicerofosfolípidos (PL) y lípidos neutros (triacilglicerol, TAG; ésteres de colesterol, CE). Para ello, se aislaron los monocitos humanos y, tras el proceso de diferenciación, se recogieron las células obtenidas, a las que se denominan células dendríticas inmaduras, y se procedió con el protocolo de extracción y separación de lípidos y su posterior análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Los ácidos grasos se designan según la fórmula A:Bn-x, donde A es el número de carbonos del ácido graso, B es el número de dobles enlaces y, para diferenciar los isómeros posicionales de un mismo ácido graso se usa la nomenclatura n-x (n menos x), donde n es el número de carbonos y x es un número entero que, restado de n, da la posición del último doble enlace de la molécula.

El análisis detallado de la composición de ácidos grasos en el conjunto de glicerofosfolípidos, triacilglicerol y ésteres de colesterol (**Figura 13**) indicó que estas células poseen muy altos niveles de ácido araquidónico (AA) en la fracción de PL (**Figura 13-A**), así como de otras especies poliinsaturadas, como era de esperar en células inmunes primarias. Estos ácidos grasos pueden dar lugar en procesos inflamatorios a los llamados eicosanoides, mediadores lipídicos bioactivos muy importantes en el desarrollo y resolución de la inflamación.

Entre los ácidos grasos mayoritarios en dicha fracción se encuentran también el ácido palmítico (16:0), el ácido esteárico (18:0) y el ácido oleico (18:1n-9). Por otra parte, en cuanto a las fracciones de TAG y CE (**Figura 13-B y -C**) no poseen gran variedad de ácidos grasos siendo todos ellos ácidos saturados o monoinsaturados, entre los que destacan los ácidos palmítico, esteárico y oleico.

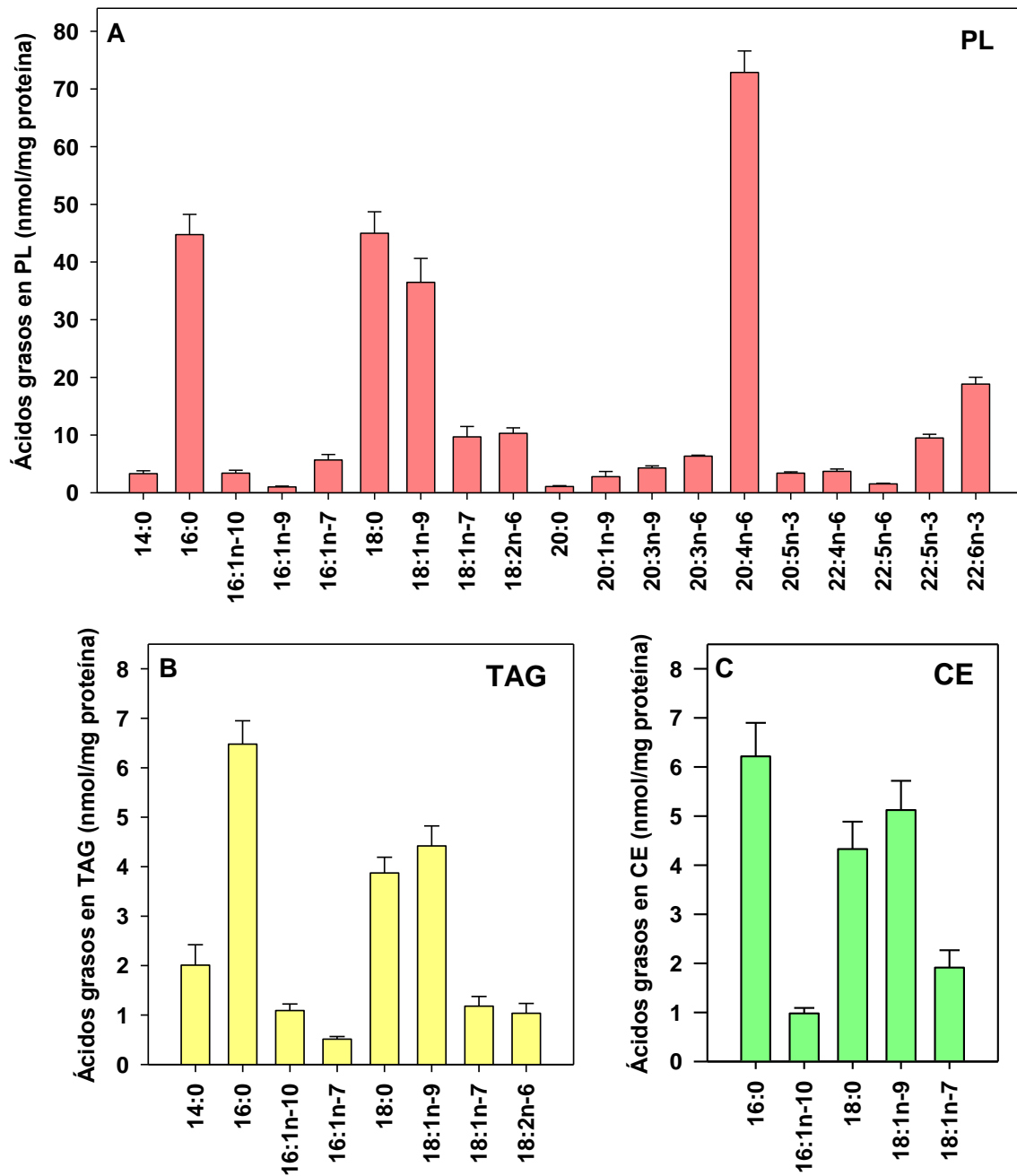


Figura 13. Perfil basal de lípidos neutros y glicerofosfolípidos en las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos humanos. Las células dendríticas se recogieron y se aislaron las diferentes clases de lípidos, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra el perfil para glicerofosfolípidos (PL) (A), triacilglicerol (TAG) (B) y ésteres de colesterol (CE) (C). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=5).

Con el objetivo de caracterizar más la composición lipídica de las moDCs, se estudiaron los diferentes perfiles basales de las diferentes clases de glicerofosfolípidos (glicerofosfolípidos de colina, PC; glicerofosfolípidos de etanolamina, PE; fosfatidilserina, PS; fosfatidilinositol, PI; y ácido fosfatídico, PA) (**Figura 14**). Como se puede observar, tanto PC como PE tienen unos perfiles que se asemejan mucho al perfil obtenido para la fracción de PLs completa (**Figura 13**). Cabe destacar que la fracción de PE es la clase de fosfolípido más rica en AA, seguida de PC, PI/PA y PS. Esta distribución es semejante a la descrita en monocitos y macrófagos (252,253). PC posee mayores niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados como el ácido oléico, ácido palmítico y los isómeros del 16:1 (ácido palmitoleico, 16:1n-7; ácido hipogeico, 16:1n-9; ácido sapiénico, 16:1n-10) (**Figura 14-A**).

En PE (**Figura 14-B**) también se pueden apreciar niveles altos de otros ácidos grasos poliinsaturados (22:5n-3 y 22:6n-3), mientras que los ácidos grasos monoinsaturados y saturados tienen niveles más bajos. Por otro lado, en PS y PI/PA los ácidos grasos mayoritarios son ácidos saturados y monoinsaturados como el ácido esteárico y oleico, aunque también se han identificado en estas fracciones ácidos grasos poliinsaturados a niveles muy bajos (**Figura 14-C y -E**).

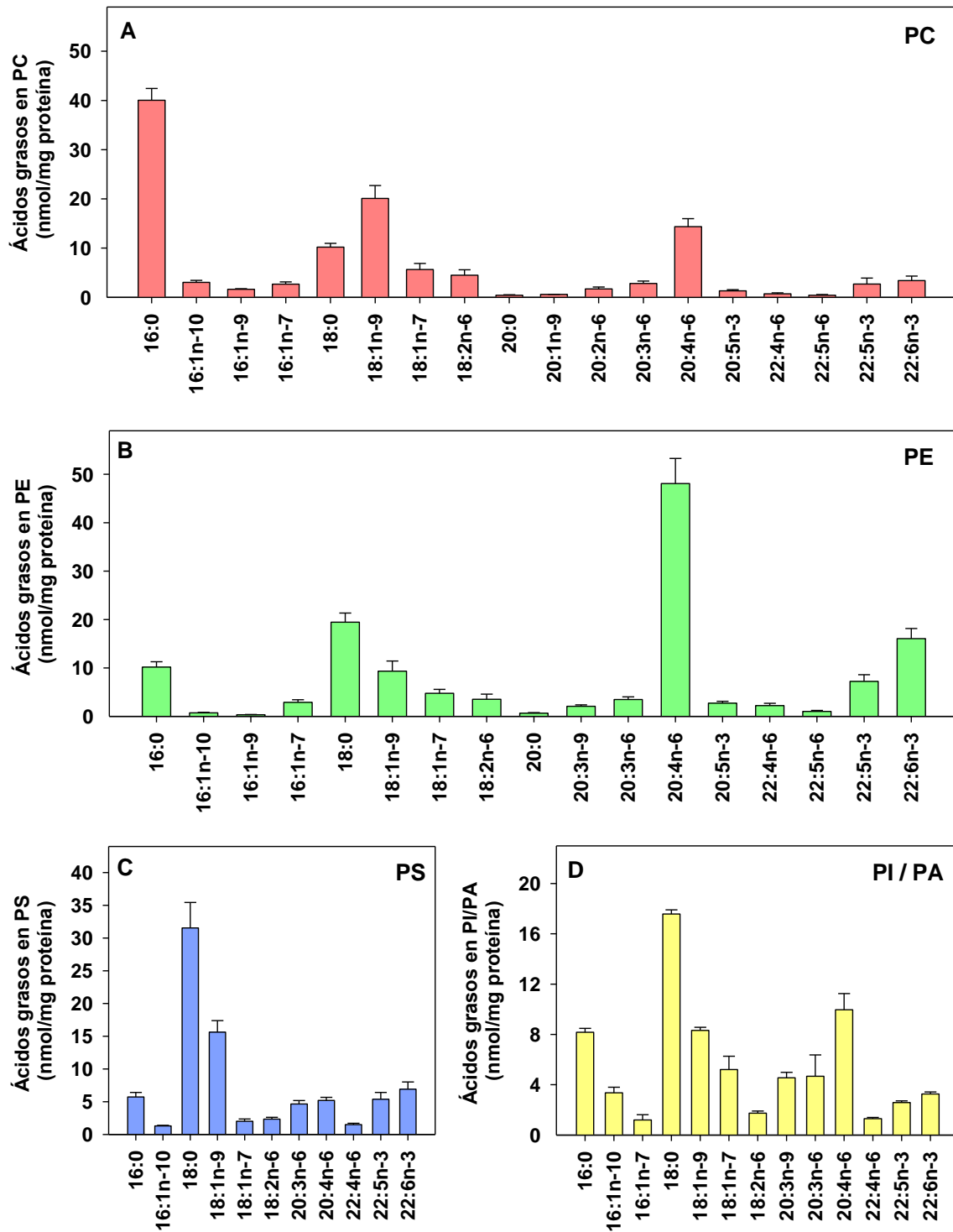


Figura 14. Perfil basal de especies de glicerofosfolípidos en las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos humanos. Las células dendríticas se diferenciaron y se recogieron. Posteriormente se aislaron las diferentes clases de lípidos, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra el perfil para glicerofosfolípidos de colina (A), glicerofosfolípidos de etanolamina (B), fosfatidilserina (C) y una mezcla, debido a una separación muy sutil por TLC, de fosfatidilinositol y ácido fosfatídico (D). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=4).

Debido a esos altos niveles de AA se procedió a determinar si existen procesos de remodelación, que involucra principalmente reacciones directas de transacilación intercambiando el AA entre las distintas clases de fosfolípidos, similares a los descritos en monocitos y macrófagos (253–256). La transacilasa independiente de CoA (CoA-IT) es la enzima involucrada en la remodelación del AA en fosfolípidos, catalizando la transferencia de AA desde, principalmente, diacil-PC a liso-PE o liso-PC (257–259). Para ello, las células se marcaron con $[^3\text{H}]\text{AA}$ durante 30 minutos y, después de eliminar el ácido graso no incorporado, se analizó su distribución entre las distintas especies de fosfolípidos a diferentes tiempos (**Figura 15**). A tiempos cortos se observa que la especie con mayor contenido de AA con un 60% es la fracción de PC, pero esos niveles se van reduciendo mientras que los niveles en PE van aumentando hasta que, a las 16 horas el contenido de AA en PC y PE se iguala (**Figura 15-A**). Después de ese punto, PE pasa a ser la especie mayoritaria en AA. Por otro lado, el contenido de AA en las fracciones de PS y PI prácticamente se mantiene estable a lo largo del tiempo.

En conclusión, a partir de las 36h, las células dendríticas ya han llegado a un equilibrio en los niveles de $[^3\text{H}]\text{AA}$ (**Figura 15-B**) ya que se asemejan mucho al contenido de AA en estado basal medido por GC-MS (**Figura 14**), donde la especie de PE es la que presenta mayor contenido de AA, seguido por PC, PI/PA y PS.

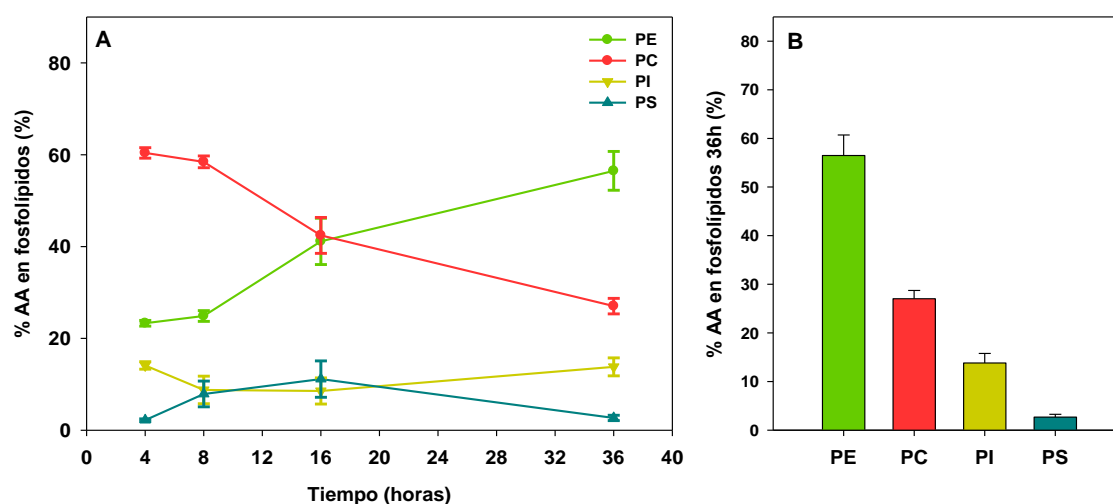


Figura 15. Remodelación del AA en las especies de PL en moDC (A) y distribución de AA a 36 h (B). Las células fueron marcadas con $[^3\text{H}]\text{AA}$, lavadas e incubadas sin el marcaje durante los periodos de tiempo indicados en la figura. Las distintas especies de fosfolípidos fueron separadas por TLC y la radiactividad incorporada en cada clase se midió por conteo de centelleo. Los resultados se muestran como el porcentaje de radiactividad presente en los PLs y se muestra como la media \pm S.E.M (n=2).

Con el objetivo de estudiar el comportamiento del AA, las células dendríticas derivadas de monocitos humanos se expusieron a diferentes estímulos reconocidos por los distintos receptores tipo toll (TLRs). Los TLRs son sensores de reconocimiento de membrana evolutivamente conservados, propios de la inmunidad innata que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y moléculas propias liberadas de células dañadas. En humanos, existen 10 clases de TLR y se localizan tanto en la membrana plasmática celular como en compartimentos intracelulares como los endosomas por lo que pueden reconocer tanto patógenos extracelulares como intracelulares (260,261).

Mediante técnicas de espectrometría de masas se determinaron los niveles de AA tras la incubación de las moDCs con diferentes estímulos de distintos TLRs.

Los niveles de AA disminuyen de manera significativa en las células tratadas frente a las no tratadas (**Figura 16**). En conjunto, estos datos demuestran que, ante un estímulo, las células dendríticas liberan AA, probablemente vía fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂) (263–268). Parte de este ácido graso libre puede ser metabolizado por vía enzimática produciéndose diferentes mediadores derivados del AA llamados eicosanoides.

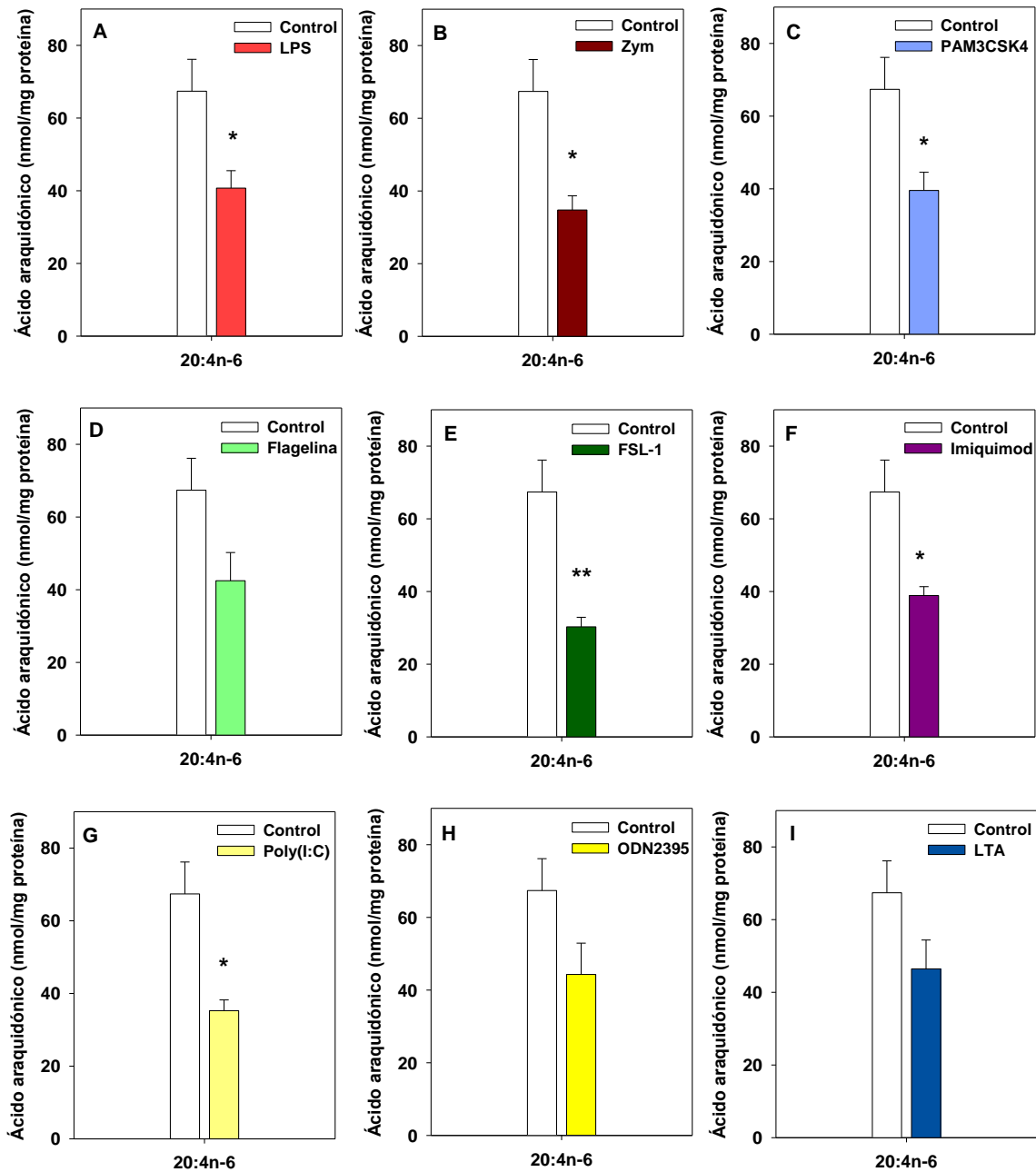


Figura 16. Efecto de diferentes estímulos relacionados con la inflamación sobre los niveles de AA. Las células moDCs no fueron estimuladas (barras blancas) o fueron estimuladas con 200 ng/ml LPS (TLR4) (A), 200 µg/ml zimosán (TLR2) (B), 1 µg/ml PAM3CSK4 (TLR1/2) (C), 50 ng/ml Flagelina (TLR5) (D), 1 µg/ml FSL-1 (TLR2/6) (E), 5 µg/ml Imiquimod (TLR7) (F) 25 µg/ml Poly(I:C) (TLR3) (G), 1 µM ODN2395 (TLR9) (H) o 1 µg/ml LTA (TLR2) (I) durante 24 h (barras coloreadas). Posteriormente, la fracción completa de lípidos se aisló y los ácidos grasos se convirtieron en ésteres metílicos. Se midió su contenido mediante GC-MS. Los resultados se muestran como media ± S.E.M (n=4). *P<0.05, **p<0.01.

1.2. DIFERENCIAS LIPIDÓMICAS ENTRE LOS MONOCITOS HUMANOS Y LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DERIVADAS DE MONOCITOS

Las células dendríticas utilizadas en este trabajo provienen de la diferenciación de los monocitos extraídos de sangre periférica humana. Por tanto, se quiso comprobar si había diferencias en los perfiles de ácidos grasos de las fracciones de lípidos neutros y de fosfolípidos entre ambos tipos celulares. Para ello, tras el aislamiento de los monocitos, una parte se destinó a estudios de diferenciación a célula dendrítica y la otra parte se recogió para su análisis lipídico mediante GC-MS.

Para una mejor comparación, los resultados se muestran como el porcentaje de cada ácido graso en el total de la muestra (**Figura 17**). Como se observa en la **Figura 17-A**, en la fracción de PLs no existen diferencias en cuanto al contenido de AA, pero las moDCs presentan una tendencia a tener mayor porcentaje de otros ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Por otra parte, los monocitos tienen menor proporción de ácido palmítico y de su producto por desaturación vía $\Delta 9$ desaturasa, el ácido palmitoleico. Sin embargo, parece que esas menores proporciones son compensadas con una mayor proporción del ácido esteárico, ácido linoleico y, en menor medida, el ácido oleico.

En cuanto a las fracciones de TAG y CE (**Figura 17-B y -C**) no se observaron diferencias significativas entre los diferentes ácidos grasos de los distintos tipos celulares, pero si se ve una disminución en los monocitos en los niveles del 16:1-x (mezcla de ácido sapiénico y ácido hipogeico).

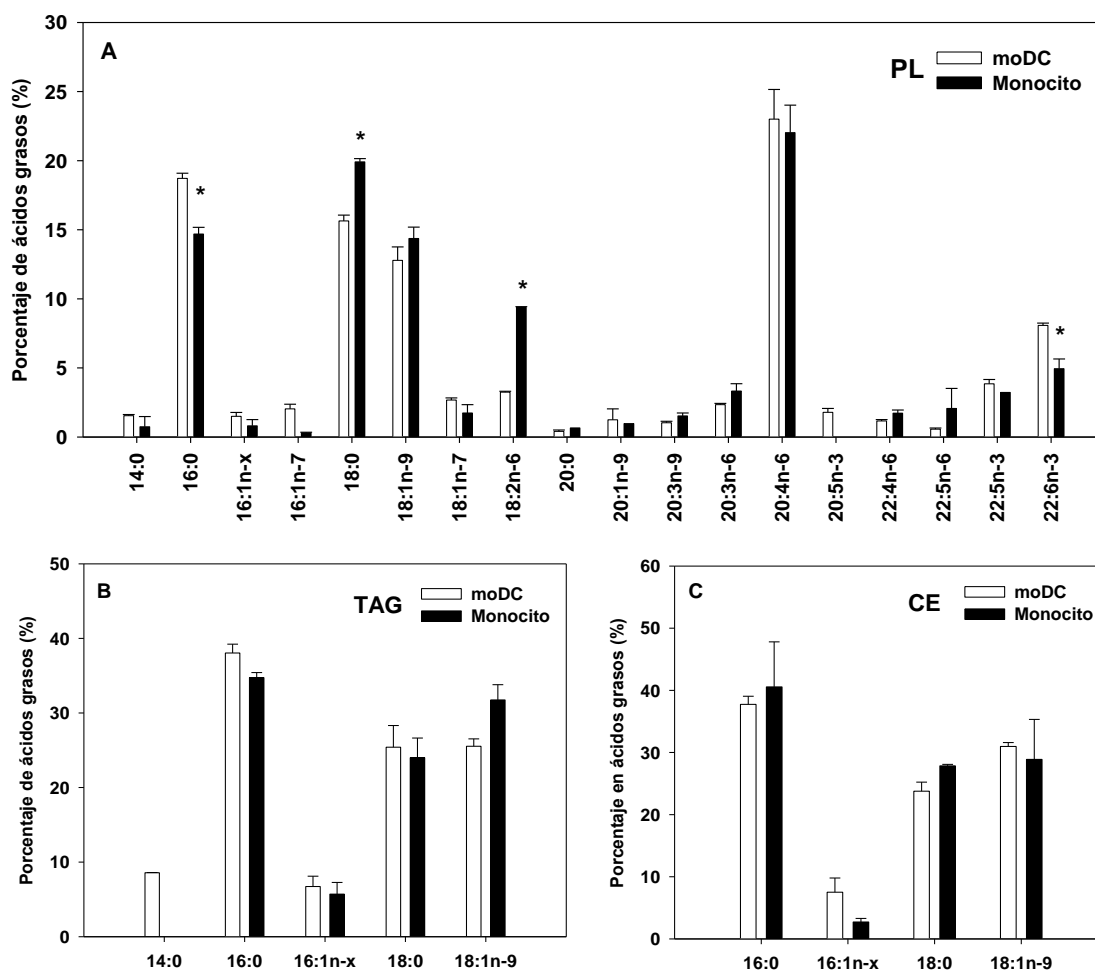


Figura 17. Comparación de los perfiles de ácidos grasos entre monocitos humanos y células dendríticas derivadas de monocitos humanos. Los monocitos y las células dendríticas se recogieron. Posteriormente se aislaron las diferentes clases de lípidos, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Se muestra el perfil para fosfolípidos (A), triacilglicerol (B) y ésteres de colesterol (C). 16:1n-x es la mezcla de los isómeros 16:1n-10 y 16:1n-9. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=3). *p<0.05

1.3. COMPARACIÓN LIPIDÓMICA ENTRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS Y LA LÍNEA CELULAR DC2.4

Otro tipo celular que se ha utilizado en esta tesis doctoral es la línea celular de ratón DC2.4, por lo que se quiso estudiar cuánto se asemejan o diferencian sus perfiles lipidómicos a los de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

Los niveles de ácidos grasos de las distintas clases de lípidos se muestran de nuevo como porcentajes. En la **Figura 18-A** se recogen numerosas diferencias significativas, lo que era de esperar, ya que se está comparando una célula primaria humana con una línea celular de ratón. En la fracción de PL se observa que el contenido de poliinsaturados en las DC2.4 es significativamente menor que en las moDCs pero esa disminución se compensa con niveles mayores de ácidos grasos saturados y monoinsaturados como el ácido mirístico (14:0), ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido vaccénico (18:1n-7). Cabe destacar la menor proporción de AA en la línea celular frente a las células primarias que puede tener consecuencias en condiciones de activación celular en la producción de eicosanoides (**Figura 18-A**) (269).

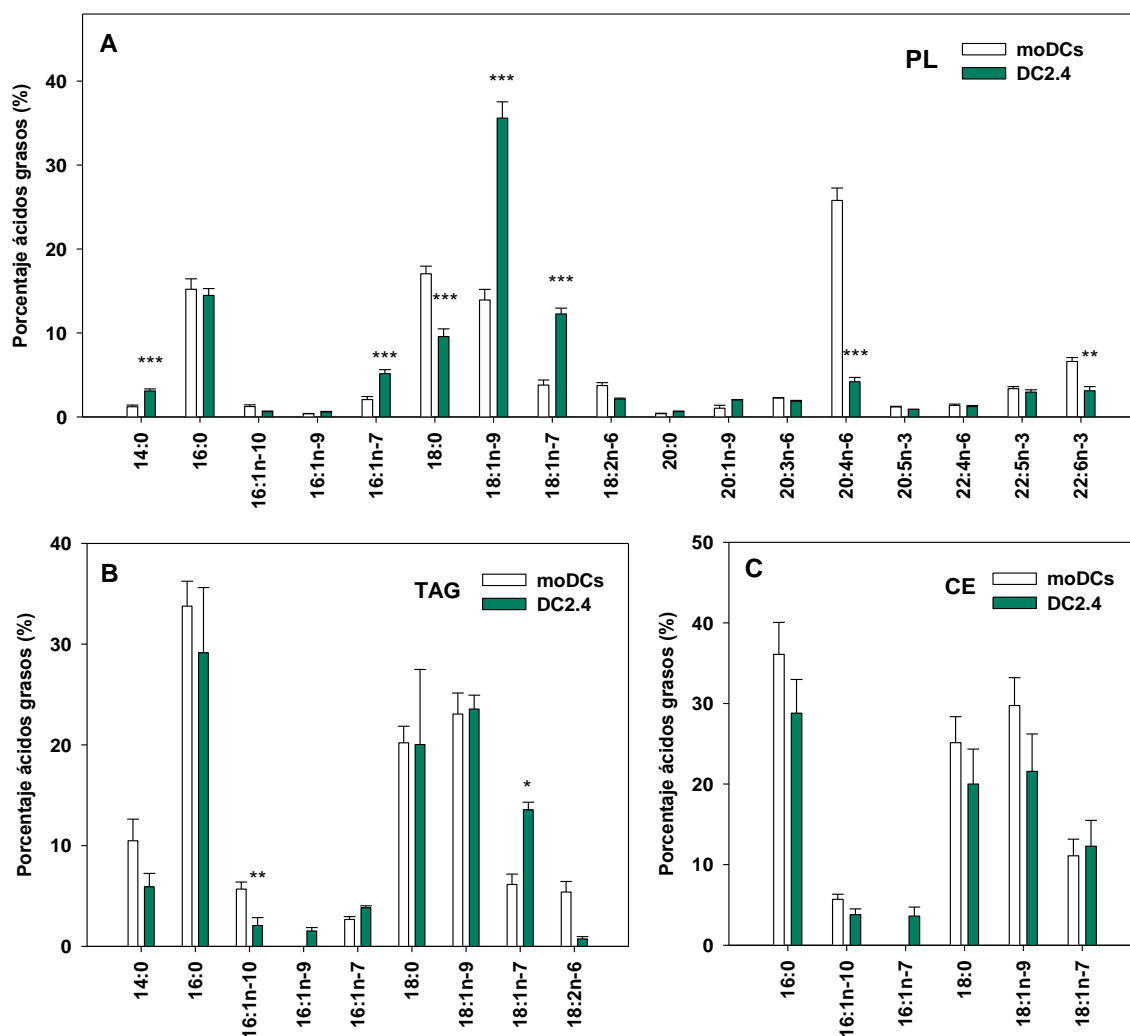


Figura 18. Comparación de los perfiles de ácidos grasos entre células dendríticas derivadas de monocitos humanos y DC2.4. Ambos tipos celulares se recogieron y se aislaron sus diferentes clases de lípidos, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra el perfil para fosfolípidos (A), triacilglicerol (B) y ésteres de colesterol (C). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=4). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

En cuanto a las fracciones de triacilglicerol y ésteres de colesterol (**Figura 18-B y -C**) solo se observan diferencias en cuanto a los isómeros del 16:1 pero esas diferencias se verán con más detalle en apartados posteriores.

Como se observaron grandes diferencias en los niveles de ácidos grasos entre ambos tipos celulares en la fracción completa de fosfolípidos se quiso comprobar que ocurriría entre las distintas clases de fosfolípidos. Mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se analizó la composición detallada de los

ácidos grasos en las distintas clases de fosfolípidos observándose que había grandes diferencias entre ambos tipos celulares (**Figura 19**). De nuevo, se puede observar la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en las células moDC frente a la acumulación de ácidos grasos saturados o monoinsaturados en la línea celular en las cuatro clases distintas de fosfolípidos (**Figura 19**).

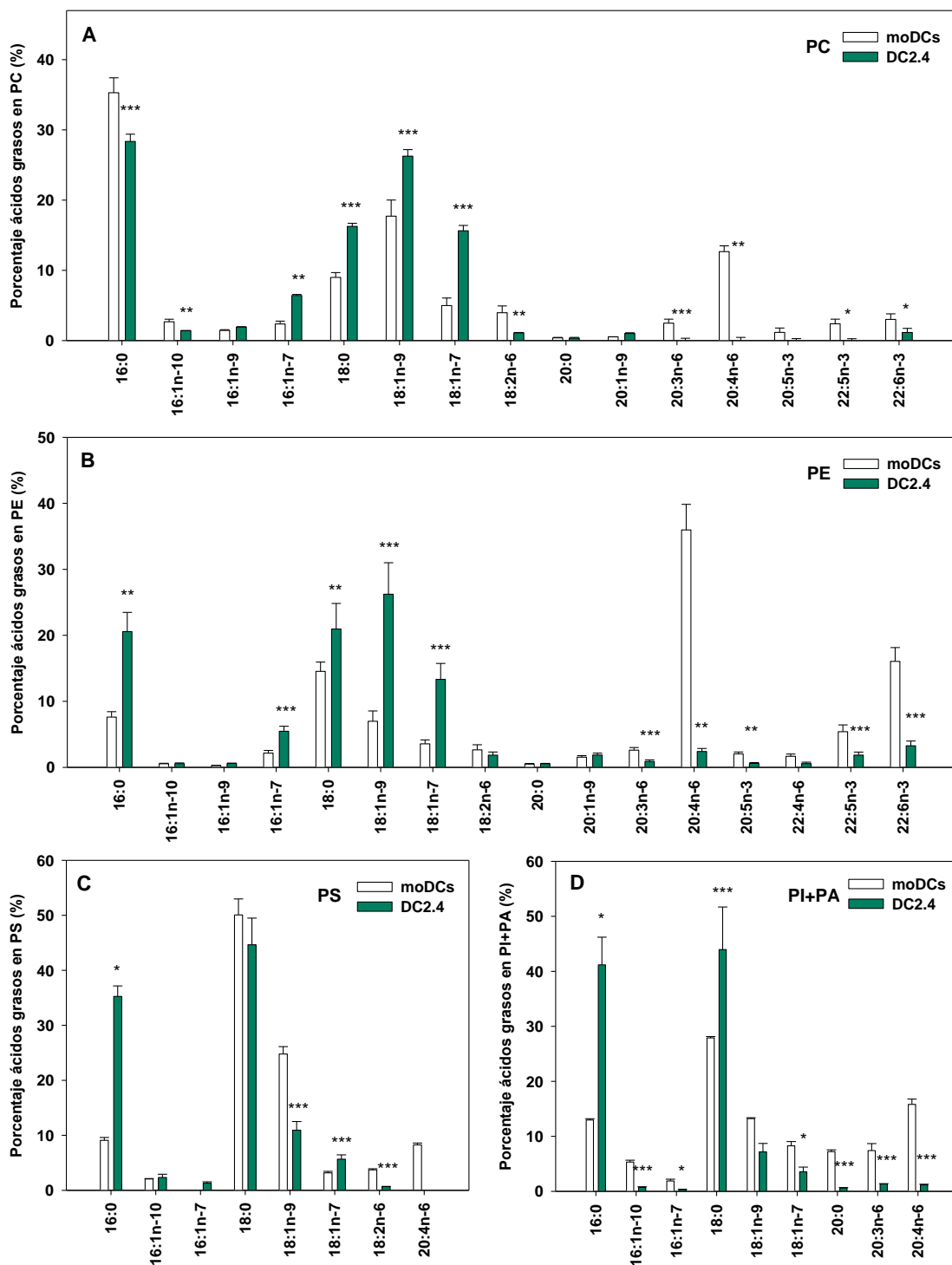


Figura 19. Comparación de la composición de las distintas clases de fosfolípidos en moDC versus DC2.4. Las células dendríticas se diferenciaron y se recogieron. Posteriormente se aislaron las diferentes clases de lípidos, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra el perfil para glicerofosfolípidos de colina (A), glicerofosfolípidos de etanolamina (B), fosfatidilserina (C) y una mezcla, debido a una separación muy sutil por TLC, de fosfatidylinositol y ácido fosfatídico (D). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

La diferencia de los niveles de AA entre moDCs y DC2.4 puede estar afectando a la distribución relativa de este ácido graso en las distintas clases de fosfolípidos. Evaluando el porcentaje de AA en cada clase de glicerofosfolípido (**Figura 20**) se observó que, a pesar de que las moDCs contienen niveles mucho más altos de AA, en ambos tipos celulares la fracción de PE es la clase de glicerofosfolípido con el mayor porcentaje de AA, aunque tiene menor porcentaje la línea celular. Otra gran diferencia perceptible es la ausencia de AA en la clase de PS en DC2.4 mientras que en moDC es la clase con menor porcentaje de AA. En cuanto a PC y PI/PA la línea celular tiene un mayor contenido de AA que moDC.

En conjunto, a pesar de las grandes diferencias en los niveles de AA entre ambos tipos celulares, la distribución de dicho ácido en las distintas especies de fosfolípidos es semejante.

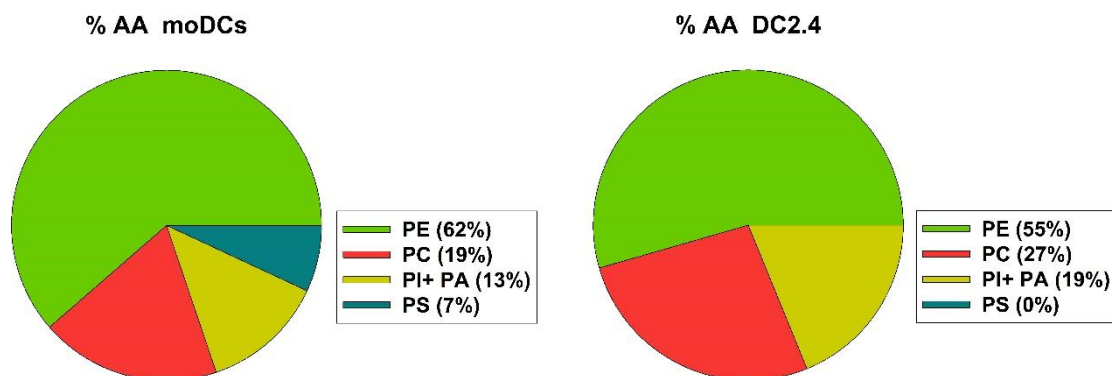


Figura 20. Distribución de AA entre las distintas clases de fosfolípidos en moDCs versus DC2.4.

1.4. PERFIL LIPIDÓMICO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURAS

Las células dendríticas tienen dos estadios diferentes de maduración; por una parte, están las células dendríticas inmaduras con una alta capacidad fagocítica y de procesamiento de antígeno y que generalmente se encuentran en tejidos periféricos y, por otra parte, se encuentran las células dendríticas maduras cuya principal función es la presentación de antígenos y activación de otras células del sistema inmune.

Para posteriormente tratar de caracterizar las funciones de las células dendríticas inmaduras y maduras se quiso estudiar si el proceso de maduración de las células dendríticas traía consigo un cambio en los perfiles de ácidos grasos. Para ello, ambos tipos celulares (moDC y DC2.4) se trataron durante 24 horas con las cantidades indicadas de LPS y después se determinaron los niveles de ácidos grasos mediante GC-MS.

Como se observa en la **Figura 21**, no se aprecian cambios significativos en los niveles de ácidos grasos con el tratamiento de LPS ni en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos ni en la línea celular DC2.4. Las moDCs parecen tener una ligera disminución de los valores de AA y en las DC2.4 puede verse una tendencia del ácido palmítico y del ácido palmitoleico a disminuir sus niveles.

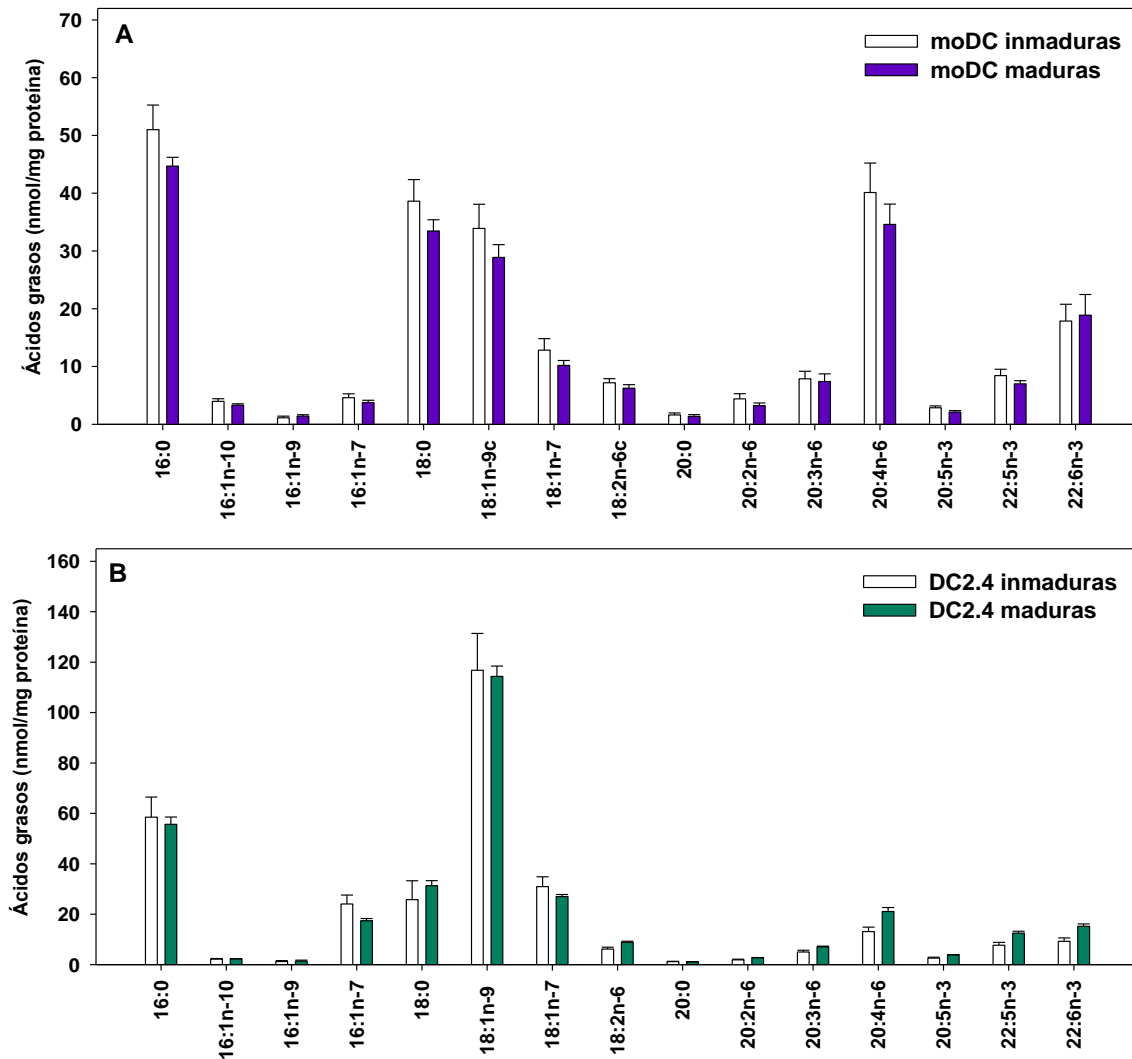


Figura 21. Maduración de las moDCs y DC2.4. Las moDC y DC2.4 no se trataron (barras blancas) o se trataron con 200 ng/ml y 1 µg/ml de LPS respectivamente durante 48 y 24 horas respectivamente (barras de color). Posteriormente la fracción completa de lípidos se aisló y los ácidos grasos se convirtieron en ésteres metílicos. Se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra el perfil de ácidos grasos totales para moDCs (A) y para DC2.4 (B). Los resultados se muestran como media ± S.E.M (n=4).

2. EFECTOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Estudios previos del laboratorio donde se ha desarrollado este trabajo demostraron que la incubación de monocitos humanos con bajas concentraciones de ácido araquidónico da lugar a que las células adquieran un fenotipo espumoso como consecuencia de la acumulación de gotas lipídicas (LDs) en el citoplasma (146,201). Investigaciones desarrolladas en otros laboratorios han visto la importancia de la formación de LDs en el interior de las células dendríticas para el desarrollo de sus funciones, específicamente en la presentación cruzada de antígeno (79,190,194,195). Por tanto, uno de los objetivos de este trabajo es el estudio del efecto del AA en la generación de LDs en células dendríticas. Este AA puede ser liberado por acción de las fosfolipasas en los focos inflamatorios y, por tanto, estar disponible en esos focos para ejercer diferentes acciones sobre las células presentes en ellos, como las células dendríticas.

2.1. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO PROMUEVE EL INCREMENTO DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN LÍPIDOS NEUTROS

Con el objetivo de estudiar el efecto que posee el AA exógeno sobre las células dendríticas, se realizaron análisis mediante GC-MS para caracterizar la composición lipídica y la distribución del AA en las diferentes clases de lípidos tanto en las células dendríticas derivadas de monocitos como en la línea celular DC2.4. La incubación con concentraciones bajas de AA exógeno resultó en un aumento significativo de los niveles celulares totales de triacilglicerol (TAG) para ambos tipos celulares (**Figura 22**). Las células dendríticas humanas tienen una tendencia a aumentar los niveles de ésteres de colesterol (CE) mientras que sus niveles totales de fosfolípidos (PL) se ven inalterados;

por otra parte, la línea celular tiende a una disminución del contenido de la fracción de PL a diferencia de los CE que se mantienen estables.

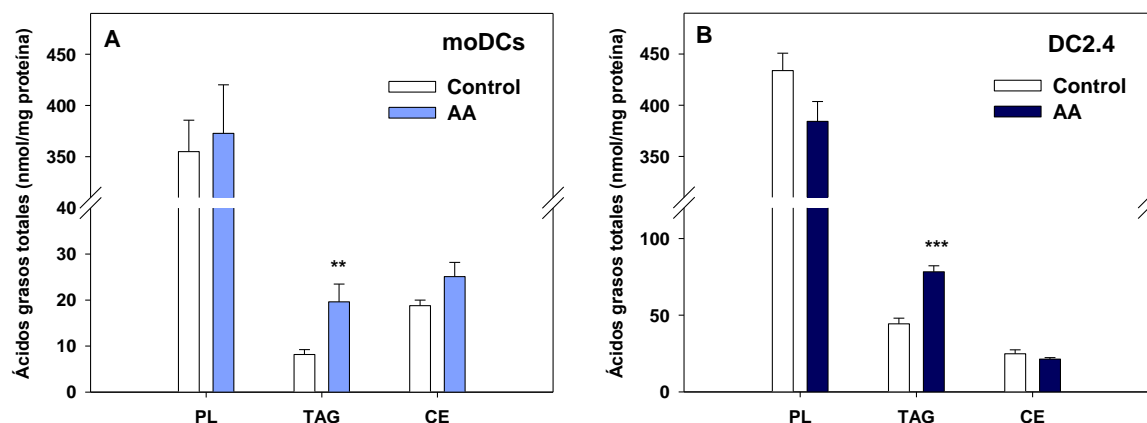


Figura 22. Contenido total de ácidos grasos en distintas especies de lípidos al incorporar AA exógeno. Las células moDCs y DC2.4 no fueron incubadas (barras blancas) o fueron tratadas con 10 μ M de AA durante 2 h (barras azules). Posteriormente, se aislaron las diferentes clases de lípidos mediante TLC y se midió el contenido de ácidos grasos mediante GC-MS tras la conversión de los ácidos grasos de los diferentes lípidos en ésteres metílicos. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=4). ** p <0.01, *** p <0.001

Analizando estos resultados más en profundidad y estudiando el perfil completo de ácidos grasos para cada especie lipídica (**Figura 23**) para ambos tipos celulares, se observaron cambios en los niveles de ácidos grasos. En el caso de las células dendríticas humanas, se observó un pequeño aumento, no significativo, de AA en la fracción de PLs. Esto sugiere que esta fracción lipídica está casi repleta en moDCs y no puede incorporar más AA. Además, también se pueden apreciar tendencias en otros ácidos grasos como disminución en el ácido palmítico (16:0) y aumentos en los ácidos grasos poliinsaturados derivados de la elongación del AA como el ácido adrenico (22:4n-6) y de la serie n-3 (22:5n-3 y 22:6n-3) (**Figura 23-A**).

En la línea celular DC2.4 se aprecia una incorporación del AA en la fracción de PLs de manera significativa. En contrapartida, se observa una disminución significativa del ácido palmítico y del ácido oleico, así como otras disminuciones más pequeñas del resto

de ácidos grasos saturados y monoinsaturados debido, posiblemente, a un desplazamiento de estos ácidos grasos por parte del AA incorporado (**Figura 23-B**).

En cuanto a la fracción de TAG (**Figura 23-C y -D**), cuando se incuban las células con AA se ve un gran aumento de los niveles de dicho ácido graso en esta fracción para ambos tipos celulares. En las células dendríticas humanas se observan también aumentos significativos de otros ácidos como el ácido sapiénico (16:1n-10) y el ácido esteárico (18:0) y tendencias de aumento de niveles en el resto de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (**Figura 23-C**). En cuanto a la línea celular, también experimenta aumentos significativos en ácidos grasos monoinsaturados como el ácido palmitoleico y el ácido oleico al incubarse con AA exógeno.

Por último, la fracción de CE (**Figura 23-D**) en moDC no tiene cambios significativos al incubarse con el AA exógeno, aunque sí que se aprecia una tendencia a aumentar los niveles en todos los ácidos grasos. Por otra parte, en DC2.4 se ve una disminución cualitativa de todos los ácidos grasos analizados y una disminución significativa del isómero del 16:1, el ácido sapiénico.

2.Efectos del ácido araquidónico sobre la función de las células dendríticas

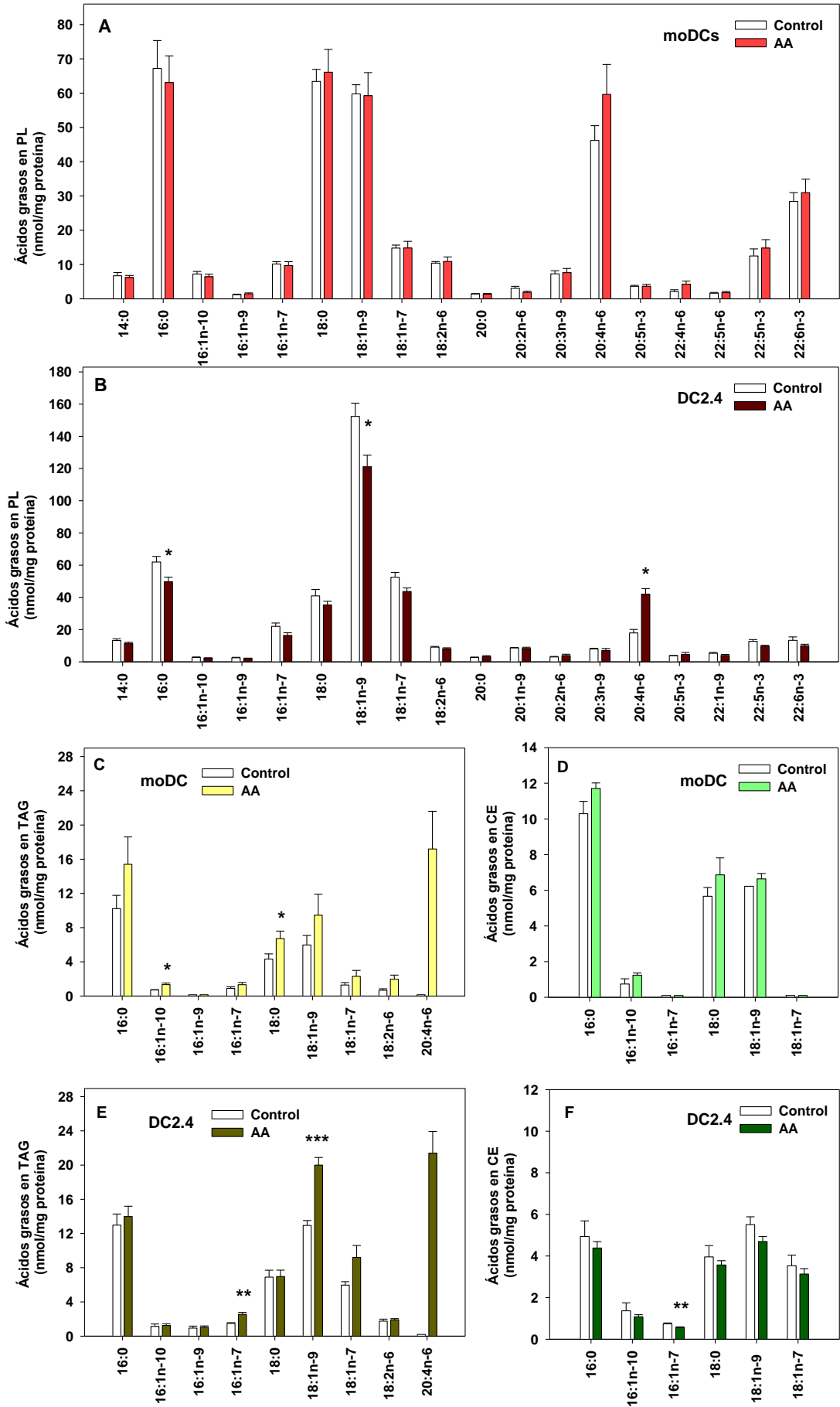


Figura 23. Incorporación de AA en diferentes clases de lípidos en moDCs y DC2.4. Las células moDCs y DC2.4 no fueron tratadas (barras blancas) o fueron tratadas con 10 μM de AA durante 2 h (barras claras y oscuras, respectivamente). Posteriormente, se aislaron las diferentes clases de lípidos mediante TLC y se midió el contenido de ácidos grasos mediante GC-MS tras la conversión de los ácidos grasos de los diferentes lípidos en ésteres metílicos. Tras analizar una vez por GC-MS, las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005

Debido a los ligeros aumentos en los niveles de ácidos grasos con la incubación a tiempos cortos se quiso comprobar si a tiempos largos el AA estaba induciendo un mayor acumulo de lípidos neutros. Para ello, se midió el perfil de ácidos grasos en la fracción completa de PL y en las fracciones de TAG y CE en moDCs control *versus* moDCs incubadas con AA en tiempos más largos.

En este caso, el contenido total analizado de ácidos grasos en las tres fracciones de lípidos (PL, TAG y CE) en las moDCs humanas se vio aumentado considerablemente tras el tratamiento con AA respecto al control (**Figura 24**).

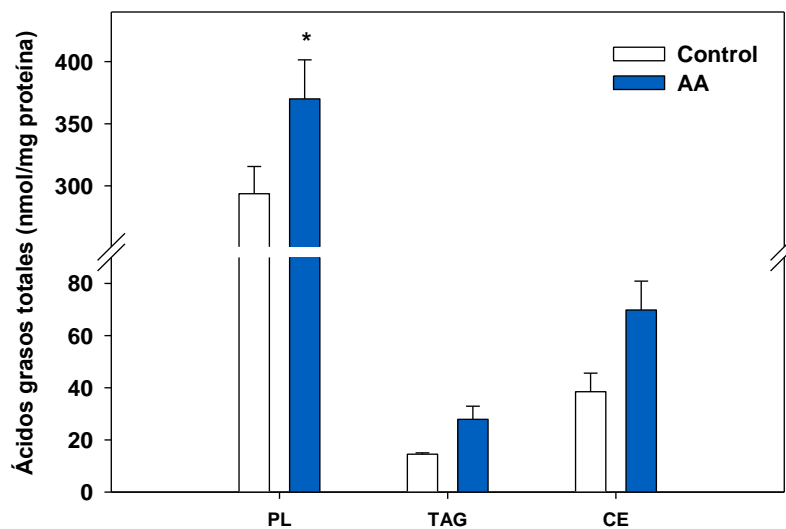


Figura 24. Incorporación durante 16 horas de AA en diferentes clases de lípidos en moDC. Las moDCs no fueron incubadas (barras blancas) o fueron tratadas con 10 μM de AA durante toda la noche (barras azules). Posteriormente, se aislaron las diferentes clases de lípidos mediante TLC y se midió el contenido de ácidos grasos mediante GC-MS tras la conversión de los ácidos grasos de los diferentes lípidos en ésteres metílicos. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=3). *p<0.05

Realizando un análisis más profundo de los distintos ácidos grasos en las tres fracciones se observa que en la clase de PL, a diferencia de lo que ocurría a tiempos cortos (**Figura 23-A**), hay una mayor incorporación del AA al incubar con dicho ácido graso a tiempos largos (**Figura 25-A**). Además, se ven aumentos del resto de ácidos grasos especialmente del ácido palmítico, ácido esteárico y del producto de elongación del AA, el ácido adrenico (22:4n-6).

En el caso de los TAG se observa un incremento de todos los ácidos grasos medidos (**Figura 25-B**) y, además, se puede apreciar que apenas hay incorporación de AA a pesar de la larga duración del tratamiento. Observando el perfil de CE se puede comprobar que al igual que ocurría con la incubación a tiempos cortos (**Figura 23-D**), no hay incorporación de AA a esta clase de lípidos. Además, se observa una tendencia a aumentar los niveles de todos los ácidos grasos tras el tratamiento con AA durante 16 horas (**Figura 25-C**).

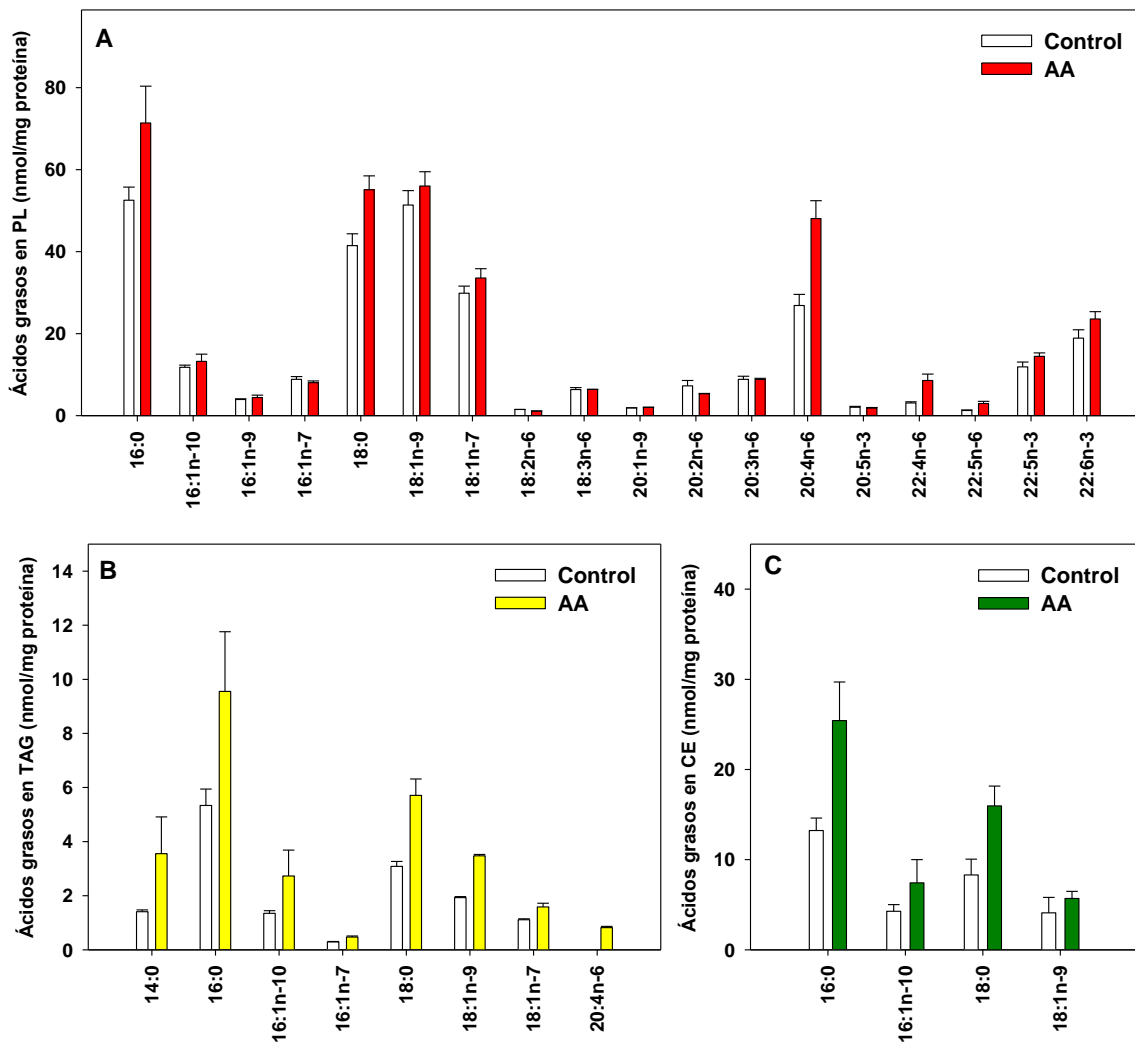


Figura 25. Incorporación de AA durante 16 horas en diferentes clases de lípidos en moDCs. Las moDCs no fueron incubadas (barras blancas) o fueron tratadas con 10 μ M de AA durante toda la noche (barras coloreadas). Posteriormente, se aislaron las diferentes clases de lípidos mediante TLC y se midió el contenido de ácidos grasos mediante GC-MS tras la conversión de los ácidos grasos de los diferentes lípidos en ésteres metílicos. Tras analizar una vez por GC-MS, las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=2).

En conclusión, la incubación a largos tiempos con ácido araquidónico da lugar a un aumento de los niveles de ácidos grasos saturados (SFA) y poliinsaturados (PUFA) de la familia n-6 (**Figura 25-D**), mientras que los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y los ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 no varían sus niveles.

2.2. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INDUCE LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Con el objetivo de estudiar si los incrementos de los niveles de TAG y CE observados en las células dendríticas se correspondían con la formación de LDs en su interior, se realizaron experimentos de microscopía confocal y citometría de flujo mediante el uso de Bodipy®493/503 que se une a los lípidos neutros que componen las LDs.

En la **Figura 26** se puede observar que, al contrario de lo que se había observado en macrófagos humanos (127), las células dendríticas, tanto las moDCs como la línea DC2.4, apenas presentan LDs en reposo. Tras la incubación con AA durante 2 horas se produjo una gran cantidad de LD en ambos tipos celulares.

También se investigó el efecto de otro ácido graso, en este caso monoinsaturado, el ácido oleico (18:1n-9, AO). En estudio previos del laboratorio se demostró que el AA y el ácido oleico inducen la formación de LDs en monocitos humanos por mecanismos diferentes (146). Se pudo observar que el AA inducía la formación de LDs iniciando una ruta independiente de la incorporación del propio ácido graso, mientras que, el ácido oleico servía a la células como combustible lipídico para la formación de las LDs (146). La incubación con ácido oleico dio lugar a la formación de LDs tanto en las células primarias humanas como en la línea celular de ratón (**Figura 26**).

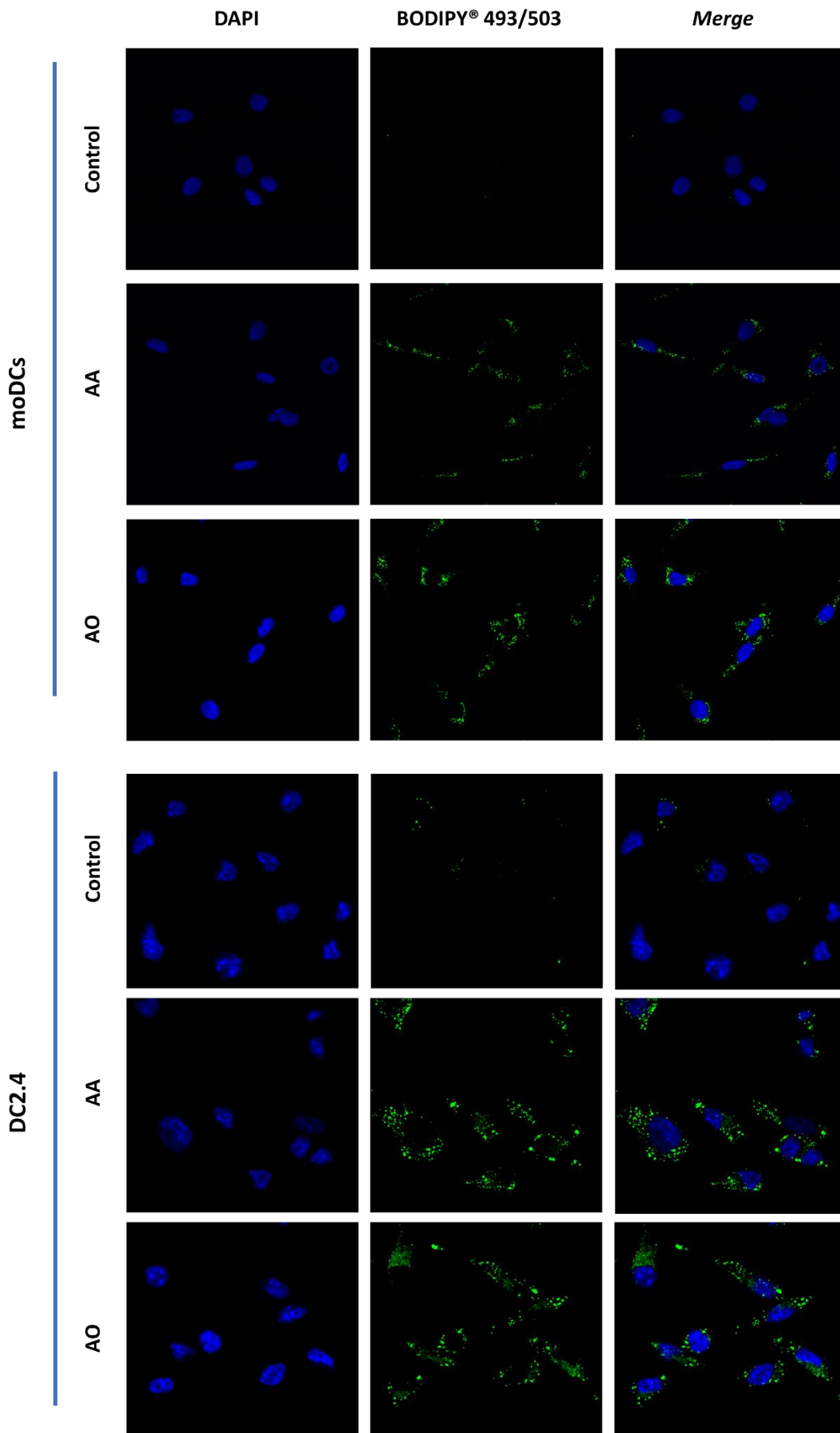


Figura 26. Formación de gotas lipídicas en moDC y DC2.4 tras la incubación con AA Y AO exógeno. Las células dendríticas se trataron con AA o AO a una concentración de 10 μ M durante 2 horas. Tras la fijación, las células se tiñeron con Bodipy[®]493/503 (2 mg/ml) para marcar las gotas lipídicas (verde, paneles centrales) y con DAPI (1 mg/ml) para marcar los núcleos (azul, paneles izquierda) y se observaron al microscopio confocal. Los paneles de la derecha muestran los dos canales conjuntamente.

Para confirmar dichos resultados y obtener de manera cuantitativa la formación de LDs en las células dendríticas tras su exposición con AA exógeno se realizaron los mismos experimentos mediante citometría de flujo. Al igual a lo observado anteriormente, se produce un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia al incubar ambos tipos celulares con AA lo que se traduce en un aumento de LDs en el interior de dichas células (

Figura 27).

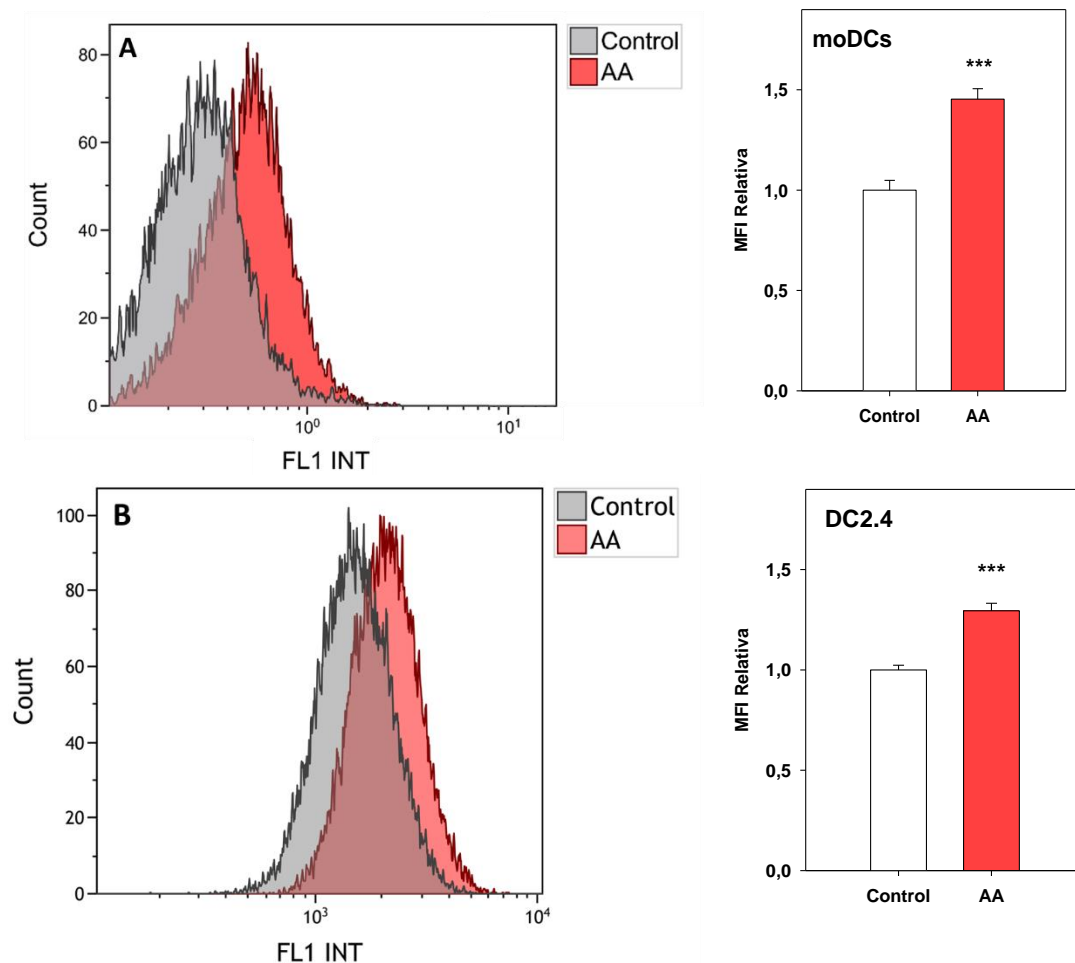
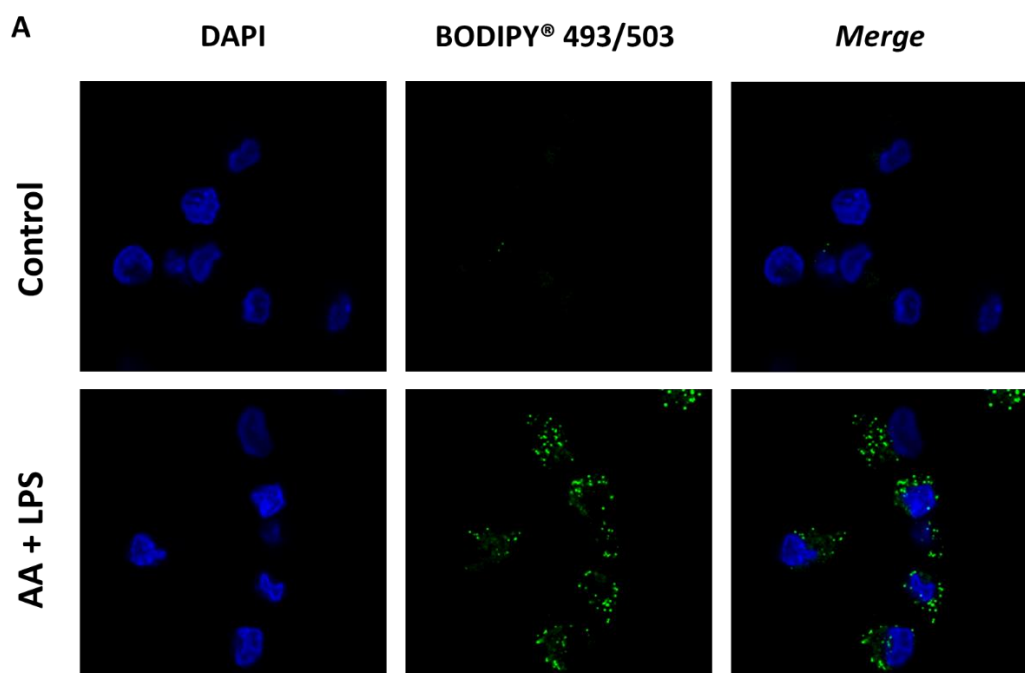


Figura 27. Formación de gotas lipídicas en moDC y DC2.4 tras la incubación con AA exógeno. Las células dendríticas se trataron con AA a una concentración de 10 μ M durante 2 horas. Las células se tiñeron con Bodipy[®]493/503 (2 mg/ml) para marcar las gotas lipídicas y se analizaron por citometría de flujo. Se

muestra la intensidad de fluorescencia y la intensidad de fluorescencia media (MFI) relativa al control en moDCs (A) y en DC2.4 (B). Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=3). * $p < 0.05$

Como ya se ha mencionado anteriormente, las células dendríticas poseen dos estados de maduración. Con el fin de comprobar si las LDs formadas por acción del AA en su estado inmaduro perduran o desaparecen tras la maduración de la célula dendrítica se realizaron experimentos de microscopía confocal y citometría de flujo. Se observó que, tras la incubación de AA y una posterior estimulación con LPS con el fin de madurar las células dendríticas, las LDs permanecían en las células (**Figura 28**). La media de intensidad obtenida es igual a la observada anteriormente en las células tratadas únicamente con AA (

Figura 27), lo que indica que no se produce una disminución de las LDs ya formadas y que, incluso, se produce un ligero incremento de LDs al madurar las células con LPS.



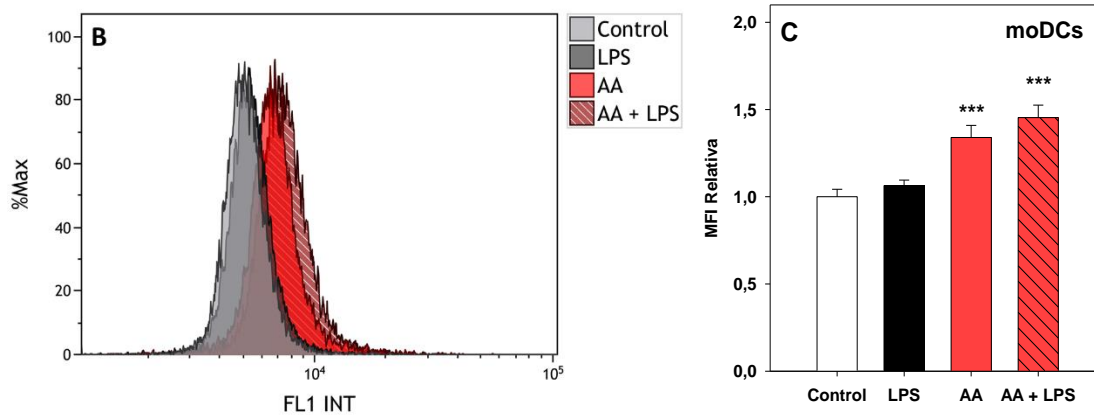


Figura 28. Formación de gotas lipídicas tras la maduración de las células dendríticas. Las células dendríticas se trataron con AA a una concentración de 10 μ M durante 2 horas y después se estimularon con 200ng/ml de LPS durante 16 horas. Para microscopía confocal, tras la fijación, las células se tiñeron con Bodipy[®]493/503 (2 mg/ml) para marcar las gotas lipídicas (verde, paneles centrales) y con DAPI (1 mg/ml) para marcar los núcleos (azul, paneles izquierda) y se observaron al microscopio confocal. Los paneles de la derecha muestran los dos canales conjuntamente. Para citometría de flujo, las células se tiñeron con Bodipy[®]493/503 (2 mg/ml) para marcar las gotas lipídicas y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra la intensidad de fluorescencia (B) y la intensidad de fluorescencia media (MFI) relativa a l control (C). Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=2). *** p<0.001 respecto el control.

A este aumento de la intensidad de fluorescencia, tanto en microscopía confocal como en citometría de flujo, lo acompaña el incremento significativo de los niveles de expresión de mRNA medidos mediante qPCR cuantitativa a tiempo real del gen *PLIN2*, que codifica para perilipina-2, también conocida como adipofilina (ADRP), una proteína clave en la formación de LDs (**Figura 29**).

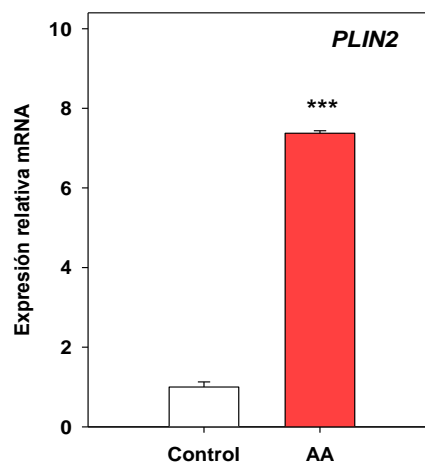


Figura 29. Efecto del AA en la expresión génica de *PLIN2*, implicada en formación de gotas lipídicas en células dendríticas humanas. La expresión relativa de los genes en los controles (barras blancas) o en las células tratadas con 10 μ M AA durante 2 horas (barras coloreadas) se determinó por RT-qPCR como se

describe en materiales y métodos. Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=2), *PLIN2*: Perilipin 2 o adipofilina (ADRP). *** $p < 0.001$.

Cuando se forman las LDs se produce un aumento de los niveles de lípidos neutros especialmente de triacilglicerol y esteres de colesterol debido a la incorporación de ácidos grasos a dichas especies lipídicas. Estos ácidos grasos pueden provenir de varias fuentes, por una parte, están las fuentes exógenas como lipoproteínas o ácidos grasos libres, y por otra parte están las fuentes endógenas como la redistribución de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana o la estimulación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (132,137–139).

La formación de LDs a consecuencia de la incorporación de ácidos grasos por una fuente exógena queda descartada en nuestros experimentos ya que éstos se realizaron en medio sin suero. Por otra parte, para estudiar la posibilidad de que los ácidos grasos se estuvieran acumulando debido a una estimulación de la síntesis *nov*o, se realizaron experimentos de qPCR donde se midieron los niveles de expresión de mRNA de proteínas involucradas en dicha síntesis como la acetil-CoA carboxilasa alfa (*ACACA*) y la sintasa de ácidos grasos (*FASN*), que conjuntamente, median la síntesis del ácido palmítico. Otras dos proteínas que participan en la síntesis de los ácidos grasos son la elongasa de ácido graso 6 (*ELOVL6*), involucrada en procesos de elongación de ácidos grasos y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (*SREBF1* y 2), factor de transcripción que se une a la secuencia de DNA del elemento regulador de esteroides, regulando la expresión de numerosas enzimas que participan en la síntesis lipídica.

La determinación de los niveles de mRNA de las proteínas involucradas en la síntesis de ácidos grasos mostró que sólo la sintasa de ácidos grasos (*FASN*) y *SERBP2* (*SERBF2*) tienen una tendencia a aumentar sus niveles tras la estimulación con AA (**Figura 30**). Por otro lado, se observa una disminución de los niveles de *SERBF1*. Los niveles del resto de proteínas no se vieron afectadas por acción de dicho ácido graso. Estos últimos resultados donde los genes que codifican por las proteínas implicadas en la síntesis de ácidos grasos muestran ligeros aumentos junto con los mostrados donde se observaban aumentos de los ácidos grasos en lípidos neutros para los moDCs (**Figura**

23-A, -C y -D), indican que el AA probablemente está induciendo la síntesis de ácidos grasos y, por tanto, podría ser la vía para la acumulación de los ácidos grasos en los lípidos neutros, de un modo similar a como ha sido descrito en monocitos humanos (146).

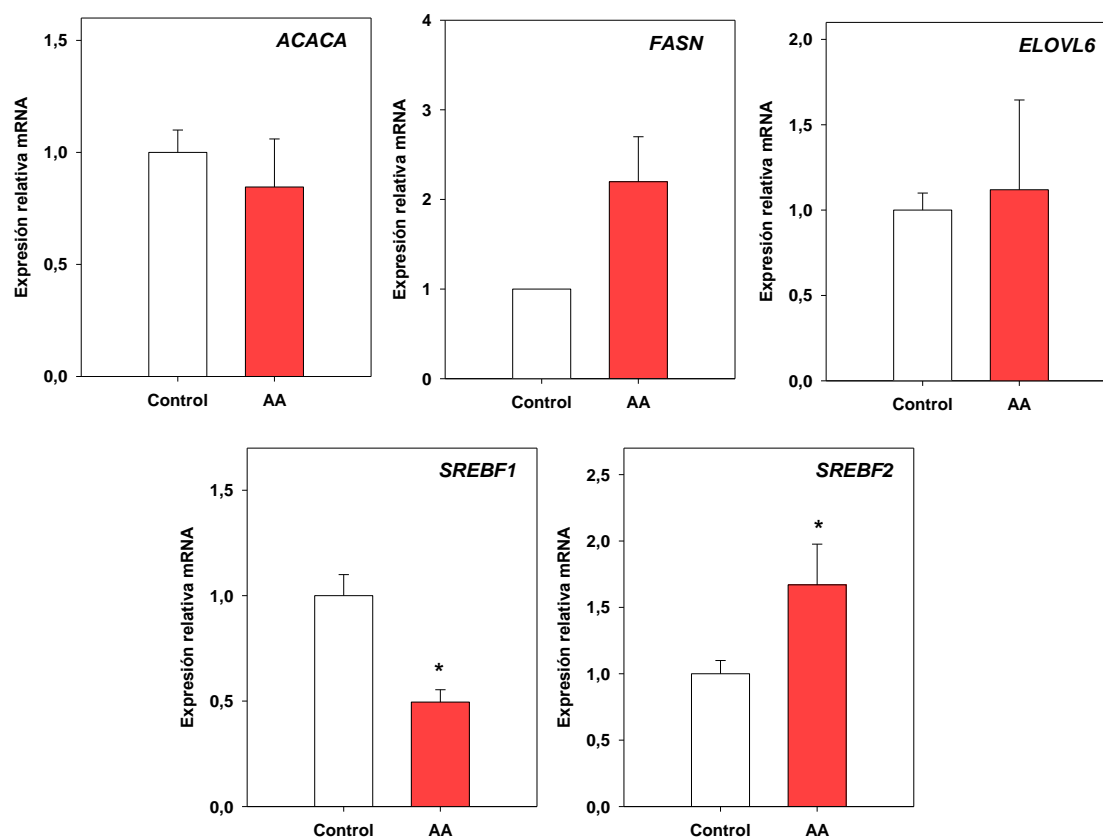


Figura 30. Efecto del AA en la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos en células dendríticas humanas. La expresión relativa de los genes en los controles (barras blancas) o en las células tratadas con 10 μ M AA durante 2 horas (barras coloreadas) se determinó por qPCR como se describe en materiales y métodos. Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=3). *ACACA*: Acetil-CoA carboxilasa alfa. *FASN*: Sintasa de ácidos grasos. *ELOVL6*: Elongasa de ácidos grasos de cadena muy larga 6. *SREBF1*: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1. *SREBF2*: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 2. *P<0.05

2.3. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EXÓGENO DISMINUYE LA FAGOCITOSIS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

Una función fundamental de las células dendríticas inmaduras es la captura de antígenos para su posterior procesamiento y degradación a péptidos que se unirán a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) o clase II (MHC-II) y dará lugar a la presentación antigénica en la superficie celular a linfocitos T. La captación de antígenos se realiza a través de diversos mecanismos como macropinocitosis, endocitosis mediada por receptor y fagocitosis, gracias a los receptores que presentan en su superficie.

Para estudiar el efecto del ácido araquidónico sobre la fagocitosis en células dendríticas inmaduras, se realizaron experimentos de microscopía confocal donde las moDCs se incubaron durante 2 horas con AA exógeno y posteriormente se añadieron partículas de zimosán sin opsonizar marcadas con AlexaFluor 549 para, posteriormente, poder cuantificarlas a razón de 4 partículas por célula durante 30 minutos. Gracias a la posibilidad de visualizar la fluorescencia verde y roja, se tiñeron las LDs con Bodipy®493/503, para estudiar también la formación de estas estructuras. Confirmando resultados anteriores, se observó que el AA inducía la producción de LDs en las células, pero tras analizar el índice fagocítico, se determinó que este ácido graso disminuye la capacidad de las moDCs para fagocitar. (**Figura 31**).

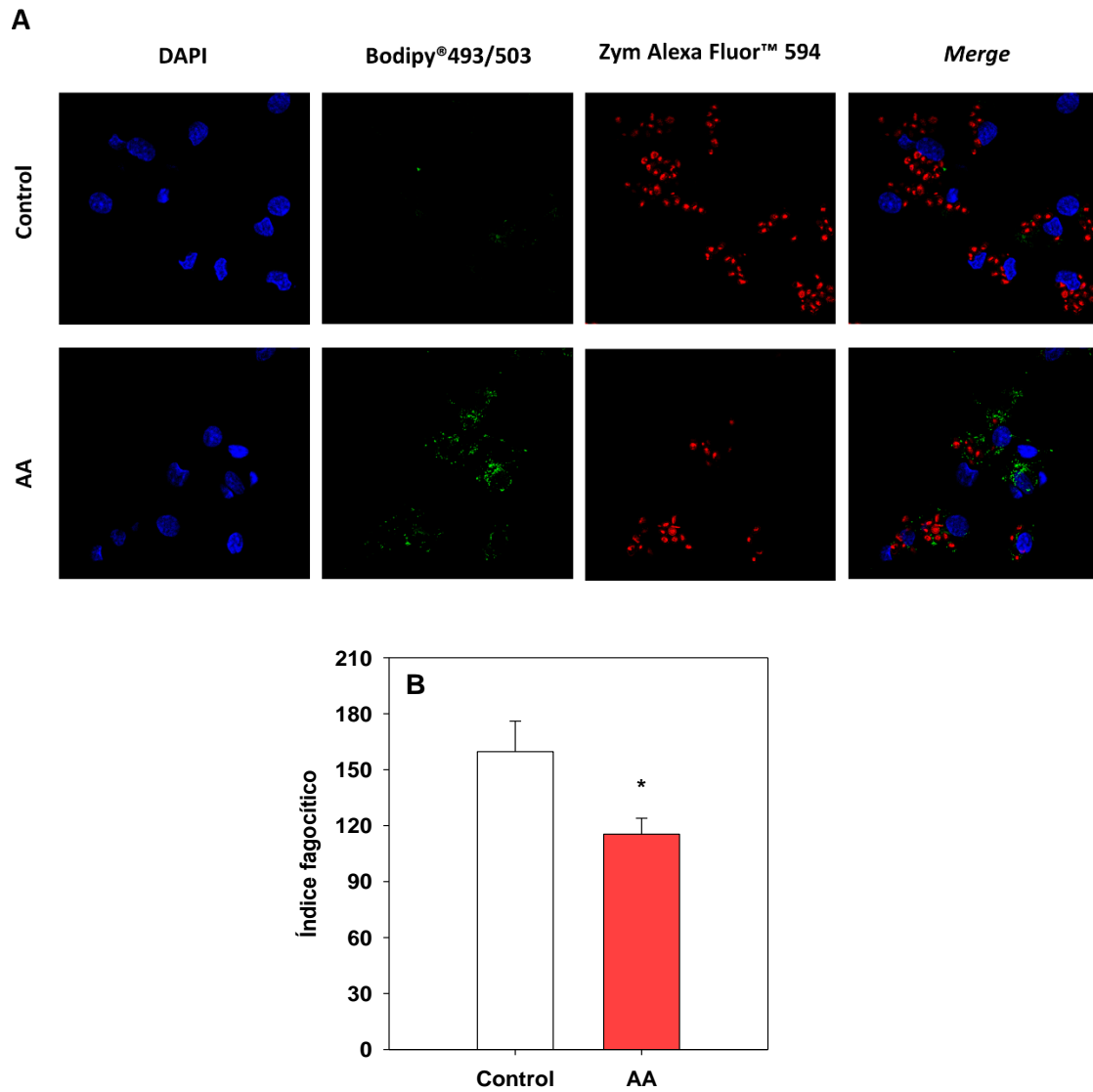


Figura 31. Efecto del AA exógeno en la fagocitosis de células dendríticas derivadas de monocitos humanos inmaduras (moiDCs). Las células fueron no tratadas (control, barra blanca) o tratadas con 10 μ M de AA durante 2 h (barra color). Después, se añadieron partículas de zimósán Alexa Fluor™ 594 (4 partículas por células) durante 30 minutos (fluorescencia roja, tercera columna). Tras la fijación, las células se tiñeron con Bodipy®493/503 (2 μ g/ml) para marcar las gotas lipídicas (fluorescencia verde, segunda columna) y con DAPI (1 μ g/ml) para marcar los núcleos (fluorescencia azul, primera columna) y se observaron al microscopio confocal. La columna de la derecha muestra todos los canales juntos (A). Cuantificación del índice fagocítico, n° células=1666 (B). * p <0.05

2.4. LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS SE VE AUMENTADA EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EXPUESTAS A ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EXÓGENO

Tras la fagocitosis y el procesamiento de antígeno, las células dendríticas pasan a su estado maduro donde sus principales funciones son la presentación de antígeno y la activación de otras células inmunes como son las células T. Para la activación de dichas células, las células dendríticas necesitan enviar tres señales a las células T. La primera señal se realiza a través de la presentación de antígeno vía MHC-I o MHC-II, la segunda señal es la unión de las moléculas de co-estimulación como el CD80 o CD40 de las células dendríticas con el CD28 y CD40L respectivamente de la célula T, y, por último, la tercera señal es la producción de citoquinas que la célula dendrítica secreta para estimular a la célula T.

Para estudiar el efecto del AA sobre la expresión de ciertas citoquinas las células se expusieron a este ácido graso durante 2 horas antes de la estimulación con LPS. Mediante qPCR se determinaron los niveles de expresión de citoquinas implicadas en la activación de células T como *IL6*, *IL1B* e *IL12B* y la expresión de la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (*PTGS2*). Como se observa en la **Figura 32** el AA aumenta los niveles de expresión de todos los genes estudiados. Por un lado, se observa el aumento de las citoquinas que median la activación de células T CD4⁺ y, por otro lado, se observa un aumento de *PTGS2*, cuyo producto COX-2 participa en la generación de prostaglandina E₂ (PGE₂) a partir de AA. Se ha visto que la PGE₂ disminuye la activación de las células T citotóxicas CD8⁺. (269,270).

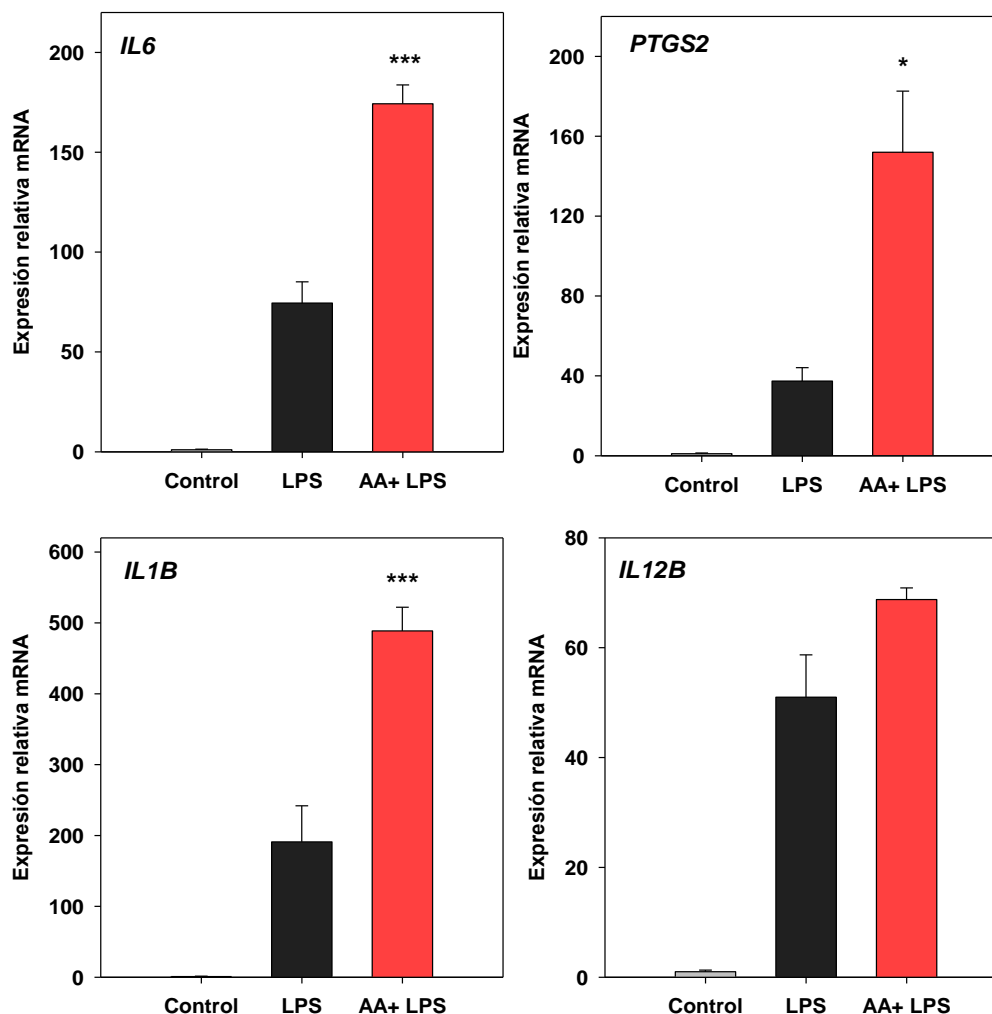


Figura 32. Efecto del AA en la expresión génica de citoquinas implicadas en la maduración de las células dendríticas humanas. La expresión relativa de los genes en las células no tratadas (negro) o tratadas con 10 μ M AA durante 2 horas (rojo) previamente a un estímulo de 100 ng/ml de LPS durante 6 h se determinó por PCR cuantitativa a tiempo real como se describe en materiales y métodos. Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=3). *IL6*: interleuquina 6; *PTGS2*: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2; *IL1B*: interleuquina 1 β ; *IL12B*: intereuquina 12b. *p<0.05, ***p<0.001

2.5. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO IMPIDE LA TRANSLOCACIÓN DE MHC-I A LA SUPERFICIE CELULAR EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Como se ha mencionado anteriormente, cuando la célula dendrítica madura se produce un cambio en sus funciones de tal manera que su función principal será la presentación de antígeno. Para ello, la célula dendrítica mediante translocación

aumenta sus niveles de expresión en su membrana celular del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y de clase II, así como de moléculas de coestimulación como CD40, CD80 y CD86. Por tanto, está establecido que para estudiar la maduración de la célula dendrítica se determinen los niveles de dichas moléculas en superficie celular.

Para estudiar la maduración y el efecto del ácido araquidónico sobre dicho proceso, la línea celular DC2.4 se incubó o no previamente a la activación con LPS con AA durante 2 horas y se determinaron los niveles de los marcadores de maduración en la superficie celular mediante citometría de flujo. La incubación con LPS produjo un incremento de la intensidad de fluorescencia para las moléculas estudiadas (CD40, CD80 y MHC-I), lo que indica que estas células han pasado de su estado inmaduro a un estado de madurez, aumentando la expresión de estas moléculas en la superficie celular (**Figura 33**). Por otro lado, la incubación con el AA previamente al estímulo del LPS no dio lugar a cambios en los niveles de las moléculas de coestimulación CD40 y CD80, pero sí produjo una disminución significativa de la expresión de MHC-I.

Por tanto, el AA no está afectando a los procesos de maduración, ya que los niveles de CD80 y CD40 no varían. El hecho de que disminuya la expresión en membrana celular del MHC-I hace pensar en la posibilidad de que el ácido graso disminuya la expresión total de esta molécula (en superficie e intracelular), o que disminuya únicamente su translocación a la membrana plasmática.

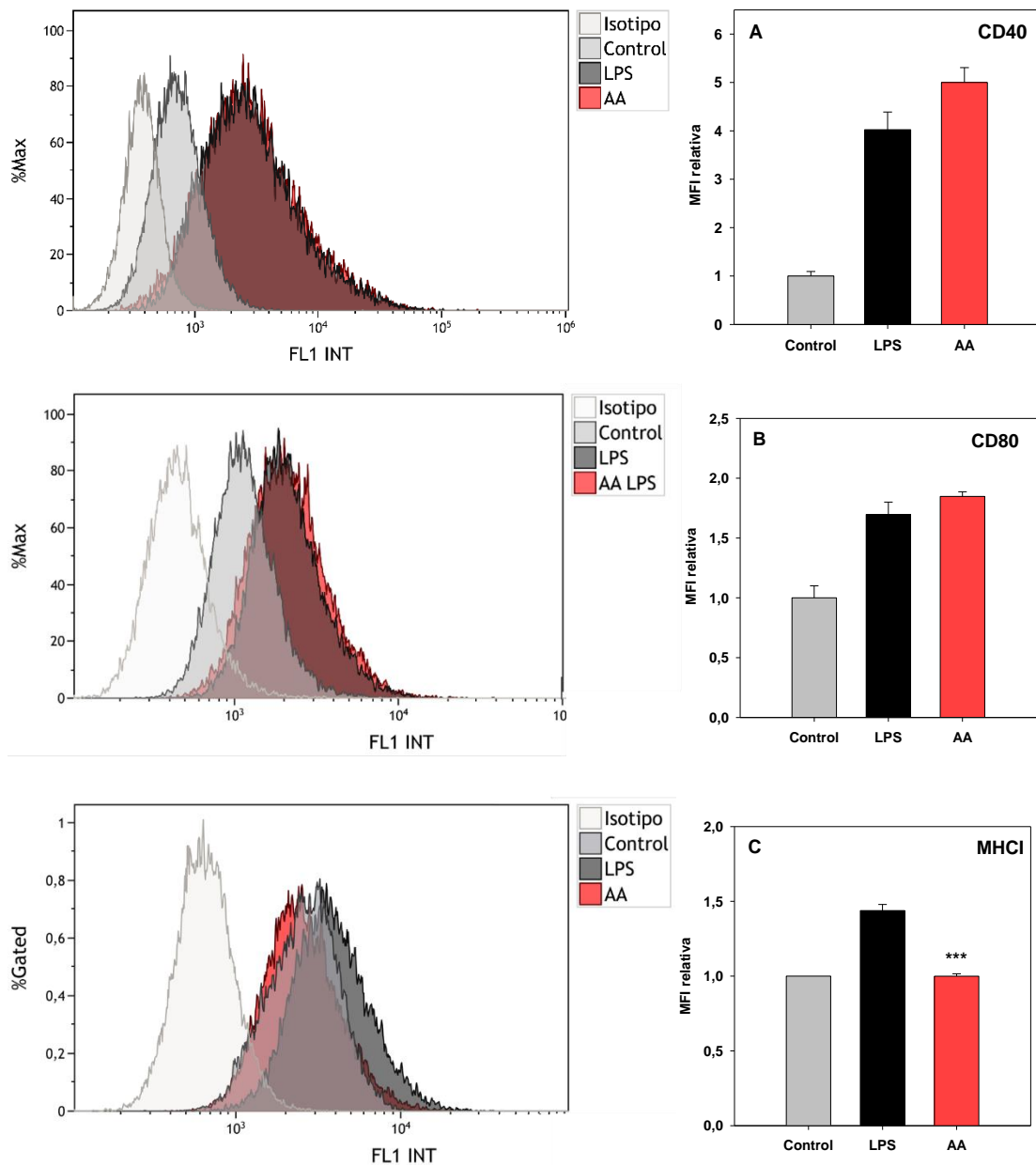


Figura 33. Efecto del ácido araquidónico en los marcadores de maduración de las DC2.4. Las células DC2.4 fueron no tratadas (barra negra) o tratadas con 10 μ M de AA (rojo) durante 2 horas. Posteriormente se estimularon con 1 μ g/ml de LPS durante 16 horas. Las células se incubaron con los respectivos anticuerpos y se midió su intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. En la figura se muestra la intensidad de fluorescencia (paneles izquierdos) y la intensidad de fluorescencia media relativa al control (gráfica derecha) para CD40 (A), CD80 (B) y MHC-I (C). Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=3). *** p<0.001

Para estudiar de qué manera el ácido araquidónico está afectando a los niveles de MHC-I se analizaron mediante citometría de flujo los niveles totales (superficie e intracelulares) de la molécula de MHC-I. Para ello, las células dendríticas se

permeabilizaron con una solución de saponina al 0.01% previamente a la incubación con el anticuerpo (Anti-ratón MHCI (H-2Kb)) de tal manera que éste es capaz de unirse a las moléculas de MHC-I que se estén expresando tanto en la superficie celular como a las moléculas que se encuentren en el interior.

Como se puede observar en la **Figura 34** el tratamiento con LPS de las células mantiene los niveles de MHC-I frente a los niveles de control, lo que indica que no es que no se esté produciendo la maduración de las células, sino que se está midiendo el contenido total de dichas moléculas que en ambos estados de maduración es el mismo (271,272). Cuando se produce el tratamiento con AA se observa de nuevo que no varían los niveles de MHC-I frente a los niveles de las células control o las células tratadas con LPS. Esto sugiere que el AA no disminuye el contenido de MHC-I en las células, sino que está limitando su translocación a la superficie celular durante el proceso de maduración.

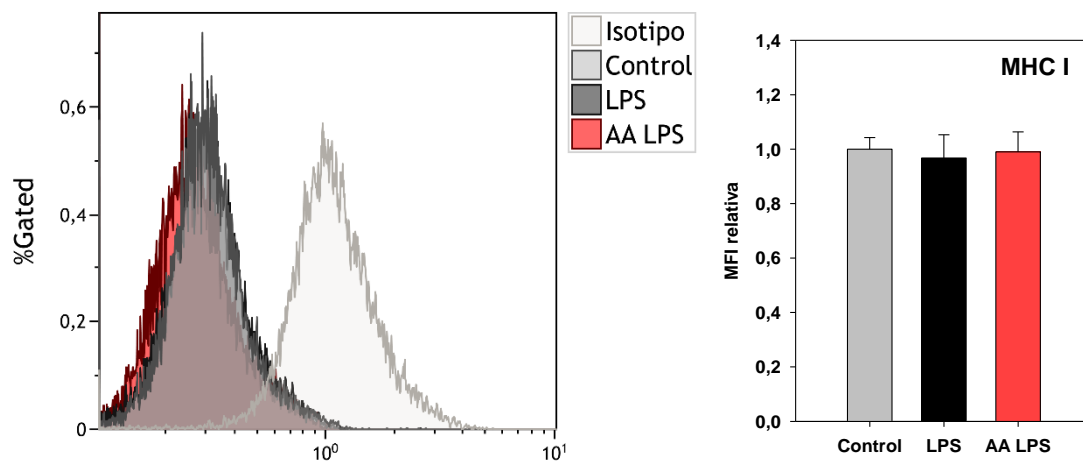


Figura 34. Niveles de MHC-I tras la incubación de AA y permeabilización de las células DC2.4. Las DC2.4 fueron no tratadas (barra negra) o tratadas con 10 μ M de AA (rojo) durante 2 horas. Posteriormente se maduraron con 1 μ g/ml de LPS durante 16 horas. Las células se incubaron con una solución de saponina 0.01 % y con el respectivo anticuerpo y se midió su intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. En la figura se muestra la intensidad de fluorescencia (panel izquierdo) y la intensidad de fluorescencia media relativa al control (gráfica derecha) para MHC-I. Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=3).

2.6. LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO SE VE DISMINUIDA POR ACCIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

La presentación de antígeno, función principal de las células dendríticas maduras, se puede realizar por tres vías distintas activando poblaciones de células T diferentes: presentación clásica vía MHC-II y activación de células T CD4⁺, presentación clásica vía MHC-I y activación de células CD8⁺; y finalmente, presentación cruzada de antígenos exógenos vía MHC-I y activación de células CD8⁺(39,82).

En estudios recientes se ha descubierto la implicación de las LDs en la presentación cruzada de antígenos de las células dendríticas (79,190,194,195). Sin embargo, existe mucha controversia sobre sus efectos beneficiosos o perjudiciales. Por ello, uno de los objetivos principales de este trabajo es estudiar el efecto del ácido araquidónico y del ácido oleico sobre la proliferación de células T CD8⁺ que se activan por presentación cruzada. Debido a la imposibilidad de realizar estos ensayos con células dendríticas humanas y células T humanas, se utilizó la línea celular DC2.4 junto con células OT-I (273).

Con el fin de determinar la implicación de dichos ácidos grasos en la presentación cruzada de las células dendríticas maduras se realizaron ensayos de proliferación de las células OT-I. Para ello, las células dendríticas incubadas o no con los ácidos grasos y maduras con LPS se incubaron con ovalbúmina (OVA) 257-264 para su fagocitosis y procesamiento por estas células. Posteriormente, las células DC2.4 se cocultivan con células OT-I durante 5 días para que tenga lugar la presentación de antígeno, activación y proliferación de células T. Esto último se analiza por incorporación de [³H]timidina durante las últimas horas del cocultivo.

El tratamiento con el AA dio lugar a una disminución significativa del porcentaje de incorporación de [³H]timidina, lo que significa una menor proliferación de las células (**Figura 35**). Estos datos concuerdan con el hecho de que el AA disminuye los niveles de MHC-I en la superficie celular (**Figura 33**) dando lugar a una menor presentación y, por tanto, a una menor activación de las células T. Por otra parte, el ácido oleico no cambió el porcentaje de proliferación de las células T (**Figura 35**).

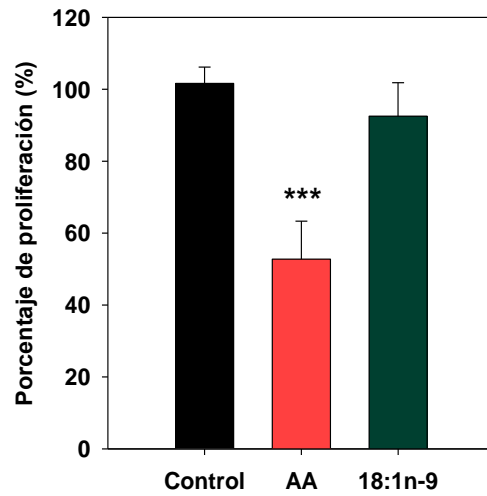


Figura 35. Ensayo de proliferación celular de células T OT-I. Las DC2.4 fueron no tratadas (barra negra) o tratadas con 10 μ M de AA (rojo) o 10 μ M de AO (verde) durante 2 horas. Posteriormente se estimularon con 1 μ g/ml de LPS durante 16 horas y se incubaron durante 6 horas con OVA 257-264. Las células se cocultivaron con células T OT-I a razón 1:2 y se dejaron durante 5 días. Tras ese tiempo, las células se incubaron con 1 μ Ci/ml de [3 H]timidina durante 16 horas, se lavaron, se recogieron y se midió el contenido de [3 H]timidina mediante contaje de centelleo y se calculó el porcentaje de proliferación respecto a las células control (sin tratar con ácidos grasos, 100%). Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=5). ***p<0.001

3. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

3.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS 16:1 EN DISTINTAS ESPECIES LIPÍDICAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Numerosos estudios sugieren que los ácidos grasos monoinsaturados son beneficiosos en la dieta humana (274). Mantener la proporción entre ácidos grasos saturados e insaturados en la composición de las membranas biológicas es fundamental para la salud, ya que la desregulación de esta proporción puede promover el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (274). El ácido graso monoinsaturado 16:1 posee numerosos isómeros posicionales siendo los más abundantes el ácido palmitoleico (16:1n-7), ácido hipogeico (16:1n-9) y ácido sapiénico (16:1n-10). Los isómeros del 16:1 han sido objeto de estudio en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo en distintas células fagocíticas observándose una acción antiinflamatoria del 16:1n-9 y 16-1n-7 en células humanas y murinas. En cuanto al 16:1n-10, originalmente descrito en piel, pelo y uña de humanos, se identificó en monocitos y macrófagos, y con menor carácter antiinflamatorio que los otros dos isómeros. Sin embargo, poco se conoce sobre estos ácidos grasos en células dendríticas, por ello, se decidió estudiar tanto la distribución como la respuesta inmunitaria de los isómeros del 16:1 en este tipo celular.

El primer objetivo fue el estudio de su proporción en las diferentes clases de lípidos en el estado basal de las células moDCs mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En las especies de lípidos neutros predomina el isómero 16:1n-10 frente a los otros dos isómeros (**Figura 36-A**) y en CE es el único isómero existente. En cuanto a las distintas especies de glicerofosfolípidos, el ácido hipogeico solo se encuentra en las especies de PC y PE y de manera minoritaria, mientras el ácido sapiénico está presente en todas las clases de fosfolípidos siendo la especie mayoritaria en todas ellas, excepto en la especie de PE donde abunda el ácido palmitoleico (**Figura 36-B**). En resumen, los isómeros más abundantes prácticamente

con el mismo porcentaje son el ácido palmitoleico y el ácido sapiénico mientras que el ácido hipogeico se encuentra en pequeñas cantidades.

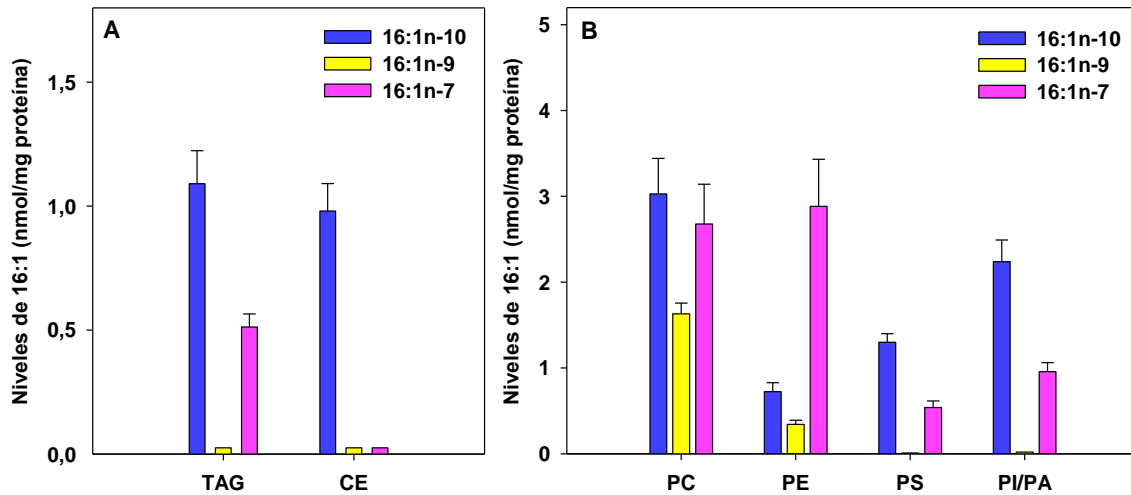


Figura 36. Perfil de los distintos isómeros del 16:1 en distintas especies lipídicas en moDCs. Las células dendríticas humanas se recogieron y se aislaron las diferentes clases de lípidos, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra el perfil para lípidos neutros (A) y especies de fosfolípidos (B). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=4).

Cabe destacar la gran diferencia en la proporción de los isómeros en estas células respecto a otras células primarias humanas como los monocitos y macrófagos donde los principales isómeros del 16:1 son el ácido hipogeico y ácido palmitoleico, siendo el ácido sapiénico un ácido graso minoritario (**Figura 37**).

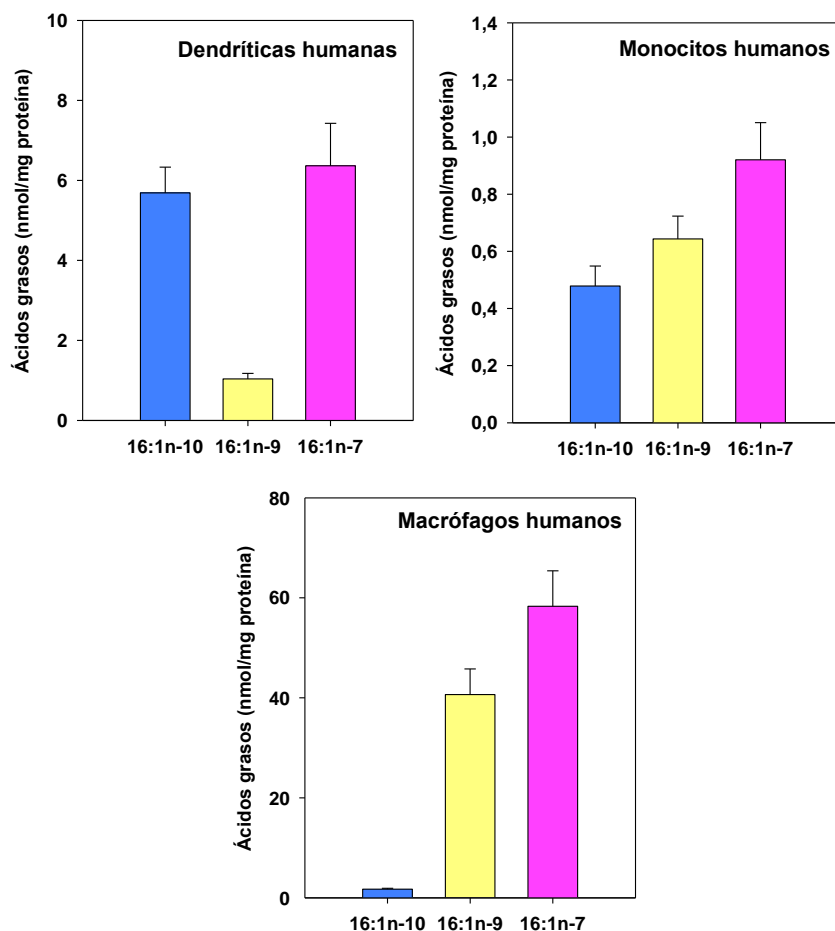


Figura 37. Distribución de los isómeros del 16:1 en células primarias humanas. Las células se recogieron y los ácidos grasos se convirtieron en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra el perfil de contenido total de 16:1n-10 (azul), 16:1n-9 (amarillo) y 16:1n-7 (rosa) para los moDCs (izquierda), monocitos humanos (centro) y macrófagos humanos (derecha). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=3).

Tanto el ácido palmitoleico como el ácido sapiénico se sintetizan a partir de la inserción de una insaturación en el ácido palmítico a través de la acción de $\Delta 9$ (SCD1) y $\Delta 6$ (FADS2) desaturasas respectivamente (208,275,276). El 16:1n-9 se produce por β -oxidación del ácido oleico (146). Analizando mediante qPCR los niveles de expresión de mRNA que da lugar a dichas proteínas involucradas en la formación de los isómeros y comparándolos entre las células dendríticas y otras células primarias humanas, se observó una mayor expresión de la *FADS2* en células dendríticas (**Figura 38-A**) lo que

podría explicar los altos niveles relativos de ácido sapiénico en moDCs en comparación con los monocitos y macrófagos humanos.

La *FADS2* también convierte el ácido linoleico en ácido γ -linolénico dentro de la vía de síntesis de los ácidos grasos de la serie n-6, por lo que los altos niveles de 16:1n-10 en células dendríticas humanas podrían reflejar, al menos en parte, un mayor acceso de la $\Delta 6$ desaturasa al ácido palmítico, debido a la relativa escasez del ácido linoleico. De acuerdo con esto, se observó que la relación molar entre el ácido palmítico (16:0) y ácido linoleico (18:2n-6) fue varias veces mayor en las células moDCs que en otras células primarias como monocitos o macrófagos humanos (**Figura 38-B**).

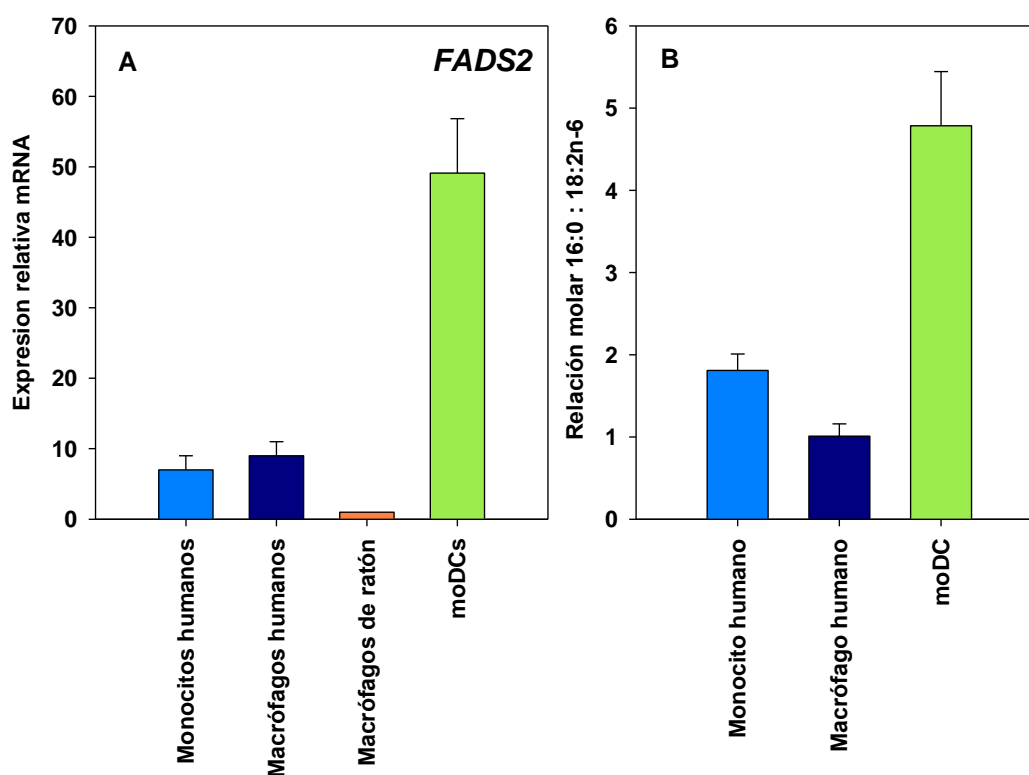


Figura 38. Estudio de la expresión génica de *FADS2* implicada en la síntesis de ácidos grasos en células dendríticas humanas y monocitos humanos. (A) La expresión relativa de los genes en monocitos humanos (azul claro), macrófagos humanos (azul oscuro), macrófagos de ratón (naranja) o células dendríticas derivadas de monocitos humanos (verde) se determinó por RT-qPCR como se describe en materiales y métodos. (B) Relación molar entre el 16:0 y 18:2n-6 en diferentes células fagocíticas. Las células se recogieron y tras la conversión de los ácidos grasos en esteres metílicos se midieron por GC-MS. *FADS2*: desaturasa de ácidos grasos 2.

Viendo la diferencia de proporciones entre células de la misma especie, se estudiaron las diferencias en las proporciones de los isómeros del 16:1 entre las células primarias humanas y la línea celular de ratón DC2.4. En la **Figura 39** se representan las diferencias entre ambos tipos celulares. Mientras que el 70% de los isómeros del 16:1 lo constituye el ácido palmitoleico en la línea celular, en moDCs solo representa el 49%. En cuanto al ácido sapiénico, se observa una mayor proporción en las células moDCs (43%) que en la línea celular DC2.4 (19%). El ácido hipogeico tiene prácticamente la misma proporción en ambos tipos celulares, moDCs y DC2.4.

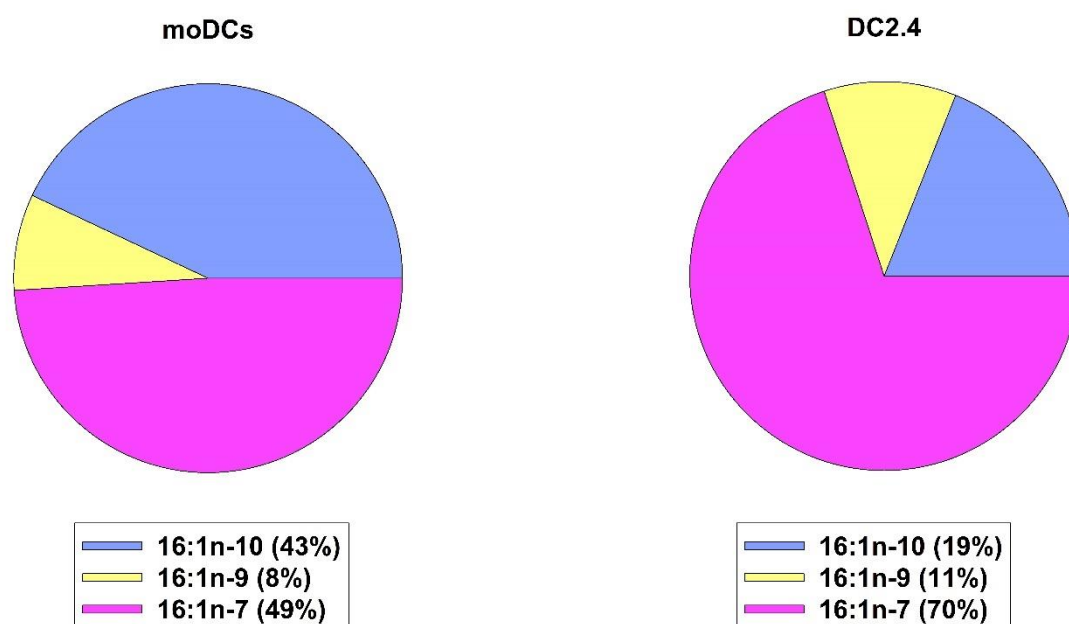


Figura 39. Comparación de la proporción de los distintos isómeros del 16:1 entre células dendríticas. Las células dendríticas humanas y las células de la línea celular DC2.4 se recogieron, los ácidos grasos se convirtieron en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra los porcentajes de 16:1n-10 (azul), 16:1n-9 (amarillo) y 16:1n-7 (rosa) para los moDCs (izquierda) y DC2.4 (derecha).

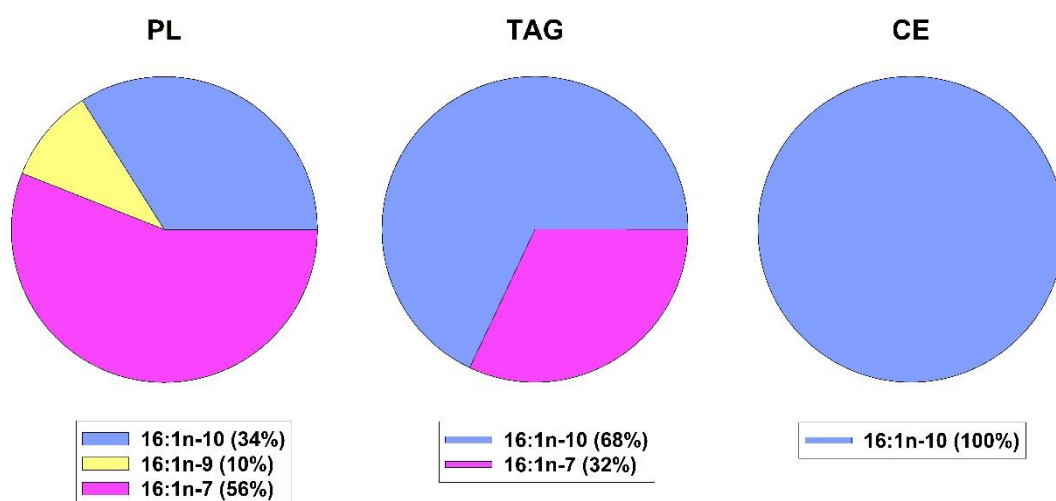
Estos estudios se extendieron también a las diferentes clases de lípidos celulares, observándose grandes diferencias en la proporción de estos isómeros que siguen la dinámica de la **Figura 39**. Existe un gran parecido en las proporciones de los isómeros en la fracción de PLs entre ambos tipos celulares. El ácido palmitoleico es el isómero más

abundante en dicha fracción con un 73% en la línea celular y un 56% en las células moDCs (**Figura 40**). Por otro lado, el ácido sapiénico es más abundante en las células dendríticas humanas (34%) frente a las células DC2.4 (14%). En cuanto al ácido hipogeico, no se aprecian prácticamente diferencias en su proporción al comparar ambos tipos celulares.

Sin embargo, en los lípidos neutros se aprecia una gran diferencia entre las proporciones de los tres isómeros del 16:1. No se ha detectado la presencia del 16:1n-9 en las células dendríticas humanas mientras que en la línea celular se observa una pequeña proporción en la fracción de TAG (**Figura 40**). Por otra parte, cabe destacar un intercambio en las proporciones entre el ácido sapiénico y el ácido palmitoleico en la fracción de TAG siendo el primero más abundante en las moDCs y el segundo en la línea celular. En cuanto a la fracción de CE se observa una clara preferencia del ácido sapiénico en las células moDCs, siendo el único isómero presente, mientras que en las células DC2.4 coexiste en casi la misma proporción con el isómero 16:1n-7.

En resumen, se puede apreciar un cambio en las proporciones de los isómeros sobre todo en las fracciones de lípidos neutros, siendo más abundante el ácido sapiénico en las células humanas primarias.

A moDCs



B DC2.4

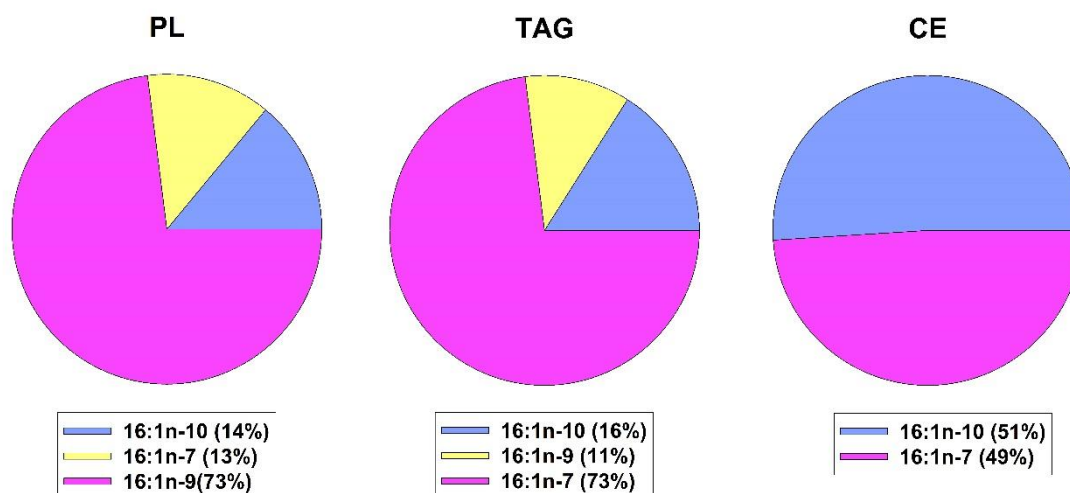
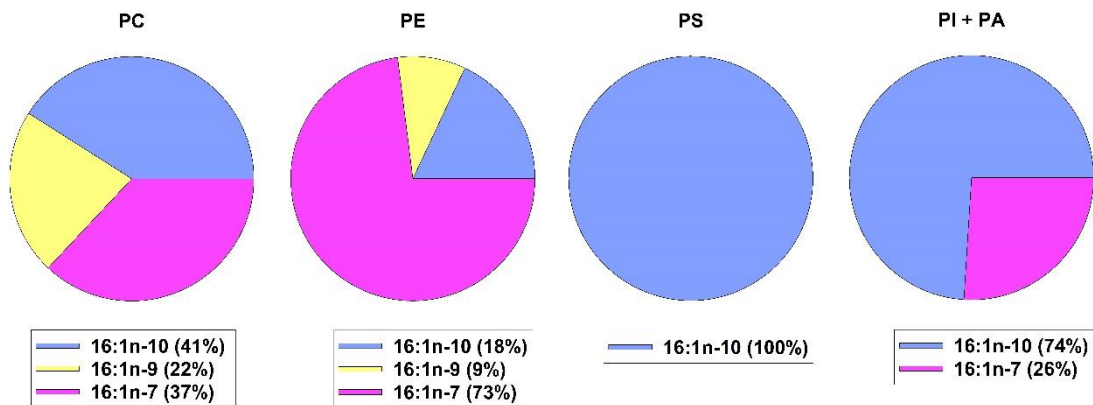


Figura 40. Diferencias de la proporción de isómeros en diferentes especies lipídicas entre células dendríticas. Las células dendríticas humanas y las células de la línea celular DC2.4 se recogieron y se aislaron las diferentes clases de lípidos mediante TLC, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra los porcentajes de 16:1n-10 (azul), 16:1n-9 (amarillo) y 16:1n-7 (rosa) para los moDCs (A) y DC2.4 (B) en las diferentes clases de lípidos (PL, TAG, CE).

Haciendo hincapié en la fracción de fosfolípidos, se quiso analizar si las distintas clases de glicerofosfolípidos mostraban diferencias entre los dos tipos celulares. Como se observa en la **Figura 41**, llama la atención la gran coincidencia de proporciones en la fracción de PE y PI+PA. El isómero más abundante es el ácido palmitoleico para ambos tipos celulares en PE, aunque con mayor porcentaje en la línea celular que en las células primarias. En la fracción de PI+PA no se aprecian diferencias en la proporción de los isómeros al comparar ambos tipos celulares. En cuanto al resto de fracciones de fosfolípidos (PC y PS), se observa de nuevo esas diferencias; el 16:1n-7 predomina en las células DC2.4 mientras que el isómero 16:1n-10 predomina en las células moDCs (**Figura 41**).

A moDCs



B DC2.4

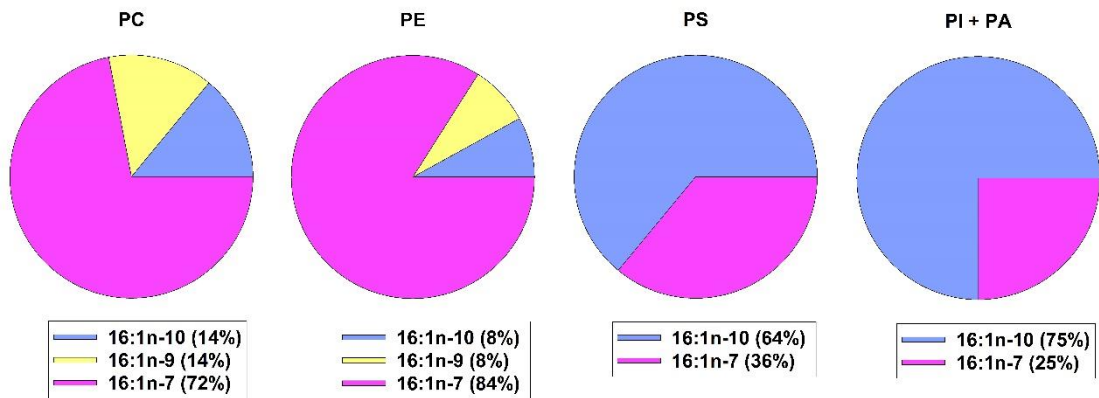


Figura 41. Comparación de la proporción de isómeros del 16:1 en las distintas clases de glicerofosfolípidos entre células dendríticas. Las células dendríticas humanas y las células de la línea celular DC2.4 se recogieron y se aislaron las diferentes clases de lípidos mediante TLC, se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra los porcentajes de 16:1n-10 (azul), 16:1n-9 (amarillo) y 16:1n-7 (rosa) para los moDCs (A) y DC2.4 (B) en las diferentes clases de fosfolípidos (PC, PE, PS y PI+PA). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=3).

3.2. INCORPORACIÓN DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LAS DISTINTAS CLASES DE LÍPIDOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

En estudios previos del laboratorio se ha observado un efecto antiinflamatorio de estos ácidos grasos en numerosos tipos celulares al enriquecer dichas células con los

isómeros del 16:1 por períodos prolongados de tiempo (201,202). Para estudiar el efecto que sobre las células dendríticas pueden tener estos ácidos grasos, se llevó a cabo una incubación durante 14 horas con dichos isómeros para analizar su incorporación en las diversas especies de lípidos. Mediante GC-MS se determinaron los niveles de ácidos grasos que se incorporan a las distintas fracciones (glicerofosfolípidos, gliceroles y ésteres de colesterol) en ambos tipos celulares (**Figura 42**).

Como era de esperar, en moDCs la mayor parte de los isómeros se incorporaron a la fracción de glicerofosfolípidos y en una proporción similar en torno a 12 nmol/mg proteína para el ácido sapiénico y el ácido palmitoleico mientras que el ácido hipogeico se incorpora en menor proporción (**Figura 42-A**). Sin embargo, en la línea celular se puede observar una marcada preferencia del ácido sapiénico por la fracción de glicerofosfolípidos, incorporándose hasta cuatro veces más que los otros dos isómeros del 16:1 (**Figura 42-B**).

En cuanto a los lípidos neutros, se observa una menor incorporación de los isómeros tanto en la fracción de glicerol (GL, TAG+DAG) como en la de ésteres de colesterol en ambos tipos celulares (**Figura 42**). En moDCs hay una mayor incorporación del 16:1n-10 y 16:1n-7 en GL respecto al 16:1n-9, mientras que en DC2.4 se incorporan prácticamente por igual. En cuanto a los ésteres de colesterol sólo se observa la incorporación de ácidos sapiénico y ácido hipogeico en cantidades muy pequeñas en ambos tipos celulares.

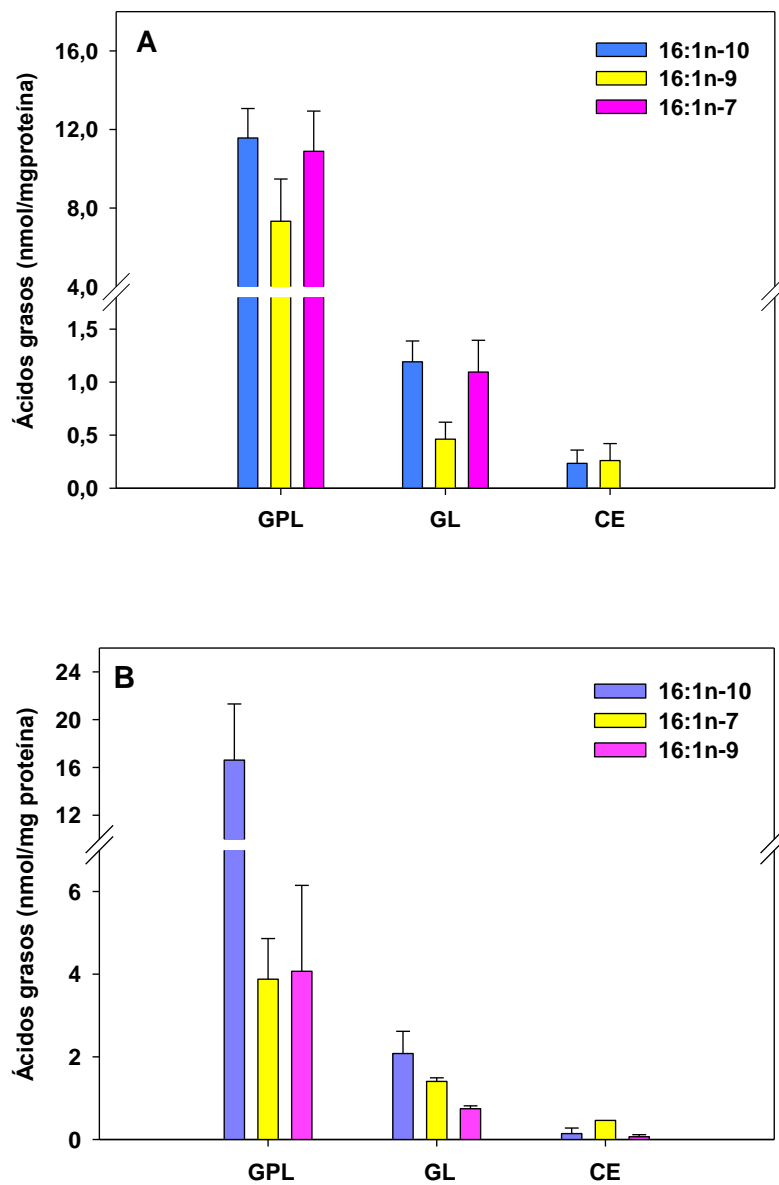


Figura 42. Incorporación de los isómeros del 16:1 en las distintas clases de lípidos en moDCs y DC2.4. Las moDCs y las células de la línea celular DC2.4 se incubaron durante 14 horas con los diferentes isómeros del 16:1 se recogieron y se aislaron las diferentes clases de lípidos mediante TLC. Se convirtieron los ácidos grasos en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra los niveles de 16:1n-10 (azul), 16:1n-9 (amarillo) y 16:1n-7 (rosa) para los moDCs (A) y DC2.4 (B) en glicerofosfolípidos (GPL), glicerolípidos neutros (GL, TAG + DAG) y ésteres de colesterol (CE). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=2).

3.3 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN CÉLULAS ACTIVADAS POR LPS

Para el estudio de la estimulación de las células dendríticas se procedió a determinar si las proporciones de los diferentes isómeros se veían alteradas por la acción de LPS en moDCs y comparar con lo que en monocitos humanos. Para ello, mediante análisis cromatográficos y de espectrometría de masas se incubaron las células dendríticas humanas o los monocitos humanos a distintos tiempos con el estímulo y se determinó la proporción de cada isómero. En la **Figura 43** se aprecia que, para ambos tipos celulares, al comienzo del experimento la proporción de isómeros es consistente con lo descrito anteriormente (**Figura 37**), donde el ácido sapiénico y el ácido palmitoleico se encuentran casi en la misma proporción, pero en una cantidad mucho mayor que el ácido hipogeico para el caso de las células moDCs. En monocitos humanos el ácido palmitoleico está en la mayor proporción siguiéndole el ácido hipogeico y por último, el ácido sapiénico. Las moDCs se estimularon a tiempos largos consiguiendo así su maduración. Se observa que, para los moDCs, no se produce variación en los niveles de los diferentes isómeros ni cuando llega a su estado de maduración (24 horas) (**Figura 43-A**). Por otro lado, en monocitos humanos no hay cambios en los niveles de ningún isómero del 16:1 durante las dos horas de incubación con el estímulo (**Figura 43-B**).

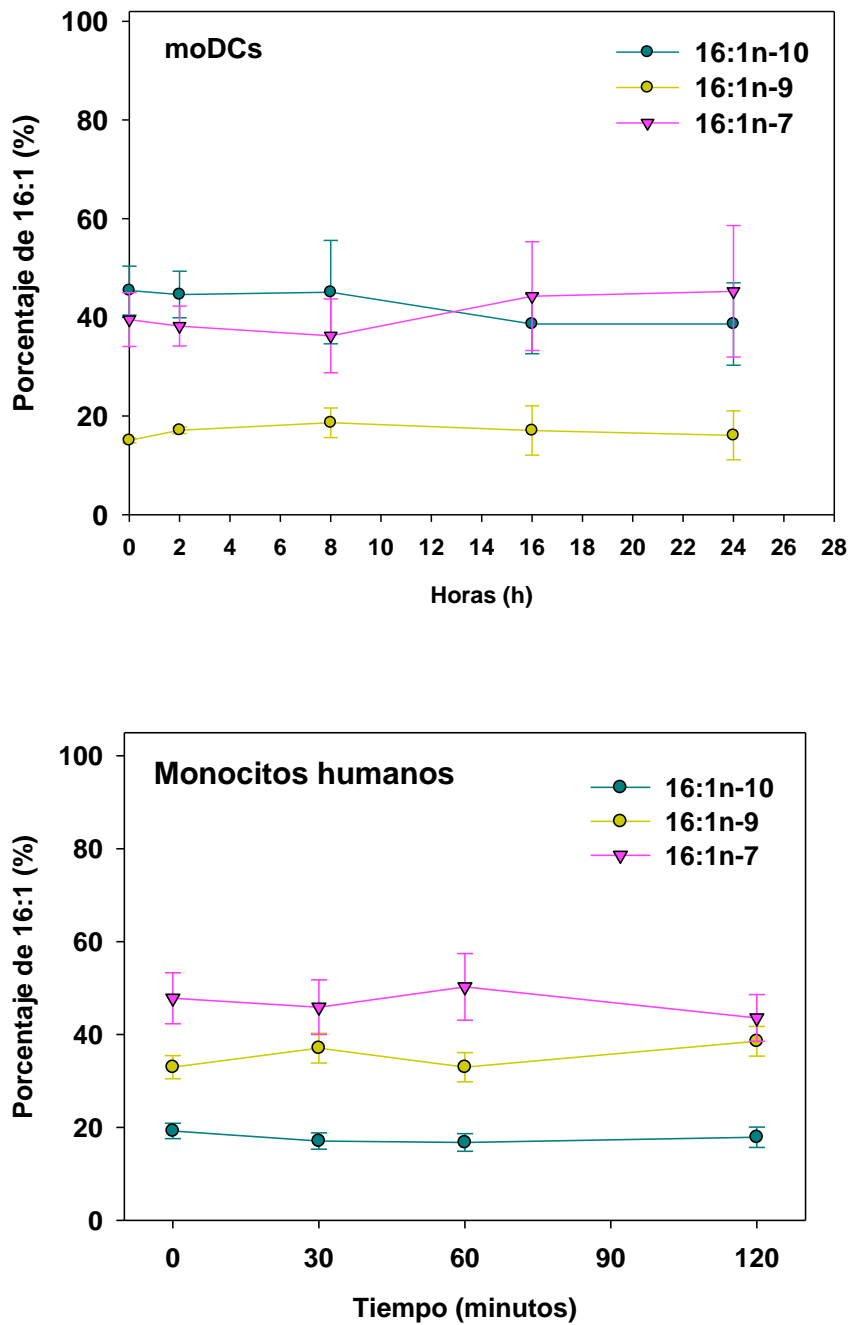


Figura 43. Efecto del LPS en los niveles de los distintos isómeros en moDCs y monocitos humanos. Las células dendríticas humanas y los monocitos humanos se trataron con 200 ng/ml o 100 ng/ml de LPS respectivamente durante los tiempos indicados. Las células se recogieron, los ácidos grasos se convirtieron en ésteres metílicos y se midió su contenido mediante GC-MS. Las muestras se volvieron a derivatizar para formar los aductos de DMDS y analizar la proporción de los diferentes isómeros de 16:1 y, finalmente, se volvieron a pasar por el GC-MS. Se muestra los porcentajes de 16:1n-10 (azul), 16:1n-9 (amarillo) y 16:1n-7 (rosa). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=2).

3.4. RESPUESTA INFLAMATORIA DE LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Como ya se ha mencionado anteriormente, numerosos estudios hablan del efecto antiinflamatorio de los ácidos grasos monoinsaturados y específicamente de los isómeros del 16:1 (200–202,209,274,277). Por ello, se procedió a determinar si estos isómeros del 16:1 ejercen el mismo efecto en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos y en la línea celular.

Realizando análisis mediante qPCR de la expresión de citoquinas proinflamatorias en las moDCs se observó que la preincubación de las células con los isómeros del 16:1 alteran los niveles de expresión de mRNA para distintas citoquinas o proteínas implicadas en el proceso de inflamación como *IL6*, *PTGS2* y *CCL2*. Se aprecia que los isómeros incrementan los niveles de expresión de manera significativa respecto a la estimulación con LPS (**Figura 44**).

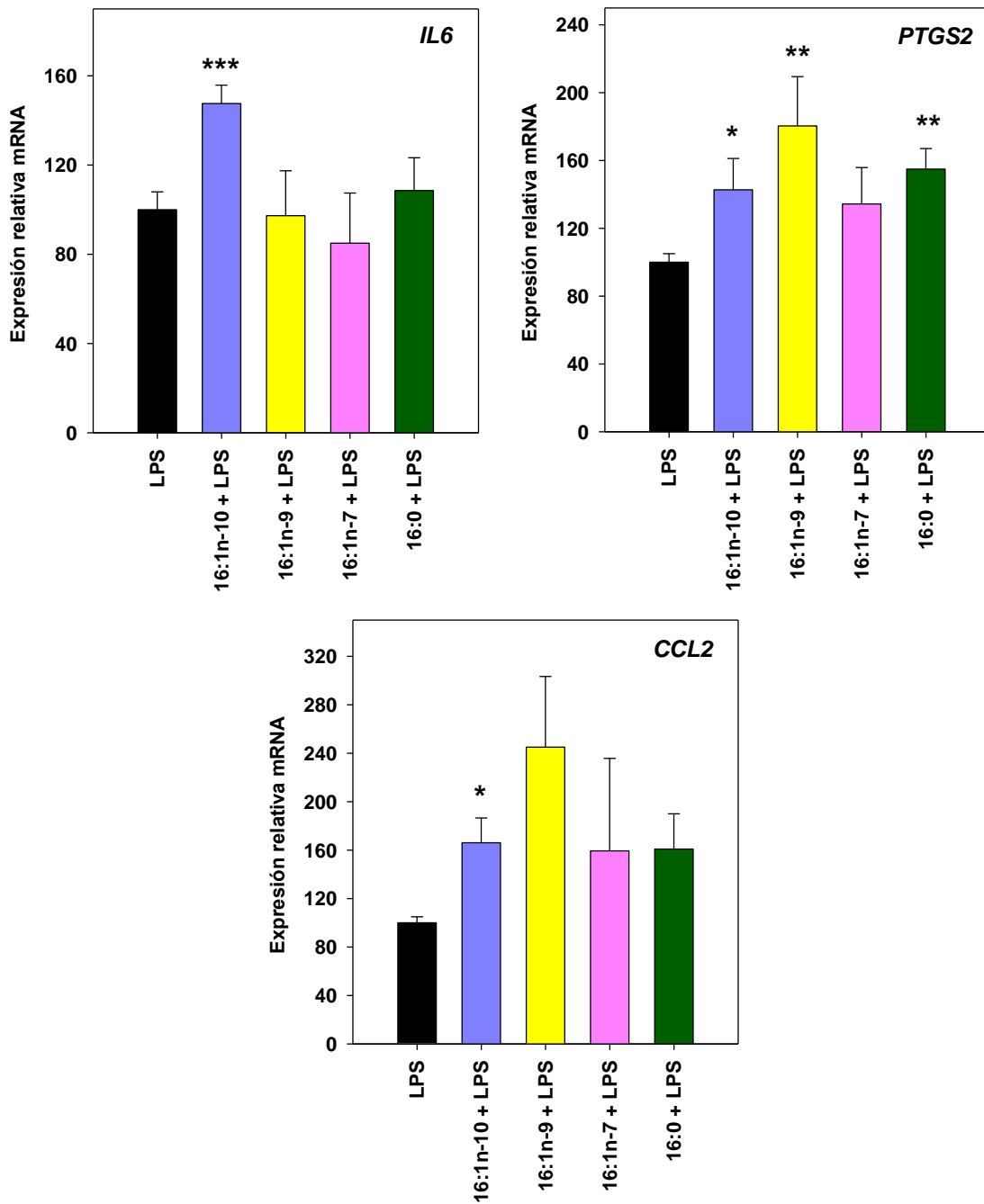


Figura 44. Efecto de los isómeros en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en células dendríticas humanas. La expresión relativa de los genes en las células no tratadas (negro) o tratadas con 10 μ M de los distintos ácidos grasos indicados (barras coloreadas) durante 14 horas previamente a un estímulo de 200 ng/ml de LPS durante 6 h se determinó por PCR cuantitativa a tiempo real como se describe en materiales y métodos. *IL6*: interleuquina 6; *CCL2*: ligando de quimiocina 2, *PTGS2*: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2. Los resultados se muestran como media \pm S.E.M (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En cuanto a la línea celular, al contrario que las células primarias, se observó que el enriquecimiento de las células DC2.4 con los isómeros del 16:1 previamente a la estimulación con LPS provoca un descenso de los niveles de expresión de mRNA de varias citoquinas proinflamatorias por parte de los tres isómeros del 16:1, de manera significativa para *Il6* y *Ccl2*, en comparación con el ácido palmítico, que no ejerce ningún efecto (**Figura 45**). En resumen, se aprecia que los isómeros del 16:1 en la línea celular DC2.4 tienen un efecto antiinflamatorio similar al observado en monocitos humanos (201,202), sin embargo, en las células moDCs no se asemejan sus efectos.

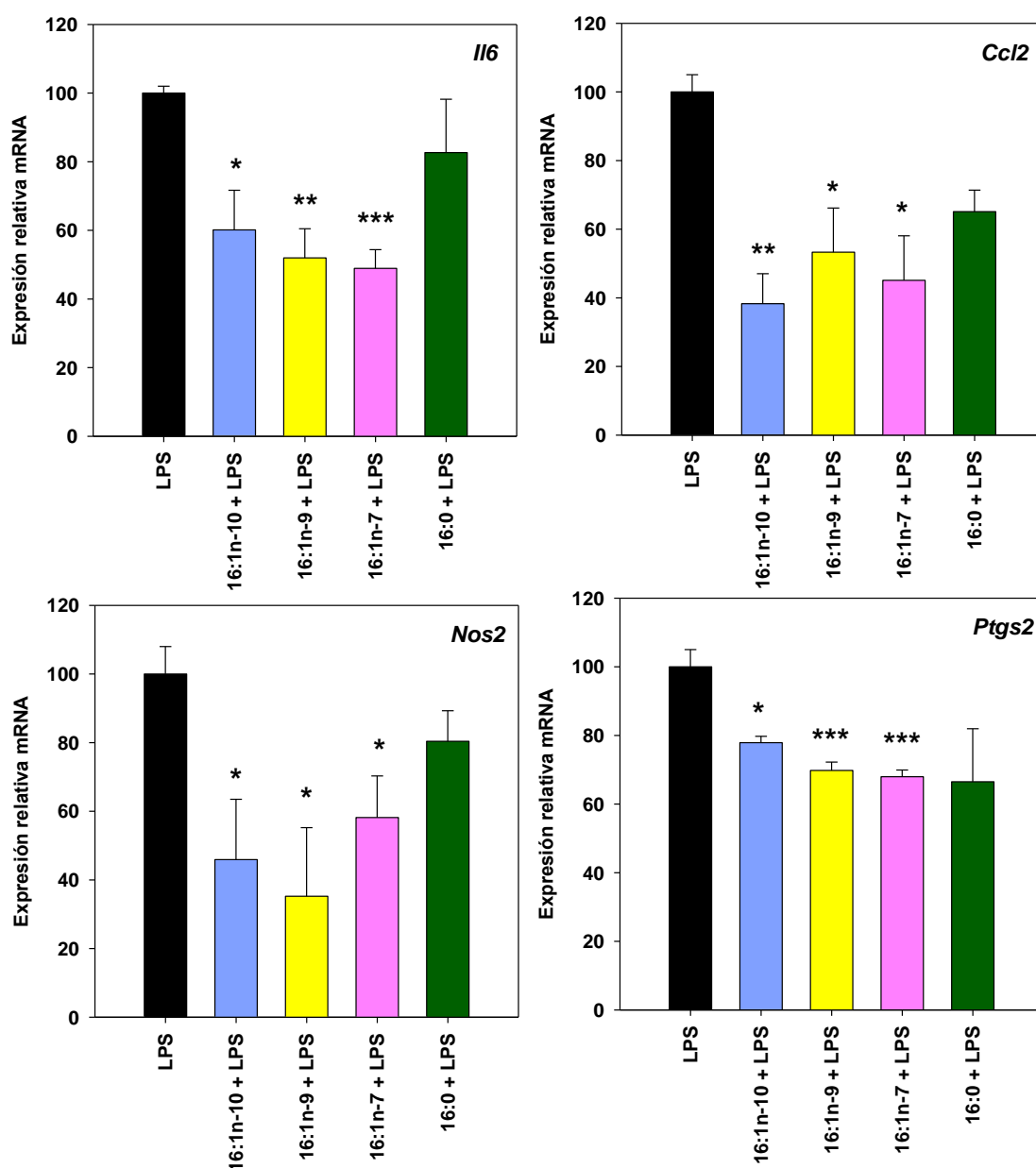


Figura 45. Efecto de los isómeros en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en DC2.4. La expresión relativa de los genes en las células no tratadas (negro) o tratadas con 10 μ M de los distintos

ácidos grasos indicados (barras coloreadas) durante 14 horas previamente a un estímulo de 1 µg/ml de LPS durante 6 h se determinó por PCR cuantitativa a tiempo real como se describe en materiales y métodos. *IL6*: interleuquina 6; *Ccl2*: ligando de quimiocina 2, *Nos2*: óxido nítrico sintasa, *PTGS2*: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2. Los resultados se muestran como media ± S.E.M (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Debido a los datos obtenidos de la caracterización de los distintos tipos celulares y viendo las grandes diferencias existentes entre ellas tanto en su proporción como en la incorporación y en la función de los isómeros, se concluye que la línea celular no constituye un buen modelo para el estudio del efecto de dichos ácidos grasos sobre las funciones de las células dendríticas ya que posteriormente no se podría trasladar, o comparar, con los resultados del modelo humano.

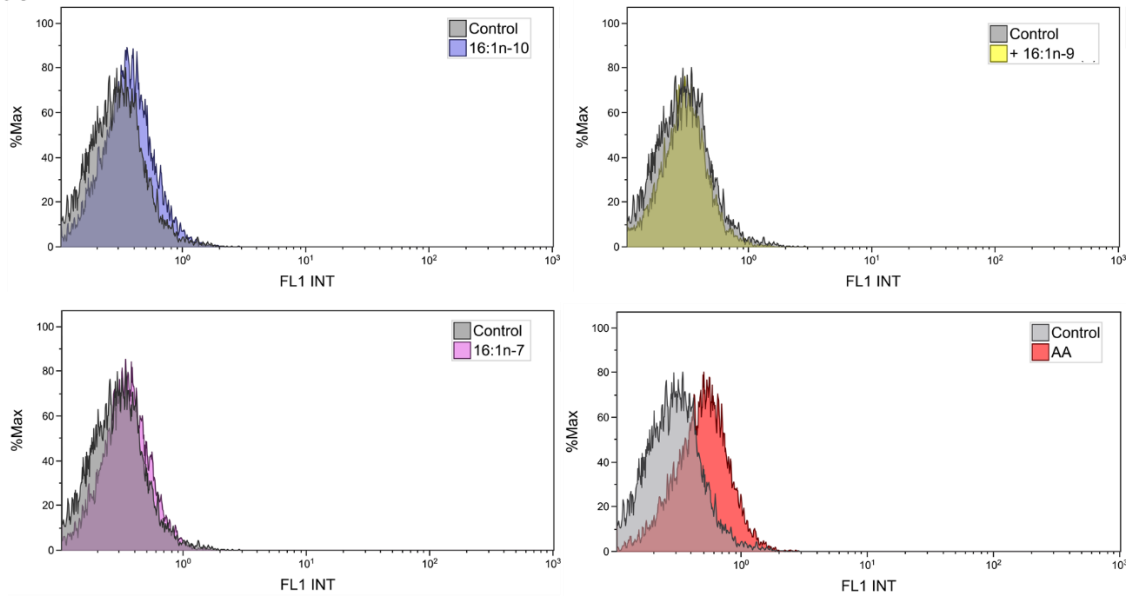
3.5. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 PREVIENEN LA FORMACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN LAS CÉLULAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS

Por último, se procedió a comprobar el efecto que podrían tener los isómeros del 16:1 en la formación de LDs por parte del AA. Para ello, las moDCs se preincubaron durante 14 horas con los isómeros del 16:1 y posteriormente se incubaron con AA exógeno para crear las LDs y mediante análisis por citometría de flujo se determinó la intensidad de fluorescencia para cada muestra.

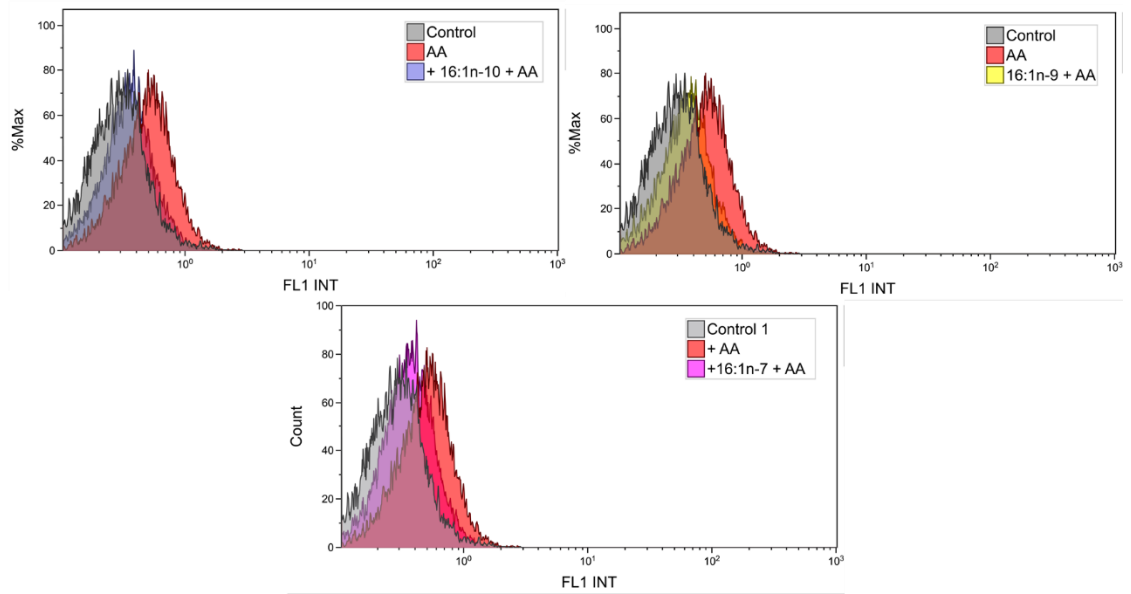
Los tres isómeros del 16:1 per se no dan lugar a la formación de LDs en las células humanas (**Figura 46**), pero sí parecen prevenir la formación de las LDs ya que al preincubar con dichos ácidos grasos antes del tratamiento con AA disminuye la intensidad de fluorescencia procedente del Bodipy 488, lo que indica una disminución de la formación de LDs.

3. Los isómeros del 16:1 en las células dendríticas

A



B



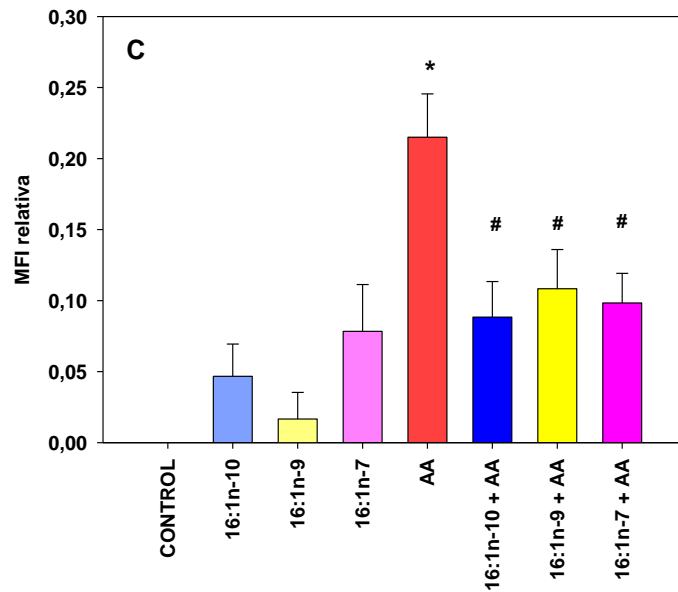


Figura 46. Prevención de la formación de gotas lipídicas por parte de los isómeros del 16:1 en moDCs.

Las células dendríticas humanas fueron preincubadas con los diferentes isómeros del 16:1 durante 14 horas y después no se incubaron (barras claras) o se incubaron con 10 μ M de AA durante 2 horas (barras oscuras). Las células se recogieron, se tiñeron con Bodipy 488 y se midieron la formación de gotas lipídicas por citometría de flujo. En la figura se muestra la intensidad de fluorescencia para los isómeros del 16:1 y el AA (A) y para la coincubación de los ácidos grasos (B) y la intensidad de fluorescencia media relativa al control (C). Los resultados son mostrados como media \pm S.E.M (n=3). * $p < 0.05$ control vs AA # $p < 0.05$ isómeros + AA vs AA

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN LIPIDÓMICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Dentro del sistema inmune, las células dendríticas (DC) son las células inmunes más importantes especializadas en la presentación de antígeno. Estas células representan un puente entre el sistema inmunitario innato y el adaptativo. En su estado inmaduro (iDC) se encuentran en la piel o en los tejidos de la mucosa siendo las primeras células inmunitarias en interactuar con los patógenos invasores. Después de la detección de patógenos, las DC maduran (cDC) y pueden activar las respuestas de las células T y B (9,10).

Las células dendríticas son una población muy heterogénea clasificada en diferentes subconjuntos, dentro de los cuales se encuentran las células dendríticas derivadas de monocitos humanos. In vivo, las moDC están presentes solo en condiciones inflamatorias y colocalizan con cualquier patógeno invasor. La generación y el uso de moDC se ha descrito ampliamente en la investigación básica y aplicada y se consideran el estándar para los estudios in vitro asociados con células dendríticas (278). Clásicamente, la diferenciación de monocitos se realiza mediante la suplementación in vitro del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la interleucina (IL)-4, para generar DC inmaduras (279,280).

La disponibilidad de técnicas de perfilado de lípidos basadas en espectrometría de masas proporciona un método confiable para caracterizar la composición y distribución de los ácidos grasos de las especies dentro de las células e identificar cambios en respuesta a las funciones celulares. Esta tecnología se ha utilizado en este trabajo para caracterizar tanto a las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) como a la línea celular dendrítica de ratón DC2.4, como modelo para estudios posteriores.

En este trabajo se ha mostrado que las células moDCs contienen altos niveles de AA en la fracción de glicerofosfolípidos, siendo los glicerofosfolípidos de etanolamina la especie más abundante en AA, seguida de PC, PI+PA y PS. Es sabida la gran importancia

de la remodelación del AA en fosfolípidos en las células del sistema inmune para su correcta distribución en las reservas celulares para su posterior movilización por las fosfolipasas A₂ (263–268). Este es un aspecto clave en la regulación de la síntesis de eicosanoides porque la naturaleza y la cantidad de estos compuestos producidos en condiciones de activación puede depender, en última instancia, de la composición y localización subcelular de la reserva de AA en fosfolípidos. En este trabajo se estudió la remodelación del AA entre las distintas especies de fosfolípidos en moDCs encontrándose que, su tiempo de remodelación es en torno a las 16 horas. Estudios previos del laboratorio analizaron los tiempos de remodelación para otros tipos celulares como RAW264.7 (línea celular macrofágica de ratón), P388D₁ (línea celular monocítica de ratón), MRPM (macrófagos peritoneales de ratón) o monocitos humanos (253,255). Comparando los resultados se observa una gran similitud del tiempo de remodelación entre los monocitos y las células moDCs, en torno a 15-16 horas) mientras que, tanto las líneas celulares de ratón y los macrófagos peritoneales poseen tiempos de remodelación mucho más lento, 20-30 minutos y 4 horas respectivamente (253,255). La acil transferasa dependiente de CoA y las transacilasas independientes de CoA (CoA-IT) participan secuencialmente en el proceso de remodelación de fosfolípidos con AA (281,282). Las acil transferasas dependientes de CoA median la incorporación inicial de AA en los fosfolípidos, que a su vez es seguida por la acción de CoA-IT, que redistribuye el AA entre las clases de fosfolípidos. Se ha observado que los niveles de actividad de CoA-IT están regulados negativamente por el nivel intracelular de AA. Por tanto, en células enriquecidas en AA, como monocitos humanos y moDCs, la actividad de CoA-IT es significativamente menor que en células deficientes en AA, como las líneas celulares (255).

Además, también se ha estudiado la movilización de este ácido graso frente a distintos estímulos de los receptores TLRs observándose una disminución de los niveles totales de AA, lo que estaría implicando su liberación. El AA liberado por la acción de las fosfolipasas A₂ puede mobilizarse bajo diversas condiciones fisiopatológicas, metabolizándose vía enzimática a través de la ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y citocromo P450 (CYP) o a través de mecanismos de radicales libres no enzimáticos dando lugar a los eicosanoides (254,268).

Las moDCs se diferencian de los monocitos dando lugar a un cambio tanto en el fenotipo como en las funciones principales de estas células. Para explorar la posibilidad de cambios en la composición lipídica entre ambos tipos celulares a causa de la diferenciación, se realizaron estudios mediante espectrometría de masas para determinar los niveles de ácidos grasos en distintas fracciones lipídicas. Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos poseen mayor cantidad de ácidos grasos en las fracciones de glicerofosfolípidos y lípidos neutros que los monocitos humanos, lo cual concuerda con estudios donde se ha observado que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos disminuye la diferenciación de moDC a partir de sus precursores de PBMC, lo que resalta la importancia de los ácidos grasos en dichos procesos (283). Analizando los datos en porcentajes de ácidos grasos se aprecian pocas diferencias significativas entre los ácidos grasos, siendo las más llamativas para los isómeros del 16:1 que se discutirán más adelante. Esto pone de relieve que, a pesar de las diferencias en la cantidad de lípidos, la proporción de ellos es parecida y se conserva a lo largo de la diferenciación.

Este trabajo también pone de relieve las diferencias en los perfiles de ácidos grasos en las distintas especies entre las células primarias (moDCs) y la línea celular (DC2.4). La principal diferencia se encuentra en el contenido de PUFAs en las fracciones de glicerofosfolípidos de las membranas de ambos tipos celulares, con un contenido notablemente inferior en las células DC2.4 en comparación con las moDCs, mientras que la línea celular posee mayor contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Como consecuencia del cultivo a largo plazo, muchas líneas celulares contienen niveles inferiores de ácidos grasos esenciales en comparación con las células primarias (202,248) y se confirma que esto también es cierto para las líneas celulares utilizadas en este estudio. A pesar de las diferencias en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, y, especialmente de AA, en las distintas especies de glicerofosfolípidos, cuando se estudia la proporción de dicho ácido graso en las distintas especies de glicerofosfolípidos se observan grandes similitudes entre ambos tipos celulares, siendo la clase de PE la más rica en AA, seguida de la especie de PC.

Tras el reconocimiento de antígenos de patógenos, las DCs aumentan las moléculas coestimuladoras y los receptores de quimiocinas, secretan citocinas y migran

hacia los órganos linfoides secundarios. Durante estos pasos de maduración, las DCs procesan los antígenos adquiridos y presentan pequeños péptidos en el surco de unión del complejo mayor de histocompatibilidad. Debido a todos los cambios que se producen en la maduración de las DCs, cabe hipotetizar que varias características celulares, desde el metabolismo hasta las propiedades de la membrana sufren modificaciones. Sin embargo, en este trabajo se ha observado que tras la maduración de las células dendríticas con LPS, un ligando de TLR establecido ampliamente como estímulo de maduración de las DCs, no hay cambios en el perfil de ácidos grasos totales ni en las células dendríticas humanas ni en la línea celular. Dudziak et al. (284) analizaron la composición lipídica de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos inmaduras y tras un proceso de estimulación y, al igual que lo observado en nuestros datos, no observaron cambios significativos en la cantidad total de lípidos celulares. Sin embargo, sí observaron cambios en especies individuales de lípidos, tales como aumentos en ceramidas (Cer) y en fosfatidilcolina (PC) y disminuciones en esfingomielina (SM), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilglicerol (PG). Otros estudios realizados en células dendríticas de ratón (285,286) han observado también cambios en especies de lípidos, pero no en su contenido total, como aumentos en PC y Cer y disminuciones en SM y PI.

2. EFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LAS FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Durante la última década se ha hecho cada vez más evidente que la activación, proliferación y función de las células inmunitarias están estrechamente relacionados y dependen de la activación de rutas metabólicas específicas (287). Dado que estos cambios metabólicos se alimentan en gran medida y dependen de los nutrientes presentes en el nicho de las células inmunitarias, se deduce que el microambiente metabólico ha de ser un factor fundamental para dar forma al resultado de una respuesta inmunitaria (288,289).

La formación de gotas lipídicas en el interior de las células está inducida en diferentes condiciones de estrés como el exceso o deprivación de nutrientes, hipoxia y el estrés oxidativo (139,145,148). En la mayoría de células expuestas a un exceso de ácidos grasos libres, las gotas lipídicas se forman para reducir la lipotoxicidad (290,291). Sin embargo, la capacidad de formación de LDs puede llegar a ser diferente según el tipo de ácido graso; así, los ácidos grasos insaturados como el ácido oleico promueven una alta formación de LDs mientras que ácidos grasos saturados dan lugar a un bajo acúmulo de gotas lipídicas (290,292). Por otra parte, el AA, un ácido graso poliinsaturado (PUFA) de la familia n-6 se ha visto implicado en la formación de gotas lipídicas en estudios previos del laboratorio y en otros laboratorios en distintos tipos celulares (201,293–295). En el laboratorio se ha demostrado que el AA y no sus derivados oxigenados induce la formación de un fenotipo espumoso en los monocitos humanos circulantes (146,201,295). En el presente trabajo se ampliaron los estudios sobre la capacidad inductora de dicho ácido graso en la formación de gotas lipídicas en las células dendríticas, demostrándose que el AA libre incorporado exógenamente, así como el ácido oleico, dan lugar a la formación de gotas lipídicas de forma rápida y potente (**Figura 47**).

La incubación con AA de células dendríticas tanto de origen humano como de origen murino dio lugar al incremento de los niveles de ácidos grasos en lípidos neutros. Estos aumentos se pueden dar vía dos rutas: mediante incorporación del AA exógeno a

los TAG o por la movilización de otros ácidos grasos endógenos hacia TAG y CE. Para poder discernir entre ambos mecanismos se puede utilizar la triacsina C, un inhibidor de las ACSL1, 3, 4, que elimina la primera ruta al inhibir la incorporación de AA. Datos preliminares del laboratorio sugieren que el uso de triacsina C, un inhibidor de la acil sintetasa de ácidos grasos de cadena larga (ACSL) (296), previamente a la incubación con AA en moDCs no inhibe la formación de LDs en su interior. Por tanto, en las células dendríticas, dichas LDs se están formando por el segundo mecanismo.

En ausencia de una fuente lipídica exógena y en respuesta a distintos estímulos, las células pueden sintetizar TAG y CE relocalizando ácidos grasos desde otras especies lipídicas, esencialmente fosfolípidos. Las fosfolipasas pueden liberar de las membranas ácidos grasos que tras activarse con CoA y, gracias a la acción de enzimas como DGAT y ACAT, se pueden incorporar a otras especies lipídicas como DAG y colesterol acumulándose en el núcleo de las LDs. Sin embargo, la medida de ácidos grasos en PL mediante espectrometría de masas no reveló ningún descenso significativo en los niveles de ácidos grasos, por lo que este mecanismo puede descartarse. Por tanto, los incrementos de los niveles de TAG y CE en la formación de LDs podrían ser debidos a la síntesis *de novo* de ácidos grasos (**Figura 47**).

La síntesis *de novo* es un proceso de reacciones sucesivas altamente reguladas que se produce en el citoplasma de las células por acción de las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC) y sintetasa de ácidos grasos (FAS). La ACC cataliza la primera etapa a partir de acetil-CoA para dar lugar a malonil-CoA que servirá como sustrato para que, junto con acetil-CoA, la FAS, a través de sus siete sitios activos, catalice las reacciones consecutivas en presencia de NADPH que conducen a la síntesis completa de palmitato. Una vez sintetizado el ácido palmítico se puede producir su elongación o desaturación a través de la acción de varias enzimas en el ER. La elongasa de ácidos grasos de cadena larga 6 (ELOVL6) es la encargada de producir la elongación del ácido palmítico a ácido esteárico (297,298). En cuanto a las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SERBPs) se pueden encontrar dos proteínas SERBP1 y SERBP2. SREBP1 posee dos isoformas, SERBP1c y SERBP1a siendo la primera la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos y la responsable de la regulación a nivel transcripcional de ACC α ,

FAS y ELOVL6. Por otra parte, SERBP2 controla la expresión de proteínas implicadas en la síntesis de colesterol.

Se estudiaron los niveles de expresión de mRNA de los genes de las proteínas implicadas en la síntesis de ácidos grasos observándose aumentos solo para FASN y SERBP2 y disminución de SERBP1c con el tratamiento con AA. Esta descrito que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) dificultan la activación de SERBP1 y tienen poco o ningún efecto sobre el procesamiento de SERBP2 (299). El mecanismo molecular por el cual los PUFA suprimen la escisión in vivo de SREBP1c, pero no SREBP2, todavía no se entiende completamente. Esta inhibición dependiente de PUFA de SREBP1c ocurre en múltiples niveles: disminución de la transcripción, descomposición acelerada del mRNA, supresión de la escisión proteolítica y degradación proteasomal de núcleo SREBP1c (300). Estos datos concuerdan con lo observado en este trabajo donde se determina que al estimular con AA disminuyen los niveles de SERBP1c pero no de SERBP2 que aumentan ligeramente, lo cual sería concordante con los incrementos en los niveles de CE observados en moDCs. La disminución de SERBP1c conlleva que el resto de las enzimas reguladas por dicha proteína como ACC y ELOVL6 no tengan cambios en la expresión de sus niveles de mRNA.

Sin embargo, en este trabajo sí se ven aumentos del gen que codifica para FAS (*FASN*). Otros factores de transcripción también pueden regular la expresión de FAS (301). En las células inmunitarias, los principales reguladores de la vía FAS son las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP) y los receptores X del hígado (LXR) (302–304). Rehman et al demostraron que FAS participa en la diferenciación y el desarrollo de DC y está estrechamente asociada con el fenotipo y la morfología inmune de las DCs (305). La inhibición de la vía FAS tiene diferentes efectos sobre la expresión de los TLR que reconocen patrones específicos en los microorganismos, como la supresión de TLR2 y TLR4 o el aumento de TLR7 y TLR9 (305). En las DCs derivadas de tumores, los lípidos oxidados se acumulan en su interior y el nivel de estrés del ER aumenta a través de la enzima 1 α que requiere inositol (IRE1 α), lo que resulta en una activación constante de la proteína 1 de unión a la caja X (XBP1) y atenúa aún más la función de las DCs mediante la promoción de FAS y el

almacenamiento de lípidos en dichas células (306,307). Este último dato encajaría con lo demostrado en este trabajo.

La mayoría de los estudios que dilucidan los efectos de los PUFA sobre la respuesta inmunitaria adaptativa están centrados en la función de los linfocitos y la producción de citoquinas (308,309). Mientras que los mecanismos de los efectos de los PUFA en las células T han sido estudiados minuciosamente (310), poco se sabe de los efectos de los PUFA en las células presentadoras de antígenos (APC) y de las células dendríticas en particular. En los últimos años se ha analizado el papel de distintos ácidos grasos poliinsaturados sobre las funciones de las células dendríticas obteniéndose resultados muy variados (311–314). En este estudio se ha observado que el AA tiene efectos en la función de las células dendríticas, lo que puede implicar un cambio en la respuesta inmune.

Las células dendríticas, cuando todavía son inmaduras, buscan constantemente patógenos en el medio que las rodea para después fagocitarlos y degradar las proteínas en pequeños fragmentos. Durante este proceso se produce la maduración de la célula dendrítica, que adopta la función de presentación de antígeno y disminuye su capacidad fagocítica (315). En este estudio se ha observado la disminución de la capacidad de fagocitosis por parte de las moDCs tras el tratamiento con AA (**Figura 47**). Paradójicamente, está aceptado que, en macrófagos y monocitos, el AA aumenta la fagocitosis (316,317). Sin embargo, el efecto del AA y otros ácidos grasos poliinsaturados es diferente en otros tipos celulares. En células dendríticas se observa que una dieta rica en PUFAs de la familia n-3 da lugar a una disminución del 12% de la fagocitosis en comparación con la dieta control (311). En otro estudio, el AA también disminuye la expresión en superficie del receptor de manosa, involucrado en procesos de fagocitosis (312). Por otro lado, Wyss-Coray et al. han demostrado que la acumulación lipídica en forma de gotas lipídicas en microglía da lugar a un defecto en la fagocitosis y un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias (318).

Por lo tanto, las DC captan patógenos en los tejidos periféricos, se someten a programas de maduración particulares de forma selectiva en respuesta a diferentes patógenos, migran a los órganos linfoides y presentan antígenos a los linfocitos T para iniciar respuestas inmunitarias específicas de antígeno. Para que esta presentación

antigénica se produzca de manera efectiva, las DCs tienen que mandar tres señales a las células T. Una de esas señales es el torrente de citoquinas que, dependiendo del patrón producido por la DC determinará el tipo de respuesta que se efectuará y la intensidad de ésta (319,320). En este trabajo se ha demostrado que la incubación con AA aumenta la expresión de mRNA de citoquinas proinflamatorias como *IL-6*, *IL-12B*, *IL1B* y del gen que codifica para prostaglandina-endoperoxidasa sintasa 2, COX-2 (*PTGS2*) (**Figura 47**). La citoquina *IL-12* está asociada a la polarización de la célula T CD4⁺ hacia una respuesta Th1 (321) lo cual sugiere el AA podría estar modulando la respuesta hacia un estado Th1 de las células T. Por otro lado, la COX-2, cuyo producto principal a partir del AA es la prostaglandina E₂ (PGE₂), se ha asociado a distintos efectos dependiendo del estado de diferenciación y maduración de la célula dendrítica. Está bien reconocido que PGE₂ disminuye la diferenciación de la DC (322,323) pero tiene un efecto mucho más complejo en la activación de DC completamente desarrolladas (aunque funcionalmente inmaduras). Las células dendríticas maduras en presencia de PGE₂ desarrollan un fenotipo “agotado” que se caracteriza por una disminución en la capacidad de activación de células T citotóxicas CD8⁺ (269,270).

Como ya se ha mencionado, la célula dendrítica activa a las células T a través de tres señales. La principal de ellas es la presentación del antígeno por parte de la DC a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o de clase II a la célula T. La segunda señal es la activación de la célula T por parte de las moléculas de coestimulación CD80, CD40 y CD86 de la célula dendrítica que se une al CD28 y CD154 de la célula T (320). La tercera señal es la producción de citoquinas por parte de la célula dendrítica, que se ha discutido con anterioridad. En este trabajo se ha demostrado que tras la estimulación con LPS se observa el aumento de las moléculas coestimuladoras como CD80, CD40 y la molécula del complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC I), lo que significa la maduración de la célula dendrítica. Cuando las células se preincubaban con AA antes de la maduración, los niveles de expresión de dichos marcadores de maduración no se ven afectados, pero sí se observa una disminución a niveles de control de la expresión de MHC I (**Figura 47**). Estos datos concuerdan con los ya observados por otros trabajos donde las células dendríticas CD11c⁺ extraídas de bazo de ratón incubadas con concentraciones altas de AA y DHA tienen una sobrerregulación de marcadores de

activación como CD40 y CD86 pero una reducción de la proliferación de células T CD4⁺ (313). También, resultados *in vivo* concuerdan con los datos aquí presentados, ya que ratones C57BL/6 con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3 durante 3 semanas muestran una expresión reducida de CD80, así como la proliferación de células T CD4⁺ (311). Stulnig et al. observaron que la diferenciación de las moDCs a partir de monocitos en presencia de ácidos grasos poliinsaturados tanto de la familia n-6 (AA) como n-3 (EPA) afectaba a la diferenciación e inhibía su activación por LPS, lo que daba lugar a una disminución de expresión de las moléculas de superficie y de la secreción de citoquinas. Además, la potencia para activar a células T también estaba marcadamente inhibida en dichas células tratadas con los PUFAs (312). Sin embargo, en otro estudio se muestra que la diferenciación de las células dendríticas en presencia de altas concentraciones de AA mejora su funcionalidad así como su migración, estimulación de células T (314). Como se observa, todavía queda mucho camino para elucidar los mecanismos de acción de los PUFAs en estas células del sistema inmune.

Se ha demostrado que la disminución de los niveles de expresión de MHC I en superficie por parte del AA se debe a un fallo en la translocación de MHC I a la superficie celular (**Figura 47**). Gabrilovich et al. observaron que las células dendríticas asociadas a tumores acumulan en sus gotas lipídicas TAG truncados dañados por oxidación que “atrapan” a la proteína de choque térmico 70 (HSP70) en la superficie de las LDs (194,195). Esto altera la presentación del antígeno al reducir el tráfico de complejos péptido-MHC clase I (pMHC) hacia la superficie celular. Curiosamente, los representantes de la familia de chaperonas HSP70 se encuentran constantemente en los proteomas de gotas de lípidos (324) y algunos tienen funciones importantes en el metabolismo de las gotas de lípidos. Por ejemplo, la proteína afín al choque térmico de 70 kDa (Hsc70) es una chaperona molecular involucrada en muchos procesos celulares (325), como la regulación de la autofagia mediada por chaperonas (CMA) (326). La CMA regula tanto la lipólisis como la lipofagia mediante la eliminación de la proteína perilipina 2 (PLIN2) de la superficie de las gotas lipídicas (327). Curiosamente, el secuestro de otra chaperona, la proteína de unión a Ca²⁺ calreticulina, en las LDs también afecta la función inmunológica (196). La calreticulina sirve como señal fagocítica para la muerte celular inmunogénica y también participa en la presentación de antígeno (328). En las células

cancerosas tratadas con quimioterapia, la calreticulina es secuestrada en las LDs reduciendo la señal "cómeme" en la membrana plasmática, lo que conduce a la supresión de la eliminación de las células cancerosas muertas, probablemente debido a la alteración de la maduración de las células dendríticas y activación de células T (196). Las LDs también participan en el intercambio de proteínas con el núcleo, incluidas las histonas (329,330), la perilipina 5 (PLIN5) (163) y el factor de transcripción factor nuclear de las células T activadas 5 (NFAT5) (163), lo que afecta al ensamblaje de la cromatina, a la regulación de la expresión génica e incluso la defensa antibacteriana.

Todos estos estudios son ejemplos representativos de un mecanismo de retención de proteínas en la superficie de las gotas lipídicas que interrumpe su función. Sería interesante analizar si otras proteínas pueden ser reguladas por mecanismos similares en otros entornos fisiopatológicos.

La disminución de la expresión en la superficie celular de MHC-I conlleva una bajada de la proliferación de células T OT-I tras una presentación de antígeno cruzada por parte de las células dendríticas. En ningún estudio mencionado anteriormente se analizó si la incubación de las células con ácidos grasos exógenos daba lugar a la formación de gotas lipídicas. Las últimas décadas han sido testigos de una transformación en nuestra visión de las gotas lipídicas que se han convertido en orgánulos dinámicos de señalización que pueden coordinar las respuestas inmunitarias (98). En este trabajo se ha demostrado que la incubación con AA que provoca la formación de gotas lipídicas en las DC2.4 induce una disminución de la expresión de MHC I en superficie y una menor presentación cruzada ya que limita la proliferación de células T OT-I. Estos datos concuerdan con los obtenidos en otros trabajos donde se muestra una disminución de la presentación cruzada debido a la formación de gotas lipídicas con contenido oxidado en ambientes tumorigénicos (194,195). Sin embargo, por otro lado, también se ha demostrado que las gotas lipídicas incrementan la estimulación de células T citotóxicas (79,189,190).

Una explicación que podría arrojar luz a los resultados contradictorios que se han encontrado hasta el momento en el efecto de las gotas lipídicas sobre la presentación de antígeno cruzada puede depender del proceso de formación de la gota lipídica, así como de su composición. La composición de proteínas y lípidos de las LDs puede variar

entre diferentes tipos de células. En términos de lípidos, el núcleo de la mayoría de las gotas de lípidos está enriquecido con TAG y algunos ésteres de esteroides (105). Sin embargo, la función especializada de ciertos tipos de células se refleja en la composición lipídica de sus LDs. En células estrelladas hepáticas se ve el enriquecimiento de las gotas lipídicas con ésteres de retinol (331) y en monocitos espumosos con el ácido hipogeico (201) así como la acumulación de lípidos peroxidados en células gliales (332). Estas gotas lipídicas con composiciones diferentes pueden interactuar de distinta manera con las proteínas del citoplasma celular o con los distintos orgánulos dando lugar a una gran amplitud de respuestas distintas (333–335).

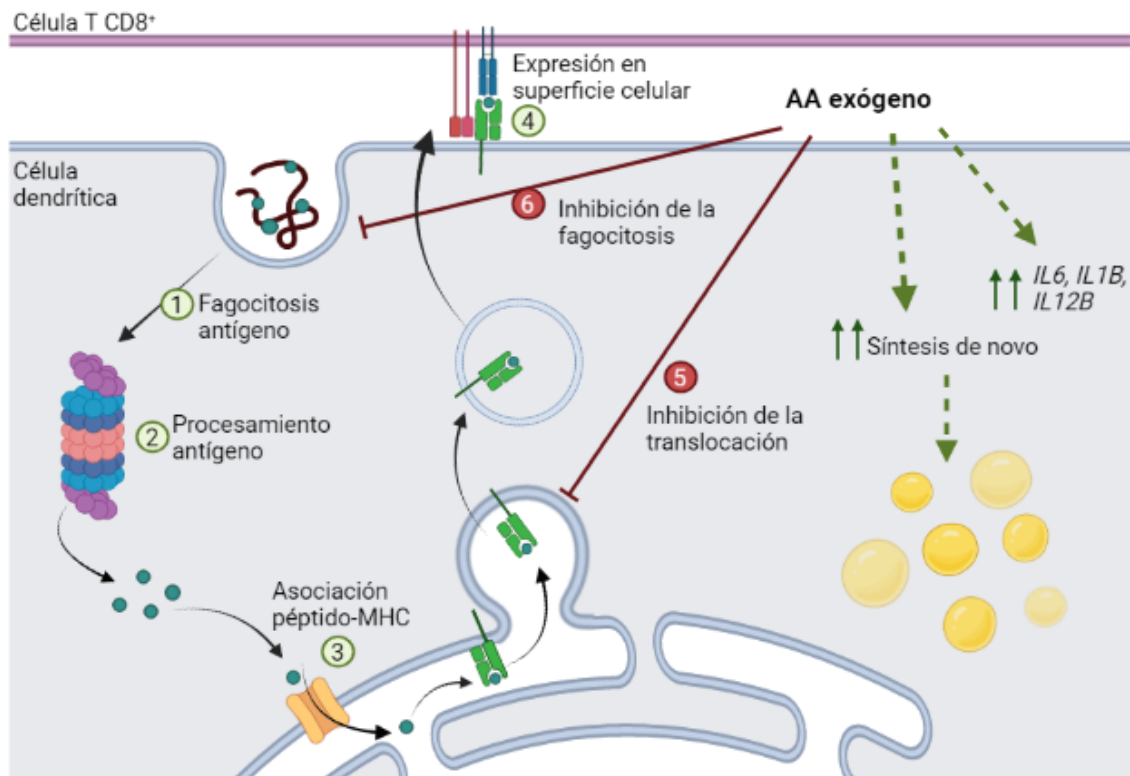


Figura 47. Presentación cruzada de antígeno en células dendríticas y el efecto del AA en sus funciones. La presentación cruzada de antígeno se inicia con la internalización del antígeno exógeno (1), tras su procesamiento en el citosol vía proteasoma (2) los péptidos se transfieren mediante TAP al ER donde se uniría al MHC-I (3). Una vez formado el complejo péptido-MCH, éste se transloca a la superficie celular (4) donde se presenta a la célula T CD8⁺. Ante el tratamiento de AA exógeno, aumenta la síntesis *de novo*, la formación de gotas lipídicas y la expresión de *IL6*, *IL1B*, *IL12B* y *PTGS2*. El AA tiene un efecto inhibitorio en la translocación de MHC-I a la superficie celular, así como el proceso de fagocitosis.

3. LOS ISÓMEROS DEL 16:1 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Los isómeros posicionales del ácido hexadecenoico se consideran ácidos grasos con propiedades antiinflamatorias. El isómero más estudiado, el ácido palmitoleico (16:1n-7), ha sido identificado como una hormona lipídica con importantes acciones beneficiosas en enfermedades metabólicas capaz de coordinar la comunicación entre el hígado y el tejido adiposo (336). En el presente laboratorio se ha estudiado el papel de otros dos isómeros del 16:1, el ácido hipogeico (16:1n-9) y el ácido sapiénico (16:1n-10). El ácido hipogeico también posee propiedades antiinflamatorias y se ha descrito como un posible biomarcador de monocitos y macrófagos espumosos durante la aterosclerosis. Por último, el ácido sapiénico, que inicialmente estaba asociado solo a sebo humano, pelos y uñas, también se ha identificado en células fagocíticas y en las membranas de eritrocitos (128,202). Dicho ácido graso también posee propiedades antiinflamatorias aunque se necesitan concentraciones mayores para que ejerza el mismo efectos que los otros isómeros (202). Todos estos resultados sugieren la presencia en las células fagocíticas de una variedad inesperada de isómeros 16:1, que se pueden distinguir en función de su actividad biológica y regulación celular. En el presente estudio se ampliaron las contribuciones realizadas anteriores en el laboratorio sobre los diferentes isómeros del ácido palmitoleico en células fagocíticas y su actividad biológica durante la activación celular.

Se ha demostrado que las células dendríticas derivadas de monocitos humanos poseen diferentes niveles totales de los isómeros del 16:1 en comparación con otras células fagocíticas como monocitos y macrófagos humanos. Mientras que en las células moDCs los ácidos grasos mayoritarios son el ácido sapiénico y el ácido palmitoleico, en monocitos y macrófagos son el ácido hipogeico y el ácido palmitoleico (202). Tanto el ácido palmitoleico como el ácido sapiénico se sintetizan a partir de la inserción de una insaturación en el ácido palmítico a través de la acción de $\Delta 9$ (SCD1) y $\Delta 6$ (FADS2) desaturasas respectivamente. El 16:1n-9 se produce por β -oxidación del ácido oleico (201). La regulación de los niveles celulares de 16:1n-10 difiere en varios aspectos de la de sus isómeros posicionales, 16:1n-7 y 16:1n-9. Los niveles de estos dos últimos ácidos

grasos pueden regularse durante las condiciones de activación inducida por estímulos de la biosíntesis de ácidos grasos de novo (146,201). Sin embargo, los niveles de 16:1n-10 parecen no depender del estado de activación de las células, sino más bien de mecanismos complejos que implican tanto las reacciones de competición de sustrato como el aumento de la expresión de FADS2. En este trabajo se ha estudiado la expresión de FADS2 mediante qPCR demostrando que las células dendríticas derivadas de monocitos humanos, que poseen un alto contenido de ácido sapiénico, también tienen una alta expresión de FADS2 en comparación con los monocitos y macrófagos humanos. Curiosamente, se ve una gran similitud entre el comportamiento de la expresión de FADS2 en las moDCs con otros tipos celulares como la línea celular macrofágica RAW264.7, la línea de ratón P388D₁ y la línea celular humana THP1 (202). Estas líneas celulares también poseen un alto contenido del isómero 16:1n-10 en comparación con células primarias humanas o macrófagos peritoneales de ratón.

Tradicionalmente se ha considerado que la desaturación en el carbono 6 está favorecida cuando el ácido graso ya contiene un doble enlace en la posición 9, como es el caso del ácido linoleico (337). En consecuencia, en las células, la desaturación del ácido linoleico a ácido γ -linolénico sería preferible a la desaturación del ácido palmítico a 16:1n-10, lo que explicaría por qué las células que contienen altos niveles endógenos ácido de linoleico producen pequeñas cantidades de 16:1n-10 y viceversa. De acuerdo con esta observación, se ha demostrado que la relación molar entre ácido palmítico (16:0) y ácido linoleico (18:2n-6) en las células dendríticas humanas es mayor que los monocitos y macrófagos humanos.

Estos resultados sugieren una disposición lipídica distinta de los isómeros de los 16:1 en las células fagocíticas dependiendo de su procedencia. El estudio de la proporción de los isómeros en la línea celular de ratón DC2.4 determinó que poseían un mayor contenido de ácido palmitoleico (70%) en comparación con las moDCs (49%) mientras que, para el ácido sapiénico, las moDCs tienen mayor contenido (43%) en comparación con las DC2.4 (19%). Este mayor contenido de 16:1n-7 en las DC2.4 se observa muy marcadamente en los lípidos neutros (TAG y CE). Estas fracciones son las que más difieren entre ambos tipos celulares siendo en moDC predominante el ácido sapiénico mientras que en DC2.4 es el ácido palmítico. Por otra parte, en cuanto a la

fracción total de PL se observa un mayor contenido de ácido sapiénico en las moDCs frente a las DC2.4 y en cuanto a las diferentes especies de PL, se aprecia una gran similitud en las especies de PE, PS y PI+PA, mientras que PC difiere ligeramente. En moDC tanto el ácido palmitoleico como el ácido sapiénico son los isómeros predominantes con un 37% y 41% respectivamente, mientras que en DC2.4 el isómero predominante es el ácido palmitoleico con un 72%.

Datos previos del laboratorio han sugerido que la formación de un éster del correspondiente ácido graso es necesario para su actividad biológica y que los diversos grupos de lípidos pueden funcionar como reservorios de ácidos grasos 16:1 con efecto antiinflamatorio. Por lo tanto, la localización inicial donde el ácido graso se esterifica después de incubarlo con las células puede determinar su actividad biológica posterior. Los datos de este trabajo muestran que, independientemente del isómero, la mayor parte de los ácidos grasos exógenos añadidos a las células dendríticas derivadas de monocitos humanos se incorporan en la fracción de glicerofosfolípidos. Sin embargo, para las DC2.4 se observa una tendencia del ácido sapiénico a incorporarse en glicerofosfolípidos en comparación con los otros dos isómeros. Dentro de las especies de lípidos neutros, se observa una menor incorporación de los tres isómeros en ambos tipos celulares.

Curiosamente, se ha determinado que en macrófagos peritoneales de ratón más del 90% del total de los isómeros del 16:1 se encuentran en la fracción de glicerofosfolípidos de colina (PC) y, más específicamente, en la especie PC(16:0/16:1). Además, los niveles de los tres isómeros disminuyen notablemente por acción de la fosfolipasa A₂ independiente de calcio de grupo VIA cuando los macrófagos se activan con estímulos inflamatorios. Este ácido graso liberado se acumularía en forma de ácido graso libre, pero, otra parte significativa también se transfiere a PI o se utiliza para formar ésteres de ácidos grasos con ácidos grasos hidroxilados (FAFHAs), conocidos por sus propiedades antidiabéticas y antiinflamatorias (203).

Cuando las células dendríticas y los monocitos humanos son activados con un estímulo proinflamatorio como es el LPS, no se observan cambios en la proporción de los isómeros para ninguna de las dos especies celulares. Sin embargo, esto no quiere decir que no pueda haber remodelaciones internas entre distintas especies de lípidos.

Una característica llamativa de este trabajo es que los isómeros poseen actividades biológicas contradictorias en los distintos tipos celulares estudiados. Se puede apreciar que para las células moDCs, el ácido sapiénico posee un efecto proinflamatorio al ser capaz de aumentar la expresión de *IL6*, *CCL2* y *PTGS2* de manera significativa mientras que de los otros dos isómeros, sólo el ácido hipogeico es capaz de aumentar la expresión de *PTGS2*. El ácido palmitoleico no posee ningún efecto. Por el contrario, en la línea celular DC2.4 se observa el ya conocido efecto antiinflamatorio de los tres isómeros del 16:1 ya que muestran efectos inhibitorios sobre el nivel de expresión de una serie de genes inflamatorios.

Estos efectos contradictorios de los isómeros del 16:1 se pueden deber a la diferente disponibilidad de dichos ácidos grasos tras la activación celular. El ácido sapiénico puede dar lugar a la síntesis de novo de ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-10 como es el ácido sebaleico (ácido cis-5,8-octadecadienoico) tanto en neutrófilos humanos como en la línea celular Caco-2 (200,338). En neutrófilos humanos se ha observado que la 5-lipoxigenasa convierte dicho ácido graso en 5-HODE (ácido 5-hidroxi-(6E,8Z)-octadecadienoico) que puede metabolizarse aún más a 5-oxo-ODE (ácido 5-oxo-(6E,8Z)-octadecadienoico), que posee un gran efecto quimioatrayente, pudiendo estar implicado en la infiltración de neutrófilos en enfermedades inflamatorias de la piel (338). Por otro lado, los estudios realizados en Caco-2 donde se comparaban los efectos entre la suplementación del ácido sapiénico y el ácido palmitoleico y sus productos de elongación, evidenciaron diferentes comportamientos en cuanto a morfología celular, viabilidad, marcadores de apoptosis, activación de la fosfolipasa citosólica A₂ (cPLA₂) y fluidez celular para dichos isómeros. El ácido sapiénico, y probablemente sus derivados poliinsaturados (ácido sebaleico y el ácido cis-8-octadecadienoico), dieron lugar a un efecto menos tóxico y aumentan las regiones fluidas de la membrana, sin embargo ambos isómeros aumentan la activación de cPLA₂ en igual medida (200).

Por otro lado, se conoce que la distribución asimétrica de los ácidos grasos en las diferentes clases de lípidos puede afectar a su metabolismo. Por ejemplo, la distribución asimétrica de AA es clave para la regulación de eicosanoides ya que, dependiendo del origen fosfolipídico del AA se pueden producir ciertos eicosanoides con preferencia

sobre otros. La producción de metabolitos a través de la lipoxigenasa en neutrófilos y macrófagos peritoneales de ratón parece estar asociada con la movilización de AA desde PC pero no desde PE ni PI (259,339). Algo similar podría estar ocurriendo en el caso de los isómeros del 16:1, donde se ha visto que, para la especie de PC, los isómeros difieren mucho en su proporción entre ambos tipos celulares.

Estos datos proporcionan información sobre cómo la diferencia en la posición del doble enlace de dos átomos de carbono, tal como ocurre en los isómeros de ácidos grasos posicionales, así como su distribución en las diferentes clases de lípidos podría inducir diferencias de propiedades biológicas y biofísicas.

Por último, se observó un efecto preventivo por parte de los tres isómeros del 16:1 en la formación de gotas lipídicas por parte del AA en las células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Respecto al primer objetivo planteado, el estudio de la formación de gotas lipídicas en células dendríticas por acción del ácido araquidónico y sus posibles efectos en las funciones de dichas células, los resultados obtenidos han dado lugar a las siguientes conclusiones:

- El ácido araquidónico (20:4n-6) da lugar a la formación de gotas lipídicas en ambos tipos de células dendríticas.
- La estimulación de las células dendríticas con ácido araquidónico da lugar a una disminución en la capacidad fagocítica de las células y un aumento en la producción de citoquinas.
- La incorporación de ácido araquidónico a las células da lugar a una disminución de la expresión en la superficie celular de MHC-I debido a una inhibición de su translocación.
- La preincubación con AA de las células dendríticas da lugar a una menor proliferación de células T OT-I debido a una disminución de la presentación cruzada de antígenos.

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

- La célula dendrítica derivada de monocito humano posee mayores proporciones de 16:1n-10 que sus homólogos primarios los monocitos y macrófagos humanos, debido a una mayor expresión de los niveles de FADS2 en las moDCs
- La distribución de los isómeros difiere en las fracciones de lípidos neutros y en PC entre las moDCs y DC2.4, siendo mayoritario el ácido sapiénico en moDC y el ácido palmitoleico en DC2.4.

- Los isómeros del 16:1 poseen efectos antiinflamatorios en las DC2.4 mientras que el 16:1n-10 posee carácter proinflamatorio en las moDCs.
- La preincubación de las células dendríticas con los isómeros previamente a la estimulación con ácido araquidónico tiene un efecto preventivo en la formación de gotas lipídicas.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Day M, Schultz R. An Overview of the immune system. *Vet Immunol.* 2001; 357: 1777–89.
2. Peter D J, Roitt IM. Advances in immunology: first of two parts. *N Engl J Med.* 2000; 343: 37–49.
3. Peter D J, Roitt IM. Advances in immunology: second of two parts. *N Engl J Med.* 2000; 343: 108–17.
4. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007; 449: 819–26.
5. Sellge G, Kufer TA. PRR-signaling pathways: learning from microbial tactics. *Semin Immunol.* 2015; 27: 75–84.
6. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 11–22.
7. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973; 137: 1142–62.
8. Macri C, Pang ES, Patton T, O’Keeffe M. Dendritic cell subsets. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 84: 11–21.
9. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018; 154: 3–20.
10. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity.* 2014; 40: 642–56.
11. Gurka S, Hartung E, Becker M, Kroczeck RA. Mouse conventional dendritic cells can be universally classified based on the mutually exclusive expression of XCR1 and SIRP α . *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015; 6: 1–6.
12. Worah K, Mathan TSM, Phong Vu Manh T, Keerthikumar S, Schreibelt G, Tel J, et al. Proteomics of human dendritic cell subsets reveals subset-specific surface markers and differential inflammasome function. *Cell Rep.* 2016; 16: 2953–66.
13. Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells: development, regulation, and function. *Immunity.* 2019; 50: 37–50.
14. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, Barrat FJ, Zal T, Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med.* 2009; 206: 1983–94.
15. Scott JL, Wirth JR, EuDaly JG, Gilkeson GS, Cunningham MA. Plasmacytoid dendritic cell distribution and maturation are altered in lupus prone mice prior to the onset of clinical disease. *Clin Immunol.* 2017; 175: 109–14.
16. Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol.* 2002; 3: 1135–41.
17. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: Langerin-

- expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev.* 2010; 234: 120–41.
18. Kashem SW, Haniffa M, Kaplan DH. Antigen-presenting cells in the skin. *Annu Rev Immunol.* 2017; 35: 469–99.
 19. Gerner MY, Kastenmuller W, Ifrim I, Kabat J, Germain RN. Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes. *Immunity.* 2012; 37: 364–76.
 20. Ebner S, Nguyen VA, Forstner M, Wang YH, Wolfram D, Liu YJ, Romani N. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119: 982–90.
 21. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 2013; 34: 440–5.
 22. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Electron Microsc (Tokyo).* 1994; 179: 1109–18.
 23. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V, Amigorena S. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 2008; 38: 336–48.
 24. Hohl TM, Rivera A, Lipuma L, Gallegos A, Shi C, Mack M, Pamer EG. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe.* 2009; 6: 470–81.
 25. Iijima N, Mattei LM, Iwasaki A. Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 108: 284–9.
 26. Leo B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against leishmania. *Immunity.* 2007; 26: 519–31.
 27. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MAM, Kool M, Muskens F, Lambrecht BN. Inflammatory dendritic cells — not basophils — are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med.* 2010; 207: 2097–111.
 28. Segura E, Albiston AL, Wicks IP, Chai SY, Villadangos JA. Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 20377–81.
 29. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, Luche H, Ardouin L, Grégoire C, Malissen B, Guilliams M. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol.* 2012; 188: 1751–60.
 30. Aldridge JR, Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C, Franks J, Brown SA,

- Doherty PC, Webster RG, Thomas PG. TNF / iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 5306–11.
31. Ballesteros-Tato A, León B, Lund FE, Randall TD. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8+ T cell responses to influenza. *Nat Immunol*. 2010; 11: 216–25.
 32. Zaba LC, Fuentes-duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, Gonzalez J, Krueger JG, Lowes MA. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2009; 129: 79–88.
 33. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol*. 1996; 106: 446–53.
 34. Bobryshev V, Lord RSA. Ultrastructural morphology recognition of cells with dendritic cell in human aortic contacting actions of vascular dendritic cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol*. 1995; 58: 307–22.
 35. Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, Falkensammer G, Xu Q. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *Atherosclerosis*. 1997; 11: 1199–207.
 36. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 823–36.
 37. Vyas JM, Veen AG Van Der, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 607–18.
 38. Kurts C, Robinson BWS, Knolle PA. Cross-priming in health and disease. *Nat Publ Gr*. 2010; 10: 403–14.
 39. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 557–69.
 40. Cresswell JSBPAWP. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 443–73.
 41. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994; 78: 761–71.
 42. Wei J, Zanker D, Carluccio AR Di, Smelkinson MG, Takeda K, Seedhom MO, et al. Varied role of ubiquitylation in generating MHC class I peptide ligands. *J Immunol*. 2017; 198: 3835–45.
 43. Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/B2-microglobulin

- complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. 1994; 368: 864–7.
44. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg OJA, Grandea AG, et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* (80-). 1997; 277: 1306–9.
 45. Saric T, Chang S, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL. An IFN- γ – induced aminopeptidase in the ER , ERAP1 , trims precursors to MHC class I – presented peptides. *Nature*. 2002; 3: 1169–76.
 46. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Val M Del, Lopez D, Lepelletier Y, et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol*. 2005; 6: 689–97.
 47. Koopmann J, Albring J, Hu E, Bulbuc N, Spee P, Neefjes J, Hammerling GJ, Momburg F. Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*. 2000; 13: 117–27.
 48. Hughes EA, Hammond C, Cresswell P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 1896–901.
 49. Caramelo JJ, Castro OA, Prat-gay G De, Parodi AJ. The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *J Biol Chem*. 2004; 279: 46280–5.
 50. Ritter C, Quirin K, Kowarik M, Helenius A. Minor folding defects trigger local modification of glycoproteins by the ER folding sensor GT. *EMBO J*. 2005; 24: 1730–8.
 51. Warmerdam PAM, Long EO, Roche PA. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J Cell Biol*. 1996; 133: 281–91.
 52. McCormick PJ, Martina JA, Bonifacino JS. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen- processing compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 7910–5.
 53. Mellins ED, Stem LJ. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. *Curr Opin Immunol*. 2014; 0: 115–22.
 54. Cheong C, Matos I, Choi J, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/ CD209+ dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 2011; 143: 416–29.
 55. Kovacsovic-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* (80-). 1995; 267: 243–6.
 56. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC Class I crosspresentation in vivo. *Immunity*.

- 2004; 21: 155–65.
57. Palmowski MJ, Gileadi U, Salio M, Gallimore A, Millrain M, James E, et al. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J Immunol.* 2006; 177: 983–90.
 58. Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature.* 1999; 398: 77–80.
 59. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, van Endert P, Amigorena S. ER – phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 2003; 425: 397–402.
 60. Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampé R, Kurts C. Spatial and mechanistic separation of cross- presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol.* 2008; 9: 558–66.
 61. Firat E, Saveanu L, Aichele P, Staeheli P, Huai J, Gaedicke S, et al. The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol.* 2007; 178: 2241–8.
 62. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, et al. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science (80-).* 2009; 325: 213–7.
 63. Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science (80-).* 2005; 307: 1630–4.
 64. Accapezzato D, Visco V, Francavilla V, Molette C, Donato T, Paroli M, Mondelli MU, Doria M, Torrisi MR, Barnaba V. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J Exp Med.* 2005; 202: 817–28.
 65. Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science (80-).* 2007; 316: 612–6.
 66. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Duménil A-M, Seabra MC, Raposo G, Amigorena S. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell.* 2006; 126: 205–18.
 67. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Pérez L, Geffner J, Hermine O, Rosenzweig SD, Faure F, Amigorena S. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood.* 2008; 112: 4712–23.
 68. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol.* 1999; 1: 362–8.
 69. Lin ML, Zhan Y, Proietto AI, Prato S, Wu L, Heath WR, Villadangos JA, Lew AM. Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A. 2008; 105: 3029–34.
70. Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, Jouve M, Bobard A, Moita C, Enninga J, Moita LF, Amigorena S, Savina A. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2011; 147: 1355–68.
 71. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity*. 2006; 25: 607–17.
 72. Zehner M, Marschall AL, Bos E, Schloetel J, Kreer C, Fehrenschild D, et al. The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8 + T cells. *Immunity*. 2015; 42: 850–63.
 73. Wang X, Venable J, Lapointe P, Hutt DM, Koulov A V, Coppinger J, et al. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*. 2006; 127: 803–15.
 74. Giodini A, Cresswell P. Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *EMBO J*. 2008; 27: 201–11.
 75. Singh R, Cresswell P. Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science* (80-). 2010; 328: 1394–8.
 76. Dingjan I, Verboogen DRJ, Paardekooper LM, Revelo NH, Sittig SP, Visser LJ, et al. Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Nat Publ Gr*. 2016; 6: 1–12.
 77. Dingjan I, Paardekooper LM, Verboogen DRJ, Fischer von Mollard G, ter Beest M, Bogaart G Van Den. VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release. *Eur J Cell Biol*. 2017; 1–11.
 78. Ploegh HL. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature*. 2007; 448: 435–8.
 79. Bougneres L, Helft J, Tiwari S, Vargas P, Hung-junn B, Chan L, et al. A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity*. 2009; 31: 232–44.
 80. Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes- E, Delgado JC, et al. Mice completely lacking immunoproteasomes display major alterations in antigen presentation. *Nat Immunol*. 2012; 13: 129–35.
 81. Fonteneau JF, Kavanagh DG, Lirvall M, Sanders C, Cover TL, Bhardwaj N, Larsson M. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood*. 2003; 102: 4448–55.
 82. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Antigen processing and presentation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019; 348: 69–121.
 83. Wilson NS, Behrens GMN, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, et al. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol*. 2006; 7: 165–72.

84. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Tiemi Shio M, Jin Hong W, Olivier M, Gagnon É, Desjardins M, Descoteaux A. Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe*. 2013; 14: 15–25.
85. Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR, Carbone FR. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*. 2006; 25: 153–62.
86. Kyaw T, Winship A, Tay C, Kanellakis P, Hosseini H, Cao A, Li P, Tipping P, Bobik A, Toh B. Cytotoxic and proinflammatory CD8⁺ T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 2013; 127: 1028–39.
87. Legein B, Janssen EM, Theelen TL, Gijbels MJ, Walraven J, Klarquist JS, et al. Ablation of CD8^α + dendritic cell mediated cross-presentation does not impact atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Sci Rep*. 2015; 5: 1–14.
88. Fyfe A, Qiao J, Lusis AJ. Immune-deficient mice develop typical atherosclerotic fatty streaks when fed an atherogenic diet. *J Clin Invest*. 1994; 94: 2516–20.
89. Gewaltig J, Kummer M, Koella C, Cathomas G, Biedermann BC. Requirements for CD8 T-cell migration into the human arterial wall. *Hum Pathol*. 2008; 39: 1756–62.
90. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H, et al. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity*. 2013; 38: 729–41.
91. Broz M, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson A, Pollock J, Erle D, et al. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen presenting cells, critical for T cell immunity. *Cancer Cell*. 2015; 26: 638–52.
92. Alloatti A, Rookhuizen DC, Joannas L, Carpier JM, Iborra S, Magalhaes JG, et al. Critical role for Sec22b-dependent antigen cross- presentation in antitumor immunity. *J Exp Med*. 2017; 214: 2231–41.
93. Sánchez-paulete AR, Cueto FJ, Martínez-lópez M, Labiano S, Morales-Kastresana A, Rodríguez-Ruiz ME, et al. Cancer immunotherapy with immunomodulatory anti-CD137 and anti-PD-1 monoclonal antibodies requires Batf3-dependent dendritic cells. *Cancer Discov*. 2016; 6: 71–9.
94. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Kohyama M, Calderon B, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8^α+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* (80-). 2008; 322: 1097–100.
95. Lorenzi S, Mattei F, Sistigu A, Spadaro F, Sanchez M, Belardelli F, et al. Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8^α+ dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming. *J Immunol*. 2011; 186: 5142–50.
96. Theisen DJ, Iv JTD, Briseño CG, Gargaro M, Lauron EJ, Wang Q, et al. WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science*

- (80-). 2018; 362: 694–9.
97. Farese R V., Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*. 2009; 139: 855–60.
 98. Boucher DM, Vijithakumar V, Ouimet M. Lipid droplets as regulators of metabolism and immunity. *Immunometabolism*. 2021; 3: 1–47.
 99. Welte MA. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol*. 2015; 25: R470–81.
 100. Beller M, Thiel K, Thul PJ, Jäckle H. Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett*. 2010; 584: 2176–82.
 101. Konige, Manige; Wang, Hong; Sztalryd C. Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842: 393–401.
 102. Kraemer N, Farese R V., Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med*. 2013; 5: 973–83.
 103. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 2001; 40: 325–438.
 104. Jarc E, Petan T. A twist of FATE: lipid droplets and inflammatory lipid mediators. *Biochimie*. 2020; 169: 69–87.
 105. Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RGW, Liu P, Chapman KD. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res*. 2007; 48: 837–47.
 106. Guo Y, Cordes KR, Farese R V., Walther TC. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci*. 2009; 122: 749–52.
 107. Blouin CM, Le Lay S, Eberl A, Köfeler HC, Guerrero IC, Klein C, et al. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: Alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J Lipid Res*. 2010; 51: 945–56.
 108. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem*. 2002; 277: 44507–12.
 109. Hodges BDM, Wu CC. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J Lipid Res*. 2010; 51: 262–73.
 110. Digel M, Eehalt R, Füllekrug J. Lipid droplets lighting up: Insights from live microscopy. *FEBS Lett*. 2010; 584: 2168–75.
 111. Kraemer N, Hilger M, Kory N, Wilfling F, Stoehr G, Mann M, Farese R V., Walther TC. Protein correlation profiles identify lipid droplet proteins with high confidence. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12: 1115–26.
 112. Yang L, Ding Y, Chen Y, Zhang S, Huo C, Wang Y, et al. The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res*. 2012; 53: 1245–53.

113. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791: 419–40.
114. Brasaemle DL. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*. 2007; 48: 2547–59.
115. Sun Z, Gong J, Wu H, Xu W, Wu L, Xu D, et al. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nat Commun*. 2013; 4: 1–14.
116. Mardani I, Tomas Dalen K, Drevinge C, Miljanovic A, Ståhlman M, Klevstig M, et al. Plin2-deficiency reduces lipophagy and results in increased lipid accumulation in the heart. *Sci Rep*. 2019; 9: 1–13.
117. MacPherson REK, Vandenboom R, Roy BD, Peters SJ. Skeletal muscle PLIN3 and PLIN5 are serine phosphorylated at rest and following lipolysis during adrenergic or contractile stimulation. *Physiol Rep*. 2013; 1: 1–12.
118. Covington JD, Noland RC, Hebert RC, Masinter BS, Smith SR, Rustan AC, Ravussin E, Bajpeyi S. Perilipin 3 differentially regulates skeletal muscle lipid oxidation in active, sedentary, and type 2 diabetic males. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100: 3683–92.
119. Sanchez PBM, Krizanac M, Weiskirchen R, Asimakopoulos A. Understanding the role of perilipin 5 in non-alcoholic fatty liver disease and its role in hepatocellular carcinoma: A review of novel insights. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 1–18.
120. Čopič A, Antoine-Bally S, Giménez-Andrés M, La Torre Garay C, Antonny B, Manni MM, Pagnotta S, Guihot J, Jackson CL. A giant amphipathic helix from a perilipin that is adapted for coating lipid droplets. *Nat Commun*. 2018; 9: 1–16.
121. Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL promotes autophagy/lipophagy via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism. *Cell Rep*. 2017; 19: 1–9.
122. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res*. 2011; 50: 14–27.
123. Shen WJ, Patel S, Miyoshi H, Greenberg AS, Kraemer FB. Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis. *J Lipid Res*. 2009; 50: 2306–13.
124. Kraemer N, Guo Y, Wilfling F, Hilger M, Lingrell S, Heger K, et al. Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab*. 2011; 14: 504–15.
125. Moessinger C, Kuerschner L, Spandl J, Shevchenko A, Thiele C. Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *J Biol Chem*. 2011; 286: 21330–9.
126. Poppelreuther M, Rudolph B, Du C, Großmann R, Becker M, Thiele C, Eehalt R,

- Füllekrug J. 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.* 2012; 53: 888–900.
127. Valdearcos M, Esquinas E, Meana C, Gil-de-Gómez L, Guijas C, Balsinde J, Balboa MA. Subcellular localization and role of Lipin-1 in human macrophages. *J Immunol.* 2011; 186: 6004–13.
 128. Melo RCN, Weller PF. Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils. *J Leukoc Biol.* 2014; 96: 703–12.
 129. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, Weller PF. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 1998; 152: 759–69.
 130. Wooten RE, Willingham MC, Daniel LW, Leslie CC, Rogers LAC, Sergeant S, O’Flaherty JT. Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2 α fluorescent proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2008; 1783: 1544–50.
 131. Buhman KF, Accad M, Farese R V. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2000; 1529: 142–54.
 132. Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.* 2004; 43: 134–76.
 133. Wilfling F, Wang H, Haas JT, Kraemer N, Gould TJ, Uchida A, et al. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev Cell.* 2013; 24: 384–99.
 134. Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan JC, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ, Mullen RT, Dyer JM. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell.* 2006; 18: 2294–313.
 135. Yen CLE, Monetti M, Burri BJ, Farese R V. The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters. *J Lipid Res.* 2005; 46: 1502–11.
 136. Li C, Li L, Lian J, Watts R, Nelson R, Goodwin B, Lehner R. Roles of Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases 1 and 2 in triacylglycerol synthesis and secretion in primary hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 1080–91.
 137. Akiba S, Yoneda Y, Ohno S, Nemoto M, Sato T. Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification. *J Lipid Res.* 2003; 44: 1676–85.
 138. Gubern A, Casas J, Barceló-Torns M, Barneda D, De La Rosa X, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E. Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem.* 2008; 283: 27369–82.
 139. Gubern A, Barceló-Torns M, Casas J, Barneda D, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E. Lipid droplet biogenesis induced by stress involves

- triacylglycerol synthesis that depends on Group VIA phospholipase A2. *J Biol Chem.* 2009; 284: 5697–708.
140. Ohsaki Y, Suzuki M, Fujimoto T. Open questions in lipid droplet biology. *Chem Biol.* 2014; 21: 86–96.
 141. Gorrissen H, Mackay AL, Wassall SR, Valic MI, Tulloch AP, Cushley RJ. Deuterium magnetic resonance of selectively deuterated cholesteryl esters in dipalmitoyl phosphatidylcholine dispersions. *BBA - Biomembr.* 1981; 644: 266–72.
 142. Gorrissen H, Tulloch AP, Cushley RJ. Deuterium magnetic resonance of triacylglycerols in phospholipid bilayers. *Chem Phys Lipids.* 1982; 31: 245–55.
 143. Gross DA, Zhan C, Silver DL. Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 19581–6.
 144. Bulankina A V., Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, Burger KNJ, Höning S. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol.* 2009; 185: 641–55.
 145. Pol A, Gross SP, Parton RG. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol.* 2014; 204: 635–46.
 146. Guijas C, Pérez-Chacón G, Astudillo AM, Rubio JM, Gil-de-Gómez L, Balboa MA, Balsinde J. 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.* 2012; 53: 2343–54.
 147. Hörl G, Wagner A, Cole LK, Malli R, Reicher H, Kotzbeck P, et al. Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo. *J Biol Chem.* 2011; 286: 17338–50.
 148. Walther TC, Chung J, Farese RVJ. Lipid droplet biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017; 33: 491–510.
 149. Ariotti N, Murphy S, Hamilton NA, Wu L, Green K, Schieber NL, Li P, Martin S, Parton RG. Postlipolytic insulin-dependent remodeling of micro lipid droplets in adipocytes. *Mol Biol Cell.* 2012; 23: 1826–37.
 150. Gong J, Sun Z, Wu L, Xu W, Schieber N, Xu D, Shui G, Yang H, Parton RG, Li P. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J Cell Biol.* 2011; 195: 953–63.
 151. Khandelia, Himanshu; Duelund, Lars; Pakkanen, Kirsi I.; Ipsen JH. Triglyceride blisters in lipid bilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes. *PLoS One.* 2010; 5: e12811.
 152. Hodges BDM, Wu CC. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J Lipid Res.* 2010; 51: 262–73.
 153. Soni KG, Mardones GA, Sougrat R, Smirnova E, Jackson CL, Bonifacino JS. Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci.* 2009; 122:

- 1834–41.
154. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bickel PE. S3-12, adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280: 19146–55.
 155. Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 2006; 580: 5484–91.
 156. Rinia HA, Burger KNJ, Bonn M, Müller M. Quantitative label-free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy. *Biophys J.* 2008; 95: 4908–14.
 157. Binns D, Januszewski T, Chen Y, Hill J, Markin VS, Zhao Y, Gilpin C, Chapman KD, Anderson RGW, Goodman JM. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol.* 2006; 173: 719–31.
 158. Liu P, Bartz R, Zehmer JK, Ying Y shu, Zhu M, Serrero G, Anderson RGW. Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007; 1773: 784–93.
 159. Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci.* 2005; 118: 2601–11.
 160. Cohen S. Lipid droplets as organelles. 1st ed. Vol. 337, *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier Inc.; 2018. 83–110 p.
 161. Ueno M, Shen WJ, Patel S, Greenberg AS, Azhar S, Kraemer FB. Fat-specific protein 27 modulates nuclear factor of activated T cells 5 and the cellular response to stress. *J Lipid Res.* 2013; 54: 734–43.
 162. Zhu Y, Ren C, Zhang M, Zhong Y. Perilipin 5 reduces oxidative damage associated with lipotoxicity by activating the PI3K/ERK-mediated Nrf2-ARE signaling pathway in INS-1 pancreatic β -Cells. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020; 11: 1–14.
 163. Gallardo-Montejano VI, Saxena G, Kusminski CM, Yang C, McAfee JL, Hahner L, Hoch K, Dubinsky W, Narkar VA, Bickel PE. Nuclear Perilipin 5 integrates lipid droplet lipolysis with PGC-1 α /SIRT1-dependent transcriptional regulation of mitochondrial function. *Nat Commun.* 2016; 7: 1–14.
 164. Wang H, Bell M, Sreenevasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, et al. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem.* 2011; 286: 15707–15.
 165. Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature.* 2017; 546: 162–7.
 166. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell.* 2015; 32: 678–92.

167. Cui L, Liu P. Two types of contact between lipid droplets and mitochondria. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 1–11.
168. Wanders RJA, Waterham HR, Ferdinandusse S. Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 3: 1–15.
169. Di Cara F, Andreoletti P, Tromprier D, Vejux A, Bülow MH, Sellin J, Lizard G, Cherkaoui-Malki M, Savary S. Peroxisomes in immune response and inflammation. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 1–29.
170. Chang CL, Weigel A V., Ioannou MS, Amalia Pasolli H, Shan Xu C, Peale DR, et al. Spastin tethers lipid droplets to peroxisomes and directs fatty acid trafficking through ESCRT-III. *J Cell Biol.* 2019; 218: 2583–99.
171. Li A, Song NJ, Riesenber BP, Li Z. The emerging roles of endoplasmic reticulum stress in balancing immunity and tolerance in health and diseases: mechanisms and opportunities. *Front Immunol.* 2020; 10: 1–15.
172. Hapala I, Marza E, Ferreira T. Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation. *Biol Cell.* 2011; 103: 271–85.
173. Vevea JD, Garcia EJ, Chan RB, Zhou B, Schultz M, Paolo D, Mccaffery JM, Pon LA. Role for lipid droplet biogenesis and microlipophagy in adaptation to lipid imbalance in yeast. *Dev Cell.* 2015; 35: 584–99.
174. Ouimet M. Autophagy in obesity and atherosclerosis: interrelationships between cholesterol homeostasis, lipoprotein metabolism and autophagy in macrophages and other systems. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2013; 1831: 1124–33.
175. Schulze RJ, Krueger EW, Weller SG, Johnson KM, Casey CA, Schott MB, McNiven MA. Direct lysosome-based autophagy of lipid droplets in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117: 32443–52.
176. Shpilka T, Welter E, Borovsky N, Amar N, Mari M, Reggiori F, Elazar Z. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 2015; 34: 2117–31.
177. Deretic V. Autophagosomes and lipid droplets: no longer just chewing the fat. *EMBO J.* 2015; 34: 2111–3.
178. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 162–76.
179. Guijas C, Rodríguez JP, Rubio JM, Balboa MA, Balsinde J. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2014; 1841: 1661–71.
180. Samuchiwal SK, Balestrieri B. Harmful and protective roles of group V phospholipase A2: current perspectives and future directions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2019; 1864: 819–26.
181. Kikawada E, Bonventre J V, Arm JP. Group V secretory PLA2 regulates TLR2-

- dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2 α activation. *Blood*. 2007; 110: 561–8.
182. Ruipérez V, Astudillo AM, Balboa MA, Balsinde J. Coordinate regulation of TLR-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A2S. *J Immunol*. 2009; 182: 3877–83.
 183. Schlager S, Goeritzer M, Jandl K, Frei R, Vujic N, Kolb D, et al. Adipose triglyceride lipase acts on neutrophil lipid droplets to regulate substrate availability for lipid mediator synthesis. *J Leukoc Biol*. 2015; 98: 837–50.
 184. Dichlberger A, Schlager S, Maaninka K, Schneider WJ, Kovanen PT. Adipose triglyceride lipase regulates eicosanoid production in activated human mast cells. *J Lipid Res*. 2014; 55: 2471–8.
 185. Kaliński P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol*. 1997; 159: 28–35.
 186. Sharma S, Stolina M, Yang SC, Baratelli F, Lin JF, Atianzar K, et al. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 961–8.
 187. Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P. Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2011; 118: 5498–505.
 188. Muthuswamy R, Mueller-berghaus J, Haberkorn U, Reinhart TA, Schadendorf D, Kalinski P. PGE2 transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*. 2010; 116: 1454–60.
 189. Ibrahim J, Nguyen AH, Rehman A, Ochi A, Jamal M, Graffeo CS, et al. Dendritic cell populations with different concentrations of lipid regulate tolerance and immunity in mouse and human liver. *Gastroenterology*. 2012; 143: 1061–72.
 190. Den Brok MH, Büll C, Wassink M, De Graaf AM, Wagenaars JA, Minderman M, et al. Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat Commun*. 2016; 7: 1–14.
 191. Blander JM. Regulation of the cell biology of antigen cross-presentation. *Annu Rev Immunol*. 2018; 36: 717–53.
 192. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Pérez L, Geffner J, Hermine O, Rosenzweig SD, Faure F, Amigorena S. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood*. 2008; 112: 4712–22.
 193. Gonzalez-Perilli L, Prolo C, Álvarez MN. Arachidonic acid and nitroarachidonic: effects on NADPH oxidase activity. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1127: 85–95.

194. Cao W, Ramakrishnan R, Tuyrin VA, Veglia F, Condamine T, Amoscato A, et al. Oxidized lipids block antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer. *J Immunol*. 2014; 192: 4935–4935.
195. Veglia F, Tyurin VA, Mohammadyani D, Blasi M, Duperret EK, Donthireddy L, et al. Lipid bodies containing oxidatively truncated lipids block antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer. *Nat Commun*. 2017; 8: 1–16.
196. Cotte AK, Aires V, Fredon M, Limagne E, Derangère V, Thibaudin M, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nat Commun*. 2018; 9: 1–16.
197. Li Z, Thiel K, Thul PJ, Beller M, Kühnlein RP, Welte MA. Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos. *Curr Biol*. 2012; 22: 2104–13.
198. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*. 2012; 4: 1989–2007.
199. Klawitter J, Bek S, Zakaria M, Zeng C, Hornberger A, Gilbert R, Shokati T, Klawitter J, Christians U, Boernsen KO. Fatty acid desaturation index in human plasma: comparison of different analytical methodologies for the evaluation of diet effects. *Anal Bioanal Chem*. 2014; 406: 6399–408.
200. Scanferlato R, Bortolotti M, Sansone A, Chatgialiloglu C, Polito L, de Spirito M, Maulucci G, Bolognesi A, Ferreri C. Hexadecenoic fatty acid positional isomers and de novo PUFA synthesis in colon cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 1–20.
201. Guijas C, Meana C, Astudillo AM, Balboa MA, Balsinde J. Foamy monocytes are enriched in cis-7-Hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease. *Cell Chem Biol*. 2016; 23: 689–99.
202. Astudillo AM, Meana C, Guijas C, Pereira L, Lebrero P, Balboa MA, Balsinde J. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J Lipid Res*. 2018; 59: 237–49.
203. Astudillo AM, Meana C, Bermúdez MA, Pérez-Encabo A, Balboa MA, Balsinde J. Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines*. 2020; 8: 1–21.
204. Ge L, Gordon JS, Hsuan C, Stenn K, Prouty SM. Identification of the Δ -6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity. *J Invest Dermatol*. 2003; 120: 707–14.
205. Destailats F, Guitard M, Cruz-hernandez C. Identification of Δ 6-monounsaturated fatty acids in human hair and nail samples by gas-chromatography – mass-spectrometry using ionic-liquid coated capillary column. *J Chromatogr A*. 2011; 1218: 9384–9.
206. Sansone A, Tolika E, Louka M, Sunda V, Deplano S, Melchiorre M, et al. Hexadecenoic fatty acid isomers in human blood lipids and their relevance for the interpretation of lipidomic profiles. *PLoS One*. 2016; 5: 1–14.

207. Hodson L, Karpe F. Is there something special about palmitoleate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013; 16: 225–31.
208. Park HG, Kothapalli KSD, Park WJ, DeAllie C, Liu L, Liang A, Lawrence P, Brenna JT. Palmitic acid (16:0) competes with omega-6 linoleic and omega-3 α -linolenic acids for FADS2 mediated 6-desaturation. *Physiol Behav*. 2017; 176: 139–48.
209. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Metab Clin Exp*. 2008; 134: 933–44.
210. Paillard F, Catheline D, Le Duff F, Bouriel M, Deugnier Y, Pouchard M, Daubert J, Legrand P. Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008; 18: 436–40.
211. Gong J, Campos H, Mcgarvey S, Wu Z, Goldberg R, Baylin A. Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am J Clin Nutr*. 2011; 93: 186–91.
212. Stefan N, Kantartzis K, Celebi N, Staiger H, Machann J, Schick F, et al. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*. 2010; 33: 405–7.
213. Vessby B, Ahrén B, Warensjo E, Lindgarde F. Plasma lipid fatty acid composition, desaturase activities and insulin sensitivity in Amerindian women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012; 22: 176–81.
214. Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, Hotamisligil GS. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92: 1350–8.
215. Fabiani E De. The true story of palmitoleic acid : Between myth and reality. *Eur J Lipid Sci Techonology*. 2011; 113: 809–11.
216. Dimopoulos N, Watson M, Sakamoto K, Hundal HS. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J*. 2006; 399: 473–81.
217. Talbot NA, Wheeler-jones CP, Cleasby ME. Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 393: 129–42.
218. Chan KL, Pillon NJ, Sivaloganathan DM, Costford SR, Liu Z, Th  ret M, Chazaud B, Klip A. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK) *. *J Biol Chem*. 2015; 290: 16979–88.
219. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β -cell turnover and function. *Diabetes*. 2003; 52: 726–33.
220. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, et al.

- Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med.* 2009; 15: 1383–92.
221. Zong G, Ye X, Sun L, Li H, Yu Z, Hu FB, Sun Q, Lin X. Associations of erythrocyte palmitoleic acid with adipokines, inflammatory markers, and the metabolic syndrome in middle-aged and older chinese. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96: 970–6.
222. Warensjö E, Risérus U, Vessby B. Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia.* 2005; 48: 1999–2005.
223. Okada T, Furuhashi N, Kuromori Y, Miyashita M, Iwata F, Harada K. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82: 747–50.
224. Perreault M, Roke K, Badawi A, Nielsen DE, Abdelmagid SA, El-Soheemy A, Ma DWL, Mutch DM. 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.* 2014; 49: 255–63.
225. Fabbrini E, Magkos F, Su X, Abumrad NA, Nejedly N, Coughlin CC, Okunade AL, Patterson BW, Klein S. Insulin sensitivity is not associated with palmitoleate availability in obese humans. *J Lipid Res.* 2011; 52: 808–12.
226. Sauma L, Stenkula KG, Kjølhede P, Strålfors P, Söderström M, Nystrom FH. PPAR- α response element activity in intact primary human adipocytes: effects of fatty acids. *Nutrition.* 2006; 22: 60–8.
227. Sansone A, Melchiorre M, Chatgialiloglu C, Ferreri C. Hexadecenoic fatty acid isomers: a chemical biology approach for human plasma biomarker development. *Chem Res Toxicol.* 2013; 26: 1703–9.
228. Souza CO, Teixeira AAS, Lima EA, Batatinha HAP, Gomes LM, Carvalho-silva M, Mota IT, Streck EL, Hirabara SM, Neto JCR. Palmitoleic Acid (N-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPAR α Mediators Inflamm. 2014; 2014: 1–12.
229. Fischer CL, Blanchette DR, Brogden KA, Dawson D V, Drake DR, Hill JR, Wertz PW. The roles of cutaneous lipids in host defense. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1841: 319–22.
230. Arsic B, Zhu Y, Heinrichs DE, MCGavin MJ. Induction of the staphylococcal proteolytic cascade by antimicrobial fatty acids in community acquired methicillin resistant staphylococcus aureus. *PLoS One.* 2012; 7: e45952.
231. Vriens K, Christen S, Parik S, Broekaert D, Yoshinaga K, Talebi A, et al. Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature.* 2019; 566: 403–6.
232. Küçüksayan E, Sansone A, Chatgialiloglu C, Ozben T, Tekeli D, Talibova G, Ferreri C. Sapienic acid metabolism influences membrane plasticity and protein signaling in breast cancer cell lines. *Cells.* 2022; 11: 1–16.

233. Ferreri C, Sansone A, Buratta S, Urbanelli L, Costanzi E, Emiliani C, Chatgililoglu C. The n-10 fatty acids family in the lipidome of human prostatic adenocarcinoma cell membranes and extracellular vesicles. *Cancers (Basel)*. 2020; 12: 1–16.
234. Wu JHY, Lemaitre RN, Imamura F, King IB, Song X, Spiegelman D, Siscovick DS, Mozaffarian D. Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease : the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr*. 2011; 94: 431–8.
235. Dai L, Gonçalves CMV, Lin Z, Huang J, Lu H, Yi L, Liang Y, Wang D, An D. Exploring metabolic syndrome serum free fatty acid profiles based on GC – SIM – MS combined with random forests and canonical correlation analysis. *Talanta*. 2015; 135: 108–14.
236. Lemaitre RN, King IB, Sotoodehnia N, Knopp RH, Mozaffarian D, Mcknight B, et al. Endogenous red blood cell membrane fatty acids and sudden cardiac arrest. *Metab Clin Exp*. 2010; 59: 1029–34.
237. Zong G, Zhu J, Sun L, Ye X, Lu L, Jin Q, et al. 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*. 2013; 98: 319–26.
238. Zhang C, Wang Y, Wa F, Wang Z, Lu Y, Xu Y, et al. Quantitative profiling of glycerophospholipids during mouse and human macrophage differentiation using targeted mass spectrometry. *Sci Rep*. 2017; 7: 1–13.
239. Mouchlis VD, Chen Y, Mccammon JA, Dennis EA. Membrane allosterity and unique hydrophobic sites promote enzyme substrate specificity. *J Am Chem Soc*. 2018; 140: 3285–91.
240. Koeberle A, Shindou H, Harayama T, Shimizu T. Palmitoleate is a mitogen, formed upon stimulation with growth factors, and converted to palmitoleoyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem*. 2012; 287: 27244–54.
241. Yore MM, Syed I, Moraes-vieira PM, Zhang T, Herman MA, Homan EA, et al. Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. *Cell*. 2014; 159: 318–32.
242. Brejchova K, Balas L, Paluchova V, Brezinova M, Durand T, Kuda O. Understanding FAHFAs : From structure to metabolic regulation. *Prog Lipid Res*. 2020; 79: 101053.
243. Casas J, Brzostek J, Zarnitsyna VI, Hong JS, Wei Q, Hoerter JAH, et al. Ligand-engaged TCR is triggered by Lck not associated with CD8 coreceptor. *Nat Commun*. 2014; 5: 1–11.
244. Letourneur F, Malissen B. Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor α and β chain transcripts reveals a nonfunctional α -mRNA of BW5147 origin. *Eur J Immunol*. 1989; 19: 2269–73.
245. Valera I, Fernández N, Trinidad AG, Alonso S, Brown GD, Alonso A, Crespo MS. Costimulation of Dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2008; 180: 5727–36.

246. Gil-de-Gómez L, Astudillo AM, Meana C, Rubio JM, Guijas C, Balboa MA, Balsinde J. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J Immunol.* 2013; 190: 5169–77.
247. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–54.
248. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001; 25: 402–8.
249. Rubio JM, Astudillo AM, Casas J, Balboa MA, Balsinde J. Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front Immunol.* 2018; 9: 1–14.
250. Pearce EJ, Everts B. Dendritic cell metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15: 18–29.
251. O'Neill LAJ, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med.* 2016; 213: 15–23.
252. Balgoma D, Astudillo AM, Pérez-Chacón G, Montero O, Balboa MA, Balsinde J. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J Immunol.* 2010; 184: 3857–65.
253. Lebrero P, Astudillo AM, Rubio JM, Fernández-Caballero L, Kokotos G, Balboa MA, Balsinde J. Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: a role for cytosolic phospholipase A2 γ in phospholipid remodeling. *Cells.* 2019; 8: 1–20.
254. Astudillo AM, Balgoma D, Balboa MA, Balsinde J. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2012; 1821: 249–56.
255. Astudillo AM, Pérez-Chacón G, Balgoma D, Gil-De-Gómez L, Ruipérez V, Guijas C, Balboa MA, Balsinde J. Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2011; 1811: 97–103.
256. Balsinde J, Winstead M V., Dennis EA. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 2002; 531: 2–6.
257. Yamashita A, Hayashi Y, Nemoto-sasaki Y, Ito M, Oka S, Tanikawa T, Waku K, Sugiura T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res.* 2014; 53: 18–81.
258. Yamashita A, Hayashi Y, Matsumoto N, Nemoto-sasaki Y, Koizumi T, Inagaki Y, Oka S, Tanikawa T, Sugiura T. Coenzyme-A-independent transacylation system; possible involvement of phospholipase A2 in transacylation. *Biology (Basel).* 2017; 6: 1–26.

259. Chilton FH. Potential phospholipid source(s) of arachidonate used for the synthesis of leukotrienes by the human neutrophil. *Biochem J.* 1989; 258: 327–33.
260. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014; 5: 1–8.
261. Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol.* 2005; 140: 395–407.
262. Kita Y, Shindou H, Shimizu T. Cytosolic phospholipase A 2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2019; 1864: 838–45.
263. Mouchlis VD, Dennis EA. Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2019; 1864: 766–71.
264. Leslie CC. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *J Lipid Res.* 2015; 56: 1386–402.
265. Dabral D, van den Bogaart G. The roles of phospholipase A2 in phagocytes. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 1–12.
266. Astudillo AM, Balboa MA, Balsinde J. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A 2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2019; 1864: 772–83.
267. Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padrón F, Blanco L, Rodríguez M, Fernández N, Crespo MS. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010: 1–14.
268. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15: 511–23.
269. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10: 181–93.
270. Youlin K, Weiyang H, Simin L, Xin G. Prostaglandin E2 inhibits prostate cancer progression by countervailing tumor microenvironment-induced impairment of dendritic cell migration through LXR α /CCR7 pathway. *J Immunol Res.* 2018; 2018: 1–8.
271. Shotorbani SS, He Z, Yang H, Sun Q, Xu Y, Su Z, et al. Over-expression of Hlx homeobox gene in DC2.4 dendritic cell enhances its maturation and antigen presentation. *Cell Immunol.* 2012; 275: 61–8.
272. Adiko AC, Babdor J, Gutiérrez-Martínez E, Guermonprez P, Saveanu L. Intracellular transport routes for MHC I and their relevance for antigen cross-presentation. *Front Immunol.* 2015; 6: 1–11.
273. Imai J, Hasegawa H, Maruya M, Koyasu S, Yahara I. Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol.* 2005; 17: 45–53.
274. Çimen I, Kocatürk B, Koyuncu S, Tufanl Ö, Onat UI, Yildirim AD, et al. Prevention

- of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation. *Sci Transl Med.* 2016; 8: 1–15.
275. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res.* 2004; 43: 91–104.
276. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. *Adv Nutr.* 2017; 8: 173S-181S.
277. Yang ZH, Miyahara H, Hatanaka A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 120.
278. Figdor CG, De Vries IJM, Lesterhuis WJ, Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med.* 2004; 10: 475–80.
279. Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology.* 2005; 114: 204–12.
280. Chometon TQ, Da Silva Siqueira M, Sant'anna JC, Almeida MR, Gandini M, De Almeida Nogueira ACM, Antas PRZ. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte derived dendritic cells. *PLoS One.* 2020; 15: 1–16.
281. Pérez-chacón G, Astudillo AM, Balgoma D, Balboa MA, Balsinde J. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. *BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2009; 1791: 1103–13.
282. Chilton FH, Fonteh AN, Surette ME, Triggiani M, Winkler JD. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1299: 1–15.
283. Rehman A, Hemmert KC, Ochi A, Jamal M, Henning JR, Barilla R, et al. Role of fatty-acid synthesis in dendritic cell generation and function. *J Immunol.* 2013; 190: 4640–9.
284. Lühr JJ, Alex N, Amon L, Kräter M, Kubánková M, Sezgin E, et al. Maturation of monocyte-derived DCs leads to increased cellular stiffness, higher membrane fluidity, and changed lipid composition. *Front Immunol.* 2020; 11: 1–18.
285. Ocaña-Morgner C, Sales S, Rothe M, Shevchenko A, Jessberger R. Tolerogenic versus immunogenic lipidomic profiles of CD11c + immune cells and control of immunogenic dendritic cell ceramide dynamics. *J Immunol.* 2017; 198: 4360–72.
286. Santinha DR, Marques DR, Maciel EA, Simões CSO, Rosa S, Neves BM, Macedo B, Domingues P, Cruz MT, Domingues MRM. Profiling changes triggered during maturation of dendritic cells: a lipidomic approach. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 403: 457–71.
287. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16: 553–65.
288. Kedia-Mehta N, Finlay DK. Competition for nutrients and its role in controlling

- immune responses. *Nat Commun.* 2019; 10: 1–8.
289. Buck MD, Sowell RT, Kaech SM, Pearce EL. Metabolic instruction of immunity. *Cell.* 2017; 169: 570–86.
290. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese R V., Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 3077–82.
291. Cao Z, Hao Y, Fung CW, Lee YY, Wang P, Li X, et al. Dietary fatty acids promote lipid droplet diversity through seipin enrichment in an ER subdomain. *Nat Commun.* 2019; 10: 1–16.
292. Jarc E, Kump A, Malavašič P, Eichmann TO, Zimmermann R, Petan T. Lipid droplets induced by secreted phospholipase A2 and unsaturated fatty acids protect breast cancer cells from nutrient and lipotoxic stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2018; 1863: 247–65.
293. Moreira LS, Piva B, Gentile LB, Mesquita-Santos FP, D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT, Bandeira-Melo C, Diaz BL. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2009; 1791: 156–65.
294. Weller PF, Bozza PT, Yu W, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: Central roles in eicosanoid generation. *Allergol Int.* 1997; 46: 141–53.
295. Guijas C, Bermúdez MA, Meana C, Astudillo AM, Pereira L, Fernández-Caballero L, Balboa MA, Balsinde J. Neutral lipids are not a source of arachidonic acid for lipid mediator signaling in human foamy monocytes. *Cells.* 2019; 8: 941.
296. Tomoda H, Igarashi K, Omura S. Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacins. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 921: 595–8.
297. Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res.* 2006; 45: 237–49.
298. Gonzalez-Soto M, Mutch DM. Diet regulation of long-chain PUFA synthesis: Role of macronutrients, micronutrients, and polyphenols on Δ -5/ Δ -6 desaturases and elongases 2/5. *Adv Nutr.* 2021; 12: 980–94.
299. Hannah VC, Ou J, Luong A, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids down-regulate SREBP isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 4365–72.
300. Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 155–64.
301. Jensen-Urstad APL, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2012; 1821: 747–53.
302. Zhong L, Yang Q, Xie W, Zhou J. Liver X receptor regulates mouse GM-CSF-derived dendritic cell differentiation in vitro. *Mol Immunol.* 2014; 60: 32–43.

303. Kidani Y, Elsaesser H, Hock MB, Vergnes L, Williams KJ, Argus JP, et al. Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2013; 14: 489–99.
304. Qian X, Yang Z, Mao E, Chen E. Regulation of fatty acid synthesis in immune cells. *Scand J Immunol.* 2018; 88: 1–11.
305. Rehman A, Hemmert KC, Ochi A, Jamal M, Henning JR, Barilla R, et al. Role of fatty-acid synthesis in dendritic cell generation and function. *J Immunol.* 2013; 190: 4640–9.
306. Osorio F, Tavernier SJ, Hoffmann E, Saeys Y, Martens L, Vettters J, et al. The unfolded-protein-response sensor IRE-1 α regulates the function of CD8 α + dendritic cells. *Nat Immunol.* 2014; 15: 248–57.
307. Cubillos-Ruiz JR, Silberman PC, Rutkowski MR, Chopra S, Perales-Puchalt A, Song M, et al. ER stress sensor XBP1 controls anti-tumor immunity by disrupting dendritic cell homeostasis. *Cell.* 2015; 161: 1527–38.
308. Monk JM, Hou TY, Turk HF, McMurray DN, Chapkin RS. n3 PUFAs reduce mouse CD4+ T-Cell ex vivo polarization into Th17 Cells. *J Nutr.* 2013; 143: 1501–8.
309. Akhtar Khan N. Polyunsaturated fatty acids in the modulation of T-cell signalling. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2010; 82: 179–87.
310. Stulnig TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 132: 310–21.
311. Teague H, Rockett BD, Harris M, Brown DA, Shaikh SR. Dendritic cell activation, phagocytosis and CD69 expression on cognate T cells are suppressed by n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Immunology.* 2013; 139: 386–94.
312. Zeyda M, Säemann MD, Stuhlmeier KM, Mascher DG, Nowotny PN, Zlabinger GJ, Waldhäusl W, Stulnig TM. Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF- κ activation. *J Biol Chem.* 2005; 280: 14293–301.
313. Carlsson JA, Wold AE, Sandberg AS, Östman SM. The polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and docosahexaenoic acid induce mouse dendritic cells maturation but reduce T-cell responses in vitro. *PLoS One.* 2015; 10: 1–23.
314. Kumar J, Gurav R, Kale V, Limaye L. Exogenous addition of arachidonic acid to the culture media enhances the functionality of dendritic cells for their possible use in cancer immunotherapy. *PLoS One.* 2014; 9: e111759.
315. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007; 219: 143–56.
316. Fernandez-Repollet E, Mittler RS, Tiffany S, Schwartz A. In vivo of prostaglandin E2 and arachidonic acid on phagocytosis of fluorescent methacrylate microbeads by rat peritoneal macrophages. *J Histochem Cytochem.* 1981; 30: 466–70.
317. Gutowska I, Baskiewicz M, Machalinski B, Chlubek D, Stachowska E. Blood arachidonic acid and HDL cholesterol influence the phagocytic abilities of human

- monocytes/macrophages. *Ann Nutr Metab.* 2010; 57: 143–9.
318. Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, Lee SE, Lehallier B, Haney MS, et al. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nat Neurosci.* 2020; 23: 194–208.
 319. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 1999; 20: 561–7.
 320. Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* 2004; 25: 323–7.
 321. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *Int Rev Cell Mol Biol.* 1st ed. 2019; 348: 1–68.
 322. Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P. Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood.* 2011; 118: 5498–505.
 323. Sharma S, Stolina M, Yang S, Baratelli F, Lin JF, Atianzar K, et al. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 961–8.
 324. Bersuker K, Peterson CWH, To M, Sahl SJ, Savikhin V, Grossman EA, Nomura DK, Olzmann JA. A proximity labeling strategy provides insights into the composition and dynamics of lipid droplet proteomes. *Dev Cell.* 2018; 44: 97–112.
 325. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* 2016; 21: 379–404.
 326. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol.* 2015; 17: 759–70.
 327. Kaushik S, Cuervo AM. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy.* 2016; 12: 432–8.
 328. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17: 97–111.
 329. Johnson MR, Stephenson RA, Ghaemmaghami S, Welte MA. Developmentally regulated H2AV buffering via dynamic sequestration to lipid droplets in *Drosophila* embryos. *Elife.* 2018; 7: 1–28.
 330. Welte MA, Gould AP. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Physiol Behav.* 2017; 176: 139–48.
 331. D’Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, Berk PD, Rippe RA, Blaner WS. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. *PLoS One.* 2011; 6: e24993.
 332. Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, et al. Glial lipid droplets

- and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell*. 2015; 160: 177–90.
333. Welte MA. Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol*. 2007; 17: 363–9.
334. Bersuker K, Olzmann JA. Establishing the lipid droplet proteome: Mechanisms of lipid droplet protein targeting and degradation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2017; 1862: 1166–77.
335. Thiam AR, Dugail I. Lipid droplet-membrane contact sites - from protein binding to function. *J Cell Sci*. 2019; 132: 1–12.
336. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*. 2008; 134: 933–44.
337. Brenner RR. The desaturation step in the animal biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. 1971; 6: 567–75.
338. Cossette C, Patel P, Anumolu JR, Sivendran S, Gue JL, Gravel S, et al. Human neutrophils convert the sebum-derived polyunsaturated fatty acid sebaleic acid to a potent granulocyte chemoattractant. *J Biol Chem*. 2008; 283: 11234–43.
339. Gil-de-gómez L, Astudillo AM, Guijas C, Magrioti V, Kokotos G, Balboa MA, Balsinde J. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A2s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. 2014; 192: 752–62.