



Universidad de Valladolid

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**Análisis lipidómico de los cambios en el metabolismo
lipídico que tienen lugar durante la activación de los
macrófagos peritoneales de ratón por estímulos
proinflamatorios**

Presentada por Patricia Monge Bartolomé 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, INNOVACION
Y UNIVERSIDADES

 **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 Dña María Ángeles Balboa García, doctora en Biología e Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, certifican:

Que Dña Patricia Monge Bartolomé, Graduada en Química por la Universidad de Valladolid y Máster en Técnicas Avanzadas en Química y en Química Sintética e Industrial por la Universidad de Valladolid, ha realizado bajo su dirección los estudios y experimentos necesarios para la elaboración de la memoria titulada "*Análisis lipidómico de los cambios en el metabolismo lipídico que tienen lugar durante la activación de los macrófagos peritoneales de ratón por estímulos inflamatorios*", que presenta para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Valladolid.

Y para que así conste donde proceda, firma la presente:

Fdo. Jesús Balsinde Rodríguez

Fdo. María Ángeles Balboa García

Valladolid, 2022

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Y GENÉTICA MOLECULAR
C/ SANZ Y FORES 3
47003 VALLADOLID
TEL.: 983 184 801
FAX: 983 184 800

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDOS PREVIOS:

Índice general	5
Índice figuras	9
Índice tablas	13
Abreviaturas	15
A. INTRODUCCIÓN	19
A.1 Sistema inmune como barrera de defensa ante invasiones patógenas	21
A.2 Respuesta a una señal patogénica e inflamación	26
A.2.1 EL AA en la lesión inflamatoria	26
A.2.2 Papel del zimosán en la activación celular	28
A.2.3 Movilización del ácido araquidónico	29
A.2.4 Papel de las fosfolipasas en la liberación del AA de fosfolípidos	31
A.2.5 Reacciones de transacilación independientes de CoA	38
A.2.6 Fosfolípidos oxidados y su papel en los procesos inflamatorios	41
A.3 Polarización de macrófagos y su papel en enfermedades inflamatorias	45
B. OBJETIVOS.....	51
C. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
C.1. Materiales	57
C.1.1. Cultivo celular	57
C.1.2. Disolventes y reactivos líquidos	57

C.1.3. Reactivos y productos sólidos	58
C.1.4. Gases	59
C.1.5. Estímulos	59
C.1.6. Inhibidores	59
C.1.7. Lípidos	60
C.1.8. Microscopía de fluorescencia	61
C.1.9. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y qPCR	62
C.1.10. Tampones.....	62
C.1.11. Material biológico	62
C.2. Equipamiento	64
C.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo	64
C.2.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	65
C.2.3. PCR cuantitativa	65
C.2.4. Microscopía confocal de fluorescencia	65
C.2.5. Otros equipos.....	66
C.2.6. Base de datos.....	67
C.3. Métodos	68
C.3.1. Aislamiento celular	68
C.3.2. Otras metodologías	68
C.3.3. Análisis de lípidos.....	70
C.3.4. Espectrometría de masas para la medida de fosfolípidos.....	78
C.3.5. Medida de fagocitosis por microscopía confocal	78
C.3.6. Análisis de la expresión de genes por RT-qPCR	79
C.3.7. Medida de la remodelación de AA en fosfolípidos por radiactividad	82
C.3.8. Análisis estadístico.....	82

D. RESULTADOS.....	83
D.1. Liberación de AA en células activadas	85
D.1.1 Diferencias en la movilización de AA y síntesis de eicosanoides en presencia de zimosán opsonizado y sin opsonizar	85
D.2. Remodelación de AA entre glicerofosfolípidos en macrófagos peritoneales de ratón activados	94
D.3. Movilización de AAox presente en fosfolípidos en macrófagos peritoneales de ratón	98
D.3.1 Papel de la iPLA₂β en la liberación de AAox de fosfolípidos	98
D.4. Contribución de cPLA₂ e iPLA₂β a la movilización del ácido adrénico en macrófagos peritoneales de ratón	103
D.4.1 La movilización del AA y del AdA está mediada por diferentes mecanismos.....	103
D.5. Estudio lipidómico de la polarización de macrófagos	111
E. DISCUSIÓN.....	123
E.1. El zimosán provoca la movilización diferencial de AA en macrófagos peritoneales de ratón	125
E.2. El AA contenido en fosfolípidos experimenta una remodelación durante la fagocitosis en macrófagos peritoneales de ratón.....	127

E.3. Implicación de la iPLA ₂ β Y cPLA ₂ β en la liberación de AAox en macrófagos peritoneales de ratón	129
E.4. cPLA ₂ α y iPLA ₂ β participan en la movilización del ácido adrénico en macrófagos peritoneales de ratón	133
E.5. Las polarizaciones M1 y M2 muestran grandes diferencias en cuanto a su metabolismo lipídico	136
F. CONCLUSIONES.....	139
G. BIBLIOGRAFÍA	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los componentes celulares del sistema inmune en tejidos, sangre y médula ósea.

Figura 2. Origen de los macrófagos peritoneales.

Figura 3. Receptores de los macrófagos.

Figura 4. Estructura del AA (20:4n-6)

Figura 5. Esquema de síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6.

Figura 6. Esquema de fagocitosis de zimosán y ZOp

Figura 7. Rutas de incorporación de ácidos grasos libres en fosfolípidos.

Figura 8. Clasificación de las fosfolipasas A₂ atendiendo criterios bioquímicos y funcionales.

Figura 9. Relación entre las enzimas PLA₂ durante la activación celular vía receptores inmunes innatos.

Figura 10. Esquema de Incorporación y remodelación de AA mediada por la enzima CoA-IT en fosfolípidos.

Figura 11. Rutas de síntesis de eicosanoides a partir de AA liberado de fosfolípidos de membrana gracias a la acción de la fosfolipasa

Figura 12. Ruta de reducción a través de la GPX4 y oxidación enzimática del fosfolípido oxidado mayoritario presente en monocitos, eosinófilos y macrófagos.

Figura 13. Roles positivos y negativos de los macrófagos debido a su plasticidad para adquirir diferentes fenotipos.

Figura 14. Metabolismo del hierro en macrófagos polarizados.

Figura 15. Modos de análisis de triple cuadrupolo

Figura 16. Análisis comparativo de la liberación de ácido [³H]araquidónico ([³H]AA) en macrófagos peritoneales de ratón en respuesta a zimosán o zimosán opsonizado

Figura 17. Efecto de los inhibidores de PLA₂

Figura 18. Comparación de la liberación de AA entre zimosán y zimosán opsonizado.

Figura 19. Especies de fosfolípidos que contienen AA en macrófagos peritoneales de ratón y efecto de la estimulación celular

Figura 20. Efecto de la estímulación e inhibición de cPLA_{2α} sobre los niveles de las especies mayoritarias de PC, PI y PE que contienen AA en macrófagos peritoneales de ratón.

Figura 21. Efecto de la estimulación e inhibición de iPLA_{2β} sobre los niveles de las especies mayoritarias de PC, PI y PE que contienen AA en macrófagos peritoneales de ratón.

Figura 22. Producción de eicosanoides por macrófagos peritoneales.

Figura 23. Efecto de la estimulación celular en los niveles de AA en diferentes clases de fosfolípidos.

Figura 24. Remodelación de AA en fosfolípidos en macrófagos peritoneales y el efecto de la estimulación celular.

Figura 25. Especies moleculares de lisofosfolípidos generados por macrófagos y el efecto de la estimulación celular.

Figura 26. Efecto de SKF98625 en la liberación de AA de los macrófagos.

Figura 27. Efecto de la estímulación e inhibición en los niveles de PC, PI y PE oxidados mayoritarios que contienen AAox de macrófagos peritoneales de ratón

Figura 28. Efecto de la estimulación e inhibición en los niveles de PC, PI y PE oxidados mayoritarios que contienen AAox de macrófagos peritoneales de ratón.

Figura 29. Perfil de metabolitos de AAox en presencia de zimosán y de aspirina.

Figura 30. Distribución del AdA y AA entre las diferentes clases de fosfolípidos.

Figura 31. Especies moleculares de fosfolípidos que contienen AdA y AA en macrófagos peritoneales.

Figura 32. movilización del AA y del AdA en macrófagos estimuladas con zimosán.

Figura 33. Liberación de AdA y AA en macrófagos peritoneales estimulados

Figura 34. Liberación de AA y AdA en macrófagos peritoneales estimulados

Figura 35. Movilización de AA y de AdA en macrófagos estimulados con zimosán

Figura 36. Producción de eicosanoïdes en macrófagos peritoneales estimulados.

Figura 37. Expresión de marcadores pro y antiinflamatorios en macrófagos peritoneales polarizados a M1 y M2.

Figura 38. Perfil lipídico de especies de PC, PE y PI con AA y AdA en macrófagos peritoneales polarizados en M1 y M2 en ausencia o presencia de zimosán.

Figura 39. Perfil lipídico de especies de PC, PE y PI con AA y AdA en macrófagos peritoneales polarizados en M1 y M2 en ausencia o presencia de ZOp.

Figura 40. Perfil lipídico de especies de PC, PE y PI con EPA en macrófagos peritoneales polarizados en M1 y M2 en ausencia o presencia de zimosán.

Figura 41. Perfil lipídico de especies de PC, PE y PI con DPA en macrófagos peritoneales polarizados en M1 y M2 en ausencia o presencia de zimosán.

Figura 42. Perfil lipídico de especies de PC, PE y PI con DHA en macrófagos peritoneales polarizados en M1 y M2 en ausencia o presencia de zimosán.

Figura 43. Perfil lipídico de especies de PC, PE y PI con AA, AdA, DHA, DPA y EPA en macrófagos peritoneales polarizados en M1 y M2 en ausencia o presencia de manano+laminarina

Figura 44. Medida de ácidos grasos AA, AdA, DHA y DPA en macrófagos peritoneales polarizados en M1 en ausencia o presencia de zimosán.

Figura 45. Fagocitosis de las partículas de zimosán en macrófagos peritoneales polarizados a M0, M1 y M2 en presencia de AdA.

Figura 46. Esquema de fosfolipasas A2 implicadas en la hidrolisis y liberación de AA y de AAox

Figura 47. Diferencias en la movilización de ácidos grasos n-6, AA y AdA y n-3, EPA, DPA y DHA en macrófagos polarizados M1 y M2

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las fosfolipasas A₂

Tabla 2. Tampones

Tabla 3. Gradiente de disolventes para el análisis de fosfolípidos por HPLC-MS

Tabla 4. Parámetros de DP y CE para el análisis de fosfolípidos en fase normal por HPLC-MS

Tabla 5. Gradiente de disolventes para el análisis de eicosanoides en fase reversa por HPLC-MS

Tabla 6. Condiciones para la separación lipídica por cromatografía en capa fina

Tabla 7. Fragmentos característicos de los ésteres metílicos

Tabla 8. Cebadores de genes para qPCR

Tabla 9. Transiciones para MRM (Multiple Reaction Monitoring) de los principales metabolitos oxidados en macrófagos peritoneales de ratón.

ABREVIATURAS

• AA	Ácido araquidónico (20:4n-6)
• AAox	Ácido araquidónico oxidado
• ACS	Acil-CoA sintetasa
• AdA	Ácido adrénico
• AdPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ del tejido adiposo
• Arg	Arginasa
• Asp	Ácido aspártico
• BSA	Albúmina de suero bovino
• cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
• CE	Ésteres de colesterol
• Cys	Cisteina
• COX	Ciclooxygenasa
• CoA-IT	Transacilasa independiente de CoA
• cPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica dependiente de Ca ²⁺
• DHA	Ácido docosahexaenoico
• DNA	Ácido desoxirribonucleico
• D ₄ -LTB ₄	Leucotrieno deuterado
• DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
• DHA	Ácido docosahexaenoico
• DMSO	Dimetil sulfóxido
• DPA	Ácido docosapentaenoico
• D ₄ -PGE ₂	Prostaglandina E ₂ deuterada
• EPA	Ácido eicosapentaenoico
• ESI	Ionización por electrospray
• EC	Energía de colisión
• EET	Ácido epoxieicosatetraenoico
• FcR	Receptores Fc
• FBS	Suero fetal bovino
• GAPDH	Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa
• GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
• GPX4	Glutatión peroxidasa 4
• HDL	Lipoproteína de alta densidad
• HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
• His	Histidina
• HPETEs	Ácidos hidroperoxieicosatetranicos
• HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a

	espectrometría de masas
• HLA	Antígenos leucocitarios humanos
• iPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica independiente de Ca ⁺²
• iNOs	Oxido nítrico sintasa inducible
• IgG	Inmunoglobulina G
• IFN	Interferón
• IL	Interleuquina
• LOX	Lipoxigenasa
• LPS	Lipopolisacárido
• LDL	Lipoproteínas de baja densidad
• LPCAT	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa
• LPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ lisosomal
• MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
• M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
• MS	Espectrometría de masas
• MRC2	Receptor de manosa tipo C
• MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
• NK	Natural Killer
• OxoETE	Ácido oxoeicosatetraenoico
• PA	Ácido fosfatídico
• PAF-AH	Acetil hidrolasas del factor activador de plaquetas
• PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos.
• PC	glicerofosfolípidos de colina
• PCR	Proteína C reactiva
• PD	Potencial de declustering
• PE	Glicerofosfolípidos de etanolamina
• PEBP1	Proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina
• PI	Fosfatidilinositol
• PL	Glicerofosfolípido
• PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato
• PS	Fosfatidilserina
• PLox	Fosfolípido oxidado
• Psi	Unidad de presión básica del sistema
• PBS	Tampón fosfato salino
• PG	Fosfatidilglicerol
• PLA ₂	Fosfolipasas A ₂
• PPAR	Receptor activador de la proliferación de los peroxisomas
• Q-PCR	PCR cuantitativa
• RNA	Ácido ribonucleico
• RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute

- Ser Serina
- Sn Estéreo específica
- STAT3 El transductor de señal y activador de la transcripción 3
- TLR Toll Like Receptor
- TNF- α Factor de necrosis tumoral α
- TGF- β Factor de crecimiento transformante beta
- TAG Triacilglicerol
- T $^{\circ}$ Temperatura
- V Volumen
- VLDL Lipoproteínas de muy baja densidad
- Z Zimosán
- ZOp Zimosán opsonizado

A. INTRODUCCIÓN

A.1 Sistema inmune como barrera de defensa ante invasiones patógenas

El sistema inmune innato desempeña un papel clave en el reconocimiento de microorganismos, constituyendo de esta manera la primera línea de defensa ante el ataque de agentes patógenos externos [1]. Hasta finales de los años 80 del siglo anterior eran muchos los estudios realizados en los que se describía la forma por la cual la célula reconoce antígenos, desde los receptores que forman parte del proceso hasta la comunicación intercelular que se lleva a cabo [2]. Sin embargo, poco se sabía de cómo el sistema inmunitario es capaz de distinguir lo propio no infeccioso de lo infeccioso no propio. Esto fue descrito por Janeway en su teoría de reconocimiento de patrones [3].

Además, se propuso la idea de que el sistema inmune es capaz de detectar una infección a través de receptores que reconocen PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) [4][5]. Pocos años más tarde Ilmer et al. [6] descubrieron que un receptor denominado Toll presente en *Drosophila* responde ante infecciones fúngicas. Posteriormente se descubrió un homólogo de este receptor en humanos, el cual produce la inducción de citoquinas proinflamatorias, generando una respuesta inmune innata[7]. Estos receptores tipo Toll reconocen mananos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos de virus [8] y bacterias y flagelinas, desencadenando una respuesta que conlleva la producción de mediadores proinflamatorios.

La activación del sistema inmune innato es necesaria para desarrollar una inmunidad adquirida en defensa contra antígenos. La inmunidad adquirida se caracteriza por la especificidad ante los antígenos y además posee memoria. Las células T y B son las encargadas de presentar el antígeno, generando ciertos anticuerpos que confieren una memoria inmunitaria contra futuras invasiones patogénicas [9,10]. Por ello, una buena interacción entre el sistema inmune innato y el adquirido es esencial para una correcta defensa inmunitaria del huésped [11].

El sistema inmune se encuentra formado por diferentes tipos celulares (**figura 1**) que se encuentran distribuidos para proporcionar una mayor defensa ante posibles infecciones patogénicas. Los macrófagos, células dendríticas y mastocitos se encuentran distribuidos en los tejidos. Los eosinófilos, basófilos y neutrófilos, que se encuentran en el torrente sanguíneo, son capaces de extravasarse en respuesta a una señal inflamatoria. Los linfocitos T y células B también se encuentran recirculando entre los tejidos y la sangre [12].

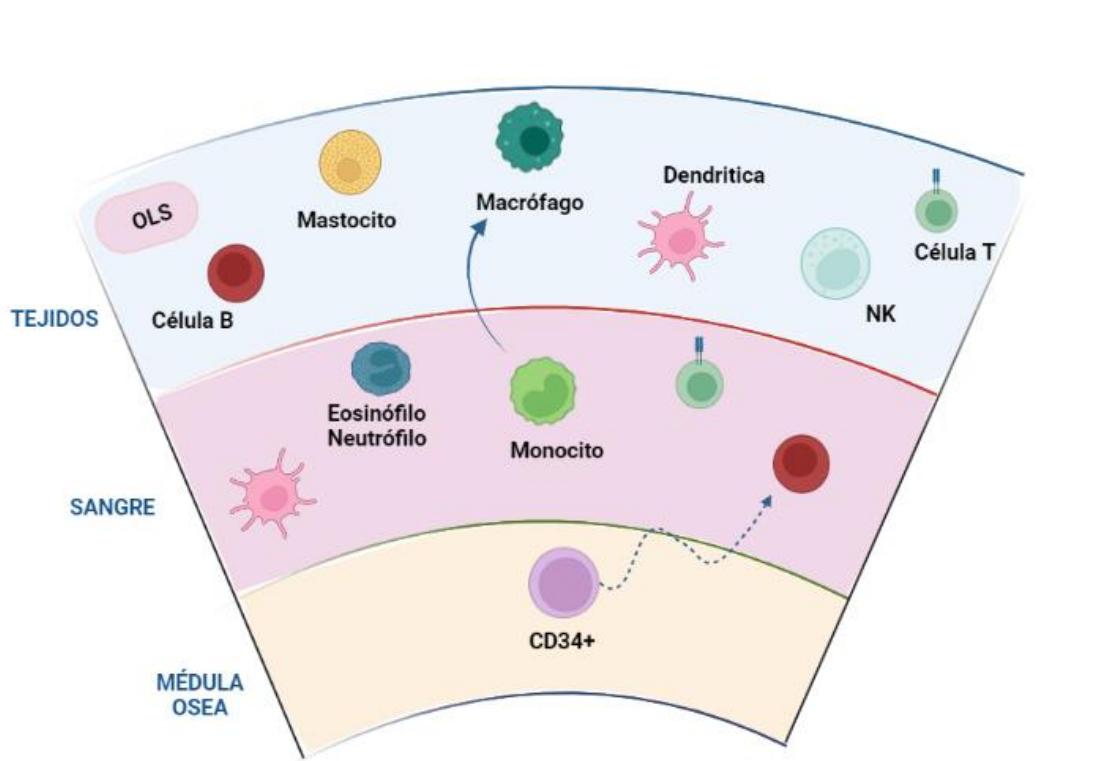


Figura 1. Distribución de los componentes celulares del sistema inmune en tejidos, sangre y médula ósea.

Los macrófagos tienen varios orígenes. Así, los macrófagos de la microglía y del hígado tienen su origen en precursores procedentes del saco vitelino que se desplazaron por los tejidos en la etapa embrionaria y maduraron a macrófagos tisulares [13]. Otros, como los macrófagos presentes en el intestino y en la dermis proceden de los monocitos de la médula ósea, los cuales se transportan a la sangre y de ahí a los tejidos donde finalmente se diferencian a macrófagos [14-17]. Finalmente, los

macrófagos alveolares, los macrófagos de la pulpa roja del bazo y los peritoneales derivan de células madre hematopoyéticas del hígado fetal [18]. En algunos órganos como el corazón, la dermis o el hígado, pueden coexistir diferentes poblaciones de macrófagos [19,20].

Los macrófagos peritoneales son la población de macrófagos más estudiada, habiéndose utilizado para el análisis ex vivo durante décadas [21]. Este tipo celular tiene un origen prenatal y ha sido clasificado en dos poblaciones discretas en función de su morfología; macrófagos peritoneales grandes (LPM) y macrófagos peritoneales pequeños (SPM) [18,22-24], los cuales parecen mantenerse de diferentes maneras. Mientras que los LPM se mantienen por autorrenovación y son independientes de la hematopoyesis [18,25] y representan en torno al 90% de los macrófagos peritoneales, los SPM se originan a partir de monocitos circulantes [25,26] y representan únicamente el 10% de la población macrofágica total (**figura 2**).

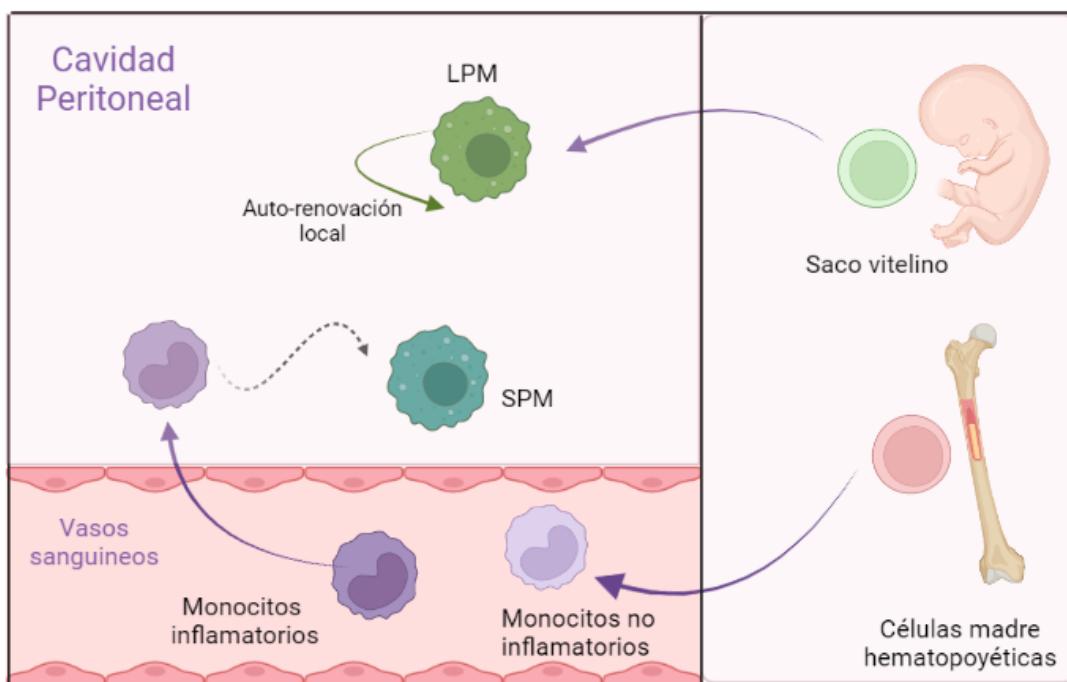


Figura 2. Origen de los macrófagos peritoneales. En la cavidad peritoneal se distinguen dos poblaciones en función de su morfología, los LPM (macrófagos grandes) y los SPM (macrófagos pequeños) ambos de origen prenatal. Los LPM son independientes de la hematopoyesis, mientras que los SPM derivan de monocitos circulantes.

En estados de inflamación, los LPM migran al epiplón [27] o a tejidos dañados y son capaces de fagocitar células apoptóticas [28], mientras que esta desaparición de dichos macrófagos peritoneales viene acompañada por un aumento de SPM y monocitos inflamatorios [23,29]. En condiciones de estado estacionario, LPM y SPM no producen niveles significativos de citoquinas pro o antiinflamatorias, aunque este tipo celular parece desarrollar un fenotipo proinflamatorio bajo condiciones de inflamación [30]. De esta manera, se ha descrito que los SPM producen altos niveles de TNF- α y MIP-1 α en respuesta a LPS, mientras que los LPM generan G-CSF, GM-CSF en respuesta al mismo estímulo [25].

Los macrófagos, al igual que otras células fagocíticas como las células dendríticas, son capaces de fagocitar antígenos gracias a una gran variedad de receptores (**figura 3**) y cascadas de señalización que tienen lugar durante este proceso [31,32]. Los patógenos internalizados en compartimentos vesiculares intracelulares son destruidos y posteriormente expuestos a las moléculas de histocompatibilidad de clase II [33]. Estas células macrofágicas también participan en la reparación de tejidos y homeostasis, remodelación vascular y reparación estructural de tejidos como músculo o hueso.

Por ejemplo, cuentan con receptores de lectina-1 [34] y de manosa, que se unen específicamente a diversas estructuras de la membrana externa de ciertas levaduras. Otros receptores que destacar son los receptores Fc γ R, los cuales reconocen el fragmento Fc de las inmunoglobulinas y los receptores para componentes del sistema del complemento, como C3b y iC3b, que favorecen la fagocitosis de agentes patógenos recubiertos con estas moléculas solubles [35,36]

.

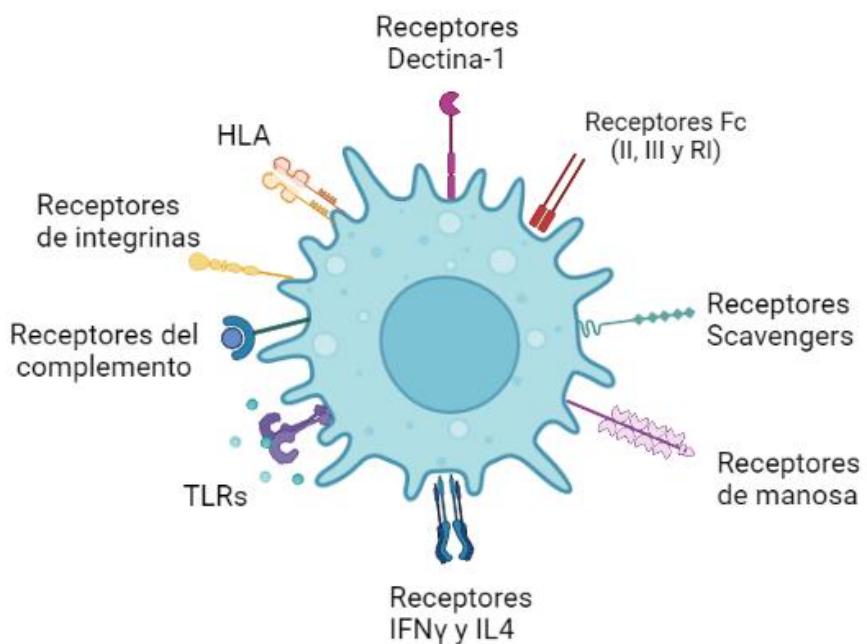


Figura 3. Receptores de los macrófagos. Los macrófagos expresan múltiples receptores en su superficie, los cuales son capaces de reconocer antígenos e internalizarlos para posteriormente ser destruidos y presentados a las moléculas de histocompatibilidad de clase II.

A.2 Respuesta a una señal patogénica e inflamación.

A.2.1 El AA en la lesión inflamatoria

Los ácidos grasos esenciales son aquellos ácidos grasos que el organismo no puede sintetizar, por lo que tienen que ser obtenidos a través de la dieta. Se distinguen dos grandes familias: omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6) denominados PUFA ya que tienen varias insaturaciones en su cadena hidrocarbonada. La mayoría provienen de plantas y pescados. Ambas familias poseen tanto propiedades pro y antiinflamatorias y por ende, participan en el inicio y resolución de la inflamación.

El AA es un ácido graso de veinte átomos de carbono y cuatro insaturaciones en las posiciones 5,8,11 y 14 (**figura 4**). Pertenece por tanto a la serie n-6. Es uno de los ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios en las células del sistema inmune.

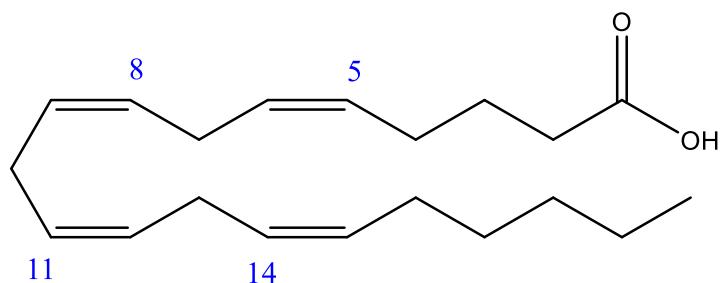


Figura 4. Estructura del AA (20:4n-6)

Una de las principales fuentes de AA es el ácido linoleico (18:2n-6) (**figura 5**), un ácido graso obtenido a través de la dieta [37]. En este proceso participan una elongasa y dos desaturasas, la $\Delta 5$ y $\Delta 6$, las cuales se expresan en numerosos tejidos, aunque el hígado es el principal órgano productor de AA a partir de linoleico. Una vez formado, el AA será liberado con posterioridad al torrente sanguíneo, distribuyéndose de esta manera en los diferentes tejidos. El AA se transporta en la sangre preferentemente en VLDL,

mayoritariamente unido a fosfolípidos y, en menor medida, a CE y TAG [38]. Este transporte es esencial para suministrar AA a fosfolípidos presentes en el tejido, incluyendo aquellos a los cuales las lipoproteínas tienen bajo acceso.

Otra fuente de ácido araquidónico es la suplementación directa a través de la dieta, por la cual se ha observado una ingesta de 0,2-0,3 g por día. Esta es una ruta secundaria ya que la ingesta de ácido linoleico es de 10-20 g por día [39].

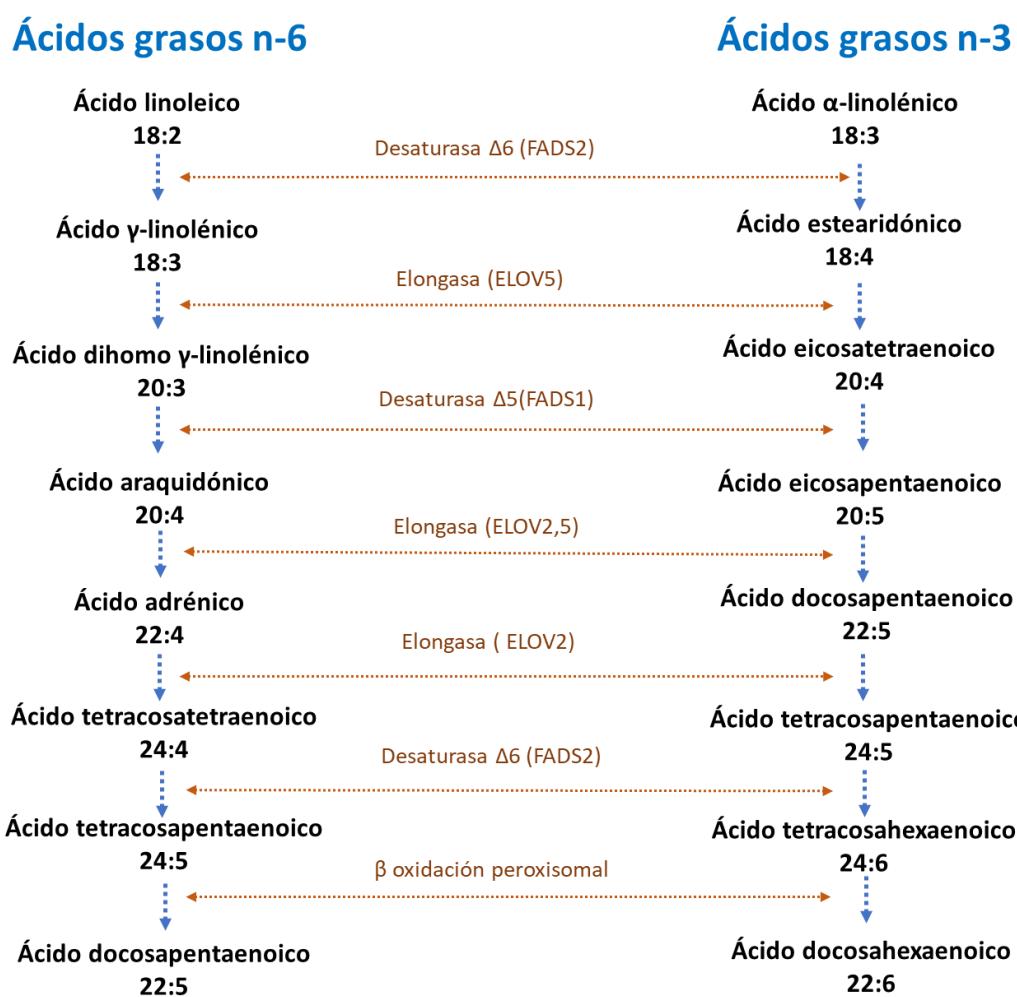


Figura 5. Esquema de síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6. En este proceso intervienen ciertas desaturasas y elongasas.

Aunque el AA libre es esencial para la resolución de procesos inflamatorios, niveles elevados en el interior celular pueden ser tóxicos [40,41]. Por ello la mayor parte del ácido araquidónico celular se localiza esterificado en los fosfolípidos de la membrana celular. Solo después de la activación celular se liberará una parte, pudiendo ser posteriormente metabolizado a eicosanoïdes, mediadores de un gran número de procesos, incluyendo la inflamación [42,43].

A.2.2 Papel del zimosán en la activación celular.

Las células del sistema inmune innato poseen receptores tanto extracelulares como intracelulares que participan en el reconocimiento de una gran diversidad de patógenos. Esta interacción patógeno-receptor conlleva el inicio de una cascada de señalización que desemboca frecuentemente en la movilización de AA desde los fosfolípidos de membrana [36].

El zimosán es un homogeneizado de la pared de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [44] y ha sido usado durante los últimos 50 años como modelo para generar una respuesta inmune a infecciones fúngicas y producción y liberación de citoquinas proinflamatorias [45-47]. Asimismo, el zimosán es uno de los estímulos fisiopatológicos más empleados para estudiar los mecanismos de movilización de AA de las células fagocíticas [48,49]. Interacciona con diversos receptores no opsónicos, entre los cuales se incluyen receptores tipo Toll como TLR2 o TLR6, lectinas de tipo C como dectina-1, receptores de manosa o receptores “scavenger”, produciendo así una señal inflamatoria [47,50]. Estudios realizados en ratones deficientes en dectina-1 han demostrado que este receptor es el responsable de activar la fosfolipasa A₂ que cataliza la movilización de AA en macrófagos expuestos a zimosán [34,51]. Ello ocurre a través de aumentos en la concentración intracelular de calcio y de la estimulación de la cascada de fosforilación mediada por MAP quinasas [52,53].

Por otra parte, el zimosán opsonizado (esto es, recubierto de opsoninas, inmunoglobulinas y factores del complemento) también es un estímulo muy potente para la liberación de AA y producción de eicosanoides [36,54]. A diferencia del zimosán, en este caso el proceso está mediado principalmente a través de receptores de opsoninas, que reconocen el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (IgG) y fracciones del complemento (C3b, C4b) [36,55,56].

Así, dependiendo de la naturaleza del estímulo, ya sea zimosán o zimosán opsonizado, entran en juego receptores diferentes (**figura 6**), los cuales comparten ciertas etapas del mecanismo de activación celular y transducción de señales, aunque también tienen diferencias bastante acusadas. Por ejemplo, mientras que en la fagocitosis mediada por el receptor Fc hay una gran activación de syk, en la fagocitosis a través del receptor dectina-1, syk no tiene dicha relevancia [57,58].

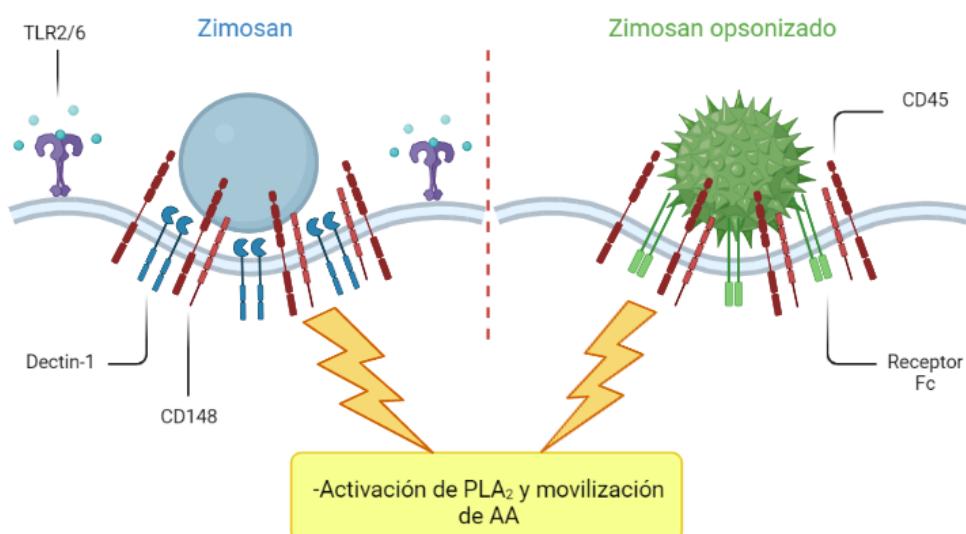


Figura 6. Esquema de fagocitosis de zimosán y ZOp. En este proceso intervienen diferentes receptores, provocando como respuesta final la activación de PLA₂ y movilización del AA.

A.2.3 Movilización del ácido araquidónico

El AA en condiciones de reposo se halla fundamentalmente esterificado en la posición sn-2 de los PLs de membrana, particularmente en glicerofosfolípidos de colina (PC), etanolamina (PE) e inositol (PI).

La regulación de los niveles de AA libre viene determinada por dos reacciones que forman parte de lo que se denomina ciclo de Lands; una desacilación del AA de los PL llevada a cabo por fosfolipasas A₂, y un proceso de reacilación de este ácido graso, llevado a cabo por acil-CoA sintetasa (ACS), y aciltransferasas [59].

Estas dos reacciones se encuentran reguladas en función del estado celular. En células en reposo, el AA se encuentra en su mayoría esterificado, mientras que cuando las células se encuentran bajo condiciones de estimulación, la hidrólisis de dicho ácido graso prevalece, lo cual genera una elevada concentración de AA libre, que será metabolizado para la síntesis de eicosanoides [60-62]. Sin embargo, aunque en condiciones de activación prevalezca la desacilación del AA, una gran parte de este sigue siendo reacilado a fosfolípidos, lo que explica por qué solo una pequeña cantidad de este ácido graso es empleado para la síntesis de eicosanoides [59].

La ruta principal de incorporación de AA en PL celulares, cuando la célula opera con bajas concentraciones de AA, es a través del ciclo de Lands que es, por tanto, una ruta de alta afinidad, pero de baja capacidad (**figura 7**) [63,64]. Para incorporarse en PL, el AA libre se convierte en araquidonoil-CoA (AA-CoA) a través de la acción de la ACS, que es posteriormente utilizado por aciltransferasas dependientes de CoA [65,66]. Para esta reacilación los lisofosfolípidos tienen un papel trascendental, ya que son los aceptores de las moléculas de AA. Por ello, su disponibilidad constituye un factor limitante de esta ruta [67,68].

Cuando la célula se ve expuesta a niveles elevados de AA libre, entra en juego una segunda ruta, la ruta de biosíntesis de novo de PL. En dicha ruta, el AA-CoA se esterifica en la molécula de glicerol-3-fosfato en cualquiera de las dos posiciones libres gracias a las enzimas glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (GPAT) y ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT), generando finalmente PA. A partir de esta molécula de PA se pueden generar diversos fosfolípidos[69]. Esta ruta de novo es operativa cuando la entrada de AA mediante el ciclo de Lands se ha saturado [70-72].

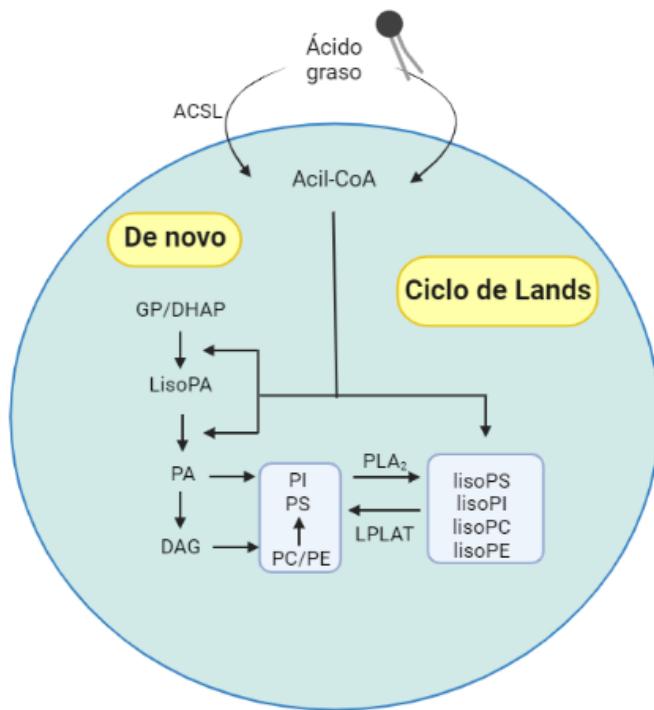


Figura 7. Rutas de incorporación de ácidos grasos libres en fosfolípidos. A la derecha el ciclo de Lands, una ruta de alta afinidad/baja capacidad cuando la célula está expuesta a bajas concentraciones del ácido. A la izquierda, ruta de novo, de baja afinidad/alta capacidad cuando la célula está expuesta a altas concentraciones de este.

A.2.4 Papel de las fosfolipasas en la liberación del AA de fosfolípidos

Las fosfolipasas A₂ son enzimas con gran relevancia en el metabolismo lipídico y señalización celular. Purificadas inicialmente a partir del veneno de serpientes y otros reptiles, se sabe actualmente que están presentes en todos los tejidos y en todas las especies. Atendiendo a criterios de secuencia, estas enzimas han sido clasificadas en 16 grupos (**tabla 1**).

Grupo	Aminoácidos catalíticos		Localización	Tamaño	Ca ²⁺
I	A	His/Asp	Secretada	13-15 kDa	mM
	B	His/Asp	Secretada	13-15 kDa	mM
II	A	His/Asp	Secretada	13-15 kDa	mM
	B	His/Asp	Secretada	13-15 kDa	mM
	C-F	His/Asp	Secretada	13-15 kDa	mM
III		His/Asp	Secretada	16-18 kDa	mM
IV	A	Ser/Asp	Citosólica	85 kDa	μM
	B	Ser/Asp	Citosólica	100 kDa	μM
	C	Ser/Asp	Citosólica	65 kDa	No
	D	Ser/Asp	Citosólica	90 kDa	μM
	E	Ser/Asp	Citosólica	85 kDa	μM
	F	Ser/Asp	Citosólica	85 kDa	μM
V		His/Asp	Secretada	14 kDa	mM
VI	A	Ser/Asp	Citosólica	80-85 kDa	No
	B	Ser/Asp	Membrana	88 kDa	No
VII	A	Ser/His/Asp	Secretada	45 kDa	No
	B	Ser/His/Asp	Citosólica	40 kDa	No
VIII	A	Ser/His/Asp	Citosólica	26 kDa	No
	B	Ser/His/Asp	Citosólica	26 kDa	No
IX		His/Asp	Secretada	14 kDa	< mM
Grupo	Aminoácidos catalíticos		Localización	Tamaño	Ca ²⁺
X		His/Asp	Secretada	14 kDa	mM
XI	A	His/Asp	Secretada	12 kDa	mM
	B	His/Asp	Secretada	13 kDa	mM
XII		His/Asp	Secretada	19 kDa	mM
XIII		His/Asp	Secretada	<10 kDa	mM
XIV		His/Asp	Secretada	13-19 kDa	mM
XV		Ser/His/Asp	Lisosomal	45 kDa	No
XVI		His/Cis	Membrana	18 kDa	No

Tabla 1. Clasificación de las fosfolípidas A₂

Una clasificación generalmente más útil, que atiende a características funcionales y propiedades bioquímicas, agrupa estas enzimas en 6 grandes familias: las enzimas citosólicas dependientes de calcio ($c\text{PLA}_2$), las intracelulares independientes de calcio ($i\text{PLA}_2$), las secretadas dependientes de calcio ($s\text{PLA}_2$), las acetil hidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH), la enzima del tejido adiposo (ad PLA_2) y la lisosomal ($L\text{-PLA}_2$) (figura 8) [73].

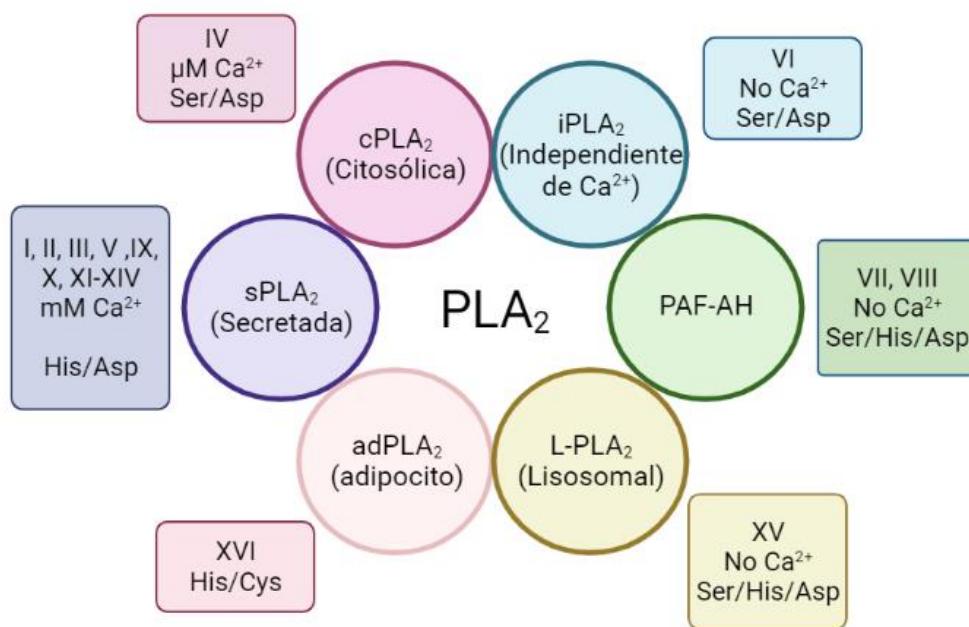


Figura 8. Clasificación de las fosfolipasas A₂ atendiendo criterios bioquímicos y funcionales. Las 6 grandes familias con sus consiguientes grupos indicados en números romanos tienen como factores distintivos el tamaño, la dependencia o no de Ca^{2+} y los aminoácidos catalíticos.

A continuación, se describen con detalle las características bioquímicas y funcionales de tres de estas familias, $c\text{PLA}_2$ (grupo IV), $i\text{PLA}_2$ (grupo VI) y $s\text{PLA}_2$ (grupos IIA, V y X), ya que se trata de las enzimas que se ha demostrado que participan activamente en los procesos de liberación de AA [74]. Las tres familias de enzimas participan frecuentemente en conjunto durante la activación celular a través de receptores inmunes innatos

- **cPLA₂**

La familia cPLA₂ consta de varias isoformas; cPLA_{2α} [75], cPLA_{2β}, cPLA_{2γ}, cPLA_{2δ} y cPLA_{2ζ} [76]. La primera cPLA₂ purificada y secuenciada fue la fosfolipasa A₂ de grupo IVA (cPLA_{2α}), la cual es dependiente de Ca²⁺. Esta enzima se expresa de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos aumentando su expresión en presencia de ciertos estímulos [77]. Además, contiene un dominio C2 en el N-terminal donde se produce la unión del Ca²⁺, lo cual promueve la translocación de la proteína a la membrana fosfolipídica [78,79]. Este dominio C2 está presente en todos los miembros de la familia con excepción de la forma γ (grupo IVC).

Diversos estudios han observado la translocación de cPLA_{2α} en presencia de Ca²⁺ a un gran número de estructuras celulares de membrana, tales como la envoltura nuclear, el retículo endoplásmico, las gotas lipídicas e incluso la membrana plasmática [80,81]. Estudios recientes han sugerido que la fosforilación de esta enzima en Ser⁵⁰⁵ es necesaria para su correcta translocación a la membrana [82]. Además, también se ha observado que la fosforilación de dicha enzima transloca a la misma a membranas enriquecidas en fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato [82]. La cPLA_{2α} también puede fosforilarse en otros residuos tales como Ser⁵¹⁵ y Ser⁷²⁷, aunque el papel biológico de dichas fosforilaciones se desconoce [82].

La cPLA_{2α} es una de las enzimas más importantes en situaciones inflamatorias ya que es la enzima principal en la liberación de AA de la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos de forma selectiva cuando la célula se encuentra en un ambiente proinflamatorio [83]. La liberación de este ácido graso n-6 es fundamental, ya que será metabolizado con posterioridad a través de diferentes vías enzimáticas como COX, LOX y CYP450 en eicosanoides, los cuales participan en la iniciación y resolución de la inflamación [84].

La selectividad de esta enzima por AA puede deberse a que el sitio activo de la cPLA_{2α} se encuentra enriquecido con residuos aromáticos que interaccionan con los cuatro dobles enlaces del AA a través de interacción π-π [73]. Sin embargo, su selectividad disminuye frente a otros ácidos grasos como el DHA que contienen otras posiciones de

dobles enlaces [74,85]. Además de esta actividad, la cPLA₂α también muestra actividad lisofosfolipasa y trasacilasa [86].

Gracias al empleo de ratones KO de cPLA₂α se ha podido comprobar que esta enzima tiene gran importancia en una serie de situaciones fisiopatológicas como fibrosis pulmonar, artritis y estres respiratorio agudo entre otras [87]. Además, se ha observado que la eliminación de esta enzima conduce a la desregulación de la señalización del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (*insulin-like growth factor-1*) y promueve el crecimiento del músculo esquelético estriado [88]. Asimismo, en animales deficientes de cPLA₂α que fueron sometidos a una dieta rica en grasas, se ha observado una reducida capacidad de aumentar el peso corporal, destacando el papel de dicha enzima en la regulación del agrandamiento del tejido adiposo [89].

• iPLA₂

Las iPLA₂ pertenecen al grupo VI y se caracterizan por no requerir Ca²⁺ para su actividad. Una de las enzimas mejor caracterizadas de este grupo es la enzima iPLA₂-VIA, también conocida como iPLA₂β.

Mientras que cPLA₂α se dirige a los fosfolípidos que contienen AA, iPLA₂β no tiene esa especificidad ante dicho ácido graso, siendo una enzima más versátil [74,90]. Además, aunque la actividad de la cPLA₂α es ligeramente superior sobre fosfolípidos que contienen ácido esteárico en posición sn-1, la actividad de la iPLA₂β aumenta en presencia de ácido palmítico en dicha posición [91].

La iPLA₂β muestra actividad lisofosfolípido transacilasa y transacilasa, pero no tiene actividad acil-CoA aciltransferasa. Además, esta enzima es capaz de hidrolizar cadenas hidrocarbonadas en fosfolípidos independientemente de su longitud y cuenta con actividad PAF acetilhidrolasa [92].

La iPLA₂β ha sido implicada en muchas funciones fisiológicas entre las que destacan la secreción de insulina y la hidrólisis de fosfolípidos en muerte celular apoptótica [68].

Una de las últimas funciones descubiertas de esta enzima es su capacidad de liberar las cadenas oxidadas de las cardiolipinas, lo cual protege a las células de daño oxidativo [93]. Además, una de sus primeras y principales funciones descritas es la capacidad para mantener los niveles celulares de lisofosfolípidos que servirán como aceptores para la reacilación de AA dentro del ciclo de Lands [92].

En estudios recientes, se ha confirmado que la iPLA₂β tiene un papel transcendental en la detoxificación de las células, ya que esta enzima es capaz de romper el enlace éster que une el esqueleto de glicerol al ácido graso oxidado, eliminando de esta manera el daño celular [94]. Estos estudios le confieren gran transcendencia a esta enzima, ya que su inhibición o sobreexpresión podrían ser una gran estrategia terapéutica ante ciertas patologías que impliquen la presencia de estos fosfolípidos oxidados. Hallazgos recientes demuestran que la proteína supresora de tumores, p53 media la activación de esta enzima disminuyendo los niveles de fosfolípidos oxidados bajo condiciones de alto estrés celular [95]. Hallazgos similares han sido reportados también en otro estudio en el cual muestran el papel protector de iPLA₂β en la defensa al daño placentario producido por la muerte de los trofoblastos en presencia de estos lípidos oxidados [96].

• sPLA₂

La familia sPLA₂ contiene 10 isoformas catalíticamente activas y una que en mamíferos se encuentra inactiva. Las principales funciones de las sPLA₂ implican propiedades antibacterianas y antivirales, regulación de la composición de LDL y HDL además de tener gran relevancia en enfermedades inflamatorias como es el caso de la aterosclerosis [97].

Al igual que iPLA₂β, las sPLA₂ contienen sitios activos más flexibles que la cPLA₂α, lo que les permite hidrolizar fosfolípidos con una gran variedad de ácidos grasos en posición sn-2. Su selectividad ante el sustrato en términos de cabeza polar es muy variable dependiendo de cada isoforma al igual que su preferencia por diferentes ácidos grasos. Mientras que ciertas isoformas no discriminan entre cadenas

hidrocarbonadas, otras lo hacen acorde al número de dobles enlaces. Así, la sPLA₂-V tiene preferencia a un menor número de dobles enlaces mientras que la sPLA₂X tiene preferencia por los PUFA [98].

Por otra parte, se conoce que estas enzimas, en especial la sPLA₂-V, amplifican la acción de la cPLA₂α a través de diferentes mecanismos. Estos implican efectos sobre los mecanismos de activación de la cPLA₂α en particular sobre su fosforilación [99-103]. En la **figura 9** se observa la interacción entre la cPLA₂ y la sPLA₂ cuando la célula se encuentra en presencia de un estímulo inflamatorio.

Estudios recientes han dado a conocer que, dependiendo de la especie, el comportamiento de estas enzimas difiere [74].

Un caso muy interesante es el de la sPLA₂-V, que en macrófagos de ratón transloca al fagosoma durante la fagocitosis, cosa que no ocurre en macrófagos humanos [104,105]. Sin embargo, a pesar de esta notable diferencia, la sPLA₂-V favorece la fagocitosis en ambos casos y por lo tanto actúa favoreciendo el proceso resolutorio de la inflamación [104]. Se ha observado igualmente que los ratones deficientes en sPLA₂-V muestran una notable disminución de su capacidad de movilizar AA durante la fagocitosis [106].

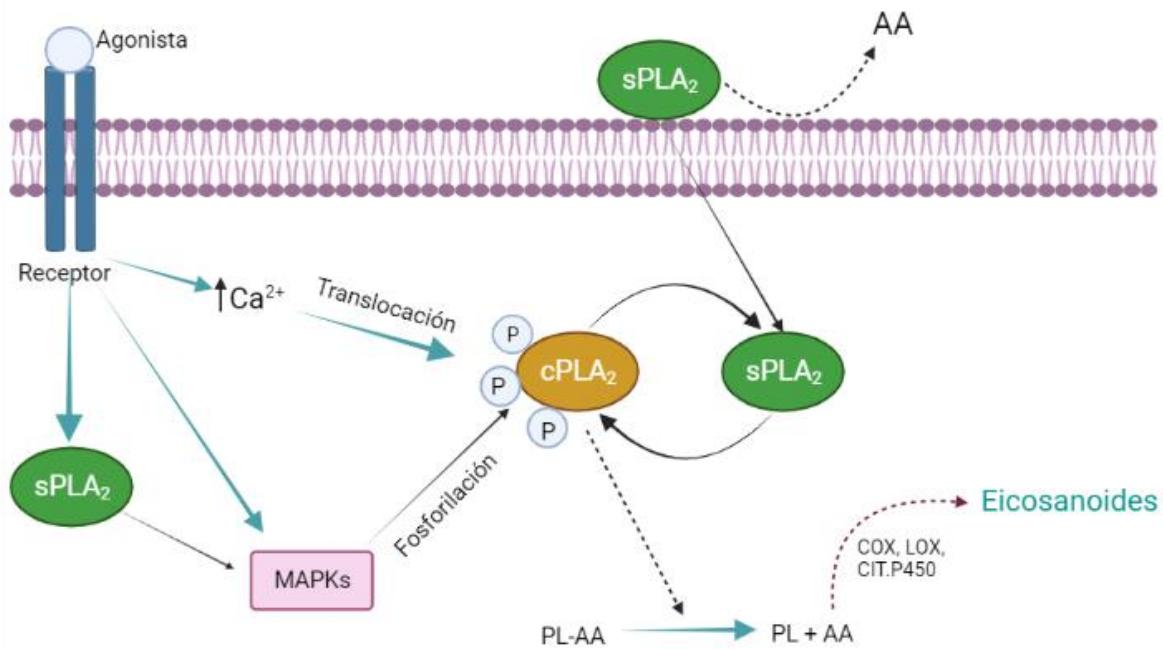


Figura 9. Relación entre las enzimas PLA₂ durante la activación celular vía receptores inmunes innatos.

En presencia de un estímulo inflamatorio, la cPLA₂ es fosforilada vía MAPK en presencia de Ca²⁺. Por su parte, la sPLA₂ amplifica la acción de la cPLA₂ a través de diferentes mecanismos.

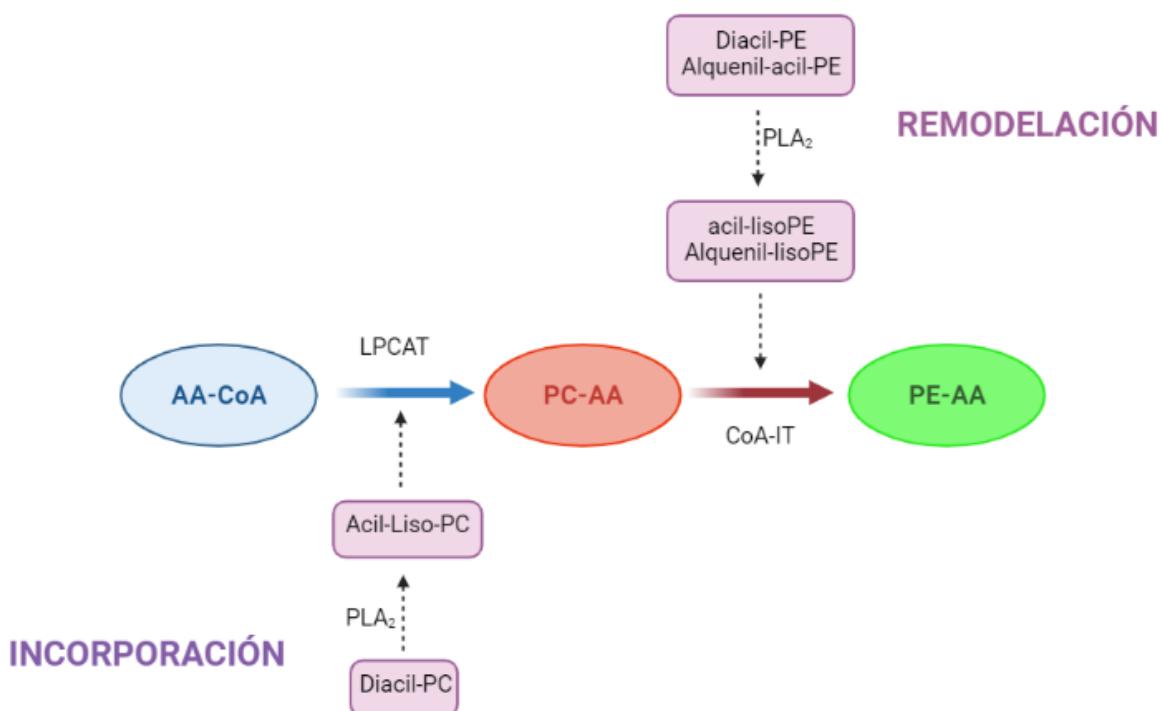
A.2.5 Reacciones de transacilación independientes de CoA

El movimiento de AA celular entre los diferentes reservorios celulares no solo se encuentra controlado por el proceso de acilación y desacilación de dicho ácido graso en los PL de membrana. También interviene un proceso de transacilación entre las diferentes clases de PL, en el cual el AA se distribuye entre diferentes PL, especialmente los plasmalógenos de PE, donde la cantidad de AA esterificado es muy elevada [107-109].

Estos procesos de transacilación se llevan a cabo a partir de una enzima denominada transacilasa independiente de CoA (CoA-IT), presente en células de los mamíferos y cuyo papel es transferir ácidos grasos de 20 y 22 carbonos de especies de PC, con un

enlace éster en posición sn-1 a fosfolípidos de etanolamina que contienen un enlace éster o vinil éter en la posición sn-1 (**figura 10**) [59]. Estudios recientes han comprobado que la tasa de remodelación en células normales y células deficientes en plasmalógeno de etanolamina no varía sustancialmente. Esto es debido a que las variantes deficientes en dichos plasmalógenos pueden compensar su deficiencia dirigiendo el AA a diacilfosfolípidos de PE [59,110].

Este proceso de remodelación de AA en PL es importante para la síntesis de eicosanoides en células activadas. Esta remodelación es la causa por la que, en condiciones de activación celular en presencia de zimosán, no se observen prácticamente variaciones en el contenido de AA en PE, ya que la perdida de dicho ácido graso por hidrólisis en condiciones de estimulación es revertida por la acción de la transacilasa, incorporando AA en PE desde las especies de PC [111,112].



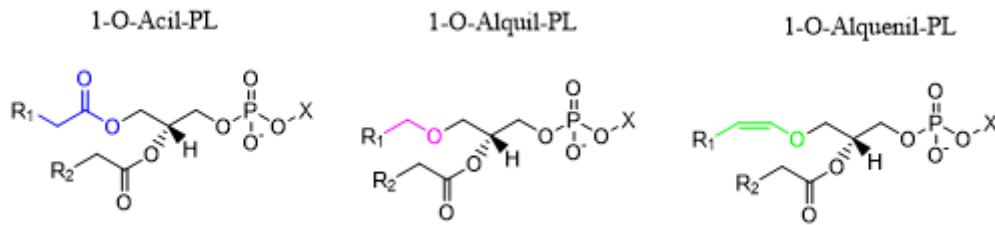


Figura 10. Esquema de Incorporación y remodelación de AA mediada por la enzima CoA-IT en fosfolípidos. Esquema representativo de 1-acil, 1-alquil y 1-alquenil glicerofosfolípidos. Los glicerofosfolípidos 1-alquenilo son llamados plasmalógenos.

La secuencia del gen de la CoA-IT hoy en día es aún desconocida, por lo cual la enzima solo se ha podido caracterizar en células mediante ensayos de actividad enzimática [113]. Además, se han podido identificar inhibidores farmacológicos de dicha enzima [114,115]. Se ha observado que el bloqueo por inhibición de dicho proceso puede provocar apoptosis celular [116,117].

La CoA-IT no se puede considerar como una PLA₂ en sentido estricto, ya que, a diferencia de estas, no genera ácidos grasos libres, sino que los transfiere directamente a otros aceptores fosfolípicos. Estudios recientes han mostrado que, al estimular macrófagos peritoneales con LPS, existe un aumento de la hidrolisis de AA en plasmalógenos de etanolamina, lo cual puede dar lugar a una menor actividad de remodelación de estos plasmalógenos con el AA liberado por las especies de PC y, por consiguiente, una actividad reducida de CoA-IT [118]. Esta transferencia más lenta de AA hacia plasmalógenos de etanolamina, conlleva que el AA permanezca en mayor medida en PC, por lo que puede ser hidrolizado en mayor cantidad a AA libre desde ese fosfolípido para generar eicosanoides específicos [107,113, 118,119]

La CoA-IT es una enzima integral de membrana e independiente de Ca²⁺. Yamashita et al. [120] fueron los primeros en sugerir que dichas reacciones de transacilación independientes de CoA son catalizadas por una o varias enzimas de la familia PLA₂, especulando con el posible papel de la fosfolipasa A₂ citosólica de grupo IVC, o cPLA₂γ como un posible candidato [121,122]. La actividad CoA-IT era mayor cuando el donante

de AA es lisoPC en vez de diacil-PC, lo que es consistente con el hecho de que la cPLA₂γ tiene mayor actividad lisofosfolipasa que fosfolipasa [123]. Estudios previos del laboratorio donde se ha llevado a cabo esta tesis demostraron que las células deficientes en cPLA₂γ transfieren AA de PC a PE de una manera menos eficiente que las células control [124]. Este dato apoya la implicación de la cPLA₂γ en reacciones de remodelación de fosfolípidos, aunque muy probablemente no es la única, pues su ausencia no elimina, sino que ralentiza este proceso [124].

Por otra parte, la remodelación de fosfolípidos es mucho más rápida en líneas celulares que en células primarias [125]. Esta diferencia parece deberse a los bajos niveles de AA esterificado en las líneas celulares en comparación con células primarias. Así la incubación de líneas celulares con AA aumenta el contenido celular de dicho ácido graso y disminuye la tasa de remodelación de este ácido graso, consecuencia de una reducción en la actividad de la transacilasa independiente de CoA [126]. Estos hallazgos confirman como los niveles celulares de AA son los que determinan la actividad de la trasacilasa independiente de CoA y como consecuencia la remodelación celular.

Además, existen diferentes factores que pueden condicionar la actividad de la enzima CoA-IT, entre la cual caben destacar situaciones de activación celular, en las cuales la velocidad de remodelación aumenta apreciablemente [127,128]

También se puede observar una gran diferencia entre células que proliferan y células que no, ya que en las primeras el proceso de remodelación conlleva unos minutos, mientras que en las segundas puede llevar horas [83,129].

A.2.6 Fosfolípidos oxidados y su papel en los procesos inflamatorios

La movilización celular del ácido araquidónico y la producción de eicosanoides derivados de este y de otros ácidos grasos poliinsaturados son características de la

inflamación, y el aumento de eicosanoides se produce tanto en alteraciones fisiopatológicas como en procesos celulares que provocan una lesión inflamatoria [130]. Los eicosanoides son lípidos bioactivos que participan en la regulación inmune al influir en la activación de las células fagocíticas inmunes innatas, tanto en la capacidad fagocítica, producción de citoquinas, diferenciación y migración [131,132]. Además, son capaces de regular la homeostasis en ciertas enfermedades, ya que su inhibición es una herramienta terapéutica estratégica [133].

Estos eicosanoides son sintetizados a partir del AA libre gracias a la ciclooxygenasa, lipoxigenasa y citocromo P-450 que generan las formas oxidadas de estos ácidos (**figura 11**). Al igual que el AA, el el ácido adrénico (AdA) también puede ser metabolizado por las mismas vías para generar eicosanoides derivados de este ácido graso [134]. Además, el AdA reduce el metabolismo del ácido araquidónico por la ciclooxygenasa [135].

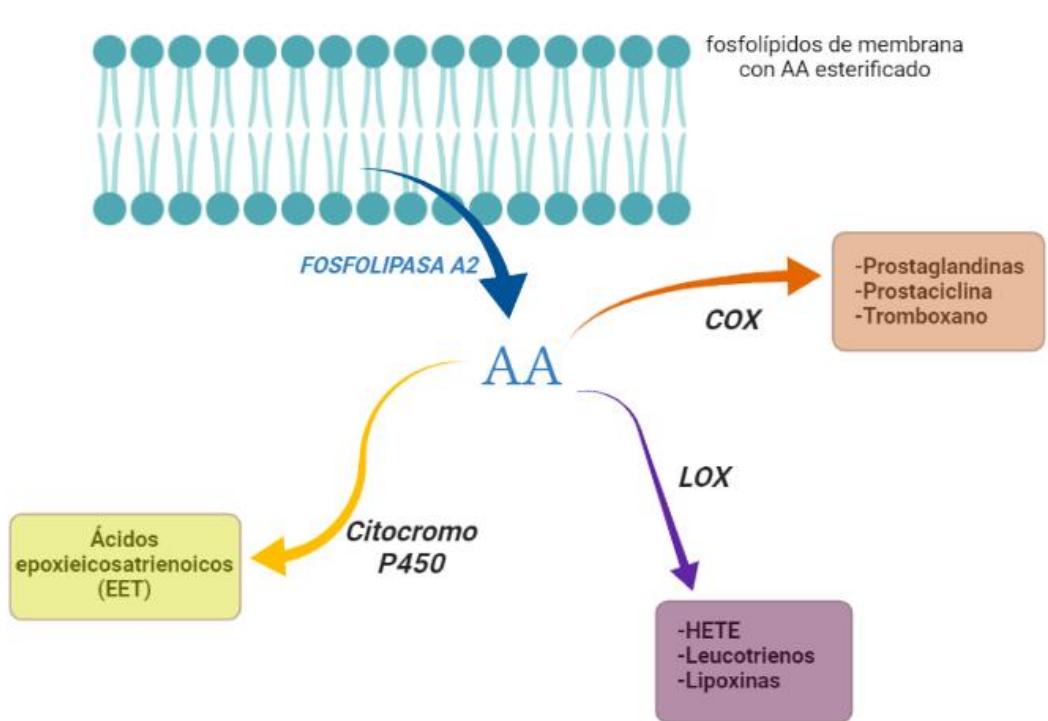


Figura 11. Rutas de síntesis de eicosanoides a partir de AA liberado de fosfolípidos de membrana gracias a la acción de la fosfolipasa. Para ello, diferentes vías enzimáticas como COX, LOX o Citocromo P450 toman parte en el proceso.

Hasta hace unos años, se creía que estos eicosanoides eran derivados de ácidos carboxílicos libres, generados por la hidrólisis de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente AA y metabolizados por diferentes vías enzimáticas. Estos lípidos oxidados difundían fuera de la célula y se unían a receptores acoplados a proteína G para desencadenar la correspondiente señalización[136]. Posteriormente, se demostró que varias de estas especies de eicosanoides, destacando las especies hidroxiladas, eran capaces de reesterificarse en diferentes fosfolípidos, no solo eicosanoides derivados de AA si no también otros ácidos grasos oxidados derivados de 22:4n-6, como son 22:5n-3 y 22:6n-3 [137], cuyos metabolitos oxidados, denominados mediadores proresolutivos (Maresinas, protectinas y resolvinas), poseen propiedades antiinflamatorias.

Los macrófagos peritoneales de ratón expresan una enzima en condiciones basales que es capaz de oxidar directamente los ácidos grasos esterificados en fosfolípidos, sin necesidad de una hidrólisis y posterior reesterificación [137]. Esta enzima, denominada 12/15 LOX, tiene su homólogo en monocitos periféricos humanos la cual toma el nombre de 15 LOX [138,139], siendo ambas capaces de oxidar directamente membranas purificadas. Además, tanto 15-LOX como sus productos oxidados regulan la activación de MAPK/ERK [140].

En los últimos años son numerosos los estudios llevados a cabo sobre el papel de PEBP1, una proteína que inhibe la cascada de las quinasas [141]. Esta proteína es capaz de generar complejos con las dos isoformas de 15-LOX, 15LO1 y 15LO2 y cambiar su competencia al sustrato para generar hidroxi-PE, teniendo gran relevancia en numerosas enfermedades relacionadas con la formación de esta especie oxidadas, como son el asma [142], fallo renal [143] o traumatismo cerebral entre otros [144].

El primer producto de oxidación de AA vía LOX es el ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE), el cual se reduce al ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE) a partir de glutatión peroxidasa, GPX4 [145,146]. Por otra parte, el HETE puede ser enzimáticamente oxidado a ácido cetoicosatetraenoico (oxoETE) (**figura 12**). Además, la posición de los grupos hidroxilo depende de la expresión específica de LOX en las células. Mientras que los neutrófilos humanos

expresan 5 LOX y generan 5-HETE-PE, el producto mayoritario formado en plaquetas es 12-HETE-PE y el isómero formado en monocitos y eosinófilos es 15-HETE-PE [147].

Sin embargo, los macrófagos peritoneales de ratón expresan 12/15 LOX en condiciones basales, generando como producto principal 12-HETE [137]. Estudios previos muestran la presencia dual de dos lipoxigenasas encargadas de metabolizar el AA en sus formas oxidadas, la 12/15-LOX y la 5-LOX. Mientras que la primera se encuentra activada en condiciones basales generando como metabolitos mayoritarios el 12-HETE y 15 HETE, la 5-LOX únicamente se activa en condiciones de estimulación celular generando 5-HETE y LTA₄, precursor del LTB₄ [148].

En estudios de incorporación de 5-HETE, 12-HETE y 15-HETE deuterado, se observó como el isómero 5-HETE es el ácido graso oxidado incorporado por los macrófagos peritoneales en condiciones de activación. Además, los aceptores principales de esta molécula son los fosfolípidos, aunque una pequeña parte son anclados en lípidos neutros o se mantienen como ácidos grasos libres [149].

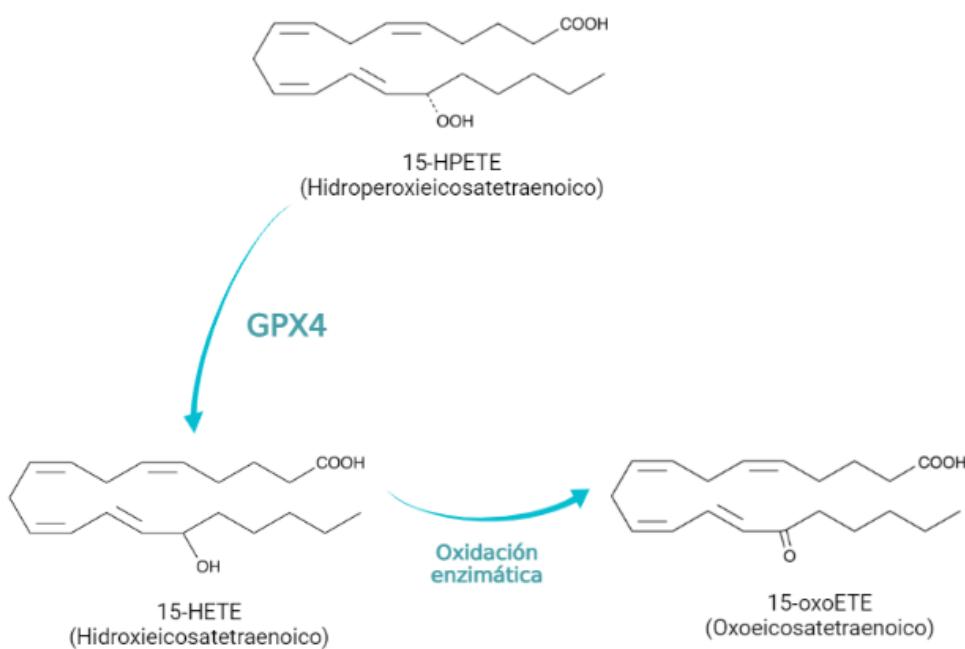


Figura 12. Ruta de reducción a través de la GPX4 y oxidación enzimática del fosfolípido oxidado mayoritario presente en monocitos, eosinófilos y macrófagos.

Los HETE-PE promueven en neutrófilos actividades antibacterianas, mientras que, en macrófagos, oxoETE-PE son agonistas de baja actividad ante PPAR γ [150,151]. Asimismo, no solamente las especies oxidadas de PE tienen grandes aplicaciones biológicas, destacando así el papel de HETE-PC como potentes procoagulantes como resultado de mejorar la unión de los factores de coagulación a las especies de fosfatidilserina [152].

Los fosfolípidos oxidados tienen gran relevancia en la inmunidad innata y en la inflamación [153]. Estos pueden servir como marcadores de inducción de apoptosis e interacciones más complejas como la regulación de ciertas respuestas inmunes [154]. Es sabido que un amplio número de receptores de la inmunidad innata reconocen estas especies oxidadas como antígenos, aunque también pueden servir como ligandos para los receptores scavenger, los cuales pueden reconocer tanto oxPL libre presente en oxLDL así como oxPL unido covalentemente a la apoB100. Además, oxPL también se acopla a la PCR (proteína C reactiva), la cual indica riesgo de enfermedad cardiovascular a niveles altos [155].

También es reconocido su papel en la activación de la agregación plaquetaria y en la adhesión de monocitos, al igual que la producción de citoquinas teniendo de esta manera un rol muy importante en base a su papel pro y antiinflamatorio en las etapas tempranas de la aterogénesis [156,157].

A.3 Polarización de macrófagos y su papel en enfermedades inflamatorias:

Los macrófagos son una población celular heterogénea que exhibe una amplia gama de fenotipos funcionales. Se sabe que estas células se infiltran en la pared vascular durante la aterosclerosis y en el tejido adiposo durante la obesidad [158,159]. En estos

tejidos se han encontrado dos subpoblaciones distintas, con funciones marcadamente diferentes, a saber, los macrófagos activados clásicamente (M1) y alternativamente (M2) (**figura 13**). Los macrófagos M1, producidos por la exposición a interferón- γ y LPS, exhiben potentes propiedades microbicidas [160,161]. El fenotipo alternativo M2, promovido por la exposición a las interleucinas -4 y -13, es funcionalmente antiinflamatorio y pro-resolutivo, protegiendo a los tejidos de un daño excesivo [162].

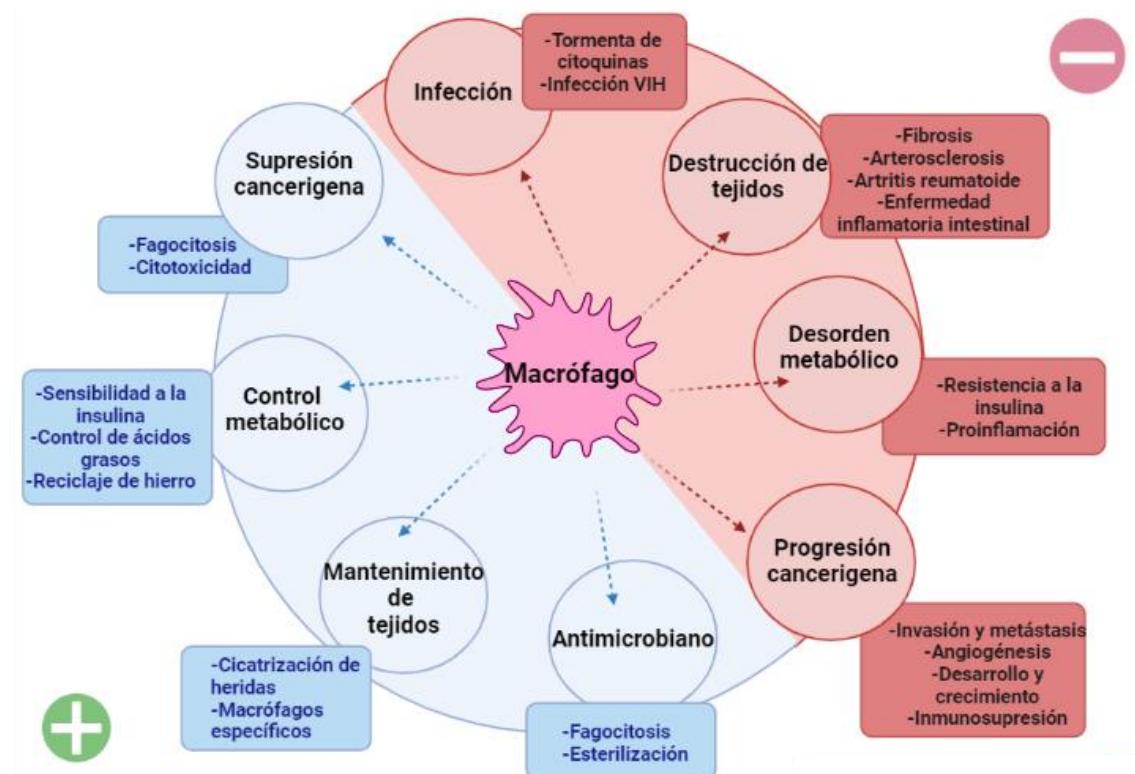


Figura 13. Roles positivos y negativos de los macrófagos debido a su plasticidad para adquirir diferentes fenotipos.

Los marcadores descritos para los estados M1 y M2 se han encontrado expresados en diferentes situaciones fisiopatológicas. La activación macrofágica se considera como un continuo de estados funcionales sin límites bien definidos, donde M1 y M2 supone los extremos. La plasticidad de los macrófagos hace que la asignación de marcadores bioquímicos a cada población sea una tarea difícil. Además, se ha observado como, los

estados de activación del macrófago varían en función de la temporalidad de la inflamación o de la enfermedad [163,164].

Por una parte, los macrófagos M1 liberan óxido nítrico producidos por iNOs y una serie de citoquinas proinflamatorias [165] como TNF α [166], IL-12, IL 1 β o IL23, las cuales son capaces de eliminar organismos infecciosos como virus y bacterias y también células tumorales [167]. Las células muertas son fagocitadas y enviadas a lisosomas donde se degradan por acción de las enzimas hidrolíticas contenidas en los mismos. Por este motivo entre otros, se cree que los macrófagos M1 mantienen la homeostasis en defensa contra infecciones.

Sin embargo, los macrófagos polarizados a M2 producen TGF β , IL10 e IL4 con el fin de reducir o terminar con la respuesta inflamatoria [165]. Además, estos macrófagos actúan como células fagocíticas, eliminando las sustancias de desecho y participan de manera activa en la reparación de los tejidos y la tolerancia del sistema inmune [168].

El estado de polarización de los macrófagos viene definido por una serie de marcadores. Así, el estado proinflamatorio M1 es reconocido por una alta expresión de CCR7, CD11c, IL-6, IL12p40, TNF α y de NOS2 [169], mientras que por otra parte el fenotipo antiinflamatorio M2 expresa Arg-1, el receptor de manosa CD206, Mrc2, Ym-1 y Fizz-1 [170].

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que los macrófagos con polarización M1 secuestran el hierro libre mientras que los que tienen el fenotipo M2 reciclan el hierro liberándolo al exterior, lo cual puede servir también como marcador biológico. El hierro es un factor esencial para el crecimiento y la supervivencia de bacterias, por ello su homeostasis es un factor clave para favorecer la defensa del huésped y combatir infecciones [171]. La polarización afecta a la expresión tanto de ferritina (acumulación de hierro) como de la ferroportina (exportación de hierro) los cuales recaen directamente en los niveles intracelulares de hierro. Los macrófagos M1 tienen una relación ferritina/ferroportina alta, lo cual desemboca en una elevada acumulación de hierro en la célula, mientras que el fenotipo M2 tiene una relación más baja dando lugar a una mayor liberación del hierro al medio extracelular [172]. Esta acumulación o liberación respectiva del hierro conlleva una serie de

consecuencias para ambos fenotipos macrofágicos como se explica en la **figura 14**. Además, los macrófagos antiinflamatorios cuentan con niveles elevados de receptores scavenger en comparación con las células proinflamatorias, los cuales tienen un papel transcendental en la liberación de los grupos hemo.

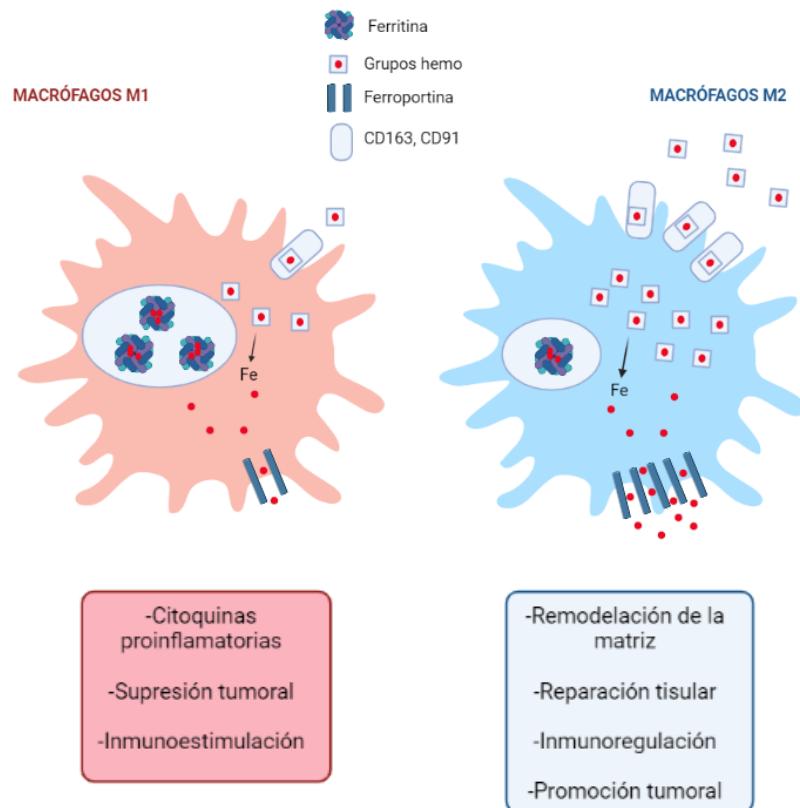


Figura 14. Metabolismo del hierro en macrófagos polarizados. La alta relación ferritina/ferroportina en los macrófagos M1 producen una elevada acumulación de hierro intracelular. Sin embargo, en los macrófagos M2 la relación es mucho más baja, experimentando una mayor liberación de hierro lo cual conlleva consecuencias metabólicas.

Los macrófagos polarizados a M2 regulan al alza la expresión de ciertos receptores scavenger como CD206, CD163 y el receptor de macrófagos con estructura de colágeno, los cuales se encuentran estrechamente relacionados con la función fagocítica y la eliminación de desechos celulares [173-175]. Además, se ha observado que, en ratones que carecen de macrófagos M2, la fagocitosis disminuye notablemente en condiciones de infección [176].

Estas células se encuentran implicadas en numerosas enfermedades como la aterosclerosis, en la cual participan ambos fenotipos de manera heterogénea [177]. Ha sido demostrado que los macrófagos con fenotipo proinflamatorio se encuentran en mayor proporción en pacientes con síntomas de ataque isquémico, mientras que los pacientes asintomáticos tienen una mayor población de macrófagos M2 [178]. Además de estos dos fenotipos, también se han encontrado diferentes fenotipos en la placa de ateroma[179].

Los macrófagos polarizados también participan en enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad como la diabetes tipo 2 [181,182]. Estudios realizados muestran que el macrófago con fenotipo proinflamatorio secreta IL-1 β y responden a un aumento de la inflamación, resistencia a la insulina y obesidad, mientras que los M2 favorecen a una actuación totalmente contraria reduciendo de esta manera la obesidad y la resistencia a la insulina [183]. La transición de los macrófagos de un fenotipo M2 a un fenotipo M1 genera cierta resistencia a la insulina, siendo transcendental el equilibrio entre las dos poblaciones macrofágicas en situaciones inflamatorias [184].

Por otra parte, los macrófagos se pueden infiltrar en microambientes tumorales reclutados por varios factores de crecimiento y quimiocinas liberadas por las células tumorales, empeorando de esta manera la enfermedad ya que favorecen la proliferación y la metástasis de las células tumorales. Se sabe que estos macrófagos infiltrados tienen tanto actividades pro como antiinflamatorias llevadas a cabo por dos subpoblaciones de diferente fenotipo [185]. En un estudio llevado a cabo por Halama et al. se observó que, en un modelo de metástasis de cáncer colorrectal, una repolarización desde M2 a M1 llevado a cabo a través de STAT3 indujo un ambiente antitumoral, lo cual podría ser una posible diana terapéutica [186].

Los macrófagos polarizados también tienen un papel trascendental en los estados de infección vírica. Así, los macrófagos polarizados a un fenotipo proinflamatorio M1 son capaces de generar una represión transcripcional y un retraso en la integración del DNA proviral generando cierta resistencia a la infección por VIH-1 [187]. La gran flexibilidad de los macrófagos en adaptar dicho fenotipo les confiere una mejora en el

proceso de presentación de antígenos, mejorando la respuesta inmune adaptativa a dicha infección [188].

NOMENCLATURA UTILIZADA EN ESTA TESIS

Los ácidos grasos se designan de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC del siguiente modo: número de átomos de carbono y, después de dos puntos, número de enlaces dobles. Para diferenciar los isómeros se utiliza la nomenclatura n-x (n menos x), donde n es el número de carbonos del ácido graso y x es un número entero que, restado de n, da la posición del último doble enlace de la molécula. Ejemplo: 20:4n-6 indica un ácido graso de 20 carbonos y cuatro insaturaciones, la última de ellas en el carbono 14; se trata del ácido araquidónico.

La nomenclatura utilizada para abreviar las especies individuales de fosfolípidos sigue las recomendaciones realizadas por el consorcio LIPID MAPS. Se indica en primer lugar la clase (PC, PE, PI, PS) seguida por un paréntesis en donde se indican los ácidos grasos en su forma abreviada. En primer lugar, se indica el ácido graso que se halla en posición sn-1 y después el que se halla en posición sn-2, ambos separados por una barra inclinada. Ejemplo: PC(18:0/20:4) indica la especie 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina. Cuando en posición sn-1 no hay un enlace éster, esto se hace notar añadiendo al comienzo del paréntesis O- (si se trata de un éter) o P- (si se trata de un vinil éter). Ejemplos: PC(O-18:0/20:4) indica la especie 1-O-octadecil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina; PC(P-18:0/20:4) indica la especie 1-O-1'-octadecil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

B. OBJETIVOS

Debido a la gran importancia del papel del AA en procesos inflamatorios, tanto en la iniciación y en la resolución de la inflamación, el principal objetivo es conocer el metabolismo de este ácido graso en fosfolípidos en condiciones de activación celular en macrófagos peritoneales de ratón. De forma más específica:

- Examinar la movilización del AA de diferentes clases de fosfolípidos en presencia de un estímulo inflamatorio y formación de eicosanoides
- Describir la implicación de diferentes fosfolipasas en hidrólisis y liberación de AA

Además, es de gran relevancia el estudio de la movilización del AA entre diferentes reservorios celulares y observar diferencias dependiendo del estado celular, por lo cual se plantea:

- Estudiar la remodelación del AA en fosfolípidos bajo condiciones de activación.

Por otro lado, teniendo en cuenta el gran impacto de fosfolípidos que contienen AAox tanto a nivel de muerte celular como relacionados con enfermedades metabólicas y neurodegenerativas observado a lo largo de los últimos años, también se ha propuesto el estudio metabólico del AAox producido en macrófagos peritoneales de ratón. De forma más específica los objetivos perseguidos en este punto del trabajo son los siguientes:

- Estudiar la formación de AAox-PL en presencia de un estímulo inflamatorio
- Explorar el papel de diferentes fosfolipasas en la formación de AAox-PL y movilización de dicho ácido graso.
- Analizar la posición de oxidación del AAox esterificado en fosfolípidos en condiciones de activación

Otro punto objeto de estudio es el metabolismo y regulación del AdA que tiene como precursor el AA, dada la gran importancia de los ácidos grasos n-6 en los procesos inflamatorios. En detalle, los objetivos propuestos en este punto de la tesis son los siguientes:

- Estudiar la distribución del AdA entre las diferentes clases de fosfolípidos y su movilización en presencia de un estímulo inflamatorio.

- Explorar la participación de diferentes fosfolípasas en la movilización del AdA
- Elucidar si, el AdA tiene un mecanismo de incorporación a fosfolípidos competitivo con AA y, por ende, a los niveles de AA móvil en condiciones de estimulación.

Finalmente, debido a la importancia del estudio y comprensión de cómo afecta un proceso inflamatorio a las diferentes polarizaciones clásicas descritas en macrófagos peritoneales polarizados se han propuesto los siguientes objetivos:

- Estudio del perfil de fosfolípidos con ácidos grasos n-6 (AA y AdA) y n-3 (EPA, DPA y DHA) en ambas condiciones de polarización bajo condiciones de activación.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

C.1. MATERIALES

C.1.1 Cultivo celular

Medio DMEM (Lonza)

Medio RPMI 1640 (Gibco)

Suero humano (Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León)

Suero fetal bovino (FBS) (Gibco)

Penicilina (Gibco)

Estreptomicina (Gibco)

Placas y frascos para cultivo celular (BD biosciences)

Raspadores de células (BD biosciences)

C.1.2 Disolventes y reactivos líquidos

C.1.2.1 Extracción, separación y análisis de lípidos

Agua mili-Q, ultrapura (Milipore)

Cloroformo, calidad HPLC (Thermo Fisher)

Metanol, calidad HPLC (Thermo Fisher)

n-hexano, calidad HPLC (Sigma- Aldrich)

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

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

Dietil éter (Scharlab)
Ácido acético glacial (Scharlab)
Acetonitrilo calidad HPLC (Sigma- Aldrich)

C.1.2.2 Otros usos

Eanol, absoluto (Scharlab)
Dimetil sulfóxido (DMSO), extrapuro (Scharlab)
Ácido sulfúrico, extrapuro (Scharlab)
Metanol 99,8% anhidro (Sigma- Aldrich)
Ácido clorhídrico 35% (Scharlab)
Reactivos Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) (Bio-Rad)

C.1.3 Reactivos y productos sólidos

Albumina de suero bovino (BSA) (Sigma- Aldrich)
Acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (Sigma- Aldrich)
Hidróxido de potasio (KOH) (Scharlab)
Hidróxido de sodio (NaOH) (Scharlab)
Yodo (Scharlab)
Ácido bórico (Scharlab)
Cloruro sódico (Scharlab)
Tris-HCl (Scharlab)
Cubetas para espectrofotómetro
Cartuchos de silice de extracción en fase sólida (C18) (Sigma- Aldrich)

C.1.4 Gases

Nitrógeno, extrapuro (Air líquide)

Dióxido de carbono, extrapuro (Air líquide)

Argón, extrapuro (Air líquide)

Helio, extrapuro (Air líquide)

C.1.5 Estímulos

LPS de Escherichia coli (Sigma- Aldrich)

PMA (Forbol 12-Miristato-13-Acetato) (Sigma- Aldrich)

A23187 (Ionóforo de calcio) (Sigma- Aldrich)

Zimosán (Sigma- Aldrich)

Manano-Laminarina (Sigma- Aldrich)

IFN γ (InmunoTools)

IL13 (InmunoTools)

IL4 (InmunoTools)

[3 H]AA (Sigma- Aldrich)

C.1.6 inhibidores

Inhibidor de cPLA $_2\alpha$ (pirrofenona) (Calbiochem)

Inhibidor de iPLA $_2\alpha$ (FKGK18) (Sintetizado y proporcionado por el Dr. G. Kokotos;
Departamento de Química, Universidad Nacional y Kapodistria de
Atenas)

Inhibidor de iPLA $_2\alpha$ (BEL) (Cayman)

Inhibidor de iPLA_{2α} (GK436) (Sintetizado y proporcionado por el Dr. G. Kokotos; Departamento de Química, Universidad Nacional y Kapodistria de Atenas)

Inhibidor de sPLA_{2α} (GK241) (Sintetizado y proporcionado por el Dr. G. Kokotos; Departamento de Química, Universidad Nacional y Kapodistria de Atenas)

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

C.1.7 lípidos

C.1.7.1 Tratamientos celulares

Ácido adrénico (AdA, 22:4 n-6) (Sigma- Aldrich)

C.1.7.2 Estandares internos para espectrometría de masas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C.1.7.3 Patrones para la separación por cromatografía en capa fina

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

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

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

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

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

Fosfatidilinositol hígado, bovino (PI) (Avanti)

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

C.1.8 Microscopía de fluorescencia

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

(Thermo Fisher)

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

Paraformaldehído (EMS)

Cubres y portas (Thermo Fisher)

C.1.9 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y qPCR

TRIzol® (Thermo Fisher)

2-propanol o isopropanol calidad biología molecular (Scharlab)

Etanol, calidad biología molecular (Scharlab)

Cloroformo, calidad biología molecular (Scharlab)

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

Kit Verso CDNA (Thermo Fisher)

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

C.1.10 Tampones

NOMBRE	COMPOSICIÓN	USO
Tampón fosfato salino (PBS)	NaCl 136 mM KCl 2.7 mM Na ₂ HPO ₄ 8mM KH ₂ PO ₄ 1.5 mM	Lavado de células

Tabla 2. Tampones

C.1.11 Material biológico

Los experimentos con macrófagos peritoneales se realizaron con la cepa Swiss Webster que fueron criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Se emplearon Swiss machos de entre 2 y 3 meses de edad los cuales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (21°C-24°C), con etapas de luz y de oscuridad cada 12 horas. Fueron alimentadas con ab libitum con dieta especial para animales de laboratorio y agua.

Los protocolos del estudio fueron aprobados por el comité de ética de investigación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, y todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la normativa 86/609/ECC de la Comunidad Europea y la legislación española que regula la investigación animal (RD 1201/2005, BOE 252/34667-91, 2005), vigente para el uso y cuidado de animales de experimentación.

C.2. EQUIPAMIENTO

C.2.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

C.2.1.1 Equipos

Ultimate HPG-3400SD standard (bomba binaria) (Thermo Scientific)

Ultimate ACC-3000 (inyector automático) (Thermo Scientific)

QTRAP 4500 (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo) (AB sciex)

Turbo V (fuente de ionización) (AB sciex)

TurbolonSpray probe (ionización por electrospray) (AB sciex)

C.2.1.2 Columnas

FORTIS HILIC (150 x 3mm, 3 µM tamaño de partícula) (Fortis)

SUPELCOSIL LC-Si (Sigma-Aldrich)

C.2.1.3 Precolumnas

Supelguard LC-Si guard cartridge (Sigma-Aldrich)

C.2.1.4 Software de control y análisis de datos

Analyst v.1.5.2 (AB Sciex)

C.2.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

C.2.2.1 Equipos

Agilent 7890A (cromatógrafo de gases) (Agilent)

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

C.2.2.2 Columnas

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

C.2.2.3 Software de control y análisis de datos

Software del análisis y control: Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation

C.2.3 PCR cuantitativa (qPCR)

ABI7500 (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA)

Analysis software: 7500 Software v.2.3

C.2.4 Microscopía confocal de fluorescencia

Microscopio confocal Leica TCS SP5X

Software Image J (NIH)

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

C.2.5 Otros equipos

C.2.5.1 Sonicador de punta

Vibracell 75115 (Bioblock Scientific)

C.2.5.2 Reacciones a temperatura controlada

Termobloque (Grant)

Baño con agitación (Julabo)

C.2.5.3 Evaporación de disolventes

Concentrator 5301(Eppendorf)

C.2.5.4 Cuantificación de RNA

Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher)

C.2.5.5 Espectrofotómetro

BioPhotometer Plus (Eppendorf)

C.2.5.6 Balanza de precisión

Explorer Pro (Ohaus)

C.2.6 Base de datos

C.2.6.1 Espectrometría de masas

- Biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST 98 Mass Spectral Library)
- Base de datos de *LIPID MAPS* (<http://www.lipidmaps.org>)
- Calculador de masas y estructuras de lípidos del Dr. Robert C. Murphy, de la Universidad de Colorado (<http://pharmacology.ucdenver.edu/lipidcalc>)
- The Lipid Library, proporcionada por la American Oil Chemists' Society (AOCS) (<http://lipidlibrary.aocs.org>)

C.3. MÉTODOS

C.3.1 Aislamiento celular

C.3.1.1 Extracción de macrófagos peritoneales murinos

Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂. Se retiró la piel del abdomen y se inyectan 5 ml de PBS frío (por ratón) en la cavidad peritoneal. Se masajeó el abdomen, y se extrajo de nuevo el PBS. Posteriormente se centrifugan a 300 xg durante 10 minutos. Los macrófagos peritoneales se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina y se dejaron adherir a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Pasadas 3 horas de su extracción, las células no adherentes se eliminaron realizando un lavado con PBS (1X) y se añadió medio nuevo con el fin de eliminar células muertas e impurezas. Los macrófagos adheridos se utilizaron para realizar la parte experimental [189]. Este protocolo se realizó bajo condiciones de esterilidad.

C.3.2 Otras metodologías

C.3.2.1 Estímulos e inhibidores

Se cultivaron los macrófagos peritoneales de ratón con medio con suero previo conteo de estas empleando la cámara de Neubauer. La densidad celular empleada fue de 1 millón de células por ml de medio.

Una hora antes de realizar la estimulación, el medio con suero se sustituyó a medio sin suero.

En el caso de añadir inhibidores, estos se añaden media hora antes del estímulo correspondiente.

Cuando se tratan las células con ácidos grasos disueltos en etanol o DMSO nunca se supera la proporción 1:1000 respecto al volumen en el cual están las células en cultivo, añadiendo el mismo volumen a las células control sin estos estímulos o inhibidores.

C.3.2.2 Tratamiento AdA

Cuando el enriquecimiento de AdA fue necesario, las células fueron preincubadas durante 30 minutos con 1 μM de este ácido graso, con anterioridad al estímulo.

C.3.2.3 Medida de proteína

Las células fueron recogidas y sonicadas en MeOH/H₂O de 400 μL con una amplitud de 23% en 3 periodos de 15 segundos cada uno. Este proceso fue llevado a cabo para obtener una muestra más homogénea posible.

Posteriormente, se procedió a medir la proteína por el método Bradford[190] utilizando un kit comercial (BioRad Protein Assay). Este es un método colorimétrico que permite medir por absorbancia (a 590 nm) la cantidad de proteína presente en una muestra con elevada sensibilidad.

Para su posterior cuantificación se realizó con anterioridad a la medida de las muestras una línea de calibrado en presencia de BSA (albumina de suero bovina) con el fin de extrapolar las absorbancias obtenidas en las diferentes muestras y calcular la proteína total.

C.3.2.4 Preparación de zimosán y zimosán opsonizado

Las partículas de zimosán se resuspendieron en PBS y se hirvieron a 100°C durante una hora y posteriormente se centrifugaron durante 30 minutos a 3220 x g y se lavaron tres veces. El pellet se resuspendió en PBS para alcanzar una concentración de 20 mg/ml y se congelo. Para su posterior uso, este zimosán se lavó con PBS 3 veces, se sónicó tres veces durante 15 segundos y se resuspendió en medio libre de suero para finalmente añadirlo a las células [191].

Para la preparación de zimosán opsonizado, el zimosán congelado se lavó con PBS 2 veces y se resuspendió en suero humano sin inactivar en una relación 10 mg de zimosán por cada ml de suero. Se calentó a 37°C durante 20 minutos agitando cada 5 minutos y finalmente se lavó con PBS sonicandose 3 veces durante 15 segundos para ser adicionado a las células en última instancia [112].

C.3.3 Análisis de lípidos

C.3.3.1 Extracción de lípidos de células

Para la extracción de lípidos de células se empleó un protocolo establecido por Bligh & Dyer [192]. Las células se resuspendieron en 400 µl de MeOH/H₂O y se añadieron los patrones correspondientes para ser medidos posteriormente.

Primeramente, se añadieron 3,75 volumenes de cloroformo/metanol 1:2 (v/v), se agitó la mezcla y se añadieron 1,25 volumenes de cloroformo y 1,25 volumenes de agua mili-Q. Las muestras se agitaron durante 1 minuto aproximadamente y se centrifugaron a 9300 xg 15°C y 5 minutos. Finalmente, los lípidos se trajeron de la fase orgánica. Posteriormente se realizó una segunda extracción añadiendo 2 volumenes de cloroformo, se agitó durante 1 minuto y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriormente expuestas. Se recogió de nuevo la fase orgánica (juntándola con la fase anterior) y se evaporó toda la fase orgánica obtenida por centrifugación a vacío para su posterior medida por el protocolo deseado.

C.3.3.2 Análisis de fosfolípidos por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Se empleó esta técnica para identificar especies de fosfolípidos de PC, PE, PI, PS, PA y PG. Para ello, se tomó una muestra correspondiente a 50 µg/100µl, obtenida anteriormente por el método de Bligh & Dyer recientemente explicado. Esta muestra debía contener 20 pmol de cada patrón correspondiente. Las muestras se redissolvieron en 100 µl de isómeros de hexano/isopropanol/ + 20 mM AcONH₄ en H₂O (30:40:7, v/v/v), y se inyectaron 10 µl en un cromatógrafo líquido de alto rendimiento con un inyector automático Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher) equipado con una bomba binaria Ultimate HPG-3400SD (Thermo Fisher).

El protocolo empleado para la medida de fosfolípidos fue obtenido de Axelsen & Murphy [193] en el cual empleaban fase normal para el análisis de estas especies. La columna empleada fue FORTIS HILIC (150 mm x 3 mm, 3 mm tamaño de partícula) y la fase móvil empleada fue un gradiente de fase móvil A (Hexanos/ Isopropanol 30:40 v/v) y como fase móvil B (Hexanos/isopropanol/ 20mM de acetato amónico en agua 30:40:7 v/v).

El flujo empleado en la carrera cromatográfica fue de 400 µl/min. Los parámetros propios del espectrómetro de masas para este protocolo fueron: CUR (gas cortina) = 20 psi, GS1 (Gas de nebulización) =35 psi, GS2 (Gas de desolvatación) =65 psi, IS (Voltaje de spray) = -4500V/+5500V, TEM (temperatura de desolvatación) = 400°C

La adquisición de las diferentes especies de fosfolípidos fue realizada en modo ionización negativa [M-H]⁻ mientras que la especie de PC se registró como un aducto de acetato [M+CH₃COO]⁻, empleando el método MRM (Multiple Reaction Monitoring) en el cual se asigna la masa ionizada inicial (ion padre) en Q1 y la masa del ion hijo en Q3.

El gradiente de disolventes empleados en la carrera cromatográfica se muestran en la siguiente tabla:

Tiempo de carrera	Eluyente A(%)	Eluyente B(%)
0	75	25
5	75	25
15	40	60
20	5	95
40	5	95
41	75	25
50	75	25

Tabla 3. Gradiente de disolventes para el análisis de fosfolípidos por HPLC-MS

Además, cada clase de fosfolípido tiene diferente PD (potencial de desagrupación) y EC (Energía de colisión) dependiendo de su cabeza polar.

	PD(V)	CE (V)
PC	-100	-75
PE	-60	-60
PI	-100	-90
PS	-60	-90
PA	-60	-90
PG	-75	-70

Tabla 4. Parámetros de DP y CE para el análisis de fosfolípidos en fase normal por HPLC-MS

La caracterización de las diferentes especies de fosfolípidos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de los patrones con las diferentes especies a analizar, además de estudiando el espectro de fragmentación de cada especie a analizar. La cuantificación posterior se llevó a cabo integrando el área bajo la curva y comparándolo con el área del patrón interno añadido que corresponde a cada clase de fosfolípido [112,194].

C.3.3.3 Extracción en fase sólida de eicosanoides en sobrenadantes

Para la extracción de eicosanoides de sobrenadantes de macrófagos peritoneales de ratón, se empleó el protocolo del fabricante de Agilent.

A los sobrenadantes recogidos (4 ml) se les añadió los patrones correspondientes para su posterior medida por cromatografía de líquidos masas (200 pmol de d₄-PGE₂ y d₄-LTB₄). Posteriormente, se añadió a cada muestra 10% (v/v) de MeOH sobre el volumen final total y 50 µl de Ác. Acético al 10% en H₂O por ml de fase acuosa inicial.

Para comenzar, los cartuchos de silice con los cuales se va a purificar la muestra deben de acondicionarse, empleando 3 ml de MeOH y 3 ml de H₂O. Una vez homogeneizados, se cargó la muestra y se lavó la columna con 3 ml de 10% MeOH en H₂O para, de esta manera, eliminar posibles impurezas presentes en la misma. Finalmente, se eluyeron los eicosanoides con 1,5 ml de MeOH y se evaporaron hasta sequedad, eliminando las ultimas trazas de disolvente con N₂.

C.3.3.4 Análisis de eicosanoides por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Se empleó esta técnica para identificar cualquier tipo de eicosanoide generado por la célula y liberado al medio extracelular. Para ello, se tomó una muestra obtenida anteriormente por el método de extracción en fase sólida recientemente explicado. Esta muestra debía contener 20 pmol de cada patrón correspondiente.

El protocolo empleado para la medida de eicosanoides empleó fase reversa para el análisis de estas especies. La columna empleada fue SUPELCOSIL LC-18 (250 x 2.1 mm, 5 µm tamaño de partícula) y la fase móvil empleada fue un gradiente de fase móvil A (agua/ acetonitrilo/ácido acético 70:30:0.02 v/v) y como fase móvil B (acetonitrilo/isopropanol 50:50 v/v).

El flujo empleado en la carrera cromatográfica fue de 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. Los parámetros propios del espectrómetro de masas para este protocolo fueron: CUR (gas cortina) = 20 psi, GS1 (Gas de nebulización) = 45 psi, GS2 (Gas de desolvatación) = 70 psi, IS (Voltaje de spray) = -4500V, TEM (temperatura de desolvatación) = 525°C

La adquisición de las diferentes especies de eicosanoides fue realizada en modo ionización negativa $[\text{M}-\text{H}]^-$, empleando el método MRM (Multiple Reaction Monitoring) en el cual se asigna la masa ionizada inicial (ion padre) en Q1 y la masa del ion hijo en Q3.

El gradiente de disolventes empleados en la carrera cromatográfica se muestran en la siguiente tabla:

Tiempo de carrera	Eluyente A(%)	Eluyente B(%)
0	100	0
3	75	25
11	55	45
13	40	60
18	25	75
18.5	10	90
20	10	90
21	100	0
30	100	0

Tabla 5. Gradiente de disolventes para el análisis de eicosanoides en fase reversa por HPLC-MS

La caracterización de los distintos eicosanoides se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de los patrones con las diferentes especies a analizar, además de estudiando el espectro de fragmentación de cada especie a analizar. La cuantificación posterior se llevó a cabo integrando el área bajo la curva y comparándolo con el área del patrón interno añadido [104,113].

C.3.3.5 Separación lipídica por cromatografía en capa fina

La separación de las diferentes clases de lípidos a partir de un extracto lipídico global se llevó a cabo por cromatografía en capa fina usando placas con silice como fase estacionaria. Las placas se activan primeramente secándolas a 70°C durante aproximadamente 1 hora. Las muestras fueron resuspendidas en un volumen pequeño de unos 20 µl de cloroformo/metanol (1:1) y posteriormente inyectadas en la placa, al mismo tiempo que los patrones, los cuales se cargaron a ambos lados de la placa con el fin de poder seguir la trayectoria de cada especie lipídica en la fase estacionaria.

Esta metodología ofrece muchas posibilidades dependiendo de las clases lipídicas que se quieran separar.

	Fase estacionaria	Fase móvil	Eluciones	Pretratado
Lípidos neutros [194]	Silice	n-hexano/dietiléter/ácido acético 70:30:1 (v/v)	1	-----
Fosfolípidos [195]	Silice	cloroformo/metanol/28% hidróxido de amonio 60:37.5:4 (v/v)	2	Ácido bórico

Tabla 6. Condiciones para la separación lipídica por cromatografía en capa fina

Una vez que la fase estacionaria de la placa se eluyó con la fase móvil correspondiente, se raspó cada parte de la placa que contiene las diferentes clases de lípidos (Observando el Rf del patrón). Finalmente, los lípidos de cada una de estas zonas se extrajeron con 1 ml de cloroformo/metanol 1:1 (v/v) y 1 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v).

C.3.3.6. Formación de ésteres metílicos a partir de la derivatización de los correspondientes ácidos grasos

Inicialmente la muestra se resuspendió en 100 µl de cloroformo/metanol (2:1) traspasándose a tubos de vidrio de tapón roscado. Posteriormente se añadió 0,5 ml de KOH en MeOH anhidro con el fin de generar la reacción de esterificación, para la cual se necesita simultáneamente a la agitación, un calentamiento de la reacción a 37°C. Transcurrido 1 hora se neutralizó la reacción con 1 ml de HCl 0,5 M, extrayendo los productos de la reacción, en este caso los ésteres metílicos con 2 ml de n-hexano. Finalmente se centrifugó a 800 g durante 5 minutos a 16°C y se extrajo la fase orgánica [125,194].

La reacción de derivatización es imprescindible para la medida de ácidos grasos no volátiles por CG-MS. De esta forma, los ácidos grasos se desprenden del esqueleto del glicerol esterificándose a los correspondientes ésteres metílicos, los cuales son compuestos mucho más volátiles aptos para poder ser analizados por esta técnica cromatográfica.

C.3.3.7. Análisis de ésteres metílicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis de ésteres metílicos se llevó a cabo por CG-MS usando un equipo Agilent 7890 que tiene acoplado un detector de masas Agilent 5975C que trabaja en modo impacto electrónico (EI, 70 eV). Este equipo consta de un inyector automático 7693.

La columna empleada para la separación de ésteres metílicos fue una Agilent DB23 (60m longitud x 0,250 mm diámetro interno y 0,15 mm de espesor) cuya fase estacionaria es 50%-cianopropil-metilpolisiloxano. La temperatura de entrada es de 250°C y la del horno es de 50°C durante 1 minuto, y después se aumentó a 175°C en intervalos de 25°C por minuto, y a 230°C a intervalos de 2,75°C por minuto. La temperatura final se mantuvo durante 5 minutos y el tiempo de ejecución es de 33

minutos. El cuadrupolo por su parte se mantuvo a 150°C y la fuente del espectrómetro de masas a 230°C.

El gas portador empleado para esta técnica fue He a una presión constante de 180 kPa. La toma de datos se llevó a cabo en modo barrido como monitorización de iones seleccionados (SIM). El modo de barrido permitió identificar los compuestos, compararlos con los estándares de ésteres metílicos y con los espectros de la biblioteca de NIST (Instituto nacional de Estándares y Tecnología). Para la cuantificación se emplearon los siguientes fragmentos:

N.º de insaturaciones	Fragmentos característicos
0	74, 87
1	83
2	67, 81
≥3	79, 91

Tabla 7. Fragmentos característicos de los ésteres metílicos

Para las curvas de calibración se empleó una mezcla de 37 componentes. El análisis de datos se llevó a cabo con el software Agilent G1701EA MSD productivity Chemstation [125,194].

C.3.4 Espectrometría de masas para la medida de fosfolípidos:

El método de análisis de triple cuadrupolo que se ha empleado en esta tesis es *MRM* (*Multiple Reaction Monitoring*), donde se filtran tanto en el primer como en el último cuadrupolo los iones que cumplan una determinada m/z [41]. La relación m/z corresponde a la masa del ion entre la carga de este. Este método permite saber si una especie en concreto se encuentra en la muestra, por ejemplo, PE (16:0/20:4) cuya relación m/z es 738,500 puede ser filtrado en el primer cuadrupolo, mientras que en el último se puede filtrar la m/z resultante de la fragmentación por ejemplo del ácido araquidónico, cuya m/z es de 303,200.

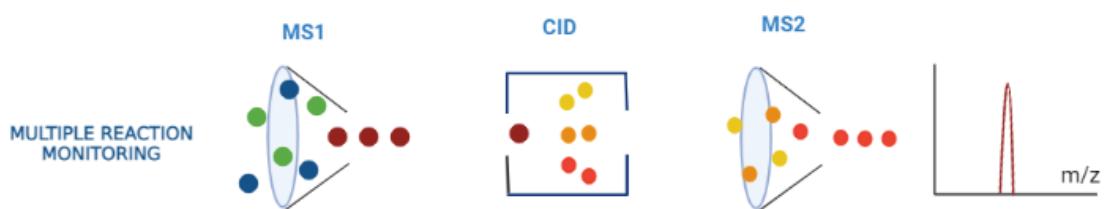


Figura 15. Multiple Reaction Monitoring (MRM). Primer cuadrupolo (MS1), celda de colisión (CID) y segundo cuadrupolo (MS2)

C.3.5 Medida de fagocitosis por microscopía confocal

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos, las cuales contenían los cristales de microscopía, y tratadas con los correspondientes estímulos e inhibidores. Posteriormente se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se fijaron las células con paraformaldehido al 4% (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras ese tiempo se eliminó el paraformaldehido y se lavó con PBS hasta eliminar todos los restos. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI durante 10 minutos a

temperatura ambiente y se lavó varias veces con PBS. Finalmente se montaron los cristales en los portas de microscopía empleando Gelvatol.

El índice fagocítico se examinó con un microscopio confocal Leica TCS SP5X (Wetzlar, Alemania) y se describe como:

$$\text{Índice fagocítico} = \frac{\text{Fagosoma } x \text{ Células fagosómicas}}{\text{Células}^2}$$

C.3.6 Análisis de la expresión de genes por RT-qPCR

C.3.6.1 Extracción de RNA

La extracción del RNA de la célula se llevó a cabo empleando el reactivo TRIzol™ (Ambion, Thermo Fischer Scientific) según muestra el fabricante.

Para comenzar, se añadió cloroformo y se mezcla, incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se realizó una centrifugación de 12000 g a 4°C y durante 15 minutos, observándose de esta manera una separación de la fase orgánica en la parte inferior y de la fase acuosa en la parte superior. A continuación, se añadió a la fase acuosa isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente con el fin de precipitar el RNA de la muestra, centrifugándose a 12000 g a 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante acuoso y el RNA se lavó con etanol al 70% (v/v) en agua libre de nucleasas. Se dejó secar el pellet de RNA al aire y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Finalmente se midió la concentración de RNA empleando el Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific) a 260 nm con una máquina espectrofotométrica.

La pureza del pellet de RNA se pudo determinar teniendo en cuenta los valores de absorbancias de 260/280 y 260/230.

C.3.6.2 Síntesis de DNAc

Para este paso se empleó un kit de síntesis verso DNAc (Thermo Fischer Scientific) tal y como indica el fabricante. Se prepara una mezcla de los siguientes componentes:

- 1) Mezcla de dNTP
- 2) Cebadores oligo dT anclados
- 3) Mezcla de enzimas Verso
 - Transcriptasa inversa Verso
 - Inhibidor RNAasa
- 4) Agua libre de nucleasas
- 5) Potenciador
- 6) Tampón de síntesis
- 7) RNA (1 µg)

Los cebadores oligo dT anclados son necesarios para transcribir con especificidad las cadenas de RNA mensajero mientras que el potenciador elimina el DNAc contaminante de la muestra. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 1 hora deteniendo la reacción con un aumento de temperatura a 95°C durante 2 minutos. Este DNAc sintetizado se mantiene a -20°C.

C.3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Se procedió a amplificar el RNA mensajero utilizando cebadores específicos con las secuencias de interés.

Con el fin de cuantificar el DNAc, se midió el número de ciclos en los cuales la fluorescencia llega a un valor determinado. Este valor es aquel en el cual la señal se distingue de manera significativa del valor de referencia para que el valor de la señal se pueda distinguir del fondo en sí.

Para medir la expresión génica se empleó el método $2-\Delta\Delta Ct$ [197]. Dicho método consiste en restar al gen de interés los ciclos del gen de referencia (housekeeping), obteniendo el valor de ΔCt . El gen de referencia utilizado fue *Cyclo B* de ratón. Finalmente, los valores de los ciclos normalizados al gen de referencia, ΔCt se normalizaron de acuerdo con las células no tratadas, células control. Los datos se muestran como expresión relativa de RNA mensajero.

La qPCR se realizó a partir de 20 ng de DNAc utilizando el Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Máster Mix (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems) siguiendo la siguiente metodología [198]:

- 1) Desnaturalizar a 95°C durante 3 minutos
- 2) Amplificación:
 - 12s a 95°C para la desnaturalización
 - 16s a 60°C
 - 28s a 72°C para la recogida de datos
- 3) Extensión final a 72°C durante 1 minuto
- 4) Curva de disociación
 - 15s a 95°C
 - 60s a 60°C
 - 30s a 95°C
 - 15s a 60°C

	Cebador directo (5`-3`)	Cebador reverso (3`-5`)
<i>IL12p40</i>	TGGTTTGCCATCGTTTGCTG	ACAGGTGAGGTTCACTGTTCT
<i>IL6</i>	TAGTCCTCCTACCCAATTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>Tnfa</i>	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATGGCTGACG
<i>Arg-1</i>	TGGCTTGCAGAGACGTAGAC	GCTCAGGTGAATGGCCTTT
<i>Mrc2</i>	ATCCAGGGAAACTCACAGGA	GCGCTCATCTTGCCGTAGT
<i>Cyclo B</i>	TGGAAGAGCCAAGACAGACA	TGCCGGAGTCGACAATGAT

Tabla 8. Cebadores de genes para qPCR

C.3.7 Medida de la remodelación de AA en fosfolípidos por radiactividad.

La medida de la remodelación de AA entre fosfolípidos en macrófagos peritoneales de ratón se llevó a cabo marcando las células con pulsos de [³H]AA 1 nM (0,25 µCi/mL) durante 15 min a 37°C [67]. A continuación, las células se lavaron cuatro veces con medio que contiene 0,5 mg/mL de albúmina de suero bovino para eliminar el exceso de AA marcado. Posteriormente se cambió el medio de las células a medio sin suero y se incubaron a 37°C en ausencia o presencia de estímulos. Una vez finalizado el tiempo de estimulación, se retiraron los sobrenadantes y se realizó una extracción lipídica según el método Bligh y Dyer [192]. Posteriormente, los lípidos totales se separaron por cromatografía en capa fina con n-hexano/éter dietílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v) [195]. Para las clases de fosfolípidos, los extractos lipídicos se separaron dos veces con cloroformo/metanol/28 % (p/p) de hidróxido de amonio (60:37,5:4, v/v/v) como fase móvil, utilizando placas impregnadas con ácido bórico [67]. Los puntos correspondientes a cada clase de fosfolípidos se cortaron y se ensayó la radiactividad mediante recuento de centelleo líquido.

C.3.8 Análisis estadístico

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

D. RESULTADOS

D.1 Liberación de AA en células activadas.

D.1.1 Diferencias en la movilización de AA y síntesis de eicosanoides en presencia de zimosán opsonizado y sin opsonizar

El zimosán es un estímulo derivado de la pared de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y es uno de los más empleados para el estudio de infecciones fúngicas y la respuesta inmune provocada en el huésped. El zimosán sin opsonizar interacciona con múltiples receptores, entre los cuales destaca el receptor denominado dectina-1 por su papel central en la activación de rutas de señalización mediadas por lípidos [199]. Cuando es opsonizado, el zimosán (ZOp) pasa a ser reconocido por los receptores de opsoninas sobre la superficie del macrófago, que reconocen factores del complemento (CR) y el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (FcR), facilitando de esta manera la fagocitosis del estímulo.

Para los primeros estudios se utilizaron células marcadas con [³H]AA. Inicialmente, se observó que la liberación de [³H]AA es mayor en ZOp que en zimosán sin opsonizar, pudiéndose observar un máximo de movilización a la concentración de 1 mg/mL para ambos (**figura 16**).

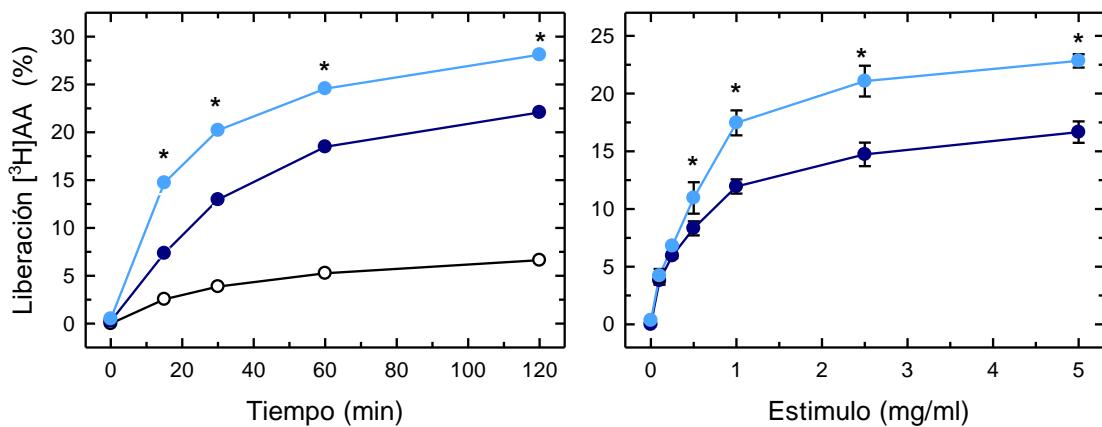


Figura 16. Análisis comparativo de la liberación de ácido $[^3\text{H}]$ araquidónico ($[^3\text{H}]AA$) en macrófagos peritoneales de ratón en respuesta a zimosán o zimosán opsonizado. Las células, marcadas con $[^3\text{H}]AA$, se dejaron sin tratar (símbolos blancos) o se trataron con zimosán (azul oscuro) o zimosán opsonizado (azul claro). (A) Efecto del tiempo sobre la liberación de $[^3\text{H}]AA$. Ambos estímulos se añadieron a 1 mg/mL. (B) Efecto de la concentración de estímulo (1h de incubación). Después de las estimulaciones, la cantidad de radiactividad en los sobrenadantes se cuantificó mediante conteo de centelleo líquido. Los datos están expresados como la media \pm S.E.M (n=6). *p<0.05 estadísticamente significativo para las células estimuladas con zimosán y zimosán opsonizado frente a las células control.

Con el fin de identificar la fosfolipasa A₂ implicada en la liberación del AA en los macrófagos peritoneales de ratón activados, se emplearon inhibidores selectivos tanto de la cPLA₂α (fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de Ca²⁺ de grupo IVA), la iPLA₂β (fosfolipasa A₂ citosólica independiente de Ca²⁺ de grupo IVA) y la sPLA₂ (fosfolipasa A₂ secretada). Estos fueron pirrofenona, FKGK18 y LY311727 respectivamente.

En presencia de pirrofenona, la liberación de AA fue completamente inhibida cuando los macrófagos se estimularon con zimosán y ZOp. Por otra parte, FKGK18 y LY311727 no tuvieron efecto, tal y como muestra la **figura 17**. Estos resultados indican que cPLA₂α es la enzima responsable de la movilización de AA en macrófagos expuestos a estos estímulos fagocíticos.

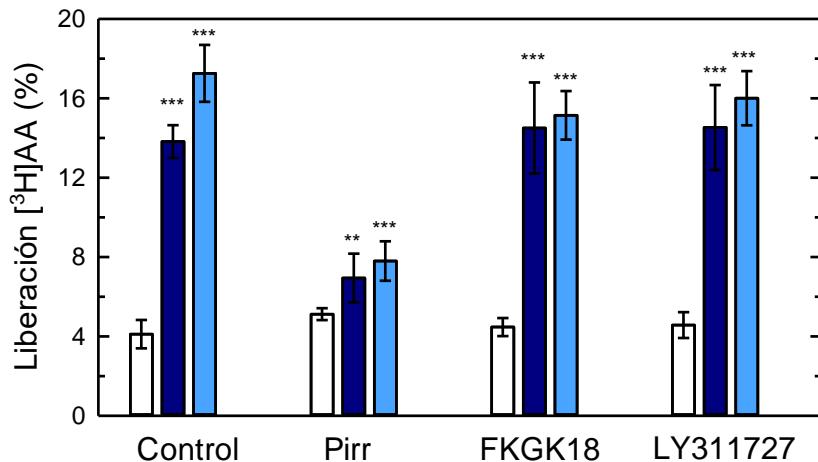


Figura 17. Efecto de los inhibidores de PLA₂. Las células marcadas con [³H]AA fueron tratadas con 1 µM de pirrofenona (Pirr), 10 µM FKGK18, and 25 µM LY311727 durante 30 min. Las células se dejaron sin tratar (Control; barras blancas) o se trataron con 1 mg/mL de zimosán (barras azul oscuro) o 1 mg/mL de zimosán opsonizado (barras azul claro) durante 1h. Con posterioridad, el medio extracelular se retiró y se analizó su contenido en radioactividad. Los datos se expresan como la media ± S.E.M (n=6). ***p < 0,001, **p < 0,01 estadísticamente significativo para las células estimuladas con zimosán y zimosán opsonizado frente a las células control. Entre las diferentes condiciones basales no hay diferencias significativas.

Para comprobar si el zimosán y ZOp activan cPLA_{2α} por la misma ruta, los dos agonistas se añadieron simultáneamente a los macrófagos peritoneales de ratón. Se comparó la respuesta cuando se añaden los dos estímulos juntos [Z+ ZOp], o cuando se añaden de forma separada [Z]+[ZOp], y se midió el cociente [Z+ ZOp]/[Z]+[ZOp]. Si el cociente da un valor cercano a 1, ello querría decir que los agonistas actúan por vías independientes. Si los dos agonistas utilizan la misma vía, el cociente sería inferior a 1. Finalmente, si ambos estímulos combinados generan más liberación de AA que la suma de las respuestas individuales, el cociente sería >1, indicando una activación sinérgica. [200]

Los resultados muestran que el cociente es cercano a 1 (**figura 18**), lo cual indica efectos aditivos de los dos agonistas. Tomando como control positivo células pretratadas con LPS y posteriormente estimuladas con ambos estímulos, se observó un ratio de activación >1, lo que es consistente con estudios previos que mostraron que el pretratamiento celular con lipopolisacárido aumenta 1,5 veces la movilización del AA producida en respuesta a zimosán (LPS priming) [118].

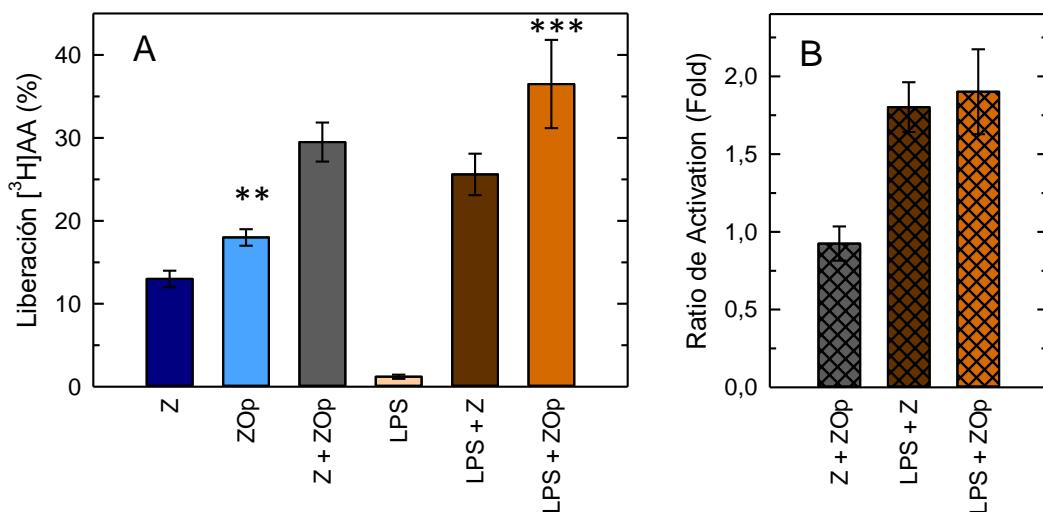


Figura 18. Comparación de la liberación de AA entre zimosán y zimosán opsonizado. (A) Los macrófagos peritoneales de ratón fueron estimulados con zimosán (0,5 mg/mL), OpZ (0,5 mg/mL) o ambos durante 1h, o con 100 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) durante 1h seguido de zimosán, ZOp, o ninguno de ellos durante 1h. Despues el medio extracelular fue extraido y se analizó el contenido de ^{3}H por radioactividad. Los datos son expresados como la media \pm error estándar de la media de tres medidas individuales. (B) Ratio de activación de cada estímulo, calculado según lo descrito en el texto.

A pesar de la gran sensibilidad que muestra la radioactividad, esta técnica no permite discernir entre las diferentes especies individuales de fosfolípidos. Por ello, a continuación, se utilizó cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), la cual permite realizar un estudio lipidómico más preciso.

En primer lugar, se estudió la distribución del AA en los diferentes fosfolípidos y los efectos que el zimosán y ZOp tienen sobre la liberación de dicho ácido graso. Como se puede observar en la **figura 19**, las especies mayoritarias encontradas son los plasmalógenos de etanolamina, seguidos de ciertas especies de glicerofosfocolina y una única especie de fosfatidilinositol, PI(18:0/20:4). Además, el tratamiento con ambos estímulos disminuyó los niveles de las especies de PC y de PI mientras que no se observan cambios aparentes en los niveles de especies de PE. Sin embargo, se observaron bajas en los niveles de plasmalógenos de PE cuando las células son activadas con ZOp.

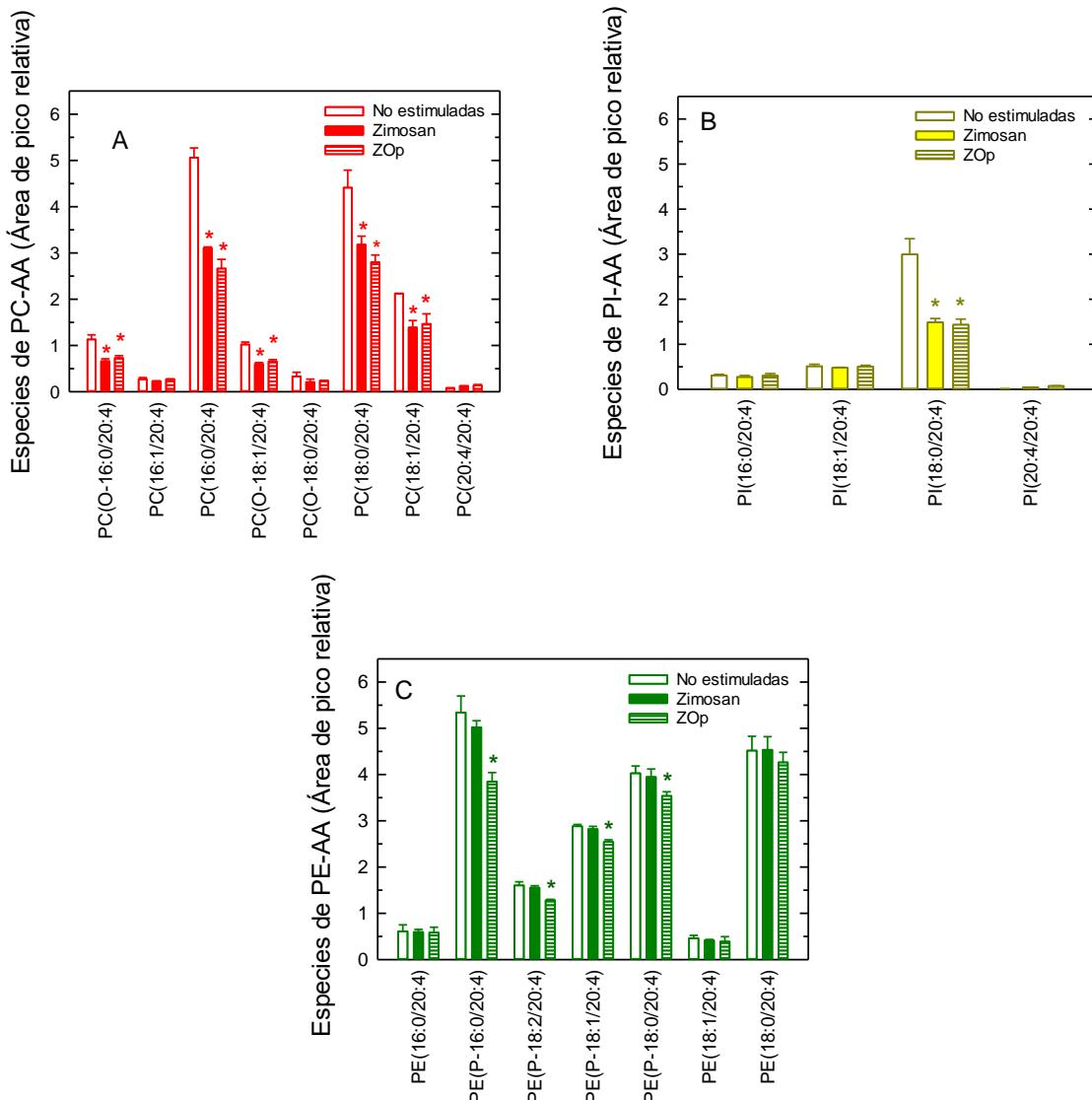


Figura 19. Especies de fosfolípidos que contienen AA en macrófagos peritoneales de ratón y efecto de la estimulación celular. Células control (barras blancas) o estimuladas con 1 mg/mL de zimosán (barras coloreadas) o 1 mg/mL de zimosán opsonizado (barras rayadas). Despues de 1 h, el contenido celular de los glicerofosfolípidos de colina (PC) que contienen AA (A) fosfatidilinositol (PI) (B) y glicerofosfolípidos de etanolamina (PE) (C) fue determinado por LC-MS. Los datos son expresados como la media de los valores ± S.E.M. ($n=6$). * $p<0.05$, estadísticamente significativo de las correspondientes especies con las células no estimuladas.

Con el fin de estudiar qué papel desempeñan tanto cPLA₂ como iPLA₂ en la liberación de AA de las diferentes especies de fosfolípidos, se realizó un análisis de especies mayoritarias de PC, PE y PI que contienen AA en macrófagos peritoneales de ratón en presencia de pirrofenona y de FKGK18 en condiciones de estimulación en presencia de zimosán.

En la **figura 20** se observa que, en presencia de zimosán, únicamente se produce liberación de AA y la consiguiente bajada en los niveles de fosfolípidos de PC y PI, no observándose variaciones en las especies de PE. Además, en presencia tanto de zimosán como de pirrofenona, se observó una inhibición de la pérdida de los niveles de PC y PI, lo que es consistente con los datos mostrados en la **figura 17**.

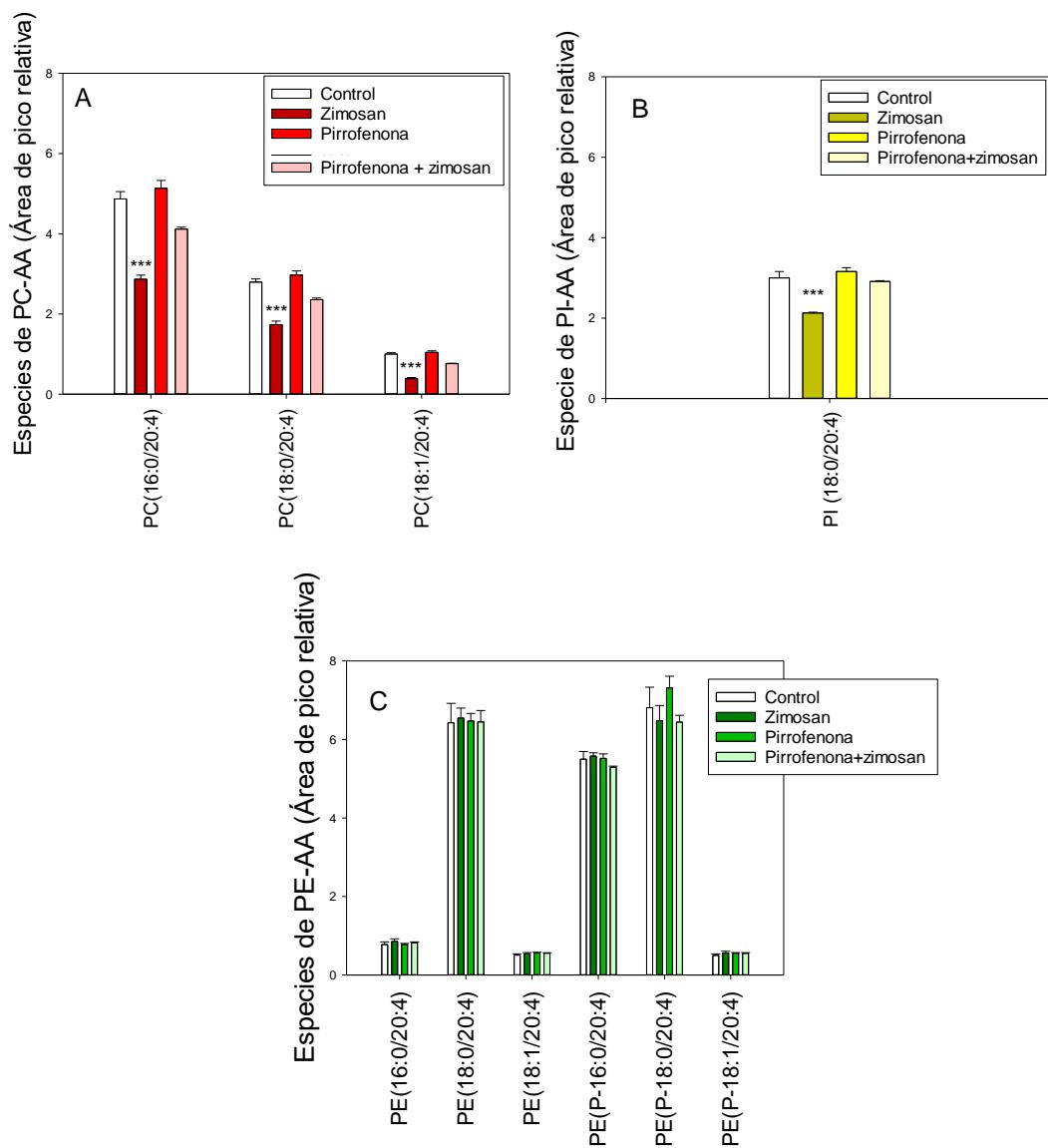


Figura 20. Efecto de la estimulación e inhibición de cPLA₂α sobre los niveles de las especies mayoritarias de PC, PI y PE que contienen AA en macrófagos peritoneales de ratón. Las células se mantuvieron 1 hora en medio sin suero, se añadió pirrofenona (inhibidor de cPLA₂α) durante 30 min y finalmente se añadió zimosán 1h. Los niveles de las diversas especies fueron medidos por LC-MS. Representación en u.a (unidades arbitrarias). Zimosán (500 µg/ml), Pirrofenona (2 µM). ***p < 0,001 estadísticamente significativo para las células estimuladas con zimosán frente a las células control.

Sin embargo, mientras que en presencia de pirrofenona se ve una inhibición en la movilización de AA, se puede observar que la exposición de dichas células a FKGK18 en presencia de zimosán no tiene consecuencias (**figura 21**).

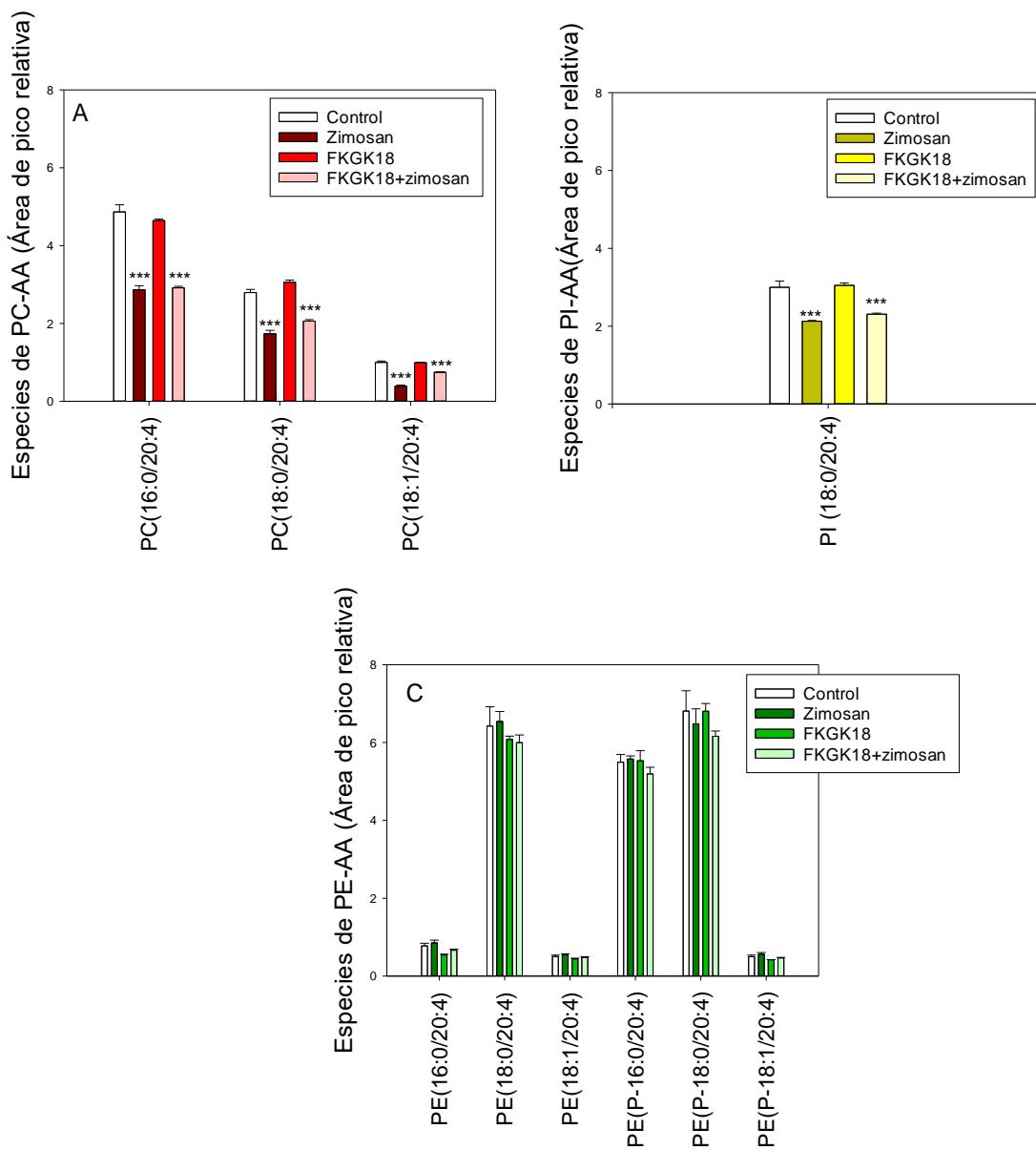


Figura 21. Efecto de la estimulación e inhibición de iPLA₂β sobre los niveles de las especies mayoritarias de PC, PI y PE que contienen AA en macrófagos peritoneales de ratón. Las células se mantuvieron 1 hora en medio sin suero y posteriormente se añadió FKGK18 (inhibidor de iPLA₂β) durante 30 min y después zimosán durante 1h. Los niveles de las diversas especies fueron medidos por LC-MS. Representación en u.a (unidades arbitrarias). Zimosán (500 µg/ml), FKGK18 (10 µM). ***p < 0,001, **p < 0,01 estadísticamente significativo para las células estimuladas con zimosán y las células tratadas con FKGK18+zimosán frente a las células control; sin embargo, no se observan diferencias entre las células control y las células con el inhibidor.

El análisis de eicosanoides liberados al medio extracelular en macrófagos peritoneales de ratón bajo condiciones de estimulación con zimosán y ZOp fue realizado por LC-MS. Como se puede observar en la figura 22, el perfil de eicosanoides es similar a nivel cualitativo cuando la estimulación se produce con ambos estímulos, aunque los niveles absolutos producidos por el ZOp son más altos. El metabolito mayoritario en ambas ocasiones es la PGE₂.

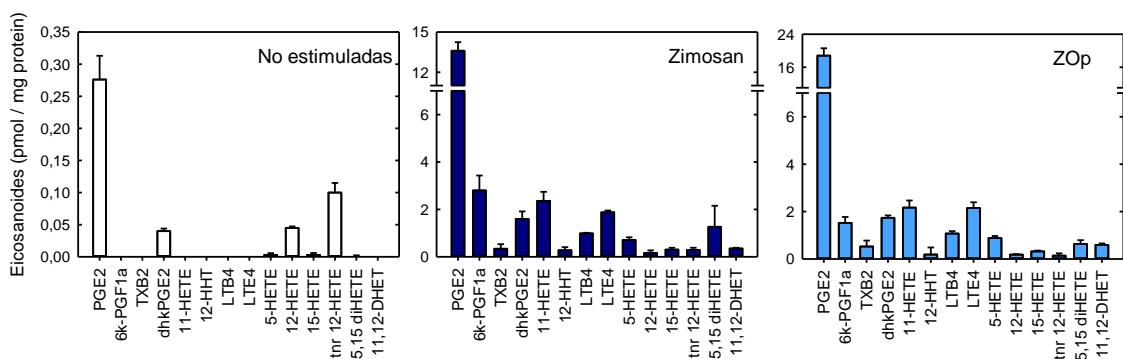


Figura 22. Producción de eicosanoides por macrófagos peritoneales. Las células se dejaron sin tratar (barras blancas) o se estimularon con zimosán (azul oscuro) o zimosán opsonizado (azul claro) durante 8h. El medio extracelular fue extraído y se analizaron los niveles de eicosanoides por espectrometría de masas. Los datos están expresados como la media ± S.E.M (n=6). PGE2, prostaglandina E2 ; 6k-PGF1a, 6-cetoprostaglandina F1 α ; TXB2, tromboxano B2 ; dhkPGE2, 13,14-dihidro-15-cetoprostaglandina E2 ; 11-HETE, ácido 11-hidroxi-eicosatetraenoico; 12-HHT, ácido 12- hidroxiheptadecatrienoico; LTB4, leucotrieno B4 ; LTE4, leucotrieno E4 ; 5-HETE, ácido 5-hidroxieicosatetraenoico; 12-HETE, ácido 12-hidroxieicosatetraenoico; 15-HETE, ácido 15-hidroxieicosatetraenoico; tnr 12-HETE, ácido tetrnor-12-hidroxieicosatetraenoico ; 5,15-diHETE, ácido 5,15-dihidroxieicosatetraenoico ; 11,12-DHET, ácido 11,12-dihidroxieicosatrienoico.

Todos estos resultados dejan constancia de que la cPLA₂ α está implicada en la liberación de AA de los fosfolípidos mientras que la iPLA₂ β no parece participar activamente en el proceso.

Con el fin de respaldar los datos obtenidos por LC-MS mostrados con anterioridad, se empleó la técnica GC-MS, la cual, aunque es menos sensible que la anterior, permite obtener información de manera cuantitativa, proporcionando así información con mayor sentido fisiopatológico.

Midiendo la masa total de AA por GC-MS se observó que tanto la disminución en los niveles de PC y de PI fueron muy similares al emplear zimosán y ZOp, mientras que los niveles de PE únicamente experimentan una disminución significativa con el empleo de ZOp (**figura 23**). La movilización diferencial de AA por parte de ambos estímulos puede deberse a que cada estímulo actúa vía diferentes receptores, y por lo tanto tiene diferentes mecanismos de acción para regular la disponibilidad de AA libre.

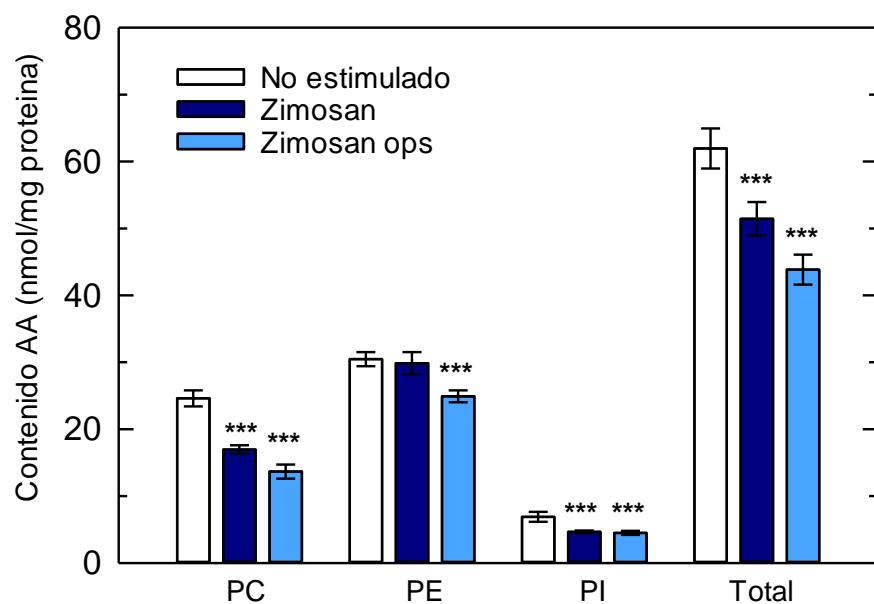


Figura 23. Efecto de la estimulación celular en los niveles de AA en diferentes clases de fosfolípidos.

Las células fueron no tratadas (barras sin colorear) o tratadas con 1 mg/mL de zimosán (barras azul oscuro) o 1 mg/mL de zimosán opsonizado (barras azul claro) durante 1 h. El contenido de AA de varias clases de fosfolípidos fue determinado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Los datos fueron expresados como la media ± S.E.M (n=6). ***p < 0,001 estadísticamente significativo de las correspondientes especies en células no estimuladas.

D.2 Remodelación de AA entre glicerofosfolípidos en macrófagos peritoneales de ratón activados

La remodelación de AA entre fosfolípidos es un paso clave para la célula, ya que distribuye dicho ácido graso en las especies apropiadas para su posterior movilización por las fosfolipasas A₂ en condiciones de activación celular e inflamación. Este es un paso clave en la producción de eicosanoides ya que su producción depende del fosfolípido del cual se hidroliza el AA y de la capacidad de la fosfolipasa para alcanzar dicho fosfolípido e hidrolizar el ácido graso [133].

Para estudiar dicha remodelación se empleó [³H]AA, estudiando a diferentes tiempos la distribución de ese AA marcado en los diferentes fosfolípidos. Como se puede observar en la **figura 24**, la mayor incorporación de AA se da inicialmente en PC, y gradualmente, de manera dependiente del tiempo, estos niveles van disminuyendo a la vez que se observa un aumento en los niveles de PE. Por otra parte, no hay variaciones dependientes de tiempo en la clase de PI. Se puede definir el tiempo de remodelación en este experimento (tiempo en el cual la cantidad de PC se iguala a la cantidad de PE) [124,125] en 16 h en células sin estimular.

Sin embargo, en células estimuladas con ZOp, el tiempo de remodelación disminuye a 11,3 h mientras que en células estimuladas con zimosán se registró el menor tiempo, produciéndose a las 10,6 h. Con estos datos se puede concluir que las células activadas con zimosán tienen una transferencia algo más rápida de AA que las estimuladas con ZOp. Las células sin activar tienen un tiempo de remodelación más elevado, reflejando una transferencia lenta de AA entre los fosfolípidos [59,120].

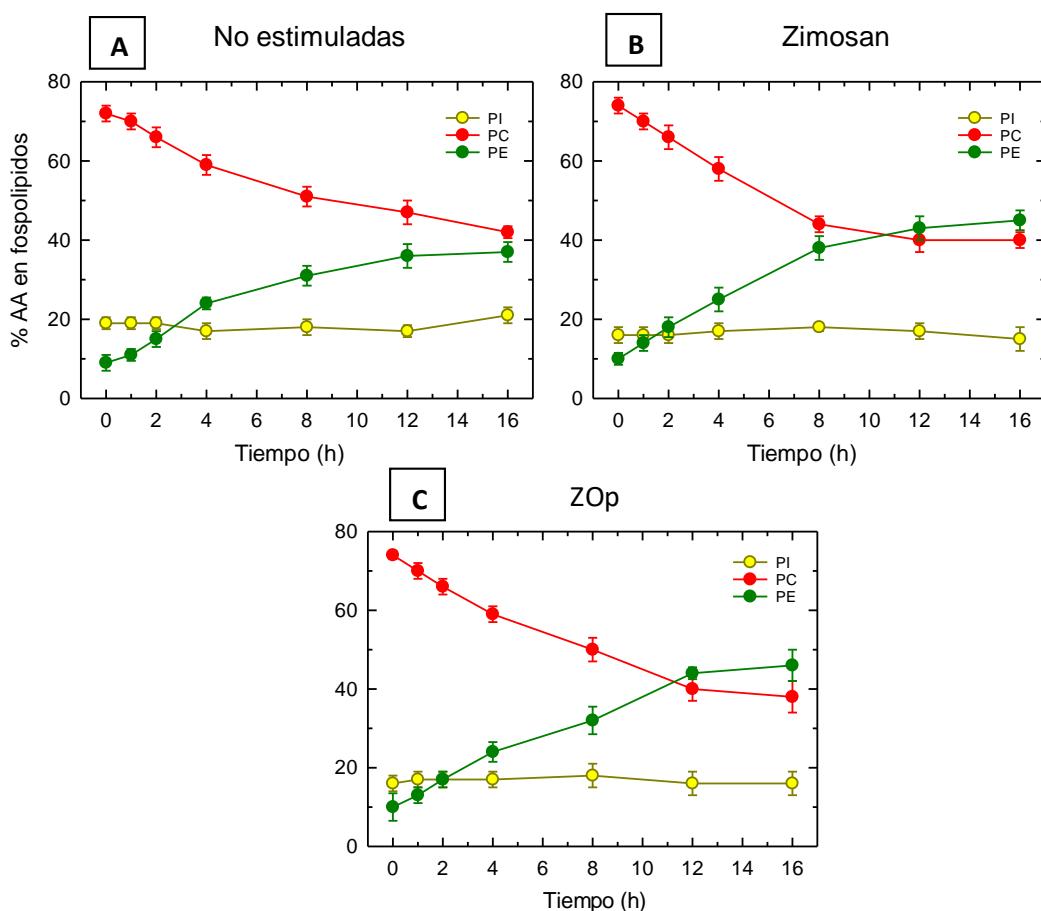


Figura 24. Remodelación de AA en fosfolípidos en macrófagos peritoneales y el efecto de la estimulación celular. Las células fueron marcadas con $[^3\text{H}]$ AA, lavadas e incubadas durante los períodos de tiempo indicados. Células no estimuladas (A), en presencia de 1 mg/mL de zimosán (B) o 1 mg/mL de zimosán opsonizado (C). Las clases de fosfolípidos fueron separadas por cromatografía en capa fina. La radioactividad incorporada en cada fosfolípido fue determinada por contejo de centelleo y se da un porcentaje de la radioactividad presente en fosfolípidos. Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M (n=6)

Sobre la base de estos datos, y debido a que liso-PE es el acceptor principal en las reacciones de remodelación de AA [59,120], podría esperarse que los niveles de liso-PE en células activadas con ZOp estuvieran elevados en comparación con células estimuladas con zimosán sin opsonizar. Esto podría deberse a una acción más lenta de CoA-IT en las células estimuladas con ZOp. La figura 25 muestra que, aunque los niveles de liso-PC y liso-PI son similares en ambas condiciones de estimulación, los niveles de varias especies de liso-PE son más altos en células tratadas con ZOp.

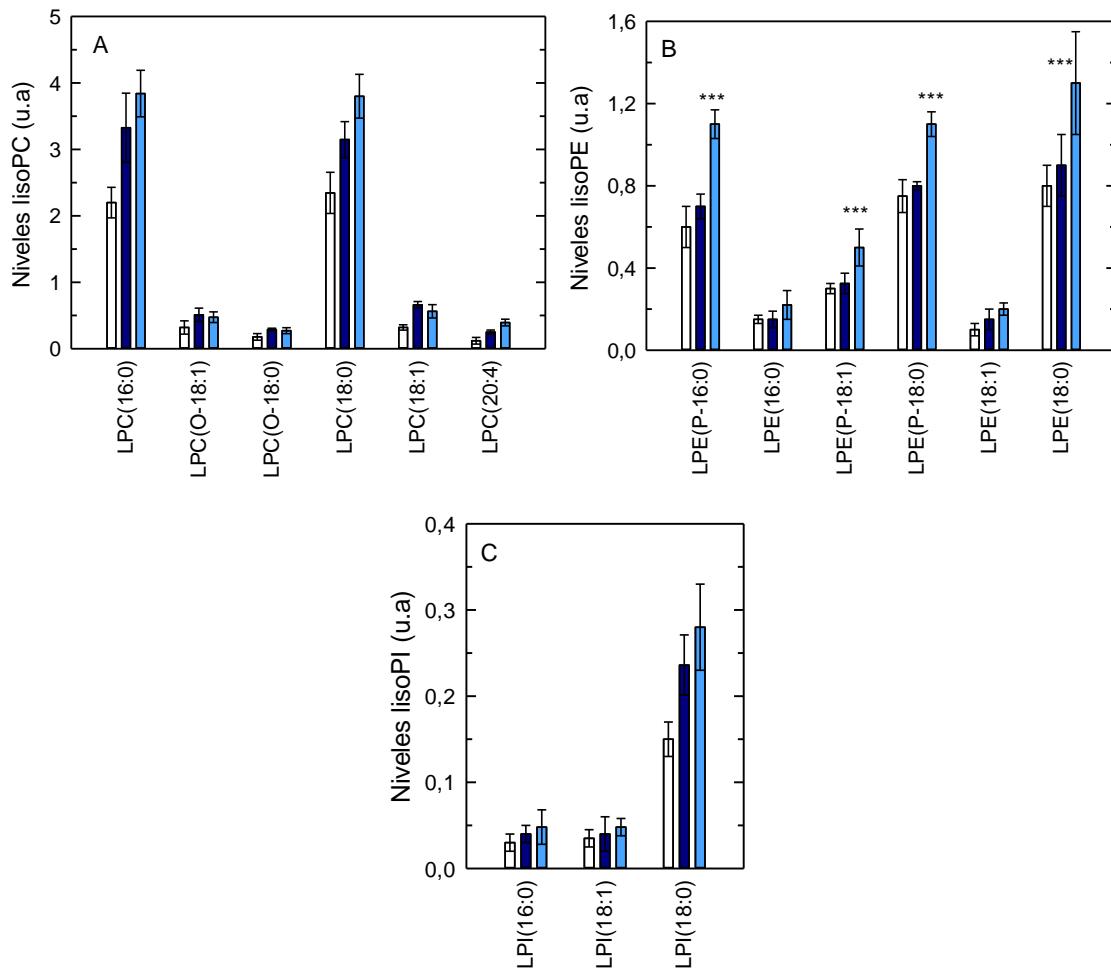


Figura 25. Especies moleculares de lisofosfolípidos generados por macrófagos y el efecto de la estimulación celular. Las células fueron no estimuladas (barras no coloreadas) o estimuladas con 1 mg/mL de zimosán (barras azul oscuro) o 1 mg/mL de zimosán opsonizado (Barras azul claro). Después de 1h, el contenido celular de especies moleculares lisoPC(A), lisoPE (B) y lisoPI(C) fue determinado por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC-MS). Los datos fueron expresados como la media ± S.E.M (n=6). ***p < 0,001 y **p < 0,01 estadísticamente significativo para células estimuladas con zimosán opsonizado con respecto a células control. Unidades arbitrarias u.a

A continuación, se procedió a determinar si la inhibición de la enzima que cataliza la remodelación de AA entre fosfolípidos, la transacilasa independiente de CoA (CoA-IT), en macrófagos peritoneales afectaba a las funciones de la célula. Para ello, se empleó un inhibidor selectivo de CoA-IT denominado SKF98625 [115,201].

Estudios preliminares realizados en el laboratorio donde se realizó la presente tesis han demostrado que dicho inhibidor bloquea de manera cuantitativa la transferencia

de AA de PC a PE en macrófagos peritoneales estimuladas con zimosán [113]. Como se muestra en la **figura 26**, el tratamiento de macrófagos peritoneales con el inhibidor SKF98625 reduce los niveles de AA liberado en aproximadamente un 50% cuando las células son tratadas con zimosán, mientras que, si se emplea ZOp, la disminución de la liberación de dicho ácido graso es mucho menor, llegando a inhibirse en aproximadamente un 20%. Ello indica que, cuando los macrófagos peritoneales de ratón son activados con ZOp, la dependencia hacia CoA-IT es mucho menor que con el mismo estímulo proinflamatorio sin opsonizar.

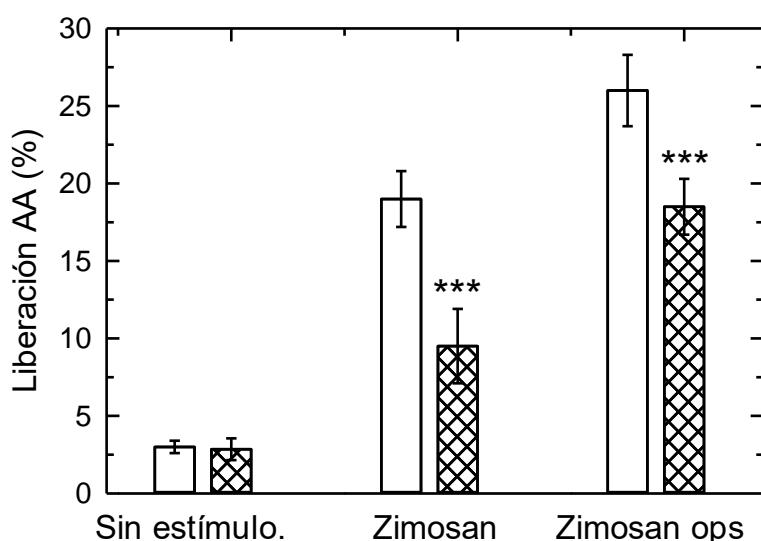


Figura 26. Efecto de SKF98625 en la liberación de AA de los macrófagos. Células control (barras blancas) o pretratadas (barras rayadas) con 10 μ M SKF98625 durante 30 min. Despues, las células fueron estimuladas con 1 mg/mL de zimosán o 1 mg/mL de zimosán opsonizado. Despues de 1h, el medio extracelular fue extraido y se analizó el contenido de ^3H por radioactividad. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M (n=6). *** $p < 0,001$ estadísticamente significativo para células estimuladas con zimosán y zimosán opsonizado con respecto a células control.

Sobre la base de todos estos resultados, se puede concluir que, dependiendo del receptor al cual se acople el estímulo, la participación de CoA-IT varía, observándose que se genera una remodelación de AA más rápida cuando las células se activan con zimosán y que dicha remodelación es necesaria para la movilización óptima de AA. Por otra parte, el ZOp promueve una remodelación de AA más lenta y la movilización de AA en respuesta a este estímulo es más amplia y menos dependiente de su movimiento entre fosfolípidos.

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

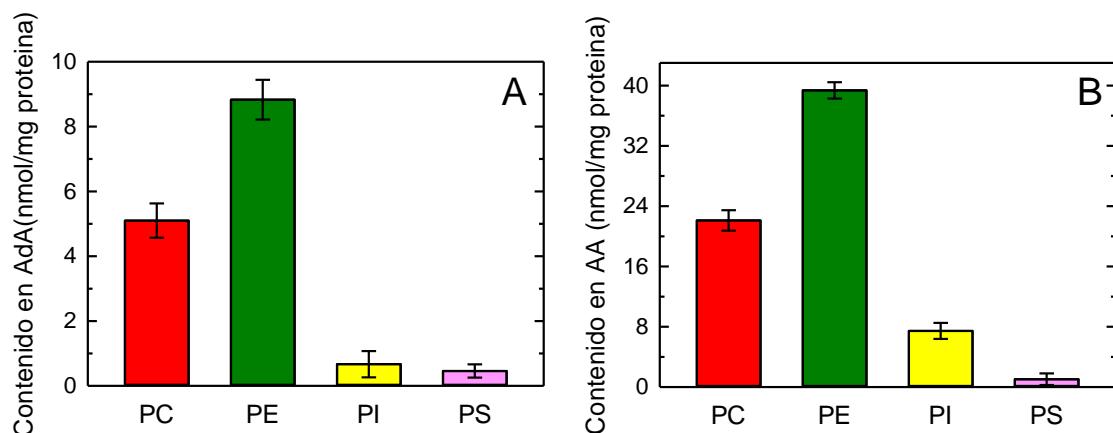
-----Hoja confidencial-----

D.4 Contribución de cPLA₂α y iPLA₂β a la movilización del ácido adrénico en macrófagos peritoneales de ratón.

D.4.1. La movilización del AA y del AdA está mediada por diferentes mecanismos

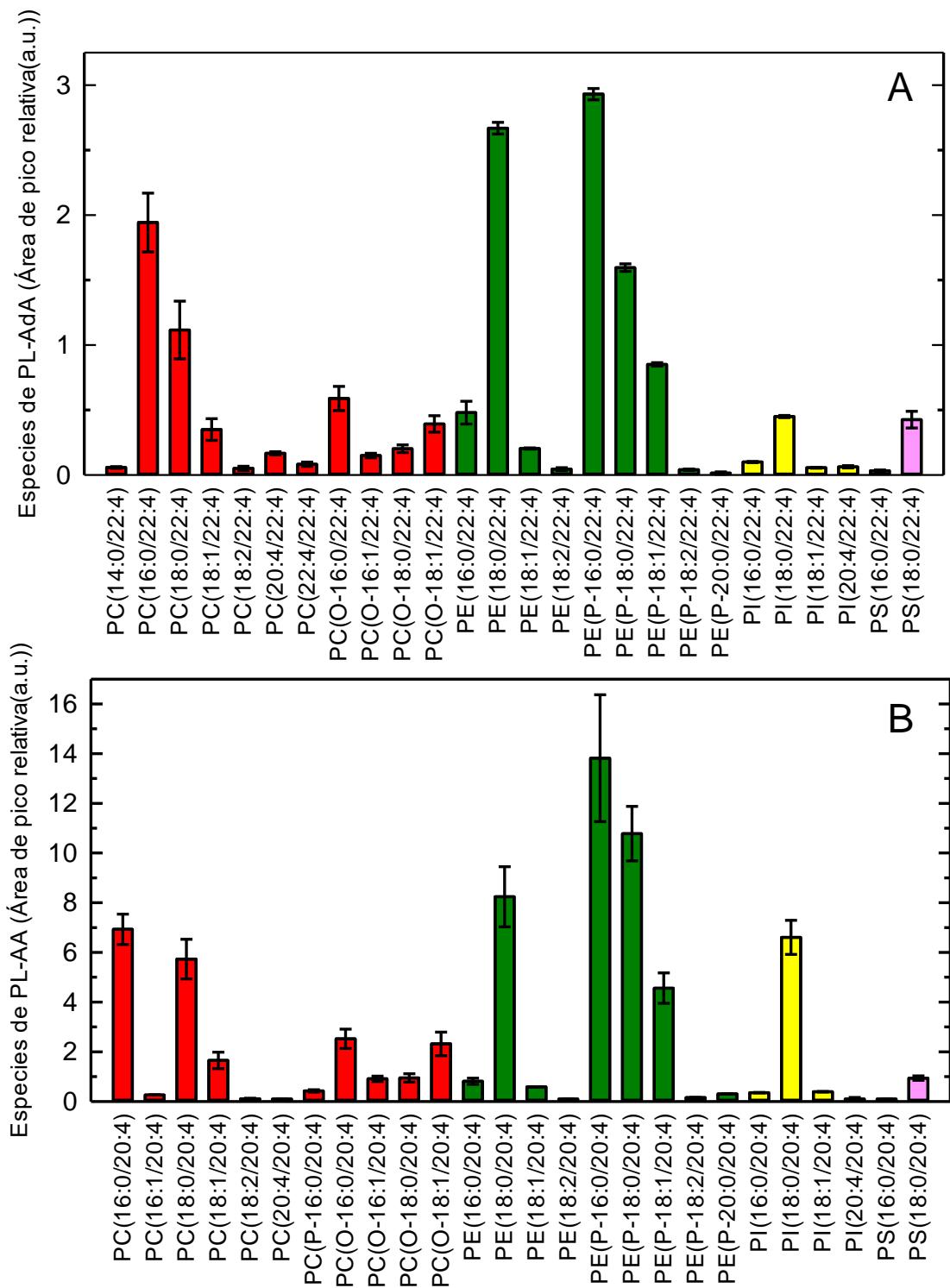
El ácido adrénico (AdA) es el producto de elongación de 2 carbonos del AA y se encuentra en cantidades significativas en los fosfolípidos de membrana de los macrófagos peritoneales de ratón. A pesar de ser un ácido graso semejante a su precursor de 20 carbonos (AA), se sabe muy poco de su regulación en las células del sistema inmune innato.

Las distribuciones relativas de AdA y AA fueron estudiadas por la técnica GC-MS, encontrándose únicamente en fosfolípidos. Se observó un perfil cualitativamente muy similar para ambos, a pesar de la clara diferencia en cuanto a masa en cada clase de fosfolípido, como se observa en la **figura 30**. Se observó que la mayoría de ambos ácidos grasos se localizaban en glicerofosfolípidos de etanolamina (PE), seguido de glicerofosfolípidos de colina (PC) y menores cantidades en fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS).



Se analizó la distribución de AdA y AA en especies moleculares de fosfolípidos mediante LC-MS, detectándose una gran cantidad de especies que contienen dichos ácidos grasos. Como se puede observar en la **figura 31**, las especies más abundantes son PE(P-16:0/22:4), PE(P-18:0/22:4), PE (18:0/22:4), y PC (16:0/22:4) y PC (18:0/22:4).

El perfil de especies de fosfolípidos que contienen AA es similar, destacando de nuevo la acumulación de dicho ácido graso en ciertas especies de glicerofosfolípidos de etanolamina, como son PE(P-16:0/20:4), PE(P-18:0/20:4) y PE(18:0/20:4) y en especies de colina como PC(16:0/20:4) y PC(18:0/20:4). En este caso, cabe destacar que la especie PI(18:0/20:4) es más abundante que su homólogo PI(18:0/22:4). Esta diferencia sugiere que la acil-CoA- aciltransferasa, que emplea lisoPI como acceptor pudiera tener más afinidad por AA que por AdA.



Tras activación por zimosán, el AdA se libera de los fosfolípidos aparentemente solo de PC, sin efectos significativos en PE o PI (**figura 32**). En experimentos control realizados simultáneamente, la estimulación de los macrófagos peritoneales de ratón con zimosán disminuye los niveles de PC y PI conteniendo AA y no en PE, en consonancia con datos mostrados anteriormente. Por tanto, la participación de PI en la liberación de AA pero no de AdA supone una diferencia notable entre ambos tipos de ácidos grasos.

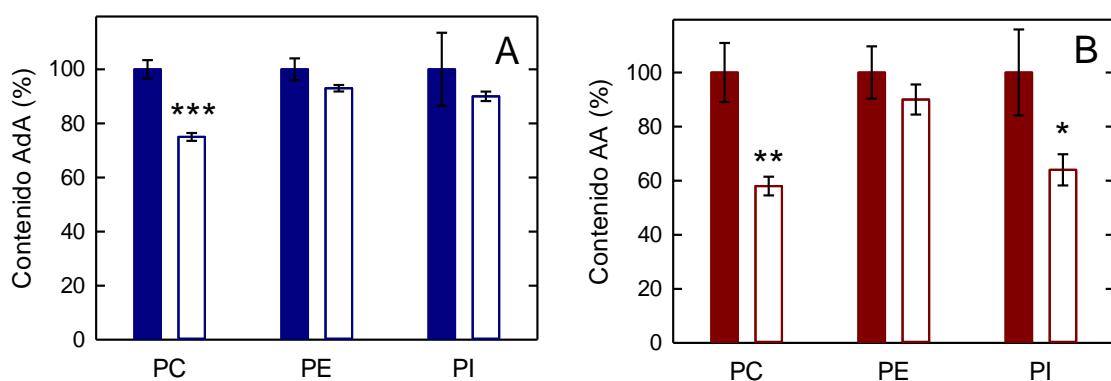


Figura 32. movilización del AA y del AdA en macrófagos estimuladas con zimosán. Células control (barras coloeadas) o estimuladas (barras blancas) con 1 mg/mL de zimosán durante 1h. El contenido total de AdA (A) o de AA (B) en varias clases de fosfolípidos fueron medidas por GC-MS. Para permitir una comparación directa entre AdA y AA, el contenido total de ácidos grasos en las clases de fosfolípidos en células no estimuladas se dispone como un 100%. Los valores actuales de masas fueron obtenidos de la figura 1. Los resultados se muestran como valores medios \pm error estándar de la media. ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05 estadísticamente significativo en células estimuladas con zimosán con respecto a células control.

Para estudiar los posibles mecanismos implicados en la liberación de AdA y de AA, se utilizaron inhibidores de las dos enzimas que participan activamente en la liberación de ácidos grasos en macrófagos peritoneales activados, la cPLA₂ α , que se inhibe selectivamente por pirrofenona y la iPLA₂ β , para la cual se emplearon tres inhibidores específicos, FKGK18, ya utilizado con anterioridad, y GK436 y BEL.

Los resultados de la movilización del AA en presencia de diferentes inhibidores ya han sido reportados en el apartado A1 de esta sección, siendo empleado en este caso

como control para observar diferencias con respecto a la movilización del AdA. En consonancia con las **figuras 18 y 19**, la pirrofenona inhibe por completo la liberación de AA de los macrófagos peritoneales activados con zimosán, mientras que los inhibidores de iPLA₂β no inhiben dicha liberación como se puede observar en la **figura 33-B**. En cuanto a la movilización del AdA, la liberación está parcialmente inhibida tanto en presencia del inhibidor de cPLA₂α como de los inhibidores de iPLA₂β, mientras que la movilización es eliminada en un 90% en presencia de ambos inhibidores tal y como se puede observar en la **figura 33-A**.

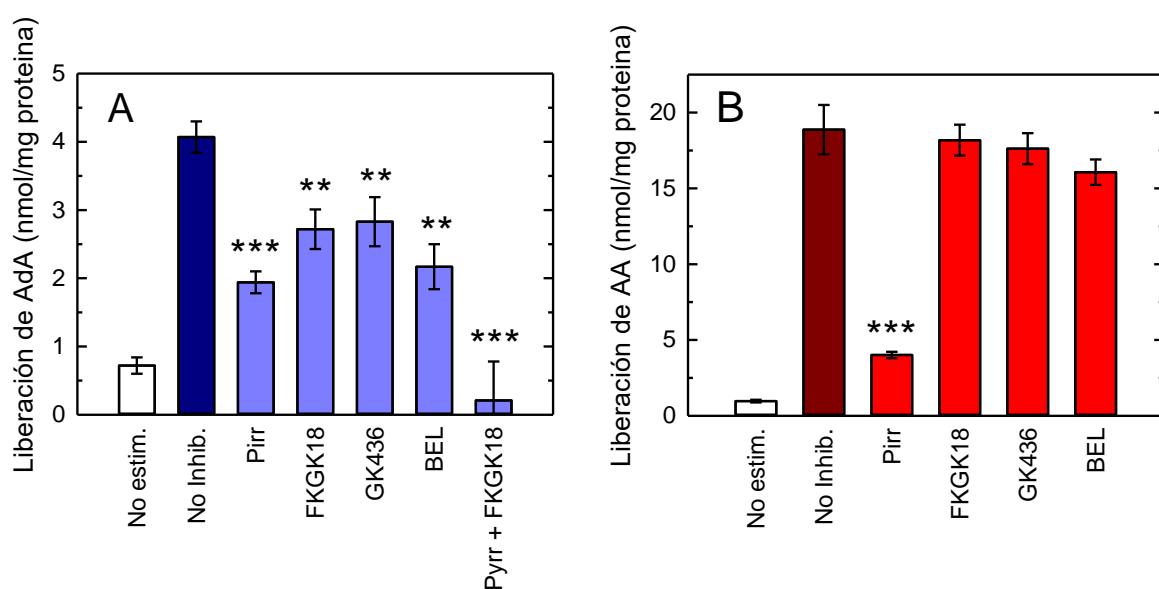


Figura 33. Liberación de AdA y AA en macrófagos peritoneales estimulados. Las células control (barras blancas) y estimuladas (barras coloreadas) se trataron o no con 1 mg/mL de zimosán durante 1 hora (barras coloreadas), en ausencia (no inhib.) o presencia de los siguientes inhibidores: 2 μM pirrofenona (Pirr), 10 μM FKGK18, 5 μM GK436, 10 μM BEL o 2 μM de pirrofenona más 10 μM de FKGK18. Después, el contenido total de AdA (A) o de AA (B) fue medido por CG-MS. La liberación de ácidos grasos fue calculada restando la cantidad de AdA o de AA unidos a fosfolípidos en células estimuladas de la de las células no estimuladas. Los resultados se muestran como valores medios ± error estándar de la media (n=3). ***p < 0,001, **p < 0,01 estadísticamente significativo en células estimuladas con zimosán en presencia de inhibidores con respecto a células estimuladas control.

Sobre la base de estos resultados se puede afirmar que mientras que la cPLA₂α se encuentra implicada en la liberación tanto de AA como de AdA, la iPLA₂β únicamente se encuentra implicada en la liberación de AdA.

Debido a las similitudes estructurales entre el AA y el AdA, este último podría competir con AA por su incorporación en fosfolípidos, lo que podría resultar en una reducción en las cantidades de AA que se puede movilizar y, por ende, en los niveles de eicosanoides formados. Para estudiar esta posibilidad se incubaron los macrófagos con AdA exógeno.

En primer lugar, se analizó el contenido de AdA en células enriquecidas con dicho ácido graso por GC-MS. La suplementación de las células con AdA supuso un desplazamiento de otros ácidos grasos como el ácido oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6) y dihomo-γ-linolénico (20:3n-6), pero, inesperadamente, no de AA, como se puede observar en el perfil mostrado en la **figura 34**.

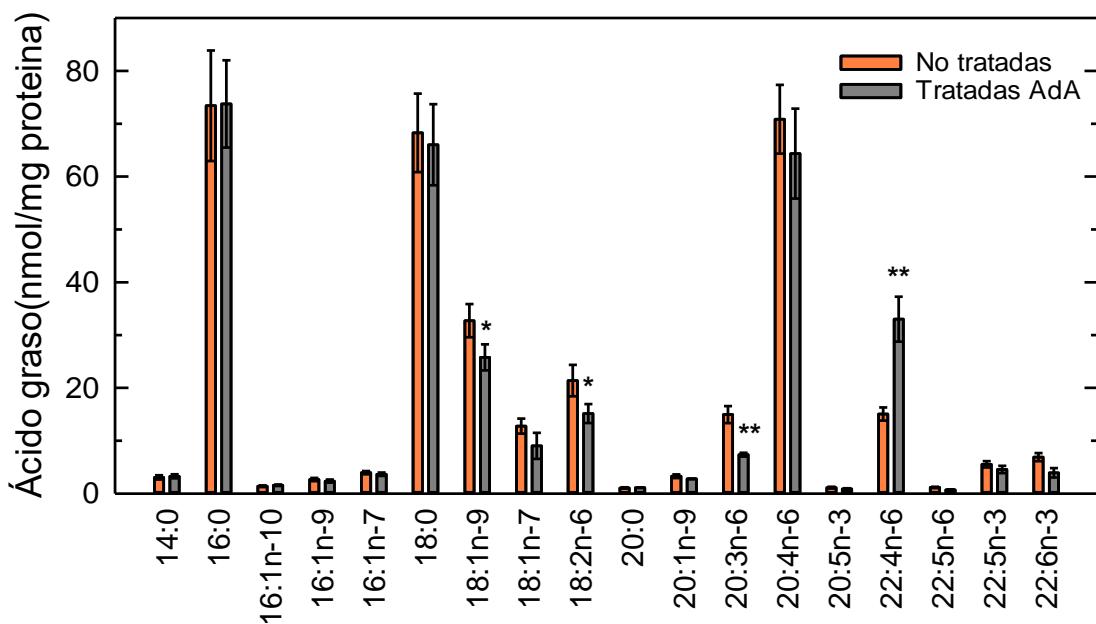


Figura 34. Composición de ácidos grasos de macrófagos peritoneales de ratón. Las células fueron no tratadas (barras naranjas) o tratadas con AdA exógeno durante 20 horas (barras grises). Despues, el perfil de ácidos grasos totales en células fue determinado por GC-MS después de convertir los esteres de glicerol de los ácidos grasos en ésteres metílicos de ácidos grasos. Los datos están expresados como

valores medios ± error estándar de la media de tres réplicas individuales. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ estadísticamente significativo en células tratadas con AdA en comparación con células control.

El análisis de la movilización de AA estimulada por zimosán no presentó grandes diferencias cuando se utilizaron células enriquecidas con AdA, mientras que la movilización del AdA aumentó como era de esperar según se muestra en la **figura 35**.

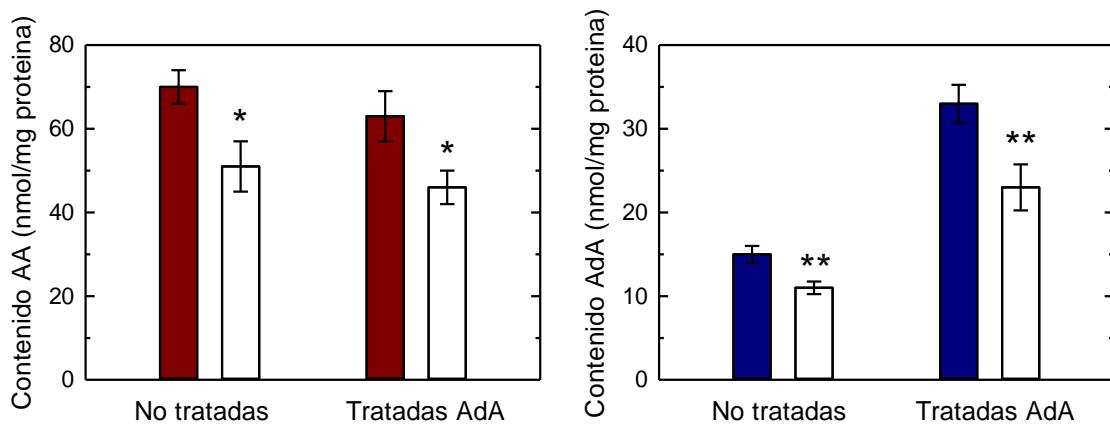


Figura 35. Movilización de AA y de AdA en macrófagos estimulados con zimosán. Las células fueron no tratadas o tratadas con AdA exógeno durante 20 horas. Despues las células fueron no estimuladas (barras coloreadas) o estimuladas (barras sin colorear) con 1 mg/mL de zimosán durante 1h y el contenido celular de AA (A) o AdA (B) fue determinado por CG/MS. Los datos fueron expresados como valores medios ± error estándar de la media ($n=3$). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ estadísticamente significativo en células estimuladas con zimosán con respecto a células control.

En cuanto a los metabolitos derivados del AA producidos en macrófagos peritoneales de ratón estimulados con zimosán y enriquecidos con AdA, en la **figura 36** se observa un perfil prácticamente idéntico al obtenido en células no enriquecidas en dicho ácido graso, aunque se observa un aumento del único metabolito detectado derivado del AdA, dihomoprostaglandina E₂.

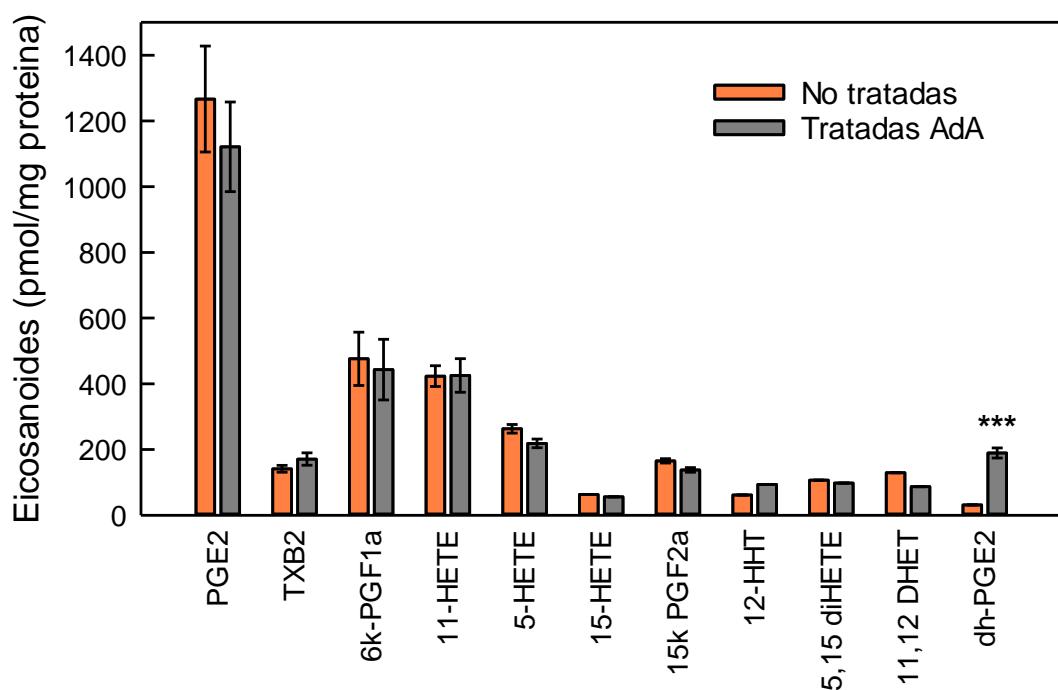


Figura 36. Producción de eicosanoides en macrófagos peritoneales estimulados. Células no tratadas (barras naranjas) o tratadas con AdA exógeno durante 20 h (barras grises). Después las células fueron estimuladas con 1 mg/mL de zimosán durante 1 h y el contenido de eicosanoides en los sobrenadantes fue analizado por LC-MS. Los datos fueron expresados como valores medios ± error estándar de la media de tres réplicas individuales. PGE2, prostaglandina E2; TXB2, tromboxano B2; 6k-PGF1a, 6-ceto prostaglandina F1 α (el producto estable de la prostaglandina I2); 11-HETE, ácido 11-hidroxieicosatetraenoico; 5-HETE, ácido 5-hidroxieicosatetraenoico; 15-HETE, ácido 15-hidroxieicosatetraenoico; 15k-PGF2a, 15-cetoprostaglandina F2 α ; 12-HHT, ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico; 5,15-diHETE, ácido 5,15-dihidroxieicosatetraenoico; 11,12-DHET, ácido 11,12-dihidroxieicosatrienoico; dh-PGE2, dihomoprostaglandina E2. *p<0,05 significativamente diferente de las incubaciones en ausencia de AdA. ***p< 0,001 estadísticamente significativo para células tratadas con AdA con respecto a células control.

Todos estos datos apoyan la idea de que, en macrófagos activados con zimosán, el AdA no influye en el metabolismo de AA ni en la producción de eicosanoides derivados del mismo. Por tanto, el proceso que permite la movilización y el metabolismo de ambos ácidos grasos parece estar independientemente regulado.

-----Hoja confidencial-----

E. DISCUSIÓN

E.1 El zimosán provoca la movilización diferencial de AA en macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos han sido estudiados a lo largo de los años como una de las principales fuentes de AA libre y de eicosanoides. Estas células contienen niveles elevados de AA esterificado en fosfolípidos de membrana los cuales pueden ser hidrolizados y liberados por una amplia variedad de estímulos para posteriormente poder ser metabolizado a sus derivados oxigenados con diferentes funciones biológicas[204,205].

En este estudio se ha investigado la respuesta de los macrófagos peritoneales de ratón a zimosán y su homólogo opsonizado. En los resultados propuestos en este trabajo se ha podido observar por liberación de [³H]AA como ambos estímulos liberan AA dependiente de tiempo y de concentración, registrando diferencias entre ambos tipos de estímulos. Así, se ha podido observar que la liberación de AA fue más elevada en presencia de ZOp. Aunque ambos estímulos tienen diferentes vías de señalización, estudios previos ya habían descrito cómo ambos tienen un efecto común, la cPLA₂α la cual se activa y tiene un papel transcendental en la hidrólisis y liberación del AA. Sin embargo, se ha podido demostrar cómo ni la iPLA₂β ni la sPLA₂ participan en la movilización del AA de las especies de PL.

A lo largo de los últimos años son numerosos los estudios que han analizado cómo la activación celular participa en la liberación de AA en diferentes tipos celulares. Balgoma et al. describieron que, en presencia de este estímulo, los monocitos humanos liberan AA de las especies de PC y de PI, con leves cambios en las especies de PE[111]. Esta liberación también fue observada en macrófagos peritoneales de ratón por Rouzer et al[206], en el que la liberación de AA únicamente venía producida en las especies de PC, de nuevo con ligeras disminuciones en PE.

Estudios realizados por LC-MS y GC-MS muestran la presencia mayoritaria de AA en las especies de PE, sobretodo en los plasmalógenos, aunque una gran cantidad también se localiza en PC y en PI. En condiciones de estimulación con zimosán, los macrófagos experimentan disminuciones en los niveles de PC y de PI, no registrando variaciones en

los niveles de PE. Sin embargo, en presencia de ZOp, se observan, además, ligeras disminuciones en el contenido de las principales especies de PE que contienen AA. La movilización diferencial de AA por parte de ambos estímulos puede deberse a que cada estímulo actúa vía diferentes receptores, y por lo tanto tiene diferentes mecanismos de acción para regular la disponibilidad de AA libre.

También se estudió qué enzimas se encontraban implicadas en la liberación de AA de los fosfolípidos de membrana con ayuda de inhibidores selectivos de las diferentes fosfolipasas. El uso de inhibidores permeables a las células tiene grandes ventajas; la inhibición se logra de manera muy rápida a los pocos minutos de la adición y esto evita efectos en la transcripción, traducción u otras alteraciones de expresión génica a largo plazo que normalmente ocurren con estrategias genéticas. Otro principal problema de las estrategias genéticas que es evitado con el uso de inhibidores es la existencia de mecanismos compensatorios debido a la expresión de diferentes isoformas de PLA₂ en una célula o tejido. Otra ventaja del uso de inhibidores deriva del descubrimiento de que ciertas fosfolipasas ejercen funciones no catalíticas dentro de las células. Estas funciones se mantienen activas en presencia de inhibidores, no resultando así si la inhibición se realizase por enfoques genéticos[113]. Estudios previos llevados a cabo por Gil de Gómez et al[113] muestran cómo, mientras que la cPLA₂α toma un papel relevante en la liberación de este ácido graso, la iPLA₂β parece no tomar parte en dicho proceso, datos que son corroborados en este estudio.

El análisis de eicosanoides producidos a partir de AA por diferentes vías enzimáticas demuestra cómo, los niveles de estos son más elevados en presencia de zimosán opsonizado, debido a que, como se ha comentado anteriormente, este estímulo permite movilizar mayores cantidades de AA que serán empleados en la célula para la síntesis de estos metabolitos oxidados.

Además, PGE₂ constituye el metabolito mayoritario bajo ambas condiciones de estimulación. La falta de recuperación de la especie de PE que contiene AA durante la estimulación con ZOp puede explicar que las cantidades de AA y PGE₂ libres producidos en macrófagos estimulados con ZOp son más altos que en células estimuladas con zimosán. Esto se debe al uso reducido de AA para la remodelación de fosfolípidos.

E.2 El AA contenido en los fosfolípidos experimenta una remodelación durante la fagocitosis en macrófagos peritoneales de ratón

Estudios previos en monocitos humanos demostraron la falta de variación en los niveles de PE-AA en condiciones de estimulación celular[111], al igual que se ha demostrado en este trabajo en macrófagos peritoneales de ratón. Mientras que el AA se incorpora a varias especies de PC y de PI mediante aciltransferasas dependientes de CoA[207,208], una ruta muy importante para la incorporación de AA a PE está mediada por la enzima CoA-IT, la cual media la transferencia de AA desde un fosfolípido donador a un lisofosfolípido acceptor en ausencia de CoA[59,74,120]. Tanto alquenil-acilo PE como diacil-PE son los principales aceptores de esta reacción mientras que diacil-PC que contiene AA es un donador importante[59,74,120].

Estudios previos en células estimuladas con zimosán mostraron que el AA liberado de las especies de PE por hidrolisis de cPLA₂α es reabastecido por la continua acción de CoA-IT[111,113,118,124]. Por lo tanto, el hallazgo de que la hidrolisis fue detectable en PE en presencia de ZOp pero no en presencia de zimosán nativo llevó a investigar las reacciones de remodelación de AA por CoA-IT.

El marcaje con [³H]AA ha permitido comprobar que el principal acceptor de AA en los fosfolípidos de membrana es PC y que, gradualmente, estos niveles de PC-AA van disminuyendo a medida que aumentan los niveles de PE-AA. Sin embargo, esta remodelación llevada a cabo entre PC-PE no se produce en las especies de PI.

También se ha demostrado cómo la transferencia de AA de PC a PE es más rápida cuando se emplea zimosán, mientras que los tiempos con ZOp se alargan levemente. Sin embargo, las células sin activar tienen un tiempo de remodelación más elevado, reflejando una transferencia lenta de AA entre los fosfolípidos, lo cual indica que este proceso está regulado por el estado de activación celular. Esto está de acuerdo con estudios previos realizados en mastocitos, donde se muestra una remodelación mayor cuando las células fueron tratadas con diferentes estímulos[127].

En concordancia con estos resultados, también se ha observado que los niveles de lisoPE en células estimuladas con ZOp son más altos que los estimulados con zimosán nativo, lo cual indica una mayor tasa de remodelación en células activadas con zimosán sin opsonizar.

El empleo del inhibidor de CoA-IT SKF98625 provoca un bloqueo de la respuesta de zimosán, teniendo efectos menores en respuesta a ZOp. Por lo tanto, la remodelación de AA mediada por CoA-IT depende del estímulo.

De esta manera, dependiendo del estímulo y del receptor implicado, ya sea zimosán y dectina-1 o ZOp y FcR existe una participación distinta de CoA-IT en la reacción de transacilación dando un abanico de posibilidades diferentes. Según el receptor implicado, la cPLA₂α puede acceder a diferentes reservas de ácidos grasos y por ello, el PE que contiene AA puede representar una hidrólisis directa por cPLA₂α, pero no por CoA-IT cuando la estimulación se produce a partir de los receptores Fc. Sin embargo, si el receptor que entra en juego es dectina-1, las especies de PE que contienen AA serán empleado por CoA-IT para abstraer AA de PC y de este modo limitar la producción de eicosanoídes que deriven de especies de PC que contienen AA [110,113,118,195]. Por lo tanto, debido a que PC constituye una fuente primordial de AA libre durante la activación celular PC[119,206], la inhibición de la remodelación del AA desde las especies de PC hacia las especies de PE provoca por lo tanto una mayor concentración de AA liberado de PC y una mayor síntesis de eicosanoídes.

Además, la falta de recuperación de los niveles de PE-AA cuando se produce la estimulación con ZOp podría explicar las mayores cantidades de AA y de PGE₂ producidos cuando se estimulan las células con ZOp a diferencia de niveles más bajos con zimosán nativo.

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

E.4 cPLA₂α y iPLA₂β participan en la movilización del ácido adrénico en macrófagos peritoneales de ratón.

El AdA es un producto derivado de la elongación del AA en dos carbonos y, al igual que este, el AdA puede ser movilizado de los fosfolípidos de membrana para la síntesis de metabolitos oxigenados que participen en funciones celulares [134,135, 216,217]. Se ha podido comprobar que el AdA se encuentra en cantidades significativas en los fosfolípidos de membrana en los macrófagos peritoneales murinos, aunque la cantidad de dicho ácido graso corresponda a una cuarta parte de la cantidad de AA en las mismas células. Sin embargo, la distribución de dicho ácido graso entre los diferentes fosfolípidos es muy similar a la de AA, encontrándose mayoritariamente en PE seguido de PC y finalmente PI y PS.

En condiciones de activación celular llevadas a cabo en presencia de zimosán, el AdA se hidroliza y se libera, siendo posteriormente metabolizado a dihomoprostaglandina E₂ como se ha podido observar por técnicas de espectrometría de masas.

En este estudio se ha podido analizar cómo, en presencia de AdA exógeno, los macrófagos tienden a utilizar el AA de la misma manera que cuando estos no son enriquecidos con AdA, por lo tanto, dicho ácidos grasos no compiten entre sí en condiciones de inflamación. Es decir, la liberación y el metabolismo de AA en células enriquecidas con AdA exógeno es el mismo que en células con niveles normales de AdA. También se ha podido comprobar que la adición de AdA exógeno no altera los niveles de AA celular.

Hasta la actualidad son muchos los estudios que prueban el papel de la cPLA₂α en la hidrólisis y movilización del AA en condiciones de estimulación celular [99,218], sin embargo, poco se sabía de la enzima implicada en la movilización de AdA. Aunque estructuralmente tanto el AA como el AdA son muy semejantes, estudios realizados por Mouchlis et al [91] muestran cómo, por simulaciones de dinámica molecular, cPLA₂α tiene preferencia por AA. Esto se debe a que dicha enzima tiene un sitio activo rígido, donde se acopla el fosfolípido con AA en posición sn-2 confiriéndole una

especificidad distintiva ante dicho sustrato. Por otra parte, el sitio activo de iPLA₂β es más versátil pudiéndose así acoplar fosfolípidos con muchos tipos de ácidos grasos.

En este trabajo se demuestra cómo la versatilidad del sitio activo de la iPLA₂β permite que esta enzima participe a la vez que la cPLA₂α en la liberación del AdA, a diferencia del AA, en cuya liberación únicamente se encuentra implicada la cPLA₂α[99,218,219]. Este es un hallazgo muy innovador, ya que son escasas las publicaciones implicando a la iPLA₂β en la producción de eicosanoides en estados inflamatorios[80,90,113,220].

En este estudio también se ha podido observar como la pirrofenona inhibe la cPLA₂α y esto impide la liberación de AA y en cierta medida la de AdA. Sin embargo, la inhibición de iPLA₂β en presencia de FKGK18 no impide la liberación de AA, pero sí en gran parte la de AdA. Con estos datos se puede concluir que la cPLA₂α participa en la liberación tanto de AA como de AdA mientras que la iPLA₂β únicamente participa en la movilización de AdA.

En análisis por espectrometría de masas de fosfolípidos muestra un perfil similar entre las principales especies que contienen AA y AdA. Sin embargo, en condiciones de estimulación celular, se ha observado como, el AA libre proviene de la hidrolisis de especies de PC y de PI, quizás también de PE, mientras que en el caso del AdA, este parece derivar exclusivamente de las especies de PC.

Como ya se ha discutido en la sección D.2 de la discusión de esta tesis, la aparente falta de hidrolisis y liberación de PE[113,118,206]en presencia de un estímulo como es el zimosán puede deberse a la participación de transacilasas independientes de CoA, las cuales movilizan el AA liberado de las especies de PC en las especies de PE, lo cual también podría estar sucediendo en el caso de AdA. Sin embargo, no se ha demostrado que esto suceda en las especies de PI[59,120]. Esto pudiera deberse a una imposibilidad de las fosfolipasas implicadas de alcanzar el sustrato PI que contiene AdA. Esta diferencia en la movilización de ambos ácidos grasos puede conllevar diferentes mecanismos que regulan la disponibilidad de ambos.

Todos los datos de esta sección nos demuestran diferencias en el mecanismo de movilización del AA y del AdA y de las enzimas implicadas en dicho proceso, además de las clases de fosfolípidos empleados como sustratos.

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

-----Hoja confidencial-----

F. CONCLUSIONES

Con lo que respecta al primer objetivo, el estudio del metabolismo del AA en condiciones de activación celular relacionado intrínsecamente con estados inflamatorios, los resultados obtenidos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- El ácido araquidónico se libera de fosfolípidos de colina y de inositol en condiciones de activación celular. Además, la liberación de AA aumenta cuando el estímulo inflamatorio actúa vía FcR, siendo su acción más leve cuando actúa vía Dectin-1.
- La cPLA₂α es la responsable de escindir el enlace de unión del AA al esqueleto de glicerol de los fosfolípidos. Sin embargo, los estudios demuestran que la iPLA₂β no participa en dicho proceso.

En cuanto al segundo objetivo, el cual se centra en el estudio de la remodelación del AA entre diferentes fosfolípidos y estados celulares, se concluyó lo siguiente:

- En condiciones de activación celular, el AA experimenta un proceso de remodelación en el cual se transfiere de las especies de glicerofosfatidilcolina reesterificándose en las especies de glicerofosfatidiletanolamina. Sin embargo, las especies de fosfatidilinositol no experimentan este proceso. Además, dependiendo al receptor al que se acople el estímulo, los tiempos de remodelación varían, siendo más rápida cuando el estímulo actúa vía dlectina-1.

En cuanto al tercer objetivo, el cual se centra en la movilización del AAox de las especies de fosfolípidos, las evidencias experimentales generaron los siguientes resultados:

- Bajo un estímulo proinflamatorio, los niveles de AAox-PL aumentan considerablemente en las especies de PC y de PI, mientras que los niveles de glicerofosfatidiletanolamina no experimentan grandes variaciones.
- A diferencia de las fosfolipasas implicadas en la liberación del AA, tanto iPLA₂β como cPLA₂α participan en los niveles celulares de AAox-PL.

- El 5-HETE es el metabolito mayoritario producido por oxidación del AA vía LOX bajo acción de un estímulo inflamatorio. Por otra parte, la acción de otras lipoxigenasas u oxidación espontánea no parecen tener relevancia.

Con respecto al estudio del cuarto objetivo, estudio centrado en la participación y regulación del AdA a nivel metabólico en las situaciones inflamatorias, las conclusiones específicas de este apartado fueron las siguientes:

- La distribución del AdA y de su precursor, el AA, es la misma a nivel cualitativo, destacando los niveles de ambos ácidos grasos n-6 en las especies de PE, seguido de PC como fuentes principales.
- A diferencia del AA el cual experimenta hidrolisis y liberación de las especies de PC y de PI, el AdA se moviliza en presencia de un estímulo inflamatorio únicamente de las especies de PC.
- El AdA no influye en el metabolismo de AA ni en la producción de eicosanoides derivados de dicho ácido graso. El proceso que permite la movilización y el metabolismo de ambos ácidos grasos parece estar independientemente regulado.

Finalmente, como quinto objetivo, análisis del perfil lípidico de diferentes ácidos grasos n-3 y n-6 presentes en fosfolípidos en macrófagos activados de forma clásica o de forma alternativa, las conclusiones derivadas del estudio experimental fueron las siguientes:

- Mientras que los niveles de AA disminuyen tanto en el fenotipo proinflamatorio M1 como en el antiinflamatorio M2 en condiciones de activación celular, no sucede así con los niveles de AdA, DHA, DPA y EPA los cuales solo experimentan una reducción en la polarización M2, no siendo liberados en los macrófagos polarizados a M1.

G. BIBLIOGRAFÍA

1. Hillion S, Arleevskaya MI, Blanco P, Bordron A, Brooks WH, Cesbron JY, Kaveri S, Vivier E, Renaudineau Y. The innate part of the adaptive immune system. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2020**; *58*: 151–154.
2. Kubelkova K, Macela A. Innate immune recognition: An issue more complex than expected. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**; *9*:241
3. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1989**; *54*: 1–13.
4. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal os that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* **2012**; *249*: 158–175.
5. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **2011**; *30*: 16–34.
6. Imler J-L, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* **2001**; *11*: 304–311.
7. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **2009**; *21*: 317–337.
8. Lind NA, Rael VE, Pestal K, Liu B, Barton GM. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2022**; *22*: 224–235.
9. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**; *14*: 392–404.
10. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**; *11*: 723–737.
11. Crespo-Lessmann A, Juárez-Rubio C, Plaza-Moral V. Role of toll like receptors in respiratory diseases. *Arch. Bronconeumol.* **2010**; *46*: 135–142.
12. Monserrat Sanz J, Gómez Lahoz AM, Sosa Reina MD, Prieto Martín A. Introduction to the immune system. Cellular components of the innate immune system. *Medicine* **2017**; *12*: 1369–1378.
13. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat.*

- Neurosci.* **2007**; *10*: 1538–1543.
14. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* **2014**; *15*: 929–937.
 15. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, Guilliams M, Malissen B, Agace WW, Mowat AM. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* **2013**; *6*: 498–510.
 16. Van Furth R. Origin and kinetics of monocytes and macrophages. *Semin. Hematol.* **1970**; *7*: 125–41.
 17. Van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **1968**; *128*: 415–435.
 18. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **2013**; *38*: 79–91.
 19. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: phenotypical vs. Functional differentiation. *Front. Immunol.* **2014**; *5*: 514
 20. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **2014**; *41*: 21–35.
 21. Bain CC, Gibson DA, Steers NJ, Boufea K, Louwe PA, Doherty C, Gonzalez-Huici V, Gentek R, Pinto MM, Shaw T, Bajénoff M, Bénézech C, Walmsley SR, Docrell DH, Saunders PTK, Batada NN, Jenkins SJ. Rate of replenishment and microenvironment contribute to the sexually dimorphic phenotype and function of peritoneal macrophages. *Sci. Immunol.* **2020**; *5*: 1-35
 22. Schulz C, Perdiguero EG, Chorro L, Rogers HS, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of

- myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science* **2012**; *336*: 86–90.
23. Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* **2011**; *41*: 2155–2164.
 24. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Guan L, Stanley R, Samokhvalov I, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **2010**; *330*: 841–845.
 25. Cain DW, O’Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, Hopper K, Gunn MD, Kelsoe G. Identification of a tissue-specific, C/EBP β -dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **2013**; *191*: 4665–4675.
 26. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2010**; *107*: 2568–2573.
 27. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* **2014**; *157*: 832–844.
 28. Wang J, Kubes P. A. Reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade visceral organs to affect tissue repair. *Cell* **2016**; *165*: 668–678.
 29. Cassado AA, de Albuquerque JAT, Sardinha LR, Buzzo CL, Faustino L, Nascimento R, Ghosn EEB, D’Imperio Lima MR, Mossig Álvarez JM, Bortoluci KR. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS One* **2011**; *6*: e22141.
 30. Cassado AA, D’Imperio Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front. Immunol.* **2015**; *6*: 225

31. Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert Rev. Mol. Med.* **2006**; *8*: 1–25.
32. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**; *23*: 901–944.
33. Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope RM. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **2007**; *56*: 2192–2201.
34. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -Glucans. *J. Exp. Med.* **2003**; *197*: 1119–1124.
35. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity* **2016**; *44*: 463–475.
36. Hazan-Halevy I, Seger R, Levy R. The requirement of both extracellular regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase for stimulation of cytosolic phospholipase A₂ activity by either Fc γ RIIA or Fc γ RIIB in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **2000**; *275*: 12416–12423.
37. Minich DM, Vonk RJ, Verkade HJ. Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions. *J. Lipid Res.* **1997**; *38*: 1709–1721.
38. Grundy SM. Monounsaturated fatty acids, plasma cholesterol, and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **1987**; *45*: 1168–1175.
39. Zhou L, Nilsson A. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J. Lipid Res.* **2001**; *42*: 1521–42.
40. Zhu D, Ran Y. Role of 15-lipoxygenase/15-hydroxyeicosatetraenoic acid in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J. Physiol. Sci.* **2012**; *62*: 163–172.
41. Burnett BP, Levy RM. 5-Lipoxygenase metabolic contributions to NSAID-induced organ toxicity. *Adv. Ther.* **2012**; *29*: 79–98.
42. Knuplez E, Sturm EM, Marsche G. Emerging role of phospholipase-derived cleavage products in regulating eosinophil activity: focus on lysophospholipids,

- polyunsaturated fatty acids and eicosanoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**; *22*: 4356.
43. Calder PC. Eicosanoids. *Essays Biochem.* **2020**; *64*: 423–441.
44. di Carlo FJ, Fiore JV. On the composition of zymosan. *Science* **1958**; *127*: 756–757.
45. Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**; *12*: 492–502.
46. Goodridge HS, Underhill DM, Touret N. Mechanisms of Fc receptor and Dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic* **2012**; *13*: 1062–1071.
47. Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *J. Endotoxin Res.* **2003**; *9*: 176–180.
48. Qiu ZH, De Carvalho MS, Leslie CC. Regulation of phospholipase A₂ activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* **1993**; *268*: 24506–24513.
49. Marone G, Fimiani B, Torella G, Poto S, Bianco P, Condorelli M. Possible role of arachidonic acid and of phospholipase A₂ in the control of lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Lab. Immunol.* **1983**; *12*: 111–6.
50. Gordon S. Phagocytosis: An immunobiologic process. *Immunity* **2016**; *44*: 463–475.
51. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Pomares LM, Wong SY, Gordon S. Dectin-1 is a major β-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* **2002**; *196*: 407–412.
52. Lin L-L, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **1993**; *72*: 269–278.
53. Qiu Z-H, Gijón MA, de Carvalho MS, Spencer DM, Leslie CC. The Role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J. Biol. Chem.* **1998**; *273*: 8203–8211.
54. Aderem AA, Wright SD, Silverstein SC, Cohn ZA. Ligated complement receptors

- do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **1985**; *161*: 617–622.
55. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**; *19*: 275–290.
56. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* **2007**: 179–204.
57. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **2005**; *22*: 507–517.
58. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcy receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **1997**; *186*: 1027–1039.
59. Chilton FH, Fonteh AN, Surette ME, Triggiani M, Winkler JD. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**; *1299*: 1–15.
60. Leslie CC. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A₂. *Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids* **2004**; *70*: 373–376.
61. Gijón MA, Leslie CC. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *J. Leukoc. Biol.* **1999**; *65*: 330–336.
62. Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**; *39*: 175–189.
63. Lands WE, Inoue M, Sugiura Y, Okuyama H. Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylcholine by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **1982**; *257*: 14968–14972.
64. Lands WE. Metabolism of glycerolipids. The enzymatic acylation of lysolecithin. *J Biol Chem* **1960**; *235*: 2233–2237.
65. Pérez-Chacón G, Astudillo AM, Ruipérez V, Balboa MA, Balsinde J. Signaling role

- for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *J. Immunol.* **2010**; *184*: 1071–1078.
66. Lands WE. Stories about acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**; *1483*: 1–14.
67. Balsinde J. Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* **2002**; *364*: 695–702.
68. Balsinde J, Dennis EA. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **1997**; *272*: 16069–16072.
69. Kennedy EP. The biosynthesis of phospholipids. *Am. J. Clin. Nutr.* **1958**; *6*: 216–220.
70. Blank ML, Smith ZL, Snyder F. Contributing factors in the trafficking of [³H] arachidonate between phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**; *1124*: 262–272.
71. Blank ML, Smith ZL, Snyder F. Arachidonate-containing triacylglycerols: biosynthesis and a lipolytic mechanism for the release and transfer of arachidonate to phospholipids in HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**; *1170*: 275–282.
72. Chilton FH, Murphy RC. Stimulated production and natural occurrence of 1,2-diarachidonoylglycerophosphocholine in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**; *145*: 1126–1133.
73. Mouchlis VD, Dennis EA. Phospholipase A₂ catalysis and lipid mediator lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**; *1864*: 766–771.
74. Astudillo AM, Balboa MA, Balsinde J. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**; *1864*: 772–783.
75. Leslie CC, Gangelhoff TA, Gelb MH. Localization and function of cytosolic phospholipase A_{2α} at the Golgi. *Biochimie* **2010**; *92*: 620–626.
76. Ghosh M, Tucker D, Burchett S, Leslie C. Properties of the Group IV

- phospholipase A₂ family. *Prog. Lipid Res.* **2006**; *45*: 487–510.
77. Murakami M, Kudo I. Phospholipase A₂. *J. Biochem.* **2002**; *131*: 285–292.
78. Channon JY, Leslie CC. A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem* **1990**; *265*: 5409–5413.
79. Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* **1999**; *97*: 349–360.
80. Shirai Y, Balsinde J, Dennis EA. Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V, and Ca²⁺ independent Group VI phospholipase A₂s in P388D1 macrophages using GFP/RFP constructs. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**; *1735*: 119–129.
81. Schievella AR, Regier MK, Smith WL, Lin L-L. Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **1995**; *270*: 30749–30754.
82. Casas J, Balsinde J, Balboa MA. Phosphorylation of cPLA₂α at Ser505 is necessary for its translocation to PtdInsP₂-enriched membranes. *Molecules* **2022**; *27*: 2347.
83. Balsinde J, Fernandez B, Solis-Herruzo JA. Increased incorporation of arachidonic acid into phospholipids in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Biochem.* **1994**; *221*: 1013–1018.
84. Balboa MA, Balsinde J. Phospholipases: From structure to biological function. *Biomolecules* **2021**; *11*: 428.
85. Shikano M, Masuzawa Y, Yazawa K, Takayama K, Kudo I, Inoue K. Complete discrimination of docosahexaenoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A₂ during the hydrolysis of diacyl- and alkenylacylglycerophosphoethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**; *1212*: 211–216.
86. Reynolds LJ, Washburn WN, Deems RA, Dennis EA. Assay strategies and methods for phospholipases. *Methods Enzymol.* **1991**: 3–23.

87. Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**; *27*: 1168–1173.
88. Li Y, Yamada H, Kita Y, Kunimi M, Horita S, Suzuki M, Endo Y, Shimizu T, Seki G, Fujita T. Roles of ERK and cPLA₂ in the angiotensin II-mediated biphasic regulation of Na⁺-HCO₃⁻ Transport. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**; *19*: 252–259.
89. Peña L, Meana C, Astudillo AM, Lordén G, Valdearcos M, Sato H, Murakami M, Balsinde J, Balboa MA. Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A₂ in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**; *1861*: 1083–1095.
90. Ramanadham S, Ali T, Ashley JW, Bone RN, Hancock WD, Lei X. Calcium-independent phospholipases A₂ and their roles in biological processes and diseases. *J. Lipid Res.* **2015**; *56*: 1643–1668.
91. Mouchlis VD, Chen Y, McCammon JA, Dennis EA. Membrane allostery and unique hydrophobic sites promote enzyme substrate specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**; *140*: 3285–3291.
92. Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. Antisense inhibition of group VI Ca²⁺ independent phospholipase A₂ blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* **1997**; *272*: 29317–29321.
93. Song H, Wohltmann M, Tan M, Ladenson JH, Turk J. Group VIA phospholipase A₂ mitigates palmitate-induced β-Cell mitochondrial injury and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2014**; *289*: 14194–14210.
94. Sun W-Y, Tyurin VA, Mikulska-Ruminska K, Shrivastava IH, Anthonymuthu TS, Zhai YJ, Pan MH, Gong HB, Lu DH, Sun J, Duan WJ, Korolev S, Abramov AY, Angelova PR, Miller I, Beharier O, Mao GW, Dar HH, Kapralov AA, Amoscato AA, Hastings TG, Greenamyre TJ, Chu CT, Sadovsky Y, Bahar I, Bayir H, Tyurina YY, He RR, Kagan VE. Phospholipase iPLA₂β averts ferroptosis by eliminating a redox lipid death signal. *Nat. Chem. Biol.* **2021**; *17*: 465–476.
95. Chen D, Chu B, Yang X, Liu Z, Kon N, Rabadian R, Jiang X, Stockwell BR, Gu W. iPLA₂β-mediated lipid detoxification controls p53-driven ferroptosis

- independent of GPX4. *Nat. Commun.* **2021**; *12*: 3644.
96. Beharier O, Tyurin VA, Goff JP, Santoro JG, Kajiwara K, Chu T, Tyurina YY, Croix CM, Wallace CT, Parry S, Parks TW, Kagan VE, Sadovsky Y. PLA₂G6 guards placental trophoblasts against ferroptotic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**; *117*: 27319–27328.
 97. Rosenson RS, Hurt-Camejo E. Phospholipase A₂ enzymes and the risk of atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **2012**; *33*: 2899–2909.
 98. Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A₂. *J. Lipid Res.* **2015**; *56*: 1248–1261.
 99. Balsinde J, Winstead M v, Dennis EA. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* **2002**; *531*: 2–6.
 100. Han WK, Sapirstein A, Hung CC, Alessandrini A, Bonventre J v. Cross-talk between Cytosolic Phospholipase A₂α (cPLA₂α) and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **2003**; *278*: 24153–24163.
 101. 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*: 3877–3883.
 102. Ruipérez V, Casas J, Balboa MA, Balsinde J. Group V phospholipase A₂ derived lysophosphatidylcholine mediates cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* **2007**; *179*: 631–638.
 103. Kikawada E, Bonventre JV, Arm JP. Group V secretory PLA₂ regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2α activation. *Blood* **2007**; *110*: 561–567.
 104. Rubio JM, Rodríguez JP, Gil-de-Gómez L, Guijas C, Balboa MA, Balsinde J. Group V secreted phospholipase A₂ is upregulated by IL-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J. Immunol.* **2015**; *194*: 3327–3339.
 105. Casas J, Meana C, Esquinas E, Valdearcos M, Pintado J, Balsinde J, Balboa MA.

- Requirement of JNK-Mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A₂ to phagosomes in human macrophages. *J. Immunol.* **2009**; *183*: 2767–2774.
- 106.** Balestrieri B, Hsu VW, Gilbert H, Leslie CC, Han WK, Bonventre JV, Arm JP. Group V secretory phospholipase A₂ translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **2006**; *281*: 6691–6698.
- 107.** Chilton FH, Connell TR. 1-ether-linked phosphoglycerides. Major endogenous sources of arachidonate in the human neutrophil. *J Biol Chem* **1988**; *263*: 5260–5265.
- 108.** Mueller HW, O'Flaherty JT, Greene DG, Samuel MP, Wykle RL. 1-O-alkyl-linked glycerophospholipids of human neutrophils: distribution of arachidonate and other acyl residues in the ether-linked and diacyl species. *J Lipid Res* **1984**; *25*: 383–388.
- 109.** MacDonald JIS, Sprecher H. Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**; *1084*: 105–121.
- 110.** Chilton FH. Potential phospholipid source(s) of arachidonate used for the synthesis of leukotrienes by the human neutrophil. *Biochem. J.* **1989**; *258*: 327–333.
- 111.** 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*: 3857–3865.
- 112.** 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*: 5169–5177.
- 113.** 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*: 752–762.

114. Winkler JD, Sung CM, Chabot-Fletcher M, Griswold DE, Marshall LA, Chilton FH, Bondinell W, Mayer RJ. β -Lactams SB 212047 and SB 216754 are irreversible, time-dependent inhibitors of coenzyme A-independent transacylase. *Mol. Pharmacol.* **1998**; *53*: 322–329.
115. Winkler JD, Fonteh AN, Sung CM, Heravi JD, Nixon AB, Chabot-Fletcher M, Griswold D, Marshall LA, Chilton FH. Effects of CoA-independent transacylase inhibitors on the production of lipid inflammatory mediators. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**; *274*: 1338–1347.
116. Winkler JD, Eris T, Sung CM, Chabot-Fletcher M, Mayer RJ, Surette ME, Chilton FH. Inhibitors of coenzyme A-independent transacylase induce apoptosis in human HL-60 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**; *279*: 956–966.
117. Surette ME, Fonteh AN, Bernatchez C, Chilton FH. Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis* **1999**; *20*: 757–763.
118. Gil-de-Gómez L, Astudillo AM, Lebrero P, Balboa MA, Balsinde J. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Front. Immunol.* **2017**; *8*: 1251
119. Astudillo AM, Rodríguez JP, Guijas C, Rubio JM, Balboa MA, Balsinde J. Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNF α gene expression in macrophages via a cPLA $_2\alpha$ /COX-1 pathway. *Cells* **2021**; *10*: 447.
120. 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 A $_2$ in transacylation. *Biology (Basel)* **2017**; *6*: 23.
121. Yamashita A, Tanaka K, Kamata R, Kumazawa T, Suzuki N, Koga H, Waku K, Sugiura T. Subcellular localization and lysophospholipase/transacylation activities of human group IVC phospholipase A $_2$ (cPLA $_2\gamma$). *Biochim. Biophys. Acta* **2009**; *1791*: 1011–1022.
122. Yamashita A, Kamata R, Kawagishi N, Nakanishi H, Suzuki H, Sugiura T, Waky K.

- Roles of C-terminal processing, and involvement in transacylation reaction of human group IVC phospholipase A₂ (cPLA₂γ). *J. Biochem.* **2005**; *137*: 557–567.
- 123.** Stewart A, Ghosh M, Spencer DM, Leslie CC. Enzymatic properties of human cytosolic phospholipase A₂γ. *J. Biol. Chem.* **2002**; *277*: 29526–29536.
- 124.** 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 A₂γ in phospholipid remodeling. *Cells* **2019**; *8*: 799.
- 125.** 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* **2011**; *1811*: 97–103.
- 126.** Surette ME, Winkler JD, Fonteh AN, Chilton FH. Relationship between arachidonate–phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry* **1996**; *35*: 9187–9196.
- 127.** Fonteh AN, Chilton FH. Rapid remodeling of arachidonate from phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine pools during mast cell activation. *J. Immunol.* **1992**; *148*: 1784–1791.
- 128.** Winkler JD, Sung C-M, Huang L, Chilton FH. CoA-independent transacylase activity is increased in human neutrophils after treatment with tumor necrosis factor α. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**; *1215*: 133–140.
- 129.** Boillard E, Surette ME. Anti-CD3 and concanavalin A-induced human T cell proliferation is associated with an increased rate of arachidonate-phospholipid remodeling. *J. Biol. Chem.* **2001**; *276*: 17568–17575.
- 130.** Kramer RM, Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺ sensitive cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). *FEBS Lett.* **1997**; *410*: 49–53.
- 131.** Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**; *31*: 986–1000.
- 132.** Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. *J. Immunol.*

- 2012; 188: 21–28.
133. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2015; 15: 511–523.
134. Kopf PG, Zhang DX, Gauthier KM, Nithipatikom K, Yi XY, Falck JR, Campbell WB. Adrenic acid metabolites as endogenous endothelium-derived and zona glomerulosa-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* 2010; 55: 547–554.
135. Campbell WB, Falck JR, Okita JR, Johnson AR, Callahan KS. Synthesis of dihomoprostaglandins from adrenic acid (7,10,13,16-docosatetraenoic acid) by human endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 837: 67–76.
136. Hammond VJ, O'Donnell VB. Esterified eicosanoids: generation, characterization and function. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1818: 2403–2412.
137. O'Donnell VB, Murphy RC. Directing eicosanoid esterification into phospholipids. *J. Lipid Res.* 2017; 58: 837–839.
138. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Prog. Lipid Res.* 2019; 73: 28–45.
139. Wuest SJA, Crucet M, Gemperle C, Loretz C, Hersberger M. Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 2012; 225: 121–127.
140. Thomas CP, O'Donnell VB. Oxidized phospholipid signaling in immune cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012; 12: 471–477.
141. Abd Alla J, Quitterer U. The RAF kinase inhibitor protein (RKIP): good as tumour suppressor, bad for the heart. *Cells* 2022; 11: 654.
142. Zhao J, O'Donnell VB, Balzar S, st. Croix CM, Trudeau JB, Wenzel SE. 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 14246–14251.
143. Schoentgen F, Jonic S. PEBP1/RKIP behavior: a mirror of actin-membrane organization. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77: 859–874.

144. Wenzel SE, Tyurina YY, Zhao J, St. Croix CM, Dar HH, Mao G, Tyurin VA, Anthonymuthu TS, Kapralov AA, Amoscato AA, Mikulska-Ruminska K, InShrivastava IH, Kenny E, Yang Q, Rosenbaum JC, Sparvero LJ, Emlet DR, Wen X, Minami Y, Qu F, Watkins SC, Holman TR, VanDemark AP, Kellum JA, Bahar I, Bayır H, Kagan VE. PEBP1 wardens ferroptosis by enabling lipoxygenase generation of lipid death signals. *Cell* **2017**; *171*: 628-641.
145. Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**; *133*: 144–152.
146. Forcina GC, Dixon SJ. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis. *Proteomics* **2019**; *19*: e1800311.
147. Tyurina YY, st. Croix CM, Watkins SC, Watson AM, Epperly MW, Anthonymuthu TS, Kisin ER, Vlasova II, Krysko O, Krysko DV, Kapralov AA, Dar HH, Tyurin VA, Amoscato AA, Popova EN, Bolevich SB, Timashev PS, Kellum JA, Wenzel SE, Mallampalli RK, Greenberger JS, Bayır H, Shvedova AA, Kagan VE. Redox (phospho)lipidomics of signaling in inflammation and programmed cell death. *J. Leukoc. Biol.* **2019**, *106*, 57-81
148. Poeckel D, Zemski Berry KA, Murphy RC, Funk CD. Dual 12/15- and 5-lipoxygenase deficiency in macrophages alters arachidonic acid metabolism and attenuates peritonitis and atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Biol. Chem.* **2009**; *284*: 21077–21089.
149. Pawlowski NA, Scott WA, Andreach M, Cohn ZA. Uptake and metabolism of monohydroxy-eicosatetraenoic acids by macrophages. *J. Exp. Med.* **1982**; *155*: 1653–1664.
150. Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N. PPARs as metabolic regulators in the liver: lessons from liver-specific PPAR-Null mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**; *21*: 2061.
151. O'Flaherty JT, Rogers LC, Paumi CM, Hantgan RR, Thomas LR, Clay CE, High K, Chen YQ, Willingham MC, Smitherman PK, Kute TE, Rao A, Cramer SD, Morrow CS. 5-Oxo-ETE analogs and the proliferation of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**; *1736*: 228–236.

152. O'Donnell VB, Rossjohn J, Wakelam MJO. Phospholipid signaling in innate immune cells. *J. Clin. Invest.* **2018**; *128*: 2670–2679.
153. O'Donnell VB, Aldrovandi M, Murphy RC, Krönke G. Enzymatically oxidized phospholipids assume center stage as essential regulators of innate immunity and cell death. *Sci. Signal.* **2019**; *12*: 574
154. Greig FH, Kennedy S, Spickett CM. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. *Free Rad. Biol. Med.* **2012**; *52*: 266–280.
155. Bochkov VN, Oskolkova O v., Birukov KG, Levonen A-L, Binder CJ, Stöckl J. Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid. Redox Signal.* **2010**; *12*: 1009–1059.
156. Subbanagounder G, Leitinger N, Shih PT, Faull KF, Berliner JA. Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis. *Circ. Res.* **1999**; *85*: 311–318.
157. Aldrovandi M, O'Donnell VB. Oxidized PLs and vascular inflammation. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2013**; *15*: 323.
158. Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology* **2018**; *155*: 407–417.
159. Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Bolado-García VE, Téllez-Mendoza J, Laviada-Molina H, Comuzzie AG. Macrophages, inflammation, adipose tissue, obesity and insulin resistance. *Gac. Med. Mex.* **2007**, *143*: 505–12.
160. Arish M, Naz F. Macrophage plasticity as a therapeutic target in tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* **2022**; *52*: 696–704.
161. Tomiotto-Pellissier F, Bortoletti BT da S, Assolini JP, Gonçalves MD, Carloto ACM, Miranda-Sapla MM, Conchon-Costa I, Bordignon J, Pacavanelli WR. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. *Front. Immunol.* **2018**; *9*: 2529
162. Lee-Rueckert M, Lappalainen J, Kovanen PT, Escola-Gil JC. Lipid-Laden Macrophages and inflammation in atherosclerosis and cancer: an integrative

- view. *Front. Cardiovasc. Med.* **2022**; *9*: 777822
- 163.** Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **2012**; *122*: 787–795.
- 164.** Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**; *8*: 958–969.
- 165.** Kashfi K, Kannikal J, Nath N. Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: role of iNOS-derived NO. *Cells* **2021**; *10*: 3194.
- 166.** Zheng X-F, Hong Y-X, Feng G-J, Zhang GF, Rogers H, Lewis MAO, Williams DW, Xia ZF, Song B, Wei XQ. Lipopolysaccharide-Induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production Is blocked by candida albicans mediated up-regulation of EBI₃ expression. *PLoS One* **2013**; *8*: e63967.
- 167.** Atri C, Guerfali F, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**; *19*: 1801.
- 168.** Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Macrophage polarity and disease control. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**; *23*: 144.
- 169.** Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* **2008**; *181*: 3733–3739.
- 170.** Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**; *3*: 23–35.
- 171.** Jung M, Mertens C, Brüne B. Macrophage iron homeostasis and polarization in the context of cancer. *Immunobiology* **2015**; *220*: 295–304.
- 172.** Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* **2011**; *32*: 241–247.
- 173.** Sierra-Filardi E, Vega MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL, Puig-Kröger A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology* **2010**; *215*: 788–795.
- 174.** Varin A, Mukhopadhyay S, Herbein G, Gordon S. Alternative activation of

- macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood* **2010**; *115*: 353–362.
- 175.** Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Holden JA, Lenzo JC, Fong SB, Reynolds EC. Unprimed, M1 and M2 macrophages differentially interact with *porphyromonas gingivalis*. *PLoS One* **2016**; *11*: e0158629.
- 176.** Jaggi U, Yang M, Matundan HH, Hirose S, Shah PK, Sharifi BG, Ghiasi K. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. *PLOS Pathog.* **2020**; *16*: e1008971.
- 177.** Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**; *13*: 709–721.
- 178.** Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S *et al.* The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid Artery. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **2013**; *22*: 910–918.
- 179.** Labonte AC, Tosello-Trampont A-C, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol. Cells* **2014**; *37*: 275–285.
- 180.** Sottero B, Testa G, Gamba P, Staurenghi E, Giannelli S, Leonarduzzi G. Macrophage polarization by potential nutraceutical compounds: A strategic approach to counteract inflammation in atherosclerosis. *Free Rad. Biol. Med.* **2022**; *181*: 251–269.
- 181.** Orliaguet L, Dalmas E, Drareni K, Ventelef N, Alzaid F. Mechanisms of macrophage polarization in insulin signaling and sensitivity. *Front. Endocrinol.* **2020**; *11*: 62
- 182.** Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function. *Front. Immunol.* **2014**; *5*: 470
- 183.** Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, Farronato G, Bruno A, Mortara L. Macrophage polarization in chronic inflammatory diseases: killers or

- builders? *J. Immunol. Res.* **2018**; *2018*: 1–25.
184. Menghini R, Casagrande V, Menini S, Marino A, Marano V, Hribal MK, Gentileschi P, Lauro D, Schillaci O, Pugliese G, Sbraccia P, Urbani A, Luro R, Federici M. TIMP3 overexpression in macrophages protects from insulin resistance, adipose inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Diabetes* **2012**; *61*: 454–462.
185. Ruytinx P, Proost P, van Damme J, Struyf S. Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions. *Front. Immunol.* **2018**; *9*: 1930.
186. Halama N, Zoernig I, Berthel A, Kahlet C, Klupp F, Suarez-Carmona M, Suetterlin T, Brand K, Krauss J, Lasitschka F, Lerchl T, Luckner-Minden C, Ulrich A, Koch M, Weitz J, Schneider M, Buechler MW, Zitvogel L, Herrmann T, Benner A, Kunux C, Luecke S, Springfield C, Grabe N, Falk CS, Jaeger D. Tumoral immune cell exploitation in colorectal cancer metastases can be targeted effectively by Anti-CCR5 therapy in cancer patients. *Cancer Cell* **2016**; *29*: 587–601.
187. Martín JC, Bandrés JC. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1999**; *22*: 413.
188. Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G. M1 and M2a Polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. *J. Immunol.* **2009**; *182*: 6237–6246.
189. Balsinde J, Fernández B, Diez E. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* **1990**; *144*: 4298–304.
190. Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**; *72*: 248–254.
191. Balsinde J, Fernández B, Solís-Herruzo JoséA, Diez E. Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**; *1136*: 75–82.
192. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification.

- Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**; *37*: 911–917.
193. Axelsen PH, Murphy RC. Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J. Lipid Res.* **2010**; *51*: 660–671.
194. Valdarcos 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*: 6004–6013.
195. Diez E, Balsinde J, Aracil M, Schüller A. Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**; *921*: 82–89.
196. Fine JB, Sprecher H. Unidimensional thin-layer chromatography of phospholipids on boric acid-impregnated plates. *J. Lipid. Res.* **1982**; *23*: 660–663.
197. 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*: 402–408.
198. Valdarcos M, Esquinas E, Meana C, Peña L, Gil-de-Gómez L, Balsinde J, Balboa MA. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J. Biol. Chem.* **2012**; *287*: 10894–10904.
199. Suram S, Brown GD, Ghosh M, Gordon S, Loper R, Taylor PR, Akira S, Uematsu S, Williams DL, Leslie CC. Regulation of cytosolic phospholipase A₂ activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the β -glucan receptor. *J. Biol. Chem.* **2006**; *281*: 5506–5514.
200. Buczynski MW, Stephens DL, Bowers-Gentry RC, Grkovich A, Deems RA, Dennis EA. TLR-4 and sustained calcium agonists synergistically produce eicosanoids independent of protein synthesis in RAW264.7 cells. *J. Biol. Chem.* **2007**; *282*: 22834–22847.
201. Chilton FH, Fonteh AN, Sung CM, Hickey DM, Torphy TJ, Mayer RJ, Marshall LA, Heravi JD, Winkler JD. Inhibitors of CoA-independent transacylase block the movement of arachidonate into 1-ether-linked phospholipids of human

- neutrophils. *Biochemistry* **1995**; *34*: 5403–5410.
- 202.** Brouwers H, Jonasdottir H, Kwekkeboom J, Lopez-Vicario C, Claria J, Freysdottir J, Hardardottir I, Huizinga T, Toes R, Giera M, Kloppenburg M, Ioan-Facsinay A. Adrenic acid as a novel anti-inflammatory player in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2018**; *26*: S126.
- 203.** Suram S, Gangelhoff TA, Taylor PR, Rosas M, Brown GD, Bonventre JV, Akira S, Uematsu S, Williams DL, Murphy RC, Leslie CC. Pathways regulating cytosolic phospholipase A₂ activation and eicosanoid production in macrophages by *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **2010**; *285*: 30676–30685.
- 204.** Guijas C, Rodríguez JP, Rubio JM, Balboa MA, Balsinde J. Phospholipase A₂ regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**; *1841*: 1661–1671.
- 205.** Astudillo AM, Balgoma D, Balboa MA, Balsinde J. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**; *1821*: 249–256.
- 206.** Rouzer CA, Ivanova PT, Byrne MO, Brown HA, Marnett LJ. Lipid profiling reveals glycerophospholipid remodeling in zymosan-stimulated macrophages. *Biochemistry* **2007**; *46*: 6026–6042.
- 207.** Murphy RC, Folco G. Lysophospholipid acyltransferases and leukotriene biosynthesis: intersection of the Lands cycle and the arachidonate PI cycle. *J. Lipid Res.* **2019**; *60*: 219–226.
- 208.** Pérez-Chacón G, Astudillo AM, Balgoma D, Balboa MA, Balsinde J. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**; *1791*: 1103–1113.
- 209.** Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**; *482*: 419–425.
- 210.** Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**; *22*: 266–282.
- 211.** Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JPF, Doll S, st Croix C, Dar, HH, Liu B, Tyurin VA,

- Ritov VB, Kapralov AA, Amoscato AA, Jiang J, Anthonymuthu T, Mohammadyani D, Yang Q, Proneth B, Klein-Seetharaman J, Watkins S, Tyurina YY, Conrad M, Bayir H. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat. Chem. Biol.* **2017**; *13*: 81–90.
212. Stockwell BR, Jiang X. A Physiological function for ferroptosis in tumor suppression by the immune system. *Cell Metab.* **2019**; *30*: 14–15.
213. Morgan LT, Thomas CP, Kühn H, O'Donnell VB. Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase. *Biochem. J.* **2010**; *431*: 141–148.
214. Flamand N, Picard S, Lemieux L, Pouliot M, Bourgoin SG, Borgeat P. Effects of pyrrophenone, an inhibitor of group IVA phospholipase A₂, on eicosanoid and PAF biosynthesis in human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* **2006**; *149*: 385–392.
215. Ono T, Yamada K, Chikazawa Y, Ueno M, Nakamoto S, Okuno T, Seno K. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A_{2α}, pyrrophenone. *Biochem. J.* **2002**; *363*: 727–735.
216. Harkewicz R, Fahy E, Andreyev A, Dennis EA. Arachidonate-derived dihomoprostaglandin production observed in endotoxin-stimulated macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* **2007**; *282*: 2899–2910.
217. Mann CJ, Kaduce TL, Figard PH, Spector AA. Docosatetraenoic acid in endothelial cells: formation, retroconversion to arachidonic acid, and effect on prostacyclin production. *Arch. Biochem Biophys.* **1986**; *244*: 813–823.
218. Leslie CC. Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* **2015**; *56*: 1386–1402.
219. Bonventre JV. Cytosolic phospholipase A_{2α} reigns supreme in arthritis and bone resorption. *Trends Immunol.* **2004**; *25*: 116–119.
220. Balsinde J, Balboa M. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cell. Signal.* **2005**; *17*: 1052–1062.
221. Batista-Gonzalez A, Vidal R, Criollo A, Carreño LJ. New Insights on the role of

- lipid metabolism in the metabolic reprogramming of macrophages. *Front. Immunol.* **2020**; 10: 2993
- 222.** Brouwers H, Jónasdóttir HS, Kuipers ME, Kwekkeboom JC, Auger JL, Gonzalez-Torres M, López-Vicario C, Clària J, Freysdottir J, Hardardottir I, Garrido-Mesa J, Norling LV, Perretti M, Huizinga TWJ Kloppenburg M, Toes REM, Binstadt B, Giera M, Ioan-Facsinay A. Anti-inflammatory and proresolving effects of the omega-6 polyunsaturated fatty acid adrenic acid. *J. Immunol.* **2020**; 205: 2840–2849.