

# TESIS DOCTORAL

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

Miguel Angel Bermúdez Arias

*Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),  
Universidad de Valladolid, 47003 Valladolid, España*

Fecha de defensa: 2021

*\*Esta es una versión en castellano, condensada y sin gráficos de la tesis doctoral presentada por Miguel Angel Bermúdez Arias para la obtención del título de doctor por la Universidad de Valladolid.*

### 1. INTRODUCCION

#### 1.1. Gotas lipídicas

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

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

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

La perilipina es una proteína que ayuda a estabilizar las LD y está implicada en procesos de protección de los lípidos neutros frente a las lipasas

(5). Por otro lado, la proteína ADRP está relacionada con la diferenciación de los adipocitos y con la estabilización de las LD. Por último, no se conocen mucho las funciones de TIP47, pero parece estar involucrada en la regulación de la lipólisis en células del músculo esquelético (6). También se ha identificado la presencia de otras proteínas de la familia PAT, S3-12 (PLIN4) y OXPAT/MLDP (PLIN5) aunque están menos descritas (7, 8).

Aparte de la familia de las PAT, han sido descritas numerosas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico en la superficie de las LD, como son la triacilglicerol lipasa (ATGL) (9), la lipasa sensible a hormonas (HSL) (10), la citidina trifosfato: fosfocolina citidiltransferasa (CCT) (11), la lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT) (12), la acil-CoA sintetasa de cadena larga 3 (ACSL3) (13), lipina-1 (14, 15) o la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica de grupo IVA (cPLA<sub>2</sub>α) (16) entre otras.

#### 1.1.1. Biogénesis de gotas lipídicas

A pesar de los importantes avances producidos los últimos años, el mecanismo de generación de esas LD no ha sido aun completamente establecido. La formación de las LD involucra gran cantidad de pasos y ocurre en el retículo endoplasmático (RE), donde se producirá la formación de la monocapa anfipática de las LD (18) (Fig. I.1.2).

El primer paso de la biogénesis de las LD es la síntesis de lípidos, como son los TAG y CE. En cada caso, para su síntesis están involucradas diferentes enzimas terminales localizadas en el RE,

como son las enzimas diacilglicerol aciltransferasas (DGAT-1 y 2) y las acil-CoA:colesterol aciltransferasas (ACAT), que pueden ser activadas por distintos estímulos como es el exceso de ácidos grasos libres presentes en el medio, la activación celular o el estrés de RE (19, 20).

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

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

Las LD nacientes necesitan una curvatura de membrana local positiva en la membrana del RE para poder crecer (Fig. I.1.2). Esta membrana está compuesta principalmente por PC, que presenta una forma espacial cilíndrica que genera una curvatura neutra, y en menor medida, fosfatidiletanolamina (PE), que genera una ligera curva negativa (3, 25). Determinaciones biofísicas han revelado que la acumulación de liso-PLs que tienen conformación en forma de cuña como el liso-PC, el liso-PE y, especialmente el lisoPA que genera una curvatura local positiva de la membrana, es beneficiosa en términos del brote de la gota lipídica naciente (3, 18, 24, 26). Debido a que estos lisofosfolípidos son generados por la acción de las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), parece que algunas de estas enzimas, como la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , puede estar implicada en la formación de las primeras etapas de las LD (21, 26-28).

Una vez generada la curva positiva en la base de las LD, las células son capaces de almacenar más TAG y CE dentro de la monocapa fosfolipídica. Debido a la mayor acumulación de estos lípidos neutros, es necesario un incremento a la vez de la cantidad de PLs, para mantener las propiedades biofísicas de la monocapa de la futura gota lipídica. Para ello se necesita una coordinación de diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos y en la reactivación de los lisoPLs previamente

formados. Una vez que la LD brota de la superficie de la membrana del RE, es necesario establecer una curvatura neutra para favorecer la estabilización de las LD nacientes y la protección del núcleo hidrofóbico de la lipólisis. (11, 24)

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

A la par de este proceso de remodelación de los lípidos neutros y los fosfolípidos que componen estas nacientes LD, se va a producir el reclutamiento de diferentes proteínas accesorias como las de la familia PAT. Aunque no se sabe cuál es la implicación de estas proteínas en la generación de las LD, algunas de sus funciones van desde la estabilización de su estructura, el control de lipólisis y el reclutamiento de otras proteínas y lípidos (17, 24, 32).

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

### *1.1.2. Diversidad funcional de las gotas lipídicas*

El alto número de estudios y artículos de revisión recientes que tratan sobre las LD ilustra el cambio en la forma de pensar acerca de estos orgánulos. De ser considerados como meros depósitos de almacenamiento de ácidos grasos para la  $\beta$ -oxidación y la biosíntesis de membranas, las LD son ahora reconocidas como actores clave en la regulación celular de la homeostasis de los lípidos, la señalización, el tráfico extra e intracelular y la regulación transcripcional génica (3, 24, 34). Además, la formación de LDs puede también constituir un signo de estrés y de muerte celular (35). Por otra parte, las LD también son importantes en la

batalla contra las infecciones actuando como una defensa intracelular de primera línea en la inmunidad innata, respondiendo a las señales de peligro mediante la reprogramación del metabolismo celular y la activación de mecanismos antimicrobianos (36). No es sorprendente que las LD de diferentes tipos de células, u obtenidas bajo diferentes estímulos o estados metabólicos, pueden diferir enormemente en sus proteínas y/o composición lipídica (37-39). De hecho se ha observado que una misma célula puede tener diferentes poblaciones de LD en adipocitos; por ejemplo, las LD nacientes presentan mayormente PLIN3 (TIP47) y PLIN4 (S3-12), mientras que en las LD ya formadas PLIN1 (perilipina) y PLIN2 (ADRP) son las proteínas predominantes (40, 41). Estas conclusiones sugieren que las LD pueden someterse a un proceso de maduración.

La heterogeneidad de las LD también es evidente en cuanto a su composición lipídica. El uso de microscopía de dispersión Raman ha permitido constatar que diferentes LD dentro de una misma célula presentan distinta composición lipídica (42). Los estudios proteómicos están permitiendo encontrar cada vez más proteínas asociadas a los LD (38). La caracterización de cómo estas proteínas afectan a la biología de estos orgánulos, permitirá en un futuro próximo conocer mejor el porqué de la heterogeneidad de éstos, y ayudar a aclarar las interacciones de la LD con el RE, las mitocondrias, los peroxisomas, los endosomas, los lisosomas, y la membrana plasmática (24, 43-45).

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

## 1.2. Aterosclerosis

Aunque en los últimos 20 años se han hecho grandes avances para caracterizar las LD y su relación con la biología de la adiposidad y el hígado, menos investigaciones se han centrado en las LD y las enfermedades cardiovasculares (CVD). A pesar de ello, hoy en día sabemos que las LD pueden tener funciones protectoras y nocivas en salud cardiovascular. En algunas situaciones, el almacenamiento de lípidos dentro de las LD es un marcador de sobrecarga de lípidos y de reducción de la función cardíaca (46). En otras circunstancias, las LD pueden prevenir la toxicidad de los lípidos mediante secuestro de especies de lípidos tóxicos como el colesterol, las ceramidas y los 1,2-diacilgliceroles (DAGs) (47). Un ejemplo destacado

en este contexto es la acumulación de ésteres de colesterol en las LD de macrófagos (células espumosas) en la íntima de las arterias, un paso importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo, se sabe poco sobre la composición de las LD en las células espumosas y cómo la formación y movilización de las LD son reguladas en el contexto de la aterosclerosis.

La aterosclerosis es la responsable de la gran mayoría de las enfermedades cardiovasculares y también es la principal causa de muerte en los países industrializados (48). La aterosclerosis implica primero la expansión de la íntima arterial, un área normalmente pequeña entre el endotelio y las células del musculo liso, debido a la acumulación de lípidos, células y matriz extracelular. Gracias a la preservación del lumen arterial, este proceso inicial raramente conduce a síntomas. Sin embargo, con el tiempo, algunas de estas lesiones pueden evolucionar y sufrir una descomposición necrótica, lo que precipita la trombosis aguda y oclusión de las arterias, llegando a obtener diferentes consecuencias: infarto de miocardio, angina inestable, muerte cardíaca repentina o accidente cerebrovascular. La aterosclerosis es un proceso de enfermedad focal que ocurre predominantemente en los sitios de flujo laminar perturbado, en particular, en los puntos de la rama arterial y las bifurcaciones (49).

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

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

Tras la quimioquinesis, los monocitos se anclan y ruedan sobre las células endoteliales que cubren las apoB-LP retenidas, en particular mediante la interacción del ligando de la glicoproteína P-selectina-1 del monocito (PSGL-1) con las selectinas de las células endoteliales (57). El análisis inmunohistoquímico de las lesiones humanas sugiere que las integrinas de los monocitos VLA-4 (antígeno-4 muy tardío) y LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos) y sus respectivos ligandos celulares endoteliales, VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular) e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), pueden ser especialmente importantes en el establecimiento de aterogénesis. Además, las plaquetas reclutadas hacia el endotelio en las lesiones ateroscleróticas promueven las adhesiones de los monocitos circulantes con las células endoteliales, a través de la liberación de quimioquinas derivadas de plaquetas en el endotelio activado. Estas quimioquinas activan la señalización vía NF- $\kappa$ B y la expresión de moléculas de adhesión en los monocitos (57, 58). Por último, la adhesión de los monocitos es seguida por su entrada al espacio subendotelial (59).

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

### 1.2.1. *Macrófagos espumosos y aterosclerosis*

Un sello distintivo del desarrollo de las placas ateroscleróticas es la acumulación en la íntima

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

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

Una de las primeras evidencias de que los receptores scavenger son importantes en aterogénesis surgió de experimentación realizada en animales doblemente deficientes en el receptor SR-A y la ApoE (principal componente de las apoproteínas en los quilomicrones). Tenían una reducción de un 60% en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, en comparación con el tipo salvaje (67). Sin embargo, estudios más recientes han sido menos categóricos en cuanto al papel proaterogénico del SR-A (68, 69). En estos estudios la doble deficiencia en SR-A y el receptor LDL causó sólo un 20% de reducción en la aterosclerosis (68), mientras que la deficiencia de SR-A en ratones transgénicos que expresan una ApoE disfuncional no produjo ninguna disminución en aterosclerosis. Finalmente, parece que la acción proaterogénica del SR-A dependería de la expresión de ApoE. Esta controversia ha sido interpretada como una indicación de que la ApoE tiene un complejo papel de la aterosclerosis, y está relacionada con el hecho de que la ApoE no sólo actúa en el metabolismo de la lipoproteína plasmática, sino que también tiene una influencia estimuladora del eflujo de colesterol en los macrófagos (70, 71). Uno anticiparía que este último efecto sirviera como un mecanismo de protección que contrarresta la formación de células espumosas.

Recientemente, un apoyo más sólido para un papel central de los SR, en especial el SR-B o CD36, fue proporcionado por un estudio en ratones con

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

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

### 1.2.2. *Monocitos espumosos circulantes*

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

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

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

La confirmación de que existe una relación entre la carga de LD de los monocitos y el desarrollo temprano de las lesiones ateroscleróticas, se ha encontrado en modelos *in vivo* donde se eliminaron los monocitos espumosos circulantes (CD11c<sup>+</sup>) mediante tratamiento con clodronato (79). Este tratamiento no influía en los niveles de monocitos sin LD (CD11<sup>-</sup>), ni en los macrófagos residentes en las arterias. Sin embargo, el clodronato redujo las lesiones ateroscleróticas en ratones tratados, respecto a los ratones sin tratar (79).

Además se ha descrito que la síntesis de las LD de los monocitos espumosos circulantes va acompañada de aumentos en la expresión de los niveles de integrinas como VLA-4, CD11b, CD11c, CD18 y CD29 (76, 79, 87), y también de receptores de quimioquinas como CCR2 y CX3CR1 (77, 87). También se ha demostrado en experimentos *in vitro*, que el aumento de expresión de estos compuestos facilita la adhesión a las células endoteliales, mientras que *in vivo* se ha observado un aumento de estos monocitos infiltrados en las placas ateroscleróticas (79, 87). Por otra parte, la formación de LD en monocitos circulantes también va acompañada de una activación inflamatoria, aumentando los niveles de expresión de diferentes genes que codifican para diversas citoquinas, tales como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  (79, 87).

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

### 1.2.3. *Ácido araquidónico, compuesto liberado en lesiones ateroscleróticas*

El ácido araquidónico (5,8,11,14-ácido eicosatetraenoico, AA) es un FA de la familia n-6 que se obtiene directamente de la dieta, o se sintetiza a partir

del ácido linoleico (18:2n-6) mediante las acciones sucesivas de  $\Delta 6$ -desaturasa, elongasa y  $\Delta 5$ -desaturasa. Se produce principalmente en el hígado, pero también en otros tejidos (88, 89).

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

Estudios del estado inflamatorio en las placas ateroscleróticas tempranas, indican que el ácido araquidónico es liberado en cantidades apreciables al torrente sanguíneo por las células endoteliales (98). Este hecho podría contribuir de manera destacada a la formación de LD en los monocitos circulantes, transformándolos en monocitos espumosos y por consiguiente, pro-aterogénicos (77, 79). La mayor fuente de AA libre es producida por las células endoteliales activadas en presencia de LDL oxidadas (53-56, 99). Además, la acción de ciertas fosfolipasas  $A_2$  secretadas sobre los PL de las LDL producen la liberación de importantes cantidades de AA al torrente sanguíneo (100-102), asociando la función de estas enzimas a focos de aterosclerosis (103, 104). Por último, las plaquetas reclutadas hacia el endotelio activado constituyen otra fuente de producción de AA libre en los focos de aterosclerosis (98).

En estudios previos del laboratorio se ha descrito que el AA es un potente inductor de la síntesis de lípidos neutros en monocitos circulantes humanos y por lo tanto, de su conversión en células espumosas. Las vías de activación de cPLA $_2\alpha$  por p38 y JNK, y la activación de la síntesis de ácidos grasos de novo parecen ser las rutas intracelulares que conducen a la formación de LD (26). También se ha observado que los efectos biológicos del AA no se ven afectados por la presencia de inhibidores de la ciclooxigenasa o la lipoxigenasa, lo que sugiere que son debidas al propio ácido graso y no a un metabolito oxigenado producido por las células después de estar en contacto con el AA (26).

En este sentido, el análisis molecular de la composición de los ácidos grasos de los lípidos neutros de monocitos espumosos ha demostrado que

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

En las células inflamatorias, el AA se encuentra generalmente esterificado en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos, en particular los glicerofosfolípidos de colina (PC), de etanolamina (PE) y de inositol (PI) (96). Los niveles de AA libre de células son controlados por dos reacciones que compiten entre sí, por un lado, la acción de la fosfolipasa  $A_2$  (PLA $_2$ ), que hidroliza la posición sn-2 de los fosfolípidos para producir el ácido graso libre y, por otro, las reacciones de aciltransferasas dependientes de CoA, que reincorporan el ácido graso libre en los fosfolípidos. Es importante destacar que la mayor parte de los ácidos grasos dentro de las células se encuentran activados con CoA (107, 108). En este paso de reacilación de AA libre cabe destacar las sintetasas de cadena larga de acil-CoA (ACSL3, 4 y 6) (109, 110) y las acil transferasas lisoPC:acil-CoA aciltransferasa 2 (111), lisoPC:acil-CoA aciltransferasa 3 (112-114), lisoPI:acil-CoA aciltransferasa y ácido lisofosfatídico:acil-CoA aciltransferasa 3 (113, 115) que muestran selectividad por el AA.

En las células en reposo, las reacciones de reacilación dominan sobre el paso de desacilación mediado por la PLA $_2$ , por lo que el AA libre se mantiene en niveles bajos. La estimulación de las células por agonistas de los receptores inflamatorios provoca la activación de las PLA $_2$  intracelulares (116-119). En estas condiciones, la tasa de la liberación de AA excede claramente la de la reincorporación en los fosfolípidos, por lo tanto, se produce una acumulación neta de AA libre que es seguida por su conversión a diversos eicosanoides. No obstante, las reacciones de reacilación de AA siguen siendo muy plurales en condiciones de estimulación, como se manifiesta en el hecho de que sólo una pequeña fracción del AA liberado por las PLA $_2$  se convierte en eicosanoides (108).

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

La producción de mediadores lipídicos está intrínsecamente vinculada con la disponibilidad de precursores de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) necesarios para su síntesis. Esta producción depende de las actividades de numerosas enzimas y proteínas que regulan la captación, el transporte, la hidrólisis, el almacenamiento, la remodelación y el tráfico de PUFA entre las diferentes reservas lipídicas celulares y extracelulares (lipoproteínas) (108, 120). Tradicionalmente, la producción de eicosanoides se ha asociado con la actividad de las enzimas fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que tienen acceso a uno de los principales reservorios de PUFA fácilmente movilizables: la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos. En particular, la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica dependiente de calcio de grupo IVA (cPLA<sub>2</sub>α) ha sido ampliamente reconocida como la principal responsable de liberar AA para la producción de eicosanoides (Fig. I.2.5.) (121). Otros miembros de la superfamilia PLA<sub>2</sub> también pueden estar implicados en el suministro de AA y otros PUFA para la producción de mediadores lipídicos, aunque su contribución es menor. Estudios recientes han revelado otras fuentes fisiológicamente relevantes de AA para la producción de eicosanoides, como son la hidrólisis de endocannabinoides por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (122-124), de lípidos lisosomales por la lipasa ácida de lisosomas (LAL) (125) y de lípidos neutros por la lipasa del tejido adiposo (ATGL) (126, 127).

La superfamilia PLA<sub>2</sub> consta de más de 30 enzimas que muestran una selectividad y especificidad diferentes sobre los fosfolípidos de membrana (128-130). Todas ellas liberan FAs y lisofosfolípidos de la posición sn-2 del esqueleto de glicerol de los glicerofosfolípidos y se han dividido clásicamente en al menos tres grandes familias, las fosfolipasas A<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>), y las intracelulares independientes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>) y las citosólicas A<sub>2</sub> dependientes de Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>).

Aunque, como se ha hecho constar anteriormente, muchos miembros de la superfamilia PLA<sub>2</sub> pueden potencialmente producir AA libre para la síntesis de eicosanoides, la cPLA<sub>2</sub>α es la única que muestra una especificidad significativa para hidrolizar fosfolípidos de membrana que contienen AA (129, 130). Al activarse la célula por diversos estímulos inflamatorios, la enzima se transloca de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup> desde el citosol a las membranas del aparato de Golgi, RE, la envoltura nuclear o las LD, un evento que es esencial para el inicio de la producción de eicosanoides. Esto permite

su posicionamiento en la proximidad inmediata de la maquinaria enzimática COX/LOX, optimizando así la provisión de ácido araquidónico para una rápida producción de eicosanoides. Las enzimas COX se localizan principalmente en el RE, pero también en el Golgi, mientras que la síntesis de leucotrienos se produce muy probablemente en la envoltura nuclear (129, 131). Sin embargo, la localización perinuclear de cPLA<sub>2</sub>α no es imprescindible para su acoplamiento funcional con las enzimas COX/LOX (132). Es importante señalar que los estudios realizados en ratones deficientes en cPLA<sub>2</sub>α han confirmado que la enzima es esencial para la producción de eicosanoides inducida por estímulos en la mayoría de células y tejidos (129, 131, 133, 134). En consecuencia, numerosos estudios han sugerido su participación en enfermedades con un componente inflamatorio, como el asma, las úlceras gástricas, la fibrosis quística, la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, las lesiones neuronales, las enfermedades metabólicas y el cáncer (129, 131, 135).

Otra enzima de la familia de las PLA<sub>2</sub> con gran interés fisiopatológico es la fosfolipasa A<sub>2</sub> independiente de calcio de grupo VIA (iPLA<sub>2</sub>-VIA). Se trata de una enzima con múltiples funciones en fisiología celular y fisiopatología, siendo de especial relevancia en la regulación de la formación ósea, la apoptosis, la secreción de insulina, y la maduración de esperma (136, 137). A diferencia de cPLA<sub>2</sub>α, la iPLA<sub>2</sub>-VIA no manifiesta especificidad con respecto al ácido graso liberado en los ensayos in vitro (128, 138). Estudios realizados en macrófagos de ratón han demostrado que la cPLA<sub>2</sub>α y la iPLA<sub>2</sub>-VIA actúan sobre diferentes fosfolípidos celulares. Mientras que la primera regula la liberación de ácido araquidónico y la producción de eicosanoides, la segunda parece actuar sobre fosfolípidos que no contienen AA (139, 140).

Además de las enzimas intracelulares, hay otro grupo importante de PLA<sub>2</sub> que participa en la producción de mediadores lipídicos, la familia de las enzimas secretadas (sPLA<sub>2</sub>) (141, 142). Las sPLA<sub>2</sub> son secretadas por un variado número de células y actúan principalmente sobre sustratos extracelulares, como las lipoproteínas, las micropartículas, las bacterias y los virus, y la parte externa de la membrana plasmática de las células de mamíferos. En particular, los grupos IID, IIF, III y X (codificados por PLA2G2D, PLA2G2F, PLA2G3 y PLA2G10, respectivamente) muestran una cierta preferencia por la liberación de PUFAs, incluidos el ácido araquidónico y n-3 PUFAs (Fig. I.2.5.), al actuar sobre sus respectivas membranas diana en contextos fisiológicamente relevantes (143). La PLA<sub>2</sub>

de grupo IID se expresa en las células dendríticas linfoides y muestra un papel antiinflamatorio al liberar n-3 PUFAs y promover la producción de resolvína D1 (144, 145). La sPLA<sub>2</sub> de grupo X es la más potente en hidrolizar membranas ricas en fosfatidilcolina conteniendo PUFA (141, 143), y libera una mezcla de FAs insaturados, incluyendo n-3 PUFAs, de diferentes células in vitro y tejidos (146) murinos in vivo, y protege contra la inflamación, la aterosclerosis y la obesidad (147, 148).

Además de las PLA<sub>2</sub>, el AA esterificado en fosfolípidos es también objeto de sucesivas reacciones de transacilación destinadas a asegurar la correcta distribución del ácido graso dentro de las diversas localizaciones celulares (107, 108, 149, 150). Esto parece ser importante no sólo para la homeostasis de la membrana sino también para la ejecución de respuestas celulares apropiadas durante la activación fisiológica y fisiopatológica (151-154). Estas reacciones de transacilación son catalizadas por la transacilasa independiente de CoA (CoA-IT), una enzima que transfiere preferentemente AA de las especies de diacil PC a diacil PE y plasmalógenos de PE (107, 108). La secuencia proteica de una posible CoA-IT está aún por describir, por lo que actualmente la única manera de estudiar la regulación celular de CoA-IT es a través de su actividad enzimática (155, 156). Basándose en los puntos comunes bioquímicos y mecanísticos, Yamashita y sus colaboradores (157, 158) sugieren que las reacciones de transacilación independientes de CoA son catalizadas por una o varias enzimas de la familia de las PLA<sub>2</sub> y han especulado que la que cPLA<sub>2</sub> del grupo IVC (también llamada fosfolipasa citosólica A<sub>2</sub>γ, cPLA<sub>2</sub>γ) es un posible candidato. Además, un estudio reciente demuestra que esa transferencia de AA de PC a PE en células activadas se ve ralentizada en células deficientes de esta enzima, sugiriendo que cPLA<sub>2</sub>γ puede actuar de forma análoga a la CoA-IT en lo que se refiere a la homeostasis de AA en PL (159). Sin embargo, no se puede confirmar si la cPLA<sub>2</sub>γ participa en la reacción de transacilación independiente de la CoA proporcionando los lisofosfolípidos aceptores que inician la reacción, catalizando directamente la transacilación de los ácidos grasos o actuando a ambos niveles.

En resumen, además de cPLA<sub>2</sub>α, otras enzimas intracelulares, así como miembros de la familia de la sPLA<sub>2</sub> de acción principalmente extracelular, contribuyen a la producción de mediadores lipídicos en diversos entornos. Es evidente que aún estamos lejos de comprender la complejidad de la regulación y la variedad de fuentes de disponibilidad de precursores de PUFA para la producción de mediadores lipídicos por parte de

diferentes PLA<sub>2</sub>. Dado que todavía se desconocen las funciones biológicas de muchas PLA<sub>2</sub> y, como se explica en la siguiente sección, varias PLA<sub>2</sub> se han asociado recientemente con el metabolismo de las LD, no será sorprendente descubrir que muchas de las vías de producción de mediadores de lípidos mediadas por PLA<sub>2</sub> también incluyen el reciclaje de los lípidos de las LDs y el tráfico de ácidos grasos entre los fosfolípidos y los TAG.

#### 1.2.5. PLA<sub>2</sub> y metabolismo de las LD

Numerosas PLA<sub>2</sub> también han sido implicados en la regulación del metabolismo de las LD (33). Aparte del papel de las LD como plataformas de regulación de la movilización de AA y la síntesis de eicosanoides, varias formas de PLA<sub>2</sub> también han sido sugeridas como reguladores críticos de la biogénesis de las LD. Las PLA<sub>2</sub> pueden actuar a varios niveles: i) como proveedores de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana para la síntesis de TAG (22, 146, 160), ii) como modificadores de las partículas, como las lipoproteínas, que contienen fosfolípidos para facilitar su absorción e internalización por las células (100, 161), iii) como generadores de metabolitos que pueden controlar la formación de LD (162), y iv) como reguladores directos de la formación de las LD (26-28).

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

Estudios dirigidos a identificar las fuentes intracelulares de los ácidos grasos esterificados en CE presentes en macrófagos tratados con LDL oxidadas, han mostrado que un inhibidor dual de cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>, pero no la bromoenol lactona, inhibidor de iPLA<sub>2</sub> (152, 154, 164), bloquea la síntesis de CE, señalando así la participación de alguna forma de cPLA<sub>2</sub>, muy probablemente cPLA<sub>2</sub>α en la generación de estos CE (146). Estudios independientes han demostrado que el tratamiento de



macrófagos con oxLDL induce la activación de cPLA<sub>2</sub>α y la posterior liberación de eicosanoides (165). Se han propuesto dos mecanismos para la regulación de la formación de CE mediada por la cPLA<sub>2</sub> y la consiguiente formación de LD en macrófagos tratados con LDL oxidadas. El primero es la activación de la vía de la síntesis de novo de ceramidas por las LDL oxidadas. Se sabe que los elevados niveles intracelulares de ceramidas y su producto fosforilado, ceramida 1-fosfato, inducen la activación de la cPLA<sub>2</sub>α (166-168). La segunda vía sería la disponibilidad del ácido graso oxidado 13-hidroxióctadecadienoico (13-HODE), formado por la oxidación del ácido linoleico, el principal ácido graso de las LDL. El 13-HODE puede liberarse de las LDL oxidadas en lesiones ateroscleróticas a través de la PLA<sub>2</sub> asociada a las lipoproteínas (PLA<sub>2</sub> grupo VIIA) (169). Se ha demostrado que el 13-HODE activa la cPLA<sub>2</sub>α favoreciendo la translocación de la enzima a la membrana donde reside su sustrato (146, 170). Este efecto puede estar mediado por el carácter aniónico del 13-HODE, que facilita la interacción de cPLA<sub>2</sub>α con las membranas, como se ha descrito con otros lípidos aniónicos (108, 171, 172). Otros componentes importantes del LDL oxidadas, como el 7-cetocolesterol o el 25-hidroxicolesterol, no reproducen los efectos del 13-HODE (170).

La iPLA<sub>2</sub>-VIA ha sido propuesta como una enzima clave en la síntesis de TAG antes de la formación de LD inducida por el estrés. Esta enzima proporciona ácidos grasos libres derivados de fosfolípidos para la esterificación en lípidos neutros (21). Puesto que tanto la actividad la cPLA<sub>2</sub>α como la liberación de AA en estas circunstancias parecen depender de la iPLA<sub>2</sub>-VIA, se ha propuesto que ésta última actúa con anterioridad a la cPLA<sub>2</sub>α en la formación de las LD. (21). Estos datos estarían de acuerdo con los hallazgos que muestran que la síntesis de TAG, mediada por iPLA<sub>2</sub>-VIA, se produce antes de la propia formación de LD y, a su vez, sugieren una función reguladora de iPLA<sub>2</sub>-VIA más allá de la de simplemente proporcionar ácidos grasos libres para la síntesis de TAG (21).

El otro miembro ampliamente estudiado de la familia iPLA<sub>2</sub> es la enzima de grupo VIB, iPLA<sub>2</sub>γ. Su localización en el peroxisoma y la membrana mitocondrial sugiere que esta enzima puede estar involucrada en la integración del metabolismo de los lípidos y la obtención de energía (129). Se ha descrito que una breve restricción calórica induce la liberación de ácidos grasos de fosfolípidos y la acumulación de TAG en células de miocardio mürido, como mecanismo de suministro de energía a las células (173). La sobreexpresión de la iPLA<sub>2</sub>γ en estas células aumenta tanto la liberación de los ácidos

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

Se ha encontrado la presencia de sPLA<sub>2</sub> en lesiones ateroscleróticas, probablemente procedentes de monocitos/macrófagos, y se ha propuesto un papel para estas enzimas en la aparición y progresión de la enfermedad (103, 104). Desde un punto de vista general, las sPLA<sub>2</sub> pueden modificar las lipoproteínas nativas en circulación mediante la hidrólisis de sus fosfolípidos, generando así ácidos grasos libres y lisofosfolípidos que cambian el tamaño, la carga eléctrica, la susceptibilidad a la oxidación y/o el estado de agregación de las partículas de lipoproteínas nativas. Estos cambios facilitan su internalización por los macrófagos, lo que da lugar a la acumulación de LD y a la formación de células espumosas. Los estudios in vitro han demostrado que entre todas las sPLA<sub>2</sub> supuestamente implicadas en la progresión de la aterosclerosis, la enzima del grupo X es la enzima hidrolítica más potente, seguida de los grupos V y III. Los grupos IIA, IIE y IIF exhiben bajas tasas de hidrólisis de partículas LDL (103).

La sPLA<sub>2</sub> de grupo IIA constituye un caso especial entre las sPLA<sub>2</sub> porque sólo hidroliza una pequeña cantidad de fosfolípidos dentro de las LDL debido a su preferencia por los fosfolípidos que contienen grupos de cabeza aniónicos (128, 129). A pesar de este potencial reducido para hidrolizar LDLs, comparado con otros sPLA<sub>2</sub>s (175), esta enzima también se ha relacionado fuertemente con la aparición y la progresión de la aterosclerosis (176), ya que facilita la migración de las partículas de LDL al subendotelio (101, 175).

Por lo tanto, las PLA<sub>2</sub> contribuyen al metabolismo de las LD de numerosas maneras y desempeñan importantes funciones como moderadores de los flujos metabólicos y de la señalización de los mediadores de lípidos.

#### *1.2.6. Gotas lipídicas como fuente de ácido araquidónico*

Varios estudios basados en inhibición y localización de cPLA<sub>2</sub>α, han indicado que la cPLA<sub>2</sub>α es probablemente la responsable de la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de las LD (Fig. I.2.5.). Sin embargo, aún no se ha podido demostrar que la cPLA<sub>2</sub>α pueda hidrolizar las moléculas de fosfolípidos en la superficie de las LD. En este escenario, los TAG podrían servir simplemente como

depósitos de reserva de AA que no se ha incorporado en fosfolípidos (177). De modo similar, el enriquecimiento de TAG con AA en las células inmunes también ha sido sugerido como sumidero para limitar el nivel del ácido graso en fosfolípidos, con el fin de reducir la respuesta inflamatoria (178, 179). Sin embargo, las vías enzimáticas y los mecanismos reguladores que rigen la remodelación de los niveles de ácido graso en PL y TAG no se han identificado.

Una serie de estudios han demostrado que la activación de cPLA<sub>2</sub>α es necesaria para biogénesis de LD en células sometidas a estrés, por lo que lo más probable es que participe en la remodelación de la membrana fosfolipídica del retículo endoplásmico para facilitar la expansión de las LD (26, 27, 33, 159). También es posible que la translocación de la cPLA<sub>2</sub>α a la superficie de las LD y su participación en las reacciones de desacilación/reacilación de los fosfolípidos permitan su colaboración tanto en la biogénesis de las LD como en la liberación de AA como mediador lipídico (33).

Por otro lado, sería de gran interés estudiar si el AA, que se acumula en los lípidos neutros dentro de las LD, también puede movilizarse durante la inflamación. Esto constituiría una segunda vía, no caracterizada hasta ahora, para la movilización de AA, alternativa a la movilización "clásica" de AA impulsada por la fosfolipasa A<sub>2</sub> de los fosfolípidos. Algunos estudios sopesan la idea de que la ATGL pueda estar implicada en la liberación de AA y la posterior formación de eicosanoides (126). Sin embargo, otros estudios sugieren que esta liberación de AA tras la activación inflamatoria sólo proviene de la fracción fosfolipídica (179) (Fig. I.2.5.).

### 1.3. Acido palmítico e isómeros

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

Otro de los isómeros posicionales del 16:1 es el 16:1n-10 o ácido sapiénico, que fue detectado por

primera vez en muestras de cabello y uñas humanos, de ahí su nombre (183). También se ha descrito posteriormente que este ácido graso es un componente menor de los fosfolípidos de la membrana de los glóbulos rojos humanos y de los ésteres de colesterol del plasma (184). Se ha propuesto que la mayoría de este ácido graso proviene de la acción de la FADS2, una Δ<sup>6</sup> desaturasa que actúa sobre el ácido palmítico, ya que tampoco se conocen alimentos con altos niveles de este ácido graso (185).

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

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

#### 1.3.1. Isómeros de 16:1 y desórdenes metabólicos

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

En este contexto, un estudio reciente ha demostrado que el enriquecimiento de células Caco-2 (un modelo celular de cáncer de colon humano) con ácido sapiénico favorece la biosíntesis de su producto de elongación, el 18:1n-10 (8cis-18:1), y de un ácido graso poliinsaturado, el ácido sabaleico (5cis,8cis-18:2), formado a través de la acción consecutiva de la Δ<sup>5</sup> desaturasa tras su elongación. Estos hechos hacen que aumente los niveles de ácidos grasos insaturados en el lipídoma celular, contribuyendo a una mayor fluidez de las membranas y mejorando la supervivencia celular (188).

Por su parte, el isómero 16:1n-7 además de presentar los efectos biofísicos comentados, presenta acciones biológicas únicas como coordinador de

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

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

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

### 1.3.2. *Isómeros de 16:1 e inflamación*

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

En los monocitos se ha estudiado la formación de los isómeros 16:1 con diferentes

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

Con respecto al mecanismo por el cual los isómeros del 16:1n-7 tienen efectos en inflamación, se plantea la posibilidad de que estos efectos dependan de su almacenamiento y distribución en diferentes lípidos celulares. En este contexto, estudios realizados en macrófagos tratados con los distintos isómeros del 16:1, mostraron una incorporación casi exclusiva en los fosfolípidos (PL) entre varios lípidos celulares, siendo la mayor incorporación en la fosfatidilcolina (PC). Además, el 90% del total de 16:1 incorporado se encuentra en PC y casi el 80% está presente en la molécula PC(16:0/16:1), lo que sugiere un papel biológico específico para estos PL (106). Por otro lado, es importante destacar que ya se ha demostrado que los PC poliinsaturados son moléculas antiinflamatorias y antioxidantes tanto en modelos animales como en humanos. Además, se ha descubierto que algunas especies de PC con una composición definida de ácidos grasos ejercen una actividad biológica por sí mismas (199, 200), pero no se conoce suficientemente el trasfondo molecular que subyace a esos efectos.

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

## 2. OBJETIVOS

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

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

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

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

## 3. MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Material biológico

Los experimentos con macrófagos peritoneales residentes de ratones se realizaron con la cepa Swiss Webster, criados en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Se utilizaron ratones machos y hembras con edades comprendidas entre las 10-12 semanas por igual, sin

mezclar los sexos en el mismo experimento. Los ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura constante (21-24 °C), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y fueron alimentados ad libitum con una dieta especial para animales de laboratorio y con libre acceso a agua estéril. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Valladolid y de acuerdo con la legislación española y europea sobre investigación animal.

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

Las células de macrófagos RAW264.7 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection.

### 3.2. Obtención de monocitos humanos de sangre periférica

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

### 3.3. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos peritoneales residentes de los ratones se obtuvieron mediante un lavado peritoneal utilizando 5 ml de PBS estéril frío. Para ello, los ratones fueron sacrificados tras inhalación de CO<sub>2</sub>, se les retiró la piel abdominal y se les realizó la inyección de la solución salina con un breve masaje. Posteriormente, se extrajo el PBS que contiene los macrófagos de la cavidad del peritoneo y se lavaron

las células 2 veces con PBS mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos (202).

Las células se sembraron a  $2 \times 10^6$  por pocillo (placas de 6 pocillos) en 2 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, y se dejaron adherir durante 20 h en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C. Los pocillos se lavaron ampliamente para eliminar las células no adherentes. Los macrófagos adheridos se utilizaron para la experimentación.

### 3.4. Cultivo de la línea celular RAW264.7

El cultivo de estas células adherentes fue llevado a cabo mediante el uso del medio de cultivo DMEM enriquecido con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin. Las células son mantenidas en un incubador en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 OC manteniendo una concentración mínima de 0,05 millones de células por cm<sup>2</sup> y una máxima de 0,26 millones de células por cada cm<sup>2</sup>. Esto se produce cada 48-72 h (203).

### 3.5. Tratamientos celulares

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

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

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

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

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

### 3.6. Preparación de zimosán y zimosán opsonizado

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

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

### 3.7. Extracción de lípidos

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

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

### 3.8. Separación de extractos lipídicos por cromatografía en capa fina

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

En el caso de separación de lípidos neutros se empleó una fase móvil con una mezcla de n-hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (v/v) (207).

En el caso de la separación de diferentes clases de fosfolípidos se utilizó una fase móvil de cloroformo/metanol/28% hidróxido de amonio 60:37.5:4 (v/v) la cual se pasa dos veces por la TLC, pretratada con ácido bórico, con un periodo de secado intermedio (208).

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

### 3.9. Derivatización de ácidos grasos a ésteres metílicos

Los ácidos grasos no pueden ser analizados de forma directa por GC/MS al no ser lo suficientemente volátiles para ser transportados por la fase gaseosa a lo largo de la columna. Para ello, se requiere de un paso de derivatización química anterior al análisis por GC/MS que permite, por una parte, separar los ácidos grasos del esqueleto de glicerol o colesterol en el que se encuentran esterificados, y por otra parte, convertirlos en compuestos más estables y volátiles para su mejor separación en columna e ionización.

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

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

Los aductos de dimetilsulfuros se llevaron a cabo bajo el procedimiento descrito por Sansone et al. (209) con pequeñas modificaciones (130). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos disueltos en hexano se traspanan a un vial de teflón, a los cuales se añaden 50  $\mu$ l de una disolución al 6% de yodo en éter (v/v) y 100  $\mu$ l de dimetildisulfuro. Los viales se purgan con nitrógeno y se dejan en agitación a 40 °C toda la noche. Al día siguiente se procede a la extracción añadiendo 1 ml de hexano y 1 ml de tiosulfato de sodio al 5% (v/v). Tras una fuerte agitación, la muestra es centrifugada y es recogida la fase orgánica donde se encuentran los derivados de DMDS.

Posteriormente se seca la fase orgánica con sulfato de magnesio anhidro, concentrado y analizado

por un análisis de GC/MS utilizando prácticamente el mismo protocolo de análisis utilizado para los ésteres metílicos. En este caso la rampa de temperatura es de 10 °C/min hasta los 250 °C, y esta temperatura se mantiene durante 20 min para poder separar los derivados de DMDS de los 16:1, identificados por los diferentes espectros de fragmentación.

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

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

### 3.12. Análisis de especies de fosfolípidos por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Esta técnica se usa para determinar todas las especies

moleculares de PC, PE, PI, PS, PA y PG. A los extractos de lípidos correspondientes a  $10 \times 10^6$  células se añadieron los estándares internos antes mencionados. Las muestras se redisolviéron en 50  $\mu$ l de hexanos/2-propanol/agua (42:56:2, v/v/v), y se inyectaron 40  $\mu$ l en un cromatógrafo líquido de alto rendimiento de Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 con un inyector automático Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher) equipado con una bomba binaria Ultimate HPG-3400SD (Thermo Fisher). La columna era una FORTIS HILIC (150  $\times$  3 mm, tamaño de partícula de 3  $\mu$ m) (Fortis Technologies), protegida con un cartucho Supelguard LC-Si (20 mm  $\times$  2,1 mm) (Sigma-Aldrich). La fase móvil fue un gradiente de disolvente A (hexanos/2-propanol, 30:40, v/v) y disolvente B (hexanos/2-propanol/20 mM de acetato de amonio en agua, 30:40:7, v/v/v).

El gradiente comenzó en el 75% A desde cero hasta 5 min, luego disminuyó del 75% A al 40% A a los 15 min, del 40% A al 5% A a los 20 min, manteniéndose en el 5% hasta los 40 min, y aumentando al 75% a los 41 min. A continuación, la columna se reequilibró al 75% A durante 14 minutos más antes de la siguiente inyección de la muestra. El flujo a través de la columna se fijó en 0,4 ml/min y se inyectaron 40  $\mu$ l del extracto lipídico. Este flujo entró en la interfaz de ionización por electrospray de un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo Sciex QTRAP 4500 operado en modo de iones negativos (AB Sciex). Los parámetros de la fuente fueron los siguientes: tensión de pulverización de iones, -4500 V; gas de cortina, 20 psi; gas de nebulización, 50 psi; gas de desolvatación, 60 psi; temperatura, 425 OC.

Los parámetros de los compuestos se fijaron como sigue: potencial de declusión; -45 V (glicerofosfolípidos de colina), -60 V (glicerofosfolípidos de etanolamina) -30 V (fosfatidilinositol), -50 V (fosfatidilserina), -60 V (ácido fosfatídico), -50 V (fosfatidilglicerol); energía de colisión -50 V (glicerofosfolípidos de colina), -40 V (glicerofosfolípidos de etanolamina), -60 V (fosfatidilinositol), -50 V (fosfatidilserina), -45 V (ácido fosfatídico), -45 V (fosfatidilglicerol); potencial de entrada, -10 V; y potencial de salida de la célula de colisión, -8 V. La caracterización de las especies de fosfolípidos se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los que producen estándares analíticos homólogos, así como mediante experimentos de fragmentación por disociación inducida por colisión (CID, Collision-Induced Dissociation) en ionización negativa con un método de MRM, detectando en Q3 los m/z de 253,4 y 303,4 correspondientes a 16:1 y AA, respectivamente, como [M-H]-.

Todos los glicerofosfolípidos se detectaron como iones [M-H]- excepto para los iones de fosfatilcolina que fueron detectados como el aducto [M + CH<sub>3</sub>COO]-. La cuantificación se realizó integrando los picos cromatográficos de cada especie y comparándolos con el área del pico del patrón interno que corresponde a cada clase de fosfolípido (14, 139, 205, 210-212).

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

Se inyectó un volumen de 90  $\mu$ l de la muestra diluida en el eluyente A en un cromatógrafo líquido de alta resolución Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 con un inyector automático Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher) equipado con una bomba binaria Ultimate HPG-3400SD (Thermo Fisher). La columna era una LC-18 (SUPELCO SIL) (250  $\times$  2,1 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu$ m) protegida con un cartucho protector Supelguard LC-18 (20  $\times$  2,1 mm) (Sigma-Aldrich). Las fracciones oxidadas se separaron según el procedimiento descrito por Dumlaio et al. (213), con pequeñas modificaciones. La fase móvil consistió en un gradiente de disolvente A (agua/acetonitrilo/ácido acético, 70:30:0,02, en volumen) y disolvente B (acetonitrilo/isopropanol, 50:50, en volumen).

El gradiente se inició con el 100% del disolvente A, que se redujo linealmente al 75% a los 3 min, al 55% a los 11 min, al 40% a los 13 min, al 25% a los 18 min y al 10% a los 18,5 min. La última mezcla de disolventes se mantuvo durante 1,5 minutos más; finalmente, la columna se reequilibró con el 100% de disolvente A durante 10 minutos antes de la siguiente inyección de muestra. El flujo a través de la columna se fijó en 0,6 ml/min, y este flujo entró en la interfaz de ionización por electrospray de un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo Sciex QTRAP 4500 operado en modo de iones negativos (AB Sciex).

Los parámetros de la fuente se ajustaron como sigue: tensión de pulverización de iones, -4500 V; gas de cortina, 30 psi; gas de nebulización, 50 psi; gas de desolvatación, 60 psi; temperatura, 550 °C. Las moléculas oxidadas y no oxidadas se analizaron como iones [M-H]-.

La identificación de las especies de oxidadas de ácido araquidónico se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los datos bibliográficos, así como mediante su comparación de los experimentos de fragmentación de las muestras en ionización negativa con un método

de fragmentación específica de los m/z correspondientes a las especies oxidadas de AA (m/z = 317, 319, 335). La cuantificación se realizó integrando los picos cromatográficos de cada especie en modo de escaneo completo y se compararon con sus correspondientes líneas de calibrado.

### 3.14. Análisis de FAHFA por LC/MS

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

Los análisis se realizaron utilizando un cromatógrafo líquido de alto rendimiento Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 equipado con una bomba binaria estándar Ultimate HPG-3400SD y un automuestreador Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Sciex QTRAP 4500 operado en modo de iones negativos (AB Sciex). El flujo total a través de la columna fue de 400  $\mu$ L/min, con 93:7 MeOH:H<sub>2</sub>O con 5 mM de acetato de amonio y 0,01% de hidróxido de amonio como disolvente. El tiempo total de funcionamiento fue de 60 minutos. Los parámetros de la fuente fueron los siguientes: tensión de pulverización de iones, -4500 V; gas de cortina, 30 psi; gas de nebulización, 50 psi; gas de desolvatación, 60 psi; temperatura, 500 °C. Para la medición cuantitativa de las especies de FAHFA derivadas de 16:1, el instrumento se ajustó al modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), seleccionando tres transiciones para cada FAHFA: ion padre  $\rightarrow$  ácido graso hidróxido, ion padre  $\rightarrow$  ácido graso hidróxido menos la pérdida de agua e ion padre  $\rightarrow$  m/z del ácido graso esterificado como ion carboxilato.

### 3.15. Análisis de LD por microscopía confocal

Una vez dispuestas las células en los cristales para microscopía en placas de 6 pocillos, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído al 4 %

(v/v) en PBS con sacarosa al 3 % (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la eliminación del medio de la fijación, se realizaron repetidos lavados con PBS, las células fueron teñidas con DAPI (1  $\mu$ g/ml en PBS) y los lípidos neutros con BODIPY 498/503 (2  $\mu$ g/ml en PBS). Por último se montaron los cristales en los portas de microscopía con Gelvatol. El contenido de LD se examinó con un microscopio confocal Leica TCS SP5X (Wetzlar, Alemania), utilizando un objetivo HCX PL APO CS de inmersión en aceite, 63 $\times$ , 1,4 NA. La fluorescencia de BODIPY 498/503 se monitorizó con un láser de luz blanca que excitaba a 490 nm, y la emisión de fluorescencia se recogió entre 502 nm y 555 nm. La fluorescencia de DAPI se excitó con un láser de diodo azul a 405 nm y la emisión se recogió entre 439 nm y 4787 nm. La cuantificación de la fluorescencia de no menos de 150 células por condición se analizó utilizando el software ImageJ (versión 1.52a).

### 3.16. Estudios de inhibición de iPLA<sub>2</sub>-VIA con oligonucleótidos antisentido

El oligonucleótido antisentido iPLA<sub>2</sub>-VIA utilizado en este trabajo ha sido descrito en estudios anteriores (216-221). La secuencia antisentido de iPLA<sub>2</sub>-VIA (CTC CTT CAC CCG GAA TGG GT) corresponde a los nucleótidos 59-78 de la secuencia murina de iPLA<sub>2</sub>-VIA. Como control, se utilizó el complemento en sentido (ACC CAT TCC GGG TGA AGG AG). Tanto los oligonucleótidos en sentido como en antisentido contenían enlaces de fosforotioato para limitar la degradación. Los oligonucleótidos se mezclaron con Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tratamiento con oligonucleótidos y las condiciones de cultivo no fueron tóxicos para las células, según se evaluó mediante el ensayo de exclusión del colorante azul tripán y la cuantificación de la proteína celular adherida.

Para la actividad PLA<sub>2</sub> independiente de Ca<sup>2+</sup>, los homogeneizados de células RAW264.7 fueron despojados de sus núcleos por precipitación por centrifugación y posteriormente incubados durante 2 h a 37 °C en 100 mM de HEPES (pH 7,5) que contenían 5 mM de EDTA y 100  $\mu$ M de sustrato fosfolípido marcado radiactivamente (1-palmitoil-2-[<sup>3</sup>H]palmitoil-glicero-3-fosfolina, actividad específica 60 Ci/mmol); (American Radiolabeled Chemicals) en un volumen final de 150  $\mu$ L. Antes del ensayo las membranas sustrato fueron calentadas a 57 °C durante 5 min para inactivar la transacilasa independiente de CoA (155). El sustrato fosfolípido se utilizó en forma de vesículas sonicadas en tampón.



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

### 3.17. Translocación de NF-κB

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

### 3.18. Extracción de ARN

El ARN de las células se extrajo utilizando el reactivo TRIzol™ (Ambion, Thermo Fisher Scientific) que es una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para una extracción del ARN se añadió cloroformo, se mezcló enérgicamente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C para separar una capa acuosa superior clara (que contiene ARN), una

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

### 3.19. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La PCR de transcripción reversa se utiliza para obtener una cadena de ADN a partir de una cadena de ARN utilizando una enzima de transcripción inversa. En este trabajo se utilizó el kit de síntesis Verso cDNA (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezcló el ARN (1 µg) con tampón de síntesis, una mezcla de dNTP, cebadores oligo dT anclados (para transcribir específicamente las cadenas de ARN mensajero o ARNm), un potenciador (que elimina el ADN contaminante), la mezcla de enzimas Verso (que contiene la transcriptasa inversa Verso y un inhibidor de la ARNasa) y agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 1 hora a 42 °C y la reacción se detuvo calentando a 95 °C 2 minutos. El ADN complementario se conservó a -20 °C hasta su utilización.

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

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

La amplificación del ARN mensajero de interés se logró utilizando cebadores específicos listados en la tabla 1. Para la cuantificación del ADN mediante esta metodología, se obtiene el número de ciclos en los que la fluorescencia supera un umbral seleccionado (Ct, cycle threshold). El umbral es el nivel de señal que refleja un aumento estadísticamente significativo respecto a la señal de referencia, para que la señal de amplificación pueda distinguirse del fondo. Para el análisis de la expresión génica se utilizó el método 2-ΔΔCt (222). En él, los valores Ct de un gen de referencia se restan a los Ct del gen de interés, con el fin de normalizar la variación en la cantidad de ADN entre las muestras.

El gen de referencia utilizado en este trabajo fue Gapdh de ratón. Los valores de  $\Delta C_t$  obtenidos se normalizan entonces a una de las condiciones, que en este trabajo fue la condición no tratada de las células de control. Los datos se representan como expresión relativa de ARNm.

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

### 3.21. Medición de proteína

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

### 3.22. Análisis estadístico

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

### 3.23. Síntesis orgánica

Los reactivos utilizados durante esta síntesis fueron obtenidos de Acros Organics y Sigma-Aldrich, mientras que los disolventes fueron de Thermo Fisher. Los disolventes anhidros se secaron utilizando tamices moleculares introduciéndolos en el disolvente y generando una atmósfera inerte en el mismo con  $\text{N}_2$ . Los análisis de TLC se llevaron a cabo en placas de gel de sílice 5 cm x 20 cm con indicador fluorescente 254 nm. Los espectros de RMN se adquirieron en un instrumento Agilent

Technologies MR 400 con consola Agilent MR 400 y una sonda de RMN ( $^1\text{H}$ , 400,123 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100,611 MHz). Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón utilizando tetrametilsilano como patrón interno. Estos espectros se obtuvieron en el Laboratorio de Técnicas Experimentales de la Universidad de Valladolid. Los valores de J están en Hz. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent 5973 (ESI-QTOF), en el Laboratorio de Técnicas Experimentales de la Universidad de Valladolid. Fuente de ionización: electrospray (ESI).

## 4. RESULTADOS

4.1. Los lípidos neutros no son una fuente de ácido araquidónico libre en monocitos espumosos humanos.

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

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

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

4.2. Los macrófagos peritoneales de ratón liberan ácidos grasos proinflamatorios como el ácido palmitoleico y sus isómeros.

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

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

4.2.3. *Liberación de los isómeros 16:1 durante la respuesta celular.*

4.2.4. *Participación de  $\text{PLA}_2$  en la liberación de los 16:1.*

4.2.5. *Estudios con ácidos grasos deuterados*

4.2.6. *Síntesis de FAHFA conteniendo 16:1*

4.3. La molécula de PC que contiene isómeros de 16:1 reduce la respuesta inflamatoria de macrófagos

de ratón.

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

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

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

4.4. Síntesis química de los derivados de 16:1.

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

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

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

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

*4.4.5. Síntesis de PC(16:0/16:1n-9), PC(16:0/16:1n-7) y PC(16:0/16:1n-10).*

## 5. DISCUSION

5.1. Los lípidos neutros no son una fuente de ácido araquidónico libre en monocitos espumosos humanos.

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

En el presente estudio se ampliaron las contribuciones realizadas anteriores en el laboratorio sobre el papel del AA en la inducción del fenotipo espumoso en monocitos humanos, y se proporcionaron más pruebas de que se trata de un efecto mediado por el propio ácido graso y no por un metabolito oxigenado.

Este trabajo también pone de relieve una diferencia entre los monocitos en condiciones normales y los cargados de lípidos, es decir, la presencia de elevadas cantidades de AA en la fracción de TAG de los monocitos espumosos, lo que no ocurre en los monocitos circulantes normales. En estas últimas células, el AA sólo está presente en fosfolípidos de membrana. Así pues, se plantea la cuestión clave de si el AA que se acumula en los lípidos neutros puede mobilizarse durante la activación inflamatoria de los monocitos y utilizarse posteriormente para generar mediadores lipídicos bioactivos. Esto es particularmente pertinente ya que los monocitos cargados de AA pueden migrar a los sitios de inflamación, donde podrían descargar sus depósitos de AA en respuesta a estímulos proinflamatorios locales, agravando así el daño. Además, la existencia de vías alternativas para la liberación de AA dentro de la misma célula que dependen del uso del sustrato (es decir, fosfolípidos frente a TAG), también conferiría al sistema una mayor versatilidad en cuanto a la regulación celular de la respuesta inflamatoria mediada por lípidos (es decir, la regulación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> frente a la regulación de la ATGL).

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

involucrados en el proceso demuestra que las tres principales clases de fosfolípidos implicados que contienen AA son PC, PE y PI, lo cual concuerda en general con datos previos (211).

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

el escenario anterior parece improbable porque los experimentos utilizando bromoenol lactona, un potente inhibidor de fosfolipasas similares a la patatina como la ATGL (228-230, 262), no tuvieron ningún efecto en la movilización de AA a partir de monocitos espumosos activados.

En conclusión, estos resultados demuestran que los fosfolípidos de membrana son las principales, si no las únicas, fuentes de movilización de AA a partir de los monocitos humanos estimulados, incluso en condiciones en las que los niveles celulares del ácido graso en el TAG superan a los de las membranas. Estos resultados, en el contexto de la literatura existente, son totalmente consistentes con el trabajo de Johnson et al. (179) en neutrófilos humanos, y difieren de los de Dichlberger et al. (126) en mastocitos humanos. En este último estudio, el silenciamiento de ATGL en mastocitos redujo la síntesis de eicosanoides generados por las vías de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa en la misma medida que la observada con el silenciamiento de cPLA<sub>2</sub>α (126). Es posible que las vías responsables de la liberación de AA difieran dependiendo del tipo de tejido y célula (234). Quedan por dilucidar las posibles implicaciones fisiopatológicas y/o razones biológicas de la presencia de AA en TAG en los monocitos, si las hubiera. Dado que los altos niveles de AA libre son tóxicos para las células (232-234, 263), una posibilidad que hay que considerar es que la entrada de AA en TAG pueda servir como un fondo de almacenamiento ampliable para proteger a las células de la toxicidad del ácido graso o para limitar la inflamación mediante la reducción de la cantidad del ácido graso libre disponible para la síntesis de eicosanoides.

## 5.2. Los macrófagos peritoneales de ratón liberan los ácidos grasos anti-inflamatorios palmitoleico e isómeros posicionales

En los últimos años, los ácidos grasos 16:1 se han convertido en centro de atención de la investigación en lípidos bioactivos, dado su potencial como biomarcadores nutricionales y metabólicos (264). En este trabajo se ha demostrado que la mayoría de los 16:1 presentes en los macrófagos se acumulan en una sola especie molecular de fosfolípidos, el PC(16:0/16:1), de la que se libera en condiciones de activación celular. Aunque no se centran específicamente en los ácidos grasos 16:1, estudios recientes que incluyen perfiles lipidómicos de macrófagos también identificaron la especie PC(32:1), probablemente compuesta de 16:0 y 16:1 (aunque también son posibles otras composiciones, por ejemplo, 14:0 y 18:1, o 18:0 y 14:1).

Montenegro-Burke et al. (265) analizaron la composición lipídica de los macrófagos humanos polarizados derivados de monocitos, encontrando seis especies que diferían significativamente entre los distintos estados; una de ellas era PC(32:1). En otro estudio en el que también se analizó el perfil de glicerofosfolípidos de los macrófagos humanos se observó una disminución de los fosfolípidos monoinsaturados como PC(32:1) durante la activación polarizada de las células a fenotipos M1 o M2 (266). En cambio, los estudios con macrófagos de ratón mostraron aumentos en los niveles de PC(32:1) tras la polarización con el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y el lipopolisacárido bacteriano (261, 267).

El uso de inhibidores específicos junto con oligonucleótidos antisentido han permitido desvelar la participación de la iPLA<sub>2</sub>-VIA en la movilización de 16:1. La otra gran PLA<sub>2</sub> intracelular presente en los macrófagos, la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , no parece participar en el proceso, ya que el inhibidor específico pirrofenona no tuvo un efecto discernible. El bloqueo de la transacilasa independiente del CoA tampoco tuvo efecto, lo que indica que el 16:1 no se transfiere directamente entre las especies de fosfolípidos por mecanismos similares a los de los ácidos grasos n-6 (158). Estos resultados confirman y amplían trabajos anteriores sobre el papel de la iPLA<sub>2</sub>-VIA en la mediación de las respuestas de liberación de ácidos grasos de fosfolípidos en macrófagos que no implican al ácido araquidónico (139, 140). Además, el hallazgo de que el principal sustrato para la liberación de 16:1 mediado por la iPLA<sub>2</sub>-VIA es la especie PC(16:0/16:1) también es relevante en vista de los datos anteriores que muestran que, en las células activadas, la iPLA<sub>2</sub>-VIA manifiesta selectividad para las moléculas de PC que contienen ácido palmítico en la posición sn-1, y que algunas de las principales especies hidrolizadas por la enzima contienen 16:1 en la posición sn-2 (139, 268). En conjunto, estos resultados sugieren que la iPLA<sub>2</sub>-VIA es la enzima clave para la movilización de 16:1, y que la selectividad de sustrato de la enzima en un contexto celular puede ser más estricta de lo que los ensayos in vitro han sugerido (269), probablemente debido a compartimentación celular. Debido al carácter antiinflamatorio de los ácidos grasos 16:1, es concebible que la liberación regulada de esos ácidos grasos constituya un paso importante para la mitigación o resolución de una reacción inflamatoria. En este estudio también se aborda la participación de parte de los 16:1 liberados de PC en las reacciones de remodelación de los ácidos grasos en fosfolípidos. Este es un aspecto importante en la señalización de los lípidos, ya que las reacciones de remodelación de

los ácidos grasos pueden aumentar la diversidad de fosfolípidos y generar nuevas especies que contienen 16:1 y que podrían constituir marcadores de estados de activación específicos de los macrófagos. Además, la transferencia de ácidos grasos 16:1 entre los fosfolípidos podría conducir a la generación de nuevas especies que contengan 16:1 -o a aumentar los niveles de las preexistentes- que doten a la célula de funciones nuevas o mejoradas. Para explorar estas posibilidades, se hizo uso de ácidos grasos deuterados. Esta estrategia mejora la sensibilidad y permite caracterizar los distintos isómeros por separado. Es importante destacar que este enfoque identificó un aumento significativo de los niveles de la especie PI(18:0/16:1). Esto se observó con los dos ácidos grasos deuterados analizados, lo que implica que las enzimas implicadas en la transferencia no distinguen entre isómeros posicionales. Obsérvese a este respecto que la iPLA<sub>2</sub>-VIA también hidroliza todos los isómeros 16:1 de PC.

Cabe señalar que la cantidad de 16:1 obtenida por la especie PI es bastante baja, lo que sugiere que la remodelación 16:1 entre los fosfolípidos utiliza sólo pequeñas cantidades del ácido graso movilizado por la iPLA<sub>2</sub>-VIA. Teniendo en cuenta las áreas de pico relativas de las muestras y los estándares internos en los experimentos de LC/MS, se estima que ~5-10% del 16:1 inicialmente presente en PC se transfiere a PI, y el resto permanece como ácido graso libre. A pesar de ello, el hecho de que las células produzcan activamente PI conteniendo 16:1 sugiere que este lípido puede tener alguna función de señalización. De hecho, el trabajo de Koeberle et al. (270) estableció recientemente que el PI que contiene 16:1 posee propiedades similares a las de factores de crecimiento cuando se añade a cultivos celulares de fibroblastos. Es evidente que será necesario seguir trabajando para explorar el papel de señalización y las posibles funciones celulares del PI que contiene 16:1 en los macrófagos.

Los estudios aquí presentados también revelan un segundo destino metabólico para el 16:1 movilizado de fosfolípidos en macrófagos activados. Los datos muestran que parte del 16:1 hidrolizado por la iPLA<sub>2</sub>-VIA se desvía a la formación de FAHFA, una familia de lípidos con propiedades antiinflamatorias (201, 271). Es interesante que, de los tres FAHFA que contienen 16:1 identificados en macrófagos en reposo, sólo uno de ellos, 16:1/OH-18:0 aumenta claramente en las células activadas. Esto sugiere algún tipo de especificidad en la formación de tales especies, que sería compatible con que desempeñe un papel biológico.

Similar a la situación discutida anteriormente con respecto a la remodelación de fosfolípidos con

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

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

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

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

Esta remodelación de 16:1 desde la posición sn-2 de PC podría ser producida por tres vías i) la

acción concertada de una fosfolipasa A<sub>2</sub>, que rompe el ácido graso de la posición sn-2 de PC, y de la acil-CoA sintetasa y las aciltransferasas específicas, que incorporan el ácido graso en otros lípidos, ii) por la acción de transacilaciones independientes de CoA y iii) por la ruta de biosíntesis de novo.

Dado que en este trabajo se ha demostrado que se produce una liberación de los 16:1 contenidos en PC por la acción de la iPLA<sub>2</sub>-VIA y no de las transacilasas independientes de CoA, en respuesta a una activación proinflamatoria de los macrófagos, esto hace posible pensar que esta remodelación de los ácidos grasos 16:1 a los fosfolípidos de inositol observada se produzca via desacilación/reacilación dependiente de CoA

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

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

La disminución de la inducción de estas citoquinas proinflamatorias puede explicarse debido a una menor activación de NF-κB en estas condiciones. Se ha descrito que los ácidos grasos poliinsaturados contenido en la posición sn-2 del PC interfieren, en un modelo de colitis ulcerosa, en la activación celular por LPS y Tnf-α, modificando la fosforilación de las MAPK, atenuando la activación de NF-κB y reduciendo los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias, lo que da lugar a una señalización antiinflamatoria (272, 273). Además, es importante destacar la existencia de varias especies de PC, que no contienen ácidos grasos poliinsaturados como sustituyentes acilo, que tienen funciones biológicas

por sí mismas (199, 200). PC(12:0/12:0) ha sido identificado como ligando del receptor nuclear del hígado homólogo-1 (LRH-1) asociado a la regulación de la homeostasis de los ácidos biliares y colesterol. El tratamiento con este PC también disminuye la esteatosis hepática y mejora la homeostasis de la glucosa en dos modelos de ratón de resistencia a la insulina (199). Por otro lado, PC(16:0/18:1) ha sido reconocido como un ligando endógeno del receptor nuclear PPAR $\alpha$  (200). Esta proteína ha sido implicada en la regulación de los procesos energéticos celulares, cuya activación está asociada con la regulación negativa de las respuestas inflamatorias. Diferentes investigaciones con ligandos de PPAR $\alpha$  han demostrado una reducción de los síntomas de inflamación y enfermedad en varios modelos, incluyendo la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la artritis y la enfermedad inflamatoria intestinal (274). Los resultados obtenidos junto a estos datos bibliográficos, permitirían especular sobre una posible función de la propia molécula PC(16:0/16:1), aunque más investigación es necesaria en este aspecto.

Otra característica destacada del trabajo actual es que el efecto antiinflamatorio de los tres isómeros se produce en los macrófagos expuestos a todos los estímulos inflamatorios examinados, que son reconocidos por diferentes receptores de membrana (LPS y zimosán opsonizado) o no (PMA e ionóforo A23187). Este resultado permite sugerir que el mecanismo de acción de este lípido se produce en la cascada de señalización tras la unión del agonista al receptor correspondiente. De hecho, otros estudios demuestran que la incubación de PUFA-PC exógeno en una línea celular de cáncer de colon cambia la compartimentación del receptor agonista Tnf- $\alpha$ /R a la balsa de lípidos sin interferir con la unión receptor/agonista, sugiriendo que el mecanismo regulador debe implicar cambios en las cascadas de señalización posteriores (272).

En conjunto, se ha demostrado que el 16:1 contenido en PC ejerce un papel protector en los macrófagos expuestos a varios estímulos proinflamatorios a través de la disminución de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Además, el enriquecimiento de las células con PC(16:0/16:1) produce un aumento selectivo del ácido graso 16:1 en los fosfolípidos de inositol cuando se activan las células con LPS y zimosán. También se ha demostrado que estos ácidos grasos son liberados de las moléculas del PC por la acción de la enzima iPLA<sub>2</sub>-VIA, permitiendo así su remodelación a otras clases de lípidos.

## 6. CONCLUSIONES

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

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

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

- El 90% de los isómeros de 16:1 acumulados en PL está presente en la clase de glicerofosfolípidos de colina (PC) en macrófagos de ratón. Además, el ~75% del total de 16:1 en PC se halla en una sola especie, PC(16:0/16:1).
- Los niveles de los tres isómeros de los ácidos grasos 16:1 en PC se reducen significativamente y de forma similar en los macrófagos activados por estímulos innatos (zimosán, LPS, manano y laminarina).
- La reducción del contenido de 16:1 en PC se corresponde con la liberación de este ácido graso a través de la enzima iPLA<sub>2</sub>-VIA durante la activación de las células.
- Parte del 16:1 liberado del PC por la activación de los macrófagos frente a manano y laminarina se transfiere a PI y otra parte es utilizado para formar otros derivados lipídicos, como son los FAHFA, que poseen actividad biológica.
- La remodelación de 16:1 de PC a PI también es observada en macrófagos enriquecidos con PC(16:0/16:1) y tratados con LPS.

- Las macrófagos enriquecidas con los isómeros de PC(16:0/16:1) demuestran una respuesta inflamatoria reducida a LPS en comparación con las células incubadas con PC(16:0/18:1n-9) y PC(16:0/16:0), que no ejercen ningún efecto.
- Este efecto antiinflamatorio de los isómeros de PC(16:0/16:1) es independiente del estímulo utilizado, actúe o no vía receptor, y se produce de forma similar entre los isómeros utilizados.

- PC(16:0/16:1) ejerce el efecto antiinflamatorio al disminuir la activación de NF- $\kappa$ B.

*Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (ref. BES-2017-079872). El trabajo realizado ha dado lugar a las publicaciones científicas indicadas en las referencias 219, 275 y 276,*

## REFERENCES

1. Olzmann, J. A., and Carvalho, P. (2019) Dynamics and functions of lipid droplets, *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 137-155.
2. Grillitsch, K., Connerth, M., Köfeler, H., Arrey, T. N., Rietschel, B., Wagner, B., Karas, M., and Daum, G. (2011) Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: Lipidome meets protein. *Biochim Biophys Acta* 1811, 1165-1176.
3. Thiam, A. R., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets, *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 775-786.
4. Brasaemle, D. L. (2007) Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis, *J Lipid Res* 48, 2547-2559.
5. Kimmel, A., Brasaemle, D., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C., and Londos, C. (2010) Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins, *J Lipid Res* 51, 468-471.
6. Macpherson, R. E., Vandenboom, R., Roy, B. D., and Peters, S. J. (2013) Skeletal muscle PLIN3 and PLIN5 are serine phosphorylated at rest and following lipolysis during adrenergic or contractile stimulation, *Physiol Rep* 1, 17.
7. Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2006) MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *J Biol Chem* 281, 14232-14240.
8. Wolins, N. E., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A., Bensch, K. G., and Bickel, P. E. (2003) Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets, *J Biol Chem* 278, 37713-37721.
9. Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., and Zechner, R. (2011) Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores, *Prog Lipid Res* 50, 14-27.
10. Shen, W. J., Patel, S., Miyoshi, H., Greenberg, A. S., and Kraemer, F. B. (2009) Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis, *J Lipid Res* 50, 2306-2313.
11. Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H. W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D. E., Mann, M., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2011) Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase, *Cell Metab* 14, 504-515.
12. Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A., and Thiele, C. (2011) Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine, *J Biol Chem* 286, 21330-21339.
13. Poppelreuther, M., Rudolph, B., Du, C., Großmann, R., Becker, M., Thiele, C., Eehalt, R., and Füllekrug, J. (2012) The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake, *J Lipid Res* 53, 888-900.
14. Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Gil-de-Gómez, L., Guijas, C., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2011) Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages, *J Immunol* 186, 6004-6010.



15. Sembongi, H., Miranda, M., Han, G. S., Fakas, S., Grimsey, N., Vendrell, J., Carman, G. M., and Siniosoglou, S. (2013) Distinct roles of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2 during adipogenesis and lipid droplet biogenesis in 3T3-L1 cells, *J Biol Chem* 288, 34502-34513.
16. Yu, W., Bozza, P. T., Tzizik, D. M., Gray, J. P., Cassara, J., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (1998) Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies, *Am J Pathol* 152, 759-769.
17. Walther, T. C., and Farese, R. V., Jr. (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism, *Annu Rev Biochem* 81, 687-714.
18. Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Krahrmer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J. X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K. K., Coleman, R. A., Bewersdorf, J., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2013) Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets, *Dev Cell* 24, 384-399.
19. Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation, *Prog Lipid Res* 43, 134-176.
20. Buhman, K. F., Accad, M., and Farese, R. V. (2000) Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases, *Biochim Biophys Acta* 15, 1-3.
21. Gubern, A., Barceló-Torns, M., Casas, J., Barneda, D., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M. A., and Claro, E. (2009) Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A<sub>2</sub>, *J Biol Chem* 284, 5697-5708.
22. Leiguez, E., Zuliani, J. P., Cianciarullo, A. M., Fernandes, C. M., Gutiérrez, J. M., and Teixeira, C. (2011) A group IIA-secreted phospholipase A<sub>2</sub> from snake venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A<sub>2</sub> and distinct signaling pathways, *J Leuk Biol* 90, 155-166.
23. Murphy, D. J. (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms, *Pro Lipid Res* 40, 325-438.
24. Pol, A., Gross, S. P., and Parton, R. G. (2014) Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites, *J Cell Biol* 204, 635-646.
25. Penno, A., Hackenbroich, G., and Thiele, C. (2013) Phospholipids and lipid droplets, *Biochim Biophys Acta* 3, 589-594.
26. Guijas, C., Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Gil-de-Gómez, L., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2012) Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes, *J Lipid Res* 53, 2343-2354.
27. Gubern, A., Casas, J., Barceló-Torns, M., Barneda, D., de la Rosa, X., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M. A., and Claro, E. (2008) Group IVA phospholipase A<sub>2</sub> is necessary for the biogenesis of lipid droplets, *J Biol Chem* 283, 27369-27382.
28. Gubern, A., Barceló-Torns, M., Barneda, D., López, J. M., Masgrau, R., Picatoste, F., Chalfant, C. E., Balsinde, J., Balboa, M. A., and Claro, E. (2009) JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A<sub>2</sub>, *J Biol Chem* 284, 32359-32369.
29. Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., de Kruijff, B., Burger, K. N., and Rand, P. R. (2005) Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid, *Biochemistry* 44, 2097-2102.
30. Marchesan, D., Rutberg, M., Andersson, L., Asp, L., Larsson, T., Borén, J., Johansson, B. R., and Olofsson, S. O. (2003) A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system, *J Biol Chem* 278, 27293-27300.
31. Andersson, L., Boström, P., Ericson, J., Rutberg, M., Magnusson, B., Marchesan, D., Ruiz, M., Asp, L., Huang, P., Frohman, M. A., Borén, J., and Olofsson, S. O. (2006) PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation, *J Cell Sci* 119, 2246-2257.
32. Tan, J. S., Seow, C. J., Goh, V. J., and Silver, D. L. (2014) Recent advances in understanding proteins involved in lipid droplet formation, growth and fusion, *J Genet Genomics* 41, 251-259.

33. Guijas, C., Rodríguez, J. P., Rubio, J. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2014) Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of lipid droplet formation, *Biochim Biophys Acta* 1841, 1661-1671.
34. Ohsaki, Y., Suzuki, M., and Fujimoto, T. (2014) Open questions in lipid droplet biology, *Chem Biol* 21, 86-96.
35. Cabodevilla, A. G., Sánchez-Caballero, L., Nintou, E., Boiadjieva, V. G., Picatoste, F., Gubern, A., and Claro, E. (2013) Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled  $\beta$ -oxidation of fatty acids, *J Biol Chem* 288, 27777-27788.
36. Bosch, M., Sánchez-Álvarez, M., Fajardo, A., Kapetanovic, R., Steiner, B., Dutra, F., Moreira, L., López, J. A., Campo, R., Marí, M., Morales-Paytuví, F., Tort, O., Gubern, A., Templin, R. M., Curson, J. E. B., Martel, N., Català, C., Lozano, F., Tebar, F., Enrich, C., Vázquez, J., Del Pozo, M. A., Sweet, M. J., Bozza, P. T., Gross, S. P., Parton, R. G., and Pol, A. (2020) Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense, *Science* 370.
37. Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y., and Fujimoto, T. (2009) Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets, *Histochem Cell Biol* 132, 281-291.
38. Hodges, B. D., and Wu, C. C. (2010) Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets, *J Lipid Res* 51, 262-273.
39. Soni, K. G., Mardones, G. A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C. L., and Bonifacino, J. S. (2009) Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets, *J Cell Sci* 122, 1834-1841.
40. Wolins, N. E., Brasaemle, D. L., and Bickel, P. E. (2006) A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins, *FEBS Lett* 580, 5484-5491.
41. Wolins, N. E., Quaynor, B. K., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A., and Bickel, P. E. (2005) S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes, *J Biol Chem* 280, 19146-19155.
42. Rinia, H. A., Burger, K. N., Bonn, M., and Müller, M. (2008) Quantitative label-free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy, *Biophys J* 95, 4908-4914.
43. Binns, D., Januszewski, T., Chen, Y., Hill, J., Markin, V. S., Zhao, Y., Gilpin, C., Chapman, K. D., Anderson, R. G., and Goodman, J. M. (2006) An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies, *J Cell Biol* 173, 719-731.
44. Dvorak, A. M., Dvorak, H. F., Peters, S. P., Shulman, E. S., MacGlashan, D. W., Jr., Pyne, K., Harvey, V. S., Galli, S. J., and Lichtenstein, L. M. (1983) Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells, *J Immunol* 131, 2965-2976.
45. Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., and Fujimoto, T. (2005) Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane, *J Cell Sci* 118, 2601-2611.
46. Kraemer, N., Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease, *EMBO Mol Med* 5, 973-983.
47. Fazio, S., Major, A. S., Swift, L. L., Gleaves, L. A., Accad, M., Linton, M. F., and Farese, R. V., Jr. (2001) Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages, *J Clin Invest* 107, 163-171.
48. Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D., and Wylie-Rosett, J. (2010) Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association, *Circulation* 121, 948-954.
49. Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D., and Farb, A. (2002) Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions, *J Interv Cardiol* 15, 439-446.
50. Williams, K. J., and Tabas, I. (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 551-561.
51. Osterud, B., and Bjorklid, E. (2003) Role of monocytes in atherogenesis, *Physiol Rev* 83, 1069-1112.

52. Moore, K. J., and Tabas, I. (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis, *Cell* 145, 341-355.
53. Lupo, G., Nicotra, A., Giurdanella, G., Anfuso, C. D., Romeo, L., Biondi, G., Tirolo, C., Marchetti, B., Ragusa, N., and Alberghina, M. (2005) Activation of phospholipase A<sub>2</sub> and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells, *Biochim Biophys Acta* 15, 135-150.
54. Lupo, G., Assero, G., Anfuso, C. D., Nicotra, A., Palumbo, M., Cannavò, G., Renis, M., Ragusa, N., and Alberghina, M. (2002) Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> mediates arachidonoyl phospholipid hydrolysis in immortalized rat brain endothelial cells stimulated by oxidized LDL, *Biochim Biophys Acta* 8, 19-29.
55. Herbert, S. P., Odell, A. F., Ponnambalam, S., and Walker, J. H. (2009) Activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> $\alpha$  as a novel mechanism regulating endothelial cell cycle progression and angiogenesis, *J Biol Chem* 284, 5784-5796.
56. Jiang, J. X., Zhang, S. J., Xiong, Y. K., Jia, Y. L., Sun, Y. H., Lin, X. X., Shen, H. J., Xie, Q. M., and Yan, X. F. (2015) EETs attenuate Ox-LDL-induced TB4 production and activity by inhibiting p38 MAPK phosphorylation and 5-LO/BLT1 receptor expression in rat pulmonary arterial endothelial cells, *PloS one* 10.
57. Mestas, J., and Ley, K. (2008) Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis, *Trends Cardiovasc Med* 18, 228-232.
58. Koenen, R. R., von Hundelshausen, P., Nesmelova, I. V., Zerneck, A., Liehn, E. A., Sarabi, A., Kramp, B. K., Piccinini, A. M., Paludan, S. R., Kowalska, M. A., Kungl, A. J., Hackeng, T. M., Mayo, K. H., and Weber, C. (2009) Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice, *Nat Med* 15, 97-103.
59. Kamei, M., and Carman, C. V. (2010) New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes, *Curr Opin Hematol* 17, 43-52.
60. Johnson, J. L., and Newby, A. C. (2009) Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques, *Curr Opin Lipidol* 20, 370-378.
61. Paulson, K. E., Zhu, S. N., Chen, M., Nurmohamed, S., Jongstra-Bilen, J., and Cybulsky, M. I. (2010) Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis, *Circ Res* 106, 383-390.
62. Kadl, A., Meher, A. K., Sharma, P. R., Lee, M. Y., Doran, A. C., Johnstone, S. R., Elliott, M. R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., Kensler, T., Ravichandran, K. S., Isakson, B. E., Wamhoff, B. R., and Leitinger, N. (2010) Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2, *Circ Res* 107, 737-746.
63. Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., and Lusis, A. J. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics, *Circulation* 91, 2488-2496.
64. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science* 232, 34-47.
65. Chisolm, G. M., 3rd, Hazen, S. L., Fox, P. L., and Cathcart, M. K. (1999) The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms, *J Biol Chem* 274, 25959-25962.
66. Steinberg, D. (1997) Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis, *Circulation* 95, 1062-1071.
67. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., and et al. (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection, *Nature* 386, 292-296.
68. Sakaguchi, H., Takeya, M., Suzuki, H., Hakamata, H., Kodama, T., Horiuchi, S., Gordon, S., van der Laan, L. J., Kraal, G., Ishibashi, S., Kitamura, N., and Takahashi, K. (1998) Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice, *Lab Invest* 78, 423-434.
69. de Winther, M. P., Gijbels, M. J., van Dijk, K. W., van Gorp, P. J., Suzuki, H., Kodama, T., Frants, R. R., Havekes, L. M., and Hofker, M. H. (1999) Scavenger receptor deficiency leads to more complex atherosclerotic lesions in APOE3Leiden transgenic mice, *Atherosclerosis* 144, 315-321.
70. Hayek, T., Oiknine, J., Brook, J. G., and Aviram, M. (1994) Role of HDL apolipoprotein E in cellular cholesterol efflux: studies in apo E knockout transgenic mice, *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1072-1078.

71. Langer, C., Huang, Y., Cullen, P., Wiesenhütter, B., Mahley, R. W., Assmann, G., and von Eckardstein, A. (2000) Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages, *J Mol Med* 78, 217-227.
72. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., and Silverstein, R. L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice, *J Clin Invest* 105, 1049-1056.
73. Podrez, E. A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R. L., Hajjar, D. P., Cohen, P. A., Frazier, W. A., Hoff, H. F., and Hazen, S. L. (2000) Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species, *J Clin Invest* 105, 1095-1108.
74. Kaplan, M., and Aviram, M. (1999) Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase, *Clin Chem Lab Med* 37, 777-787.
75. Tabas, I., and Bornfeldt, K. E. (2016) Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis, *Circ Res* 118, 653-667.
76. Wu, H., Gower, R. M., Wang, H., Perrard, X. Y., Ma, R., Bullard, D. C., Burns, A. R., Paul, A., Smith, C. W., Simon, S. I., and Ballantyne, C. M. (2009) Functional role of CD11c<sup>+</sup> monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia, *Circulation* 119, 2708-2717.
77. Foster, G. A., Xu, L., Chidambaram, A. A., Soderberg, S. R., Armstrong, E. J., Wu, H., and Simon, S. I. (2015) CD11c/CD18 Signals Very Late Antigen-4 Activation To Initiate Foamy Monocyte Recruitment during the Onset of Hypercholesterolemia, *J Immunol* 195, 5380-5392.
78. Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J. L., Gorbatov, R., Sukhova, G. K., Gerhardt, L. M., Smyth, D., Zavitz, C. C., Shikani, E. A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H. Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R., and Swirski, F. K. (2013) Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis, *Nat Med* 19, 1166-1172.
79. Xu, L., Dai Perrard, X., Perrard, J. L., Yang, D., Xiao, X., Teng, B. B., Simon, S. I., Ballantyne, C. M., and Wu, H. (2015) Foamy monocytes form early and contribute to nascent atherosclerosis in mice with hypercholesterolemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1787-1797.
80. Tertov, V. V., Kalenich, O. S., and Orekhov, A. N. (1992) Lipid-laden white blood cells in the circulation of patients with coronary heart disease, *Exp Mol Pathol* 57, 22-28.
81. Dresel, H. A., Via, D. P., Stöhr, M., Elchner, U., Gnasso, A., Postiglione, A., Blin, N., Augustin, J., and Schettler, G. (1986) Observations on leukocytes from patients with severe familial hypercholesterolemia, *Arteriosclerosis* 6, 259-264.
82. Varela, L. M., Ortega, A., Bermudez, B., Lopez, S., Pacheco, Y. M., Villar, J., Abia, R., and Muriana, F. J. (2011) A high-fat meal promotes lipid-load and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in circulating monocytes, *Am J Clin Nutr* 93, 918-925.
83. den Hartigh, L. J., Connolly-Rohrbach, J. E., Fore, S., Huser, T. R., and Rutledge, J. C. (2010) Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes, *J Immunol* 184, 3927-3936.
84. den Hartigh, L. J., Altman, R., Norman, J. E., and Rutledge, J. C. (2014) Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NFκB, *Am J Physiol* 306, H109-H120.
85. Lopez, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega, A., Bermudez, B., Abia, R., and Muriana, F. J. (2013) p38 MAPK protects human monocytes from postprandial triglyceride-rich lipoprotein-induced toxicity, *J Nutr* 143, 620-626.
86. Alipour, A., van Oostrom, A. J., Izraeljan, A., Verseyden, C., Collins, J. M., Frayn, K. N., Plokker, T. W., Elte, J. W., and Castro Cabezas, M. (2008) Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 792-797.
87. Gower, R. M., Wu, H., Foster, G. A., Devaraj, S., Jialal, I., Ballantyne, C. M., Knowlton, A. A., and Simon, S. I. (2011) CD11c/CD18 expression is upregulated on blood monocytes during hypertriglyceridemia and enhances adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 160-166.
88. Sprecher, H. (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids, *Biochim Biophys Acta* 19, 2-3.

89. Zhou, L., and Nilsson, A. (2001) Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues, *J Lipid Res* 42, 1521-1542.
90. Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294, 1871-1875.
91. Phillis, J. W., Horrocks, L. A., and Farooqui, A. A. (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders, *Brain Res Rev* 52, 201-243.
92. Harkewicz, R., Fahy, E., Andreyev, A., and Dennis, E. A. (2007) Arachidonate-derived dihomoprostaglandin production observed in endotoxin-stimulated macrophage-like cells, *J Biol Chem* 282, 2899-2910.
93. Sprecher, H., VanRollins, M., Sun, F., Wyche, A., and Needleman, P. (1982) Dihomo-prostaglandins and -thromboxane. A prostaglandin family from adrenic acid that may be preferentially synthesized in the kidney, *J Biol Chem* 257, 3912-3918.
94. Kopf, P. G., Zhang, D. X., Gauthier, K. M., Nithipatikom, K., Yi, X. Y., Falck, J. R., and Campbell, W. B. (2010) Adrenic acid metabolites as endogenous endothelium-derived and zona glomerulosa-derived hyperpolarizing factors, *Hypertension* 55, 547-554.
95. Flesch, I., Schonhardt, T., and Ferber, E. (1989) Phospholipases and acyltransferases in macrophages, *Klin Wochenschr* 67, 119-122.
96. Irvine, R. F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?, *Biochem J* 204, 3-16.
97. Astudillo, A. M., Balgoma, D., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2012) Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells, *Biochim Biophys Acta* 1821, 249-256.
98. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med* 340, 115-126.
99. Wong, J. T., Tran, K., Pierce, G. N., Chan, A. C., O, K., and Choy, P. C. (1998) Lysophosphatidylcholine stimulates the release of arachidonic acid in human endothelial cells, *J Biol Chem* 273, 6830-6836.
100. Hanasaki, K., Yamada, K., Yamamoto, S., Ishimoto, Y., Saiga, A., Ono, T., Ikeda, M., Notoya, M., Kamitani, S., and Arita, H. (2002) Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> is linked to macrophage foam cell formation, *J Biol Chem* 277, 29116-29124.
101. Sato, H., Kato, R., Isogai, Y., Saka, G., Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Tsutsumi, K., Yamada, J., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hatakeyama, S., Hara, S., Kudo, I., Itabe, H., and Murakami, M. (2008) Analyses of group III secreted phospholipase A<sub>2</sub> transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis, *J Biol Chem* 283, 33483-33497.
102. Karabina, S. A., Brochériou, I., Le Naour, G., Agrapart, M., Durand, H., Gelb, M., Lambeau, G., and Ninio, E. (2006) Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A<sub>2</sub> on human endothelial cell function, *FASEB J* 20, 2547-2549.
103. Karabina, S. A., Gora, S., Atout, R., and Ninio, E. (2010) Extracellular phospholipases in atherosclerosis, *Biochimie* 92, 594-600.
104. Rosenson, R. S., and Hurt-Camejo, E. (2012) Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes and the risk of atherosclerosis, *Eur Heart J* 33, 2899-2909.
105. Guijas, C., Meana, C., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2016) Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease, *Cell Chem Biol* 23, 689-699.
106. Astudillo, A. M., Meana, C., Guijas, C., Pereira, L., Lebrero, P., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2018) Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells, *J Lipid Res* 59, 237-249.
107. Chilton, F. H., Fonteh, A. N., Surette, M. E., Triggiani, M., and Winkler, J. D. (1996) Control of arachidonate levels within inflammatory cells, *Biochim Biophys Acta* 5, 1-15.
108. Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Balgoma, D., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2009) Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A<sub>2</sub> and lysophospholipid acyltransferases, *Biochim Biophys Acta* 12, 26.
109. Fujino, T., Kang, M. J., Suzuki, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. (1996) Molecular characterization and expression of rat

acyl-CoA synthetase 3, *J Biol Chem* 271, 16748-16752.

110. Kang, M. J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. T. (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2880-2884.

111. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase, *J Biol Chem* 282, 6532-6539.

112. Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2008) Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2830-2835.

113. Gijón, M. A., Riekhof, W. R., Zarini, S., Murphy, R. C., and Voelker, D. R. (2008) Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils, *J Biol Chem* 283, 30235-30245.

114. Zarini, S., Hankin, J. A., Murphy, R. C., and Gijón, M. A. (2014) Lysophospholipid acyltransferases and eicosanoid biosynthesis in zebrafish myeloid cells, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 115, 52-61.

115. Yuki, K., Shindou, H., Hishikawa, D., and Shimizu, T. (2009) Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: an enzyme with dual functions in the testis, *J Lipid Res* 50, 860-869.

116. Balsinde, J., Winstead, M. V., and Dennis, E. A. (2002) Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Lett* 531, 2-6.

117. Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., and Dennis, E. A. (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 175-189.

118. Leslie, C. C. (2004) Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production, *Biochem Cell Biol* 82, 1-17.

119. Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in activated cells, *Cell Signal* 17, 1052-1062.

120. Kita, Y., Shindou, H., and Shimizu, T. (2019) Cytosolic phospholipase A(2) and lysophospholipid acyltransferases, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 6, 838-845.

121. Jarc, E., and Petan, T. (2020) A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators, *Biochimie* 169, 69-87.

122. Nomura, D. K., Long, J. Z., Niessen, S., Hoover, H. S., Ng, S. W., and Cravatt, B. F. (2010) Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis, *Cell* 140, 49-61.

123. Nomura, D. K., Morrison, B. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., Kinsey, S. G., Marcondes, M. C., Ward, A. M., Hahn, Y. K., Lichtman, A. H., Conti, B., and Cravatt, B. F. (2011) Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation, *Science* 334, 809-813.

124. Grabner, G. F., Eichmann, T. O., Wagner, B., Gao, Y., Farzi, A., Taschler, U., Radner, F. P., Schweiger, M., Lass, A., Holzer, P., Zinser, E., Tschöp, M. H., Yi, C. X., and Zimmermann, R. (2016) Deletion of monoglyceride lipase in astrocytes attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, *J Biol Chem* 291, 913-923.

125. Schlager, S., Vujic, N., Korbilius, M., Duta-Mare, M., Dorow, J., Leopold, C., Rainer, S., Wegscheider, M., Reicher, H., Ceglarek, U., Sattler, W., Radovic, B., and Kratky, D. (2017) Lysosomal lipid hydrolysis provides substrates for lipid mediator synthesis in murine macrophages, *Oncotarget* 8, 40037-40051.

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

127. Schlager, S., Goeritzer, M., Jandl, K., Frei, R., Vujic, N., Kolb, D., Strohmaier, H., Dorow, J., Eichmann, T. O., Rosenberger, A., Wölfler, A., Lass, A., Kershaw, E. E., Ceglarek, U., Dichlberger, A., Heinemann, A., and Kratky, D. (2015) Adipose triglyceride lipase acts on neutrophil lipid droplets to regulate substrate availability for lipid mediator synthesis, *J Leukoc Biol* 98, 837-850.

128. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y. H., Magrioti, V., and Kokotos, G. (2011) Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure,

biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention, *Chem Rev* 111, 6130-6185.

129. Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., and Yamamoto, K. (2011) Recent progress in phospholipase A<sub>2</sub> research: from cells to animals to humans, *Prog Lipid Res* 50, 152-192.

130. Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2019) Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization, *Biochim Biophys Acta* 1864: 772-783.

131. Leslie, C. C. (2015) Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>: physiological function and role in disease, *J Lipid Res* 56, 1386-1402.

132. Murakami, M., Das, S., Kim, Y. J., Cho, W., and Kudo, I. (2003) Perinuclear localization of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> $\alpha$  is important but not obligatory for coupling with cyclooxygenases, *FEBS Lett* 546, 251-256.

133. Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., and Shimizu, T. (1997) Role of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in allergic response and parturition, *Nature* 390, 618-622.

134. Bonventre, J. V., Huang, Z., Taheri, M. R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M. A., and Sapirstein, A. (1997) Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, *Nature* 390, 622-625.

135. Adler, D. H., Cogan, J. D., Phillips, J. A., 3rd, Schnetz-Boutaud, N., Milne, G. L., Iverson, T., Stein, J. A., Brenner, D. A., Morrow, J. D., Boutaud, O., and Oates, J. A. (2008) Inherited human cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction, *J Clin Invest* 118, 2121-2131.

136. Ramanadham, S., Ali, T., Ashley, J. W., Bone, R. N., Hancock, W. D., and Lei, X. (2015) Calcium-independent phospholipases A<sub>2</sub> and their roles in biological processes and diseases, *J Lipid Res* 56, 1643-1668.

137. Turk, J., White, T. D., Nelson, A. J., Lei, X., and Ramanadham, S. (2019) iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and its role in male fertility, neurological disorders, metabolic disorders, and inflammation, *Biochim Biophys Acta* 1864, 846-860.

138. Mouchlis, V. D., and Dennis, E. A. (2019) Phospholipase A<sub>2</sub> catalysis and lipid mediator lipidomics, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864, 766-771.

139. Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A. M., Guijas, C., Magrioti, V., Kokotos, G., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2014) Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A<sub>2</sub>s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages, *J Immunol* 192, 752-762.

140. Monge, P., Garrido, A., Rubio, J. M., Magrioti, V., Kokotos, G., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2020) The contribution of cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A<sub>2</sub>s to adrenic acid mobilization in murine macrophages, *Biomolecules* 10, 542.

141. Lambeau, G., and Gelb, M. H. (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>, *Annu Rev Biochem* 77, 495-520.

142. Murakami, M., and Lambeau, G. (2013) Emerging roles of secreted phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: an update, *Biochimie* 95, 43-50.

143. Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2021) Phospholipases: from structure to biological function. *Biomolecules* 11: 428.

144. Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J. M., Hara, S., Gelb, M. H., and Murakami, M. (2013) Lymphoid tissue phospholipase A<sub>2</sub> group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators, *J Exp Med* 210, 1217-1234.

145. Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., and Taketomi, Y. (2015) A new era of secreted phospholipase A<sub>2</sub>, *J Lipid Res* 56, 1248-1261.

146. Akiba, S., Yoneda, Y., Ohno, S., Nemoto, M., and Sato, T. (2003) Oxidized LDL activates phospholipase A<sub>2</sub> to supply fatty acids required for cholesterol esterification, *J Lipid Res* 44, 1676-1685.

147. Ait-Oufella, H., Herbin, O., Lahoute, C., Coatrieux, C., Loyer, X., Joffre, J., Laurans, L., Ramkhalawon, B., Blanc-Brude, O., Karabina, S., Girard, C. A., Payré, C., Yamamoto, K., Binder, C. J., Murakami, M., Tedgui, A., Lambeau, G., and Mallat, A. (2013) Oxidized LDL activates phospholipase A<sub>2</sub> to supply fatty acids required for cholesterol esterification, *J Lipid Res* 54, 1676-1685.

- Z. (2013) Group X secreted phospholipase A<sub>2</sub> limits the development of atherosclerosis in LDL receptor-null mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 466-473.
148. Murase, R., Sato, H., Yamamoto, K., Ushida, A., Nishito, Y., Ikeda, K., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Taketomi, Y., and Murakami, M. (2016) Group X secreted phospholipase A<sub>2</sub> releases ω<sub>3</sub> polyunsaturated fatty acids, suppresses colitis, and promotes sperm fertility, *J Biol Chem* 291, 6895-6911.
149. MacDonald, J. I., and Sprecher, H. (1991) Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells, *Biochim Biophys Acta* 9, 105-121.
150. Hermansson, M., Hokynar, K., and Somerharju, P. (2011) Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells, *Prog Lipid Res* 50, 240-257.
151. Fonteh, A. N., and Chilton, F. H. (1992) Rapid remodeling of arachidonate from phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine pools during mast cell activation, *J Immunol* 148, 1784-1791.
152. Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A<sub>2</sub> enzymes present in P388D1 macrophages, *J Biol Chem* 271, 6758-6765.
153. Boilard, E., and Surette, M. E. (2001) Anti-CD3 and concanavalin A-induced human T cell proliferation is associated with an increased rate of arachidonate-phospholipid remodeling. Lack of involvement of group IV and group VI phospholipase A<sub>2</sub> in remodeling and increased susceptibility of proliferating T cells to CoA-independent transacyclase inhibitor-induced apoptosis, *J Biol Chem* 276, 17568-17575.
154. Balsinde, J. (2002) Roles of various phospholipases A<sub>2</sub> in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling, *Biochem J* 364, 695-702.
155. Winkler, J. D., Sung, C. M., Bennett, C. F., and Chilton, F. H. (1991) Characterization of CoA-independent transacyclase activity in U937 cells, *Biochim Biophys Acta* 5, 339-346.
156. Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Balgoma, D., Gil-de-Gómez, L., Ruipérez, V., Guijas, C., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2011) Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacyclase activity in human monocytes and U937 cells, *Biochim Biophys Acta* 2, 97-103.
157. Yamashita, A., Tanaka, K., Kamata, R., Kumazawa, T., Suzuki, N., Koga, H., Waku, K., and Sugiura, T. (2009) Subcellular localization and lysophospholipase/transacylation activities of human group IVC phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>γ), *Biochim Biophys Acta* 1791, 1011-1022
158. Yamashita, A., Hayashi, Y., Matsumoto, N., Nemoto-Sasaki, Y., Koizumi, T., Inagaki, Y., Oka, S., Tanikawa, T., and Sugiura, T. (2017) Coenzyme-A-independent transacylation system; possible involvement of phospholipase A<sub>2</sub> in transacylation, *Biology* 6, 23.
159. Lebrero, P., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Fernández-Caballero, L., Kokotos, G., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2019) Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: A role for cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>γ in phospholipid remodeling, *Cells* 8, 799.
160. Ruipérez, V., Astudillo, A.M., Balboa, M.A. & Balsinde, J. (2009) Coordinate regulation of Toll-like receptor-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A<sub>2</sub>s. *J. Immunol.* 182, 3877-3883.
161. Boyanovsky, B. B., van der Westhuyzen, D. R., and Webb, N. R. (2005) Group V secretory phospholipase A<sub>2</sub>-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans, *J Biol Chem* 280, 32746-32752.
162. Pucer, A., Brglez, V., Payré, C., Pungerčar, J., Lambeau, G., and Petan, T. (2013) Group X secreted phospholipase A<sub>2</sub> induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival, *Mol Cancer* 12, 1476-4598.
163. Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D., and Tabas, I. (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages, *Nat Cell Biol* 5, 781-792.
164. Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2002) Involvement of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells, *J Biol Chem* 277, 40384-40389.



165. Panini, S. R., Yang, L., Rusinol, A. E., Sinensky, M. S., Bonventre, J. V., and Leslie, C. C. (2001) Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol, *J Lipid Res* 42, 1678-1686.
166. Stahelin, R. V., Subramanian, P., Vora, M., Cho, W., and Chalfant, C. E. (2007) Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> via a novel site in the C2 domain, *J Biol Chem* 282, 20467-20474.
167. Lamour, N. F., Subramanian, P., Wijesinghe, D. S., Stahelin, R. V., Bonventre, J. V., and Chalfant, C. E. (2009) Ceramide 1-phosphate is required for the translocation of group IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and prostaglandin synthesis, *J Biol Chem* 284, 26897-26907.
168. Huwiler, A., Johansen, B., Skarstad, A., and Pfeilschifter, J. (2001) Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release, *FASEB J* 15, 7-9.
169. Tyurin, V. A., Yanamala, N., Tyurina, Y. Y., Klein-Seetharaman, J., Macphee, C. H., and Kagan, V. E. (2012) Specificity of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> toward oxidized phosphatidylserines: liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry characterization of products and computer modeling of interactions, *Biochemistry* 51, 9736-9750.
170. Akiba, S., Ii, H., Yoneda, Y., and Sato, T. (2004) Translocation of phospholipase A<sub>2</sub> to membranes by oxidized LDL and hydroxyoctadecadienoic acid to contribute to cholesteryl ester formation, *Biochim Biophys Acta* 8, 1-2.
171. Casas, J., Gijón, M. A., Vigo, A. G., Crespo, M. S., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2006) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A<sub>2</sub> to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells, *Mol Biol Cell* 17, 155-162.
172. Subramanian, P., Vora, M., Gentile, L. B., Stahelin, R. V., and Chalfant, C. E. (2007) Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> via distinct and separate mechanisms, *J Lipid Res* 48, 2701-2708.
173. Han, X., Cheng, H., Mancuso, D. J., and Gross, R. W. (2004) Caloric restriction results in phospholipid depletion, membrane remodeling, and triacylglycerol accumulation in murine myocardium, *Biochemistry* 43, 15584-15594.
174. Mancuso, D. J., Han, X., Jenkins, C. M., Lehman, J. J., Sambandam, N., Sims, H. F., Yang, J., Yan, W., Yang, K., Green, K., Abendschein, D. R., Saffitz, J. E., and Gross, R. W. (2007) Dramatic accumulation of triglycerides and precipitation of cardiac hemodynamic dysfunction during brief caloric restriction in transgenic myocardium expressing human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> $\gamma$ , *J Biol Chem* 282, 9216-9227.
175. Hanasaki, K., Ono, T., Saiga, A., Morioka, Y., Ikeda, M., Kawamoto, K., Higashino, K., Nakano, K., Yamada, K., Ishizaki, J., and Arita, H. (1999) Purified group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells, *J Biol Chem* 274, 34203-34211.
176. Webb, N. R., Bostrom, M. A., Szilvassy, S. J., van der Westhuyzen, D. R., Daugherty, A., and de Beer, F. C. (2003) Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub> increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 263-268.
177. Bozza, P. T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R. A., and Bandeira-Melo, C. (2011) Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85, 205-213.
178. Triggiani, M., Oriente, A., Seeds, M. C., Bass, D. A., Marone, G., and Chilton, F. H. (1995) Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool, *J Exp Med* 182, 1181-1190.
179. Johnson, M. M., Vaughn, B., Triggiani, M., Swan, D. D., Fonteh, A. N., and Chilton, F. H. (1999) Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 21, 253-258.
180. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G., and Jacobsson, A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice, *Prog Lipid Res* 49, 186-199.
181. Hodson, L., and Karpe, F. (2013) Is there something special about palmitoleate?, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 225-231.
182. Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S., and Hotamisligil, G. S. (2010) Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes, *Am J Clin Nutr* 92, 1350-1358.

183. Destailats, F., Guitard, M., and Cruz-Hernandez, C. (2011) Identification of  $\Delta 6$ -monounsaturated fatty acids in human hair and nail samples by gas-chromatography-mass-spectrometry using ionic-liquid coated capillary column, *J Chromatogr A* 30, 9384-9389.
184. Ge, L., Gordon, J. S., Hsuan, C., Stenn, K., and Prouty, S. M. (2003) Identification of the delta-6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity, *J Invest Dermatol* 120, 707-714.
185. Longmuir, K. J., Resele-Tiden, C., and Rossi, M. E. (1988) Fatty acids of pulmonary surfactant phosphatidylcholine from fetal rabbit lung tissue in culture. Biosynthesis of n-10 monoenoic fatty acids, *J Lipid Res* 29, 1065-1077.
186. Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S., and Hotamisligil, G. S. (2010) Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: a cohort study, *Ann Intern Med* 153, 790-799.
187. Schwingshackl, L., and Hoffmann, G. (2012) Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses, *Nutrients* 4, 1989-2007.
188. Scanferlato, R., Bortolotti, M., Sansone, A., Chatgililoglu, C., Polito, L., De Spirito, M., Maulucci, G., Bolognesi, A., and Ferreri, C. (2019) Hexadecenoic fatty acid positional isomers and de novo PUFA synthesis in colon cancer cells, *Int J Mol Sci* 20, 832.
189. Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., and Hotamisligil, G. S. (2008) Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism, *Cell* 134, 933-944.
190. Erbay, E., Babaev, V. R., Mayers, J. R., Makowski, L., Charles, K. N., Snitow, M. E., Fazio, S., Wiest, M. M., Watkins, S. M., Linton, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2009) Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis, *Nat Med* 15, 1383-1391.
191. Çimen, I., Kocatürk, B., Koyuncu, S., Tufanlı, Ö., Onat, U. I., Yıldırım, A. D., Apaydın, O., Demirsoy, Ş., Aykut, Z. G., Nguyen, U. T., Watkins, S. M., Hotamisligil, G. S., and Erbay, E. (2016) Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation, *Sci Transl Med* 8.
192. Tsuchiya, Y., Hatakeyama, H., Emoto, N., Wagatsuma, F., Matsushita, S., and Kanzaki, M. (2010) Palmitate-induced down-regulation of sortilin and impaired GLUT4 trafficking in C2C12 myotubes, *J Biol Chem* 285, 34371-34381.
193. Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J. L., Elmi, N., Bronk, S. F., Kohno, S., Charlton, M. R., and Gores, G. J. (2010) Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis, *J Hepatol* 52, 586-593.
194. Yang, Z. H., Miyahara, H., and Hatanaka, A. (2011) Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes, *Lipids Health Dis* 10, 10-120.
195. De Fabiani, E. (2011) The true story of palmitoleic acid: Between myth and reality, *Eur J Lipid Sci Tech* 113, 809-811.
196. Fabbrini, E., Magkos, F., Su, X., Abumrad, N. A., Nejedly, N., Coughlin, C. C., Okunade, A. L., Patterson, B. W., and Klein, S. (2011) Insulin sensitivity is not associated with palmitoleate availability in obese humans, *J Lipid Res* 52, 808-812.
197. Gong, J., Campos, H., McGarvey, S., Wu, Z., Goldberg, R., and Baylin, A. (2011) Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine?, *Am J Clin Nutr* 93, 186-191.
198. Perreault, M., Roke, K., Badawi, A., Nielsen, D. E., Abdelmagid, S. A., El-Sohemy, A., Ma, D. W., and Mutch, D. M. (2014) Plasma levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are positively associated, but 18:0 and 18:2n-6 are inversely associated with markers of inflammation in young healthy adults, *Lipids* 49, 255-263.
199. Lee, J. M., Lee, Y. K., Mamrosh, J. L., Busby, S. A., Griffin, P. R., Pathak, M. C., Ortlund, E. A., and Moore, D. D. (2011) A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects, *Nature* 474, 506-510.
200. Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J., and Semenkovich, C. F. (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR $\alpha$  in liver, *Cell* 138, 476-488.
201. Yore, M. M., Syed, I., Moraes-Vieira, P. M., Zhang, T., Herman, M. A., Homan, E. A., Patel, R. T., Lee, J., Chen, S., Peroni, O. D., Dhaneshwar, A. S., Hammarstedt, A., Smith, U., McGraw, T. E., Saghatelian, A., and Kahn, B. B. (2014) Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects, *Cell* 159, 318-332.
202. Balsinde, J., Fernández, B., and Diez, E. (1990) Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages.

The role of extracellular calcium and protein kinase C, *J Immunol* 144, 4298-4304.

203. Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2007) TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>/cyclooxygenase-2 pathway, *J Immunol* 179, 4821-4828.

204. Balsinde, J., Fernández, B., Solís-Herruzo, J. A., and Diez, E. (1992) Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages, *Biochim Biophys Acta* 22, 75-82.

205. Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A. M., Meana, C., Rubio, J. M., Guijas, C., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2013) A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses, *J Immunol* 190, 5169-5177.

206. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

207. Diez, E., Balsinde, J., Aracil, M., and Schüller, A. (1987) Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages, *Biochim Biophys Acta* 921, 82-89.

208. Fine, J. B., and Sprecher, H. (1982) Unidimensional thin-layer chromatography of phospholipids on boric acid-impregnated plates, *J Lipid Res* 23, 660-663.

209. Sansone, A., Melchiorre, M., Chatgililoglu, C., and Ferreri, C. (2013) Hexadecenoic fatty acid isomers: a chemical biology approach for human plasma biomarker development, *Chem Res Toxicol* 26, 1703-1709.

210. Axelsen, P. H., and Murphy, R. C. (2010) Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain, *J Lipid Res* 51, 660-671.

211. Balgoma, D., Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Montero, O., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010) Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids, *J Immunol* 184, 3857-3865.

212. Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Meana, C., Balgoma, D., Pol, A., Del Pozo, M. A., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2011) Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis, *J Biol Chem* 286, 35299-35307.

213. Dumlao, D. S., Buczynski, M. W., Norris, P. C., Harkewicz, R., and Dennis, E. A. (2011) High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acyl ethanolamines, *Biochim Biophys Acta* 11, 724-736.

214. Zhang, T., Chen, S., Syed, I., Ståhlman, M., Kolar, M. J., Homan, E. A., Chu, Q., Smith, U., Borén, J., Kahn, B. B., and Saghatelyan, A. (2016) A LC-MS-based workflow for measurement of branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids, *Nat Protoc* 11, 747-763.

215. Rodríguez, J. P., Guijas, C., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2019) Sequestration of 9-hydroxystearic acid in FAHFA (fatty acid esters of hydroxy fatty acids) as a protective mechanism for colon carcinoma cells to avoid apoptotic cell death, *Cancers* 11, 524.

216. Balsinde, J., Balboa, M. A., and Dennis, E. A. (1997) Antisense inhibition of group VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D<sub>1</sub> macrophages, *J Biol Chem* 272, 29317-29321.

217. Balsinde, J., Balboa, M. A., and Dennis, E. A. (2000) Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D<sub>1</sub> macrophage-like cells, *J Biol Chem* 275, 22544-22549.

218. Balboa, M. A., Sáez, Y., and Balsinde, J. (2003) Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes, *J Immunol* 170, 5276-5280.

219. Pérez, R., Melero, R., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2004) Role of group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide, *J Biol Chem* 279, 40385-40391.

220. Carnevale, K. A., and Cathcart, M. K. (2001) Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> is required for human monocyte chemotaxis to monocyte chemoattractant protein 1, *J Immunol* 167, 3414-3421.

221. Mishra, R. S., Carnevale, K. A., and Cathcart, M. K. (2008) iPLA<sub>2</sub>β: front and center in human monocyte chemotaxis to MCP-1, *J Exp Med* 205, 347-359.

222. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods* 25, 402-408.
223. Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Peña, L., Gil-de-Gómez, L., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2012) Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages, *J Biol Chem* 287, 10894-10904.
224. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254.
225. Murphy, R. C., Barkley, R. M., Zemski Berry, K., Hankin, J., Harrison, K., Johnson, C., Krank, J., McAnoy, A., Uhlsom, C., and Zarini, S. (2005) Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids, *Anal Biochem* 346, 1-42.
226. Deems, R., Buczynski, M. W., Bowers-Gentry, R., Harkewicz, R., and Dennis, E. A. (2007) Detection and quantitation of eicosanoids via high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, *Methods Enzymol* 432, 59-82.
227. ElSORI, D. H., Yakubenko, V. P., Roome, T., Thiagarajan, P. S., Bhattacharjee, A., Yadav, S. P., and Cathcart, M. K. (2011) Protein kinase C $\delta$  is a critical component of Dectin-1 signaling in primary human monocytes, *J Leukoc Biol* 90, 599-611.
228. Hashimoto, T., Segawa, H., Okuno, M., Kano, H., Hamaguchi, H. O., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Hasui, S., Yamaguchi, T., Hirose, F., and Osumi, T. (2012) Active involvement of micro-lipid droplets and lipid-droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes, *J Cell Sci* 125, 6127-6136.
229. Dai, Z., Qi, W., Li, C., Lu, J., Mao, Y., Yao, Y., Li, L., Zhang, T., Hong, H., Li, S., Zhou, T., Yang, Z., Yang, X., Gao, G., and Cai, W. (2013) Dual regulation of adipose triglyceride lipase by pigment epithelium-derived factor: a novel mechanistic insight into progressive obesity, *Mol Cell Endocrinol* 377, 123-134.
230. Khan, S. A., Sathyanarayan, A., Mashek, M. T., Ong, K. T., Wollaston-Hayden, E. E., and Mashek, D. G. (2015) ATGL-catalyzed lipolysis regulates SIRT1 to control PGC-1 $\alpha$ /PPAR- $\alpha$  signaling, *Diabetes* 64, 418-426.
231. Pérez, R., Matabosch, X., Llebaria, A., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2006) Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells, *J Lipid Res* 47, 484-491.
232. Pompeia, C., Lima, T., and Curi, R. (2003) Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death?, *Cell Biochem Funct* 21, 97-104.
233. Tallima, H., and El Ridi, R. (2017) Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review, *J Adv Res* 11, 33-41.
234. Sonnweber, T., Pizzini, A., Nairz, M., Weiss, G., and Tancevski, I. (2018) Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases, *Int J Mol Sci* 19.
235. Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A. M., Lebrero, P., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2017) Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release, *Front Immunol* 8, 1251.
236. Chilton, F. H., and Murphy, R. C. (1986) Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil, *J Biol Chem* 261, 7771-7777.
237. Suram, S., Gangelhoff, T. A., Taylor, P. R., Rosas, M., Brown, G. D., Bonventre, J. V., Akira, S., Uematsu, S., Williams, D. L., Murphy, R. C., and Leslie, C. C. (2010) Pathways regulating cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activation and eicosanoid production in macrophages by *Candida albicans*, *J Biol Chem* 285, 30676-30685.
238. Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Ruipérez, V., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010) Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes, *J Immunol* 184, 1071-1078.
239. Rubio, J. M., Rodríguez, J. P., Gil-de-Gómez, L., Guijas, C., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2015) Group V secreted phospholipase A<sub>2</sub> is upregulated by IL-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids, *J Immunol* 194, 3327-3339.
240. Nikolaou, A., Kokotou, M. G., Vasilakaki, S., and Kokotos, G. (2019) Small-molecule inhibitors as potential therapeutics

and as tools to understand the role of phospholipases A<sub>2</sub>, *Biochim Biophys Acta* 1864, 941-956.

241. Maryanoff, B. E., and Reitz, A. B. (1989) The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects, *Chem Rev* 89, 863-927.

242. Gliszczynska, A., Niezgoda, N., Gładkowski, W., Czarnecka, M., Świtalska, M., and Wietrzyk, J. (2016) Synthesis and biological evaluation of novel phosphatidylcholine analogues containing monoterpene acids as potent antiproliferative agents, *PLoS ONE* 11, e0157278.

243. Hsiao, C. Y., Ottaway, C. A., and Wetlaufer, D. B. (1974) Preparation of fully deuterated fatty acids by simple method, *Lipids* 9, 913-915.

244. Singh, A. (1990) An efficient synthesis of phosphatidylcholines, *J Lipid Res* 31, 1522-1525.

245. Nanda, S., and Yadav, J. S. (2003) Asymmetric synthesis of unnatural (Z,Z,E)-octadecatrienoid and eicosatrienoid by lipoxygenase-catalyzed oxygenation, *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 1799-1806.

246. Darwish, T. A., Luks, E., Moraes, G., Yepuri, N. R., Holden, P. J., and James, M. (2013) Synthesis of deuterated [D32]oleic acid and its phospholipid derivative [D64]dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, *J Labelled Comp Radiopharm* 56, 520-529.

247. Hu, T. S., Yu, Q., Wu, Y. L., and Wu, Y. (2001) Enantioselective syntheses of monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins tonkinicin and annonacin starting from carbohydrates, *J Org Chem* 66, 853-861.

248. Brocksom, T. J., Coelho, F., Deprés, J. P., Greene, A. E., Freire De Lima, M. E., Hamelin, O., Hartmann, B., Kanazawa, A. M., and Wang, Y. (2002) First comprehensive bakkan approach: stereoselective and efficient dichloroketene-based total syntheses of (+/-)- and (-)-9-acetoxylfukinanolide, (+/-)- and (+)-bakkenolide A, (-)-bakkenolides III, B, C, H, L, V, and X, (+/-)- and (-)-homogynolide A, (+/-)-homogynolide B, and (+/-)-palmosalide C, *J Am Chem Soc* 124, 15313-15325.

249. Barbachyn, M. R., Cleek, G. J., Dolak, L. A., Garmon, S. A., Morris, J., Seest, E. P., Thomas, R. C., Toops, D. S., Watt, W., Wishka, D. G., Ford, C. W., Zurenko, G. E., Hamel, J. C., Schaadt, R. D., Stapert, D., Yagi, B. H., Adams, W. J., Friis, J. M., Slatter, J. G., Sams, J. P., Oien, N. L., Zaya, M. J., Wienkers, L. C., and Wynalda, M. A. (2003) Identification of phenylisoxazolines as novel and viable antibacterial agents active against Gram-positive pathogens, *J Med Chem* 46, 284-302.

250. Niezgoda, N., Mituła, P., Kempńska, K., Wietrzyk, J., and Wawrzęczyk, C. (2013) Synthesis of phosphatidylcholine with conjugated linoleic acid and studies on its cytotoxic activity, *Aus J Chem* 66, 354-361.

251. Guijas, C., Astudillo, A.M., Gil-de-Gómez, L, Rubio, J. M., Balboa, M.A. & Balsinde, J. (2012) Phospholipid sources for adrenic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 1386-1393.

252. Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) The incorporation of arachidonic acid into triacylglycerol in P388D<sub>1</sub> macrophage-like cells, *Eur J Biochem* 235, 480-485.

253. Pereira-Dutra, F. S., Teixeira, L., de Souza Costa, M. F., and Bozza, P. T. (2019) Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation, *J Leukoc Biol* 106, 563-580.

254. Bingham, C. O., 3rd, Fijneman, R. J., Friend, D. S., Goddeau, R. P., Rogers, R. A., Austen, K. F., and Arm, J. P. (1999) Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A<sub>2</sub> enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells, *J Biol Chem* 274, 31476-31484.

255. Balsinde, J., Balboa, M. A., Yedgar, S., and Dennis, E. A. (2000) Group V phospholipase A<sub>2</sub>-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D<sub>1</sub> macrophages, *J Biol Chem* 275, 4783-4786.

256. Mounier, C. M., Ghomashchi, F., Lindsay, M. R., James, S., Singer, A. G., Parton, R. G., and Gelb, M. H. (2004) Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A<sub>2</sub> occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>α, *J Biol Chem* 279, 25024-25038.

257. Balboa, M. A., Shirai, Y., Gaietta, G., Ellisman, M. H., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (2003) Localization of group V phospholipase A<sub>2</sub> in caveolin-enriched granules in activated P388D<sub>1</sub> macrophage-like cells, *J Biol Chem* 278, 48059-48065.

258. Öörni, K., and Kovanen, P. T. (2009) Lipoprotein modification by secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes contributes to the

initiation and progression of atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* 20, 421-427.

259. Dichlberger, A., Schlager, S., Kovanen, P. T., and Schneider, W. J. (2016) Lipid droplets in activated mast cells - a significant source of triglyceride-derived arachidonic acid for eicosanoid production, *Eur J Pharmacol* 785, 59-69.

260. Blank, M. L., Smith, Z. L., and Snyder, F. (1993) Arachidonate-containing triacylglycerols: biosynthesis and a lipolytic mechanism for the release and transfer of arachidonate to phospholipids in HL-60 cells, *Biochim Biophys Acta* 3, 275-282.

261. Rouzer, C. A., Ivanova, P. T., Byrne, M. O., Milne, S. B., Marnett, L. J., and Brown, H. A. (2006) Lipid profiling reveals arachidonate deficiency in RAW264.7 cells: Structural and functional implications, *Biochemistry* 45, 14795-14808.

262. Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B., and Gross, R. W. (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities, *J Biol Chem* 279, 48968-48975.

263. Brash, A. R. (2001) Arachidonic acid as a bioactive molecule, *J Clin Invest* 107, 1339-1345.

264. Ferreri, C., Masi, A., Sansone, A., Giacometti, G., Larocca, A. V., Menounou, G., Scanferlato, R., Tortorella, S., Rota, D., Conti, M., Deplano, S., Louka, M., Maranini, A. R., Salati, A., Sunda, V., and Chatgililoglu, C. (2016) Fatty acids in membranes as homeostatic, metabolic and nutritional biomarkers: recent advancements in analytics and diagnostics, *Diagnostics* 7, 1.

265. Montenegro-Burke, J. R., Sutton, J. A., Rogers, L. M., Milne, G. L., McLean, J. A., and Aronoff, D. M. (2016) Lipid profiling of polarized human monocyte-derived macrophages, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 127, 1-8.

266. Zhang, C., Wang, Y., Wang, F., Wang, Z., Lu, Y., Xu, Y., Wang, K., Shen, H., Yang, P., Li, S., Qin, X., and Yu, H. (2017) Quantitative profiling of glycerophospholipids during mouse and human macrophage differentiation using targeted mass spectrometry, *Sci Rep* 7, 017-00341.

267. Snider, S. A., Margison, K. D., Ghorbani, P., LeBlond, N. D., O'Dwyer, C., Nunes, J. R. C., Nguyen, T., Xu, H., Bennett, S. A. L., and Fullerton, M. D. (2018) Choline transport links macrophage phospholipid metabolism and inflammation, *J Biol Chem* 293, 11600-11611.

268. Murakami, M., Masuda, S., Ueda-Semmyo, K., Yoda, E., Kuwata, H., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Sumimoto, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakatani, Y., and Kudo, I. (2005) Group VIB Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub>γ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A<sub>2</sub>, *J Biol Chem* 280, 14028-14041.

269. Mouchlis, V. D., Chen, Y., McCammon, J. A., and Dennis, E. A. (2018) Membrane allostery and unique hydrophobic sites promote enzyme substrate specificity, *J Am Chem Soc* 140, 3285-3291.

270. Koeberle, A., Shindou, H., Harayama, T., and Shimizu, T. (2012) Palmitoleate is a mitogen, formed upon stimulation with growth factors, and converted to palmitoleoyl-phosphatidylinositol, *J Biol Chem* 287, 27244-27254.

271. Brejchova, K., Balas, L., Paluchova, V., Brezinova, M., Durand, T., and Kuda, O. (2020) Understanding FAHFAs: From structure to metabolic regulation, *Prog Lipid Res* 79, 29.

272. Treede, I., Braun, A., Sparla, R., Kühnel, M., Giese, T., Turner, J. R., Anes, E., Kulaksiz, H., Füllekrug, J., Stremmel, W., Griffiths, G., and Ehehalt, R. (2007) Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine, *J Biol Chem* 282, 27155-27164.

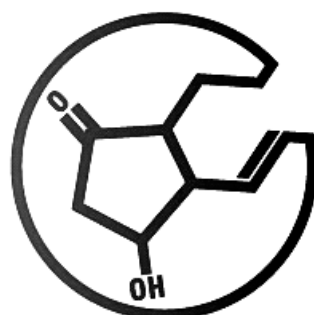
273. Jung, Y. Y., Nam, Y., Park, Y. S., Lee, H. S., Hong, S. A., Kim, B. K., Park, E. S., Chung, Y. H., and Jeong, J. H. (2013) Protective effect of phosphatidylcholine on lipopolysaccharide-induced acute inflammation in multiple organ injury, *Kor J Physiol Pharmacol* 17, 209-216.

274. Straus, D. S., and Glass, C. K. (2007) Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms, *Trends Immunol* 28, 551-558.

275. Astudillo, A.M., Meana, C., Bermúdez, M.A., Pérez-Encabo, A., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2020) Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8, 480.

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

277. Balsinde, J. (1993) Mechanism of arachidonic acid liberation in ethanol-treated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1169, 54-58.
278. Rubio, J. M., Astudillo, A. M., Casas, J., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2018) Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front Immunol* 9, 1723.
279. Casas, J., Gijón, M. A., Vigo, A.G., Crespo, M.S., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2006) Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A<sub>2</sub> protects cells from calcium-dependent death. *J. Biol. Chem.* 281, 6106-6116.
280. Balgoma, D., Montero, O., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010) Lipidomic approaches to the study of phospholipase A<sub>2</sub>-regulated phospholipid fatty acid incorporation and remodeling. *Biochimie* 92, 645-650.
281. Casas, J., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2010) The cationic cluster of group IVA phospholipase A<sub>2</sub> (Lys488/Lys541/Lys543/Lys544) is involved in translocation of the enzyme to phagosomes in human macrophages. *J. Lipid Res.* 51, 388-399.
282. Peña, L., Meana, C., Astudillo, A. M., Lordén, G., Valdearcos, M., Sato, H., Murakami, M. Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2016) Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A<sub>2</sub> in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim Biophys Acta* 1861, 1083-1095.
283. Balboa, M. A., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (2000) Phosphorylation of cytosolic group IV phospholipase A<sub>2</sub> is necessary but not sufficient for arachidonic acid release in P388D<sub>1</sub> macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 145-148.
284. Johnson, C. A., Balboa, M. A., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1999) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* 274: 27689-27693.
285. Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2006) Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta* 1761, 385-391.
286. Balsinde, J., Perez, R., and Balboa, M. A. (2006) Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1761, 1344-1350.
287. Astudillo, A.M., Rodríguez, J.P., Guijas, C., Rubio, J.M., Balboa, M.A. & Balsinde, J. (2021) Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNF $\alpha$  gene expression in macrophages via a cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ /COX-1 pathway. *Cells* 10, 447.
288. Gil-de-Gómez, L.; Monge, P., Rodríguez, J.P., Astudillo, A.M., Balboa, M.A. & Balsinde, J. (2020) Phospholipid arachidonic acid remodeling during phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 274.
289. Fernández, B., Balboa, M. A., Solís-Herruzo, J. A. & Balsinde, J. (1994) Phosphatidate-induced arachidonic acid mobilization in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 269: 26711-26716.



**THE EICOSANOID  
RESEARCH DIVISION**  
VALLADOLID