

TESIS DOCTORAL

Estudios lipídomicos en macrófagos. Regulación de los niveles lipídicos por lipinas y su impacto en la biología del macrófago y en procesos inflamatorios*

Alvaro Garrido Jiménez

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

Fecha de defensa: 30 septiembre 2023

**Esta es una versión en castellano, condensada y sin gráficos de la tesis doctoral presentada por Alvaro Garrido Jiménez para la obtención del título de doctor por la Universidad de Valladolid.*

1. INTRODUCCION

1.1. Síntesis de ácidos grasos, glicerofosfolípidos y esfingolípidos

Los ácidos grasos, además de servir como fuente de energía, son componentes esenciales de los fosfolípidos de membrana, de lípidos de reserva y de lípidos que pueden actuar como segundos mensajeros en señalización celular, como el diacilglicerol (DAG).

Son sintetizados endógenamente por la acción conjunta de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintetasa (FAS). Esta ruta, conocida como biosíntesis de novo proporciona ácido palmítico, 16:0, que puede ser sustrato de elongasas (ELOVL), para transformarse en ácido esteárico, 18:0 (1, 2).

Los ácidos grasos saturados (SFAs) palmítico y esteárico son los principales sustratos de la esteroil-CoA desaturasa (SCD), una enzima microsomal con actividad $\Delta 9$ desaturasa, que cataliza la desaturación de estos ácidos grasos introduciendo una insaturación de configuración cis en posición $\Delta 9$, obteniendo de esta forma los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), ácido palmitoleico, 16:1n-7 y ácido oleico, 18:1n-9, respectivamente (3) (Figura A.1).

En mamíferos no se pueden generar insaturaciones en los ácidos grasos más allá del carbono 9, por lo que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido linoleico, 18:2n-6 y el ácido α -linolénico, 18:3n-3, deben ser

incorporados a través de la dieta y por tanto se les denomina ácidos grasos esenciales. Una vez que estos entran a la célula, para generar PUFA de cadena más larga o más insaturada deben interactuar con elongasas o desaturasas $\Delta 5$ o $\Delta 6$, pertenecientes a la familia de desaturasas FADS (4) (Figura A.2).

Los ácidos grasos sintetizados de forma endógena y los obtenidos de forma exógena se utilizan en su forma activada con coenzima A en la síntesis de triacilglicerol (TAG), glicerofosfolípidos (PL) o esfingolípidos (SL).

Por un lado, en la mucosa intestinal, la mayor parte de TAG proviene de la reaclación del 2-monoacilglicerol (MAG), que es el producto de la hidrólisis de los TAG adquiridos a través de la dieta (5). Por otro lado, en el resto de tejidos la síntesis de novo de TAG y PL procede en esencia de la ruta del ácido fosfatídico (PA).

En esta ruta, el glicerol-3-fosfato, proveniente de la fosforilación del glicerol por la glicerol quinasa (GK) o de la reducción de dihidroxiacetona-fosfato por la glicerol-3- fosfato deshidrogenasa (GPDH), se acila en las posiciones sn-1 y sn-2 para producir PA (6). El PA, mediante la enzima ácido fosfatídico:CTP citidililtransferasa o CDP-DAG sintasa (CDS), que cataliza la formación de CDP-DAG, puede ser utilizado para la síntesis de fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipinas (CL) (7) (Figura A.3).

Por otra parte, el PA puede ser desfosforilado por la lipina produciendo DAG. Este DAG sirve como sustrato en la síntesis de TAG y PL como glicerofosfolípidos de colina (PC), glicerofos-

folípidos de etanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS). También, el DAG puede ser fosforilado por la DAG kinasa (DGK) para producir nuevamente PA.

La síntesis de TAG consiste en la acilación en posición sn-3 del DAG y es catalizada por la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). En mamíferos se conocen dos DGAT, DGAT1 y DGAT2 (8, 9). DGAT1 se expresa ubicuamente en tejido humano adulto y fetal mientras que DGAT2 se expresa principalmente en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria.

1.1.1. Síntesis de glicerofosfolípidos

La síntesis de PC se realiza por la ruta de la CDP-colina también conocida como ruta de Kennedy (10-12) (Figura A.3). En esta ruta, la colina es fosforilada por la colina kinasa (CK) para producir fosfocolina. Seguidamente la enzima CTP:fosfocolina citidililtransferasa (CCT) cataliza la etapa limitante de la ruta, la producción de CDP-colina (13, 14). En humanos y ratones existen dos isoformas de esta enzima, la CCT α localizada en núcleo y retículo endoplásmico y la CCT β localizada en retículo endoplásmico. Ambas se encuentran en forma soluble inactiva o asociadas a membranas y activas (15). La CDP-colina, mediante la CDP-colina: 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT), proporciona al DAG el grupo fosfocolina para la formación del PC. Los PC también pueden formarse por trimetilación directa de la etanolamina presente en los PE por parte de la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT).

La PS se sintetiza en mamíferos por la acción de dos fosfatidilserina sintasas, PS sintasa-1 (PSS1) y PS sintasa-2 (PSS2), localizadas en un dominio del retículo endoplásmico llamado MAM, del inglés Mitochondria-Associated Membranes. Estas sintasas catalizan reacciones de intercambio del grupo de cabeza polar en las que la serina reemplaza a la colina o a la etanolamina provenientes de PC y PE, respectivamente (10, 11, 16) (Figura A.3).

Los PE pueden sintetizarse a partir de DAG y CDP-etanolamina mediante una ruta análoga a la de la CDP-colina en retículo endoplásmico o producirse por descarboxilación de PS mediante la fosfatidilserina descarboxilasa (PSD) en mitocondria (Figura A.3).

El PI se sintetiza en retículo endoplásmico a partir de mio-inositol y CDP-DAG por acción de la PI sintasa (PIS). Este PI puede sufrir diferentes fosforilaciones por parte de las PI quinasas generando polifosfoinosítidos (PIPs) (Figura 3), que participan en diferentes rutas de señalización celular como el ciclo PIP2 o la ruta PI3K/AKT/mTOR.

Para la síntesis de PG, en primer lugar, se sintetiza fosfatidilglicerol-fosfato a partir de glicerol-3-fosfato y CDP-DAG en una reacción catalizada por la fosfatidilglicerol-fosfato sintasa (PGPS). En segundo lugar, el fosfatidilglicerolfosfato es desfosforilado por la fosfatidilglicerol fosfato fosfatasa (PGP Fosfatasa) (Figura A.3).

Ambas reacciones ocurren en retículo endoplásmico y mitocondria. A partir de PG pueden sintetizarse otros fosfolípidos menos abundantes como la CL o el BMP (Figura A.3). Para la síntesis de CL, el PG se combina con una segunda molécula de CDP-DAG en una reacción catalizada por la cardiolipina sintasa (CLS) que es única de membrana mitocondrial interna. La síntesis de BMP es compleja y ocurre a través de una reacción de isomerización y sucesivas reacciones de desacilación/reacilación.

1.1.2 Síntesis de esfingolípidos

La etapa limitante en la síntesis de SL consiste en la transformación de ácido palmítico activado con CoA en esfingánina o dihidroesfingosina por parte de la serina palmitoiltransferasa (SPT) en retículo endoplásmico (17). Este aminoalcohol de 18 átomos de carbono puede acilarse y experimentar transformaciones sucesivas por parte de la dihidroceramida sintasa para generar dihidroceramida (dhCer) y posteriormente mediante la dihidroceramida desaturasa generar ceramidas (Cer). Las Cer son metabolitos clave en la síntesis de otros SL más complejos formados principalmente en el aparato de Golgi como ceramida-1-fosfato (C1P), esfingomiélin (SM) o glucosilceramidas (GlcCer), precursoras de otros esfingoglucolípidos (18, 19). Además de la biosíntesis de novo, las Cer pueden ser generadas mediante la degradación de otros SL, por lo que se trata de un lípido cuya concentración está altamente regulada en la célula (Figura A.4).

1.2. Estearoil-CoA desaturasa

La estearoil-CoA desaturasa (SCD) es una enzima localizada en retículo endoplásmico y, como se ha mencionado anteriormente, cataliza la inserción de un doble enlace de configuración cis en posición Δ^9 en SFAs como el ácido palmítico o el ácido esteárico para generar el ácido palmitoleico o el ácido oleico, respectivamente. Esta reacción requiere oxígeno, O₂, NAD(P)H, un palmitoil-CoA o estearoil-CoA y una cadena de transporte de electrones compuesta por la enzima citocromo b5 reductasa, el citocromo b5 y la desaturasa SCD (Figura A.5) (20).

En mamíferos se han descrito diferentes genes que codifican para la SCD, tanto en ratón (21-

24) como en rata (25), cerdo (26), cabra (27) y humano (28-33). Hasta la fecha en ratones se han identificado cuatro isoformas de SCD (de SCD-1 a SCD-4) codificadas por distintos genes cuyo patrón de expresión es diferente en función del tejido (21-24). En humanos se han identificado dos isoformas (SCD-1 y SCD-5) y, de la misma forma que ocurre en ratones, se expresa en diferentes tejidos siendo abundante en tejido adiposo, cerebro, hígado, corazón y pulmón (28) aunque la isoforma SCD-5 se expresa principalmente en cerebro y páncreas (33).

La estructura obtenida a partir de la secuencia de aminoácidos en distintos organismos sugiere que las $\Delta 9$ -desaturasas poseen dos dominios transmembrana y tres motivos ricos en histidinas localizados hacia la cara citosólica de la membrana del retículo endoplásmico que podrían intervenir en la unión al hierro, necesario para la función de esta enzima (34, 35).

La expresión de SCD1 está regulada por diversas hormonas y factores nutricionales (36- 39). Está regulada positivamente por SREBP-1c, CHREBP y LXR, lo que podría explicar la inducción de la expresión de SCD1 durante los ciclos de ayuno-realimentación (40, 41).

Los MUFAs son los productos directos de SCD1 y son incorporados con preferencia en lípidos mayoritarios como TAG, ésteres de colesterol (CE) y PL (42). Además de sus funciones estructurales, los MUFAs tienen funciones en señalización, pueden regular el metabolismo y modular enfermedades metabólicas crónicas. El aumento en los niveles de MUFA en modelos animales y en pacientes humanos destaca el importante papel que juega SCD1 en el desarrollo de enfermedades metabólicas relacionadas con obesidad, incluyendo enfermedad de hígado graso no alcohólico, resistencia a insulina e hiperlipidemia (43-45). El rol de SCD1 en la patogénesis de varias enfermedades indica que juega un papel clave en la regulación de diversas funciones celulares. Además, se ha visto que también está implicada en el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer como carcinomas de colon y esófago, adenomas hepatocelulares y en líneas celulares de cáncer de mama (46, 47) por lo que está siendo ampliamente estudiada como potencial diana terapéutica contra esta enfermedad (48).

Estudios en modelos de ratón transgénicos han corroborado el papel fundamental de SCD1 en la regulación de procesos celulares como la síntesis y oxidación de lípidos, termogénesis, señalización vía hormonas e inflamación (42, 48).

Los ratones asebia, que significa “sin sebo”, presentan una mutación espontánea en el gen que codifica para la SCD1 (49). Tanto estos ratones como

los Scd1 $-/-$ generados mediante ingeniería génica se caracterizan por mostrar alteraciones en la piel como atrofia de glándulas sebáceas, mayor pérdida de agua transepidérmica y una notable falta de pelo en comparación con ratones wild type (50, 51). Por otro lado, los ratones deficientes en SCD1 muestran un contenido disminuido de TAG y CE en piel, hígado y plasma, mientras que el colesterol en plasma está aumentado. En hígado, el contenido de fosfolípidos totales no está alterado (51) aunque se observa un aumento en PC (52). En el hígado de estos ratones Scd1 $-/-$ hay una disminución en la expresión de genes lipogénicos que codifican para proteínas como la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), la ácido grasos sintetasa (FAS) y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP); y un aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en la oxidación de ácidos grasos como la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) o la acil-CoA oxidasa (53, 54). También se observa un menor peso corporal y menor adiposidad a pesar de que consumen más que los ratones wild type, y de que están sometidos a una dieta lipogénica (55).

Por otro lado, los niveles de insulina en plasma durante el ayuno, así como la cascada de señalización en musculo esquelético están aumentados en ratones machos carentes de SCD1 lo que explicaría su mayor tolerancia a la glucosa (56).

1.3. Familia de proteínas lipinas

La familia de las lipinas se identificó mediante la elucidación del defecto genético provocado por una mutación espontánea en la cepa de ratón BALB/cByJ. Estos ratones mutantes presentaban un fenotipo caracterizado por una neuropatía periférica progresiva y la aparición de hígado graso durante la lactancia, por lo que se les dio el nombre de ratones fld (del inglés, fatty liver dystrophy) (57).

Estos ratones también presentan hipertrigliceridemia durante el periodo de lactancia ya que a través de la leche siguen una dieta elevada en grasa. Con el fin de la lactancia y el cambio a una dieta adulta la hipertrigliceridemia y el hígado graso desaparecen. Sin embargo, en ratones fld adultos, se observa una notable falta de tejido adiposo, resistencia a insulina y una neuropatía periférica progresiva debido a la desmielinización de las células de Schwann (58) (Figuras A.6 y A.7). Por otro lado, los ratones fld machos son estériles, defecto que probablemente está relacionado con la elevada expresión de la lipina-1 en los testículos de los ratones (59).

El gen causante del fenotipo fld fue identificado por el grupo de Reue en 2001 mediante

el uso de técnicas de clonaje posicional. Gracias a esta técnica descubrieron que el fenotipo observado se debía a mutaciones en el gen *Lpin1* (Figura A.8), que se convirtió en el miembro fundador de la familia de las lipinas (60).

Además, mediante análisis de homología de secuencia empleando bases de datos, se encontraron dos genes adicionales en mamíferos a los que llamaron *Lpin2* y *Lpin3*. En ratones, el procesamiento alternativo del gen *Lpin1* da lugar a dos isoformas conocidas como lipina-1 α y lipina-1 β , con 891 y 924 aminoácidos, respectivamente (61). En humanos, el procesamiento alternativo del gen *LPIN1*, además de generar lipina-1 α y lipina-1 β con 890 y 923 aminoácidos (62), respectivamente, produce otra isoforma con 916 aminoácidos denominada lipina-1 γ (63). La lipina-2 y la lipina-3 comparten una similitud de secuencia de aminoácidos con la lipina-1 de entre el 44-48 % (64).

Esto planteó la cuestión de qué funciones específicas desempeña cada miembro de la familia de las lipinas, ya que cada uno tiene un patrón de expresión distinto en función del tejido. *Lpin1* se expresa mayoritariamente en tejido adiposo, músculo esquelético y testículos, y en menor medida en riñones, pulmones, cerebro, corazón e hígado (60). *Lpin2* se expresa de manera prominente en hígado y cerebro, y *Lpin3* se expresa en el tracto gastrointestinal y el hígado (59). Por el momento la literatura sugiere que, en mamíferos, las tres lipinas realizan funciones moleculares similares en diferentes tejidos.

1.3.1. Funciones moleculares de las lipinas

En la secuencia de aminoácidos de las lipinas se conocen dos regiones conservadas con la evolución, una en el extremo amino-terminal, el dominio N-LIP, y otra en el extremo carboxi-terminal, el dominio C-LIP (Figura A.9). Cerca del dominio N-LIP las lipinas contienen una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés Nuclear Localization Signal). El dominio C-LIP contiene dos motivos funcionales: (a) un motivo DXDXT, que está presente en todas las especies y constituye el sitio catalítico para la actividad fosfatasa de PA o PAP (del inglés, Phosphatidic Acid Phosphatase), y (b) un motivo LXXIL, que está presente en las lipinas de mamíferos y se requiere para su actividad como coactivador transcripcional, aunque in vivo esta función solo se ha demostrado para lipina-1 (65).

Las lipinas poseen actividad fosfatasa de PA o PAP, es decir, catalizan el penúltimo paso en la síntesis de triglicéridos, convirtiendo el PA en DAG. Esta reacción fue caracterizada por primera vez en

1957 cuando se describió la ruta del glicerol-3-fosfato (67). El DAG resultante actúa como precursor de TAG o PC, PE y PS (Figura A.10).

En 2006, Carman et al. (68) mediante análisis de homología de secuencia de una proteína purificada e identificada como Pah1p, responsable de la actividad PAP en levaduras, identificaron a las lipinas como responsables de la actividad PAP en mamíferos. Las enzimas con actividad PAP normalmente residen en el citosol (69) y se translocan a la membrana del retículo endoplásmico para unirse a PA y catalizar la reacción enzimática. Esta actividad PAP citosólica es dependiente de Mg^{2+} y sensible a la presencia de bloqueantes de grupos tiol de cisteínas como NEM (N-etil-maleimida) (70).

Para diferenciar a las fosfatasas con actividad PAP citosólica específicas de PA de otras fosfatasas no específicas de PA como las LPP (del inglés, Lipid Phosphate Phosphatase), se nombraron a las primeras PAP-1 y a las últimas PAP-2, que son independientes de magnesio e insensibles a NEM. Las LPP se localizan en la membrana plasmática, intervienen en la síntesis de TAG por la ruta del monoacilglicerol fosfato en intestino y pueden hidrolizar grupos fosfato de otros lípidos, como ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida-1-fosfato o esfingosina-1-fosfato (59).

En mamíferos, la actividad PAP-1 de las lipinas no sólo depende de Mg^{2+} , sino que también depende de la concentración de Mn^{2+} y se ha descrito que las sales de Ca^{2+} y Zn^{2+} de PA pueden inhibir dicha actividad (63). Sin embargo, esta actividad no depende del estado de oligomerización, ya que las lipinas pueden ensamblarse formando homo- y hetero-oligómeros sin afectar a su actividad PAP (71). Por otro lado, la fosforilación de lipina-1 no afecta a su actividad PAP, pero sí controla su actividad fisiológica y su localización subcelular, permaneciendo en citoplasma si no está fosforilada y en núcleo si está fosforilada (72).

De los tres miembros de la familia, la lipina-1 tiene una mayor actividad PAP que la lipina-2 y la lipina-3 (59). En humanos, las isoformas α y β de lipina-1 presentan una actividad PAP similar, mientras que la isoforma γ , presenta una actividad mucho menor (63).

Varios estudios han demostrado que la contribución de cada una de las lipinas a la actividad PAP-1 total es dependiente del tipo celular. En ratones fld se ha visto que la mayor responsable de la actividad PAP-1 es lipina-1 en tejido adiposo, músculo esquelético o corazón, mientras que en hígado parece que otros miembros de la familia de las lipinas (lipina-2 o lipina-3) están ejerciendo efectos compensatorios ya que se observó una actividad

PAP-1 normal (59). El silenciamiento de lipina-2 en hepatocitos de ratones fld disminuye drásticamente la actividad PAP-1 (73), mientras que el silenciamiento de lipina-2 en células HeLa produce un incremento de actividad PAP-1 debido a que aumenta la expresión de lipina-1 (74).

Además de su función como fosfatasa de PA en la ruta del glicerol 3-fosfato, las lipinas han sido implicadas en la regulación de la expresión de genes a través de la interacción con receptores nucleares o factores de transcripción ligados al DNA (75).

La primera demostración de esta función para lipina-1 fue llevada a cabo por Finck et al. (65) en estudios de la respuesta hepática al ayuno de ratones deficientes del coactivador del receptor γ 1- α activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α). En estos estudios se demostró que la lipina-1 forma un complejo con PPAR α y PGC-1 α , lo que induce la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y reprime la expresión de genes relacionados con la lipogénesis. La lipina-1 también interacciona con el factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF-4 α), con PPAR δ , con el receptor de glucocorticoides y con factores adipogénicos como PPAR γ (65, 76).

Durante la diferenciación de adipocitos la lipina-1 α y la lipina 1 β ejercen roles complementarios. Por un lado, lipina-1 α induce la expresión de factores adipogénicos mientras que lipina-1 β induce la expresión de genes implicados en la biosíntesis de lípidos como FAS o DGAT (61).

Por otro lado, lipina-1 también reprime la actividad transcripcional de NFATc4 en adipocitos inhibiendo la secreción de citoquinas (78) y en neuronas lipina-1 α se asocia con el factor MEF2, implicado en la diferenciación y supervivencia de este tipo celular (79).

Aunque lipina-2 y lipina-3 también poseen el motivo LXXIL, se sabe muy poco sobre su actividad como coactivadoras transcripcionales. Por un lado, en experimentos in vitro se ha demostrado que lipina-2 actúa como coactivador transcripcional de PGC-1 α de forma similar a lipina-1 (80). Por otro lado, se ha visto que lipina-3 interacciona físicamente con PPAR α (65) aunque in vivo se desconoce la importancia de estas actividades. Mutaciones en el motivo LXXIL suprime tanto la función de coactivadoras transcripcionales de las lipinas como la actividad PAP-1. Sin embargo, mutaciones en el motivo catalítico, responsable de la actividad PAP-1, no altera la actividad cotranscripcional (59, 65, 68).

La capacidad de las lipinas para regular tanto la síntesis de TAG a través de su actividad PAP-1 como la oxidación de ácidos grasos a través de su actividad cotranscripcional sugiere un mecanismo

único en la coordinación de la síntesis y movilización de lípidos (81).

1.3.2. Función de las lipinas en el sistema inmune

Las lipinas juegan un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria en macrófagos ya que, al igual que ocurre en otros sistemas celulares, controlan los niveles celulares de dos lípidos bioactivos como el PA y el DAG (82-84). Por una parte, el PA es utilizado como precursor en la biosíntesis de otros fosfolípidos (Figura A.3 y Figura A.10), sus propiedades físicas influyen en la curvatura de la membrana (85) y actúa como lípido señalizador reclutando proteínas citosólicas a membranas (86). Por otra parte, el DAG, además de formar parte de las membranas y ser el precursor de TAG y de diferentes fosfolípidos (Figura A.3 y Figura A.10), también actúa como segundo mensajero. Está involucrado en múltiples procesos de señalización celular como señalización por insulina, en la activación de proteínas que contienen el dominio C1 tales como PKC (87-90) y en la activación de TRPC3, que es un canal iónico que regula los niveles de calcio intracelular.

Por un lado, a la lipina-1 se le ha atribuido un papel pro-inflamatorio ya que cuando está ausente, como en ratones fld, disminuye la señalización a través de TLR4, observándose una disminución en la activación de MAPK y del factor de transcripción AP-1 tras activación con LPS (82). Los macrófagos de estos ratones producen menos citoquinas proinflamatorias y se recuperan antes del tratamiento con LPS que los ratones wild type. En macrófagos humanos, la falta de lipina-1 disminuye el número de gotas lipídicas (LDs) e impide el aumento de tamaño de las mismas tras el tratamiento con oleato. Además, la falta de lipina-1 reduce la activación de cPLA $_2\alpha$ y la movilización de ácido araquidónico por diferentes estímulos. Este efecto puede deberse al papel que ejerce el DAG en la activación de PKC que, a su vez, regula cascadas de fosforilación que culminan en la fosforilación y activación de cPLA $_2\alpha$ (91). Además, Casas et al. (92) han demostrado recientemente que durante la activación con LPS en macrófagos humanos, lipina-1 provoca un aumento de DAG en retículo endoplásmico que activa el canal iónico TRPC3 liberando los depósitos de Ca $^{2+}$ del retículo al citosol, lo que fomenta la translocación de NF κ B al núcleo y, por tanto, una regulación positiva de genes proinflamatorios (Figura A.11).

También se han llevado a cabo estudios de la implicación de lipinas en la patología del cáncer. En concreto, Meana et al. (93) han descrito como afecta la presencia o ausencia de lipina-1 al desarrollo y

progresión del cáncer de colon. En dicho estudio se demostró que la lipina-1 promueve la formación de tumores, el crecimiento y la progresión en intestino grueso. En los tumores de animales deficientes en lipina-1 hay una menor infiltración de macrófagos, célula inmune donde se expresa principalmente lipina-1, así como una menor expresión de IL-23, que es responsable, en parte, del menor daño en el colon y del desarrollo de los tumores en estos animales (Figura A.12).

Por otro lado, a la lipina-2 se le ha atribuido un papel antiinflamatorio, opuesto al desempeñado por lipina-1. Valdearcos et al. (94) demostraron que, tanto en la línea celular RAW 264.7 como en macrófagos humanos, la lipina-2 regula las rutas de señalización inflamatorias tras activación por ácido palmítico mediante el secuestro del mismo en TAG. En estos estudios se observó que la falta de lipina-2 provoca una disminución en la incorporación del ácido palmítico en TAG aumentando la señalización proinflamatoria inducida por este ácido graso a través de JNK (Figura A.13).

Gracias a la obtención de ratones deficientes en lipina-2 se ha podido profundizar más en el estudio metabólico de esta enzima. En estos ratones se observó una elevada actividad PAP-1 hepática provocada por un mecanismo compensatorio por parte de lipina-1 cuyos niveles proteicos habían aumentado (95) a diferencia de la disminución en la actividad PAP-1 observada al silenciar lipina-2 en hepatocitos de ratones fld (73). Por otro lado, en estos ratones también se descubrió que la lipina-2 juega un rol clave en la homeostasis lipídica en el cerebelo de ratones de edad avanzada. En el cerebelo de ratones jóvenes wild type se expresan únicamente lipina-1 y lipina-2. Cuando falta lipina-2 en estos ratones se observa un aumento en los niveles de expresión de lipina-1 como efecto compensatorio, sin embargo, cuando los ratones envejecen, los niveles de lipina-1 desaparecen y al no tener lipina-2 se altera la composición de los fosfolípidos lo que provoca temblores y ataxia. Además, se observa una disminución en el número de células de Purkinje lo que indica que la lipina-2 desempeña un papel importante en la homeostasis lipídica de estas células.

Estudios recientes en macrófagos humanos y de ratón llevados a cabo por Lordén et al. (96) han relacionado la deficiencia o carencia de lipina-2 con una mayor activación del inflammasoma NLRP3 y la consecuente maduración de pro-IL-1 β a IL-1 β a través de la activación de MAPK, la disminución de los niveles de colesterol, que afectan al canal iónico P2X7R, y al mayor procesamiento de pro-caspasa-1 por parte del inflammasoma NLRP3, lo que se traduce en un mayor procesamiento de pro-IL-1 β a IL-1 β

(Figura A.14).

1.3.3. Defectos genéticos de lipinas y enfermedades asociadas

El estudio de las deficiencias de lipinas ha proporcionado nuevos conocimientos sobre la función fisiológica de las mismas. Incluso antes de la identificación del gen Lpin1, los estudios del fenotipo de los ratones fld implicaron a la lipina-1 en el metabolismo de lípidos en hígado, en la correcta funcionalidad de los nervios periféricos y en el desarrollo del tejido adiposo (57, 102-104). En los últimos años se han identificado mutaciones en los genes humanos LPIN1 y LPIN2 que están asociadas con enfermedades graves. Sin embargo, debido a la rareza de la deficiencia de estas enzimas unido a las cuestiones éticas que rodean a los estudios en humanos, los estudios sobre la fisiopatología de las lipinas se han realizado principalmente en modelos de ratón.

Se han observado algunas diferencias de fenotipo entre ratones y humanos con deficiencia de lipinas. Sin embargo, es probable que algunas de estas diferencias estén relacionadas con la caracterización incompleta en los modelos de ratón y en las enfermedades en humano.

Como se ha comentado anteriormente, la carencia de lipina-1 o el defecto genético en el gen Lpin1 provoca en ratones el fenotipo fld, caracterizado por la presencia de hígado graso durante el período neonatal hasta aproximadamente 2 semanas de edad y una neuropatía periférica progresiva que se desarrolla en ratones adultos (57, 103). Estos ratones tienen lipodistrofia caracterizada por una diferenciación alterada de adipocitos y una ausencia casi completa de TAG en los depósitos del tejido adiposo blanco (60, 76, 102, 105, 106). Por otro lado, su metabolismo diurno está alterado y son resistentes a la insulina, probablemente debido a la desregulación del metabolismo lipídico en tejido adiposo, hígado y músculo (107, 108). Otra característica de los ratones fld machos es que no son fértiles a pesar de producir espermatozoides móviles (57).

La actividad PAP de la lipina-1 en tejido adiposo proporciona una explicación de la reducción en las reservas de TAG observada en el tejido adiposo de ratones fld (59, 109). Mediante estudios en el tejido adiposo de ratones knockout para lipina-1, que también presentan lipodistrofia, se ha confirmado que su función PAP es necesaria en adipocitos blancos y marrones (106). También se han realizado estudios empleando ratones con una lipina-1 truncada específicamente en su tejido adiposo. Esta

lipina-1 truncada mantiene la actividad como coactivador transcripcional, pero carece de actividad PAP y se confirmó que esta actividad PAP es necesaria en la maduración de adipocitos y en el almacenamiento de TAG (105). La pérdida de la actividad coactivadora de la lipina-1 y la desregulación en los genes implicados en la oxidación de ácidos grasos hepáticos contribuyen al fenotipo de hígado graso neonatal en ratones fld (65). Sin embargo, la demostración más reciente de que la esteatosis hepática neonatal ocurre en el tejido adiposo de ratones deficientes de lipina-1 sugiere que el hígado graso puede ser resultado de una disfunción metabólica en los adipocitos y/o macrófagos (106).

La neuropatía periférica en ratones fld se caracteriza por una desmielinización y lipodistrofia en los nervios periféricos (103, 110). Nadra et al. (58) determinaron que la falta de la actividad PAP de lipina-1 en las células de Schwann provoca una acumulación de PA y la activación de la vía de señalización MEK-ERK, que inhibe la diferenciación de estas células. Esta acumulación de PA también ocurre en otros tipos celulares de ratones carentes de lipina-1, como en corazón y en tejido adiposo (105, 106, 111). En adipocitos la acumulación de PA y la activación de ERK inhiben la expresión de PPAR γ , regulador transcripcional clave en adipogénesis, lo que explicaría la diferenciación defectuosa de estas células en ratones fld (112). Además, la acumulación de PA altera la lipólisis de los adipocitos debido a efectos alostéricos sobre la fosfodiesterasa 4 (105).

Los primeros pacientes con deficiencia de lipina-1 se identificaron en 2008 (113). Las mutaciones de LPIN1 se detectaron por primera vez en niños de familias consanguíneas que habían experimentado episodios de rabdomiólisis con dolor muscular, degradación de miocitos y fiebre. Michot et al. (114, 115) catalogaron posteriormente las mutaciones de LPIN1 en pacientes con rabdomiólisis infantil de todo el mundo. Hasta la fecha, se han identificado al menos 19 mutaciones distintas de LPIN1, la mayoría de las cuales son cambios puntuales o pequeñas inserciones/eliminaciones que dan como resultado codones de stop prematuros.

Michot et al. (114, 115) secuenciaron LPIN1 en 141 casos de rabdomiólisis infantil grave o moderada. Las mutaciones bialélicas de LPIN1 estaban presentes en dos tercios de los individuos que presentaban rabdomiólisis grave con inicio antes de los 7 años de edad, pero se observaron con poca frecuencia en individuos con inicio tardío o rabdomiólisis menos grave. Curiosamente, se identificaron mutaciones heterocigóticas de los genes

LPIN2 y LPIN3 en un puñado de pacientes con rabdomiólisis moderada o con rabdomiólisis grave de aparición tardía.

La deficiencia de lipina-1 en niños pequeños puede producir una enfermedad grave y potencialmente mortal, con daño grave en el músculo cardíaco que puede conducir a un paro cardíaco (116). Además de la rabdomiólisis, el análisis de los lípidos musculares en dos individuos afectados reveló niveles elevados de intermediarios lipídicos en la vía del glicerol-3-fosfato (113). La rabdomiólisis y la patología muscular no se han observado en ratones fld. Esto puede estar relacionado con las dificultades para detectar episodios de dolor muscular en ratones y la falta de estímulos que normalmente desencadenan esos episodios en humanos como fiebre, ejercicio extenuante o ayuno.

Como se mencionó anteriormente, la importancia de la lipina-1 en el tejido adiposo de roedores está bien establecida y, por tanto, es sorprendente que los niños con deficiencia de lipina-1 no presenten lipodistrofia (113). Sin embargo, existe una fuerte evidencia de que la lipina-1 es un determinante de la adiposidad y los rasgos metabólicos relacionados en seres humanos. Tanto los niveles de expresión de lipina-1 en tejido adiposo humano como los polimorfismos genéticos de LPIN1 están asociados con el índice de masa corporal y la sensibilidad a insulina en múltiples cohortes humanas (117-121). Además, la mayoría de publicaciones sobre deficiencia de lipina-1 humana han sido en niños, y es posible que algunos pacientes afectados desarrollen fenotipos en su tejido adiposo a medida que envejecen. Otra posibilidad es que las diferencias metabólicas observadas entre ratones y humanos estén protegiendo a los humanos con deficiencia de lipina-1 de la lipodistrofia. Entre estas diferencias metabólicas podemos destacar la mayor dependencia de la lipogénesis de novo en el tejido adiposo de ratón que en el tejido adiposo humano (122), y/o una posible compensación por la pérdida de lipina-1 en humanos por parte de otros miembros de la familia de las lipinas.

Se desconoce si los humanos con deficiencia de lipina-1 desarrollan hígado graso durante las primeras semanas de vida, aunque cabe destacar que se ha relacionado una variación genética en LPIN1 con la presencia y gravedad de la enfermedad de hígado graso en niños (123).

Mediante estudios de asociación del genoma completo en humanos se han identificado mutaciones en LPIN2 y LPIN3 relacionadas con diferentes patologías, principalmente metabólicas. Un polimorfismo en la región UTR 3' de LPIN2 se ha relacionado con la distribución de grasa, la glucosa y

los niveles de insulina en diabéticos tipo 2 (124). Además, las mutaciones sin sentido de LPIN2 o la mutación con cambio de sentido (S734L) en el dominio C-LIP producen una patología conocida como síndrome de Majeed (125).

1.3.4. El síndrome de Majeed

El síndrome de Majeed se considera como enfermedad muy rara, hasta la fecha se ha observado en treinta y dos individuos en un total de diecinueve familias. Se describió por primera vez en 1989, en tres niños de una familia consanguínea que presentaba osteomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), anemia diseritropoyética congénita (CDA) y dermatosis neutrofílica transitoria (126). Posteriormente fue descrito otro caso infantil, dos hermanos de otra familia consanguínea no relacionada (127). Estos niños presentaron un importante retraso en el crecimiento, fiebres recurrentes y dolor óseo, a veces con contracturas articulares debida a la CRMO y requerían de múltiples transfusiones de glóbulos rojos debido a la CDA (126-128). Los marcadores inflamatorios, incluida la tasa de sedimentación de eritrocitos, estaban elevados en los seis niños. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos mejoraron, pero no controlaron la sintomatología. Fue en 2005 cuando, mediante técnicas de clonaje posicional y mapeo de homocigosis, Ferguson et al. (129) identificaron al gen LPIN2 como responsable de las patologías observadas en estos pacientes.

El mapeo genético de homocigotos utilizando DNA de 2 familias afectadas no relacionadas entre sí demostró vinculación con marcadores en una región de 1,8 Mb en el cromosoma 18p. La secuenciación reveló mutaciones únicas en el gen LPIN2 de cada familia (129). Los individuos afectados de una familia eran homocigotos para una mutación sin sentido que reemplazaba la serina altamente conservada en el aminoácido 734 con una leucina (p.S734L), mientras que los niños afectados de la otra familia tenían una mutación de cambio de marco causada por una eliminación consecutiva de 2 pares de bases que resultó en un codón de stop prematuro en el primer cuarto de la secuencia codificante (p.C181*). Hasta la fecha, se han informado 9 mutaciones únicas en familias no relacionadas con distintos orígenes (Figura A.15). Todos ellos han sido homocigotos y sólo dos pacientes tienen un genotipo heterocigoto compuesto (131, 132). La mayoría de las mutaciones son perjudiciales y conducen a una proteína truncada con pérdida de función. Sin embargo, dos familias albergan mutaciones sin sentido que cambian aminoácidos altamente

conservados; uno alterando la serina en el aminoácido 734 a una leucina (p.S734L) y el otro alterando la prolina en el aminoácido 736 a una histidina (p.P736H) (126, 129).

Hasta la fecha, no existe un patrón claro de correlación genotipo-fenotipo que explique la heterogeneidad clínica del síndrome de Majeed. La mutación S734L anula la actividad PAP de la lipina-2 pero no su actividad como coactivador transcripcional ni su habilidad para asociarse a membranas microsomales (80), lo que indica que la pérdida en la actividad catalítica es suficiente para provocar el síndrome de Majeed.

Debido a la rareza de la enfermedad y a las limitaciones para realizar estudios en humanos aún se desconoce cómo se relaciona la patogénesis de la enfermedad con la función de la lipina-2 y el metabolismo de los glicerolípidos. Los últimos datos obtenidos en humanos han implicado a la IL-1 β en las anomalías óseas del síndrome de Majeed. En 2013 se publicó un estudio en el que, tras el tratamiento con fármacos bloqueantes de la acción de la IL-1 β (Anakinra, un antagonista del receptor de IL-1 y Canakinumab, un anticuerpo contra IL-1 β) de dos pacientes con síndrome de Majeed, se observó una notable mejoría clínica (133). Como se comentó anteriormente, la falta de lipina-2 provoca, ante un estímulo proinflamatorio, una sobreactivación del inflammasoma NLRP3 con el consecuente procesamiento de caspasa-1 y la maduración de pro-IL-1 β a IL-1 β (96). Por lo tanto, la lipina-2 juega un papel clave en la regulación de la producción de IL-1 β y esto explica gran parte de la patología encontrada en pacientes con el síndrome de Majeed.

2. OBJETIVOS

Considerando los antecedentes descritos anteriormente y, puesto que la lipina-2 juega un papel fundamental en el metabolismo lipídico y en la respuesta inmune, el objetivo principal de este trabajo es el análisis lipídico de diferentes sistemas celulares, principalmente macrófagos, carentes de lipina-2.

Este objetivo general puede desglosarse en varios objetivos más específicos:

- Estudiar el lipidoma en línea celular macrofágica en la cual se alteró la expresión génica de lipina-2.
- Estudiar el lipidoma de fibroblastos procedentes de animales carentes de lipina-2 con el fin de comprobar si esta deficiencia afecta de forma diferente a sistemas celulares diferentes.

- Estudiar el lipidoma de macrófagos derivados de médula ósea procedentes de ratones carentes de lipina-2 comparando estos estudios con los obtenidos en la línea celular macrofágica.
- Estudiar cómo afecta la carencia de lipina-2 a la regulación de otras enzimas del metabolismo lipídico.
- Identificar las alteraciones que provoca la falta de lipina-2 en propiedades biológicas de la célula o en diferentes procesos como la remodelación de PUFAs o en la síntesis de Cer durante la activación celular.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Material biológico

La línea celular macrofágica RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) fue comprada en American Type Culture Collection. La línea celular de fibroblastos L-929 fue proporcionada por el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid). Los fibroblastos embrionarios se obtuvieron a partir de ratones C57BL/6N wild type (Wt) y knockout para lipina-2 (KO Lpin2). Los macrófagos derivados de médula ósea de ratón se obtuvieron a partir de ratones C57BL/6N wild type (Wt) y knockout para lipina-2 (KO Lpin2). Se utilizaron ratones machos con edades comprendidas entre los 2 y 3 meses. Los ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura constante (21-24°C), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas 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 (Directiva 2010/63/UE).

3.2. Cultivo y tratamiento de las células RAW264.7

El cultivo de las células RAW 264.7 se llevó a cabo usando como medio DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por choque térmico, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C con una atmosfera húmeda conteniendo un 5 % de CO₂ y el proceso de subcultivo fue llevado a cabo una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente (cada 48 h).

Para realizar silenciamiento génico mediante transfección con siRNA en la línea celular macrofágica RAW 264.7 se empleó el reactivo

comercial Lipofectamine™ RNAiMAX, un reactivo catiónico que forma liposomas y permite la entrada del RNA al interior de la célula. Antes de cada experimento se aseguró que la confluencia fuera de al menos el 85% y que el pase de las células no fuera superior a 7.

En el momento de la transfección se cambió el medio de cultivo por medio Opti-MEM® sin antibiótico. En primer lugar, se preparó una mezcla conteniendo la lipofectamina diluida en medio Opti-MEM® sin antibiótico. Dicha dilución se dejó reposar 5 minutos y posteriormente se añadieron los siRNA. La mezcla se dejó reposar tras una leve agitación, con cuidado para evitar que se rompan los liposomas, hasta transcurridos los 20 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se sembraron 5x 10⁵ células en cada pocillo en placas de 12 pocillos en 500 µL de medio de cultivo DMEM sin antibiótico y sobre los mismos se añadieron 100 µL de la dilución preparada anteriormente de los siRNA con los liposomas gota a gota, logrando una concentración final de siRNA de 20 nM.

Las placas se agitaron levemente y se incubaron overnight. Posteriormente se cambió el medio de cultivo a medio de cultivo con antibiótico dejando las placas en cultivo durante 24 horas más. La extracción del RNA y la comprobación del silenciamiento obtenido se llevó a cabo transcurrido ese tiempo.

Para el silenciamiento génico del gen Lpin2 se usó una secuencia ON-TARGET plus SMART pool (GE Dharmacon). Como control del silenciamiento se usó una secuencia ON-TARGET plus SMART pool (GE Dharmacon), que es una secuencia de siRNA sin genes diana en la célula, referidos como siRNA (-).

3.3. Aislamiento, cultivo e immortalización de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Para la obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) se cruzaron animales heterocigotos para el gen de la lipina-2. Los embriones se aislaron a día 13.5 de desarrollo sacrificando las hembras gestantes por desmédulación previo adormecimiento con CO₂. Se separó la cabeza para determinar el genotipo y se eliminó el vestigio de sistema circulatorio. La obtención de MEFs se llevó a cabo en ratones wild type y KO Lpin2 mediante digestión del tronco y extremidades del embrión con tripsina 0.05% durante 45 min a 37°C, homogeneizando cada 10 min con ayuda de una micropipeta. Transcurrido el tiempo de digestión, se inactivó la tripsina con medio de cultivo (DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y

suero fetal bovino al 10 %). El disgregado se pasó 10 veces por una jeringa con aguja 23 g para asegurar la total digestión y se filtró con un tamiz celular de malla de nylon de 40 μ m de tamaño de poro.

El cultivo de estas células adherentes se llevó a cabo usando como medio DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 0.1 mM de β -mercaptoetanol. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C con una atmosfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂ y el proceso de subcultivo fue llevado a cabo una vez que las células alcanzaron una confluencia del 70 % aproximadamente (cada 48 h).

La immortalización se realizó siguiendo el modelo de obtención de la línea celular 3T3 descrito en 1963 por Todaro & Green (134). Brevemente, se plaquearon las MEFs a razón de 300 000 células en frasco de 25 cm² de superficie y 5 mL de volumen y se hicieron subcultivos cada 3 días manteniendo el número de células y utilizando tripsina como agente de digestión de proteínas de adhesión. Durante el proceso, se utilizó el medio de cultivo indicado anteriormente. La immortalización se consiguió en pase 25.

3.4. Aislamiento y cultivo de macrófagos immortalizados derivados de médula ósea (iBMDM)

Estas células se obtuvieron a partir de ratones wild type y KO Lpin2 de 2 a 3 meses de edad sacrificados por dióxido de carbono y dislocación cervical. Se extrajeron el fémur y la tibia y se aisló la médula ósea como sigue. En primer lugar, se separó fémur y tibia y se extrajo la cabeza del hueso a la altura de la rodilla. Los huesos se introdujeron en tubos de 0.5 mL con un pequeño orificio en el fondo y que contenían 100 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y L-glutamina 2 mM. Posteriormente, se introdujeron los tubos de 0.5 mL en tubos de 1.5 mL para recoger la médula ósea por centrifugación a 3000 x g durante 3 minutos. Después de la centrifugación, se formó un pellet de células en el fondo del tubo de 1.5 ml que contiene los macrófagos derivados de médula ósea.

El cultivo de estas células adherentes una vez immortalizadas se llevó a cabo usando como medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, 10% (v/v) de FBS, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmosfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂ y el proceso de subcultivo fue llevado a cabo una vez que las células alcanzaron

una confluencia del 80 % aproximadamente (cada 48h).

Para el proceso de immortalización de los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) se siguió la técnica basada en la utilización de retrovirus J2 que contienen los oncogenes v-raf y v-myc (135).

Los retrovirus J2 se obtuvieron del medio de cultivo de la línea celular AMJ2-C11 (ATCC CRL-2456). Para ello, las células se cultivaron durante dos días en placas con área de 10 cm² a una densidad de 1x10⁵ células/mL, y en medio DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/mL y suero fetal bovino al 10%. Transcurridos los dos días, se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 150 x g 10 min a temperatura ambiente y se purificó con un filtro de 0.45 μ m de tamaño de poro.

La línea celular fibroblástica L-929 produce y libera grandes cantidades de citoquinas requeridas para la diferenciación macrofágica, como M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos). Dicha citoquina es un factor de crecimiento hematopoyético involucrado en la proliferación, diferenciación y supervivencia de monocitos y macrófagos (136, 137). Para la obtención del sobrenadante de esta línea celular las células se incubaron en una densidad de 0.5x10⁶ en un frasco P75 y 20 mL de DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/mL y suero fetal bovino al 10 %. Tras 7 días de cultivo, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. Posteriormente se purificó con un filtro de 0.22 μ m de tamaño de poro y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El protocolo de immortalización utilizado se basó en el descrito por De Nardo et al. (135) en 2018, con modificaciones. A día 4 de diferenciación, cuando las células están en fase de crecimiento, se procedió a la primera ronda de infección con los retrovirus. Para ello, se combinó un 40 % del medio de cultivo RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/mL y suero fetal bovino al 10 %, con un 50% de sobrenadante obtenido del cultivo de las células AMJ2-C11 y un 10% de sobrenadante L929. Transcurridas 24 horas, se eliminó este medio y se dejaron las células en medio de cultivo completo (RPMI con suero, antibióticos y L-glutamina) durante un día. A día 6 de diferenciación se realizó una segunda infección repitiendo exactamente los pasos realizados en la primera. Cuando se observó crecimiento celular se redujo el porcentaje de sobrenadante L929 contenido en el medio de cultivo. Dicho porcentaje fue reduciéndose a la mitad de

manera gradual cada vez que se reestableció la división celular. El proceso de inmortalización se consideró completo en el momento en el que las células fueron capaces de dividirse sin presencia de sobrenadante L929.

3.5. Tratamientos y estímulos

El tratamiento con los inhibidores de SCD-1 (CAY10566 3 μ M, MF-438 1 μ M) se llevó a cabo añadiendo dichos inhibidores disueltos en DMSO a las células en cultivo, se mantuvieron con este tratamiento en medio con suero durante 24 horas y posteriormente se cambió a medio sin suero durante 1 hora antes de la estimulación con LPS a 200 ng/mL o zimosán a 500 μ g/mL durante 6 horas.

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 con PBS. 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 a 23% de amplitud y se diluyó en medio libre de suero antes de añadirlo a las células.

3.6. Extracción de lípidos de células

Los lípidos totales se extrajeron según el método descrito por Bligh y Dyer (138). Las células se rasparon con H₂O/MeOH 1:1 (v/v), y se añadieron los estándares internos necesarios según qué tipo de lípidos se analicen. 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 H₂O y 1.25 volúmenes de cloroformo. Las muestras se agitaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 5900 x g y a 15 °C para separar las fases. Tras esta centrifugación los lípidos quedaron en la fase inferior (clorofórmica). Dicha fase orgánica se transfirió a un tubo eppendorf y se realizó una segunda extracción añadiendo 2 volúmenes de cloroformo a la fase acuosa. La fase orgánica obtenida en la segunda extracción se combinó con la anterior y se evaporó por centrifugación a vacío obteniendo el extracto lipídico total de las células.

La separación de las diferentes clases de lípidos fue llevada a cabo por cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de sílice como fase estacionaria. Las placas fueron secadas por calor a 70°C durante al menos 1 hora. Para cargar las muestras en las placas cromatográficas, los extractos lipídicos se resuspendieron en 20 μ L de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y en los laterales de las

placas se cargaron patrones insaturados correspondientes a cada especie con el fin de identificarlos mediante su factor de retención al revelar la placa en yodo.

En el caso de separación de lípidos neutros (Figura C.1) (DAG, TAG y CE) se empleó una fase móvil con una mezcla de n-hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (v/v) (139).

En el caso de la separación de las clases de fosfolípidos (Figura C.2) (PC, PE, PS, PI y PA) se utilizaron placas de sílice pretratadas con ácido bórico al 1.8 % (p/v), con un período de secado intermedio y una fase móvil de cloroformo/metanol/hidróxido de amonio al 28 % 65:35:4 (v/v), la cual se pasó dos veces por la TLC. Las zonas donde se encuentran los lípidos de cada muestra se rasparon de la placa. La extracción de los lípidos adsorbidos en la sílice se realizó utilizando 1 mL de cloroformo/metanol 1:2 (v/v) y 1 mL de cloroformo/metanol 2:1 (v/v). En cada extracción se centrifugó a 7080 x g a 15 °C durante 5 minutos recogiendo a un nuevo eppendorf el sobrenadante ignorando la sílice.

3.7. Derivatización de ácidos grasos y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Debido a que los ácidos grasos contenidos en las diferentes clases de lípidos no son lo suficientemente volátiles para ser analizados por cromatografía de gases, es necesaria una etapa previa de derivatización química. Esta derivatización 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 ésteres metílicos (FAMES), que son compuestos más estables y volátiles, con el fin de mejorar su ionización, así como su separación en la columna capilar del cromatógrafo de gases. El protocolo para la separación de los FAMES se adaptó inicialmente de Abu et al. (140) y ha sido optimizando en el laboratorio para una mejor separación de los mismos.

Los extractos lipídicos se disolvieron en 150 μ L de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se transfirieron a tubos de borosilicato. Seguidamente se añadió 1 mL de KOH 0.5 M en metanol anhidro y se dejó reaccionar en baño con agitación a 37 °C durante 1 hora. La reacción se neutralizó con 1 mL de HCl 0.5 M en solución acuosa y los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron con 2 mL de n-hexano tras centrifugar la mezcla a 800 x g durante 5 minutos a 16 °C.

El análisis de los ésteres metílicos se llevó 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 FAMES es un modelo Agilent DB23 (60 m longitud x 0.250 µm diámetro interno, 0.15 µm de espesor de película) cuya fase estacionaria es de (50 %-cianopropil)-metilpolisiloxano.

Se inyectó 1 µL de muestra en modo splitless (sin división de la muestra) y como gas portador se usó helio a una presión constante de 26.1 libra fuerza por pulgada cuadrada (psi). 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 comerciales de FAMES y con los espectros de la biblioteca del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología).

El modo SIM se utilizó para la cuantificación, sirviéndose de los fragmentos 74 y 87 para los FAME 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 empleó una mezcla de 37 componentes de Supelco. El análisis de los datos se realizó con el software Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation.

3.8. Análisis de especies de fosfolípidos y esfingolípidos por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

Mediante esta técnica determinamos de forma semicuantitativa el contenido de especies moleculares de las diferentes clases de PC, PE, PS, PI, PA, PG, bis- monoacilglicerofosfato (BMP) y especies de SL como SM o Cer. El protocolo usado para lograr la separación cromatográfica en fase normal de las diferentes clases de fosfolípidos incluyendo SM se adaptó de Axelsen y Murphy (141). Para el análisis de Cer se utilizó el protocolo descrito por Shaner (142). Para el análisis de eicosanoides se siguió el

procedimiento descrito por Lebrero et al. (143).

Las muestras, conteniendo los estándares internos correspondientes antes de la extracción, se resuspendieron en 100 µL de fase móvil A, que contiene mezcla de isómeros de hexano/2-propanol 30:40 (v/v) y se inyectaron en un cromatógrafo líquido de alta resolución 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 empleada es una FORTIS HILIC (150 × 3 mm, tamaño de partícula de 3 µm) (Fortis Technologies), protegida con un cartucho Supelguard LC-Si (20 mm × 2.1 mm) (Sigma-Aldrich).

La fase móvil empleada consiste en un gradiente de disolvente A (mezcla de isómeros de hexano/2 propanol, 30:40, v/v) y disolvente B (mezcla de isómeros de hexano/2- propanol/20 mM de acetato de amonio en H₂O, 30:40:7, v/v/v).

El gradiente comenzó en 75 % A desde cero hasta 5 min, luego disminuyó del 75 % A al 40 % A Dione los 15 min, del 40 % A al 5 % A Dione 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 muestra.

El flujo a través de la columna se fijó en 400 µL/min y se inyectaron 10 µL 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 operando en modo de ionización negativa (AB Sciex).

Los parámetros de la fuente de ionización se fijaron de la siguiente forma: IS (Voltaje aplicado al spray de ionización) = -4500 V/+5500 V, CUR (Gas cortina) = 20 psi, GS1 (Gas de nebulización) = 35 psi, GS2 (gas de desolvatación) = 65 psi, TEM (temperatura de desolvatación) = 400 °C. Los parámetros analíticos de las clases de PL y SL se fijaron según la siguiente tabla, ya que cambian en función de la cabeza polar:

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. Todos los PL se detectaron como iones [M-H]⁻ excepto para los iones de PC que fueron detectados como el aducto [M+CH₃COO]⁻, en ambos casos en modo MRM asignando transiciones Q1/Q3 con la masa total del fosfolípido y la masa de uno de los ácidos grasos que contiene dicho fosfolípido, respectivamente (Tablas C.2-C-10). 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.

3.9. Inmunodetección de proteínas (Inmunoblot)

Las células se lavaron 2 veces con PBS y se rasparon con 80 μ L de tampón de lisis celular frío. El lisado celular se transfirió a tubos eppendorf que, posteriormente, se dejaron en hielo durante 30 minutos agitando los tubos cada 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 16200 xg durante 10 minutos a 4 °C, recogiendo los sobrenadantes. Se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (144) y se tomó el volumen correspondiente a 50 μ g de proteína total al que se añadió tampón de carga con el fin de igualar el volumen en todas las muestras. Además, se añadió la misma cantidad de buffer Laemmli a todas las muestras y posteriormente se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos en el termobloque antes de cargarlas en los geles de acrilamida.

La electroforesis de los geles se realizó según el método descrito por Laemmli (145). Se usaron geles de acrilamida-bis-acrilamida al 10 o 12% en función del peso molecular de la proteína a estudiar y las muestras se corrieron en tampón de electroforesis aplicando un voltaje constante de 80 V durante los primeros 20 minutos y posteriormente a 120 V durante 90 minutos.

Una vez que las muestras corrieron completamente en el gel, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) usando el tampón de transferencia. El proceso se realizó mediante la aplicación de una intensidad de corriente constante de 300 mA durante 90 minutos y a una temperatura de 4 °C.

Para disminuir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario se incubaron las membranas con una disolución de bloqueo compuesta por 5 % (p/v) de leche deslipidada en PBS. El bloqueo se realizó durante una hora a temperatura ambiente o un overnight a 4 °C, en función de las condiciones que el fabricante recomienda para el anticuerpo que se fuera a utilizar. Posteriormente las membranas se lavaron 2 veces con PBS antes de añadir el anticuerpo primario.

Para la inmunodetección de las proteínas, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una disolución compuesta por 0.5 % (p/v) de leche deslipidada en PBS. La incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente o un overnight a 4 °C, según recomendación del fabricante del anticuerpo.

Seguidamente se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con PBS Tween-20 0.05 % (v/v) para eliminar el exceso de anticuerpo primario no adherido. Tras ello, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario

correspondiente diluido en una disolución compuesta por 0.5 % (p/v) de leche deslipidada en PBS. La incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron de nuevo tres lavados con PBS Tween-20 0.05 % (v/v) para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no adherido.

Se utilizaron anticuerpos producidos en conejo frente a SCD-1 (Cell Signaling y Abcam) (diluidos 1:1000) y anticuerpos producidos en ratón frente a SCD-1 (Santa Cruz) (diluido 1:100) y α -actina (diluido 1:20000). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa frente a las inmunoglobulinas de conejo y ratón (diluidos 1:5000).

Para el revelado de las membranas, se incubaron con la solución de revelado durante 1 minuto y se introdujeron en los cassette con películas de revelado usando distintos tiempos de exposición según la proteína a analizar. Las fotos de las películas se tomaron con el software Quantity One y la densitometría cuantitativa de las bandas de interés se llevó a cabo mediante el software ImageJ, referenciando la proteína respecto a una proteína constitutiva como la β -actina.

3.10. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y análisis de expresión génica por RT-qPCR

La extracción del RNA total de las células se llevó a cabo utilizando el reactivo PRImeZOL™ (Canvax), cuyo método se basa en la distinta solubilidad de los ácidos nucleicos y proteínas entre dos fases inmiscibles.

Para la extracción del RNA, previa retirada del medio de cultivo, se añadió a cada pocillo, en placas de 6 pocillos, 800 μ L de PRImeZOL™ dejando reposar durante 5 minutos la mezcla a temperatura ambiente. El lisado se transfirió a tubos eppendorf asegurándose mediante pipeteo que la disolución es homogénea. A continuación, se añadieron 160 μ L de cloroformo, mezclando ligeramente cada tubo durante 15 segundos. Finalizada la mezcla las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C para separar una capa acuosa superior transparente (que contiene RNA), una interfase y una capa orgánica inferior. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf, en el cual, se precipitó el RNA añadiendo 400 μ L de isopropanol, incubando la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugándola a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75 % (v/v) preparado en agua de grado biología molecular. Se centrifugó a 10000 x g durante

10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante dejando únicamente en el tubo el pellet de RNA. El pellet se secó al aire y se resuspendió en 20-30 µL de agua de grado biología molecular. La concentración de RNA se midió por espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific). Las relaciones 260/280 y 260/230 se utilizaron como indicadores de la pureza del RNA.

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo empleando una enzima de transcripción inversa que transforma una cadena de RNA en una cadena de DNA. En este trabajo se utilizó el kit de síntesis Verso cDNA (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo consistió en los siguientes pasos: a una alícuota de RNA (1000 ng) se le añadió buffer de síntesis, una mezcla de dNTP, cebadores oligo-dT anclados (para transcribir específicamente las cadenas de RNA mensajero o mRNA), un potenciador (que elimina el DNA contaminante), la mezcla de enzimas Verso (que contiene la transcriptasa inversa Verso y un inhibidor de la RNAsa) y agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 1 hora a 42 °C y la reacción se detuvo calentando a 95 °C durante 2 minutos. El cDNA se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Para el análisis de la expresión génica se utilizó la técnica conocida como PCR cuantitativa a tiempo real o RT-qPCR. Esta técnica permite simultáneamente amplificar y cuantificar el producto de la reacción de amplificación del DNA durante el transcurso de la PCR. La cuantificación se realizó determinando el ciclo umbral (CT) que se define como el ciclo de la reacción en el cual la amplificación comienza a ser exponencial.

Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo ABI7500 siguiendo las condiciones detalladas en la Tabla C.11, utilizando el cDNA, obtenido por transcripción reversa como se indica en el penúltimo párrafo, al que se le añadieron los oligonucleótidos directos y reversos (Tabla C.12) y el kit comercial llamado Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR Master Mix que contiene SYBR Green, Taq polimerasa, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato y un tampón de reacción. La realización de una curva de disociación al final de cada PCR permitió detectar la presencia de productos amplificados de forma inespecífica. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y la cuantificación se realizó aplicando el algoritmo $\Delta\Delta CT$ (146), comparando el ciclo umbral del gen en estudio con el de un gen constitutivo de referencia, en este caso Gapdh, para todas las condiciones experimentales representadas.

3.11. Microscopía de fluorescencia

Una vez sembradas las células en los cristales para microscopía en placas de 6 pocillos, se retiró el medio de cultivo y se incubaron con Hoechst 33342 a 20 µM durante 5 minutos para teñir los núcleos. Se realizaron 3 lavados con PBS y posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % en PBS con sacarosa al 3 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la eliminación del medio de fijación, se realizaron 3 lavados con PBS y se procedió a la permeabilización empleando Triton X-100 al 0.1 % (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS y seguidamente se bloquearon las células con suero normal de cabra (NGS) al 10 % durante 1 hora. Tras el bloqueo se lavó con PBS para posteriormente añadir la preparación del anticuerpo primario en PBS con 1 % de NGS, incubando overnight a 4°C. finalizada la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS y se añadió el anticuerpo secundario fluorescente, en este caso se empleó Alexa Fluor 488 Fab en una dilución 1:2000 en PBS con 1 % de NGS durante 1 hora a 4 °C protegiendo la placa de la luz. Pasado ese tiempo se realizaron 3 lavados con PBS y, por último, se montaron los cristales en los portas de microscopía con Gelvatol.

3.12. Medida de la fluidez de membrana por FRAP mediante microscopia confocal

Una vez sembradas y tratadas las células en placas p35 (MatTek) aptas para microscopia confocal, se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 mL de *working solution*, dejando las placas a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS para retirar el exceso de marcaje de membrana plasmática y se añadió a cada pocillo 1 mL de medio HBSS (suplementado con HEPES 25 mM, CaCl₂ 1.3 mM y MgCl₂ 1.3 mM, pH 7.4) templado. Para el análisis de la fluidez de membrana por FRAP, las células se mantuvieron en medio HBSS en todo momento.

Las imágenes fueron tomadas a 37 °C usando un microscopio confocal Leica TCS SP5X (Wetzlar, Alemania), utilizando un objetivo HCX PL APO CS de inmersión en aceite, 63x, 1.4 NA. Para el fotoblanqueo se tomaron tres regiones rectangulares de interés (ROI) de 6 µm² (3×2 µm) en la membrana plasmática. Se utilizó un láser blanco de 488 nm que se fijó al 100% de potencia en un pulso de 1.864 segundos para el blanqueamiento. Se adquirieron 10 imágenes previas al blanqueamiento (pre-bleaching) y 200 imágenes posteriores al blanqueamiento (post-

bleaching) con un 20% de la potencia máxima del láser y a una resolución de 256×256 píxeles y 8 bits en modo full scan a 1.000 Hz cada 0.265 segundos.

El tamaño del pinhole se optimizó a una apertura de 238.8 μm . Se analizaron un mínimo de 8 células por genotipo mediante el software ImageJ. Las mediciones de FRAP se normalizaron de acuerdo con el método descrito por Giakoumakis et al. (147). Los datos resultantes se ajustaron a un modelo de curva exponencial, que permitió calcular la fracción móvil de la membrana plasmática (147–149).

3.13. Medición de proteína

La cantidad de proteína se cuantificó para referir a la misma los valores obtenidos en los análisis lipidómicos. Se recogieron los homogeneizados celulares en MeOH/H₂O y se sonicaron tres veces con una amplitud del 23 % durante 15 segundos en hielo. La proteína se cuantificó mediante el método Bradford (144) utilizando el reactivo 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 $\mu\text{g/mL}$.

3.14. Viabilidad celular

Para el análisis de la viabilidad celular se utilizaron placas de 6 pocillos en las que se plaquéó un número conocido de células que fueron sometidas al tratamiento con distintos inhibidores farmacológicos específicos de SCD-1 durante 24 horas. Pasado ese tiempo se rasparon las células de cada pocillo y se extrajo una alícuota representativa de cada pocillo a la que se le añadió 50 μL de una disolución comercial al 0.4 % de azul de tripano. Posteriormente se procedió al conteo de células vivas (aquellas en las que se observa el núcleo) y células muertas (aquellas teñidas de azul completamente sin núcleo visible) para estimar el porcentaje de viabilidad celular comparando los tratamientos con controles sin tratamientos.

3.15. Presentación de datos y análisis estadístico

Los ácidos grasos se designan de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC del siguiente modo:

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

La nomenclatura utilizada para abreviar las especies individuales de fosfolípidos sigue las recomendaciones realizadas por el consorcio LIPID MAPS. Se indica en primer lugar la clase (PC, PE, PI, PS, PA, etc.) seguida por un paréntesis en donde se indican los ácidos grasos en su forma abreviada. En primer lugar, se indica el ácido graso que se halla en posición sn-1 y después el que se halla en posición sn-2, ambos separados por una barra inclinada. Ejemplo: PC(18:0/20:4) indica la especie 1-estearoil-2-araquidonoil-sn- glicero-3-fosfocolina. Cuando en posición sn-1 no hay un enlace éster, esto se hace notar añadiendo al comienzo del paréntesis O- (si se trata de un enlace éter) o P- (si se trata de un enlace vinil éter). Ejemplos: PC(O-18:0/20:4) indica la especie 1-O-octadecil-2- araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina; PC(P-18:0/20:4) indica la especie 1-O-1'-octadecil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina. En la sección de resultados en la que se muestran los análisis de clases de fosfolípidos por LC-MS la nomenclatura que se sigue, con el fin de simplificar la información en los ejes del gráfico, es abreviada, esto es, para la especie PC(18:1/18:1) se muestra la especie PC (36:2).

En los análisis lipidómicos, los datos analizados por espectrometría de masas se presentaron en forma de masa molar relativizados a la cantidad de proteína de la muestra, manteniéndose similar en todas las muestras de un mismo experimento. En el pie de cada figura se refleja el número de repeticiones de cada experimento, así como las repeticiones de cada muestra dentro del mismo, por lo que los valores que se muestran son media $\pm$ error estándar de la media. Para el análisis estadístico se usó el software SigmaPlot v.11.0 y se realizó la prueba t de Student para muestras no emparejadas considerando diferencias significativas entre datos según el valor del estadístico p (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$). Cuando hay diferencias entre tratamientos las diferencias significativas se marcaron, de la misma forma, atendiendo al valor del estadístico p, pero con # en lugar de *.

3.16. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces con los diferentes tratamientos por triplicado. Los valores mostrados se presentan como la media $\pm$ 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 % (* $p < 0.005$).

4. RESULTADOS

4.1. Influencia de las lipinas en el lipidoma de macrófagos y fibroblastos embrionarios de ratón

El silenciamiento del gen *Lpin2* mediante la técnica de siRNA proporcionó un sistema de estudio en el cual comprobar como la falta de lipina-2 podría alterar el lipidoma de estas células. Se obtuvieron silenciamientos de lipina-2 en torno al 60% (Figura D.1), mientras que la lipina-1 y la lipina-3 se mantuvieron inalteradas.

Se realizó un análisis de ácidos grasos totales por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) y se observaron diferencias significativas en los ácidos grasos 20:3n-9 o ácido Mead y en el 20:5n-3 o EPA. También se observó una tendencia a la acumulación del ácido graso 18:1n-9 o ácido oleico cuando falta lipina-2 (Figura D.2).

Con el fin de determinar en qué fracción lipídica podrían ser más llamativas las diferencias observadas en el perfil completo de ácidos grasos se realizó un análisis detallado de ácidos grasos por GC-MS en las fracciones de PL, DAG, TAG y CE. No obstante, no se observaron diferencias significativas en ninguna de estas especies, aunque si se mantuvieron las tendencias observadas en el perfil de ácidos grasos totales (Figura D.3).

De la misma forma que se realizó en la línea celular macrofágica RAW 264.7 y con el objetivo de comprobar si la falta de lipina-2 puede afectar de forma diferente a un sistema celular distinto, se realizaron análisis lipidómicos en fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (iMEFs) carentes de lipina-2 procedentes de ratones KO en el gen *Lpin2*.

En el estudio de los ácidos grasos totales de iMEFs carentes de lipina-2 (KO *Lpin2*) se observó un elevado contenido en SFAs como el 16:0 y 18:0 o ácido palmítico y esteárico respectivamente, en

ambos genotipos (Figura D.4).

Por otro lado, se observaron diferencias significativas respecto a su genotipo wild type en ácidos grasos como el 16:1n-9, que es mayor en las células wild type o el 18:2n-6, que es mayor en las células KO *Lpin2* (Figura D.4). El ácido graso 16:1n-9 es relevante debido a su actividad antiinflamatoria demostrada en nuestro laboratorio (154). Por otro lado, el ácido graso 18:2n-6 es un ácido graso esencial, precursor de ácidos grasos como el ácido araquidónico, que puede metabolizarse a eicosanoides, moléculas con importante actividad biológica.

Con el objetivo de definir en qué fracción lipídica se encuentran estas pequeñas diferencias observadas en ácidos grasos totales, se procedió al análisis de ácidos grasos en las fracciones de fosfolípidos totales y lípidos neutros por GC-MS (Figura D.5). Se observaron diferencias significativas en la fracción de fosfolípidos totales (Figura D.5A) en los ácidos grasos mencionados anteriormente además del ácido graso 20:3n-9 o ácido Mead. En las fracciones de TAG y CE se observó que el contenido de ácido 18:1n-9 o ácido oleico era menor en las células carentes de lipina-2 (Figura D.5C-D). Mientras que no se observaron diferencias en el contenido de ácidos grasos presentes en DAG ni en los niveles totales de DAG entre ambos genotipos (Figura D.5B), si se observaron diferencias significativas en los niveles totales de TAG, producto directo del DAG, que es menor en las células carentes de lipina-2.

Además de estos estudios, se realizó un análisis más detallado por GC-MS de cada fracción de fosfolípidos por separado. En este caso se observó la misma tendencia observada previamente en la fracción de fosfolípidos totales (Figura D.5A), una disminución en el contenido de las clases de fosfolípidos cuando falta lipina-2 (Figura D.6). En cuanto al PA, sustrato de las lipinas, no se encontraron diferencias significativas cuando falta lipina-2, de la misma forma que se observó con el DAG, que es su producto directo (Figuras D.5B y D.6E).

Continuando el estudio lipidómico en células carentes de lipina-2, se realizó el análisis de lípidos de macrófagos derivados de médula ósea inmortalizados (iBMDM) procedentes de ratones wild type y KO para lipina-2. El proceso de aislamiento e inmortalización de estas células se describe en la sección de Materiales y métodos.

En el perfil de ácidos grasos totales (Figura D.7) se observó un elevado contenido en MUFAs en las células carentes de lipina-2, destacando los ácidos grasos 16:1n-7 y 18:1n-9. Los SFAs permanecieron

inalterados en ambos genotipos, mientras que se observó que las células carentes de lipina-2 poseen, de forma general, un menor contenido en PUFAs tales como el 18:2n-6, el 20:4n-6, el 22:4n-6, el 22:5n-3 y el 22:6n-3.

Los MUFAs 16:1n-7 y 18:1n-9 proceden de la desaturación de los ácidos grasos 16:0 y 18:0, respectivamente, gracias a la acción de la desaturasa estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD-1). Como se mostrará más adelante en este estudio, esta enzima está alterada en células carentes de lipina-2.

Por otro lado, en cuanto a los PUFAs se observó que todos los derivados del ácido graso esencial 18:2n-6, incluido el mismo, estaban disminuidos en las células carentes de lipina-2 (Figura D.7). Este ácido graso puede metabolizarse a través de las desaturasas FADS1 o FADS2 y posteriormente elongarse por elongasas.

Continuando con el estudio lipidómico, de la misma forma que en los otros sistemas celulares, se realizó un análisis de las diferentes fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos totales (Figura D.8).

En este caso, se observaron las mismas diferencias mencionadas anteriormente con respecto al contenido de fosfolípidos totales (Figura D.8A), mientras que en el resto de fracciones no se observaron diferencias significativas en ningún ácido graso ni en el contenido total. Analizando el contenido total de todas las especies de lípidos, se observó que la fracción de fosfolípidos totales supone aproximadamente un 90% del contenido lipídico total de estas células, por lo que es coherente que las diferencias observadas anteriormente (Figura D.9) se mantengan en la fracción de fosfolípidos totales.

4.2. Regulación de la estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD-1) en macrófagos derivados de médula ósea de ratón inmortalizados carentes de lipina-2.

Para explicar las diferencias observadas en MUFAs y PUFAs entre las células wild type y KO Lpin2 se procedió al análisis de la expresión génica de enzimas implicadas en la síntesis de estos ácidos grasos, principalmente de las desaturasas SCD y FADS, de las cuales se conocen 4 y 2 isoformas en ratón, respectivamente. La SCD es una desaturasa con actividad Δ^9 desaturasa, lo que se traduce en la introducción de una insaturación en posición Δ^9 de la cadena hidrocarbonada del ácido graso. La FADS1 tiene actividad

Δ^5 desaturasa mientras que la FADS2 tiene actividad Δ^6 desaturasa. La familia de las FADS es responsable de la síntesis de PUFAs tales como el 20:4n-6 o ácido araquidónico, el 22:6n-3 o ácido docosahexaenoico (DHA), entre otros, derivados de

ácidos grasos esenciales como el 18:2n-6 y el 18:3n-3, respectivamente.

La expresión génica de SCD-1 es aproximadamente 50 veces superior en las células sin lipina-2 que en las wild type (Figura D.10). Puesto que esta enzima genera insaturaciones en posición Δ^9 , este resultado podría explicar las diferencias observadas en los análisis lipidómicos. Por otro lado, también se observó que las células sin lipina-2 tienen aumentada la expresión génica de FADS2, responsable de generar insaturaciones en posición Δ^6 .

Para verificar el resultado observado por expresión génica se procedió al estudio por Western Blot de SCD-1 con el fin de determinar si la sobreexpresión génica observada por RT-qPCR se mantiene a nivel de proteína.

Por desgracia, mediante esta técnica no se pudo demostrar la presencia de SCD-1 en nuestro sistema a pesar de utilizar anticuerpos contra SCD-1 de distintas clases comerciales, ni siquiera tras condiciones de activación celular con LPS (Figura D.11). El único anticuerpo con el que fue detectada SCD-1 pertenece a la casa comercial *Cell Signaling* y esta solo fue detectada en hígado.

Puesto que el análisis por Western Blot no proporcionó resultados en nuestro sistema, decidimos seguir las recomendaciones de la casa comercial Abcam y utilizamos este anticuerpo para detectar SCD-1 mediante inmunofluorescencia. En este caso se observó una mayor cantidad de fluorescencia en las células carentes de lipina-2 en zonas próximas al núcleo (marcado en azul), posiblemente retículo endoplásmico, localización ya descrita para esta enzima (3, 20) (Figura D.12), lo que podría indicar una mayor cantidad de proteína. Estos resultados estarían en concordancia con los datos de expresión génica y con los datos observados en los análisis lipidómicos.

La SCD-1 juega un papel clave en la síntesis de MUFAs y, por tanto, para el mantenimiento de la relación de ácidos grasos saturados/insaturados. Las alteraciones en esta relación pueden tener varias consecuencias a nivel funcional entre las que podemos destacar la fluidez de membrana cuyos resultados se mostrarán posteriormente.

Complementando los datos obtenidos a nivel basal se realizó un estudio lipidómico de ácidos grasos totales tras el tratamiento durante 24 horas con el inhibidor farmacológico específico de SCD-1 CAY10566 (Figura D.13).

En dichos experimentos se observó que tras la inhibición de SCD-1 el contenido de SFAs aumentó considerablemente, mientras que el contenido de MUFAs disminuyó ligeramente.

Además, se observó un pequeño aumento en PUFAs. Como resultado el contenido total de ácidos grasos aumentó en las células tratadas con CAY10566 independientemente de la expresión de lipina-2.

La acumulación de SFAs observada en ambos genotipos tras la inhibición de SCD-1 podría impactar en las respuestas inflamatorias. Por ello, se estudió el efecto del inhibidor CAY10566 en los aumentos de expresión génica de citoquinas proinflamatorias como IL-6, Tnf- α IL-1 β , que promueve el LPS en los macrófagos. Sin embargo, a diferencia de lo que cabría esperar, un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias debido a la acumulación de SFAs por la inhibición de SCD-1, no se observaron cambios significativos en la expresión de dichas citoquinas proinflamatorias (Figura D.14).

Las alteraciones en la fluidez de membrana pueden afectar a parámetros o funciones biológicas como la señalización celular a través de receptores o a la fagocitosis (158, 159). Dado que SCD-1 tiene un papel clave en el mantenimiento de la relación de ácidos grasos saturados/monoinsaturados y, por tanto, en las propiedades biofísicas de las membranas, se procedió al estudio del estado de la fluidez de membrana plasmática por técnicas de microscopia confocal empleando la técnica conocida como FRAP (del inglés, Fluorescence Recovery After Photobleaching), que nos permite estudiar in vivo como se recupera la membrana plasmática de las células tras ser sometida al blanqueo mediante un láser.

Tras analizar las imágenes obtenidas, se observaron diferencias significativas entre las células wild type y KO Lpin2 tanto en la velocidad de recuperación de la fluorescencia de la membrana como en la cantidad de membrana recuperada, también conocida como fracción móvil, siendo mayores ambas en las células carentes de lipina-2 (Figura D.15). Este resultado implica que las moléculas de las membranas de las células carentes de lipina-2 tienen una mayor movilidad, lo que se traduce en una mayor fluidez y, a su vez, está relacionado con el mayor contenido en MUFAs observados en los análisis lipidómicos ya que estos se empaquetan peor que los SFAs generando así mayor movimiento en la membrana plasmática.

El uso diario de estos macrófagos mostró que, de forma continuada, las células carentes de lipina-2 crecían más que las células wild type. Debido a esto, se procedió a realizar un estudio de la viabilidad celular para comprobar si la sobreexpresión de SCD-1 en las células carentes de lipina-2 está relacionada con el aumento observado en la proliferación.

En dicho ensayo, realizado tras inhibir SCD-

1 con CAY10566 o MF-438 durante 24 horas, se observó que las células mueren de manera significativa independientemente de su genotipo (Figura D.16). Las células wild type resultaron ser menos viables que las células carentes de lipina-2 tras la inhibición de SCD-1, por lo que la sobreexpresión de SCD-1 observada en las células KO parece que las está protegiendo de la muerte.

4.3. Movilización de ácido araquidónico en macrófagos derivados de médula ósea de ratón inmortalizados carentes de lipina-2.

Como se observó en los análisis lipidómicos, las células carentes de lipina-2 poseen un menor contenido en PUFAs que se ve compensado por un aumento en el contenido de MUFAs. Este hecho sugirió que en las células deficientes en lipina-2 podría estar alterado el mecanismo de movilización o la remodelación de estos PUFAs en el que están implicadas las fosfolipasas A₂ (PLA₂s), por lo que se procedió al análisis por GC-MS de la pérdida de ácido araquidónico tras activación celular con LPS o zimosán. En estos ensayos se consideró que ambos genotipos parten del mismo contenido inicial de ácido araquidónico, llamándola 100% para observar la variación a lo largo del tiempo de 0 a 24 horas de forma más adecuada, aunque como ya se mencionó anteriormente el contenido inicial es menor en las células que carecen de lipina-2.

En los análisis se observó una mayor liberación de ácido araquidónico en las células wild type que en las KO Lpin2 cuando se activan las células con zimosán (Figura D.17B). Con LPS como estímulo apenas se observaron diferencias entre ambos genotipos (Figura D.17A). Como se observa en la gráfica la mayor liberación se produce a tiempos cortos, entre 2 y 8 horas. Con estos resultados podemos observar que el mecanismo de movilización o liberación de ácido araquidónico por parte de las fosfolipasas A₂ está alterado de alguna forma en las células carentes de lipina-2 cuando son activadas con zimosán, pero esto no ocurre al activarlas con LPS.

4.4. Análisis de clases de glicerofosfolípidos y esfingolípidos por LC-MS en macrófagos derivados de médula ósea de ratón inmortalizados carentes de lipina-2.

Con el fin de determinar qué clases de fosfolípidos en concreto son las responsables de las diferencias observadas entre genotipos en la fracción de fosfolípidos totales analizada por GC-MS, se procedió al análisis por LC-MS de todas las clases de

PL, así como de SL presentes en estas células.

El estudio comparativo de la composición de especies de PL y SL entre las células wild type y las células carentes de lipina-2 (Figuras D.18-D.20) demostró que existen alteraciones entre ambos genotipos. De forma general, se observa una disminución en especies de PC, PA, PG y SM y aumentos en especies de Cer principalmente. El resto de especies como los PE, el PI, la PS y el BMP permanecieron inalterados en cuanto a su contenido total en ambos genotipos, por lo que no se pudo determinar qué especie concreta es la responsable de los aumentos y disminuciones observados por GC-MS en MUFAs y PUFAs, respectivamente. Las diferencias significativas en estos perfiles fueron observadas principalmente en especies que contienen MUFAs como el 16:1 y el 18:1, presumiblemente ácido palmitoleico (16:1n-7) y ácido oleico (18:1n-9), respectivamente, y en PUFAs como 18:2, 20:4 y 22:4 lo que está en consonancia con el perfil de ácidos grasos totales y de fosfolípidos totales observados mediante GC-MS (Figuras D.7 y D.8A).

En cuanto al perfil de SL cabe destacar las diferencias observadas de forma basal entre ambos genotipos siendo menor el contenido de SM y mayor el contenido de Cer cuando falta lipina-2 (Figura D.20) por lo que parece que la biosíntesis de estas clases de SL está alterada como consecuencia de la falta de lipina-2.

4.5, La falta de lipina-2 provoca cambios en la síntesis de ceramidas tras activación celular.

Como se mostró anteriormente, a nivel basal observamos un mayor contenido de Cer en las células KO Lpin2 que en las wild type (Figura D.20B), por lo que nos planteamos como la falta de lipina-2 podría estar afectando a la ruta sintética de Cer. Puesto que, según la literatura (203), la ruta de síntesis de Cer se activa tras una infección, se comprobó cómo afecta a los perfiles de Cer el tratamiento con LPS o zimosán.

En las células wild type, tras el tratamiento con LPS o zimosán se observó un incremento en el contenido total de Cer, más relevante al tratar las células con LPS que con zimosán (Figuras D.21 y D.22). Este resultado era lo esperado ya que coincidió con lo descrito en la literatura. Sin embargo, en las células carentes de lipina-2, tras la activación con LPS o zimosán, no solo no se observó un aumento en el contenido total, sino que, los niveles fueron disminuidos respecto a las células KO Lpin2 control por lo que se concluyó que en algún punto de la ruta de síntesis de Cer la falta de lipina-2 está generando problemas que provocan una menor

capacidad de síntesis o una mayor degradación de las mismas bajo condiciones de activación celular.

5. DISCUSION

5.1. El silenciamiento génico de Lpin2 no es suficiente como para alterar el perfil lipídico de macrófagos RAW 264.7.

La lipina-2 juega un papel clave en la regulación de lípidos bioactivos como PA y el DAG. La desregulación de estos lípidos puede llevar a alteraciones en diferentes rutas de señalización en los que éstos están implicados directamente.

El estudio lipidómico en la línea celular macrofágica RAW 264.7 demostró que el silenciamiento obtenido mediante la técnica de siRNA no es suficiente como para alterar el metabolismo de lípidos ya que apenas se observaron cambios significativos en el contenido de ácidos grasos totales ni en el contenido de lípidos neutros y fosfolípidos analizados por GC-MS. Esto puede deberse a varias razones, en primer lugar, es posible que el silenciamiento de lipina-2 obtenido (en torno al 60 %) (Figura D.1). Por otro lado, el análisis de la expresión génica de los otros miembros de la familia de las lipinas (lipina-1 y lipina-3) demostró que la expresión de mRNA de estos genes es similar a la de los controles. Sin embargo, es posible que el silenciamiento de lipina-2 provoque una mayor traducción a nivel proteico de lipina-1 o lipina-3, existiendo, de esta forma, una compensación a la falta provocada por el silenciamiento génico de Lpin2.

En el perfil de ácidos grasos totales (Figura D.2) podemos observar que existen ciertas tendencias como la acumulación de MUFAs, tales como el 16:1n-7 y el 18:1n-9. Estas tendencias observadas no son significativas, sin embargo, es posible que se deba a que el silenciamiento de lipina-2 no es completo. Como se discutirá más adelante, en macrófagos derivados de médula ósea en los cuales la lipina-2 no está presente, estas tendencias observadas en los macrófagos RAW 264.7 sí son significativas y parecen tener sentido biológico.

Por otro lado, observamos que los PUFAs como el 20:3n-9 o ácido Mead y el 20:5n-3 o EPA están ligeramente aumentados en las células silenciadas para lipina-2. Al tratarse de una línea celular, el contenido en PUFAs es bajo en comparación con células primarias y estos PUFAs como el EPA o el ácido Mead, junto a un mayor contenido de MUFAs, compensan esta carencia en el resto de PUFAs. La síntesis y acumulación de ácido Mead está relacionado con una deficiencia en ácidos grasos esenciales como el 18:2n-6 o 18:3n-3 y en sus

derivados (150). Se conocen dos rutas de síntesis de este ácido graso, ambas a través de elongaciones y desaturaciones por parte de elongasas y desaturasas, respectivamente. Resulta interesante que ambas rutas parten del mismo punto, que es el ácido oleico, el cual está ligeramente aumentado en las células silenciadas para lipina-2 de la misma forma que ocurre con el ácido Mead por lo que, parece ser que la reducción de la expresión génica de lipina-2 parece estar implicada en la regulación de los niveles de estos dos ácidos grasos con el fin de evitar una desregulación lipídica que pueda generar otro tipo de alteraciones en la célula.

En cuanto al análisis de lípidos neutros (Figura D.3), es lógico pensar que habría una disminución del contenido total de DAG debido a que falta lipina-2, sin embargo, no se observaron cambios significativos con respecto a los controles. Por otro lado, en el TAG, que es subproducto directo del DAG, también sería lógico pensar que habría una disminución en su contenido total cuando hay menos lipina-2 y de la misma forma, tampoco se observaron estos cambios. Este hecho probablemente se deba a lo ya mencionado anteriormente, y es, que un silenciamiento génico del 60 % no es apropiado para ver cambios a nivel lipídico.

5.2. La falta de lipina-2 en fibroblastos embrionarios de ratón provoca una disminución en la capacidad de síntesis de algunos glicerosfolípidos.

El análisis lipidómico en iMEFs carentes de lipina-2 demostró que a nivel basal la carencia de lipina-2 no parece afectar al perfil lipídico de forma importante. En el perfil total de ácidos grasos totales (Figura D.4), las diferencias entre ambos genotipos se dan exclusivamente en algunos ácidos grasos como el 16:1n-9 o en el 18:2n-6. El ácido graso 16:1n-9 proviene de la α -oxidación de ácido oleico en la mitocondria mientras que el 18:2n-6 es un ácido graso esencial, precursor de la familia de ácidos grasos n-6 como el ácido araquidónico.

Se ha demostrado que la administración de ácido hipogeico (16:1n-9) o su isómero más común, el ácido palmitoleico, provee a las células un importante carácter antiinflamatorio, contrarrestando los efectos de varios agonistas proinflamatorios como LPS o zimósán (151-154). En este caso, no se ha podido demostrar el por qué los fibroblastos carentes de lipina-2 poseen un menor contenido de este ácido graso ya que no fueron sometidos a activación celular y, por tanto, se desconoce si a nivel basal esta diferencia puede tener importancia biológica. No obstante, sería interesante realizar el estudio lipidómico tras activación celular en este sistema para

comprobar si el perfil de estos ácidos grasos es diferente debido a la falta de lipina-2 y poder confirmar así el papel antiinflamatorio de los mismos descrito en otros sistemas.

En cuanto al perfil de especies de lípidos neutros se observó que el contenido en TAG (Figura D.5C) es menor en las células carentes de lipina-2 mientras que el contenido de DAG, producto directo de la lipina al actuar sobre el PA, permaneció inalterado (Figura D.5B), por lo que se concluye que el menor contenido en TAG está directamente relacionado con la carencia de lipina-2.

El análisis por clases de fosfolípidos (Figura D.6) proporcionó resultados similares a los observados en la fracción total de fosfolípidos (Figura D.5A), es decir, de forma general, un menor contenido de las clases analizadas en las células que carecen de lipina-2. Por otro lado, el PA, de la misma forma que ocurrió con el diaciglicerol, permaneció inalterado entre ambos genotipos (Figura D.6E).

Es probable que las diferencias en DAG y PA no fueron observadas debido a que son dos lípidos cuyos niveles deben estar regulados de forma muy estricta en la célula debido a que su desregulación puede tener graves consecuencias en la homeostasis y señalización de la célula. Sin embargo, las diferencias se observaron en los productos directos del DAG, que son el TAG y PL como PC, PE o PS, por lo que los resultados obtenidos en este apartado son coherentes.

5.3. La falta de lipina-2 en macrófagos derivados de médula ósea inmortalizados aumenta la composición total de ácidos grasos monoinsaturados.

El estudio lipidómico en iBMDMs demostró que existen alteraciones en el perfil de ácidos grasos totales (Figura D.7), principalmente debido a la fracción de fosfolípidos (Figura D.8A), cuando falta lipina-2. Las diferencias significativas más importantes se observaron en MUFAs y en PUFAs, que están aumentados o disminuidos, respectivamente, cuando falta lipina-2, mientras que los SFAs permanecieron inalterados en ambos genotipos.

En cuanto a los MUFAs destacan el ácido palmitoleico y el ácido oleico cuyos niveles están aumentados cuando falta lipina-2. Ambos ácidos grasos son derivados de la desaturación en posición $\Delta 9$ llevada a cabo por la estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD-1) del ácido palmítico y del ácido esteárico, respectivamente.

Los PUFAs, por su parte, están disminuidos cuando falta lipina-2. En este caso destacan principalmente los derivados de los ácidos grasos esenciales ácido linoleico y ácido α -linolénico, que

dan lugar a las grandes familias de PUFAs de las series n-6 y n-3, respectivamente. Cabe destacar que, en este tipo celular, de la misma forma que ocurrió en la línea celular macrofágica RAW 264.7, el ácido Mead (20:3n-9) está aumentado en las células carentes de lipina-2. Es posible que, en estas células, tal y como indica la literatura (150), exista una compensación por falta de ácidos grasos esenciales, aunque también puede deberse al elevado contenido de ácido oleico presente en las células cuando falta lipina-2 ya que las rutas de síntesis descritas hasta la fecha para el ácido Mead parten de este ácido graso.

Resulta muy interesante como en las células carentes de lipina-2 se esté compensando el número total de insaturaciones, disminuyendo el contenido de PUFAs debido a su elevado contenido de MUFAs. Este hecho dirige la atención a la SCD-1, la cual, parece estar ejerciendo un papel clave en el mantenimiento de la relación saturados/insaturados en las células carentes de lipina-2 con el fin de proteger a la célula de alteraciones en las propiedades biofísicas de su membrana.

En cuanto al análisis de lípidos neutros, no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos. Sin embargo, cabe destacar que sí se observó una tendencia a un menor contenido de DAG en las células carentes de lipina-2 (Figura D.8B), lo cual es lógico ya que, al no existir lipina-2, es probable que estas células tengan dificultad en transformar el PA a DAG. Es posible que esta tendencia no sea significativa debido a que la lipina-1 puede estar compensando la carencia de lipina-2. Por otro lado, también fue de interés la tendencia observada en CE (Figura D.8D), ya que resultados publicados en nuestro laboratorio han demostrado que estas células carentes de lipina-2 presentan una síntesis de colesterol reducida en comparación a las wild type (96), por lo que está en consonancia con la tendencia observada.

5.4. Regulación de la estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD-1) en macrófagos derivados de médula ósea inmortalizados carentes de lipina-2.

Los estudios realizados en relación a la expresión de SCD-1 en iBMDMs, tanto por análisis de la expresión génica por qPCR-RT (Figura D.10) como por inmunofluorescencia (Figura D.12), demostraron que la falta de lipina-2 provoca cambios en el metabolismo lipídico alterando los niveles de expresión génica de otras proteínas del metabolismo lipídico como la SCD-1, en concreto aumentando la expresión de la misma.

Esta sobreexpresión está directamente relacionada con lo obtenido en los análisis

lipidómicos en los cuales observamos mayores niveles de MUFAs cuando falta lipina-2 por lo que es posible que lipina-2 está regulando la expresión de otras enzimas del metabolismo lipídico como la SCD-1.

La inhibición de SCD-1 generó un incremento significativo en los niveles de SFAs y una reducción en los niveles de MUFAs además de un ligero incremento en los niveles de PUFAs (Figura D.13). Al inhibir SCD-1 las diferencias significativas que se observaban entre ambos genotipos desaparecen, aumentando el contenido total de ácidos grasos presente en las células debido principalmente a la acumulación de SFAs.

La acumulación de SFAs dentro de la célula puede llegar a ser nocivo para la misma y, de hecho, se sabe que los SFAs mimetizan el comportamiento del LPS bacteriano desencadenando una respuesta inflamatoria vía TLR4 (155-157). Este hecho nos llevó al estudio de algunas citoquinas proinflamatorias clásicas como IL-1 β , IL-6 y Tnf- α tras la inhibición de SCD-1 y activación con LPS (Figura D.14). En estos análisis, se comprobó que el tratamiento con CAY10566, a pesar de aumentar el contenido de SFAs dentro de la célula, no alteraba la expresión génica de estas citoquinas.

Durante el tratamiento con LPS, se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos, independientemente del tratamiento con el inhibidor de SCD-1. En cuanto a la producción de IL-6, la inhibición de SCD-1 aumenta la expresión de dicha citoquina en el genotipo wild type mientras que ocurre lo contrario para las KO Lpin2. En este sentido sería conveniente realizar análisis de liberación de citoquinas en sobrenadantes mediante la técnica ELISA ya que confirmarían si la inhibición de esta enzima tiene como consecuencia la liberación de estos factores inflamatorios al medio extracelular.

Por otro lado, el análisis de la fluidez de la membrana mediante FRAP (Figura D.15) confirmó que la diferencia en la relación de ácidos grasos saturados/insaturados observada de forma basal entre ambos genotipos en los análisis lipidómicos afecta a las propiedades biofísicas de la membrana, haciéndola más fluida en las células carentes de lipina-2 probablemente debido al mayor contenido de MUFAs, cuya estructura química provoca un menor empaquetamiento, facilitando así una membrana más fluida. Dicha membrana se recuperó de forma más efectiva y rápida que la membrana de las células wild type. Además de la fluidez de la membrana plasmática, las alteraciones en la relación ácidos grasos saturados/insaturados puede afectar a otras características relacionadas con la membrana plasmática como los procesos de fagocitosis (158,

159) o el ensamble de las balsas lipídicas o lipid rafts y la señalización a través de las mismas (160).

Por último, el estudio de la viabilidad celular tras la inhibición de SCD-1 con distintos inhibidores farmacológicos específicos como CAY10566 o MF-438 demostraron que las células wild type son menos viables que las células carentes de lipina-2 (Figura D.16). Es probable que la mayor viabilidad observada en las células carentes de lipina-2 se deba a la sobreexpresión de SCD-1 que poseen, aunque esto no se ha demostrado aún.

En la literatura se ha relacionado la sobreexpresión de SCD-1 con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer y se ha establecido como posible diana terapéutica para evitar proliferación de células cancerígenas, el crecimiento de tumores y metástasis (161-164). Por otra parte, un elevado contenido en MUFAs, como consecuencia de unos niveles altos de SCD-1, está relacionado con un menor contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la membrana plasmática y con una protección ante la muerte celular por ferroptosis (165), en la que intervienen PUFAs susceptibles a peroxidación.

5.5. El zimósán afecta en mayor medida que el LPS a la movilización de ácido araquidónico a las células carentes de lipina-2.

Debido a la importancia del ácido araquidónico, sus niveles dentro de la célula están altamente regulados por dos rutas. En condiciones basales, este ácido graso se encuentra principalmente esterificado en la posición sn-2 de fosfolípidos de membrana como PC, PE o PI. Por el contrario, bajo condiciones de activación celular, se fomenta la hidrólisis de fosfolípidos liberando este ácido graso, generando una elevada concentración de ácido araquidónico libre, que es parcialmente metabolizado en eicosanoides (166-168).

El ciclo de Lands consiste en la desacilación del ácido araquidónico de los fosfolípidos llevada a cabo por las PLA2s seguida de un proceso de reacilación llevado a cabo por la acil-CoA sintetasa (ACS) y aciltransferasas (169-173). Esta ruta de esterificación de ácido araquidónico se define como una ruta de alta afinidad y baja capacidad ya que opera cuando las concentraciones de este ácido graso son bajas en la célula.

Otra ruta que regula la concentración intracelular de ácido araquidónico es la biosíntesis de novo de fosfolípidos, se da cuando los niveles de ácido araquidónico libre son elevados en la célula y su entrada mediante el ciclo de Lands está saturada (174-176). Se trata de una ruta de baja afinidad y alta

capacidad. En esta ruta, el ácido araquidónico libre se convierte en araquidonil-CoA (AA-CoA), por acción de la ACS, que se esterifica en moléculas de glicerol-3-fosfato por acción secuencial de la glicerol-3-fosfato- aciltransferasa (GPAT) y la ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT), generando PA. A partir de este PA pueden sintetizarse otros fosfolípidos (Figura A.3). Un marcador de esta ruta es la aparición de diaraquidonil-PC o diaraquidonil-PI, es decir, PC o PI que contienen dos cadenas de ácido araquidónico. Este tipo de especies únicamente está presente cuando se da esta ruta, mientras que si la ruta mayoritaria es el ciclo de Lands estas no se observan.

El zimósán es un homogeneizado de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (177) y es el modelo de estudio más usado en los últimos años para generar una respuesta inmune a infecciones fúngicas, así como para estudiar la producción u liberación de citoquinas proinflamatorias (178-180). Además, es uno de los estímulos más empleados para el estudio de los mecanismos de movilización de ácido araquidónico en célula fagocítica (181, 182). El zimósán interacciona con diversos receptores entre los que se incluyen receptores scavenger, receptores tipo Toll como TLR2 o TLR6, lectinas de tipo C como dectina-1, lo que genera una señal proinflamatoria. (180, 183).

En la literatura se ha demostrado que el receptor dectina-1 es el responsable de activar fosfolipasas A₂ implicadas en la movilización de ácido araquidónico en macrófagos estimulados con zimósán (184, 185). Esto se debe a que se generan aumentos en la concentración intracelular de Ca²⁺ y se activa la ruta de las MAP quinasas (MAPK) (186, 187) que fosforilan cPLA₂α fomentando la movilización de ácido araquidónico.

El LPS es uno de los componentes bacterianos inmunoestimuladores mejor estudiados, pueden inducir inflamación sistémica y sepsis si la exposición al mismo es excesiva (188). Es el componente estructural más importante de la membrana externa de las bacterias gram-negativas y consta de tres partes: el lípido A, un núcleo de oligosacárido y una cadena lateral O (189-192). Durante la activación celular, el LPS interacciona con diferentes proteínas entre las que se incluyen la proteína de unión a LPS (LBP), CD-14, MD-2 y TLR4 generando en última instancia la activación de quinasas como MAPK y factores de transcripción como AP-1, NF-κB o IRF3. La activación de TLR4 por LPS resulta, por tanto, en la producción de genes proinflamatorios entre los que destacan los que codifican para citoquinas proinflamatorias como IL-

1 β , IL-6 o Tnf- α .

En los iBMDMs, al tratarse de una línea celular, los niveles de ácido araquidónico no son muy elevados. A pesar de ello, se quiso comprobar como la falta de lipina-2 podría afectar a la movilización o liberación de este ácido graso tras la activación celular con diferentes estímulos como LPS o zimosán, que actúan a través de diferentes rutas de señalización como se ha indicado previamente.

Los análisis por GC-MS demostraron una menor liberación de ácido araquidónico en las células carentes de lipina-2 respecto a las wild type tras activar las células con zimosán (Figura D.17B), aunque este efecto no se observó tras la activación con LPS. Este hecho confirma nuestra hipótesis de que la carencia de lipina-2 afecta a la movilización de este ácido graso modulando de cierta forma la señalización celular generada por el zimosán a tiempos cortos (entre 2 y 8 horas) mientras que la ruta de señalización por LPS parece inalterada o al menos no parece afectar a la activación de cPLA₂ α , ya que no se observaron cambios entre ambos genotipos en la liberación de ácido araquidónico cuando usamos este estímulo.

5.6. La falta de lipina-2 en macrófagos derivados de médula ósea inmortalizados provoca cambios en la composición de glicerofosfolípidos y esfingolípidos.

El análisis de clases de PL y SL por LC-MS se realizó para verificar, de forma complementaria al estudio realizado por GC-MS, que existen diferencias significativas en especies que contienen MUFAs cuando falta lipina-2 debido a una sobreexpresión de SCD-1.

En dichos análisis se demostró que las principales diferencias observadas entre ambos genotipos se encuentran en especies que contienen ácido palmitoleico y ácido oleico (Figura D.18). En PE, estas diferencias están compensadas ya que los niveles de algunas especies con estos ácidos grasos son mayores y en otros casos son menores cuando falta lipina-2. Por otro lado, observamos que el pequeño contenido de PUFAs presente en esta línea celular se concentre en PE mientras que en PC no se detectaron especies con estos ácidos grasos o eran minoritarias, con excepción de la especie PC (18:0/18:2).

Pese a lo esperado, se encontró que los niveles de PA están disminuidos en las células carentes de lipina-2. Este efecto se debe a una disminución del contenido en especies que contienen SFAs como el ácido palmítico (16:0) o ácido esteárico (18:0). Este hecho se podría explicar posiblemente por una compensación por parte de

lipina-1 aunque sería necesario realizar ensayos de actividad PAP o análisis de expresión de lipina-1 por Western Blot para verificarlo. Por otro lado, el PG también se ve disminuido en las células carentes de lipina-2 y esto, junto al menor contenido de PA, puede deberse a que las células carentes de lipina-2 están destinando el PA y el PG para la síntesis de CL (Figura A.3). Además, debido a que los niveles de DAG en las células carentes de lipina-2 tienden a ser menores, parece lógico pensar que tanto el PA como el PG están siendo metabolizados a CL. Este PL es el componente principal de la membrana mitocondrial interna (193-195) y es clave en el mantenimiento y correcto funcionamiento de las crestas mitocondriales. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que las células carentes de lipina-2 presentan un daño mitocondrial importante, afectando a la respiración de estas células y por tanto a la generación de energía. Por otra parte, también sabemos que la composición de CL es diferente entre ambos genotipos, lo cual parece coincidir con lo mencionado, aunque aún es necesario profundizar más en dicho estudio.

El análisis de SL por LC-MS proporcionó información acerca de cómo la falta de lipina-2 puede estar afectando a la biosíntesis de este tipo de lípidos. Los SL son componentes muy importantes en las células eucariotas y muchos de ellos funcionan como moléculas señalizadoras. En concreto, las Cer juegan un papel clave en muchas respuestas celulares como regulación del crecimiento celular, viabilidad, diferenciación y senescencia (196). La formación de Cer puede ser inducida a través de diferentes estímulos como Tnf- α (197), ésteres de forbol (198), estrés oxidativo (199) o quimioterapéuticos (200). Existen varias rutas que conducen a la síntesis de Cer (Figura A.4). Por un lado, la síntesis de novo a partir de serina y palmitoil-CoA (100); por otro lado, existe otra vía que consiste en la hidrólisis de SM por acción de las esfingomielinasas neutra o ácida (201) y, por último, otra vía que consiste en el catabolismo de SL más complejos que generan esfingosina que es reaclada para generar Cer (202).

En iBMDM a nivel basal observamos que el contenido de SM es menor mientras que el de Cer es mayor cuando falta lipina-2 (Figura D.20) por lo que es posible que el defecto de esta enzima este asociado a una sobreactivación de alguna esfingomielinasa que está hidrolizando SM para generar Cer. En este apartado resultaría muy interesante realizar, en el futuro, un análisis de expresión génica o proteica de las enzimas implicadas en la biosíntesis de SL y en concreto de las esfingomielinasas en estas células carentes de lipina-2 ya que, de existir alteraciones en dichas proteínas, se explicarían estos resultados

observados por LC-MS.

5.7. La falta de lipina-2 en macrófagos derivados de médula ósea immortalizados altera la síntesis de ceramidas tras activación celular.

De forma basal en iBMDM carentes de lipina-2 observamos un mayor contenido de Cer totales a expensas de una disminución en el contenido de SM (Figura D.20). Debido a este hecho, resultó interesante comprobar que ocurría tras activar las células con dos estímulos que señalizan por vías diferentes como el LPS o el zimosán. En la literatura está descrito que el LPS o cualquier estímulo relacionado con la activación celular vía TLR4 (203), promueve la síntesis de ácidos grasos a partir de intermediarios no lipídicos, principalmente a partir de glucólisis, lo que en última instancia lleva a la síntesis de novo de SL, en concreto de Cer (Figura A.4).

En este caso, tras la activación con LPS las células wild type mostraron un comportamiento normal como el ya descrito en la literatura, es decir, un incremento significativo en el contenido total de Cer tras la activación. Sin embargo, esto no ocurrió con las células carentes de lipina-2 ya que no se observaron aumentos en la producción de Cer, más bien, los niveles se mantuvieron por debajo o similares a los controles (Figura D.21).

Por otro lado, el tratamiento de las células con zimosán no produjo aumentos en el contenido total de Cer. En cuanto a las células carentes de lipina-2 se observó una reducción significativa en el contenido total de Cer, más acusado que en el tratamiento con LPS (Figura D.22).

No es trivial comprender por qué cada estímulo afecta de forma diferente a estas células, aunque lo más lógico es pensar que esto ocurre debido a las diferencias en las cascadas de señalización activadas por cada estímulo. Por otra parte, mientras que las células wild type parecen responder de forma adecuada a los estímulos aumentando la producción de Cer como está descrito, al menos con LPS, las células carentes de lipina-2 parecen tener un defecto asociado a la falta de dicha enzima que impide que produzcan más cantidad de Cer. Este hecho probablemente está asociado al mayor contenido de Cer totales que presenta este genotipo de forma basal.

Sin embargo, en este último apartado del trabajo se recogen estudios preliminares y es necesario profundizar mucho más en el metabolismo de SL tras activación celular para comprender que enzimas pueden estar alteradas (ceramida sintasa, esfingomielinasa ácida, etc.) y dar una posible

explicación a los datos observados. Esto permitirá establecer interconexiones entre otras enzimas del metabolismo lipídico y la lipina-2, además de explicar resultados previos como las diferencias observadas en la fluidez de membrana, que está directamente relacionada con el contenido de SL, y otros funcionales relacionados como el ensamble de balsas lipídicas (lipid rafts) implicadas en la señalización e internalización de algunos receptores de membrana como TLR4 (203-205).

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se han efectuado las siguientes conclusiones:

- El silenciamiento génico mediante siRNA en la línea celular macrofágica RAW 264.7 no es suficiente como para alterar el perfil lipídico de esta línea celular.
- La falta de lipina-2 en fibroblastos embrionarios de ratón provoca una síntesis atenuada de PL y de TAG, aunque el sustrato y el producto de la lipina, es decir, el PA y el DAG, permanecieron inalterados.
- La falta de lipina-2 en macrófagos derivados de médula ósea de ratón immortalizados provoca cambios en el contenido de MUFAs y PUFAs.
- Los cambios asociados a los MUFAs observados en las células carentes de lipina-2 están relacionados con la sobreexpresión de la esteroil-CoA desaturasa 1, observada tanto por expresión génica como por inmunofluorescencia.
- La inhibición farmacológica con inhibidores específicos de SCD-1 provoca la desaparición de las diferencias significativas que se observan en los MUFAs de los controles entre ambos genotipos y un aumento en el contenido total de ácidos grasos debido a un incremento en el contenido de SFAs.
- La inhibición farmacológica con inhibidores específicos de SCD-1, a pesar de generar elevados niveles de SFAs dentro de la célula, no altera la expresión génica de citoquinas proinflamatorias como IL-6, $\text{Tnf-}\alpha$ e IL-1 β independientemente de la expresión de lipina-2.
- El análisis de la fluidez de la membrana mediante FRAP por microscopia confocal reveló que las

- células carentes de lipina-2 poseen una membrana plasmática más fluida debido, posiblemente, al mayor contenido en MUFAs que se empaquetan peor y generan una estructura más móvil.
- La inhibición farmacológica con inhibidores específicos de SCD-1 disminuye la viabilidad celular, con un impacto menor en las células carentes de lipina-2.
 - La movilización de ácido araquidónico tras activación celular con zimosán es menor en células carentes de lipina-2. El LPS, al señalar por otra vía diferente, no afecta a esta movilización.
 - En macrófagos derivados de médula ósea de ratón immortalizados carentes de lipina-2 los niveles de PC, PA, PG y SM son menores y los niveles de ceramidas son mayores.
 - Algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de SL parecen estar alteradas cuando falta lipina-2. La activación celular con LPS en macrófagos derivados de médula ósea de ratón immortalizados carentes de lipina-2 no fomenta la síntesis de Cer, mientras que en las células wild type sí.
- Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León.*

REFERENCES

1. Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil SJ. 1995. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8695-8699.
2. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Takahashi A, Yato S, Sone H, Ishibashi S, Yamada N. 2002. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res* 43: 911- 920.
3. Enoch HG, Catalá A, Strittmatter P. 1976. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* 251: 5095-5103.
4. Nakamura MT, Nara TY. 2003. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68: 145-150.
5. Lehner R, Kuksis A. 1996. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 35: 169- 201.
6. Caviglia J.M, de Gomez Dumm I.N, Coleman R.A, Igal R.A. 2004. Phosphatidylcholine deficiency upregulates enzymes of triacylglycerol metabolism in CHO cells. *J Lipid Res* 45: 1500-1509.
7. Bell RM, Coleman RA. Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. 1980. *Annu Rev Biochem* 49: 459-487.
8. Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV Jr. 1998. Identification of a gene encoding an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13018-13023.
9. Cases S, Stone SJ, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal KD, Voelker T, Farese RV Jr. 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 276: 38870-38876.
10. Pelech SL, Vance DE. 1984. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 779: 217-251.
11. Tijburg LB, Geelen MJ, van Golde LM. 1989. Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim Biophys Acta* 1004: 1-19.
12. Jackowski S, Fagone P. 2005. CTP: Phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *J Biol Chem* 280: 853-856.
13. Kent C. 1997. CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1348: 79-90.
14. Clement JM, Kent C. 1999. CTP:phosphocholine cytidyltransferase: insights into regulatory mechanisms and novel functions. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 643-650.
15. Friesen JA, Campbell HA, Kent C. 1999. Enzymatic and cellular characterization of a catalytic fragment of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha. *J Biol Chem* 274: 13384-13389.
16. Vance JE. 1998. Eukaryotic lipid-biosynthetic enzymes: the same but not the same. *Trends Biochem Sci* 23: 423-428.
17. Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp*

Med Biol 688: 1-23.

18. Hannun YA, Obeid LM. 2018. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 175-191.
19. Maceyka, M., Spiegel, S. 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510: 58–67.
20. Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, Rogers MJ, Setlow B, Redline R. 1974. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4565-4569.
21. Ntambi J.M, Buhrow S.A, Kaestner K.H, Christy R.J, Sibley E, Kelly T.J Jr, Lane M.D. 1988. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 263: 17291-17300.
22. Kaestner K.H, Ntambi J.M, Kelly T.J Jr, Lane M.D. 1989. Differentiation-induced gene expresión in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 264: 14755-14761.
23. Zheng Y, Prouty S.M, Harmon A, Sundberg J.P, Stenn K.S, Parimoo S. 2001. Scd3--a novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics* 71: 182-191.
24. Miyazaki M, Jacobson M.J, Man W.C, Cohen P, Asilmaz E, Friedman J.M, Ntambi J.M. 2003. Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart- specific stearyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem* 278: 33904-33911.
25. Thiede M.A, Ozols J, Strittmatter P. 1986. Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J Biol Chem* 261: 13230-13235.
26. Chung M, Ha S, Jeong S, Bok J, Cho K, Baik M, Choi Y. 2000. Cloning and characterization of bovine stearyl CoA desaturase l cDNA from adipose tissues. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1526-1530.
27. Yahyaoui M.H, Sanchez A, Folch J.M. 2002. Partial nucleotide sequence of the goat stearyl coenzyme A desaturase cDNA and gene structure. *J Anim Sci* 80: 866-867.
28. Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty S.M. 1999. Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J* 340: 255-264.
29. Zhang L, Ge L, Tran T, Stenn K, Prouty S.M. 2001. Isolation and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element. *Biochem J* 357: 183-193.
30. Bene H, Lasky D, Ntambi J.M. 2001. Cloning and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 1194-1198.
31. Beiraghi S, Zhou M, Talmadge C.B, Went-Sumegi N, Davis J.R, Huang D, Saal H, Seemayer T.A, Sumegi J. 2003. Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv (4) (p13.1q21.1) in a family with cleft lip. *Gene* 309: 11-21.
32. Zhang S, Yang Y, Shi Y. 2005. Characterization of human SCD2, an oligomeric desaturase with improved stability and enzyme activity by cross-linking in intact cells. *Biochem J* 388: 135-142.
33. Wang J, Yu L, Schmidt R.E, Su C, Huang X, Gould K, Cao G. 2005. Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 735-742.
34. Stuke J.E, McDonough V.M, Martin C.E. 1990. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* 265: 20144-20149.
35. Shanklin J, Whittle E, Fox B.G. 1994. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33: 12787-12794.
36. Waters, K.M. and Ntambi, J.M. 1996. Polyunsaturated fatty acids inhibit hepatic stearyl-CoA desaturase-1 gene in diabetic mice. *Lipids* 31: S33-S36.
37. Ntambi, J.M. 1995. Cellular differentiation and dietary regulation of gene expresión. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent Fatty Acids* 52: 117-120.
38. Waters KM, Ntambi JM. 1994. Insulin and dietary fructose induce stearyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. *J Biol Chem* 269: 27773-27777.
39. Ntambi JM. 1992. Dietary regulation of stearyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *J Biol Chem* 267: 10925-10930.

40. Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 678-689.
41. Zhang X, Liu J, Su W, Wu J, Wang C, Kong X, Gustafsson JÅ, Ding J, Ma X, Guan Y. 2014. Liver X receptor activation increases hepatic fatty acid desaturation by the induction of SCD1 expression through an LXR α -SREBP1c-dependent mechanism. *J Diabetes* 6: 212-220.
42. Sampath H, Ntambi JM. 2014. Role of stearoyl-CoA desaturase-1 in skin integrity and whole body energy balance. *J Biol Chem* 289: 2482-2488.
43. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. 2009. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 50: 1827-1838.
44. Sjögren P, Sierra-Johnson J, Gertow K, Rosell M, Vessby B, de Faire U, Hamsten A, Hellenius ML, Fisher RM. 2008. Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia* 51: 328-335.
45. Warensjö E, Risérus U, Vessby B. 2005. Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia* 48: 1999-2005.
46. Li J, Ding S.F, Habib N.A, Fermor B.F, Wood C.B, Gilmour R.S. 1994. Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 57: 348-352.
47. Kumar-Sinha C, Ignatoski K.W, Lippman M.E, Ethier S.P, Chinnaiyan A.M. 2003. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res* 63: 132-139.
48. Strable MS, Ntambi JM. 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet- induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 199-214.
49. Zheng Y, Eilertsen K.J, Ge L, Zhang L, Sundberg J.P, Prouty S.M, Stenn K.S, Parimoo S. 1999. Scd1 is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet* 23: 268-270.
50. Sundberg J.P, Boggess D, Sundberg B.A, Eilertsen K, Parimoo S, Filippi M, Stenn K. 2000. Asebia-2J (Scd1(ab2J)): a new allele and a model for scarring alopecia. *Am J Pathol* 156: 2067-2075.
51. Miyazaki M., Man W. C., and Ntambi J. M. 2001. Targeted disruption of stearoyl- CoA desaturase 1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J. Nutr* 131: 2260-2268.
52. Dobrzyn A, Dobrzyn P, Miyazaki M, Sampath H, Chu K, Ntambi J.M. 2005. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases CTP:choline cytidyltransferase translocation into the membrane and enhances phosphatidylcholine synthesis in liver. *J Biol Chem* 280: 23356-23362.
53. Ntambi J.M, Miyazaki M, Stoehr J.P, Lan H, Kendzierski C.M, Yandell B.S, Song Y, Cohen P, Friedman J.M, Attie A.D. 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11482- 11486.
54. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie D.G, Friedman J.M, Ntambi J.M. 2004. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6409-6414.
55. Cohen P, Miyazaki M, Socci N.D, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas A.A, Sharma R, Hudgins L.C, Ntambi J.M, Friedman J.M. 2002. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin mediated weight loss. *Science* 297: 240-243.
56. Rahman S.M, Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee S.H, Miyazaki M, Ntambi J.M. 2003. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein tyrosine phosphatase 1B in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11110-11115.
57. Langner, C. A., E. H. Birkenmeier, O. Ben-Zeev, M. C. Schotz, H. O. Sweet, M. T. Davisson, and J. I. Gordon. 1989. The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *J. Biol. Chem* 264: 7994-8003.
58. Nadra K, de Preux Charles AS, Médard JJ, Hendriks WT, Han GS, Grès S, Carman GM, Saulnier-Blache JS, Verheijen MH, Chrast R. 2008. Phosphatidic acid mediates demyelination in Lpin1 mutant mice. *Genes Dev* 22: 1647-1661.
59. Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K. 2007. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* 282: 3450-3457.
60. Peterfy, M., J. Phan, P. Xu, and K. Reue. 2001. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat. Genet* 27: 121-124.

61. Peterfy, M., J. Phan, and K. Reue. 2005. Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J. Biol. Chem* 280: 32883-32889.
62. Croce, M. A., J. C. Eagon, L. L. LaRiviere, K. M. Korenblat, S. Klein, and B. N. Finck. 2007. Hepatic lipin 1 β expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss. *Diabetes* 56: 2395-2399.
63. Han, G. S. and G. M. Carman. 2010. Characterization of the human LPIN1- encoded phosphatidate phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem* 285: 14628-14638.
64. Reue, K. and D. N. Brindley. 2008. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J. Lipid Res* 49: 2493-2503.
65. Finck, B. N., M. C. Gropler, Z. Chen, T. C. Leone, M. A. Croce, T. E. Harris, J. C. Lawrence Jr, and D. P. Kelly. 2006. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell. Metab* 4: 199-210.
66. Bou Khalil, M., A. Blais, D. Figeys, and Z. Yao. 2010. Lipin - The bridge between hepatic glycerolipid biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 1249-1259.
67. Smith S. W., S. B. Weiss, E. P. Kennedy. 1957. The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids. *J. Biol. Chem* 228: 915-922.
68. Han, G. S., W. I. Wu, and G. M. Carman. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J. Biol. Chem* 281: 9210-9218.
69. Hubscher, G., D. N. Brindley, M. E. Smith, and B. Sedgwick. 1967. Stimulation of biosynthesis of glyceride. *Nature* 216: 449-453.
70. Cascales, C., E. H. Mangiapane, and D. N. Brindley. 1984. Oleic acid promotes the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to particulate fractions of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J* 219: 911- 916.
71. Liu, G. H., J. Qu, A. E. Carmack, H. B. Kim, C. Chen, H. Ren, A. J. Morris, B. N. Finck, and T. E. Harris. 2010. Lipin proteins form homo- and hetero-oligomers. *Biochem. J* 432: 65-76.
72. Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck, and D. M. Sabatini. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146: 408-420.
73. Gropler, M. C., T. E. Harris, A. M. Hall, N. E. Wolins, R. W. Gross, X. Han, Z. Chen, and B. N. Finck. 2009. Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice. *J. Biol. Chem* 284: 6763-6772.
74. Grimsey, N., G. S. Han, L. O'Hara, J. J. Rochford, G. M. Carman, and S. Siniosoglou. 2008. Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J. Biol. Chem* 283: 29166-29174.
75. Harris TE, Finck BN. 2011. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 22: 226–233.
76. Phan J, Peterfy M, Reue K. 2004. Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor- γ is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 279: 29558-29564.
77. Hall AM, Brunt EM, Chen Z, Viswakarma N, Reddy JK, Wolins NE, Finck BN. 2010. Dynamic and differential regulation of proteins that coat lipid droplets in fatty liver dystrophic mice. *J Lipid Res* 51: 554-563.
78. Kim HB, Kumar A, Wang L, Liu GH, Keller SR, Lawrence JC Jr, Finck BN, Harris TE. 2010. Lipin 1 represses NFATc4 transcriptional activity in adipocytes to inhibit secretion of inflammatory factors. *Mol Cell Biol* 30: 3126-3139.
79. Liu GH, Gerace L. 2009. Sumoylation regulates nuclear localization of lipin-1 α in neuronal cells. *PLoS One* 4: e7031.
80. Donkor J, Zhang P, Wong S, O'Loughlin L, Dewald J, Kok BP, Brindley DN, Reue K. 2009. A conserved serine residue is required for the phosphatidate phosphatase activity but not the transcriptional coactivator functions of lipin-1 and lipin-2. *J Biol Chem* 284: 29968-29978.
81. Barroso E, Rodríguez-Calvo R, Serrano-Marco L, Astudillo AM, Balsinde J, Palomer X, Vázquez-Carrera M. 2011. The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC- 1 α -Lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology* 152: 1848-1859.
82. Meana C, Peña L, Lordén G, Esquinas E, Guijas C, Valdearcos M, Balsinde J, Balboa MA. 2014. Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J Immunol* 193: 4614-4622.
83. Balsinde J, Diez E, Fernández B, Mollinedo. 1989. Biochemical characterization of phospholipase D activity from human neutrophils. *Eur. J. Biochem.* 186: 717-724.

84. Speranza F, Mahankali M, Henkels KM, Gomez-Cambronero J. 2014. The molecular basis of leukocyte adhesion involving phosphatidic acid and phospholipase D. *J Biol Chem* 289: 28885-28897.
85. Shemesh T, Luini A, Malhotra V, Burger KN, Kozlov MM. 2003. Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophys J* 85: 3813-3827.
86. Delon C, Manifava M, Wood E, Thompson D, Krugmann S, Pyne S, Ktistakis NT. 2004. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 279: 44763-44774.
87. Newton AC. 2018. Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 53: 208-230.
88. Cobbaut M, Van Lint J. 2018. Function and regulation of protein kinase D in oxidative stress: a tale of isoforms. 2018. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 2138502.
89. Brose N, Rosenmund C. 2002. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* 115: 4399-4411.
90. Yang C, Kazanietz MG. 2003. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci* 24: 602-608.
91. Valdearcos M, Esquinas E, Meana C, Gil-de-Gómez L, Guijas C, Balsinde J, Balboa MA. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J Immunol* 186: 6004-6013.
92. Casas J, Meana C, López-López JR, Balsinde J, Balboa MA. 2021. Lipin-1-derived diacylglycerol activates intracellular TRPC3 which is critical for inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* 78: 8243-8260.
93. Meana C, García-Rostán G, Peña L, Lordén G, Cubero Á, Orduña A, Györfy B, Balsinde J, Balboa MA. 2018. The phosphatidic acid phosphatase lipin-1 facilitates inflammation-driven colon carcinogenesis. *JCI Insight* 3: e97506.
94. Valdearcos M, Esquinas E, Meana C, Peña L, Gil-de-Gómez L, Balsinde J, Balboa MA. 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J Biol Chem* 287: 10894-10904.
95. Dwyer JR, Donkor J, Zhang P, Csaki LS, Vergnes L, Lee JM, Dewald J, Brindley DN, Atti E, Tetradis S, Yoshinaga Y, De Jong PJ, Fong LG, Young SG, Reue K. 2012. Mouse lipin-1 and lipin-2 cooperate to maintain glycerolipid homeostasis in liver and aging cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2486-E2495.
96. Lordén G, Sanjuán-García I, de Pablo N, Meana C, Alvarez-Miguel I, Pérez-García MT, Pelegrín P, Balsinde J, Balboa MA. 2017. Lipin-2 regulates NLRP3 inflammasome by affecting P2X7 receptor activation. *J Exp Med* 214: 511-528.
97. Guillou H, Zdravcevic D, Martin PG, 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.
98. Vance JE. 2015. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic* 16: 1-18.
99. Balsinde J, I.D. Bianco, E.J. Ackermann, K. Conde-Frieboes, and E.A. Dennis. 1995. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 8527-8531.
100. Taniguchi M, Okazaki T. 2014. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. *Biochim Biophys Acta* 1841: 692-703.
101. Shen J, Wu G, Tsai AL, Zhou M. 2020. Structure and Mechanism of a Unique Diiron Center in Mammalian Stearoyl-CoA Desaturase. *J Mol Biol* 432: 5152- 5161.
102. Reue K, Xu P, Wang XP, Slavin BG. 2000. Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J Lipid Res* 41: 1067-1076.
103. Langner CA, Birkenmeier EH, Roth KA, Bronson RT, Gordon JI. 1991. Characterization of the peripheral neuropathy in neonatal and adult mice that are homozygous for the fatty liver dystrophy (fld) mutation. *J Biol Chem* 266: 11955-11964.
104. Reue K, Doolittle MH. 1996. Naturally occurring mutations in mice affecting lipid transport and metabolism. *J Lipid Res* 37: 1387-1405.
105. Mitra MS, Chen Z, Ren H, Harris TE, Chambers KT, Hall AM, Nadra K, Klein S, Chrast R, Su X, Morris AJ, Finck BN. 2013. Mice with an adipocyte-specific lipin 1 separation-of-function allele reveal unexpected roles for phosphatidic acid in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 642-647.
106. Nadra K, Médard JJ, Mul JD, Han GS, Grès S, Pende M, Metzger D, Chambon P, Cuppen E, Saulnier-Blache JS, Carman GM, Desvergne B, Chrast R. 2012. Cell autonomous lipin 1 function is essential for development and maintenance of white and brown adipose tissue. *Mol Cell Biol* 32: 4794-4810.

107. Phan J, Peterfy M, Reue K. 2005. Biphasic expression of lipin suggests dual roles in adipocyte development. *Drug News Perspect* 18: 5-11.
108. Xu J, Lee WN, Phan J, Saad MF, Reue K, Kurland IJ. 2006. Lipin deficiency impairs diurnal metabolic fuel switching. *Diabetes* 55: 3429-3438.
109. Harris TE, Huffman TA, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A, Lawrence JC Jr. 2007. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem* 282: 277-286.
110. Verheijen MH, Chrast R, Burrola P, Lemke G. 2003. Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev* 17: 2450-2464.
111. Mitra MS, Schilling JD, Wang X, Jay PY, Huss JM, Su X, Finck BN. 2011. Cardiac lipin 1 expression is regulated by the peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α /estrogen related receptor axis. *J Mol Cell Cardiol* 51: 120-128.
112. Zhang P, Takeuchi K, Csaki LS, Reue K. 2012. Lipin-1 phosphatidic phosphatase activity modulates phosphatidate levels to promote peroxisome proliferator- activated receptor γ (PPAR γ) gene expression during adipogenesis. *J Biol Chem* 287: 3485-3494.
113. Zeharia A, Shaag A, Houtkooper RH, Hindi T, de Lonlay P, Erez G, Hubert L, Saada A, de Keyzer Y, Eshel G, Vaz FM, Pines O, Elpeleg O. 2008. Mutations in LPIN1 cause recurrent acute myoglobinuria in childhood. *Am J Hum Genet* 83: 489-494.
114. Michot C, Hubert L, Brivet M, De Meirleir L, Valayannopoulos V, Müller-Felber W, Venkateswaran R, Ogier H, Desguerre I, Altuzarra C, Thompson E, Smitka M, Huebner A, Husson M, Horvath R, Chinnery P, Vaz FM, Munnich A, Elpeleg O, Delahodde A, de Keyzer Y, de Lonlay P. 2010. LPIN1 gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood. *Hum Mutat* 31: E1564-1573.
115. Michot C, Hubert L, Romero NB, Gouda A, Mamoune A, Mathew S, Kirk E, Viollet L, Rahman S, Bekri S, Peters H, McGill J, Glamuzina E, Farrar M, von der Hagen M, Alexander IE, Kirmse B, Barth M, Laforet P, Benlian P, Munnich A, JeanPierre M, Elpeleg O, Pines O, Delahodde A, de Keyzer Y, de Lonlay P. 2012. Study of LPIN1, LPIN2 and LPIN3 in rhabdomyolysis and exercise-induced myalgia. *J Inherit Metab Dis* 35: 1119-1128.
116. Bergounioux J, Brassier A, Rambaud C, Bustarret O, Michot C, Hubert L, Arnoux JB, Laquerriere A, Bekri S, Galene-Gomez S, Bonnet D, Hubert P, de Lonlay P. 2012. Fatal rhabdomyolysis in 2 children with LPIN1 mutations. *J Pediatr* 160: 1052-1054.
117. Csaki LS, Reue K. 2010. Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annu Rev Nutr* 30: 257-272.
118. Chang YC, Chang LY, Chang TJ, Jiang YD, Lee KC, Kuo SS, Lee WJ, Chuang LM. 2010. The associations of LPIN1 gene expression in adipose tissue with metabolic phenotypes in the Chinese population. *Obesity* 18: 7-12.
119. Donkor J, Sparks LM, Xie H, Smith SR, Reue K. 2008. Adipose tissue lipin-1 expression is correlated with peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression and insulin sensitivity in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 233-239.
120. Fawcett KA, Grimsey N, Loos RJ, Wheeler E, Daly A, Soos M, Semple R, Syddall H, Cooper C, Siniosoglou S, O'Rahilly S, Wareham NJ, Barroso I. 2008. Evaluating the role of LPIN1 variation in insulin resistance, body weight, and human lipodystrophy in U.K. Populations. *Diabetes* 57: 2527-2533.
121. Wiedmann S, Fischer M, Koehler M, Neureuther K, Riegger G, Doering A, Schunkert H, Hengstenberg C, Baessler A. 2008. Genetic variants within the LPIN1 gene, encoding lipin, are influencing phenotypes of the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 57: 209-217.
122. Shrago E, Glennon JA, Gordon ES. 1971. Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism* 20: 54-62.
123. Valenti L, Motta BM, Alisi A, Sartorelli R, Buonaiuto G, Dongiovanni P, Rametta R, Pelusi S, Fargion S, Nobili V. 2012. LPIN1 rs13412852 polymorphism in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54: 588- 593.
124. Aulchenko YS, Pullen J, Kloosterman WP, Yazdanpanah M, Hofman A, Vaessen N, Snijders PJ, Zubakov D, Mackay I, Olavesen M, Sidhu B, Smith VE, Carey A, Berezikov E, Uitterlinden AG, Plasterk RH, Oostra BA, van Duijn CM. 2007. LPIN2 is associated with type 2 diabetes, glucose metabolism, and body composition. *Diabetes* 56: 3020-3026.
125. Reue K. 2009. The lipin family: mutations and metabolism. *Curr Opin Lipidol* 20: 165-170.
126. Majeed HA, Kalaawi M, Mohanty D, Teebi AS, Tunjekar MF, al-Gharbawy F, Majeed SA, al-Gazzar AH. 1989. Congenital dyserythropoietic anemia and chronic recurrent multifocal osteomyelitis in three related children and the association with Sweet syndrome in two siblings. *J Pediatr* 115: 730-734.

127. Majeed HA, El-Shanti H, Al-Rimawi H, Al-Masri N. 2000. On mice and men: An autosomal recessive syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anemia. *J Pediatr* 137: 441-442.
128. Majeed HA, Al-Tarawna M, El-Shanti H, Kamel B, Al-Khalaileh F. 2001. The syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia. Report of a new family and a review. *Eur J Pediatr* 160: 705-710.
129. Ferguson PJ, Chen S, Tayeh MK, Ochoa L, Leal SM, Pelet A, Munnich A, Lyonnet S, Majeed HA, El-Shanti H. 2005. Homozygous mutations in LPIN2 are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). *J Med Genet* 42: 551-557.
130. Ferguson PJ, El-Shanti H. 2021. Majeed syndrome: A review of the clinical, genetic and immunologic features. *Biomolecules* 11: 367.
131. Liu J, Hu XY, Zhao ZP, Guo RL, Guo J, Li W, Hao CJ, Xu BP. 2019. Compound heterozygous LPIN2 pathogenic variants in a patient with Majeed syndrome with recurrent fever and severe neutropenia: case report. *BMC Med Genet* 20: 182.
132. Bhuyan F, de Jesus AA, Mitchell J, Leikina E, VanTries R, Herzog R, Onel KB, Oler A, Montealegre Sanchez GA, Johnson KA, Bichell L, Marrero B, De Castro LF, Huang Y, Calvo KR, Collins MT, Ganesan S, Chernomordik LV, Ferguson PJ, Goldbach-Mansky R. 2021. Novel Majeed syndrome-causing LPIN2 mutations link bone inflammation to inflammatory M2 macrophages and accelerated osteoclastogenesis. *Arthritis Rheumatol* 73: 1021-1032.
133. Herlin T, Fiirgaard B, Bjerre M, Kerndrup G, Hasle H, Bing X, Ferguson PJ. 2013. Efficacy of anti-IL-1 treatment in Majeed syndrome. *Ann Rheum Dis* 72: 410-413.
134. Todaro GJ, Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17: 299- 313.
135. De Nardo D, Kalvakolanu DV, Latz E. 2018. immortalization of murine bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol Biol* 1784: 35-49.
136. Gersuk GM, Razai LW, Marr KA. 2008. Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. *J Immunol Methods* 329: 157-166.
137. Nemunaitis J. 1993. Macrophage function activating cytokines: potential clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 14: 153-171.
138. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
139. Diez, E., J. Balsinde, M. Aracil, and A. Schüller. 1987. Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 921: 82–89.
140. Abu EO, Oluwatowaju I. 2009. Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80: 189-194.
141. Axelsen PH, Murphy RC. 2010. Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J Lipid Res* 51: 660-671.
142. Shaner RL, Allegood JC, Park H, Wang E, Kelly S, Haynes CA, Sullards MC, Merrill AH Jr. 2009. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. *J Lipid Res* 50: 1692-1707.
143. Lebrero, P., A.M. Astudillo, J.M. Rubio, L. Fernández-Caballero, G. Kokotos, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: a role for cytosolic phospholipase A₂γ in phospholipid remodeling. *Cells* 8: 799.
144. Bradford MM. 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.
145. Laemmli UK. 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
146. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-ΔΔC(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
147. Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Lygerou Z. 2017. Analysis of protein kinetics using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Methods Mol Biol* 1563: 243-267.
148. Carnell M, Macmillan A, Whan R. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP): acquisition, analysis, and applications. 2015. *Methods Mol Biol* 1232: 255-271.
149. Zheng CY, Petralia RS, Wang YX, Kachar B. 2011. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of fluorescence

tagged proteins in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J Vis Exp* 50: 2568.

150. Ichi I, Kono N, Arita Y, Haga S, Arisawa K, Yamano M, Nagase M, Fujiwara Y, Arai H. 2014. Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20:3n-9), an indicator of essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1841: 204-213.
151. Souza CO, Valenzuela CA, Baker EJ, Miles EA, Rosa Neto JC, Calder PC. 2018. Palmitoleic acid has stronger anti-inflammatory potential in human endothelial cells compared to oleic and palmitic acids. *Mol Nutr Food Res* 62: e1800322.
152. Souza CO, Teixeira AA, Biondo LA, Silveira LS, Calder PC, Rosa Neto JC. 2017. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NF κ B, independently of PPARs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 44: 566- 575.
153. Guijas C, Meana C, Astudillo AM, Balboa MA, 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.
154. Astudillo AM, Meana C, Guijas C, Pereira L, Lebrero P, Balboa MA, Balsinde J. 2018. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J Lipid Res* 59: 237-249.
155. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. 2016. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis* 244: 211-215.
156. Fritsche KL. 2015. The science of fatty acids and inflammation. *Adv Nutr* 6: 293S-301S.
157. Rogero MM, Calder PC. 2018. Obesity, inflammation, Toll-like receptor 4 and fatty acids. *Nutrients* 10: 432.
158. Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. 1990. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J* 269: 807-814.
159. Adolph S, Fuhrmann H, Schumann J. 2012. Unsaturated fatty acids promote the phagocytosis of *P. aeruginosa* and *R. equi* by RAW264.7 macrophages. *Curr Microbiol* 65: 649-655.
160. Schumann J, Leichte A, Thiery J, Fuhrmann H. 2011. Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. *PLoS One* 6: e24066.
161. Tracz-Gaszewska Z, Dobrzyn P. 2019. Stearoyl-CoA desaturase 1 as a therapeutic target for the treatment of cancer. *Cancers* 11: 948.
162. Piao C, Cui X, Zhan B, Li J, Li Z, Li Z, Liu X, Bi J, Zhang Z, Kong C. 2019. Inhibition of stearoyl CoA desaturase-1 activity suppresses tumour progression and improves prognosis in human bladder cancer. *J Cell Mol Med* 23: 2064-2076.
163. Liu G, Feng S, Jia L, Wang C, Fu Y, Luo Y. 2018. Lung fibroblasts promote metastatic colonization through upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1 in tumor cells. *Oncogene* 37: 1519-1533.
164. Wang MH, Ye Y, Zhang M, Zhou BR, Wang JN, Song YN, Xia W. 2022. Exosome- mediated delivery of SCD-1 siRNA promoted the death of anaplastic thyroid carcinoma cells via regulating ROS level. *Clin Transl Oncol* 24: 288-296.
165. Magtanong L, Ko PJ, To M, Cao JY, Forcina GC, Tarangelo A, Ward CC, Cho K, Patti GJ, Nomura DK, Olzmann JA, Dixon SJ. 2019. Exogenous monounsaturated fatty acids promote a ferroptosis-resistant cell state. *Cell Chem Biol* 26: 420-432.e9.
166. Balsinde J, M.V. Winstead, and E.A. Dennis. 2002. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2–6.
167. Pérez-Chacón, G., A.M. Astudillo, D. Balgoma, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103–1113.
168. Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. 1999. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 175-189.
169. Chilton FH, Fonteh AN, Surette ME, Triggiani M, Winkler JD. 1996. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta* 1299: 1-15.
170. Pérez-Chacón G, Astudillo AM, Ruipérez V, Balboa MA, Balsinde J. 2010. Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor- regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *J Immunol* 184: 1071-1078.
171. Lands WE. 2000. Stories about acyl chains. *Biochim Biophys Acta* 1483: 1-14.
172. Balsinde J. 2002. Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem J* 364: 695-702.

173. Balsinde J, Dennis EA. 1997. Function and inhibition of intracellular calcium- independent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 272: 16069-16072.
174. Balsinde, J., and M.A. Balboa. 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cell. Signal.* 17: 1052-1062.
175. Blank ML, Smith ZL, 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* 1170: 275- 282.
176. Chilton FH, Murphy RC. 1987. Stimulated production and natural occurrence of 1,2-diarachidonoyl glycerophosphocholine in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 1126-1133.
177. DiCarlo, GJ, Fiore JV. 1958. On the composition of zymosan. *Science* 127: 756- 757.
178. Underhill DM, Goodridge HS. 2012. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12: 492-502.
179. Goodridge HS, Underhill DM, Touret N. 2012. Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic* 13: 1062-1071.
180. Underhill DM. 2003. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res* 9: 176-180.
181. Qiu ZH, de Carvalho MS, Leslie CC. 1993. Regulation of phospholipase A₂ activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 268: 24506-24513.
182. Marone G, Fimiani B, Torella G, Poto S, Bianco P, Condorelli M. 1983. Possible role of arachidonic acid and of phospholipase A₂ in the control of lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Lab Immunol* 12: 111-116.
183. Gordon S. 2016. Phagocytosis: An immunobiologic process. *Immunity* 44: 463- 475.
184. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197: 1119- 1124.
185. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SY, Gordon S. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 196: 407-412.
186. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. 1993. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72: 269-278.
187. Qiu ZH, Gijón MA, de Carvalho MS, Spencer DM, Leslie CC. 1998. The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem* 273: 8203-8211.
188. Beutler B, Rietschel ET. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3: 169-176.
189. Gioannini TL, Weiss JP. 2007. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* 39: 249-260.
190. Miyake K. 2007. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 19: 3-10.
191. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433.
192. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-1782.
193. Schlame M, Rua D, Greenberg ML. 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 39: 257-288.
194. Schlame M, Ren M, Xu Y, Greenberg ML, Haller I. 2005. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids* 138: 38-49.
195. Chicco AJ, Sparagna GC. 2007. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C33-44.
196. Hannun YA. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274: 1855-1859.
197. Schütze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Krönke M. 1992. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C- induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71: 765-776.
198. Garzotto M, White-Jones M, Jiang Y, Ehleiter D, Liao WC, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. 1998. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis in LNCaP cells is mediated through ceramide synthase. *Cancer Res* 58:

2260-2264.

199. Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Chea V, Matsukuma K, Gilchrist D, Wang H, Chan C. 1998. H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 111: 3209-3220.
200. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R. 1995. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* 82: 405-414.
201. Marchesini N, Hannun YA. 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol* 82: 27-44.
202. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* 20: 1010-1018.
203. Dennis EA, Deems RA, Harkewicz R, Quehenberger O, Brown HA, Milne SB, Myers DS, Glass CK, Hardiman G, Reichart D, Merrill AH Jr, Sullards MC, Wang E, Murphy RC, Raetz CR, Garrett TA, Guan Z, Ryan AC, Russell DW, McDonald JG, Thompson BM, Shaw WA, Sud M, Zhao Y, Gupta S, Maurya MR, Fahy E, Subramaniam S. 2010. A mouse macrophage lipidome. *J Biol Chem* 285: 39976- 39985.
204. Hailemariam TK, Huan C, Liu J, Li Z, Roman C, Kalbfleisch M, Bui HH, Peake DA, Kuo MS, Cao G, Wadgaonkar R, Jiang XC. 2008. Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NF κ B activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1519-1526.
205. Olona A, Hateley C, Muralidharan S, Wenk MR, Torta F, Behmoaras J. 2021. Sphingolipid metabolism during Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated macrophage activation. *Br J Pharmacol* 178: 4575-4587.
206. Monge, P., A. Garrido, J.M. Rubio, V. Magrioti, G. Kokotos, M.A. Balboa, and J. Balsinde, J. 2020. The contribution of cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s to adrenic acid mobilization in murine macrophages. *Biomolecules* 10: 542.
207. Balboa, M.A., N. de Pablo, C. Meana, and J. Balsinde. 2019. The role of lipins in innate immunity and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1864: 1328–1337.
208. Balboa, M.A., and J. Balsinde. 2021. Phospholipases: from structure to biological function. *Biomolecules* 11: 428.
209. Bermúdez, M.A., Rubio, J.M., Balboa, M.A. & Balsinde, J. 2022. Differential mobilization of the phospholipid and triacylglycerol pools of arachidonic acid in murine macrophages. *Biomolecules* 12: 1851.
210. Rubio, J.M., J.P. Rodríguez, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2015. Group V secreted phospholipase A₂ is up-regulated by interleukin-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J. Immunol.* 194: 3327–3339.
211. Rubio, J.M., A.M. Astudillo, J. Casas, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front. Immunol.* 9: 1723.
212. Rodríguez, J.P., C. Guijas, A.M. Astudillo, J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 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.
213. Gil-de-Gómez, L., A.M. Astudillo, P. Lebrero, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2017. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Front. Immunol.* 8: 1251.
214. Gil-de-Gómez, L., P. Monge, J.P. Rodríguez, A.M. Astudillo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Phospholipid arachidonic acid remodeling during phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 274.
215. Astudillo, A.M., M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1864: 772–783.
216. Astudillo, A.M., C. Meana, M.A. Bermúdez, A. Pérez-Encabo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 480.
217. Bermúdez, M.A., L. Pereira, C. Fraile, L. Valerio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2022. Roles of palmitoleic acid and its positional isomers, hypogeic and sapienic acids, in inflammation, metabolic diseases and cancer. *Cells* 11: 2146.
218. Bermúdez, M.A., J.M. Rubio, M.A. Balboa, and Balsinde, J. 2022. Differential mobilization of the phospholipid and triacylglycerol pools of arachidonic acid in murine macrophages. *Biomolecules* 12: 1851.
219. Guijas, C., M.A. Bermúdez, C. Meana, A.M. Astudillo, L. Pereira, L. Fernández-Caballero, M.A. Balboa, and J. Balsinde.

2019. Neutral lipids are not a source of arachidonic acid for lipid mediator signaling in human foamy monocytes. *Cells* 8: 941.
220. Astudillo, A.M., J.P. Rodríguez, C. Guijas, J.M. Rubio, M.A. Balboa, M.A., and J. Balsinde. 2021. Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNF α gene expression in macrophages via a cPLA $_2\alpha$ /COX-1 pathway. *Cells* 10: 447.
221. Astudillo, A.M., M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2023. Compartmentalized regulation of lipid signaling in oxidative stress and inflammation: Plasmalogens, oxidized lipids and ferroptosis as new paradigms of bioactive lipid research. *Prog. Lipid Res.* 89: 101207.

