

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Análisis lipidómico de una muestra biológica mediante técnicas cromatográficas y espectrometría de masas

Eva Merino García

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

May 28, 2025

Para analizar la composición de ácidos grasos en muestras biológicas y evaluar las variaciones inducidas por la suplementación con ácidos grasos n-3 y n-6, se utilizó la línea celular macrofágica murina P388D1. El objetivo principal fue caracterizar el perfil de ácidos grasos en diversas clases lipídicas, incluyendo glicerofosfolípidos, diacilglicerol, triacilglicerol y ésteres de colesterol, así como en subclases específicas de glicerofosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico. Adicionalmente, se analizó el perfil de ácidos grasos de la línea celular tanto en estado basal como tras la suplementación con distintos ácidos grasos de las series n-3 y n-6. Este análisis permitió examinar la posible competencia entre las enzimas elongasas y desaturasas en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que dichas enzimas no muestran una preferencia específica por los ácidos grasos de las series n-3 o n-6. Para realizar esta caracterización, se emplearon técnicas analíticas como la cromatografía en capa fina, para la separación de lípidos, y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para la identificación y cuantificación de ácidos grasos. Estas técnicas nos permitieron obtener una caracterización detallada, proporcionando información sobre las funciones y la dinámica metabólica de los lípidos en esta línea celular.

1. INTRODUCCION

Los lípidos constituyen un grupo diverso y ubicuo de compuestos que desempeñan múltiples funciones esenciales en sistemas biológicos. Son componentes estructurales de las membranas celulares, actúan como fuente de energía y funcionan como mediadores en procesos de señalización celular.

A lo largo del tiempo, la definición de los lípidos ha variado debido a su notable heterogeneidad estructural y funcional. Tradicionalmente, los lípidos se han definido como compuestos apolares que se caracterizan por ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como el cloroformo y el hexano. No obstante, en 1987, W. W. Christie propuso una definición más amplia, describiendo a los lípidos como ácidos grasos y sus derivados, así como otras sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente con estos compuestos.²

En 2005, el Comité Internacional de Clasificación y Nomenclatura de Lípidos (ILCNC)

introdujo un sistema de clasificación de lípidos basado en principios químicos y bioquímicos. Este sistema define los lípidos como pequeñas moléculas hidrófobas o anfipáticas derivadas total o parcialmente de condensaciones basadas en carbaniones de tioésteres de cetoacilo y/o condensaciones basadas en carbocationes de unidades de isopreno (Figura 1).¹

Bajo este esquema, los lípidos se dividen en 8 categorías: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos (derivados de la condensación de unidades de cetoacilo); y esteroides y prenoides (derivados de la condensación de subunidades de isopreno).^{1,3-5}

Las categorías en las que nos centraremos en este trabajo se muestran en la Figura 2.

Ácidos grasos: su estructura representa el principal bloque de construcción de los lípidos complejos y constituyen una de las categorías fundamentales de los lípidos biológicos. El grupo acilo, (R-CO-), característico de los ácidos grasos (FA), está

formado por una serie repetida de grupos metileno (-CH₂), lo que les confiere un carácter hidrofóbico. Glicerolípidos: abarcan todos los lípidos que contienen glicerol como esqueleto principal. Esta categoría está dominada por los gliceroles mono-, di- y tri-sustituídos, siendo los más conocidos los acilgliceroles, que consisten en moléculas de glicerol esterificadas con uno, dos o tres ácidos grasos, principalmente saturados y monoinsaturados. Los acilgliceroles son conocidos por su papel en el almacenamiento de energía.

Glicerofosfolípidos: comúnmente conocidos como fosfolípidos (PL). Son componentes esenciales de la bicapa lipídica de las células. Estas moléculas se caracterizan por tener un “grupo de cabeza” polar unido a la posición sn3 del glicerol, lo que permite su clasificación en distintas subclases según la naturaleza de este grupo. Además, los PL contienen dos ácidos grasos esterificados en las posiciones sn1 (saturados) y sn2 (monoinsaturados o poliinsaturados) del glicerol.

Esteroles: dentro de esta categoría, el colesterol y sus derivados son los más estudiados debido a su importancia en las membranas celulares y en la señalización intracelular. Los ésteres de colesterol (CE) contienen un ácido graso esterificado en el carbono 3 de la molécula de colesterol. Estas moléculas participan en el almacenamiento y transporte de colesterol en las células.^{3,6}

1.1 Ácidos grasos

Los FA tienen amplias funciones metabólicas y existen libres o integrados en lípidos más complejos. Se encuentran en todos los organismos y constituyen elementos estructurales de las membranas biológicas, regulan la actividad de las enzimas y cumplen funciones importantes como moléculas de señalización. Los FA son la forma más eficiente de almacenar energía, principalmente en forma de triacilgliceroles y CE. Además de su papel en la homeostasis energética también son componentes integrales de las membranas celulares, principalmente en forma de glicerofosfolípidos. La composición de FA de los lípidos de membrana regula las propiedades físicas, la arquitectura y la función de las membranas. La longitud de la cadena y el número de dobles enlaces, así como la posición de éstos, determinan la fluidez de la membrana y

otras propiedades dinámicas, incluidos los movimientos de las moléculas dentro y a través de las membranas. La naturaleza de las cadenas acilo define las actividades de las enzimas y receptores asociados a la membrana. La composición de FA también afecta la disposición organizativa de los microdominios de la membrana y, en última instancia, las funciones de señalización transmembrana.

Los FA son ácidos monocarboxílicos alifáticos con una gran diversidad en su estructura, que va desde cadenas de carbono saturadas simples hasta configuraciones más complejas insaturadas cis/trans, ramificadas y cíclicas. También pueden llevar grupos funcionales adicionales. Los ácidos grasos se pueden clasificar, según su grado de insaturación en: ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA). Los PUFA se pueden dividir en n-3, n-6, y n-9, donde n es el número de carbonos de que consta la molécula.⁷ Es frecuente, sin embargo, encontrar distintas nomenclaturas al referirse a estos compuestos (Tabla 1).

La nomenclatura semi-sistemática utiliza abreviaturas que tienen en cuenta la longitud de la cadena, el número de dobles enlaces y su posición. Según las reglas de la IUPAC, en la abreviatura delta (Δ), la cadena de los FA se numera a partir del carbono carboxílico que es el número 1 y la posición de los dobles enlaces se indica utilizando la letra griega Δ .

En la abreviatura n-x (n menos x): “n” es el número de carbonos que hay en la molécula y “x” es un número entero que, restado a “n”, nos da la posición del último doble enlace en la molécula. Otra manera muy frecuente de nombrar los FA, pero desaconsejada por la IUPAC, es la nomenclatura omega (ω), que consiste en numerar la cadena a partir del metilo terminal; en este caso, la posición de los dobles enlaces se indica con la letra griega ω .

1.2.1. Ácidos grasos esenciales y biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 y n-6

Los mamíferos pueden sintetizar la mayoría de FA mediante la elongación de la cadena de un cebador de acetil-CoA, pero carecen del sistema

enzimático necesario para introducir dobles enlaces más allá de la posición 9 de la cadena hidrocarbonada.⁹ Por este motivo, los seres humanos no poseen la capacidad de sintetizar PUFA de 18 carbonos, por lo que el ácido linoleico (LA) y el ácido α -linolénico (ALA) se consideran FA esenciales n-6 y n-3, respectivamente, y deben ser obtenidos a través de la dieta. La proporción óptima de PUFA n-6 y n-3 en la dieta está entre 1:1 y 4:1.6. El metabolismo del ALA utiliza las mismas enzimas que el LA, lo que genera una competencia entre estos PUFA por los procesos de desaturación y elongación (Figura 3).

La familia n-3 de los PUFA incluye el ALA, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), mientras que la familia n-6 incluye el LA y el ácido araquidónico (AA). El EPA y el DHA son, en general, precursores de mediadores lipídicos antiinflamatorios, mientras que el AA lo es de mediadores lipídicos proinflamatorios. En conjunto, los PUFA son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular. Alteraciones en su metabolismo pueden provocar disfunción celular y contribuir a la aparición y progresión de diversas enfermedades.

1.2. Lipidómica

El término lipidoma hace referencia al perfil completo de las especies lipídicas en una célula, orgánulo o tejido, mientras que la lipidómica puede definirse como la caracterización integral de los lípidos en sistemas biológicos. Este campo de investigación ha surgido como una tecnología clave para investigar el metabolismo y las funciones celulares de los lípidos conocidos, así como para identificar y caracterizar nuevas estructuras lipídicas. Su desarrollo ha sido impulsado por los avances en tecnologías analíticas como la espectrometría de masas (MS) y los métodos computacionales, junto con el creciente reconocimiento del papel crítico de los lípidos en diversas enfermedades metabólicas, como la obesidad, la aterosclerosis, la hipertensión y la diabetes. La mayoría de los métodos de lipidómica basados en MS se pueden dividir en dos estrategias distintas: las que infunden directamente extractos de lípidos en el espectrómetro de masas, también

denominadas lipidómicas “shotgun”, y aquellas en las que las muestras de lípidos se someten a una separación cromatográfica antes del análisis. Cabe destacar que, a pesar de los avances en MS y bioinformática, la capacidad de definir el lipidoma de manera exhaustiva depende en gran medida de la calidad de la extracción de las muestras y de la eficacia de los métodos de separación cromatográfica utilizados.

En el desarrollo de este trabajo, se emplean técnicas analíticas como la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), precedida de la derivatización de los FA a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Estas técnicas, complementarias entre sí, permitirán una caracterización detallada de los ácidos grasos presentes en las muestras analizadas, proporcionando información para interpretar su papel en los procesos biológicos estudiados.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es determinar la composición de FA en la línea celular P388D₁ y analizar la competencia de las enzimas elongasas y desaturasas en la biosíntesis de PUFA, tras la suplementación con FA de las series n-3 y n-6. Esto se llevará a cabo mediante la:

1.1. Caracterización lipídica a nivel basal de la línea celular P388D₁

- Perfil de ácidos grasos totales
- Perfil de ácidos grasos en fosfolípidos totales y subclases de lípidos neutros
- Perfil de ácidos grasos en subclases de fosfolípidos

1.2. Caracterización lipídica de la línea celular P388D₁ tras la incorporación de ácidos grasos n-3 y n-6

- Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con ácido 18:3n-3
- Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con ácido 18:2n-6

- Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con ácido 18:3n-6
- Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con ácido 20:3n-6
- Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con los ácidos 18:3n-3 y 18:3n-6 y estudio de la competencia de las enzimas en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados
- Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con los ácidos 18:3n-3 y 20:3n-6 y estudio de la competencia de las enzimas en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Medios de cultivo y suplementos

- Medio RPMI 1640 sin L-glutamina (Corning)
- Penicilina/estreptomicina/L-glutamina (P/S/G) (Gibco)
- Suero bovino fetal (FBS) (Gibco)
- Ácido α -linolénico (18:3n-3) (Sigma)
- Ácido linoleico (18:2n-6) (Sigma)
- Albúmina de suero bovino (BSA), libre de ácidos grasos y endotoxinas (Sigma)

3.1.2. Disolventes, tampones y reactivos líquidos

- Agua MilliQ ultrapura (Millipore)
- Tampón fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mM + KCl 27 mM + Na₂HPO₄ 10 mM + KH₂PO₄ 1.8 mM) a pH 7.4 (Scharlau)
- Etanol absoluto (Scharlau)
- Reactivo Bradford (BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) (Bio-Rad)
- Metanol de calidad HPLC (Fisher)
- Cloroformo de calidad HPLC (Fisher)
- Hidróxido amónico 28 % (Scharlau)
- n-hexano de calidad HPLC (Supelco)
- Dietil éter (Scharlau)
- Ácido acético glacial (Fisher)
- Metanol anhidro 99.8 % (Sigma)
- Ácido clorhídrico 35 % (Scharlau)

3.1.3. Reactivos y productos sólidos

- Albúmina de suero bovino (BSA) Fracción V 1 mg/mL (Sigma)
- Ácido bórico (MP Biomedicals)

- Hidróxido de potasio (Scharlau)
- Láminas de poliéster Polygram SIL G, 0.2 mm sílica gel 60 (Macherey-Nagel)

3.1.4 Patrones de lípidos

- Patrones internos para la determinación del rendimiento de los procesos de extracción de lípidos, separación y derivatización (Tabla 2).
- Patrones externos para la identificación de los lípidos por TLC (Tabla 3).
- Patrones de calibración para la cuantificación en GC-MS: Mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco)

3.1.5. Equipamiento

Tabla 4 - Relación de los equipos y software, empleados en los diferentes métodos analíticos, así como las bases de datos consultadas.

3.1.6. Material biológico

Línea celular macrofágica murina P388D1

3.2. Métodos

El método de trabajo seguido se representa de forma esquemática en la Figura 4, donde se ilustra la secuencia de pasos que se realizaron en cada uno de los experimentos, según el objetivo específico de cada análisis.

3.2.1. Cultivo de línea celular

En este estudio se empleó la línea celular P388D₁, derivada de un linfoma murino y con características similares a las de los macrófagos. Las células se cultivaron en frascos de cultivo utilizando medio RPMI 1640 suplementado con un 10% (v/v) de FBS y 1 % (v/v) de una solución de P/S/G. El cultivo se mantuvo en un incubador a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Hasta alcanzar una confluencia del 80-90%, lo que generalmente ocurrió en un periodo de, aproximadamente, 48 horas.

Para la recolección, las células se desprendieron del frasco de cultivo utilizando un raspador estéril y se transfirieron a un tubo Falcon. El contenido se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el

sobrenadante y el precipitado celular se lavó dos veces con PBS, repitiendo la centrifugación después de cada lavado. Durante estos pasos, el tubo se mantuvo en hielo para preservar la viabilidad y estabilidad de las células.

3.2.2. Tratamiento celular: suplementación con ácidos grasos n-3 y n-6

Se sembraron 4 placas con 6×10^6 de células por placa, en un volumen de 10 mL de medio suplementado con P/S/G, pero sin suero. Posteriormente, se incubaron durante una hora a 37°C. La suplementación se llevó a cabo mediante la adición de un complejo FA-BSA en proporción 2:1. La complejación se realiza con BSA, libre de FA y endotoxinas, porque es el modo fisiológico de transportar FA y, además, previene pérdidas en la viabilidad celular.

Se establecieron cuatro condiciones experimentales:

1. Placa 1: No se realizó suplementación y se utilizó como control, representando las células en estado basal.
2. Placa 2: se suplementó con el complejo 18:3n-3-BSA a concentración 50 μ M – 25 μ M.
3. Placa 3: se suplementó con el complejo 18:2n-6-BSA a concentración 50 μ M – 25 μ M.
4. Placa 4: se suplementó con ambos complejos, manteniendo la misma concentración 50 μ M – 25 μ M

Se cuidó que la proporción de etanol empleado para disolver los FA no excediera de 1:1000 en el medio, con el fin de evitar toxicidad celular. Una vez completada la suplementación, las células se incubaron durante 17 horas. Al finalizar el periodo de incubación, se eliminó el sobrenadante y las células adheridas se lavaron dos veces con PBS. Las placas se mantuvieron en hielo para garantizar la estabilidad de las células.

3.2.3. Obtención de homogeneizados celulares (lisis celular)

La homogeneización ultrasónica es un método eficaz para la lisis celular, ya que emplea ondas ultrasónicas de alta frecuencia para romper las membranas celulares y liberar el contenido intracelular.

Para llevar a cabo la lisis celular, el

precipitado celular obtenido en el tubo Falcon se resuspendió en 1200 μ L de una solución de metanol y agua en proporción 1:1, transfiriendo posteriormente el contenido a un tubo Eppendorf. En el caso de las placas, se añadieron 450 μ L de la misma solución de metanol y agua (1:1) a cada placa, tras lo cual se desprendieron las células con un raspador estéril y se transfirió el contenido a tubos Eppendorf. Para asegurar una disrupción celular eficiente, las muestras se sometieron a homogeneización utilizando un homogeneizador ultrasónico de sonda, aplicando tres pulsos de 15 segundos a una amplitud del 23 %. Durante todo el proceso, los tubos se mantuvieron en hielo para prevenir el sobrecalentamiento y preservar la integridad de los componentes intracelulares.

3.2.4. Valoración del contenido total de proteínas: Método de Bradford

Para la valoración del contenido total de proteínas se utilizó el método de Bradford, que es un método colorimétrico basado en la unión de proteínas a un colorante. La unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a la proteína provoca un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción, del colorante, de 465 nm a 595 nm, por lo que la absorción a 595 nm está directamente relacionada con la concentración de proteínas.

Se elaboró una curva de calibrado trazando la cantidad de proteína estándar (en μ g) frente a la absorbancia medida a 595 nm (Figura 5). Para ello, se prepararon diferentes concentraciones, en un rango de 1-10 μ g en un volumen final de 100 μ L, a partir de una solución de BSA Fracción V a 1 mg/mL. A cada tubo se le añadió una disolución compuesta por 200 μ L del reactivo de Bradford y 700 μ L de agua destilada. Se esperaron 2 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en cubetas de 1 mL, utilizando como blanco una disolución compuesta por 800 μ L de agua destilada y 200 μ L del reactivo de Bradford.

Posteriormente, 3 μ L de muestra se llevaron a un volumen final de 100 μ L con agua destilada, seguido de la adición de 900 μ L de la misma disolución de reactivo de Bradford utilizada en la curva de calibrado. Se esperaron 2 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Finalmente, los

valores obtenidos de las absorbancias se interpolaron en la curva de calibrado y se obtuvo la concentración de proteínas de las muestras analizadas.

Para las muestras que se iban a utilizar para realizar la TLC, se utilizaron 1000 μ g de proteína y se llevaron a un volumen final de 400 μ L con una solución de metanol y agua (1:1), y para las muestras que se iban a utilizar directamente para la GC-MS, se emplearon 450 μ g de proteína y se llevaron a un volumen final de 400 μ L con la solución de metanol y agua (1:1). Estas cantidades de proteína se utilizaron para hacer triplicados técnicos.

3.2.5. Extracción de lípidos totales: Método de Bligh y Dyer

Antes de la extracción se añadieron 6 μ L de la mezcla de patrones internos correspondientes a cada caso (Tabla 2) en cada tubo, equivalentes a 2 μ L por muestra. Para la extracción de lípidos, se empleó el método modificado de Bligh y Dyer que consiste en una extracción líquido-líquido. Esta técnica aprovecha las diferencias de solubilidad de los componentes de la muestra en una mezcla de tres disolventes, que con las proporciones adecuadas se separan en dos fases distintas.¹³ En este proceso, se utilizaron como disolventes cloroformo, metanol y agua en una proporción 1:1:0.9.

Inicialmente, se añadieron 250 μ L de cloroformo y 300 μ L de metanol a cada tubo que contenía la muestra, seguido de una agitación vigorosa. Posteriormente, se incorporaron 250 μ L de agua y 250 μ L de cloroformo, repitiendo la agitación vigorosa antes de proceder a la centrifugación a 10000 rpm y 15°C durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se recuperó la fase orgánica, situada en la parte inferior, y se transfirió a un tubo nuevo. A continuación, se realizó una segunda extracción añadiendo 400 μ L de cloroformo a la fase acuosa restante. La mezcla resultante fue nuevamente agitada enérgicamente y sometida a otra centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente, las fases orgánicas obtenidas en ambos procesos se combinaron en un solo extracto.

Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina. La TLC es una técnica analítica rápida y sencilla que permite la separación de los componentes de una muestra a partir de su migración diferencial a través de una capa delgada de adsorbente, generalmente, sostenido por una superficie plana inerte. Esta separación se fundamenta en el principio de adsorción entre dos fases: una fase móvil (líquida) y una fase estacionaria (sólida), y depende de los distintos coeficientes de reparto que presentan las moléculas de la muestra entre ambas fases. En la TLC en fase normal, la fase estacionaria es polar, mientras que la fase móvil es relativamente apolar. Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizado como método estándar para la separación de lípidos, aprovechando sus diferencias en polaridad y afinidad relativa hacia cada una de las fases.

Separación por TLC de fosfolípidos totales y subclases de lípidos neutros. Para llevar a cabo esta separación se siguió un procedimiento que comenzó con la saturación de la atmósfera de la cubeta de desarrollo. Para ello, se utilizó como fase móvil una mezcla de n-hexano, dietiléter y ácido acético en una proporción de 70:30:1 (v/v/v). Se colocó un papel de filtro en la pared interna de la cubeta para facilitar la saturación del ambiente. Mientras tanto, la placa de gel de sílice, que actúa como fase estacionaria, se activó calentándola en una estufa a 70 °C durante una hora para eliminar la humedad. Posteriormente, la fase orgánica obtenida en el paso anterior, que contenía el extracto lipídico, se evaporó hasta sequedad, mediante centrifugación a vacío, y el residuo seco se resuspendió en 20 μ L de una mezcla de cloroformo y metanol en proporción 2:1. La muestra y los estándares externos (Tabla 3) se depositaron sobre la placa en la línea previamente designada para su aplicación.

Tras la aplicación de la muestra y los estándares, la placa se introdujo en la cubeta y se dejó desarrollar hasta que el frente del disolvente alcanzó el límite superior de la placa. Luego, se retiró y se dejó secar al aire durante 10 minutos. A continuación, se aisló el carril correspondiente a la muestra, mientras que los carriles con los

estándares se expusieron a vapores de yodo, revelando manchas de color marrón que indicaban la presencia y posición relativa de los diferentes lípidos, como se muestra en la Figura 6.

Finalmente, en el carril de la muestra, se rasparon las áreas correspondientes a cada clase de lípidos y la sílice recolectada de cada zona se transfirió a tubos Eppendorf para proceder a su extracción. Se realizaron dos etapas sucesivas de extracción con el objetivo de recuperar los lípidos de interés, adsorbidos en la fase estacionaria. En la primera extracción, se añadió 1 mL de una disolución de cloroformo y metanol, en proporción 1:2, a cada tubo que contenía la sílice. Posteriormente, las muestras se agitaron enérgicamente y se centrifugaron a 12000 rpm y 15°C durante 5 minutos. Finalizado este proceso, el sobrenadante fue cuidadosamente recogido y transferido a un tubo nuevo. La segunda extracción se efectuó bajo las mismas condiciones que la anterior, diferenciándose únicamente en la composición de la disolución empleada, que en este caso fue de cloroformo y metanol en proporción 2:1. Los sobrenadantes obtenidos en ambos procesos se combinaron en un solo extracto.

Separación por TLC de subclases de fosfolípidos. La separación de las subclases de fosfolípidos mediante TLC se realizó siguiendo un procedimiento similar al empleado para el sistema descrito anteriormente, con algunas modificaciones específicas. La fase estacionaria fue tratada impregnando la placa de gel de sílice con una solución de ácido bórico al 1.8 % (p/v) preparada en etanol absoluto, asegurando una distribución homogénea sobre toda la superficie de la placa. Tras la impregnación, la placa se dejó secar al aire. También se modificó la fase móvil, empleando una mezcla de cloroformo, metanol y amoníaco al 28 % en una proporción de 60:38:4.2. Se utilizaron los patrones externos especificados en la Tabla 3. Tras aislar el carril correspondiente a la muestra y revelar los carriles que contenían los estándares, se observó la presencia y posición relativa de cada una de las subclases de fosfolípidos, tal como se muestra en la Figura 7. Dado que las especies PI y PA no se separaron bien, hubo que analizarlas de

forma conjunta.

3.2.6 Derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos

Los ácidos grasos se encuentran unidos a nuestros lípidos de interés mediante enlaces éster y se caracterizan por presentar un elevado punto de ebullición. Una condición básica del análisis por cromatografía de gases (GC) es la necesidad de la volatilidad suficiente de los analitos y su estabilidad térmica. Debido a este hecho, el uso de la GC en el análisis de lípidos es limitado. Por esta razón, resulta necesaria su transformación en sus correspondientes ésteres metílicos. Los FAME poseen una menor reactividad y una mayor volatilidad, lo cual proporciona estabilidad a la muestra y permite su separación por GC.¹⁵ Para obtener estos compuestos, se realiza una reacción de transesterificación en medio básico (Figura 8).

La derivatización de los FA a FAME se llevó a cabo a partir de los extractos lipídicos obtenidos, tanto de la extracción de lípidos totales como de las bandas aisladas mediante TLC. Los extractos fueron concentrados hasta sequedad, mediante centrifugación a vacío. El residuo seco se resuspendió en 100 µL de una disolución de cloroformo y metanol en proporción 2:1. Posteriormente, la disolución se transfirió a un tubo de borosilicato, donde se añadió 1 mL de hidróxido de potasio 0.5 M preparado en metanol anhidro. La mezcla se incubó en un baño a 37 °C con agitación constante a 200 rpm durante 1 hora, con el objetivo de favorecer la reacción de transesterificación. Finalizado el periodo de incubación, la muestra fue neutralizada mediante la adición de 1 mL de ácido clorhídrico 0.5 M en agua. A continuación, se procedió a la extracción de los FAME formados en la reacción, mediante dos etapas sucesivas utilizando hexano como disolvente orgánico. En cada etapa, se añadió 1 mL de hexano, se agitó enérgicamente durante 30 segundos y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a 16°C. La fase orgánica (superior) recuperada de ambas extracciones fue recogida y combinada en un único tubo para su posterior análisis.

3.2.7 Elaboración de líneas de calibrado para la cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Para poder hacer un análisis cuantitativo, se construyó una línea de calibrado para cada uno de los 37 FAME de la mezcla patrón, indicada para tal fin en el apartado 3.1.4 Patrones de lípidos. Para ello, se prepararon diluciones seriadas (1/60, 1/120, 1/360 y 1/480) de la mezcla de estándares de concentración conocida. Cada una de estas diluciones se evaporó a vacío hasta sequedad, y los residuos secos se resuspendieron en 100 μ L de n-hexano para su posterior análisis. Se inyectó 1 μ L de cada dilución en el GC-MS y se analizaron cada uno de los picos cromatográficos. De cada pico se registraron las áreas y los tiempos de retención.

Con los datos obtenidos se trazaron las líneas de calibrado de cada uno de los FAME, representando el área del pico frente a la concentración conocida de cada dilución. El rango de concentraciones utilizado para construir las líneas de calibrado fue desde 1 hasta 25 μ M.

En el apartado 7. APÉNDICES (1), se incluyen los tiempos de retención y las rectas de calibrado obtenidos para cada estándar de FAME (Tabla 7).

3.2.8 Separación y detección de los ésteres metílicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La GC es una técnica analítica que permite la separación de compuestos volátiles y térmicamente estables. En este proceso, un gas portador inerte actúa como fase móvil, transportando los analitos a través de la columna. La separación de los componentes se basa en dos factores principales: la volatilidad de los compuestos y su interacción con la fase estacionaria.¹⁵

El análisis de los FAME se realizó mediante GC-MS, utilizando el equipo descrito en el apartado 3.1.5 Equipamiento (Tabla 4). Durante el análisis, la temperatura del puerto de inyección y de la línea de transferencia, que conecta el extremo de la columna cromatográfica con la fuente de ionización del espectrómetro de masas, se mantuvo constante a

250°C. Adicionalmente, la temperatura del cuadrupolo se estableció en 150°C, mientras que la de la fuente de ionización operó a 230°C.

Tras la derivatización, la fase orgánica obtenida fue evaporada a vacío, hasta sequedad y, posteriormente, resuspendida en 300 μ L de n-hexano. De esta solución, se distribuyeron 100 μ L en tres viales diferentes para llevar a cabo triplicados técnicos. Los viales se colocaron en el puerto de inyección, donde se realizó una inyección de 1 μ L de muestra en modo splitless. Este procedimiento asegura que la totalidad de la muestra inyectada ingrese directamente a la columna, sin fraccionarse. Como gas portador se utilizó helio, con una presión constante de 26.1 psi. La rampa de temperaturas empleada durante el análisis fue la que se muestra en la Tabla 5.

El equipo operó en modo de ionización por impacto electrónico (EI), con electrones acelerados a una energía de 70 eV. Esta técnica de ionización es utilizada en MS para convertir moléculas neutras, en fase gaseosa, en iones positivos mediante la eliminación de un electrón y generar una fragmentación extensa con relación masa/carga (m/z), proporcionando un espectro característico que puede usarse como “huella dactilar” para identificar y cuantificar compuestos. Se emplea especialmente con compuestos pequeños o volátiles.^{7,17}

La adquisición de los datos por parte del analizador comenzó 5 minutos después de la inyección, para evitar registrar señales correspondientes al disolvente de la muestra. La identificación de los compuestos se realizó en modo TIC (Corriente Total de Iones) efectuando un barrido de masas en el rango de $m/z=0$ a $m/z=450$. Para identificar cada compuesto, se comparó su tiempo de retención con el de los estándares de FAME utilizados en el calibrado y se analizaron los fragmentos característicos generados tras la ionización por EI. Los iones representativos para la identificación y cuantificación,¹⁸ aparecen resumidos en la Tabla 6.

La cuantificación de los compuestos se realizó

empleando el modo SIM (Monitorización de Iones Seleccionados). Para ello, se utilizaron los datos generados automáticamente por el software del equipo, que incluían la integración del área bajo la curva de los picos cromatográficos correspondientes a cada compuesto. Los valores obtenidos de las áreas integradas se interpolaron en la línea de calibrado específica para cada compuesto, obteniéndose la concentración final de cada uno de los compuestos analizados. Asimismo, a partir de los datos del área de cada patrón interno, se calculó su concentración final siguiendo el mismo procedimiento. Al conocer la concentración inicial del patrón interno se determinó el rendimiento del proceso analítico. Finalmente, con la concentración final de cada compuesto y el rendimiento del proceso, se calculó la concentración inicial de cada ácido graso presente en la muestra.

En el apartado 7. APÉNDICES (2), se presentan los cromatogramas correspondientes a los FA totales contenidos en la línea celular P388D₁. En la Figura 20 se muestra el cromatograma en modo TIC para la identificación y en modo SIM para la cuantificación. De igual manera, en la Figura 21, se incluye el cromatograma integrado, también en modo TIC y en modo SIM de los FA totales. En el apartado 7. APÉNDICES (3), se incluyen los espectros de masas de algunos FA, indicando los fragmentos característicos según sean saturados (Figuras 22 y 23), monoinsaturados (Figuras 24 y 25), diinsaturados (Figura 26) y poliinsaturados (Figuras 27 y 28).

3.2.9. Análisis estadístico de los datos

Los datos se representaron como la media $\pm$ error estándar de la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Para la comparación estadística de datos, se aplicó la prueba t de Student para muestras desapareadas, considerando estadísticamente significativas las diferencias entre grupos de datos que presentan un nivel de confianza mayor del 95 %, del 99.9 % o del 99.999 % (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respectivamente).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización lipídica de la línea celular P388D₁

Perfil de ácidos grasos totales. Se llevó a cabo un análisis de los FA totales por GC-MS. A partir de los datos obtenidos, se elaboró su perfil, así como la suma total del contenido en SFA, MUFA y PUFA, como se muestra en la Figura 9.

Los resultados revelaron que los FA más abundantes son el ácido palmítico (16:0) y el ácido oleico (18:1n-9), con concentraciones significativamente superiores a las de los demás ácidos grasos. Les sigue en abundancia el ácido esteárico (18:0), aunque su concentración es menor en comparación con los dos anteriores.

En términos generales, los SFA representaron la categoría más abundante, predominando los ácidos 16:0 y 18:0. Los MUFA ocuparon el segundo lugar en abundancia, destacando el ácido oleico (18:1n-9), y en menor medida, el ácido vaccénico (18:1n-7). Por último, los PUFA presentaron la menor proporción dentro del perfil analizado, con una mayor representación del ácido 20:4n-6 (AA), del ácido 22:5n-3 (docosapentaenoico, (DPA)) y del ácido 22:6n-3 (DHA).

Perfil de ácidos grasos en fosfolípidos totales y subclases de lípidos neutros. Con el objetivo de determinar en qué fracción lipídica se encuentran los FA contenidos en la muestra, se procedió al análisis de FA en las fracciones de PL totales y subclases de lípidos neutros: DAG, TAG y CE. Para ello, las diferentes fracciones se analizaron mediante GC-MS, previa separación por TLC, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/dietiléter/ácido acético (70:30:1). Con los datos obtenidos tras el análisis, se elaboró el perfil de FA de cada fracción lipídica (Figura 10). Asimismo, se calculó el contenido total de SFA, MUFA y PUFA en cada una de las fracciones (Figura 11).

Los PL constituyeron la fracción más

abundante dentro de este perfil lipídico y se observó su similitud con el perfil de FA totales. Esto sugiere que la mayoría de los ácidos grasos analizados están integrados en las membranas biológicas como parte de los fosfolípidos. En segundo lugar, se identificaron los CE, mientras que los DAG y los TAG se encontraron en proporciones menores.

En los PL, se identificó una predominancia de SFA, destacando el ácido esteárico (18:0) y el palmítico (16:0). Asimismo, se detectó una significativa proporción de MUFA, principalmente el ácido oleico (18:1n-9). En cuanto a los PUFA, aunque presentes en menor proporción, se identificaron importantes FA como el 20:4n-6 (AA), seguido por el 22:6n-3 (DHA), el 22:5n-3 (DPA) y el 20:3n-6 (dihomo- γ -linolénico (DGLA)). En los DAG, se observó un predominio de los SFA, destacándose el 18:0 y el 16:0. Además, se identificó una cantidad moderada de MUFA, particularmente el 18:1n-9, mientras que la proporción de PUFA fue muy baja.

Por otro lado, en los TAG, se registró un comportamiento similar al observado en los DAG, aunque en menor concentración.

Por último, en los CE, se evidenció un predominio de los SFA, con una mayor representación del 18:0 y el 16:0. Los MUFA, representados principalmente por el 18:1n-9, también mostraron una contribución significativa en esta fracción. Al igual que en TAG y DAG, la proporción de PUFA fue muy baja.

Perfil de ácidos grasos en subclases fosfolípidos. Con el objetivo de determinar en qué fracciones se encuentran los FA contenidos en los PL totales, se llevó a cabo el análisis detallado de los FA presentes en las fracciones de PL totales: PC, PE, PS y la combinación de PI+PA. Para ello, las diferentes fracciones se analizaron mediante GC-MS, previa separación por TLC, utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol/amoniaco al 28 % (60:38:4). Con los datos obtenidos tras el análisis, se elaboró el perfil de FA de cada fracción lipídica (Figura 12). Asimismo, se calculó el contenido total de SFA, MUFA y PUFA en cada una de las fracciones (Figura 13).

La fracción de PC mostró un predominio de SFA, con una representación significativa de MUFA y una contribución menor de PUFA. Entre los ácidos grasos mayoritarios se encontraron los ácidos 16:0 y 18:0 y el ácido oleico (18:1n-9).

La fracción de PE presentó un predominio de SFA, con una representación significativa de MUFA y PUFA en proporciones similares. Entre los SFA mayoritarios, el ácido 18:0 fue el más abundante, seguido del 16:0, mientras que entre los MUFA destacó el 18:1n-9. En cuanto a los PUFA, se identificó una contribución significativa del ácido 20:4n-6 (AA), el 22:6n-3 (DHA) y el 22:5n-3 (DPA).

En la fracción de PS, se evidenció un predominio de los SFA, destacándose el 18:0 y, en menor medida, el 16:0. Los MUFA y los PUFA presentaron contribuciones moderadas, destacándose entre los MUFA el 18:1n-9 y entre los PUFA los ácidos 18:2n-6 (LA) y 20:3n-9 (Mead). En la fracción combinada de PI+PA, se identificó una predominancia de SFA, con el 18:0 como el más abundante, seguido del 16:0, aunque este último en menor proporción. Los MUFA presentaron una menor contribución que los PUFA, destacándose entre los MUFA el 18:1n-9 y entre los PUFA los ácidos 18:2n-6 (LA), 20:3n-9 (Mead) y 20:4n-6 (AA).

4.2. Caracterización lipídica de la línea celular P388D₁ tras la incorporación de ácidos grasos n-3 y n-6

Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con ácido 18:3n-3. Con el propósito de evaluar los cambios en el perfil lipídico de la línea celular P388D₁ tras la suplementación con el ALA, precursor de los ácidos grasos n-3, se analizó la composición de FA totales en condiciones basales y suplementadas mediante GC-MS. Los resultados obtenidos permitieron elaborar el perfil de FA totales en ambas condiciones (Figura 14).

En las células suplementadas se evidenció un incremento significativo de ALA, reflejando directamente su incorporación como consecuencia de la suplementación. Asimismo, entre los

derivados de la serie n-3, se observó un aumento notable en los ácidos 20:3n-3, 20:5n-3 (EPA) y 22:5n-3 (DPA), lo que sugiere una conversión activa de ALA hacia ácidos grasos de cadena más larga y mayor insaturación. Este aumento indica que las células poseen las enzimas necesarias (elongasas y desaturasas) para metabolizar el ALA en sus derivados bioactivos.

En cuanto a los FA derivados de la serie n-6, se observó una ligera disminución en el contenido del ácido 20:4n-6. Sin embargo, no se observó una variación significativa del ácido FA esencial 18:2n-6. Además, se observó una disminución en los SFA y MUFA, para compensar el aumento de los PUFA. Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con ácido 18:2n-6

Con el propósito de evaluar los cambios en el perfil lipídico de la línea celular P388D1 tras la suplementación con el LA, precursor de los ácidos grasos n-6, se analizó la composición de FA totales en condiciones basales y suplementadas mediante GC-MS. Los resultados obtenidos permitieron elaborar el perfil de FA totales en ambas condiciones (Figura 15).

El ácido 18:2n-6 presentó un notable incremento en las células suplementadas, reflejando la influencia directa de la suplementación. Otro PUFA como el 20:3n-6 mostró una tendencia al aumento en las células suplementadas, aunque en menor magnitud que el 18:2n-6. Además, se observó una disminución en los MUFA 16:1n-x y 18:1n-7, para compensar el aumento de los PUFA, mientras los SFA se mantuvieron estables. Los PUFA de la serie n-3 no presentaron cambios significativos, lo cual era esperable dada la naturaleza de la suplementación. La menor incorporación del ácido 18:2n-6 en comparación con el ácido 18:3n-3, observada en el apartado anterior, podría estar relacionada con posibles limitaciones en los transportadores específicos para el ácido 18:2n-6. Este fenómeno plantea una hipótesis interesante que podría ser objeto de estudio en investigaciones futuras.

Perfil de ácidos grasos totales tras la suplemen-

tación con ácido 18:3n-6. Con el propósito de evaluar los cambios en el perfil lipídico de la línea celular P388D1 tras la suplementación con el ácido 18:3n-6 (γ -linolénico), se analizó la composición de FA totales en condiciones basales y suplementadas mediante GC-MS. Los resultados obtenidos permitieron elaborar el perfil de FA totales en ambas condiciones (Figura 16).

En las células suplementadas con el ácido 18:3n-6 se evidenció un incremento notable de éste, reflejando directamente su incorporación tras la suplementación. Asimismo, entre los derivados de la serie n-6, se observó un aumento significativo de los ácidos 20:3n-6, 20:4n-6 (AA) y 22:4n-6 (adrénico), lo que sugiere una conversión activa del 18:3n-6 hacia FA de cadena más larga y mayor insaturación. Este aumento indica que las células poseen las enzimas necesarias (elongasas y desaturasas) para metabolizar el 18:3n-6 en sus derivados bioactivos. Además, se observó una disminución en el ácido 18:0 y en los MUFA, para compensar el aumento de los PUFA.

Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con ácido 20:3n-6. Con el propósito de evaluar los cambios en el perfil lipídico de la línea celular P388D1 tras la suplementación con el ácido 20:3n-6 (DGLA), se analizó la composición de FA totales en condiciones basales y suplementadas mediante GC-MS. Los resultados obtenidos permitieron elaborar el perfil de FA totales en ambas condiciones (Figura 17).

En las células suplementadas con el ácido 20:3n-6, se observó un incremento en la serie n-6, siguiendo una tendencia similar a la registrada con la suplementación de ácido 18:3n-6, destacando un aumento significativo del ácido 20:2n-6 como consecuencia de la suplementación. Asimismo, se detectó una disminución en el ácido 18:0 y en los MUFA, para compensar el aumento de los PUFA.

Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con los ácidos 18:3n-3 y 18:3n-6 y estudio de la competencia de las enzimas en la biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Con el propósito de evaluar los

cambios en el perfil lipídico de la línea celular P388D1 tras la suplementación con el ácido 18:3n-3 (ALA), precursor de los ácidos n-3, y el ácido 18:3n-6 (γ -linolénico), se analizó la composición de FA totales en condiciones basales y suplementadas mediante GC-MS. Los resultados obtenidos permitieron elaborar el perfil de FA totales en ambas condiciones (Figura 18).

En la suplementación con 18:3n-3 + 18:3n-6, se evidenció la incorporación de ambos FA, destacando una mayor proporción del ácido 18:3n-3. Entre los derivados de la serie n-3, se observó un aumento de los ácidos 20:3n-3, 20:5n-3 y 22:5n-3, como resultado de la elongación y desaturación del 18:3n-3 incorporado. Asimismo, entre los derivados de la serie n-6, también se observó un incremento notable de los ácidos 20:3n-6, 20:4n-6 y 22:4n-6 como resultado de la elongación y desaturación del 18:3n-6. Se observó una disminución en los SFA y MUFA, para compensar el aumento de los PUFA.

Perfil de ácidos grasos totales tras la suplementación con los ácidos 18:3n-3 y 20:3n-6 y estudio de la competencia de las enzimas en la biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Con el propósito de evaluar los cambios en el perfil lipídico de la línea celular P388D1 tras la suplementación con el ácido 18:3n-3 (ALA), precursor de los ácidos n-3, y el 20:3n-6 (DGLA), se analizó la composición de FA totales en condiciones basales y suplementadas mediante GC-MS. Los resultados obtenidos permitieron elaborar el perfil de FA totales en ambas condiciones (Figura 19).

En la suplementación con 18:3n-3 + 20:3n-6, se evidenció la incorporación de ambos FA, destacando una mayor proporción del ácido 18:3n-3. Entre los derivados de la serie n-3, se observó un

aumento de los ácidos 20:3n-3, 20:5n-3 y 22:5n-3, como resultado de la elongación y desaturación del 18:3n-3 incorporado. Asimismo, entre los derivados de la serie n-6, también se observó un incremento notable de los ácidos 20:4n-6 y 22:4n-6 como resultado de la desaturación y elongación del 20:3n-6. Se observó una disminución en los SFA y MUFA, para compensar el aumento de los PUFA.

5. CONCLUSIONES

- Los perfiles de FA mostrados en el trabajo proporcionan información para comprender qué funciones biológicas podría desempeñar cada especie dentro de la célula.
- Comparando la fracción de PL con la fracción de lípidos neutros, observamos que la primera representa la mayor proporción del contenido lipídico total de esta línea celular.
- La variedad de FA en la composición de PL muestra su implicación en diversas funciones.
- La suplementación con ácido 18:2n-6 apenas produce variaciones en el perfil de FA, mientras que la suplementación con 18:3n-3 aumenta la proporción de PUFA n-3.
- En la suplementación con los ácidos de la serie n-6, el 18:2n-6 se incorpora en una proporción mucho menor que los ácidos 18:3n-6 y 20:3n-6.
- En la suplementación con los ácidos 18:3n-3 + 18:3n-6 y 18:3n-3 + 20:3n-6, en proporción 1:1, se observa una incorporación, elongación y desaturación similares de los FA de las series n-3 y n-6. Estos resultados permiten concluir que no existe competencia entre las enzimas elongasas y desaturasas por la utilización de estos FA.

REFERENCES

1. Fahy, E.; Cotter, D.; Sud, M.; Subramaniam, S. Lipid Classification, Structures and Tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2011, 1811 (11), 637–647.
2. Fuchs, B.; Süß, R.; Teuber, K.; Eibisch, M.; Schiller, J. Lipid Analysis by Thin-Layer Chromatography—A Review of the Current State. *J Chromatogr A* 2011, 1218 (19), 2754–2774.

3. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A. A Comprehensive Classification System for Lipids. *J Lipid Res* 2005, 46 (5), 839–861.
4. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R. C.; Nishijima, M.; Raetz, C. R. H.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M. J. O.; Dennis, E. A. Update of the LIPID MAPS Comprehensive Classification System for Lipids. *J Lipid Res* 2009, 50 (SUPPL.), S9–S14.
5. Liebisch, G.; Fahy, E.; Aoki, J.; Dennis, E. A.; Durand, T.; Ejsing, C. S.; Fedorova, M.; Feussner, I.; Griffiths, W. J.; Köfeler, H.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; O'Donnell, V. B.; Oskolkova, O.; Subramaniam, S.; Wakelam, M. J. O.; Spener, F. Update on LIPID MAPS Classification, Nomenclature, and Shorthand Notation for MS-Derived Lipid Structures. *J. Lipid Res.* 2020, 61 (12), 1539–1555.
6. Nelson, D. L.; Cox, M. M. Lehninger. Principios de Bioquímica; Editorial Omega S.A.: España, 2018; pp 359–385.
7. Quehenberger, O.; Armando, A. M.; Dennis, E. A. High Sensitivity Quantitative Lipidomics Analysis of Fatty Acids in Biological Samples by Gas Chromatography– Mass Spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2011, 1811 (11), 648–656.
8. Caramunt, R. M.; Farrán, M. de los Á.; López, C.; Pérez, M.; Santa María, D. Química Bioorgánica y Productos Naturales, 1st ed.; Librería UNED: Madrid, 2013.
9. Balgoma, D., A.M. Astudillo, G. Pérez-Chacón, O. Montero, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* 184: 3857–3865.
10. Astudillo, A.M., G. Pérez-Chacón, D. Balgoma, L. Gil-de-Gómez, V. Ruipérez, C. Guijas, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1811: 97–103.
11. Astudillo, A.M., G. Pérez-Chacón, C. Meana, D. Balgoma, A. Pol, M.A. del Pozo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* 286: 35299–35307.
12. Astudillo, A.M., D. Balgoma, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 249–256.
13. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Meana, J. M. Rubio, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J. Immunol.* 190: 5169–5177.
14. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Guijas, V. Magriotti, G. Kokotos, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 192: 752–762.
15. Peña, L., C. Meana, A. M. Astudillo, G. Lordén, M. Valdearcos, H. Sato, M. Murakami, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2016. Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A₂ in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 1083–1095.
16. 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.
17. Astudillo, A.M., C. Meana, C. Guijas, L. Pereira, P. Lebrero, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* 59: 237–249.
18. 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.
19. 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.
20. Rodríguez, J.P., C. Guijas, A.M. Astudillo, J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde, J. 2019. Sequestration of 9-hydroxystearic acid in FAHFA (fatty acid esters of hydroxy fatty acids) as a protective mechanism for colon carcinoma cells to avoid apoptotic cell death. *Cancers* 11: 524.
21. 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.
22. 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.

23. Monge, P.; Garrido, A.; Rubio, J.M.; Magriotti, V.; Kokotos, G.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. The contribution of cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s to adrenic acid mobilization in murine macrophages. *Biomolecules* **2020**, *10*, 542.
24. Rodríguez, J.P., E. Leiguez, C. Guijas, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, C. Teixeira, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. A lipidomic perspective of the action of group IIA secreted phospholipase A₂ on human monocytes: lipid droplet biogenesis and activation of cytosolic phospholipase A₂α. *Biomolecules* **10**: 891.
25. 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.
26. 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.
27. 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 TNFα gene expression in macrophages via a cPLA₂α/COX-1 pathway. *Cells* **10**: 447.
28. Bermúdez, M.A., J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2022. Differential mobilization of the phospholipid and triacylglycerol pools of arachidonic acid in murine macrophages. *Biomolecules* **12**: 1851.
29. 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.
30. Bermúdez, M.A., J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2022. Differential mobilization of the phospholipid and triacylglycerol pools of arachidonic acid in murine macrophages. *Biomolecules* **12**: 1851.
31. Bermúdez, M.A., A. Garrido, L. Pereira, T. Garrido, M.A. Balboa and J. Balsinde. 2024. Rapid movement of palmitoleic acid from phosphatidylcholine to phosphatidylinositol in activated human monocytes. *Biomolecules* **14**: 707.
32. Rodríguez, J.P., J. Casas, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2025. Bioactive lipid signaling and lipidomics in macrophage polarization: impact on inflammation and immune regulation. *Front. Immunol.* **16**: 1550500.
33. Balsinde, J., and M.A. Balboa. 2024. Plasmalogens in innate immune cells: from arachidonate signaling to ferroptosis. *Biomolecules* **14**: 1461.
34. 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.
35. 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.

