

Especies de fosfatidilcolina conteniendo ácido palmítico activan las funciones antiinflamatorias de los macrófagos

Jesús Balsinde, et al.

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

*Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM),
28029 Madrid, Spain*

Oct 17, 2025

Los procesos inflamatorios son fundamentales para la progresión de numerosas enfermedades crónicas, como los trastornos cardiovasculares y metabólicos y los macrófagos desempeñan un papel fundamental en estas respuestas. Los ácidos grasos monoinsaturados, tales como el ácido palmítico (16:1n-7), han sido implicados en la modulación de la inflamación; sin embargo, los mecanismos moleculares de acción precisos aún no se comprenden completamente. Cabe destacar que, en macrófagos, el 16:1n-7 se esterifica preferentemente en una especie específica de fosfatidilcolina (PC), PC(16:0/16:1n-7), lo que plantea la posibilidad de que su actividad biológica esté regulada por esta forma. En este trabajo, demostramos que los efectos antiinflamatorios del 16:1n-7 en los macrófagos se median a través de su incorporación a esta especie de PC. Utilizando fosfolípidos sintéticos y múltiples estímulos de activación, demostramos que el PC(16:0/16:1n-7) regula directamente la activación de los macrófagos. Suprime la señalización de NF- κ B, reprograma la expresión génica y promueve un cambio hacia un fenotipo antiinflamatorio similar al M2 que mejora la capacidad fagocítica. Estos efectos se conservan en análogos de éter resistentes a la hidrólisis mediada por fosfolipasa, lo que confirma que no se requiere la liberación de 16:1n-7. Estos hallazgos revelan un mecanismo de inmunomodulación impulsado por lípidos previamente desconocido, en el que las características estructurales específicas de PC(16:0/16:1n-7) confieren bioactividad intrínseca. Nuestro estudio amplía la comprensión de la regulación inmunometabólica por fosfolípidos de membrana y proporciona una base mecanicista para el potencial farmacoterapéutico de especies lipídicas definidas en la reprogramación de la función de los macrófagos en enfermedades inflamatorias.

Financiación: Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PID2019-105989RB-I00 and PID2022-140764OBI00)

Basándonos en nuestros trabajos previos sobre la modulación inmune mediada por lípidos, el presente estudio arroja nueva luz sobre los efectos biológicos del ácido palmítico (16:1n-7), destacando su papel fundamental en la modulación de las respuestas de los macrófagos a la estimulación innata. Mediante múltiples enfoques, aportamos evidencia de que los efectos moduladores del 16:1n-7 sobre la expresión de citoquinas en macrófagos activados y su estado antiinflamatorio general dependen de su incorporación a un fosfolípido. Esta observación resulta interesante, ya que sugiere un nuevo marco para comprender los efectos del 16:1n-7 en la inflamación; en lugar de que el propio ácido graso libre transmita la señal biológica, es un metabolito lipídico complejo, con el ácido graso incorporado en él, el que impulsa la respuesta.

Una posible explicación de los efectos inhibidores de PC(16:0/16:1n-7) sobre las respuestas inducidas por LPS podría ser que el fosfolípido interfiera directamente con la unión de LPS a TLR4 o neutralice el ligando. Sin embargo, nuestros experimentos en macrófagos con TLR4 silenciado contradicen esta interpretación. En estas

células, las respuestas de LPS fueron prácticamente abolidas como se esperaba, pero PC(16:0/16:1n-7) continuó suprimiendo las respuestas a otros estímulos, ya fueran solubles (ionóforo y éster de forbol) o aquellos que involucran otros receptores de superficie (zimosán). Este hallazgo indica que el efecto inhibitor de PC(16:0/16:1n-7) no depende de la presencia de TLR4 y es improbable que se explique por el simple secuestro de LPS. En cambio, los datos son más consistentes con un mecanismo más amplio, como la modulación de la organización de la membrana o los componentes de señalización descendentes que pueden influir en múltiples vías receptoras que convergen en NF-κB. Como regulador principal de la respuesta proinflamatoria de los macrófagos, la activación de NF-κB controla la expresión de genes implicados en la activación inmunitaria, desencadenando la transcripción de diversas citocinas proinflamatorias que amplifican la respuesta inmunitaria y promoviendo la inflamación. Nuestros resultados, que muestran que las células tratadas con PC(16:0/16:1n-7) manifiestan una activación significativamente reducida de NF-κB, proporcionan un marco molecular para explicar el fuerte carácter antiinflamatorio de este lípido y su papel en la reprogramación del perfil de expresión génica de los macrófagos hacia un estado M2 antiinflamatorio. Curiosamente, los efectos antiinflamatorios de PC(16:0/16:1n-7) se conservan cuando 16:1n-7 se reemplaza con su isómero posicional 16:1n-9, pero se pierden cuando se reemplaza con 18:1n-9. Este hallazgo concuerda con observaciones de otros autores que observaron que 16:1n-7, pero no 18:1n-9, provoca respuestas antiinflamatorias significativas en células endoteliales humanas. Estos resultados sugieren que la actividad biológica está dictada más por el número de carbonos que por la posición del doble enlace en relación con el extremo metilo. Cabe destacar, sin embargo, que se sabe que PC(16:0/18:1n-9) posee actividad biológica en otras situaciones, ya que esta especie se ha descrito como un ligando endógeno del receptor nuclear PPARα.

Múltiples mecanismos no excluyentes podrían explicar la inhibición de la señalización de NF-κB en macrófagos por PC(16:0/16:1n-7), incluyendo interacciones moleculares directas con componentes reguladores o modulación mediada por membrana. Las especies de fosfolípidos podrían actuar como un ligando competitivo para los dominios de unión a lípidos en proteínas de señalización, alterando su localización o conformación. En este sentido, se ha descrito que la fosfatidilserina suprime la activación de NF-κB en células dendríticas al prevenir la fosforilación y degradación de IκBα, estabilizando así el secuestro citoplasmático de NF-κB y previniendo su translocación nuclear. También existe evidencia de que ciertos fosfolípidos pueden activar fosfatasa o inhibir quinasas aguas arriba de NF-κB, lo que inhibe indirectamente la vía. Por ejemplo, se ha descrito que la especie PC(18:2/18:2) (1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfolina) bloquea la activación de MAPK e inhibe la fosforilación de IκBα en modelos de células neuronales, lo que atenúa la activación de NF-κB. En particular, el enriquecimiento de macrófagos con 16:1n-7, que, como se señaló previamente, resulta en su acumulación pronunciada en la especie PC(16:0/16:1n-7), también conduce a una disminución de la activación de MAPK.

En resumen, los resultados de este estudio revelan que tratar macrófagos con PC conteniendo 16:1 ejerce efectos protectores contra estímulos proinflamatorios al reducir la producción de citoquinas mediante la inhibición de la activación de NF-κB. En última instancia, este proceso reprograma el perfil de expresión génica, promoviendo un fenotipo anti-inflamatorio. La identificación de cambios en la expresión génica inducidos por PC conteniendo 16:1 resalta su potencial para modular las respuestas de los macrófagos en condiciones patológicas. Dada su biocompatibilidad, estabilidad química y capacidad para integrarse en sistemas de administración basados en lípidos, como liposomas y micelas, las moléculas de PC ya se emplean en plataformas de nanopartículas clínicamente exitosas, incluyendo terapias de mRNA. Sin embargo, su viabilidad translacional se ve comprometida por la rápida depuración, la degradación enzimática y la limitada biodisponibilidad oral. En aplicaciones sistémicas, las moléculas de PC circulantes, al formar parte de liposomas u otros nanotransportadores, pueden formar una corona proteica que compromete la estabilidad vesicular y altera la biodistribución. Se ha demostrado que la incorporación de colesterol mejora la robustez de la bicapa y reduce la desestabilización por las proteínas plasmáticas. Sin embargo, algunas formulaciones liposomales aún presentan el riesgo de pseudoalergia relacionada con la activación del complemento, lo que provoca reacciones a la infusión y respuestas inmunitarias. Además, las interacciones no deseadas con la membrana siguen siendo

motivo de preocupación. Lograr la viabilidad clínica requerirá una optimización precisa de la composición lipídica, incluyendo las especies de PC, la relación PC/colesterol y la carga superficial, junto con un riguroso perfil toxicológico para garantizar la estabilidad, la biodisponibilidad y la seguridad.

REFERENCES

1. Schwingshackl, L., and Hoffmann, G. (2014) Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis.* 13: 154.
2. Santa-María, C., López-Enríquez, S., Montserrat-de la Paz, S., Geniz, I., Reyes-Quiroz, M.E., Moreno, M., Palomares, F., Sobrino, F., and Alba, G. (2023) Update on anti-inflammatory molecular mechanisms induced by oleic acid. *Nutrients* 15: 224.
3. Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., and Hotamisligil, G. S. (2008) Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134: 933–944.
4. Erbay, E., Babaev, V. R., Mayers, J. R., Makowski, L., Charles, K. N., Snitow, M. E., Fazio, S., Wiest, M. M., Watkins, S. M., Linton, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2009) Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat. Med.* 15: 1383–1391.
5. Talbot, N. A., Wheeler-Jones, C. P., and Cleasby, M. E. (2014) Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 393: 129–142.
6. Chan, K. L., Pillon, N. J., Sivaloganathan, D. M., Costford, S. R., Liu, Z., Thérét, M., Chazaud, B., and Klip, A. (2015) Palmitoleate reverses high fat-induced pro-inflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* 290: 16979–16988.
7. de Souza, C. O., Valenzuela, C. A., Baker, E. J., Miles, E. A., Rosa Neto, J. C., and Calder, P. C. (2018) Palmitoleic acid has stronger anti-inflammatory potential in human endothelial cells compared to oleic and palmitic acids. *Mol. Nutr. Food Res.* 62: e1800322.
8. Souza, C. O., Teixeira, A. A. S., Biondo, L. A., Silveira, L. S., de Souza Breda, C. N., Braga, T. T., Camara, N. O. S., Belchior, T., Festuccia, W. T., Diniz, T. A., Ferreira, G. M., Hirata, M. H., Chaves-Filho, A. B., Yoshinaga, M. Y., Miyamoto, S., Calder, P. C., Sethi, J. K., and Rosa Neto, J. C. (2020) Palmitoleic acid reduces high fat diet-induced liver inflammation by promoting PPAR- γ -independent M2a polarization of myeloid cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1865: 158776.
9. Cruz, M.M., Simão, J.J., de Sá, R., Farias, T.S.M., da Silva, V.S., Abdala, F., Antraco, V.J., Armelin-Correa, L., Alonso-Vale, M.I.C. (2020) Palmitoleic acid decreases non-alcoholic hepatic steatosis and increases lipogenesis and fatty acid oxidation in adipose tissue from obese mice. *Front. Endocrinol.* 11: 537061.
10. Tricò, D., Mengozzi, A., Nesti, L., Hatunic, M., Sánchez, R.G., Konrad, T., Lalić, K., Lalić, N.M., Mari, A., and Natali, A. (2020) Circulating palmitoleic acid is an independent determinant of insulin sensitivity, beta cell function and glucose tolerance in non-diabetic individuals: a longitudinal analysis. *Diabetologia* 63: 206–218.
11. Gong, J., Campos, H., McGarvey, S., Wu, Z., Goldberg, R., and Baylin, A. (2011) Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 186–191.
12. Lee, J. J., Lambert, J. E., Hovhannisyanyan, Y., Ramos-Roman, M. A., Trombold, J. R., Wagner, D. A., and Parks, E. J. (2015) Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 101: 34–43.
13. Samad, A., James, A., Wong, J., Mankad, P., Whitehouse, J., Patel, W., Alves-Simoes, M., Siriwardena, A. K., and Bruce, J. I. (2014) Insulin protects pancreatic acinar cells from palmitoleic acid-induced cellular injury. *J. Biol. Chem.* 289: 23582–23595.
14. Akazawa, Y., Morisaki, T., Fukuda, H., Norimatsu, K., Shiota, J., Hashiguchi, K., Tabuchi, M., Kitayama, M., Matsushima, K., Yamaguchi, N., Kondo, H., Fujita, F., Takeshita, H., Nakao, K., and Takeshima, F. (2021) Significance of serum palmitoleic acid levels in inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* 11: 16260.
15. Cetin, E., Pedersen, B., Porter, L. M., Adler, G. K., and Burak, M. F. (2023) Protocol for a randomized placebo-controlled clinical trial using pure palmitoleic acid to ameliorate insulin resistance and lipogenesis in overweight and obese subjects with prediabetes. *Front. Endocrinol.* 14: 1306528.
16. De Fabiani, E. (2011) The true story of palmitoleic acid: Between myth and reality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113: 809–811.

17. Hodson, L., and Karpe, F. (2013) Is there something special about palmitoleate? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16: 225–231.
18. Frigolet, M.E., and Gutiérrez-Aguilar, R. (2017) The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. *Adv. Nutr.* 8: 173S–181S.
19. de Souza, C.O., Vannice, G.K., Rosa Neto, J.C., and Calder, P.C. (2018) Is palmitoleic acid a plausible nonpharmacological strategy to prevent or control chronic metabolic and inflammatory disorders? *Mol. Nutr. Food Res.* 62: 1700504.
20. Bermúdez, M. A., Pereira, L., Fraile, C., Valerio, L., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2022) Roles of palmitoleic acid and its positional isomers, hypogeic and sapienic acids, in inflammation, metabolic diseases and cancer. *Cells* 11: 2146.
21. Guijas, C., Meana, C., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2016) Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease. *Cell Chem. Biol.* 23: 689–699.
22. Astudillo, A. M., Meana, C., Guijas, C., Pereira, L., Lebrero, R., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2018) Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* 59: 237–249.
23. Astudillo, A.M., Meana, C., Bermúdez, M.A., Pérez-Encabo, A., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2020) Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 480.
24. Bermúdez, M.A., Garrido, A., Pereira, L., Garrido, T., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2024) Rapid movement of palmitoleic acid from phosphatidylcholine to phosphatidylinositol in activated human monocytes. *Biomolecules* 14: 707.
25. Balsinde, J., Fernández, B., and Diez, E. (1990) Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* 144: 4298–4304.
26. Koeberle, A., Shindou, H., Koeberle, S.C., Laufer, S.A., Shimizu, T., and Werz, O. (2013) Arachidonoyl-phosphatidylcholine oscillates during the cell cycle and counteracts proliferation by suppressing Akt membrane binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 2546–2551.
27. Balsinde, J., Balboa, M.A., and Dennis, E.A. (2000) Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D₁ macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* 275: 22544–22549.
28. Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., and Dennis, E.A. (1997) Differential regulation of phospholipase D and phospholipase A₂ by protein kinase C in P388D₁ macrophages. *Biochem. J.* 321: 805–809.
29. Balboa, M.A., Pérez, R., and Balsinde, J. (2003) Amplification mechanisms of inflammation: Paracrine stimulation of arachidonic acid mobilization by secreted phospholipase A₂ is regulated by cytosolic phospholipase A₂-derived hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *J. Immunol.* 171: 989–994.
30. Balboa, M.A., Sáez, Y., and Balsinde, J. (2003) Calcium-independent phospholipase A₂ is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J. Immunol.* 170: 5276–5280.
31. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
32. Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2007) TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A₂/cyclooxygenase-2 pathway. *J. Immunol.* 179: 4821–4828.
33. Ruipérez, V., Astudillo, M.A., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2009) Coordinate regulation of TLR-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A₂s. *J. Immunol.* 182: 3877–3883.
34. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
35. Diez, E., Balsinde, J., Aracil, M., and Schüller, A. (1987) Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 921: 82–89.
36. Fine, J.B., and Sprecher, H. (1982) Unidimensional thin-layer chromatography of phospholipids on boric acid-impregnated plates. *J. Lipid Res.* 23: 660–663.
37. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods* 25: 402–408.
38. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29: 15–21.
39. Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30: 923–930.

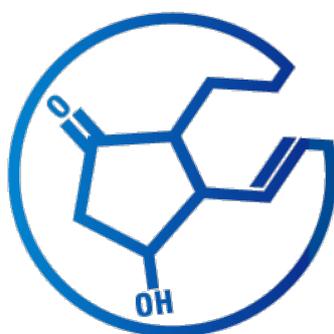
40. Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139–140.
41. Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., and Smyth, G.K. (2014) voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 15: R29.
42. Zhao, S., Guo, Y., Sheng, Q., and Shyr, Y. (2014) Heatmap3: an improved heatmap package with more powerful and convenient features. *BMC Bioinformatics* 15: P16.
43. Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, J.D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, P., and Guerau-de-Arellano, M. (2015) Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One* 10: e0145342.
44. Girotti, M., Evans, J. H., Burke, D., and Leslie, C. C. (2004) Cytosolic phospholipase A₂ translocates to forming phagosomes during phagocytosis of zymosan in macrophages *J. Biol. Chem.* 279: 19113–19121.
45. Balestrieri, B., Hsum V.W., Gilbert, H., Leslie, C.C., Han, W.K., Bonventre, J.V., and Arm, J.V. (2006) Group V secretory phospholipase A₂ translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 281: 6691–6698.
46. Balestrieri, B., Maekawa, A., Xing, W., Gelb, M.H., Katz, H.R., and Arm, J.P. (2009) Group V secretory phospholipase A₂ modulates phagosome maturation and regulates the innate immune response against *Candida albicans*. *J. Immunol.* 182: 4891–4898.
47. Hu, X., Zhou, J., Song, S., Kong, W., Shi, Y.C., Chen, L.L., and Zeng, T.S. (2020) TLR4/AP-1-targeted anti-inflammatory intervention attenuates insulin sensitivity and liver steatosis. *Mediators Inflamm.* 2020: 2960517.
48. Xu, Z., Huang, C.X., Li, Y., Wang, P.Z., Ren, G.L., Chen, C.S., Shang, F.J., Zhang, Y., Liu, Q.Q., Jia, Z.S., Nie, Q.H., Sun, Y.T., and Bai, X.F. (2007) Toll-like receptor 4 siRNA attenuates LPS-induced secretion of inflammatory cytokines and chemokines by macrophages. *J. Infection.* 55, e1-e9.
49. Aoki, M., Ishii, T., Kanaoka, M., and Kimura, T. (2006) RNA interference in immune cells by use of osmotic delivery of siRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 326-333.
50. Chen, Y., Ye, X., Escames, G., Lei, W., Zhang, X., Li, M., Jing, T., Yao, Y., Qiu, Z., Wang, Z., Acuña-Castroviejo, D., and Yang, Y. (2023) The NLRP3 inflammasome: contributions to inflammation-related diseases. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 28: 51.
51. Zhang, Y., Yang, W., Li, W., and Zhao, Y. (2021) NLRP3 inflammasome: Checkpoint connecting innate and adaptive immunity in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 12: 732933.
52. Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P.Y. (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 21: 677–687.
53. Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A.M., Guijas, C., Magrioti, V., Kokotos, G., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2014) Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 192: 752–762.
54. Lebrero, P., Astudillo, A.M., Rubio, J.M., Fernández-Caballero, L., Kokotos, G., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2019) Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: A role for cytosolic phospholipase A₂ in phospholipid remodeling. *Cells* 8: 799.
55. Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., and Kokotos, G. (2010) Phospholipase A₂ enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111: 6130–6185.
56. Nikolaou, A., Kokotou, M.G., Vasilakaki, S., and Kokotos, G. (2019) Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A₂. *Biochim. Biophys. Acta* 1864: 941–956.
57. Kokotos, G., Hsu, Y.H., Burke, J.E., Baskakis, C., Kokotos, C.G., Magrioti, V., and Dennis, E.A. (2010) Potent and selective fluoroketone inhibitors of group VIA calcium-independent phospholipase A₂. *J. Med. Chem.* 53: 3602–3610.
58. Dedaki, C., Kokotou, M.G., Mouchlis, V.D., Limnios, D., Lei, X., Mu, C.T., Ramanadham, S., Magrioti, V., Dennis, E.A., and Kokotos, G. (2019) β-Lactones: A novel class of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (group VIA iPLA₂) inhibitors with the ability to inhibit β-cell apoptosis. *J. Med. Chem.* 62: 2916–2927.
59. Bone, R.N., Gai, Y., Magrioti, V., Kokotou, M.G., Ali, T., Lei, X., Tse, H.M., Kokotos, G., and Ramanadham, S. (2015) Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂β) ameliorates islet infiltration and incidence of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 64: 541–554.
60. Ramanadham, S., Ali, T., Ashley, J.W., Bone, R.N., Hancock, W.D., and Lei, X. (2015) Calcium-independent phospholipases A₂ and their roles in biological processes and diseases. *J. Lipid Res.* 56: 1643–1668.
61. Hartman, E.J., Omura, S., and Laposata, M. (1989) Triacsin C: A differential inhibitor of arachidonoyl-CoA synthetase and nonspecific long chain acyl-CoA synthetase. *Prostaglandins* 37: 655–671.

62. Kim, J.H., Lewin, T.M., and Coleman, R.A. (2001) Expression and characterization of recombinant rat acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. *J. Biol. Chem.* 276: 24667–24673.
63. Vessey, D.A., Kelley, M., and Warren, R.S. (2004) Characterization of triacsin C inhibition of short-, medium-, and long-chain fatty acid: CoA ligases of human liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18: 100–106.
64. Carnevale, K.A., and Cathcart, M.K. (2001) Calcium-independent phospholipase A₂ is required for human monocyte chemotaxis to monocyte chemoattractant protein 1. *J. Immunol.* 167: 3414–3421.
65. Barnabei, L., Laplantine, E., Mbongo, W., Rieux-Laucat, F., and Weil, R. (2021) NF-κB: At the borders of autoimmunity and inflammation. *Front. Immunol.* 12: 716469.
66. Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010) Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity* 32: 593–604.
67. Rodríguez-Prados, J.C., Través, P.G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., and Boscá, L. (2010) Substrate fate in activated macrophages: A comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol.* 185: 605–614.
68. Rosales, C., and Uribe-Querol, E. (2017) Phagocytosis: A fundamental process in immunity. *BioMed. Res. Int.* 2017: 9042851.
69. Astudillo, A.M., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (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.
70. Rodríguez, J.P., Casas, J., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2025) Bioactive lipid signaling and lipidomics in macrophage polarization: impact on inflammation and immune regulation. *Front. Immunol.* 16: 1550500.
71. Li, J., Wang, X., Zhang, T., Vang, C., Huang, Z., Luo, X., and Deng, Y. (2015) A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* 10: 81–98.
72. Fricker, G., Kromp, T., Wender, A., Blume, A., Zirkel, J., Rebmann, H., Setzer, C., Quinkert, R.O., Martin, F., and Müller-Goymann, C. (2010) Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharm. Res.* 27: 1469–486.
73. Koeberle A., Shindou, H., Harayama, T., and Shimizu, T. (2012) Palmitoleate is a mitogen, formed upon stimulation with growth factors, and converted to palmitoleoyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 287: 27244–27254.
74. Balgoma, D., Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Montero, O., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010) Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* 184: 3857–3865.
75. Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R., Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARα in liver. *Cell* 138: 476–488.
76. Balboa, M.A., Balsinde, J., Dillon, D.A., Carman, G.M., and Dennis, E.A. (1999) Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 274: 522–526.
77. Shirai, Y., Balsinde, J., and Dennis, E.A. (2005) Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted group V, and Ca²⁺-independent group VI phospholipase A₂s in P388D₁ macrophages using GFP/RFP constructs. *Biochim. Biophys. Acta* 1735: 119–129.
78. Lee, J.M., Lee, Y.K., Mamrosh, J.L., Busby, S.A., Griffin, P.R., Pathak, M.C., Ortlund, E.A., and Moore, D.D. (2011) A nuclear receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature* 474: 506–510.
79. O'Donnell, V.B., and Murphy, R.C. (2012) New families of bioactive oxidized phospholipids generated by immune cells: Identification and signaling actions. *Blood* 120: 1985–1992.
80. Thürmer, M., Gollowitzer, A., Pein, H., Neukirch, K., Gelmez, E., Walzl, L., Wielsch, N., Winkler, R., Löser, K., Grandner, J., et al. (2022) PI(18:1/18:1) is a SCD1-derived lipokine that limits stress signaling. *Nat. Commun.* 13: 2982.
81. Straus, D.S., and Glass, C. K. (2007) Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 28: 551–558.
82. Stienstra, R., Duval, C., Keshtkar, S., van der Laak, J., Kersten, S., and Muller, M. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 283: 22620–22627.
83. Silveira, L.S., H.A.P. Batatinha, H.A.P., Castoldi, A., Camara, N.O.S., Festuccia, W.T., Souza, C.O., Rosa Neto, J.C., and Lira, F.S. (2019) Exercise rescues the immune response fine-tuned impaired by peroxisome proliferator-activated receptors gamma deletion in macrophages. *J. Cell. Physiol.* 234: 5241–5251.

84. Prieur, X., Mok, C.Y., Velagapudi, V.R., Nunez, V., Fuentes, L., Montaner, D., Ishikawa, K., Camacho, A., Barbarroja, N., O'Rahilly, S., Sethi, J.K., Dopazo, J., Oresic, M., Ricote, M., and Vidal-Puig, A. (2011) Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60: 797–809.
85. Croasdell, A., Duffney, P.F., Kim, N., Lacy, S.H., Sime, P.J., and Phipps, R.P. (2015) PPAR γ and the innate immune system mediate the resolution of inflammation. *PPAR Res.* 2015: 549691.
86. Jain, M.R., Giri, S.R., Bhoi, B., Trivedi, C., Rath, A., Rathod, R., Ranvir, R., Kadam, S., Patel, H., Swain, P., Roy, S.S., Das, N., Karmakar, E., Wahli, W., and Patel, P.R. (2018) Dual PPAR α/γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int.* 38: 1084–1094.
87. Doffek, K., Chen, X., Sugg, S.L., and Shilyansky, J. (2011) Phosphatidylserine inhibits NF κ B and p38 MAPK activation in human monocyte derived dendritic cells. *Mol. Immunol.* 48: 1771-1777.
88. Pandey, N.R., Sultan, K., Twomey, E., and Sparks, D.L. (2009) Phospholipids block nuclear factor-kappa B and tau phosphorylation and inhibit amyloid-beta secretion in human neuroblastoma cells. *Neuroscience* 164: 1744-1753.
89. Treede, I., Braun, A., Jeliaskova, P., Giese, T., Füllekrug, J., Griffiths, G., Stremmel, W., and Ehehalt, R. (2009) TNF-alpha-induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines is reduced by phosphatidylcholine in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterology* 9: 53.
90. Warda, M., Tekin, S., Gamal, M., Khafaga, N., Çelebi, F., and Tarantino, G. (2025) Lipid rafts: novel therapeutic targets for metabolic, neurodegenerative, oncological, and cardiovascular diseases. *Lipids Health Dis.* 24: 147.
91. Varshney, P., Yadav, V., and Saini, N. (2016) Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology* 149: 13–24.
92. Szustak, M., Korkus, E., Madaj, R., Chworos, A., Dąbrowski, G., Czaplicki, S., Tabandeh, E., Maciejewska, G., Koziolkiewicz, M., Konopka, I., Gliszczyńska, A., and Gendaszewska-Darmach, E. (2024) Lysophosphatidylcholines enriched with cis and trans palmitoleic acid Regulate insulin secretion via GPR119 receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* 15: 197-204.
93. Korkus, E., Szustak, M., Madaj, R., Chworos, A., Drzazga, A., Koziolkiewicz, M., Dąbrowski, G., Czaplicki, S., Konopka, I., and Gendaszewska-Darmach, E. (2023) Trans-palmitoleic acid, a dairy fat biomarker, stimulates insulin secretion and activates G protein-coupled receptors with a different mechanism from the cis isomer. *Food Funct.* 14: 6496–6512.
94. Huang, W., Hong, B., Bai, K., Tan, R., Yang, T., Sun, J., Yi, R., and Wu, H. (2020) Cis- and trans-palmitoleic acid isomers regulate cholesterol metabolism in different ways. *Front. Pharmacol.* 11: 602115.
95. Sierra-Filardi, E., Puig-Kröger, A., Blanco, F.J., Nieto, C., Bragado, R., Palomero, M.I., Bernabeu, C., Vega, M. A., and Corbí, A.L. (2011) Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 117: 5092–5101.
96. Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008) The yin-yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev.* 222: 155–161.
97. Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 72: 219–246.
98. Schumann, J. (2016) It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.* 785: 18–23.
99. Rubio, J.M., Rodríguez, J.P., Gil-de-Gómez, L., Guijas, C., Balboa, M.A. & Balsinde, J. (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.
100. Balsinde, J., Balboa, M.A., Yedgar, S., and Dennis, E.A. (2000) Group V phospholipase A₂-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* 275: 4783–4786.
101. Watanabe, K., Taketomi, Y., Miki, Y., Kugiyama, K., and Murakami, M. (2020) Group V secreted phospholipase A₂ plays a protective role against aortic dissection. *J. Biol. Chem.* 295: 10092–10111.
102. Sendetski, M., Wedel, S., Furutani, K., Hahnefeld, L., Angioni, C., Heering, J., Zimmer, B., Pierre, S., Banica, A.M., Scholich, K., Tunaru, S., Geisslinger, G., Ji, R.R., and Sisignano, M. (2024) Oleic acid released by sensory neurons inhibits TRPV1-mediated thermal hypersensitivity via GPR40. *iScience* 27: 110552.
103. Czauderna, A., Kulkarni, G., Bianchi, N., Cheng, L., Sim, M., Realini, N.R., Gach, J., Caillon, A., Kloehn, J., Lambeau, G., Hausmann, A., Serra, S., Sorbara, M.T., and Becattini, S. (2025) Long-chain unsaturated fatty acids released during immune responses stimulate host-microbe trans-kingdom communication. *Cell Host Microbe* 33: 1–19.
104. Sui, Y., Hou, X., Zhang, J., Hong, X., Wang, H., Xiao, Y., and Zeng, X. (2025) Lipid nanoparticle-mediated targeted mRNA delivery and its application in cancer therapy. *J. Mater. Chem. B.*

105. Pozzi, D., and Caracciolo, G. (2023) Looking back, moving forward: Lipid nanoparticles as a promising frontier in gene delivery. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 6: 1561–1573.
106. Li, H., Wang, Y., Tang, Q., Yin, D., Tang, C., He, E., Zou, L., and Peng, Q. (2021) The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomater.* 129:57–72.
107. Szebeni, J., Bedőcs, P., Urbanics, R., Bünnger, R., Rosivall, L., Tóth, M., and Barenholz, Y. (2012) Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *J. Control. Release* 160: 382–387.
108. Guijas, C.; Pérez-Chacón, G.; Astudillo, A.M.; Rubio, J.M.; Gil-de-Gómez, L.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A₂-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid Res.* 2012, 53, 2343–2354.
109. Rubio, J.M.; Astudillo, A.M.; Casas, J.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front. Immunol.* 2018, 9, 1723.
110. Balsinde, J.; Fernández, B.; Solís-Herruzo, J.A.; Diez, E. Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1136, 75–82.
111. Pérez-Chacón, G.; Astudillo, A.M.; Balgoma, D.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1791, 1103–1113.
112. Balsinde, J.; Balboa, M.A. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cell. Signal.* 2005, 17, 1052–1062.
113. Casas, J.; Gijón, M.A.; Vigo, A.G.; Crespo, M.S.; Balsinde, J.; Balboa, M.A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A₂ to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol. Biol. Cell* 2006, 17, 155–162.
114. Balboa, M.A.; Balsinde, J. Involvement of calcium-independent phospholipase A₂ in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 40384–40389.
115. Balsinde, J.; Dennis, E.A. Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 6758–6765.
116. Balsinde, J.; Diez, E.; Mollinedo, F. Phosphatidylinositol-specific phospholipase D: a pathway for generation of a second messenger. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 154, 502–508.
117. Balboa, M.A.; Balsinde, J.; Dennis, E.A.; Insel, P.A. A phospholipase D-mediated pathway for generating diacylglycerol in nuclei from Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 11738–11740.
118. Johnson, C.A.; Balboa, M.A.; Balsinde, J.; Dennis, E.A. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 27689–27693.
119. Balboa, M.A.; Balsinde, J.; Johnson, C.A.; Dennis, E.A. Regulation of arachidonic acid mobilization in lipopolysaccharide-activated P388D₁ macrophages by adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 36764–3768.
120. Balboa, M.A.; Balsinde, J.; Dennis, E.A. Phosphorylation of cytosolic group IV phospholipase A₂ is necessary but not sufficient for arachidonic acid release in P388D₁ macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 267, 145–148.
121. Gil-de-Gómez, L.; Astudillo, A.M.; Lebrero, P.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Front. Immunol.* 2017, 8: 1251.
122. Pérez R, Melero R, Balboa MA, and Balsinde J. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 2004, 279: 40385–40391.
123. Monge, P., Garrido, A., Rubio, J.M., Magriotti, V., Kokotos, G., Balboa, M.A., and Balsinde, J. (2020) The contribution of cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s to arachidonic acid mobilization in murine macrophages. *Biomolecules* 10: 542.
124. 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.
125. 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.
126. Monge, P.; Astudillo, A.M.; Pereira, L.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. (2023) Dynamics of docosahexaenoic acid utilization by mouse peritoneal macrophages. *Biomolecules* 13: 1635.

127. Astudillo, A.M.; Rodríguez, J.P.; Guijas, C.; Rubio, J.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. (2021) Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNF α gene expression in macrophages via a cPLA $_2\alpha$ /COX-1 pathway. *Cells* 10, 447.
128. 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.
129. Balsinde, J., and M.A. Balboa (2024) Plasmalogens in innate immune cells: from arachidonate signaling to ferroptosis. *Biomolecules* 14: 1461.
130. Rodríguez, J.P.; Guijas, C.; Astudillo, A.M.; Rubio, J.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. 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* 2019, 11, 524.
131. Astudillo, A.M.; Balgoma, D.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1821, 249–256.
132. Astudillo, A.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A $_2$ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 2019, 1864, 772–783.



**THE EICOSANOID
RESEARCH DIVISION**
VALLADOLID