

La incorporación de isómeros de ácido hidroxieicosatetraenoico en fosfolípidos de macrófagos revela una distribución específica que depende de la cabeza polar

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*

May 7, 2026

La incorporación y remodelación de ácidos grasos en fosfolípidos son procesos centrales mediante los cuales las células de la inmunidad innata adaptan sus membranas durante los procesos de activación. Se sabe que los macrófagos integran ácidos grasos oxidados en los fosfolípidos; sin embargo, los principios que gobiernan esta distribución aún no están completamente definidos. Los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) son productos abundantes generados durante la inflamación, y su integración en los fosfolípidos de membrana puede influir en la señalización, el tráfico intracelular y la organización de la membrana. Aunque los distintos isómeros de HETE difieren en su biosíntesis y función, no se sabe si los macrófagos los utilizan de modo diferente. En este trabajo, estudiamos cómo los isómeros 5-, 12- y 15-HETE se incorporan en los fosfolípidos de macrófagos peritoneales de ratón durante una estimulación inflamatoria. Mostramos que cada isómero exhibe una distribución distinta entre las clases de fosfolípidos, con el 12-HETE incorporándose preferentemente en fosfolípidos de colina (PC), el 15-HETE enriqueciéndose en fosfatidilinositol (PI), y el 5-HETE distribuyéndose de forma más amplia entre PC, PI y fosfolípidos de etanolamina (PE). Los tres isómeros se incorporan predominantemente en la posición sn-2 y muestran una distribución similar de especies moleculares dentro de cada clase, siendo las diacil-PC, los plasmalógenos de PE y la especie PI(18:0/HETE) los principales aceptores. Las células RAW264.7 reproducen estos patrones. En las células RAW.108, deficientes en fosfolípidos éter, la falta de incorporación en especies éter se compensa mediante un aumento de la incorporación en PC y PE diacilo, mientras que la incorporación en PI permanece inalterada. En conjunto, estos hallazgos revelan que la clase de fosfolípido, y no la simple disponibilidad, determina dónde se incorporan los HETEs. Esta distribución se conserva entre distintos tipos celulares de macrófagos y permanece intacta incluso en ausencia de fosfolípidos éter, lo que indica que las vías específicas de cada clase, más que la composición de las subclases lipídicas, determinan principalmente la incorporación de HETEs. lipídicas definidas en la reprogramación de la función de los macrófagos en enfermedades inflamatorias.

Financiación: Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PID2022-140764OBI00)

El presente estudio proporciona una visión detallada de cómo los distintos isómeros estructuralmente diferentes de HETE se incorporan en los fosfolípidos de los macrófagos y de cómo este proceso está determinado tanto por la composición del grupo polar como por la presencia de especies unidas mediante enlaces éter. Utilizando macrófagos peritoneales primarios en condiciones que favorecen el recambio lipídico dependiente de fosfolipasa A₂, pudimos comparar directamente el comportamiento de incorporación de los tres principales isómeros de HETE —5-, 12- y 15-HETE— tanto a nivel de clases de fosfolípidos como de especies moleculares. Un

hallazgo notable es que los tres isómeros de HETE se incorporan en cantidades globalmente comparables en los fosfolípidos de macrófagos, aunque muestran diferencias claras en sus preferencias a nivel de clase. El enriquecimiento de 12-HETE en PC, la fuerte incorporación de 15-HETE en PI y la distribución más uniforme de 5-HETE entre las distintas clases indican que la identidad del grupo polar ejerce una influencia sustancial sobre el destino de estos ácidos grasos oxidados. Al mismo tiempo, la importante contribución de los plasmalógenos de PE en los macrófagos peritoneales, así como la distribución alterada observada en su ausencia, destacan el papel modulador de los fosfolípidos unidos por enlaces éter en la configuración de estos patrones. Es importante destacar que la digestión con fosfolipasa A₂ confirmó que los tres HETEs se incorporan mayoritariamente en la posición sn-2, lo que indica que entran en la vía canónica de remodelación lipídica en lugar de ser incorporados mediante mecanismos alternativos.

El análisis de especies moleculares proporcionó una visión más profunda de los determinantes estructurales de las reacciones de incorporación de HETE. A pesar de sus diferentes preferencias a nivel de clase, los tres isómeros exhibieron patrones de incorporación notablemente similares entre las especies dentro de cada clase. En PC, los tres HETEs favorecieron a las especies diacil frente a las especies con enlaces éter como aceptores; en PE, los plasmalógenos fueron los aceptores dominantes; y en PI, una sola especie, PI(18:0/HETE), representó la mayor parte de la incorporación. Estas características sugieren que la maquinaria de remodelación reconoce rasgos estructurales compartidos entre los isómeros de HETE y los dirige hacia un conjunto limitado de especies moleculares particularmente adecuadas para acomodar cadenas acilo oxidadas. Esta observación coincide con la idea de que los ácidos grasos oxidados no se incorporan aleatoriamente en los fosfolípidos de membrana, sino que siguen patrones determinados tanto por la selectividad enzimática como por las características estructurales de los reservorios disponibles de fosfolípidos. Las aciltransferasas implicadas en el reciclaje de ácidos grasos de los fosfolípidos muestran preferencias por grupos polares y combinaciones específicas de cadenas acilo, y el comportamiento de 12-HETE, 15-HETE y 5-HETE podría responder a dichas actividades selectivas.

Es interesante señalar que la distribución de especies moleculares de los HETEs incorporados se asemeja estrechamente a la de los fosfolípidos endógenos que contienen AA, los cuales en macrófagos están enriquecidos en especies de PC que contienen ácido palmítico o esteárico en la posición sn-1, plasmalógenos de PE y especies de PI que presentan ácido esteárico en la posición sn-1. Junto con la esterificación predominante en la posición sn-2 demostrada mediante digestión con fosfolipasa A₂, estos hallazgos respaldan aún más la idea de que los HETEs ingresan en las mismas vías de reciclaje de ácidos grasos que el AA, y que los patrones de incorporación específicos de cada clase surgen de una selectividad enzimática intrínseca más que de la disponibilidad de lisofosfolípidos.

El predominio de especies diacilo de PC para la incorporación de 12-HETE es consistente con la actividad de aciltransferasas selectivas para ácidos grasos poliinsaturados que actúan sobre lisoPC, siendo LPCAT3 un candidato principal. La acumulación selectiva de PI(18:0/HETE) implica fuertemente a MBOAT7, que reacciona preferentemente estearoil-lisoPI con ácidos grasos poliinsaturados. En cuanto a la incorporación de HETE en plasmalógenos de PE, hasta donde sabemos, no se ha demostrado de forma definitiva que alguna aciltransferasa prefiera 2-lisoplasmalógenos como aceptores; sin embargo, algunos estudios han implicado a MBOAT5 como un posible contribuyente a la incorporación de cadenas poliinsaturadas en plasmalógenos de PE. En conjunto, estos candidatos proporcionan un marco mecanístico para explicar la especificidad por clase de fosfolípido observada en nuestro estudio.

Las preferencias por grupo polar observadas en este estudio pueden tener consecuencias importantes sobre la forma en que los macrófagos utilizan los ácidos grasos oxidados durante la activación inflamatoria. El direccionamiento selectivo de 12-HETE hacia PC o de 15-HETE hacia PI podría influir en procesos como la curvatura de membrana, el ensamblaje de complejos de señalización y la disponibilidad de sustratos para posteriores transformaciones enzimáticas. En este sentido, la incorporación en PI resulta particularmente destacable, ya que PI y sus derivados fosforilados participan en una amplia variedad de vías de señalización que

regulan la fagocitosis, el tráfico vesicular y la dinámica del citoesqueleto. La marcada preferencia de 15-HETE por esta clase es consistente con estudios previos y sugiere que su incorporación podría intersectar con vías hasta ahora no identificadas que normalmente no se asocian con ácidos grasos oxidados. Por el contrario, la distribución más amplia de 5-HETE podría reflejar un papel más general en la remodelación de membranas, más que una participación en rutas de señalización específicas. Estas consideraciones apuntan a la posibilidad de que la diversidad estructural de los fosfolípidos no solo acomode HETEs exógenos, sino que también module su impacto funcional dentro de los macrófagos activados.

Los experimentos con células RAW.108 deficientes en fosfolípidos éter proporcionan información sobre el papel de este tipo específico de fosfolípidos en la configuración de estos patrones de incorporación. Además de su función en la modulación de numerosas respuestas celulares clave, como la homeostasis oxidativa, la señalización mediada por lípidos y la fluidez y organización de la dinámica de membrana, se sabe también que los fosfolípidos éter, en particular la fracción de plasmalógenos, constituyen un importante reservorio de ácidos grasos poliinsaturados en células fagocíticas. Por ello, en principio, sería lógico esperar que los fosfolípidos éter desempeñaran un papel importante en la incorporación de HETE en macrófagos. Como era de esperar, la ausencia de lípidos éter eliminó la incorporación en especies de PC unidas por enlaces éter y en plasmalógenos de PE. Sin embargo, en lugar de alterar el patrón global de distribución, el sistema compensa aumentando la incorporación en las correspondientes especies diacilo. Esta compensación preserva la cantidad total de HETE recuperada en las clases PC y PE, demostrando que la red de remodelación redistribuye los ácidos grasos entrantes para mantener el equilibrio a nivel de clase incluso cuando un subconjunto importante de especies moleculares no está disponible. La incorporación en PI permanece esencialmente inalterada, con PI(18:0/HETE) manteniéndose como la especie dominante, lo que subraya la estabilidad de la vía de reciclaje de ácidos grasos de PI.

En conclusión, nuestro trabajo identifica determinantes moleculares clave de cómo los macrófagos incorporan isómeros exógenos de HETE en sus membranas. La identidad del grupo polar emerge como el principal determinante de la incorporación de HETE. La composición de especies moleculares, incluida la presencia o ausencia de enlaces éter, modula la distribución dentro de cada clase, pero no altera la distribución global. Esta robustez sugiere que los macrófagos poseen un sistema de incorporación flexible pero estrechamente regulado, capaz de integrar ácidos grasos oxidados de una manera que preserva tanto la integridad estructural como la especialización funcional. La capacidad del sistema para mantener patrones de incorporación específicos de clase incluso en ausencia de fosfolípidos éter pone de relieve la adaptabilidad de la maquinaria de incorporación de ácidos grasos en fosfolípidos y subraya el papel central de las vías específicas del grupo polar en el control del destino de los ácidos grasos oxidados. Al definir las características estructurales que guían la incorporación de HETE, nuestros resultados proporcionan una base para futuros estudios dirigidos a comprender cómo los lípidos oxidados se integran en las membranas de los macrófagos y cómo estos procesos influyen en las respuestas inflamatorias y en la remodelación de membranas.

REFERENCES

1. Rådmark, O. Formation of eicosanoids and other oxylipins in human macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **2022**, *204*, 115210.
2. Dennis, E.A.; Norris, P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 511–523.
3. Pernet, E.; Poschmann, J.; Divangahi, M. A complex immune communication between eicosanoids and pulmonary macrophages. *Curr Opin. Virol.* **2024**, *66*, 101399.
4. Wang, B.; Wu, L.; Chen, J.; Dong, L.; Chen, C.; Wen, Z.; Hu, J.; Fleming, I.; Wang, D.W. Metabolism pathways of arachidonic acid: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 94.
5. Humes, J.L.; Bonney, R.J.; Pelus, L.; Dahlgren, M.E.; Sadowski, S.J.; Kuehl, F.A.; Davies, P. Macrophages synthesise and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* **1977**, *269*, 149–151.

6. Scott, W.A.; Zrike, J.M.; Hamill, A.L.; Kempe, J.; Cohn, Z.A. Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages. *J. Exp. Med.* **1980**, *152*, 324–335.
7. Scott, W.A.; Pawlowski, N.A.; Murray, H.W.; Andreach, M.; Zrike, J.; Cohn, Z.A. Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. *J. Exp. Med.* **1982**, *155*, 1148–1160.
8. Rouzer, C.A.; Scott, W.A.; Hamill, A.L.; Liu, F.T.; Katz, D.H.; Cohn, Z.A. IgE immune complexes stimulate arachidonic acid release by mouse peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, *79*, 5656–5660.
9. Emilsson, A.; Sundler, R. Evidence for a catalytic role of phospholipase A in phorbol diester- and zymosan-induced mobilization of arachidonic acid in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *876*, 533–542.
10. Balsinde, J.; Fernández, B.; Diez, E. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* **1990**, *144*, 4298–4304.
11. 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.
12. Qiu, Z.H.; Leslie, C.C. Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19480–19487.
13. Gijón, M.A.; Spencer, D.M.; Siddiqi, A.R.; Bonventre, J.V.; Leslie, C.C. Cytosolic phospholipase A₂ is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that do and do not mobilize calcium. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20146–20156.
14. Satake, Y.; Diaz, B.L.; Balestrieri, B.; Lam, B.K.; Kanaoka, Y.; Grusby, M.J.; Arm, J.P. Role of group V phospholipase A₂ in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16488–16494.
15. Rouzer, C.A.; Kingsley, P.J.; Wang, H.; Zhang, H.; Morrow, J.D.; Dey, S.K.; Marnett, L.J. Cyclooxygenase-1-dependent prostaglandin synthesis modulates tumor necrosis factor- α secretion in lipopolysaccharide-challenged murine resident peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34256–34268.
16. Balestrieri, B.; Hsu, V.W.; Gilbert, H.; Leslie, C.C.; Han, W.K.; Bonventre, J. V.; Arm, J.P. Group V secretory phospholipase A₂ translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6691–6698.
17. Suram, S.; Brown, G.D.; Ghosh, M.; Gordon, S.; Loper, R.; Taylor, P.R.; Akira, S.; Uematsu, S.; Williams, D.L.; Leslie, C.C. Regulation of cytosolic phospholipase A₂ activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the β -glucan receptor. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5506–5514.
18. Shirai, Y.; Balsinde, J.; Dennis, E.A. Localization and functional interrelationships among cytosolic group IV, secreted group V, and Ca²⁺-independent group VI phospholipase A₂s in P388D₁ macrophages using GFP/RFP constructs. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1735*, 119–129.
19. Balestrieri, B.; Maekawa, A.; Xing, W.; Gelb, M.H.; Katz, H.R.; Arm, J.P. Group V secretory phospholipase A₂ modulates phagosome maturation and regulates the innate immune response against *Candida albicans*. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4891–4898.
20. Suram, S.; Silveira, L.J.; Mahaffey, S.; Brown, G.D.; Bonventre, J.V.; Williams, D.L.; Gow, N.A.R.; Bratton, D.L.; Murphy, R.C.; Leslie, C.C. Cytosolic phospholipase A₂ α and eicosanoids regulate expression of genes in macrophages involved in host defense and inflammation. *PLoS One* **2013**, *8*, e69002.
21. Gil-de-Gómez, L.; Astudillo, A.M.; Guijas, C.; Magrioti, V.; Kokotos, G.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 752–762.
22. Yun, B.; Lee, H.; Jayaraja, S.; Suram, S.; Murphy, R.C.; Leslie, C.C. Prostaglandins from cytosolic phospholipase A₂ α /cyclooxygenase-1 pathway and mitogen-activated protein kinases regulate gene expression in *Candida albicans*-infected macrophages. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 7070–7086.
23. Werz, O.; Gerstmeier, J.; Libreros, S.; De la Rosa, X.; Werner, M.; Norris, P.C.; Chiang, N.; Serhan, C.N. Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 59.
24. Lands, W.E.M. Stories about acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1483*, 1–14.
25. Murphy, R.C.; Folco, G. Lysophospholipid acyltransferases and leukotriene biosynthesis: Intersection of the Lands cycle and the arachidonate PI cycle. *J. Lipid Res.* **2019**, *60*, 219–226.
26. Roggero, A.; Toyama, M.H.; Sousa, S.F. Lands' cycle at the crossroads: phospholipid remodelling, oxidative stress, cellular toxicity, and therapeutic targeting. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2025**, *8*, 11, 3729–3756.

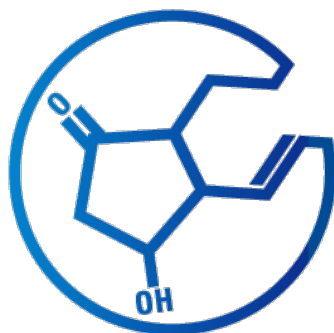
27. Astudillo, A.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Compartmentalized regulation of lipid signaling in oxidative stress and inflammation: Plasmalogens, oxidized lipids and ferroptosis as new paradigms of bioactive lipid research. *Prog. Lipid Res.* **2023**, *89*, 101207.
28. Pawlowski, N.A.; Scott, W.A.; Andreach, M.; Cohn, Z.A. Uptake and metabolism of monohydroxy-eicosatetraenoic acids by macrophages. *J. Exp. Med.* **1982**, *155*, 1653–1664.
29. Stenson, W.; Nickells, M.; Atkinson, J. Esterification of monohydroxyfatty acids into the lipids of a macrophage cell line. *Prostaglandins* **1983**, *26*, 253–264.
30. Giordano, M.J.; Mathur, S.N.; Moore, S.A. Differential metabolism of hydroxyeicosatetraenoic acid isomers by mouse cerebromicrovascular endothelium. *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 374–382.
31. Balsinde, J.; Balboa, M.A.; Yedgar, S.; Dennis, E.A. Group V phospholipase A₂-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4783–4786.
32. O'Donnell, V.B.; Murphy, R.C. Directing eicosanoid esterification into phospholipids. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 837–839.
33. Carpanedo, L.; Wende, L.M.; Goebel, B.; Häfner, A.K.; Chromik, M.A.; Kampschulte, N.; Steinhilber, D.; Schebb, N.H. Substrate-dependent incorporation of 15-lipoxygenase products in glycerophospholipids: 15-HETE and 15-HEPE in PI, 17-HDHA in plasmalogen PE, and 13-HODE in PC. *J. Lipid Res.* **2025**, *66*, 100841.
34. Pérez-Chacón, G.; Astudillo, A.M.; Balmoma, 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.
35. Balmoma, D.; Astudillo, A.M.; Pérez-Chacón, G.; Montero, O.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 3857–3865.
36. Lauder, S.N.; Allen-Redpath, K.; Slatter, D.A.; Aldrovandi, M.; O'Connor, A.; Farewell, D.; Percy, C.L.; Molhoek, J.E.; Rannikko, S.; Tyrrell, V.J.; Ferla, S.; Milne, G.L.; Poole, A.W.; Thomas, C.P.; Obaji, S.; Taylor, P.R.; Jones, S.A.; de Groot, P.G.; Urbanus, R.T.; Hörrkö, S.; Uderhardt, S.; Ackermann, J.; Vince Jenkins, P.; Brancale, A.; Krönke, G.; Collins, P.W.; O'Donnell, V.B. Networks of enzymatically oxidized membrane lipids support calcium-dependent coagulation factor binding to maintain hemostasis. *Sci. Signal.* **2017**, *10*, ean2787.
37. Ruipérez, V.; Astudillo, M.A.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Coordinate regulation of TLR-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A₂s. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 3877–3883.
38. Sun, D.; Funk, C.D. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages: enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24055–24062.
39. Poeckel, D.; Zemski Berry, K.A.; Murphy, R.C.; Funk, C.D. Dual 12/15- and 5-lipoxygenase deficiency in macrophages alters arachidonic acid metabolism and attenuates peritonitis and atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21077–21089.
40. Rodríguez, J.P.; Casas, J.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Bioactive lipid signaling and lipidomics in macrophage polarization: impact on inflammation and immune regulation. *Front. Immunol.* **2025**, *16*, 1550500
41. Huo, Y.; Zhao, L.; Hyman, M.C.; Shashkin, P.; Harry, B.L.; Burcin, T.; Forlow, S.B.; Stark, M.A.; Smith, D.F.; Clarke, S.; Srinivasan, S.; Hedrick, C.C.; Pratico, D.; Witztum, J.L.; Nadler, J.L.; Funk, C.D.; Ley, K. Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **2004**, *110*, 2024–2031.
42. Brash, A.R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23679–23682.
43. Rådmark, O.; Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S40–S45.
44. Rådmark, O.; Werz, O.; Steinhilber, D.; Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 332–341.
45. Miller, Y.I.; Chang, M.K.; Funk, C.D.; Feramisco, J.R.; Witztum, J. L. 12/15-lipoxygenase translocation enhances site-specific actin polymerization in macrophages phagocytosing apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19431–19439.
46. Dong, L.; Wang, H.; Chen, K.; Li, Y. Roles of hydroxyeicosatetraenoic acids in diabetes. *Biomed Pharmacother.* **2022**, *156*, 113981.
47. Helal, S.A.; Gerges, S.H.; El-Kadi, A.O.S. Enantioselectivity in some physiological and pathophysiological roles of hydroxyeicosatetraenoic acids. *Drug Metab. Rev.* **2024**, *56*, 31–45.
48. Diez, E.; Balsinde, J.; Aracil, M.; Schüller, A. Ethanol induces release of arachidonic acid but not synthesis of eicosanoids in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *921*, 82–89.

49. Underhill, D.M. Macrophage recognition of zymosan particles. *J. Endotoxin Res.* **2003**, *9*, 176–180.
50. Balsinde, J.; Balboa, M.A.; Dennis, E.A. Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D₁ macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22544–22549.
51. Kim, J.S.; Kwon, H.Y.; Choi, W.H.; Jeon, C.Y.; Kim, J.I.; Kim, J.; Lee, J.Y.; Kim, Y.S.; Park, J.B. Phagocytosis of serum-and IgG-opsonized zymosan particles induces apoptosis through superoxide but not nitric oxide in macrophage J774A.1. *Exp. Mol. Med.* **2003**, *35*, 211–221.
52. Laassili, C.; Ben El Hend, F.; Benzidane, R.; Oumeslakht, L.; Aziz, A.I.; El Fatimy, R.; Bensussan, A.; Ben Mkaddem, S. Fc receptors act as innate immune receptors during infection? *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1188497.
53. Aderem, A.A.; Wright, S.D.; Silverstein, S.C.; Cohn, Z.A. Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **1985**, *161*, 617–622.
54. Balboa, M.A.; Pérez, R.; Balsinde, J. 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.* **2003**, *171*, 989–994.
55. Balboa, M.A.; Sáez, Y.; Balsinde, J. Calcium-independent phospholipase A₂ is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 5276–5280.
56. Balsinde, J.; Balboa, M.A.; Insel, P.A.; Dennis, E.A. Differential regulation of phospholipase D and phospholipase A₂ by protein kinase C in P388D₁ macrophages. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 805–809.
57. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
58. Zoeller, R.A.; Rangaswamy, S.; Herscovitz, H.; Rizzo, W.B.; Hajra, A.K.; Das, A.K.; Moser, H.W.; Moser, A.; Lazarow, P.W.; Santos, M.J. Mutants in a macrophage-like cell line are defective in plasmalogen biosynthesis, but contain functional peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8299–8306.
59. Gaposchkin, D.P.; Zoeller, R.A. Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line: Insights using ether lipid-deficient variants. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 495–503.
60. Gaposchkin, D.P.; Farber, H.W.; Zoeller, R.A. On the importance of plasmalogen status in stimulated arachidonic acid release in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1781*, 213–219.
61. Pindado, J.; Balsinde, J.; Balboa, M.A. TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A₂/cyclooxygenase-2 pathway. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4821–4828.
62. Lebrero, P.; Astudillo, A.M.; Rubio, J.M.; Fernández-Caballero, J.; Kokotos, G.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: a role for cytosolic phospholipase A₂γ in phospholipid remodeling. *Cells* **2019**, *8*, 799.
63. 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.
64. Axelsen, P.H.; Murphy, R.C. Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 660–671.
65. 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.
66. Astudillo, A.M.; Meana, C.; Bermúdez, M.A.; Pérez-Encabo, A.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* **2020**, *8*, 480.
67. Shipolini, R.A.; Callewaert, G.L.; Cottrell, R.C.; Doonan, S.; Vernon, C.A.; Banks, B.E.C. Phospholipase A from bee venom. *Eur. J. Biochem.* **1971**, *20*, 459–468.
68. Hazan-Halevy, I.; Levy, R. Activation of cytosolic phospholipase A₂ by opsonized zymosan in human neutrophils requires both ERK and p38 MAP-kinase. *Adv. Exp. Mol. Biol.* **2000**, *479*, 115–123.
69. Hazan, I.; Dana, R.; Granot, Y.; Levy, R. Cytosolic phospholipase A₂ and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A₂ and NADPH oxidase. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 867–876.
70. Pfannkuche, H.J.; Kaever, V.; Gemsa, D.; Resch, K. Regulation of prostaglandin synthesis by protein kinase C in mouse peritoneal macrophages. *Biochem. J.* **1989**, *260*, 471–478.
71. Pérez-Chacón, G.; Astudillo, A.M.; Ruipérez, V.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Signaling role for lysophospholipid acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 1071–1078.

72. Rubio, J.M.; Rodríguez, J.P.; Gil-de-Gómez, L.; Guijas, C.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Group V secreted phospholipase A₂ is up-regulated by interleukin-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 3327–3339.
73. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H.A.; Glass, C.K.; Merrill, A.H., Jr.; Murphy, R.C.; Raetz, C.R.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; et al. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 839–861.
74. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R.C.; Nishijima, M.; Raetz, C.R.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M.J.; Dennis, E.A. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S9–S14.
75. 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.
76. Buczynski, M.W.; Stephens, D.L.; Bowers-Gentry, R.C.; Grkovich, A.; Deems, R.A.; Dennis, E.A. TLR-4 and sustained calcium agonists synergistically produce eicosanoids independent of protein synthesis in RAW 264.7 cells. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 22834–22847.
77. Norris, P.C.; Reichart, D.; Dumlao, D.S.; Glass, C.K.; Dennis, E. A. Specificity of eicosanoid production depends on the TLR-4-stimulated macrophage phenotype. *J. Leukoc. Biol.* **2011**, *90*, 563–574.
78. Dennis, E.A.; Deems, R.A.; Harkewicz, R.; Quehenberger, O.; Brown, H.A.; Milne, S.B.; Myers, D.S.; Glass, C.K.; et al. A mouse macrophage lipidome. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 39976–39985.
79. Andreyev, A.A.; Fahy, E.; Guan, Z.; Kelly, S.; Li, X.; McDonald, J.G.; Milne, S.; Myers, D.; et al. Subcellular organelle lipidomics in TLR4-activated macrophages. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2785–2797.
80. Rouzer, C.A.; Ivanova, P.T.; Byrne, M.O.; Milne, S.B.; Marnett, L.J.; Brown, H.A. Lipid profiling reveals arachidonate deficiency in RAW264.7 cells: structural and functional implications. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14795–14808.
81. Rouzer, C.A.; Ivanova, P.T.; Byrne, M.O.; Milne, S.B.; Brown, H.A.; Marnett, L.J. Lipid profiling reveals glycerophospholipid remodeling in zymosan-stimulated macrophages. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6026–6042.
82. Murawska, G.M.; Armando, A.; Dennis, E.A. Lipidomics of phospholipase A₂ reveals exquisite specificity in macrophages. *J. Lipid Res.* **2024**, *65*, 100571.
83. Hayashi, D.; Mouchlis, V.; Dennis, E.A. Each phospholipase A₂ type exhibits distinct selectivity toward sn-1 ester, alkyl ether, and vinyl ether phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **2022**, *1867*, 159067.
84. Hayashi, D.; Dennis, E.A. Differentiating human phospholipase A₂'s activity toward phosphatidylinositol, phosphatidylinositol phosphate and phosphatidylinositol bisphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **2024**, *1869*, 159527.
85. Nagan, N.; Zoeller, R.A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res.* **2001**, *40*, 199–229.
86. Chilton, F.H.; Fonteh, A.N.; Surette, M.E.; Triggiani, M.; Winkler, J.D. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1299*, 1–15.
87. Yamashita, A.; Hayashi, Y.; Nemoto-Sasaki, Y.; Ito, M.; Oka, S.; Tanikawa, T.; Waku, K.; Sugiura, T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog. Lipid Res.* **2014**, *53*, 18–81.
88. Kita, Y.; Shindou, H.; Shimizu, T. Cytosolic phospholipase A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**, *1864*, 838–845.
89. Shindou, H.; Hishikawa, D.; Harayama, T.; Yuki, K.; Shimizu, T. Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S46–S51.
90. Okuno, T.; Gijón, M.A.; Zarini, S.; Martin, S.A.; Barkley, R.M.; Johnson, C.A.; Ohba, M.; Yokomizo, T.; Murphy, R.C. Altered eicosanoid production and phospholipid remodeling during cell culture. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 542–549.
91. Gijón, M.A.; Riekhof, W.R.; Zarini, S.; Murphy, R.C.; Voelker, D.R. Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30235–30245.
92. Hajeyah, A.A.; Griffiths, W.J.; Wang, Y.; Finch, A.J.; O'Donnell, V.B. The biosynthesis of enzymatically oxidized lipids. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 591819.
93. O'Donnell, V.B. Recent updates in mammalian oxylipin biochemistry. *J. Biol. Chem.* **2025**, *301*, 110629.
94. Xie, M.; Koch, E.H.W.; van Walree, C.A.; Sobota, A.; Sonnen, A.F.P.; Breukink, E.; Killian, J.A.; Lorent, J.H. Two separate mechanisms are involved in membrane permeabilization during lipid oxidation. *Biophys. J.* **2023**, *23*, 4503–4517.
95. Libardo, M.D.J.; Wang, T.Y.; Pellois, J.P.; Angeles-Boza, A.M. How does membrane oxidation affect cell delivery and cell killing? *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 686–690.

96. Catalá, A.; Díaz, M. Impact of lipid peroxidation on the physiology and pathophysiology of cell membranes. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 423.
97. Hou, X.; Chen, Y.; Carrillo, N.D.; Cryns, V.L.; Anderson, R.A.; Sun, J.; Wang, S.; Chen, M. Phosphoinositide signaling at the cytoskeleton in the regulation of cell dynamics. *Cell Death Dis.* **2025**, *16*, 296.
98. Rossignol, F.; Lamari, F.; Mitchell, G.A. Phosphoinositide metabolism: biochemistry, physiology and genetic disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2025**, *48*, e70008.
99. Brezinski, M.E.; Serhan, C.N. Selective incorporation of (15S)-hydroxyecosatetraenoic acid in phosphatidylinositol of human neutrophils: agonist-induced deacylation and transformation of stored hydroxyecosanoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 6248–6252.
100. Legrand, A.; Lawson, J.; Meyrick, B.; Blair, I.; Oates, J. Substitution of 15-hydroxyecosatetraenoic acid in the phosphoinositide signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7570–7577.
101. Girton, R.A.; Spector, A.A.; Gordon, J.A. 15-HETE: selective incorporation into inositol phospholipids of MDCK cells. *Kidney. Int.* **1994**, *45*, 972–980.
102. Honsho, M.; Fujiki, Y. Asymmetric distribution of plasmalogens and their roles. *Membranes* **2023** *13*, 764.
103. Kimura, T.; Kimura, A.K.; Epand, R.M. Systematic crosstalk in plasmalogen and diacyl lipid biosynthesis for their differential yet concerted molecular functions in the cell. *Prog. Lipid Res.* **2023**, *91*, 101234.
104. Bozelli, J.C. Jr.; Azher, S.; Epand, R.M. Plasmalogens and chronic inflammatory diseases. *Front Physiol.* **2021**, *12*, 730829.
105. Papin, M.; Bouchet, A.M.; Chantôme, A.; Vandier, C. Ether-lipids and cellular signaling: A differential role of alkyl- and alkenyl-ether-lipids? *Biochimie* **2023**, *215*, 50–59.
106. Astudillo, A.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**, *1864*, 772–783.
107. 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 adrenergic acid mobilization in murine macrophages. *Biomolecules* **2020**, *10*, 542.
108. Monge, P.; Astudillo, A.M.; Pereira, L.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Dynamics of docosahexaenoic acid utilization by mouse peritoneal macrophages. *Biomolecules* **2023**; *13*; 1635.
109. Guijas, C.; Bermúdez, M.A.; Meana, C.; Astudillo, A.M.; Pereira, L.; Fernández-Caballero, L.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Neutral lipids are not a source of arachidonic acid for lipid mediator signaling in human foamy monocytes. *Cells* **2019**, *8*, 941.
110. 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.
111. Gil-de-Gómez, L.; Monge, P.; Rodríguez, J.P.; Astudillo, A.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Phospholipid arachidonic acid remodeling during phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* **2020**, *8*, 274.
112. Balsinde, J.; Winstead, M.V.; Dennis, E.A. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* **2002**, *531*, 2–6.
113. Astudillo, A.M.; Meana, C.; Guijas, C.; Pereira, L.; Lebrero, R.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 237–249.
114. 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.
115. 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.
116. Bermúdez, M.A.; Garrido, A.; Pereira, L.; Garrido, T.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Rapid Rapid movement of palmitoleic acid from phosphatidylcholine to phosphatidylinositol in activated human monocytes. *Biomolecules* **2024**, *14*, 707.
117. 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.
118. 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.
119. Astudillo, A.M.; Rodríguez, J.P.; Guijas, C.; Rubio, J.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNF α gene expression in macrophages via a cPLA 2α /COX-1 pathway. *Cells* **2021**, *10*, 447.
120. 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.

121. Bermúdez, M.A.; Meana, C.; Garrido, A.; Pérez-Encabo, A.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Phosphatidylcholine-bound palmitoleic acid: a bioactive key to unlocking macrophage anti-inflammatory functions. *Biomed. Pharmacother.* **2025**, *192*, 118652.
122. Barceló-Coblijn, G.; Balsinde, J. Advances in lipid research: from bench to bedside. A special issue dedicated to the 63rd International Conference on the Bioscience of Lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **2025**, *1870*, 59624.



**THE EICOSANOID
RESEARCH DIVISION**
VALLADOLID