

TESIS DOCTORAL

Mecanismos de control de los niveles de ácido araquidónico en monocitos y macrófagos*

Alma Astudillo del Valle

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

Fecha de defensa: 29 julio 2011

**Esta es una versión condensada y sin gráficos de la tesis doctoral presentada por Alma Astudillo del Valle para la obtención del título de doctor por la Universidad de Valladolid.*

La respuesta inmune se puede dividir en dos tipos: la inmunidad adaptativa o específica y la inmunidad innata o inespecífica. La primera es una respuesta compleja que se basa en la formación de receptores de superficie de linfocitos, generados por reorganización de genes sometidos a hipermutaciones somáticas cuya función es reconocer una gran variedad de antígenos. Por el contrario, la inmunidad innata o inespecífica está presente en la casi totalidad de organismos multicelulares y constituye la primera línea de defensa frente a patógenos invasores.

Los mecanismos de respuesta inmune innata tienen la capacidad de reconocer directamente una amplia variedad de patógenos a través de un gran repertorio de receptores, denominados receptores de reconocimiento de patógenos (PPRs) [1], los cuales se codifican en la línea germinal. Los PPRs reconocen patrones moleculares conservados de organismos extraños, también conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son capaces de activar directamente las células inmunes, desencadenando una cascada de señalización que conlleva la expresión de una amplia variedad de genes.

Uno de los mecanismos de defensa inespecífica más característicos frente a patógenos es el proceso de inflamación, que representa la respuesta del tejido vivo

al daño local, ya sea traumático, infeccioso, post-isquémico, tóxico o autoinmune. La inflamación se caracteriza clásicamente por los cuatro signos de Celso: calor, rubor, tumor y dolor, y constituye una compleja red de interacciones entre factores solubles y células. Los daños locales inducen una respuesta aguda e inmediata, que en esencia es siempre la misma, independientemente del agente. Dicha respuesta se desencadena gracias a la liberación de una gran variedad de mediadores químicos que pueden aparecer en el tejido en cuestión de segundos, y que tienen como finalidad la extravasación de fluido y células blancas de la sangre, principalmente leucocitos polimorfonucleares, conduciendo a la recuperación de la infección y a la curación del tejido [2, 3].

Dentro del sistema inmune innato las células fagocíticas desempeñan un papel esencial, limpiando los tejidos de manera inespecífica [4]. Existen dos clases de células fagocíticas: polimorfonucleares y mononucleares. El sistema fagocítico mononuclear incluye los macrófagos de los tejidos y los monocitos circulantes, que derivan de los promonocitos, los cuales a su vez derivan de los monoblastos y en último término de las células precursoras en la médula ósea. En condiciones de estimulación, los monocitos se adhieren a las células endoteliales vasculares, migran a tejidos y se diferencian a macrófagos. Todo ello se lleva a cabo principalmente

por el M-CSF (factor de estimulación de la colonia de macrófagos), GM-CSF (factor de estimulación de las colonias de granulocitos y macrófagos), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-3 (IL-3) y otras citoquinas producidas in situ, dando lugar a diferentes tipos de macrófagos en función de donde ocurra la diferenciación [5] (Figura 1).

Entre los mediadores químicos que desencadenan la respuesta inflamatoria destacan los eicosanoides, compuestos de origen lipídico derivados de la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados esenciales de 20 átomos de carbono, principalmente el ácido araquidónico (AA). Debido a la gran actividad biológica de estos compuestos, es esencial el control de los niveles de este precursor en la célula.

1.1. Metabolismo del ácido araquidónico

El ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, n-6) (AA), es un ácido graso esencial, obtenido directamente de la dieta o indirectamente a través de la conversión del ácido linoleico (18:2n-6) por acción consecutiva de las enzimas $\Delta 6$ -desaturasa, que forma el ácido γ -linolénico (18:3n-6 o GLA), elongasa, dando lugar al ácido dihomo γ -linolénico (20:3n-6 o DGLA) y, finalmente, la $\Delta 5$ -desaturasa.

El AA es crucial en las células de la inmunidad innata, pues es precursor de los eicosanoides, mediadores lipídicos que actúan en los procesos de inflamación y sistema nervioso [6, 7], aunque el AA libre puede generar también funciones fisiopatológicas por sí mismo, como por ejemplo induciendo apoptosis [8, 9].

Debido a la gran actividad biológica del AA y, en especial, de sus derivados, es necesario un control exhaustivo y eficaz de sus niveles como ácido graso libre. Para ello se requiere la acción de un amplio grupo de enzimas que trabajen conjuntamente para asegurar bajos niveles de AA libre en la célula en estado basal, evitando la síntesis de eicosanoides y los procesos biológicos llevados a cabo por el propio ácido, así como garantizar su disponibilidad para la producción de

eicosanoides en caso de estimulación celular [10, 11]. Así, en condiciones fisiológicas, el AA se encuentra en su mayoría esterificado en la posición sn-2 de los fosfolípidos (PL), particularmente PL de colina (PC), etanolamina (PE) e inositol (PI), con diferentes enlaces en la posición sn-1 (acilo, alquilo o 1-alqueno) [12].

La regulación de la producción de AA libre está marcada por el equilibrio entre dos reacciones antagónicas: i) la desacilación de AA de los PL, reacción llevada a cabo por las fosfolipasas A2 (PLA2), y ii) el proceso de reacilación, preferentemente en la posición sn-2 de los PL, y subsiguiente transferencia de AA a varios reservorios de PL, reacción llevada a cabo por las enzimas acil-CoA sintetetasas (ACS), lisofosfolípido:acil CoA aciltransferasas (LPLAT) y transacilasas independientes de CoA (CoA-IT) [11].

Dependiendo del estado de la célula, una reacción domina sobre la otra. Así, en células en reposo, la hidrólisis se produce en menor extensión y el AA se encuentra principalmente esterificado. En estas condiciones se considera la fosfolipasa independiente de Ca^{2+} (iPLA2) como una de las principales responsables de la homeostasis de los PL de membrana [13, 14]. En células estimuladas, la reacción que prevalece es la desacilación o hidrólisis, gracias a la activación de PLA2 dependientes de Ca^{2+} , lo que resulta en la liberación de grandes cantidades de AA disponible para la síntesis de eicosanoides [15-19]. Aun así, en condiciones de activación el proceso de reacilación sigue siendo muy significativo, lo que se manifiesta por el hecho de que sólo una pequeña fracción del AA que se libera se utiliza para la síntesis de eicosanoides, y el resto se reacila de nuevo a los PL por acción de las LPLAT [11]. En el apartado 2.2.2 se explican en mayor profundidad las enzimas que participan en el control de los niveles de AA.

1.1.1. Rutas de incorporación de AA en PL

Existen dos rutas diferentes para la incorporación de AA en los PL celulares, las cuales se han descrito en varios tipos celulares, en particular los implicados en reacciones inflamatorias, como macrófagos y neutrófilos [11, 20].

La ruta principal de incorporación de AA en condiciones fisiológicas, cuando la célula está expuesta a bajas concentraciones de AA, ocurre a través del ciclo de Lands [21, 22] que es una ruta de alta afinidad pero de baja capacidad [11]. Esta ruta implica un mecanismo de acilación/desacilación que permite la entrada de ácidos grasos poliinsaturados en la posición sn-2 de los PL. El AA libre presente en las células, procedente de fuentes exógenas o del metabolismo basal de fosfolípidos mediado por acción de las PLA2, puede incorporarse en la posición sn-2 de los PL, en primer lugar a través de la acción de ACS para formar araquidonil-CoA (AA-CoA), y en segundo lugar por la acción de LPLAT [10, 11, 20, 23, 24] (Figura 2). En este mecanismo de incorporación, la disponibilidad de lisofosfolípidos (lisoPL) (que actúan como moléculasceptoras de AA), evento controlado por las PLA2, constituye un factor limitante [13, 19, 25-28].

La segunda ruta opera cuando la célula está expuesta a altos niveles de AA libre, en condiciones que pueden ser patológicas, y conduce a la incorporación del ácido graso a través de la ruta de novo o ruta de Kennedy de biosíntesis de PL. En esta ruta, las moléculas de AA-CoA pueden esterificarse en cualquiera de las dos posiciones del glicerol-3-fosfato (G3P), o incluso en ambas a la vez, lo que daría lugar a PA(20:4/20:4) mediante la acción consecutiva de glicerol-3-fosfato aciltransferasas (GPAT) y ácido lisofosfatídico aciltransferasas (LPAAT). A partir del PA se forma bien TAG —por la acción secuencial de las fosfatidato-fosfohidrolasas (PAP) y diacilglicerolaciltransferasas (DGAT)—, o bien PL— mediante la activación con citidina difosfato (CDP) del DAG (PI) o de la cabeza polar (PC y PE)— [29] (Figura 2). La incorporación de AA a través de esta ruta resulta en la acumulación de AA en TG y la formación de PC(20:4/20:4) principalmente. Se considera que esta ruta de alta capacidad pero baja afinidad funciona fundamentalmente después de que el ciclo de Lands de acilación/desacilación se haya saturado [11, 30-33].

1.1.2. Enzimas de incorporación y remodelación de AA

A) Fosfolipasas A2

Las fosfolipasas son enzimas que actúan sobre los glicerofosfolípidos, hidrolizando sus enlaces carboxiéster o fosfoéster. Las fosfolipasas A2 hidrolizan específicamente el resto acilo de la posición sn-2 del glicerol, dando como productos un ácido graso y el correspondiente lisofosfolípido (Figura 3). La reacción es de especial importancia cuando el ácido graso liberado es AA, ya que es convertido a eicosanoides por acción de posteriores enzimas. Además, si el PL sobre el que actúa la PLA2 posee una cabeza polar de colina en la posición sn-3 y un resto alquílico en la posición sn-1, el otro producto de la reacción es el precursor del factor activador de plaquetas (PAF), otro compuesto de gran relevancia en procesos de inflamación [34]. El lisofosfolípido también puede ser convertido a ácido lisofosfatídico (lisoPA), con múltiples funciones fisiológicas [35]. Por ello, las PLA2 son enzimas cruciales que regulan la producción de lípidos bioactivos. Además, las PLA2 participan en la remodelación de los PL de membrana.

Hasta el momento presente se han clonado y caracterizado 29 enzimas con actividad PLA2 en mamíferos. Todas estas enzimas han sido clasificadas sobre la base de su estructura primaria [36, 37]. Siguiendo este criterio, se han establecido hasta el momento 15 grupos de PLA2s, acorde con la revisión de Burke et al. [38], algunos de los cuales no pertenecen a mamíferos, sino que se encuentran en fluidos extracelulares de diferentes especies como por ejemplo veneno de insectos y reptiles. Existe además otra PLA2 que se ha caracterizado recientemente y es específica de tejido adiposo (PdPLA2). Debido a sus características únicas ha sido propuesta para formar un grupo diferente (grupo XVI) [39, 40], y así ha sido incluida recientemente en la última revisión de PLA2 realizada por Murakami et al. [41].

Desde el punto de vista del mecanismo de catálisis, las PLA2 pueden ser agrupadas en dos grandes familias; las de bajo peso molecular (menos de 20 kDa) que utilizan una diada catalítica de histidina/ácido aspártico (His/Asp), y las de alto peso molecular (más de 40 kDa), que utilizan una serina (Ser) en el centro catalítico, el cual puede estar constituido por la triada catalítica

Ser/His/Asp o por la diada Ser/Asp. La hidrólisis se produce por dos reacciones de sustitución nucleofílica consecutivas. En el centro catalítico que utiliza una His, ésta actúa sobre una molécula de H₂O aumentando su capacidad nucleofílica y permitiendo el ataque de su átomo de oxígeno al carbono carboxílico del PL, proceso que se ve favorecido por la proximidad de un Asp a la His (Figura 4). En el caso del centro catalítico con Ser es el átomo de oxígeno de la misma el que actúa como nucleófilo sobre el carbono carboxílico, a través de un mecanismo similar al que ocurre en las bien conocidas serín proteasas como la tripsina. En cualquiera de los dos casos, el ataque nucleofílico genera un intermedio hemiacetal tetraédrico con el PL, que a continuación se hidroliza liberando el lisoPL y el ácido graso o una acil-enzima, la cual sufre otra sustitución nucleofílica con H₂O [42-44].

Desde un punto de vista de regulación celular, y basándose en propiedades bioquímicas, las PLA2 se suelen clasificar en cinco grupos: secretadas dependientes de Ca²⁺ (sPLA2), citosólicas dependientes de Ca²⁺ (cPLA2), citosólicas independientes de Ca²⁺ (iPLA2), acetilhidrolasas de PAF (PAF-AH) y PLA2 lisosomales [36, 38, 41]. Las PAF-AH hidrolizan el grupo acetilo de la posición sn-2 de PAF, conduciendo a la formación de lisoPAF y ácido acético, aunque también hidrolizan otros grupos acilo de cadena corta así como ácidos grasos oxidados [45, 46]. Las PLA2 lisosomales, por su parte, se localizan en los lisosomas y desempeñan una función común en la homeostasis de surfactante pulmonar [36, 41, 47-49]. Estos dos grupos de enzimas no están por tanto implicados en el metabolismo de AA.

A continuación se describe en mayor profundidad aquellos grupos de PLA2 que están implicados en el metabolismo de AA, es decir, las PLA2 secretadas y las citosólicas dependientes e independientes de Ca²⁺ [50, 51].

PLA2s secretadas (sPLA2s) – En este grupo se incluyen enzimas que se secretan al medio extracelular, en general de bajo peso molecular (14-18 kDa), excepto la sPLA2-III, con un peso de 55 kDa (Tabla 1). Algunas de

ellas se encuentran en fluidos extracelulares de distintos seres vivos, como venenos de insectos y reptiles, además de las identificadas en mamíferos. Todas poseen 6-8 puentes disulfuro conservados, lo que proporciona alta estabilidad en ambientes extracelulares. Poseen una His catalítica, y requieren para la catálisis concentraciones milimolares de Ca²⁺. No muestran selectividad por el ácido graso en la posición sn-2 de los PL, si bien algunas de ellas muestran cierta tendencia por PL aniónicos. Algunas de ellas (GIIA, GV y GX) desempeñan un papel importante en la síntesis de eicosanoides, actuando conjuntamente con la cPLA2 α en la liberación de AA [50]. También se ha descrito su participación en aterosclerosis, enfermedades neuronales y respiratorias, además de poseer propiedades anticoagulantes [43, 52].

PLA2s citosólicas dependientes de Ca²⁺ (cPLA2s) – Este grupo (G-IV) consta de 6 miembros de alto peso molecular (61-114 kDa) que comparten una secuencia consenso GX₂SXS, común a lipasas, y una Ser catalítica (Tabla 2). Todas menos la de grupo IVC poseen un dominio C2 en el extremo N-terminal, el cual une PL y Ca²⁺, permitiendo la traslocación e interacción con las membranas celulares. Así pues, estas enzimas necesitan Ca²⁺ en el rango micromolar para desarrollar su actividad catalítica. De todas ellas, la primera que ha sido clonada, y la que más se ha estudiado es la del grupo IVA o cPLA2a [54], por su especificidad por AA y su capacidad para liberarlo y desencadenar la producción de eicosanoides en condiciones de activación celular mediada por agonista [37].

La traslocación de la cPLA2a en respuesta a un aumento de Ca²⁺ intracelular se produce clásicamente hacia la envoltura nuclear, retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi [42], aunque también se han descrito otros sitios de localización como fagosoma (durante la fagocitosis de partículas de zimosán), membrana plasmática y cuerpos lipídicos [42, 55-60]. Una característica importante es su fosforilación en varios residuos de serina (Ser505, Ser727, Ser515), reacción mediada por varias quinasas [61-65]. Además, la enzima contiene agrupaciones de residuos básicos en el dominio catalítico que se asocian con PL aniónicos, como

fosfoinosítidos (PIPs), que participan en el proceso de activación de la cPLA2a a través de la regulación de la unión de la proteína a la membrana [42, 50].

PLA2s citosólicas independientes de Ca²⁺ (iPLA2s) – Este grupo está compuesto por 6 enzimas diferentes (A-F) (Tabla 3). Ninguna requiere Ca²⁺ para su actividad catalítica, que es llevada a cabo por una Ser en el sitio activo. Todas tienen un motivo lipasa (GX SXG), característica común con las cPLA2. La más estudiada ha sido el grupo VIA, que contiene 5 variantes (VIA-1, VIA-2, VIA-3, VIA anquirina-1 and VIA anquirina-2), aunque solamente las dos primeras poseen actividad catalítica. La primera identificada y caracterizada ha sido el grupo VIA-1 [66-68], denominada clásicamente como iPLA2, la cual contiene 8 repeticiones de anquirina. La función de estas repeticiones de anquirina es promover la oligomerización de la enzima. De hecho, la forma activa de la enzima de grupo VIA es un tetrámero [14, 69].

La iPLA2-VIA se expresa en todos los tejidos, y no tiene preferencia por ningún ácido graso o cabeza polar de PL. Entre sus múltiples funciones, cabe destacar su papel en la homeostasis de los PL celulares, participando en el ciclo de acilación/desacilación (ciclo de Lands). Por ello, es una enzima clave en la distribución del AA dentro de los PL [13]. También ha sido implicada en la liberación de ácidos grasos en condiciones de estrés oxidativo, donde el papel de la iPLA2-VIA no se basa en un incremento de su actividad sino en una mayor susceptibilidad de la membrana a la hidrólisis como consecuencia de la peroxidación [70]; en apoptosis, por acción del otro producto de reacción de la iPLA2, el lisoPC [71] y otros procesos como secreción, ciclo celular, entrada de Ca²⁺, regulación de expresión de genes o isquemia cardíaca, si bien algunos de ellos se han estudiado con el inhibidor inespecífico bromoenol lactona (BEL), por lo que los resultados no se consideran concluyentes [69].

B) Acil-CoA sintetasas

Las ACS catalizan la reacción de tioesterificación de los ácidos grasos con coenzima A (CoA) a expensas de adenosina trifosfato (ATP) y Mg²⁺ (Figura 5). Dicha

etapa de activación de los ácidos grasos es crucial para posteriores reacciones metabólicas de los mismos, y por tanto indispensable para la incorporación de AA en PL.

Todas las ACS enzimáticamente activas contienen al menos dos secuencias de aminoácidos conservados: un dominio de unión AMP (adenosina monofostato) (motivo I), el cual consiste en 10 residuos altamente conservados de bacterias a humanos [72], y un dominio de 36 a 37 residuos [73] (motivo II) en el que hay una secuencia considerada esencial para la unión del sustrato [73]. Este último ha sido usado para asignar las ACS a subfamilias. Hasta el momento se han definido 26 genes como ACS [73], 22 de ellos con actividad enzimática bien definida. Estas enzimas se han clasificado en 5 subfamilias, según la longitud de cadena de sus sustratos preferidos: de cadena corta o ACSS [74, 75], media o ACMS [76, 77], larga o ACSL [78], muy larga o ACSVL [79, 80] y bubblegum o ACSBG [81-83], y otro grupo de cuatro enzimas que no pertenecen a ninguna subfamilia (familia ACS o ACSF). Todas ellas se resumen en las Tablas 4-7. Las ACS que muestran preferencia por AA son típicamente las de la familia ACSL, aunque la familia ACSVL y bubblegum también pueden utilizar AA como sustrato, por ello son los grupos que se explican en mayor detalle a continuación.

Acil-CoA sintetasas de cadena larga (ACSL) – Las ACSL desempeñan un papel imprescindible en la remodelación de los lípidos de membrana, así como en la síntesis de lípidos de novo. Hasta ahora se han descrito 5 isoformas en mamíferos, denominadas ACSL1, 3, 4, 5 y 6 [84] (Tabla 5), con al menos dos variantes de splicing de maduración del RNA mensajero por isoforma. ACSL1 ha sido el primer gen clonado de la familia ACSL en humano [85]. Es abundante en corazón, hígado y tejido adiposo, y usa gran variedad de ácidos grasos como sustrato, con una ligera preferencia por 16:0, 18:1n-9 y 18:2n-6 [86]. ACSL3 se expresa abundantemente en cerebro [87, 88]. Esta enzima posee una marcada selectividad por AA y EPA sobre otros ácidos grasos poliinsaturados, aunque su preferencia por los ácidos mirístico y láurico hace que sea menos específica que la ACSL4 en cuanto al AA. La ACSL4 muestra alta homología con ACSL3, compartiendo el

68% de sus aminoácidos. Se expresa sobre todo en tejido esteroidogénico y se localiza en peroxisomas y membrana mitocondrial. Tanto en humano como en ratón muestra alta selectividad por EPA y AA, indicando una función crítica en el metabolismo de AA [89, 90]. La ACSL5 es la única que se localiza en la membrana mitocondrial externa, indicativo de su participación en la β -oxidación en la mitocondria. Su expresión es abundante en intestino delgado y, en menor extensión, en hígado, y usa una amplia variedad de ácidos grasos saturados e insaturados [91]. Junto con la ACSL3, la ACSL6 es la ACSL que mayoritariamente se expresa en cerebro. Tanto la de ratón como la humana muestran clara preferencia por DHA y AA [92, 93]. Esto sugiere una importante función en la síntesis de membranas neuronales, que experimentan una remodelación rápida de los PL. También la ACSL6 está presente en la membrana plasmática de eritrocitos maduros, donde activa ácidos grasos de cadena larga para la remodelación de lípidos y acilación de proteínas [94].

Acil CoA-sintetasas de cadena muy larga (ACSVL) – Esta familia está compuesta por 6 proteínas integrales de membrana (ACSVL1-6) (Tabla 6) de 70-80 kDa con un dominio N-terminal extracelular/luminal y un dominio C-terminal citosólico. Contienen un motivo propio de las enzimas dependientes de ATP que forman intermediarios adenilados, consistente con su actividad enzimática [95-97]. Son capaces de activar ácidos grasos de cadena larga, con ramificaciones, o muy largos conteniendo más de 22 átomos de carbono. Los miembros de esta familia también se denominan FATP (proteínas transportadoras de ácidos grasos), pues se piensa que están implicados en la traslocación de ácidos grasos largos y muy largos a través de la membrana plasmática [78], bien directamente, o indirectamente a través de su actividad ACS, capaz de atrapar los ácidos grasos en la célula [98]. Así, estas proteínas pueden tener una doble función: el transporte y la esterificación de los sustratos, si bien no queda claro si ambas funciones son dependientes o independientes entre sí [97, 99].

Acil-CoA sintetasas bubblegum (ACSBG) – Se

descubrieron originalmente en el mutante de *Drosophila melanogaster* “bubblegum”, el cual se caracterizó por neurodegeneración y altos niveles de ácidos grasos saturados muy largos [81]. La ACSBG1 en humanos tiene papel en la activación de ácidos grasos largos y muy largos [72]. Recientemente, un segundo miembro (ACSBG2) ha sido localizado en testículos de humano y de ratón, mostrando un alto grado de homología con ACSBG1 [82] (Tabla 7).

C) Lisofosfolípido: acil-CoA aciltransferasas dependientes de CoA (LPLAT)

Las LPLAT son enzimas que catalizan la reacción de esterificación de un ácido graso, activado previamente como acil-CoA, a un grupo hidroxilo de un glicerolípido, aunque también hay enzimas que utilizan proteínas susceptibles de acilarse como sustrato [100]. Dentro de los glicerolípidos, las aciltransferasas más relevantes, acorde con este trabajo, son las que utilizan como sustrato lisoPL, pues participan en el proceso de remodelación de los PL celulares, al esterificar un ácido graso en la posición sn-2 que ha quedado vacante por acción de las PLA2 (Figura 6).

Las células mamíferas contienen un gran número de enzimas con actividad LPLAT localizadas casi exclusivamente en el RE, las cuales exhiben distintos grados de selectividad por los lisoPL aceptores y por los acil-CoA. Existen muchas aciltransferasas que pueden estar implicadas en el reciclaje del AA, específicamente o como parte de una función general en el metabolismo homeostático de PL.

Se han descrito hasta el momento dos familias de enzimas LPLAT: la familia O-aciltransferasa unida a membrana (MBOAT), y la familia 1-acil-glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (AGPAT) [101-103] (Tablas 8 y 9). Mientras que los miembros de la familia MBOAT están implicados específicamente en la remodelación de los ácidos grasos en el ciclo de Lands, los de la familia AGPAT actúan típicamente en la ruta de novo, aunque algunas enzimas también participan en las reacciones de remodelación. En cuanto a las que utilizan lisoPL como aceptores, las proteínas de la familia MBOAT tienen varios dominios transmembrana y un residuo

conservado de His en una región hidrofóbica que se piensa puede constituir el sitio catalítico [104].

Los miembros de la familia de AGPAT, al considerarse en un principio que utilizaban lisoPA específicamente como aceptor, han sido clasificados como aciltransferasas de la ruta de novo de biosíntesis de PL. Más tarde se ha observado que la especificidad es más amplia, pudiendo usar también lisoPC y lisoPE. Presentan cuatro dominios conservados (motivos I-IV) que son importantes para la actividad catalítica y unión a sustrato [105, 106].

Ácido lisofosfatídico:acil-CoA aciltransferasas (LPAAT) – Han sido clonadas y caracterizadas tres LPAAT: LPAAT1 [107-109], LPAAT2 [109, 110] y LPAAT3 [111]. LPAAT1 y LPAAT2 usan varios acil-CoA como donores [112], y se expresan en una amplia variedad de tejidos. LPAAT3 muestra selectividad por AA, aunque también posee actividad LPIAT [111]. Esta última se considera que determina los niveles de ácidos grasos poliinsaturados en células germinales [113]. Recientemente se ha demostrado que la proteína humana CGI-58/ABHD5 muestra actividad LPAAT, con preferencia por AA-CoA y oleil-CoA [114].

Lisoglicerofosfolípido de colina:acil-CoA aciltransferasas (LPCAT) – Hasta ahora se han encontrado tres enzimas en humanos que utilizan preferentemente lisoPC como aceptor, denominadas LPCAT1, LPCAT2 y LPCAT3.

La LPCAT1 (o AGPAT9) [102, 103] fue identificada y caracterizada independientemente por dos grupos diferentes en células alveolares de tipo II de ratón [115, 116]. Se expresa mucho en pulmón, donde parece desempeñar una importante función en la síntesis de fosfolípidos surfactantes, en particular PC(16:0/16:0), que es el componente mayoritario del surfactante pulmonar. Ensayos de actividad muestran selectividad por acil-CoA saturados de longitud media (6:0-16:0) y como aceptor lisoPC, aunque también muestra actividad hacia lisoPA y lisoPG [116]. Es importante para la remodelación de PC en eritrocitos [117]. Recientemente se ha descrito que esta enzima está implicada en la síntesis de PAF en condiciones no inflamatorias e

independientes de Ca²⁺ [118]. La LPCAT1 humana es también abundante en pulmón, y tiene propiedades similares a la de ratón. Otros autores han descrito también la sobreexpresión de LPCAT1 humana en adenocarcinomas de cáncer colorrectal [119].

LisoPAFAT/LPCAT2, clonada y caracterizada en ratón, se considera que es la enzima implicada en la síntesis de PAF en condiciones inflamatorias [120]. Pertenece a la familia de la AGPAT, y se expresa abundantemente en células inflamatorias, principalmente en macrófagos residentes y neutrófilos. Muestra una marcada preferencia por lisoPC. Usando células RAW 264.7 que sobreexpresan LPCAT2, se ha encontrado que en condiciones basales la enzima muestra actividad con los sustratos acetil-CoA y AA-CoA, con más afinidad por el segundo que por el primero. Sin embargo, al estimular las células a través de receptor, la actividad acetiltransferasa aumenta considerablemente, mientras que la de AA no [120].

LPCAT3, también conocida como MBOAT5, presenta altos niveles en tejidos de ratón, especialmente testículos [121]. Muestra selectividad por lisoPC y, en cuanto a ácidos grasos, usa AA y ácido linoleico con preferencia sobre otros ácidos grasos [121]. En humanos se expresa mucho en hígado, páncreas y tejido adiposo, donde además muestra preferencia por ácido linoleico sobre AA [122, 123].

Lisoglicerofosfolípido de etanolamina:acil-CoA aciltransferasas (LPEAT) – Hasta el momento se han encontrado tres tipos diferentes de LPEAT: LPEAT1 (o MBOAT1), LPEAT2 (o AGPAT7) y MBOAT2.

LPEAT1 [121, 122, 124] ha sido caracterizada ampliamente en ratón y muestra preferencia por oleil-CoA. También puede utilizar lisoPS como aceptor, aunque prefiere lisoPE [121]. La enzima humana presenta propiedades similares, aunque muestra mayor preferencia por lisoPS que lisoPE [122]. LPEAT2 ha sido identificada en tejidos humanos por Cao et al. [124]. Se expresa altamente en cerebro y células inflamatorias. Tiene selectividad por palmitoil-, estearoil- y oleil-CoA como donantes, así como lisoPE como aceptor, aunque también puede usar lisoPC,

lisoPG y lisoPS. Debido a que el cerebro está enriquecido en LPEAT2, se piensa que es crucial para la remodelación de PL en este órgano y pudiera estar implicada en desórdenes neurológicos como Alzheimer o esclerosis múltiple.

La MBOAT2 ha sido bien caracterizada en ratón y se expresa abundantemente en epidídimo, cerebro, testículos y ovario, tiene afinidad por oleil-CoA y puede usar lisoPE y lisoPC como aceptores. MBOAT2 humana tiene clara selectividad por lisoPE sobre lisoPC, y también por oleil-CoA [122]. La MBOAT de ratón se ha llamado LPCAT4 porque muestra la misma preferencia por lisoPE que por lisoPC [121].

Lisofosfatidilinositol:acil-CoA aciltransferasas (LPIAT) – Hasta el momento se conoce una enzima que utiliza específicamente lisoPI como sustrato: la MBOAT7, identificada en *Caenorhabditis elegans* [125]. Además, exhibe alta selectividad para AA y EPA, haciendo obvio su papel en el reciclado de AA en PI a través del ciclo de Lands. La homóloga en humanos es BB1/LENG4 y presenta la misma especificidad por sustrato que la enzima de *Caenorhabditis elegans* [122]. La otra LPIAT descrita es la LPAAT3, que, como se ha comentado, usa lisoPA y lisoPI como aceptores.

En las Tablas 8 y 9 se detallan las enzimas aciltransferasas que utilizan acil-CoA y lípidos como sustrato (no están incluidas las de palmitoilación u octanoilación de proteínas).

D) Transacilasa independiente de CoA (CoA-IT) y proceso de remodelación

El proceso de acilación/desacilación en los PL de membrana no es el único mecanismo que controla el movimiento de AA en la célula; también, las reacciones de transacilación entre las diferentes clases de PL son indispensables para la distribución del mismo en los reservorios de PL, especialmente en los plasmalógenos de PE, donde hay una cantidad considerable de AA esterificado [11, 12, 20, 126, 127]. En células inflamatorias, la consecuencia más importante del proceso de remodelación es que, a pesar de que PC es el receptor inicial preferido de AA exógeno, en condiciones

de equilibrio el AA es más abundante en PE que en PC [11, 20] (Figura 7).

La reacción de transacilación es llevada a cabo por la enzima CoA-IT, que transfiere AA principalmente desde los glicerofosfolípidos de colina a plasmalógenos de etanolamina, mediante una reacción de transacilación sin el uso de CoA [128-130] (Figura 8).

El proceso de remodelación de AA dentro de los PL es importante para la síntesis de eicosanoides en condiciones de estimulación, puesto que la liberación de AA ocurre preferentemente de PL con enlaces éter en la posición sn-1 [11, 129] y por ello es necesario que este tipo de PL posea los niveles apropiados de AA. Esta reacción de remodelación es también importante para la generación de PAF [34], ya que se ha observado que un producto típico de la acción de la CoA-IT es precisamente 1-alkil-2-liso-GPC o lisoPAF [131-134].

Existen distintos factores que condicionan la actividad enzimática de la CoA-IT, como por ejemplo la estimulación celular, circunstancias bajo las cuales la velocidad de remodelación aumenta varias veces [129, 135]; también hay una notable diferencia entre células que no proliferan, donde el proceso de remodelación puede llevar horas [129, 136, 137], y células que proliferan, en las que la remodelación se produce en cuestión de minutos [137-139]. De hecho, el bloqueo del proceso a través de la inhibición de la CoA-IT provoca apoptosis celular [140-143]. Aunque la actividad de la CoA-IT se ha estudiado en gran detalle [131-134, 144-146], aún no se ha conseguido ni purificar la enzima ni clonar el gen, lo que dificulta la realización de estudios más profundos sobre el papel de ésta en la remodelación de AA.

1.1.3. Síntesis de eicosanoides y funciones biológicas

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de eicosanoides se produce de una manera muy controlada, teniendo su origen en la liberación de AA de los PL de membrana, lo que constituye el paso limitante para la síntesis de los mismos en células mamíferas. Los eicosanoides engloban un amplio grupo de compuestos que incluyen prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT),

tromboxano (TX), hepoxilinas (HX), lipoxinas, y ácidos hidroxitetraenoicos (HETEs), con múltiples funciones en procesos inflamatorios [6, 147-149] (Figura 9), que actúan en las células inflamatorias a través de receptores específicos acoplados a proteínas G. Estos metabolitos se sintetizan por acción de ciclooxigenasas (COX), lipoxigenasas (LOX) y enzimas citocromo P450 (CYP), aunque también hay algunos derivados que se producen por oxidaciones no enzimáticas de AA (Figura 9).

Las prostaglandinas son moléculas señalizadoras que se forman por acción de las COX sobre el AA, mediante su acción dual ciclooxigenasa y peroxidasa. La COX incorpora O₂ molecular para formar PGG₂, que contiene un anillo de 5 carbonos, un puente endoperóxido y un peróxido. El centro peroxidasa reduce el peróxido a hidroxilo para formar PGH₂, sustrato de diferentes prostaglandinas sintasas dependiendo de tipo celular y tejido, dando lugar a PGD₂, PGE₂ (dinoprostano), PGF_{2α}, PGI₂ (prostaciclina) o tromboxano A₂ (TXA₂) (Figura 10). Las prostaglandinas están implicadas en vasoconstricción, dolor, fiebre o agregación plaquetaria, entre otras funciones [147].

La prostaglandina PGE₂ constituye la molécula señalizadora derivada de AA que más se ha caracterizado. Participa en muchos procesos biológicos y enfermedades como parto, broncodilatación, señalización del dolor, respuestas inmunes innatas y adaptativas, cáncer, artritis y aterosclerosis [150, 151]. PGD₂ es un isómero estructural de la PGE₂. PGF_{2α} participa en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo ciclo endometrial, parto, vasoconstricción, inflamación aguda, daño por privación de O₂ y aterosclerosis [152]. La PGI₂ por su parte inhibe la agregación plaquetaria y constituye la señal fisiológicamente contraria a TXA₂. TXA₂ se sintetiza en plaquetas, produce vasoconstricción y activación de la agregación plaquetaria. TXA₂ contiene un enlace éter inestable que se hidroliza rápidamente in vivo bajo condiciones acuosas para formar TXB₂, biológicamente inactivo.

Las prostaglandinas ciclopentenonas se forman por la

deshidratación de los grupos hidroxilo de PGE₂ y PGD₂ (Figura 10) [147].

Los leucotrienos participan en reacciones de defensa y condiciones fisiopatológicas como la hipersensibilidad inmediata y la inflamación. Los leucotrienos se sintetizan principalmente en células inflamatorias como mastocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos alveolares, y también en el sistema nervioso central [149]. Se forman a partir de AA por la acción de la enzima 5-lipoxigenasa (5-LOX), que se transloca a la envoltura nuclear durante la estimulación celular y cataliza el primer paso enzimático en la síntesis de leucotrienos mediante la adición estereoespecífica de O₂ molecular en el AA creando el ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico (5-HpETE) [153], el cual tiene varios destinos: puede ser secretado tal cual en forma de peróxido, puede reducirse a ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE), o puede ser utilizado por la 5-LOX para formar leucotrieno A₄ (LTA₄). Éste es un intermedio epóxido inestable, que se hidroliza enzimáticamente para generar LTB₄, o forma LTC₄ por adición de glutatión, el cual se metaboliza a LTD₄ y LTE₄ por sucesiva eliminación de los residuos γ -glutamil y glicina (Figura 11). Además, el LTA₄ es precursor de las lipoxinas [147, 149].

El LTB₄ provoca una potente activación autocrina sobre los leucocitos, principalmente los polimorfonucleares, aumenta la permeabilidad vascular, produce quimiotaxis, reclutamiento in vivo y adhesión de leucocitos al endotelio y a vénulas, con el propósito de infiltrar células en el tejido infectado [149].

La mezcla de LTC₄, LTD₄ y LTE₄ (cisteinil-leucotrienos) constituye la sustancia de baja reactividad de la anafilaxis, por su baja y sostenida capacidad de contracción de músculo liso. Tiene una función fisiopatológica en reacciones hipersensibles inmediatas. Dichos cisteinil-leucotrienos son potentes vasoconstrictores, induciendo obstrucción de aire, estimulan la secreción mucosa, activan el músculo liso, incrementan la permeabilidad microvascular de las vías respiratorias y disminuyen la presión sanguínea porque reducen la contractilidad de miocardio y al flujo

sanguíneo coronario [149].

Otros productos con actividad biológica sintetizados por las LOX incluyen HETEs, los cuales pueden reducirse a ácidos oxoeicosatetraenoicos (oxoETEs), hepxilinas (HXA3 y HXB3), que se caracterizan por poseer un grupo epóxido, y lipoxinas, que se generan cuando sobre el AA actúan varias LOX [147] (Figura 9).

Las enzimas citocromo P450 catalizan la hidroxilación y epoxigenación de AA, dando lugar a los ácidos epoxieicosatetraenoicos (EET), que pueden ser posteriormente hidrolizados a ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DHET), y HETEs hidroxilados en los carbonos omega (Figura 9).

1.1.4. Estimulación celular y liberación de AA

De entre los muchos estímulos que se pueden aplicar en células inmunoinflamatorias para estudios de movilización de AA, uno de los más clásicos es el zimosán. El zimosán es una preparación de paredes celulares de levaduras formado de complejos de proteínas y carbohidratos, principalmente manano y β -glucano. Tiene la capacidad de unirse a diferentes tipos de receptores en la superficie del macrófago dependiendo de si las partículas están opsonizadas o no. El zimosán opsonizado se une principalmente a FcR y CR3, y aunque CR3 tiene también la capacidad de unirse a zimosán no opsonizado por diferentes sitios, no induce liberación de AA en macrófagos peritoneales de ratón [154]. Por otra parte, el zimosán no opsonizado se une preferentemente a dectina-1 y, en menor medida, a receptores Toll-like, concretamente TLR2/TLR6. La liberación de AA y la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos en macrófagos peritoneales de ratón mediante estimulación con zimosán no opsonizado se describió hace décadas [155-157], demostrándose ya entonces que una actividad PLA2 es la responsable de promover la liberación de AA en condiciones de estimulación con zimosán [158-160]. Con posterioridad, dicha actividad PLA2 se adscribió a la cPLA2 α , que se regula por fosforilación y elevaciones de la concentración intracelular de Ca²⁺ [161-163]. Además, se transloca al fagosoma durante la fagocitosis de

partículas de zimosán, proceso regulado por la activación de JNK, que fosforila cPLA2 α en Ser505 y que se lleva a cabo gracias a la agrupación catiónica Lys488/Lys541/Lys543/Lys544 en macrófagos derivados de monocitos humanos estimulados con zimosán opsonizado [56, 57]. En la liberación de AA también participa la sPLA2-V [164, 165]. De manera similar, en células dendríticas derivadas de monocitos humanos se ha descrito que el zimosán no opsonizado se une a dectina-1 y DC-SIGN, e induce fosforilación de Syk, activación de cPLA2 α y la consecuente movilización de AA y expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) [166].

1.2. Caveolas y caveolina 1

Las caveolas son invaginaciones de la membrana en forma de matraz de 50 a 100 nm de diámetro. Constituyen microdominios especializados de membrana formados como resultado de la acumulación localizada de colesterol, glicoesfingolípidos y caveolina-1 (cav-1). Se encuentran en muchos tipos celulares, como células endoteliales, epiteliales, células de músculo liso y estriado, adipocitos, fibroblastos o neumocitos de tipo I. Sus funciones incluyen tráfico de vesículas, transporte de colesterol, transducción de señal y supresión de tumor. Las caveolas también sirven como plataformas de compartimentación y concentración de moléculas señalizadoras [167-170].

Cav-1 es una proteína integral de membrana (21-24 kDa) que forma parte de la familia de las caveolinas. Fue primero identificada por Glenney et al. [171-173], y originalmente aislada de dos fuentes diferentes: de vesículas exocíticas derivadas del aparato de Golgi trans [174], y de la caveola [175]. Cav-1 se expresa en todos los tejidos, siendo más abundante en adipocitos (tipo de célula que más cav-1 y número de caveolas posee), células endoteliales, células de músculo liso, mioblastos esqueléticos, fibroblastos y una gran variedad de células epiteliales [170, 176]. Posteriormente se han clonado la caveolina 2 (cav-2) [177] y la caveolina 3 (cav-3) [178]. Cav-2 tiene la misma distribución y colocaliza con cav-1, hasta tal punto que es incapaz de salir del aparato de

Golgi por sí misma, y se degrada rápidamente en células que no expresan cav-1 [179], mientras que cav-3 es exclusiva de músculo esquelético, cardíaco y liso.

La cav-1 tiene tres exones y dos isoformas, α y β [180]. Tiene una topología inusual, formando una horquilla embebida en la membrana con ambos extremos, amino y carboxilo, en el citoplasma (Figura 12) [181]. Se encuentra dentro de la caveola principalmente, aunque según tipos celulares también puede encontrarse en citosol, Golgi, endosomas y cuerpos lipídicos [182, 183]. Desempeña una importante función estructural formando las invaginaciones caveolares [184], y, si la caveola se internaliza, la proteína puede ciclar a varios compartimentos celulares [185, 186]. Además, posee la propiedad de formar oligómeros de alto peso molecular [187, 188]; es capaz de unir colesterol, y está implicada en su incorporación y transporte [189, 190]; también puede interaccionar directamente con proteínas señalizadoras y mantenerlas en conformación inactiva [191]. Hace más de una década la cav-1 se definió como proteína que une ácidos grasos, por tanto implicada en el transporte de los mismos [192-194].

En la actualidad existen varios tipos de ratones modificados genéticamente que no expresan cav-1, generados en diferentes laboratorios. En este trabajo se han utilizado dos tipos de ratones sin cav-1 o knockout (KO): el creado por Drab et al. [196], por escisión del exón 3, que codifica el dominio transmembrana, sitios de palmitoilación, y el dominio scaffolding de la proteína, y el creado por Razani et al. [197], en el que se han reemplazado los exones 1 y 2 y una pequeña porción del promotor 5' con el casete de resistencia a neomicina (Figura 13). Existen además otros dos tipos de ratones: por disrupción del exón 2 [198] y disrupción de los exones 1 y 2 [199].

Los primeros estudios mostraron que estos ratones son viables y fértiles, carecen de caveolas así como de expresión de cav-2 (cav-1 y cav-2 forman heterooligómeros [200]), muestran defectos en la endocitosis y un fenotipo hiperproliferativo, aunque no mayor incidencia de carcinomas [196, 197].

Con el tiempo se han descrito las anomalías de ambos tipos de ratones en mayor profundidad, muchas de las cuales están relacionadas con el metabolismo de lípidos. Las anomalías más destacadas se detallan a continuación. No se aprecian diferencias en el contenido lipídico de las fracciones de membrana resistentes a detergentes ni en la apariencia de tejido adiposo intraperitoneal; sin embargo, a medida que se hacen mayores tienden a ser más delgados, ofrecen resistencia a desarrollar obesidad inducida por dieta, los adipocitos son de menor diámetro, presentan elevados niveles de ácidos grasos libres y TAG, acumulación de quilomicrones, resistencia a insulina, menor incorporación de glucosa, alteración en la formación de cuerpos lipídicos como consecuencia de su papel en el transporte de colesterol, aterosclerosis, alteraciones urogenitales, defectos en angiogénesis, hipermeabilidad vascular, mayor tumorigenicidad cuando son expuestos a carcinógenos y lactancia prematura. Por último, se ha descrito mayor grado de mortalidad entre las 27-65 semanas, consecuencia de una progresiva fibrosis pulmonar (provocada por la hiper celularidad y engrosamiento de la pared alveolar), hipertensión e hipertrofia cardíaca [182, 195, 201].

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar en mayor profundidad los mecanismos de incorporación y remodelación del AA en los PL de membrana de diferentes tipos celulares correspondientes a la línea fagocítica mononuclear, más específicamente promonocitos, monocitos y macrófagos, y la relación de estos procesos con diferentes condiciones celulares, como estimulación celular y contenido endógeno de AA, o con ciertas proteínas, concretamente su relación con la caveolina 1. De forma más específica, los objetivos perseguidos son:

2.1. Entender mejor los aspectos bioquímicos de la incorporación y remodelación del AA en los PL entre las células promonocíticas humanas U937 y monocitos humanos, la relación de los mismos con el estado de diferenciación celular y el contenido endógeno de AA

esterificado.

2.2. Estudiar el proceso de incorporación de AA en monocitos humanos extraídos de sangre periférica en condiciones de estimulación con zimósán, y determinar la enzima del metabolismo del AA responsable del aumento de incorporación observado en situación de activación celular.

2.3. Estudiar el efecto de la ausencia de cav-1 en la incorporación y distribución del AA dentro de los PL de macrófagos peritoneales de ratón, así como el efecto en la liberación del mismo en condiciones de estimulación y su implicación fisiopatológica en procesos de inflamación aguda in vivo.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. *Cultivo de líneas celulares tumorales* – Las líneas celulares U937 y HEK293 se mantuvieron en medio RPMI 1640 y DMEM respectivamente, suplementados con glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y suero fetal bovino a una concentración de 10% (v/v), a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Las HEK293 se despegaron incubando las células con tripsina durante 1 min. La línea celular U937 se diferenció a monocito mediante la administración de PMA a una concentración de 35 ng/ml durante 24 h [206]. En caso de enriquecer las células con AA, estas se incubaron durante 20 h con AA 100 µM complejado con albúmina (BSA) en una proporción 5:1.

3.2. *Aislamiento de monocitos humanos* – El contenido de la bolsa de leucoféresis se diluyó en una proporción 1:1 con PBS, se vertió sobre un colchón de Ficoll, en una proporción 2:1 v/v, y se centrifugó durante 30 min a 1900 rpm (726 g). La capa de células mononucleares que se obtuvo al centrifugar se recogió y se lavó tres veces con PBS, centrifugando en cada caso durante 10 min a 1500 rpm (453 g). Posteriormente, las células se contaron y cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 2 mM y gentamicina a 40 µg/ml, a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de

CO₂, permitiendo la adherencia de los monocitos durante 2 h. Después de ese tiempo los monocitos se lavaron con PBS, eliminando linfocitos y restos celulares que quedaron en suspensión, y se dejaron durante toda la noche en las mismas condiciones mencionadas anteriormente antes de realizar el ensayo.

3.3. *Extracción de macrófagos peritoneales de ratón* – Los macrófagos peritoneales de ratón se extrajeron mediante una modificación del protocolo descrito por Cohn y Benson [207]. Los animales se sacrificaron mediante exposición a CO₂. Posteriormente se abrió la piel abdominal y se les inyectó 5 ml de PBS frío. Tras una agitación suave, se recogió el fluido intraperitoneal, haciendo en total dos extracciones. El contenido intraperitoneal se centrifugó durante 10 min a 1200 rpm (290 g) y las células se cultivaron en placas de 6 pocillos con medio RPMI 1640, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y 10% de FBS, a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂, permitiendo la adherencia de los macrófagos durante toda la noche antes de proceder al ensayo.

3.4. *Preparación de partículas de zimósán* – El zimósán se resuspendió en PBS, se calentó durante 60 min a 100 °C, se centrifugó durante 30 min a 4000 rpm (3220 x g), y se lavó tres veces con PBS, centrifugando en cada caso a 4000 rpm (3220 g) durante 5 min. El precipitado final se resuspendió en PBS a una concentración final de 20 mg/ml y se guardó a -20 °C hasta su uso. Antes de cada experimento, el zimósán se sonicó en un sonicador de tip (Fisher Bioblock Scientific Vibra-Cell 75115) 2 veces durante 20 s [158, 208-210, 213].

3.5. *Inhibidores* – En este trabajo se utilizaron tres inhibidores químicos de PLA₂ [15]: la pirrofenona (Pir), inhibidor de la cPLA₂a, a una concentración de 1 µM, la bromoenol lactona (BEL), inhibidor de la iPLA₂, a una concentración de 10 µM, y el propranolol, que inhibe la enzima fosfatidato fosfohidrolasa-1 (PAP-1), a una concentración de 200 µM. En ensayos de actividad realizados in vitro con anterioridad se demostró que, para concentraciones usadas en este estudio, las actividades de la cPLA₂α y la iPLA₂ se inhiben cuantitativamente con Pir [214-218] y BEL [28, 208,

219-223], respectivamente. Además, a las concentraciones utilizadas la Pir no afecta a la actividad de la iPLA2, así como tampoco para el BEL tiene efecto alguno en la actividad de la cPLA2a. Asimismo, a la concentración utilizada para propranolol la enzima PAP-1 se encuentra completamente inhibida [224, 225]. Los inhibidores se añadieron 30 min a las células antes del estímulo.

3.6. *Liberación de AA en condiciones de estimulación* – Los monocitos, una vez extraídos de la sangre periférica, se dejaron adherir a los pocillos durante 2 h aproximadamente. Después de ese tiempo, los monocitos se lavaron con PBS dos veces y se dejaron en medio incompleto con [3H]AA, a una concentración de 0,25 μ Ci/ml. Pasadas 20 h, las células se lavaron tres veces con medio incompleto conteniendo BSA a una concentración de 0,5 mg/ml con el fin de eliminar el exceso de ácido graso. Tras los lavados, las células se dejaron en medio incompleto con BSA (0,5 mg/ml) y se añadió zimosán, a 1 mg/ml, incubando durante 1 h en presencia de albúmina con el fin de evitar la reacilación del [3H]AA liberado, el cual se compleja a la albúmina presente. Pasado ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron con el fin de descartar restos celulares y células no adheridas y una fracción se recogió para medir la radioactividad, mezclándolo previamente con 3 ml de líquido de centelleo en un contador de centelleo (modelo 6500 de Beckman Coulter LS).

3.7. *Inducción de peritonitis en ratón* – La peritonitis se indujo mediante una inyección intraperitoneal de 1 mg de partículas de zimosán en un volumen de 500 μ l de PBS estéril. A los ratones control se les inyectó sólo PBS. Los ratones se mantuvieron 12 h antes de sacrificarlos en la cámara de CO₂, y el contenido intraperitoneal se extrajo tal y como se detalla en el apartado 4.2.1.3. [226].

3.8. *Incorporación de ácidos grasos radiactivos* – Las células, distribuidas en placas de 6 pocillos en el caso de células adherentes (monocitos, macrófagos peritoneales y HEK293) o en tubos de 1,5 ml en el caso de células en suspensión (U937), se mantuvieron en medio sin suero

durante 1 h a una concentración de 10⁶ células/ml, y posteriormente se añadió [3H]AA (0.25 μ Ci/ml), ácido [14C]palmítico (Pam), ácido [14C]oleico o ácido [14C]docosahexaenoico (DHA) (0.1 μ Ci/ml) a la concentración deseada. Se incubé durante el tiempo oportuno, tras el cual se retiró el medio y las células se lisaron con 150 μ l de Tritón X-100 al 0.1% en agua a 4°C. Posteriormente se extrajeron y separaron los lípidos celulares tal y como se explica en el apartado 4.2.3. Las bandas de sílice correspondientes a las principales especies de lípidos que incorporaron AA, tras ser visualizadas con vapores de yodo, se rasparon y junto con líquido de centelleo se midió la radioactividad en el contador de centelleo.

3.9. *Incorporación de [2H]AA* – Las células U937 (en tubos de 1,5 ml), los monocitos humanos o macrófagos peritoneales (en placas de 6 pocillos), se incubaron 1 h en medio incompleto antes de la adición de [2H]AA a una concentración de 1 o 10 μ M. Se incubaron las células durante 30 minutos y posteriormente se lisaron con agua muy fría.

3.10. *Transfección de siRNA* – Las células se dejaron en medio sin antibiótico durante 2 h antes de añadir una mezcla de siRNA y lipofectamina 2000 (lípidos catiónicos que interaccionan con la membrana y permite la introducción de moléculas, como por ejemplo ácidos nucleicos), hecha en medio Optimem y mantenida durante 20 min para permitir la formación de los complejos, hasta una concentración final en el pocillo de 200 nM de siRNA y 2.5 μ g de lipofectamina, siguiendo las instrucciones del fabricante de la lipofectamina 2000. Las células se incubaron 24 h con el complejo y, transcurrido ese tiempo, se cambió el medio por medio propio de cada tipo celular sin suero. Las células se incubaron otras 24 h adicionales (48 h en total) con el fin de asegurar la degradación de la proteína preexistente. Pasado ese tiempo, se extrajo el mRNA o bien se procedió a un ensayo de incorporación de [3H]AA.

3.11. *Extracción de RNA* – El RNA se extrajo de las células siguiendo el procedimiento descrito por Chomczynski y Sacchi [227] y siguiendo las

instrucciones del reactivo comercial para aislar RNA, Tri Reagent, una disolución de isotiocianato de guanidina en fenol. Se lisaron las células con aproximadamente 1 ml de Tri Reagent por $5-10 \times 10^6$ células durante 5 min a T^a ambiente con el fin de permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitó durante 15 s, se incubó 5 min a T^a ambiente y se centrifugó a 12000 rpm (13400 g) durante 15 min a 4 °C. Se recogió la fase acuosa, donde se encuentra el RNA, que se transfirió a otro tubo junto con 500 μ l de isopropanol. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente con el fin de precipitar el RNA. Se centrifugó a 12000 rpm (13400 x g) durante 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el RNA se lavó con etanol al 75% (en H₂O-DEPC) y se centrifugó a 12000 rpm (13400 g) durante 5 min a 4 °C. El RNA se dejó secar, se disolvió en 25 μ l de H₂O DEPC y se cuantificó a través de medida de absorbancia (A) a 260 nm en un espectrofotómetro UV/visible (BioPhotometer, Eppendorf) usando una cubeta TrayCell (Helma Analytics).

3.12. Síntesis de cDNA – Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se partió de 2 μ g de RNA y se calentó junto con 0.1 nmol de cebadores aleatorios (2 μ l) y 0.1 nmol de oligo dT (2 μ l) entre 70 y 85 °C durante 3 min y se completó con H₂O DEPC hasta un volumen de 13.4 μ l. Las muestras se colocaron en hielo y se añadió 40 nmol de cada dNTP (1.6 μ l de la mezcla comercial), 40 U de inhibidor de RNasa (2 μ l), 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (1 μ l), junto con 2 μ l de su correspondiente tampón de reacción comercial (Tris 500 mM pH 8,3, KCl 500 mM, DTT 50 mM y MgCl₂ 30 mM), siendo el volumen final de la reacción de 20 μ l. La mezcla de reacción se calentó a 43 °C durante 1h, y finalmente a 92 °C durante 10 min. Para la Q-PCR y RT-PCR, se partió de una dilución 1:5 de la anteriormente indicada.

3.13. RT-PCR y electroforesis en geles de agarosa – Para la amplificación de DNA se utilizó cDNA como molde (20 ng), al que se añadieron 20 nmol de cada dNTP (0.8 μ l de la mezcla), 20 pmol de los cebadores

directos e inversos (2 μ l de cada uno), 1 U DNA polimersa termoestable Thermos thermophilus (1 μ l), junto con 5 μ l de su correspondiente tampón de reacción (Tris HCl 750 mM pH 9,0, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM y (NH₄)₂SO₄ 200 mM), y se completó con H₂O DEPC hasta un volumen final de 50 μ l). La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa del 2% (p/v) en TAE 1X y con bromuro de etidio (0,004% v/v) para la visualización de los fragmentos de DNA en luz ultravioleta, en un sistema de documentación de geles (GelDoc XR, Bio-Rad). Los geles se corrieron en tampón TAE 1X.

3.14. Q-PCR (PCR cuantitativa) – La Q-PCR se utilizó como técnica de cuantificación relativa, en la que se determinó el cambio de expresión del gen bajo un tratamiento respecto a una condición control, y normalizado todo respecto a un control endógeno (gen de referencia, cuya expresión se mantiene constante en las muestras que se pretenden comparar). A continuación se explica brevemente en qué se basa el método comparativo $\Delta\Delta CT$ [228, 229]. La ecuación que describe la amplificación exponencial de PCR para un gen dado X en el ciclo umbral CT (punto de intersección entre la línea umbral y la fase exponencial de la curva que representa la fluorescencia emitida en función del número de ciclos de la reacción) se puede expresar como: $XT = X_0(1 + Ex)^{CT,x}$ donde XT es el número de moléculas problema en el ciclo CT, X₀ es el número inicial de moléculas problema y Ex es la eficiencia de la amplificación de la molécula problema. Relativizando la amplificación de la molécula problema en un determinado tratamiento frente a la amplificación de la molécula problema en la situación control, y ambas frente a la amplificación del gen de referencia, así como asumiendo que la eficiencia de amplificación de ambos genes es igual a 1, se llega a la expresión relativa = $2 - \Delta\Delta CT$. Dicha expresión se utilizó para el cálculo de cambios de expresión de ciertos genes en relación a la situación control.

Sonda Taqman. Gene Expression Assay TaqMan consta de los cebadores correspondientes para amplificar la secuencia de interés, a una concentración final de 900 nM cada uno, una sonda Taqman MGB marcada con

colorante 6-FAM (6-carboxifluoresceína), a una concentración final de 250 nM, una DNA polimerasa y un medio de reacción. Como gen de referencia se utilizó la β -actina. Experimentalmente se siguieron las instrucciones dadas por Applied Biosystems. En un tubo de reacción se mezclaron 1 μ l de la sonda TaqMan, 9 μ l del cDNA de interés (1 ng) disuelto en H₂O y 10 μ l del medio de reacción junto con la DNA polimerasa (Taqman Universal PCR Master Mix), siendo el volumen final de 20 μ l.

3.15. *Extracción de lípidos y separación en TLC* – Las células se resuspendieron en H₂O, se añadió el correspondiente estándar interno, en caso de ser necesario, y se procedió a la extracción de los lípidos celulares siguiendo el protocolo descrito por Bligh & Dyer [230]. Se añadieron 3,75 volúmenes (en relación al volumen de la fase acuosa) de cloroformo/metanol 1:2 v/v, se agitó, se añadieron 1,25 volúmenes de H₂O y 1,25 volúmenes de cloroformo, se agitó de nuevo y se centrifugó a 3000 rpm (800 g) durante 5 minutos a 4 °C con el fin de separar las fases. Posteriormente se extrajo la fase orgánica, que se vertió en otro tubo. Sobre la fase acuosa se añadieron 2 volúmenes de cloroformo, se agitó de nuevo y se centrifugó de igual forma. Se extrajo la fase orgánica, que se juntó con la fracción anterior. La fase orgánica extraída se concentró hasta sequedad y se procedió a la separación de los lípidos mediante cromatografía en placa fina (TLC), en los casos necesarios. El extracto lipídico se disolvió en 20 μ l de cloroformo/metanol y se pinchó en una placa de TLC activada previamente mediante calor (65 °C durante 24 h en una estufa), junto con estándares de las correspondientes clases de lípidos. La TLC se desarrolló en el sistema hexano/dietil éter/ácido acético (70:30:1 v/v/v) para la separación de lípidos neutros, cloroformo/metanol/hidróxido de amonio al 28% (65/25/5 v/v/v) para la separación de distintas clases de PL (especialmente PC, PE y PI) [209], y cloroformo/metanol/ácido acético/H₂O (50/40/8/2 v/v/v/v) para la separación de PA y lisoPA [231]. La porción de TLC donde se encontraban los estándares se cortó y se expuso a vapores de yodo, permitiendo su visualización. Los factores de retención (R_f) de los

estándares se utilizaron para localizar los lípidos de la muestra en la TLC. Dichas porciones se cortaron, se introdujeron en tubos de 2 ml y los lípidos fueron reextraídos de la sílice mediante 1 ml de cloroformo/metanol 1:1 v/v, seguido de 1 ml de cloroformo/metanol 2:1 v/v, centrifugando en cada caso la sílice a 12000 rpm (13400 g) durante 5 min con el fin de recoger la fase orgánica limpia.

3.16. *Derivatización de ácidos grasos* – La fase orgánica extraída de la TLC se concentró, se redisolvió en 50 μ l de cloroformo/metanol 2:1 v/v y se introdujo en un tubo de vidrio roscado. Se añadieron 500 μ l de KOH 0.5 M en metanol y se calentó a 37 °C durante 30 min en agitación, produciéndose la transmetilación de los ácidos grasos. La reacción se neutralizó añadiendo un volumen de HCl 0,5 M, y los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se extrajeron dos veces con un volumen de hexano. Esta fase orgánica se guardó a -80 °C en atmósfera de N₂ hasta su análisis.

3.17. *Análisis de ésteres metílicos por GC/MS* – El análisis de los ésteres metílicos obtenidos se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) dotado de un espectrómetro de masas como detector (Agilent 5975 MS) en modo de impacto electrónico (EI, 70 eV), equipado con un inyector automático (Agilent 7693 autosampler) y una columna capilar (Agilent DB-23) [(50%-cianopropil)-metilpolisiloxano] de 60 m x 250 μ m D.I. x 0.15 μ m (grosor de película). El programa de temperatura utilizado, detallado a continuación, es una modificación del descrito por Abu et al. [232].

La temperatura del inlet se mantuvo a 250 °C. La temperatura del horno se programó a 50 °C durante 1 min, se incrementó hasta 175 °C a 25 °C/min, y posteriormente hasta 230 °C a 2,75 °C/min. La temperatura final se mantuvo 5 min, siendo el tiempo total de la carrera 32,8 min. La temperatura de la línea de transferencia del espectrómetro de masas se programó a 250 °C, y la del cuadrupolo y la fuente del MS a 150 °C y 230 °C, respectivamente. Se utilizó He como gas portador, a una presión constante de 26,1 psi. En cada caso se inyectó 1 μ l de muestra en modo splitless (sin división de la muestra). La adquisición de

datos se realizó en modo scan para la identificación de compuestos, y en modo SIM (monitorización de iones seleccionados) para la cuantificación. La identificación de compuestos se realizó usando el tiempo de retención característico para cada FAME (éster metílico de ácido graso) así como la librería de espectros NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología). Para la cuantificación en modo SIM se usaron los siguientes fragmentos: 74 y 87 para FAMES saturados, 83 para monoinsaturados, 67 y 81 para diinsaturados, y 79 y 91 para poliinsaturados [233]. La cuantificación se llevó a cabo mediante el uso de un estándar interno (lípidos análogos al lípido problema del cual se quiere conocer la composición de ácidos grasos pero con cadenas de un número impar de átomos de carbono, que son despreciables en la naturaleza) y mediante una curva de calibración externa para cada FAME. El espectrómetro de masas fue calibrado usando PTFBA (perfluorotributilamina) suministrado con el aparato y usando el protocolo del equipo. El software utilizado fue MSD Productivity Chemstation, G1701EA, revisión E.02.00 SP2 (G1701-64553).

3.18. *Acoplamiento HPLC/ESI/MS* – La separación cromatográfica de los PL se realizó en un sistema de HPLC compuesto por un sistema de bombas binario con desgasificador en línea y régimen de gradiente Hitachi LaChrom Elite L-2130 (Merck) y un inyector Hitachi Autosampler L-2200 (Merck), acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Bruker esquire6000 (Bruker Daltonics). El efluente procedente del HPLC fue dividido, dejando entrar un flujo de 0,2 ml/min a la cámara de electronebulización (ESI) del espectrómetro de masas mediante un separador de caudal. En los casos en los que fue necesario añadir un modificante después de la columna para favorecer la ionización, éste se añadió a través de una jeringa Hamilton, movilizada por un pistón (Cole-Parmer) que proporciona flujo continuo y conectada con la columna a través de una conexión en “T” antes del separador de caudal. La presión del gas de nebulización se ajustó a 30 psi, el caudal del gas de secado a 4 l/min y la temperatura del gas de secado a 350 °C. La calibración de la trampa iónica se realizó mediante el protocolo del propio equipo con la solución Tunning Mix (Agilent).

3.19. *Análisis de especies moleculares de PC, PE y PI* – Los lípidos totales se extrajeron de diferente cantidad de células de acuerdo al procedimiento de Bligh & Dyer, añadiendo previamente los estándares internos apropiados. Se evaporó el disolvente y las muestras se redisolvieron en metanol/agua (9:1 v/v) y se guardaron bajo atmósfera de N₂ a -80 °C hasta su análisis. Para la separación cromatográfica se usó la columna Supelcosil LC-18 de 5 µm de tamaño de partícula, 250 x 2,1 mm (Sigma-Aldrich) protegida con una precolumna Supelguard LC-18 de 20 x 2,1 mm (Sigma-Aldrich). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las descritas por Igbavboa et al. [234] con algunas modificaciones. La fase móvil que se utilizó fue un gradiente del eluyente A (metanol/agua/hexano/hidróxido de amonio al 30%, 87,5:10,5:1,5:0,5 v/v/v/v), eluyente B (metanol/hexano/hidróxido de amonio al 30%, 87,5:12:0,5 v/v/v/v), y eluyente C (metanol/agua, 9:1 v/v). El gradiente utilizado se detalla en la Tabla 11. La velocidad de flujo fue 0,5 ml/min y el volumen de inyección 80 µl. Las especies de PI y PE se detectaron en modo negativo como [M-H]⁻ con corriente de capilar +3500 V a lo largo de los primeros 21 min. Las especies de PC se detectaron como [M+H]⁺ desde el minuto 21 al 35 con corriente de capilar -4000 V. La identificación de las especies de PC se realizó en modo negativo mediante la adición de ácido acético después de la columna con un flujo de 100 µl/h, condiciones en las que se produce el aducto [M+CH₃CO₂]⁻. El rango de m/z rastreado para los experimentos de identificación fue m/z 150-1000 y para los experimentos de detección 450-1000. Se usó la base de datos de Lipid Maps (www.lipidmaps.org) para la identificación de cada especie, y sucesivas fragmentaciones en modo MRM para su caracterización, concretamente los fragmentos correspondientes a las cadenas R1 y R2 de los PL, y del fragmento correspondiente a la pérdida neutra de R2. Como estándares internos así como para curvas de calibrado se usó 1, 2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, m/z = 762,5 para especies de PC, 1,2-didodecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina para especies de PE, m/z = 578,5 y 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoinositol para especies de PI, m/z = 809,5.

En los experimentos de incorporación de [2H]AA a los fosfolípidos celulares, la identificación de las especies que contenían [2H]AA se realizó mediante la visualización de una forma acampanada característica de las señales m/z, debido a la distribución isotópica del [2H]AA, siendo la m/z 8 unidades mayor que su análogo natural como consecuencia de los 8 deuterios, así como por los fragmentos generados en MS/MS, especialmente 311, correspondiente al ion [M-H]⁻ de [2H]AA [235].

3.20. *Cuantificación de proteína* – La proteína se cuantificó usando el método de Bradford [236]. Es un método colorimétrico que se basa en el cambio del máximo de A que sufre el azul de Coomassie G-250 cuando en medio ácido interacciona de forma no covalente con las proteínas, de 465 a 595 nm. Con la absorbancia medida, se determina la concentración de proteínas utilizando la Ley de Lambert-Beer. Para dicho cálculo se realizó una curva patrón con distintas cantidades de BSA, disueltas en H₂O MilliQ, cubriendo un rango de 1 a 10 µg/ml.

3.21. *Medida de actividades enzimáticas* – Las células se lavaron una vez con PBS, se centrifugaron a 1300 rpm (340 g) durante 5 min, se resuspendieron en el tampón en el que se llevó a cabo el ensayo enzimático, y se sonicaron tres veces en el sonicador de tip en tres intervalos de 20 s en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm (13400 g) 10 min a 4 °C para eliminar los núcleos y se recogió el sobrenadante. Se midió la proteína de los homogeneizados mediante el método de Bradford. Todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron con el sustrato en forma de vesículas. Éstas se formaron evaporando el disolvente orgánico en el que se encuentra disuelto el sustrato y sonicando en hielo en un sonicador de tip, en tres intervalos de 20 s en la propia disolución tampón del ensayo de actividad.

Araquidonoil-CoA sintetasa. Se siguió el protocolo utilizado por Wilson et al. [237]. Para realizar la curva de velocidad de reacción frente a concentración de sustrato, se mezcló MgCl₂ 20 mM, ATP 10 mM, CoA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, [3H]AA en un rango de concentraciones de 25-150 µM, y extracto celular correspondiente a 50 µg de proteína en Tris-HCl 100

mM (pH 8) hasta un volumen final de 150 µl. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 10 min en un baño con agitación. Posteriormente, la reacción se paró añadiendo 2,25 ml de 2-propanol/heptano/H₂SO₄ 2 M (40:10:1 v/v/v). Después de la agitación se añadió 1,5 ml de heptano y 1 ml de H₂O. La mezcla se agitó y se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm (800 g). Se recogió la fase acuosa que se lavó dos veces con 2 ml de heptano conteniendo 4 mg/ml de ácido linoleico, con el fin de extraer el sustrato que no ha reaccionado. En la fase acuosa se encuentra el producto de reacción, AA-CoA. Una porción de la fase acuosa se recogió, se mezcló con líquido de centelleo y se midió la radioactividad.

Lisofosfolípido:araquidonoil-CoA aciltransferasa. Se realizó siguiendo una modificación del protocolo descrito por Lands et al. [22]. Para realizar la curva de velocidad de reacción frente a concentración de sustrato, se mezcló MgCl₂ 20 mM, ATP 10 mM, CoA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, [3H]AA 50 µM y lisofosfolípido (LisoPA, LisoPC, LisoPI, o lisoPE) en un rango de concentraciones de 5-50 µM y extracto celular correspondiente a 50 µg de proteína en Tris-HCl 100 mM (pH 8), hasta un volumen final de 150 µl. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 20 min en un baño con agitación. Posteriormente, la reacción se paró añadiendo cloroformo, y tanto los productos de reacción como el resto de los lípidos se extrajeron mediante el método de Bligh & Dyer. La separación de los productos de reacción (PC, PE, PI o PA) se realizó mediante TLC como se explica en el apartado 4.2.3.1. Los puntos correspondientes a las especies lipídicas de interés se visualizaron exponiendo la TLC a vapores de yodo, se rasparon y se mezclaron con líquido de centelleo para la medida de la radioactividad.

Transacilasa independiente de CoA. El ensayo se realizó siguiendo el procedimiento descrito originalmente por Venable et al. [238] y modificado por Balsinde et al. [239]. La mezcla del ensayo se componía de NaCl 120 mM, EGTA 2 mM, homogeneizado celular correspondiente a 100 µg de proteína (el PL que cede el ácido graso lo proporciona el homogeneizado) y varias concentraciones (1,25 a 30 µM de 1-O-[3H]octadecil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina, que constituye el

lisofosfolípido aceptor) en Tris HCl 100 mM (pH 7,5) en un volumen final de 200 μ l. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 5 min. Posteriormente, la reacción se paró con 0,75 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (1:2 v/v), extrayendo la porción lipídica según el procedimiento de Bligh & Dyer. La fase orgánica se concentró y lisoPC y PC se separaron mediante TLC utilizando el sistema de cloroformo/metanol/ácido acético/agua (50:25:8:4 v/v/v/v) o cloroformo/metanol/amoníaco 28% (65:25:5 v/v/v). La porción de sílice correspondiente a lisoPC y PC se raspó, tras ser visualizada con vapores de yodo, y se midió la radioactividad mezclándolo con líquido de centelleo.

La estimación de la V_{max} y K_M de algunas de las actividades enzimáticas descritas anteriormente se realizó mediante la ecuación de Lineweaver-Burk, cuyo principio teórico se detalla brevemente a continuación. La dependencia de la velocidad inicial de una reacción catalizada por enzima (V_0) con la concentración de sustrato ($[S]$), se expresa algebraicamente mediante la ecuación de Michaelis-Menten. La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar algebraicamente en otra ecuación más útil para representar datos experimentales, la denominada ecuación de Lineweaver-Burk, en la que simplemente se obtiene la inversa a ambos lados de la ecuación de Michaelis-Menten, como se muestra a continuación. Esta ecuación permite un fácil y preciso cálculo de K_M y V_{max} , donde K_M es un indicativo de la afinidad de la enzima por su sustrato, mientras que el valor de V_{max} da una idea de la cantidad de enzima presente en la célula.

3.22. *Medición de población granulocítica mediante citometría de flujo* – Las células extraídas de la región intraperitoneal se centrifugaron a 1200 rpm (290 g) durante 10 min y se resuspendieron en PBS estéril, cultivando $0,5 \times 10^6$ células en 100 μ l de PBS por condición. A continuación se bloquearon los receptores Fc con 50 μ l de suero de cabra inactivado (calentado 20 min a 65 °C) durante 45 min a 4 °C. Posteriormente se añadió el anticuerpo a una concentración de 5 μ g/ml (dilución 1:100 del anticuerpo comercial), y se incubó durante 30 min a 4 °C en oscuridad. Las células se

centrifugaron a 1200 rpm (290 g) durante 10 min, se lavaron una vez con PBS estéril y se resuspendieron en 500 μ l finales de PBS en un tubo de citómetro. Las células se analizaron en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) con el software Gallios y los datos se analizaron en el canal FL1 con el software Kaluza 1.1.

3.23. *Medición de PGE2 y LTB4* – La cuantificación de ambos eicosanoides se realizó mediante ensayo ELISA, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

3.24. *Análisis de datos* – Todos los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado. Salvo que se indique otra cosa, las figuras mostradas corresponden a un experimento representativo, y cada dato se muestra como la media \pm error estándar (SE). En el caso de comparar estadísticamente datos, se realizó el test de Student t y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Función de LPCAT3 en las reacciones de reacidación de AA reguladas por receptor

4.1.1. Liberación e incorporación de AA en PL de monocitos estimulados con zimósán

4.1.2. Rutas de incorporación de AA en PL durante la estimulación celular

4.1.3. Implicación de la cPLA2a en la incorporación de AA en PL en monocitos estimulados con zimósán

4.1.4. Incremento de la actividad LPLAT en monocitos estimulados con zimósán

4.1.5. Regulación de la LPCAT3 en células estimuladas

4.2. Influencia de los niveles celulares de AA en la remodelación y actividad enzimática CoA-IT en monocitos y U937

4.2.1. Caracterización de la incorporación y remodelación de AA en monocitos y U937

4.2.2. Análisis mediante HPLC-MS de las especies de PL que incorporan [2H]AA

4.2.3. Influencia de la diferenciación celular en la incorporación y remodelación de AA

4.2.4. Influencia del contenido endógeno de AA en su velocidad de remodelación

4.2.5. Variación de la actividad enzimática CoA-IT con el contenido endógeno de AA

4.3. Efecto de la Cav-1 sobre el metabolismo de AA de macrófagos peritoneales de ratón

4.3.1. Incorporación de ácidos

4.3.2. Incorporación [2H]AA en especies de PL

4.3.3. Análisis de las especies endógenas de PC, PE y PI mediante HPLC-MS

4.3.4. Incremento de la actividad CoA-IT en células sin cav-1

4.3.5. Análisis de ácidos grasos por GC-MS

4.3.6. Análisis de AA en PL en macrófagos estimulados con zimosán mediante GC-MS

4.3.7. Infiltración de neutrófilos en peritonitis inducida con zimosán

5. DISCUSION

5.1. Función de LPCAT3 en las reacciones de reacidación de AA reguladas por receptor

El control de los niveles de AA en la célula se realiza a través de varias reacciones bioquímicas en equilibrio. En un primer lugar, el AA tiene que ser incorporado en los PL celulares. Este proceso de incorporación, común para los ácidos grasos poliinsaturados, se produce

principalmente a través del ciclo de Lands, mecanismo por el que los PL de membrana sufren reacciones de acilación/desacilación en la posición sn-2 [11, 20, 23], aunque alternativamente el AA puede incorporarse a través de la ruta de novo, si la célula está expuesta a altas concentraciones de AA [11]. En estado basal el proceso de incorporación de AA en PL está muy bien caracterizado; sin embargo, se conoce muy poco de su regulación en condiciones de estimulación, donde la activación sostenida de las PLA2s —en particular la cPLA2 α — produce la liberación de AA a una velocidad mayor que la de reacidación en los PL, que culmina en la acumulación de gran cantidad de AA libre, el cual sirve de sustrato para numerosas enzimas que lo oxidan para dar lugar finalmente a una gran variedad de eicosanoides. A este respecto, varios estudios han demostrado que la velocidad de incorporación de AA en PL celulares se incrementa ligeramente después de la estimulación celular en mastocitos de ratón, neutrófilos humanos y macrófagos peritoneales de ratón con la utilización de diferentes estímulos, como PAF, ionóforo o zimosán [129, 131, 158, 251, 252]. Se cree que este incremento es importante para el reabastecimiento de las reservas intracelulares de AA, las cuales se han agotado después de la estimulación [11]. Sin embargo, el aumento del influjo de AA exógeno en PL puede también ocurrir bajo condiciones donde no hay liberación de AA endógeno [137, 209], lo que da indicios de que este proceso puede ser realmente independiente.

Tradicionalmente se ha asumido que la incorporación de AA en PL en condiciones de estimulación celular es un proceso subsiguiente a la etapa de hidrólisis llevado a cabo por las PLA2, debido a que el AA se incorpora preferentemente en la posición sn-2 de los PL. Así pues, para que ocurriera un incremento en la incorporación de AA, las PLA2 tendrían que generar lisoPL a partir de PL. Por otro lado, se ha descrito que las actividades de las enzimas que participan en las reacciones de reacidación, es decir, la actividad acil-CoA sintetasa y la lisofosfolípido:acil-CoA aciltransferasa son varias veces superiores a las de las PLA2 tanto en homogeneizados de células en estado basal como en homogeneizados de células estimuladas, lo que sería concordante con que la

reacción de hidrólisis de las PLA2 sobre los PL para generar lisofosfolípidos constituyera el paso limitante en el proceso de reacilación en condiciones de activación celular.

En este estudio se demuestra que la estimulación de monocitos con zimosán promueve la liberación de AA y que el proceso es dependiente de la activación de la cPLA2 α , pues al hacer ensayos de liberación de AA con pirrofenona, inhibidor de esta enzima, se inhibe completamente la respuesta, un comportamiento descrito con anterioridad en distintos tipos celulares como promonocitos humanos o macrófagos de ratón [253-255]. Sin embargo con el uso de BEL, inhibidor de la iPLA2, la liberación se mantiene inalterada. También se ha observado que las células estimuladas con zimosán presentan un incremento en la incorporación de AA en todas las clases mayoritarias de PL (PI, PC y PE), el cual se produce principalmente a través del ciclo de acilación/desacilación, pues, aunque se demuestra que en estas condiciones la ruta de novo también se activa, su contribución a la incorporación de AA en PL es menor, en vista de los resultados obtenidos con propranolol, inhibidor de PAP-1, enzima que actúa en la ruta de novo.

Un resultado llamativo de estos estudios es que la incorporación de AA es insensible a pirrofenona, lo que pone de manifiesto que el incremento en la incorporación de AA en los PL no está determinado únicamente por el incremento en la cantidad de lisoPL producidos por la activación (mediada por receptor) de la cPLA2 α . El inhibidor BEL sí produce inhibición en la incorporación de AA, si bien esta disminución es la misma en condiciones de estimulación que en condiciones basales. Se ha descrito que la iPLA2 tiene una importante función homeostática, manteniendo los niveles de lisoPL en condiciones basales en macrófagos P388D1 y U937, importante para la incorporación y movilización de AA, o en el control de la disponibilidad de lisoPC, indispensable en señales de apoptosis [25, 27, 28, 239, 248]. Así pues, si se inhibe la enzima bajan los niveles de lisoPL presentes en la célula y como consecuencia el proceso de acilación de AA se ve reducido. Lo que es nuevo e importante de estos

resultados es que la iPLA2 también participa en la incorporación de AA en condiciones de estimulación. Sin embargo, es necesario recalcar que esta contribución parcial es igual en ambos casos, tanto en estado basal como en estimulación, lo que quiere decir que incluso en ausencia de esta enzima hay un aumento neto en la incorporación de AA en condiciones de activación en relación con el estado basal, o, lo que es lo mismo, el efecto provocado por la iPLA2 no condiciona el proceso de incorporación en células activadas.

Así, el proceso de incorporación de AA en estas condiciones no está limitado por la cantidad de lisoPL presentes, y parece constituir en sí mismo un proceso regulado por receptor con entidad propia. Si las PLA2 no regulan directamente esta ruta de incorporación de AA, parece lógico pensar que sí lo hagan las otras enzimas implicadas en la ruta de reacilación, ya sea las acil-CoA sintetasas o las lisofosfolípido:acil-CoA aciltransferasas. Para verificarlo de manera sencilla y directa se han medido las actividades enzimáticas de estos dos grupos de enzimas en homogeneizados de células estimuladas con zimosán.

Hasta este momento se han caracterizado cinco formas diferentes de acil-CoA sintetasa de cadena larga: ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5 y ACSL6 [88, 92, 256]. De todas ellas, la ACSL4 y ACSL6 presentan cierta selectividad por AA, y la ACSL6 también por DHA en células sin tratar [90, 93]. Sin embargo, en este trabajo no se ha detectado ningún incremento en la actividad acil-CoA sintetasa en homogeneizados de células tratadas con zimosán utilizando AA como sustrato, lo que sugiere que esta actividad no se regula por señales extracelulares.

En cuanto a la actividad enzimática LPLAT, ésta se midió para distintas clases de lisoPL como aceptores; lisoPC, lisoPE, lisoPI y lisoPA. Los tres primeros lisoPL toman parte en el ciclo de Lands, y el último es un aceptor de la biosíntesis de novo de PL. Los resultados muestran que en condiciones de estimulación con zimosán solamente la actividad LPCAT aumenta, lo que demuestra que la ruta de reacilación está regulada a nivel de las aciltransferasas. Por el contrario, utilizando

el resto de los lisofosfolípidos no se detectaron cambios en la actividad. El que la actividad LPLAT correspondiente al uso de lisoPA como aceptor se mantenga inalterada es esperable, puesto que los datos han demostrado que la incorporación de AA en PL inducida por zimósán no se produce por la ruta de novo de biosíntesis de PL. Que no haya incremento en la actividad enzimática usando como aceptores lisoPI o lisoPE es más difícil de explicar, puesto que sí se observa un incremento en la incorporación de AA en PE y PI en células estimuladas con zimósán. Además, se han descrito enzimas aciltransferasas con clara preferencia por lisoPE y por lisoPI como aceptores [122, 124, 125]. Es posible que una porción significativa del AA reincorporado en estos PL en células activadas, particularmente en PE, proceda de PC a través de reacciones de transacilación, ya que es bien conocido que dicha ruta contribuye sustancialmente a la remodelación de los ácidos grasos de PL en neutrófilos humanos [131].

En cuanto a las LPCAT, se han descrito hasta el momento cuatro enzimas en humanos con esta actividad. Tres de ellas, LPCAT1, LPCAT2 y LPCAT4, pertenecen a la familia de AGPAT, y la cuarta, LPCAT3, forma parte de la familia MBOAT. En ratón se ha descrito que tanto la LPCAT2 como la LPCAT3 muestran preferencia por AA [120, 121], aunque también por ácido linoleico [120, 123, 250]. Shindou et al. [120] ha descrito aumento de la actividad lisoPAF:acetil-CoA aciltransferasa en RAW 264.7 transfectadas con el gen de ratón LPAF-AT/LPCAT2 y estimuladas con agonistas de TLR. Sin embargo, en ese trabajo no se describió nada relacionado con la actividad LPCAT, lo que sugiere que el principal papel de esta enzima se encuentra más relacionado con el metabolismo de PAF que con el proceso de remodelación general de los PL. De hecho, recientemente se ha descrito que la enzima se fosforila en Ser34 por la acción de la MAPKAP quinasa 2 o MK2, (MAPK-activated protein kinase 2) en macrófagos de ratón, y que la actividad enzimática, utilizando acetil-CoA y araquidonoil-CoA como sustratos, aumenta significativamente en macrófagos transfectados con la enzima y estimulados con LPS, si

bien el aumento de la actividad lisoPAF-AT es mucho más acusado que el de LPCAT [257]. Por otro lado, se ha encontrado actividad LPCAT endógena en macrófagos peritoneales de ratón que aumenta en respuesta a LPS bacteriano, aunque la expresión basal de LisoPAF/LPCAT2 fue casi indetectable, lo que sugiere que esta actividad LPCAT basal que se midió podía deberse a otras isoformas [120]. En este sentido, esta tesis demuestra, utilizando siRNA específico, que la LPCAT implicada en la reaclación de AA en condiciones de estimulación es la LPCAT3 y que la LPCAT2 juega un papel minoritario. Este comportamiento se ha observado en monocitos, promonocitos U937 y también en la línea celular HEK293, poniendo de manifiesto que el comportamiento no se circunscribe a un solo tipo celular, si bien es cierto que la activación de HEK293 no es mediada por receptor, y se aleja del modelo fisiológico de estimulación con zimósán a través de receptor en células fagocíticas.

5.2. Influencia de los niveles celulares de AA en la remodelación y actividad enzimática CoA-IT en monocitos y U937

En este estudio se ha comparado la incorporación y remodelación de AA en los PL de membrana de células promonocíticas humanas (U937) y monocitos humanos extraídos de sangre periférica. La remodelación de AA entre los PL celulares es esencial para lograr la distribución apropiada del ácido graso en los reservorios específicos sobre los que actúan las PLA2 para iniciar la síntesis de eicosanoides [11, 50]. En el proceso de remodelación de AA en los PL participan secuencialmente las lisofosfolípido:acil-CoA aciltransferasas y la transacilasa independiente de CoA [11, 50]. Así, las aciltransferasas dependientes de CoA median la incorporación inicial de AA en PL, y después, gracias a la acción de CoA-IT, el AA se redistribuye entre las clases de PL. Está descrito que tanto la inhibición del proceso de incorporación como el de remodelación de AA altera la homeostasis celular y induce apoptosis [27, 140, 142].

En este trabajo se ha demostrado que las células U937 manifiestan una gran capacidad para incorporar AA en PL, que es cualitativamente similar a la de los monocitos humanos y, en ambos tipos de células, la incorporación en lípidos neutros (TAG) es menor, lo que indica que el AA se incorpora a los PL a través del ciclo de Lands. En ambas células (U937 y monocitos), el AA se incorpora en PC y PI inicialmente, seguido de la transferencia de AA a PE a expensas de PC. Aunque esta remodelación de AA es, en términos cualitativos, similar al descrito en otros sistemas celulares como macrófagos alveolares, peritoneales, neutrófilos o linfocitos [11, 128, 130, 137, 209], lo que la hace notoria en las células U937 es que es extremadamente rápida comparado con los monocitos.

Con el fin de comprobar si el estado de diferenciación celular influye en esta diferencia en la velocidad de remodelación, se indujo la diferenciación de las células U937 hacia monocitos maduros exponiéndolas a PMA, un éster de forbol que provoca el cese de la división celular, adherencia, formación de agregados y expresión de propiedades fenotípicas propias de monocitos maduros, como la expresión de antígenos de superficie [258, 259], así como mayor liberación de AA y síntesis de eicosanoides [206, 260]. Cabe destacar que la incorporación en ambos casos es similar, así como también la velocidad de remodelación es similar entre las U937 sin diferenciar y diferenciadas con PMA. En un principio se puede pensar que el cese de la división de las células al diferenciarse provoca una inevitable disminución en la síntesis de PL puesto que no se requiere la fabricación de nuevas membranas, y por tanto el proceso de la distribución de AA en los mismos pueda verse afectado. Sin embargo estos resultados muestran que el movimiento de AA en PL es independiente de los cambios en el metabolismo de lípidos asociado a la diferenciación, pues la velocidad de remodelación sigue siendo extraordinariamente rápida. Así pues, estos resultados dan indicios de que la regulación de estos eventos es independiente. De hecho, otros autores han descrito con anterioridad que la actividad CoA-IT, enzima responsable de la remodelación de AA, se mantiene inalterada con la diferenciación de las células U937 inducida por DMSO

[261], aunque sí se han descrito cambios en incorporación y liberación de AA o en síntesis de eicosanoides, como consecuencia de aumento de la actividad PLA2 en la diferenciación de células U937 con distintos agentes como DMSO, ésteres de forbol o IFN γ [262-266].

Como se muestra en esta tesis, la cantidad de AA presente en monocitos de sangre periférica representa aproximadamente el 20% del total de los ácidos grasos celulares esterificados. Sin embargo, en las células U937 el AA supone un escaso 3%. Ello lleva a pensar en la posibilidad de que la gran capacidad de las células U937 para remodelar AA en los PL pueda estar relacionada con su “deficiencia” en AA endógeno comparada con monocitos de sangre normales. Con el fin de investigar esta hipótesis, se prepararon células U937 enriquecidas en AA, cultivándolas con AA complejado con BSA, con el fin de que la cantidad endógena de AA fuese similar a la encontrada en los monocitos. Cuando se exponen de nuevo a AA, las células U937 enriquecidas previamente con AA incorporan el ácido graso de una manera tanto cualitativa como cuantitativamente similar a las células U937 sin enriquecer y a los monocitos. Sin embargo, los resultados demuestran que en las células enriquecidas con AA, el proceso de remodelación de AA en los PL es mucho más lento que en el de las células sin tratar, llegando a ser parecido al de los monocitos (el tiempo de remodelación para las células U937 enriquecidas con AA y los monocitos es aproximadamente de 15 h). En las células U937 diferenciadas con PMA, enriquecidas con AA y expuestas a AA por segunda vez ocurre lo mismo; las células remodelan el AA mucho más despacio, pasando de minutos en células sin tratar a varias horas en el caso de células enriquecidas con AA. Estos resultados indican que el contenido celular de AA modifica la velocidad del proceso de remodelación.

Ya que la secuencia de la CoA-IT aún no ha sido descrita, no es posible manipular sus niveles en células mediante las técnicas habituales de sobreexpresión o silenciamiento. Por ello, la única manera de estudiar la regulación celular de la CoA-IT es a través de la medida de la actividad enzimática. Mediante este tipo de experimentos se ha observado que los niveles

intracelulares de AA producen una disminución en la actividad CoA-IT. Así, en homogeneizados de células enriquecidas en AA, la actividad de la CoA-IT es significativamente más baja que en homogeneizados de células sin tratar (deficientes en AA). Después de enriquecer las células con AA, la actividad de la CoA-IT de homogeneizados de estas células presenta una V_{max} menor que la de los homogeneizados de células sin tratar con AA; sin embargo, la KM no sufre variación significativa. Winkler et al. ha demostrado que la actividad CoA-IT no se inhibe directamente por sus sustratos o productos de origen fosfolipídico en células U937, particularmente ácido araquidónico y 1-alkil-2-araquidonoil-PC [261]. Así, una explicación plausible de estos datos podría ser que enriquecer las células con AA lleva a la reducción de la cantidad de masa de CoA-IT, lo que reduce su actividad en homogeneizados. Ello lleva a especular con la posibilidad de que un PL conteniendo AA —o un ácido graso sintetizado a partir de éste, por ejemplo ácido adrenico (22:4n-6), producto de la elongación de AA [267]—, que estuviera presente en las células enriquecidas pero no en las que no están tratadas, pueda regular los niveles de expresión de la CoA-IT. En este sentido, estudios lipidómicos recientes de nuestro laboratorio en monocitos humanos y células U937 han puesto de manifiesto la existencia de un rápido recambio de ciertas especies con AA dependiendo del estado de activación de la célula [12]. Igualmente, existen estudios que han mostrado que ciertas especies moleculares de PL pueden producir efectos notables en la expresión de genes por interacción directa con factores de transcripción. Por ejemplo, la activación de PPAR α mediada por ligando induce la expresión de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos, y Chakravarthy et al. han mostrado recientemente que la especie PC(16:0/18:1) es un ligando endógeno de PPAR α en hígado de ratón, dependiente de la ácido graso sintasa (FAS) [268].

6.3. Efecto de la cav-1 en el metabolismo de AA de macrófagos de ratón

La cav-1 se expresa en todos los tejidos, si bien es más

abundante en adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales [170]. Por otro lado, aunque ha habido discrepancias sobre la expresión de cav-1 en líneas celulares macrofágicas [269], existen evidencias de que la caveola y/o caveolina están presentes en todos los tipos de células inmunes, aunque su nivel de expresión y distribución puede depender de la activación o grado de maduración de la célula [270]. Cav-1 ha sido identificada en macrófagos y mastocitos de ratón [271-275], así como en neutrófilos y células dendríticas humanas [276, 277].

En cuanto a lípidos se refiere, la cav-1 ha sido implicada tradicionalmente en la unión y transporte de colesterol [190, 278]. Además, hace más de diez años se describió que la cav-1 (ambas isoformas, α y β) es capaz de unir ácidos grasos, al tratar proteínas purificadas de membrana plasmática de adipocitos 3T3-L1 con ácido 11-DAPI[11-3H]undecanoico, un ácido graso fotorreactivo que marca la cav-1 de modo saturable [192-194]. Por otro lado, está implicada en la formación y lipólisis de cuerpos lipídicos, según los ensayos realizados en fibroblastos procedentes de ratones KO de cav-1 [279]. Conociendo la implicación de esta proteína en el metabolismo de lípidos, se propuso valorar el efecto de su ausencia en el metabolismo de AA en macrófagos peritoneales de ratón y, de existir alguna diferencia, investigar qué consecuencias tendría en la respuesta inflamatoria. Al hacer ensayos de incorporación con [3H]AA en macrófagos peritoneales procedentes de dos tipos de ratones KO [196, 197], se observó que el AA se incorpora principalmente en PL para todas las concentraciones utilizadas, comportamiento típico de macrófagos peritoneales de ratón [30], aunque en ese caso a concentraciones de 5 μ M la ruta de PL ya estaba saturada, mientras que en los resultados que aquí se muestran, incluso a una concentración de 10 μ M el AA se incorpora principalmente en PL. Lo más llamativo ha resultado ser que los macrófagos sin cav-1 incorporan más AA tanto en PL como en TAG, en comparación con los WT, comportamiento que se mantiene en un intervalo de concentraciones de cuatro órdenes de magnitud. Este efecto no es específico de AA, sino que se observa

también para DHA y otros ácidos grasos comunes como ácido oleico (típico ácido graso monoinsaturado) y palmítico (típico ácido graso saturado), lo que sugiere que la función que la cav-1 ejerce sobre los ácidos grasos no es selectiva, ni en cuanto a longitud ni en número de insaturaciones. El hecho de que los macrófagos de ratones KO incorporen más AA que los WT, o lo que es lo mismo, que en estas condiciones y para este tipo de células la cav-1 actúe de regulador negativo de la incorporación de ácidos grasos, contrasta con lo observado en la bibliografía. El fenotipo de los ratones sin cav-1 muestra alteración de los lípidos plasmáticos y perfil de lipoproteínas en plasma, en particular altos niveles de colesterol y ceramidas [280]; además, presentan alto contenido en ácidos grasos y TAG circulantes, efecto que se agudiza en el estado postprandial, y presentan resistencia a desarrollar obesidad [182, 195, 201]. Todos estos efectos, aunque en parte han sido atribuidos a un defecto en lipogénesis mediado por insulina al faltar el receptor de insulina en estos ratones [195], son congruentes con el papel que desempeña la cav-1 en el transporte de lípidos.

Por otro lado, Pohl et al. ha descrito cómo se reduce la incorporación de ácido [3H]oleico a una concentración de 173 μM y complejado con BSA, en células de hepatoma humano HepG2 [281] deficientes en cav-1 por tratamiento con oligonucleótidos antisentido. Adicionalmente se corroboraron estos resultados al inhibir la expresión de filipina III y ciclodextrina, otras dos proteínas indispensables en la formación de la caveola. Asimismo, en MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) derivados de ratones KO de la cepa de Drab et al. [196] se observa una disminución en la incorporación de ácido oleico (173 μM con BSA 1:1) [282] junto con la pérdida la expresión de FAT/CD36 en la membrana plasmática, proteína transportadora de ácidos grasos cuya deficiencia está asociada a una disminución en la incorporación de los mismos [283]. Según estos estudios, la pérdida de la caveola que acompaña la ausencia de expresión de cav-1 es determinante para la disminución en la incorporación de ácido graso.

La razón por la cual existe esta diferencia con la bibliografía no es fácil de responder aunque es muy

probable que se deba a diferencias derivadas del tipo celular en consideración. En este trabajo se han utilizado macrófagos peritoneales de ratón, células clave de la inmunidad con funciones completamente diferentes a las de las células utilizadas en los trabajos presentes en bibliografía. La mayoría de los estudios están realizados en fibroblastos o adipocitos, células especializadas para el almacenaje de lípidos, donde la caveolina juega papel en lipogénesis y lipólisis [284]. Wu et al. ha descrito cómo en ratones KO de FATP1 la incorporación de moléculas derivadas de lípidos en tejido adiposo y músculo disminuye, mientras la incorporación en hígado y corazón aumenta, indicando una redistribución de los ácidos grasos a tejidos donde la FATP1 está ausente o no se requiere para la incorporación de ácido graso [285]. Esto podría llevar a pensar que algo similar puede ocurrir en los ratones KO de cav-1.

Uno de los aspectos importantes a tener en cuenta es el perfil endógeno, tanto de ácidos grasos como de especies de PL. En cuanto al perfil de ácidos grasos, no se han encontrado diferencias al hacer al análisis mediante GC/MS de los ácidos grasos esterificados en PL, ni en AA ni en ningún otro ácido graso.

Analizando mediante experimentos de metabolipidómica las especies de PL donde se incorpora inicialmente el AA exógeno, se ha observado que en ratones KO este ácido graso se incorpora en mayor medida en PC, PE y PI. Si bien la mayor incorporación se produce en PC, aceptor inicial mayoritario de AA [11, 286], el incremento respecto a la incorporación en los WT es mucho más acusado en PE y PI. De hecho sólo se ha detectado una especie de PE con [2H]AA que fue indetectable en los WT, lo que hace pensar que el proceso de remodelación en las células KO es más rápido que en los WT [11], aunque está descrito que en células primarias lleva horas en alcanzar la misma cantidad de AA en PC que en PE [129, 137, 209]. Esta diferencia en la velocidad de remodelación se corroboró midiendo la actividad CoA-IT y comprobando que hay más actividad en los homogeneizados de células KO, aunque no se sabe si el aumento implica cambio en la proteína de afinidad por el sustrato o aumento en su expresión. El aumento en la velocidad de remodelación

favorece a su vez el proceso de incorporación en PC, ya que la transferencia de AA de PC a PE genera lisoPC disponibles para reaclilar nuevas moléculas de AA.

En cuanto al perfil endógeno de especies de PL, las especies mayoritarias conteniendo AA son similares a las de otros estudios [12, 287, 288]. Sin embargo, merece ser destacado que en los ratones KO hay menos AA en PC y más en PE y PI en comparación con los WT, lo que es nuevamente consistente con la presencia de una mayor actividad CoA-IT en los macrófagos de ratones KO. La falta de cav-1 provoca en definitiva una redistribución de AA entre las distintas clases de PL, si bien es importante destacar que los niveles de AA en el equilibrio son idénticos, lo que sugiere que los mecanismos homeostáticos globales de utilización de AA no están alterados.

En cuanto a especies sin AA, quizás la más destacada sea PC(16:0/16:0), que es menos abundante en los KO. Esta especie (DPPC) constituye el principal componente del surfactante pulmonar. Los ratones KO de cav-1 desarrollan fibrosis pulmonar y presentan fatiga cuando son expuestos a ejercicio físico y, aunque ello se ha relacionado con un tejido alveolar más engrosado como consecuencia del fenotipo hiperproliferativo [197] -ya que la expresión de cav-1 se considera supresora de tumor [289]- sería interesante medir la especie en tejido pulmonar, por si sus niveles pudieran estar asociados a los problemas respiratorios.

Cuando las células procedentes de ratones KO se estimulan con zimosán se aprecia menor liberación de AA que en ratones WT (un 20% menos). Esto podría ser simplemente un reflejo de la mayor capacidad de acilación y remodelación de ácidos grasos de estas células, también en condiciones de activación, aunque también podría ser consecuencia de la distribución anormal de AA en los PL en las células sin cav-1, o a un defecto en los mecanismos de activación de las enzimas que catalizan la liberación del AA, esto es, las PLA2. En este sentido, se sabe que cav-1 interacciona con proteínas y modifica su actividad; un ejemplo muy claro es su capacidad de inhibir eNOS [197]. Hay estudios que describen co-localización de cav-2 con sPLA2-V

[290], y otros que muestran que la cav-1 colocaliza con cPLA2 α e interacciona con ella positiva o negativamente según el tipo celular en cuestión [291-293]. Además, se ha descrito también su co-localización con COX2 en fibroblastos [294]. En futuras direcciones del trabajo será necesario evaluar si la falta de cav-1 afecta a la acción de las PLA2 en condiciones de estimulación, y por tanto a la liberación de AA, o a otras enzimas de las reacciones subsiguientes.

Como consecuencia de la menor liberación de AA se ha medido la producción de PGE2 y de LTB4 (dos mediadores típicos en la respuesta proinflamatoria aguda). Se ha observado menor producción de ambos, tanto en situación basal como en estimulación, lo que sugiere que la maquinaria de síntesis de eicosanoides está intacta, y lo que falta es sustrato, es decir, AA, como consecuencia de una mayor reaclilación. Esta disminución produce efectos *in vivo*, de tal manera que los ratones KO exhiben menor infiltración de PMN al inducir peritonitis en los ratones. Así, la cav-1 desempeña un papel proinflamatorio, lo que es remarcable, ya que no existen muchas evidencias implicando a la cav-1 en las reacciones de inmunidad. Los trabajos de cav-1 en macrófagos involucran a esta proteína en metabolismo de lípidos, especialmente en el transporte de colesterol, y también se considera importante su papel en aterosclerosis y formación de células espumosas [269], aparte de su función en apoptosis [295]. Por otro lado, se ha visto que la expresión de cav-1 está afectada por el tratamiento de LPS *in vitro* en macrófagos peritoneales, si bien aumenta (en macrófagos peritoneales extraídos con tioglicolato) o disminuye (en la línea celular RAW 264.7), lo que sugiere que la cav-1 puede ser una proteína reguladora que contribuye a la señalización celular producida por LPS [275, 296].

Además, la caveola parece jugar un papel importante en la internalización de patógenos, de tal manera que ciertos ligandos y moléculas extracelulares, como toxinas de cólera y tétanos, son transportados a través de la caveola [270, 278]. Wang et al. [297] han demostrado que en ausencia de cav-1 se incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-6) y disminuye

la citoquina antiinflamatoria IL-10 en macrófagos alveolares de ratones KO estimulados con LPS, lo que sugiere que la cav-1 modula la respuesta inmune inflamatoria, aunque en este mismo trabajo los macrófagos peritoneales no muestran ninguna modulación de la producción de citoquinas. Por otro lado, Medina et al. [298] han demostrado que los ratones KO infectados con Salmonella enterica Serovar Typhimurium, así como sus macrófagos peritoneales, desarrollan una mayor respuesta inflamatoria a juzgar por la mayor producción de citoquinas, quimoquinas y óxido nítrico, menor supervivencia y mayor infiltración de bacterias en tejidos. Sin embargo, en un trabajo similar donde se infectaron ratones KO con el parásito Trypanosoma cruzi se observa el efecto contrario, basado en la reducción de parasitemia y de la producción de mediadores inflamatorios como IFN γ , TNF α y otras quimoquinas y citoquinas [299], es decir, una reducción de la respuesta inflamatoria, en consonancia con los datos que se muestran en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

6.1. Los monocitos estimulados con zimosán presentan un aumento en la incorporación de AA en PI, PC y PE, a través del ciclo de Lands mayoritariamente, y no a través de la ruta de novo.

6.2. El aumento de la incorporación de AA en monocitos estimulados con zimosán no es consecuencia

de la activación de PLA2 y subsiguiente aumento de la disponibilidad de lisofosfolípidos aceptores, sino de la activación de la actividad LPCAT, concretamente a la activación de la enzima LPCAT3.

6.3. La diferencia en la velocidad de remodelación del AA en monocitos humanos y promonocitos U937 no es debida a la diferencia en el estado de diferenciación, sino al contenido endógeno de AA, que provoca la disminución en la Vmax de la actividad CoA-IT.

6.4. La ausencia de cav-1 provoca mayor reacilación de AA, a juzgar por el aumento en la incorporación de AA de macrófagos peritoneales de ratón, aunque el efecto no es específico para este ácido graso.

6.5. El exceso de AA que se incorpora en macrófagos peritoneales de ratones KO lo hace principalmente en PI y PE, consecuencia, en parte, de una mayor velocidad de remodelación como resultado del aumento de de la actividad CoA-IT.

6.6. La mayor reacilación provoca menor liberación de AA en condiciones de estimulación, y en consecuencia menor síntesis de PGE2 y LTB4, provocando una deficiencia de la respuesta proinflamatoria in vivo. La cav-1 favorece la respuesta proinflamatoria.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Castilla y León (Orden O.EDU/1878/2006). El trabajo realizado ha dado lugar a las publicaciones científicas indicadas en las referencias 12, 24, 50, 254, 286, 300-303.

REFERENCES

1. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 124: 783-801.
2. Nathan, C. (2002) Points of control in inflammation. Nature. 420: 846-852.
3. Ryan, G. B. and Majno, G. (1977) Acute inflammation. A review. Am. J. Pathol. 86: 183-276.
4. van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., and Langevoort, H. L. (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ.

46: 845-852.

5. Takahashi, K. (2001) Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concepts. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*. 41.
6. Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 294: 1871-1875.
7. Phillis, J. W., Horrocks, L. A., and Farooqui, A. A. (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res. Rev.* 52: 201-243.
8. Cao, Y., Pearman, A. T., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (2000) Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 97: 11280-11285.
9. Serini, S., Piccioni, E., Merendino, N., and Calviello, G. (2009) Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. *Apoptosis*. 14: 135-152.
10. Irvine, R. F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204: 3-16.
11. Chilton, F. H., Fonteh, A. N., Surette, M. E., Triggiani, M., and Winkler, J. D. (1996) Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1299: 1-15.
12. 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.
13. Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1997) Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 272: 16069-16072.
14. Winstead, M. V., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (2000) Calcium-independent phospholipase A2: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*. 1488: 28-39.
15. Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., and Dennis, E. A. (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 175-189.
16. Gijón, M. A. and Leslie, C. C. (1999) Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J. Leukoc. Biol.* 65: 330-336.
17. Hirabayashi, T., Murayama, T., and Shimizu, T. (2004) Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1168-
18. Leslie, C. C. (2004) Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 70: 373-
19. Balsinde, J. (2002) Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* 364: 695-702.
20. MacDonald, J. I. and Sprecher, H. (1991) Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1084: 105-121.
21. Lands, W. E. (1960) Metabolism of glycerolipids. II. The enzymatic acylation of lysolecithin. *J. Biol. Chem.* 235: 2233-2237.
22. Lands, W. E., Inoue, M., Sugiura, Y., and Okuyama, H. (1982) Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylcholine by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 257: 14968-14972.

23. Lands, W. E. (2000) Stories about acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1483: 1-14.
24. Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Ruipérez, V., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010) Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *J. Immunol.* 184: 1071-1078.
25. Balsinde, J., Balboa, M. A., and Dennis, E. A. (1997) Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* 272: 29317-29321.
26. Balboa, M. A., Balsinde, J., Dillon, D. A., Carman, G. M. & Dennis, E. A. (1999) Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 274: 522-526.
27. Pérez, R., Matabosch, X., Llebaria, A., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2006) Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J. Lipid Res.* 47: 484-491.
28. Pérez, R., Melero, R., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2004) 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.* 279: 40385-40391.
29. Kennedy, E. P. (1958) The biosynthesis of phospholipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 6: 216-220.
30. Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1996) The incorporation of arachidonic acid into triacylglycerol in P388D1 macrophage-like cells. *Eur. J. Biochem.* 235: 480-485.
31. Blank, M. L., Smith, Z. L., and Snyder, F. (1992) Contributing factors in the trafficking of [³H]arachidonate between phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1124: 262-272.
32. Blank, M. L., Smith, Z. L., and Snyder, F. (1993) Arachidonate-containing triacylglycerols: biosynthesis and a lipolytic mechanism for the release and transfer of arachidonate to phospholipids in HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1170: 275-282.
33. Chilton, F. H. and Murphy, R. C. (1987) Stimulated production and natural occurrence of 1,2-diarachidonoylglycerophosphocholine in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 1126-1133.
34. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1990) Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 265: 17381-17384.
35. Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., and Giepmans, B. N. (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays.* 26: 870-881.
36. Schaloske, R. H. and Dennis, E. A. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1246-1259.
37. Six, D. A. and Dennis, E. A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488: 1-19.
38. Burke, J. E. and Dennis, E. A. (2009) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50 Suppl: S237-242.
39. Duncan, R. E., Sarkadi-Nagy, E., Jaworski, K., Ahmadian, M., and Sul, H. S. (2008) Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). *J. Biol. Chem.* 283: 25428-25436.
40. Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R. E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K. A., Hellerstein, M. K., Lee, H. Y., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Kim, K. H., de Val, S., Kang, C., and Sul, H. S. (2009) AdPLA ablation increases lipolysis and prevents

obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat. Med.* 15: 159-168.

41. Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., and Yamamoto, K. (2011) Recent progress in phospholipase A2 research: From cells to animals to humans. *Prog. Lipid Res.* 50: 152-192.
42. Ghosh, M., Tucker, D. E., Burchett, S. A., and Leslie, C. C. (2006) Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog. Lipid Res.* 45: 487-510.
43. Lambeau, G. and Gelb, M. H. (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 495-520.
44. Neves Petersen, M. T., Fojan, P., and Petersen, S. B. (2001) How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J. Biotechnol.* 85: 115-147.
45. Karasawa, K., Harada, A., Satoh, N., Inoue, K., and Setaka, M. (2003) Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog. Lipid Res.* 42: 93-114.
46. Tjoelker, L. W. and Stafforini, D. M. (2000) Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488: 102-123.
47. Abe, A., Kelly, R., Kollmeyer, J., Hiraoka, M., Lu, Y., and Shayman, J. A. (2008) The secretion and uptake of lysosomal phospholipase A2 by alveolar macrophages. *J. Immunol.* 181: 7873-7881.
48. Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R. W., and Shayman, J. A. (2006) Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol. Cell. Biol.* 26: 6139- 6148.
49. Hiraoka, M., Abe, A., and Shayman, J. A. (2002) Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. *J. Biol. Chem.* 277: 10090-10099.
50. Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Balgoma, D., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2009) Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791: 1103-1113.
51. Balsinde, J., Winstead, M. V., and Dennis, E. A. (2002) Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2-6.
52. Kudo, I. and Murakami, M. (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 3-58.
53. Burke, J. E. and Dennis, E. A. (2009) Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23: 49-59.
54. Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N., and Knopf, J. L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell.* 65: 1043-1051.
55. Casas, J., Gijón, M. A., Vigo, A. G., Crespo, M. S., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2006) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A2 to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol. Biol. Cell.* 17: 155-162.
56. Casas, J., Meana, C., Esquinas, E., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2009) Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A2 to phagosomes in human macrophages. *J. Immunol.* 183: 2767-2774.
57. Casas, J., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2010) The cationic cluster of group IVA phospholipase A2 (Lys488/Lys541/Lys543/Lys544) is involved in translocation of the enzyme to phagosomes in human macrophages. *J.*

Lipid Res. 51: 388-399.

58. 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.
59. Shmelzer, Z., Haddad, N., Admon, E., Pessach, I., Leto, T. L., Eitan-Hazan, Z., Hershfinkel, M., and Levy, R. (2003) Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J. Cell Biol.* 162: 683-692.
60. Wooten, R. E., Willingham, M. C., Daniel, L. W., Leslie, C. C., Rogers, L. C., Sergeant, S., and O'Flaherty, J. T. (2008) Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2 α fluorescent proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783: 1544-1550.
61. Hefner, Y., Borsch-Haubold, A. G., Murakami, M., Wilde, J. I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J. R., 3rd, Armstrong, C. G., Paterson, A., Cohen, P., Fukunaga, R., Hunter, T., Kudo, I., Watson, S. P., and Gelb, M. H. (2000) Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J. Biol. Chem.* 275: 37542-37551.
62. Borsch-Haubold, A. G., Bartoli, F., Asselin, J., Dudler, T., Kramer, R. M., Aplitz-Castro, R., Watson, S. P., and Gelb, M. H. (1998) Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 273: 4449-4458.
63. Muthalif, M. M., Hefner, Y., Canaan, S., Harper, J., Zhou, H., Parmentier, J. H., Aebersold, R., Gelb, M. H., and Malik, K. U. (2001) Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 276: 39653-39660.
64. Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A., and Davis, R. J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell.* 72: 269-278.
65. Kramer, R. M., Roberts, E. F., Um, S. L., Borsch-Haubold, A. G., Watson, S. P., Fisher, M. J., and Jakubowski, J. A. (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol. Chem.* 271: 27723-27729.
66. Ackermann, E. J., Kempner, E. S., and Dennis, E. A. (1994) Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 269: 9227-9233.
67. Balboa, M. A., Balsinde, J., Jones, S. S., and Dennis, E. A. (1997) Identity between the Ca²⁺-independent phospholipase A2 enzymes from P388D1 macrophages and Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272: 8576-8580.
68. Tang, J., Kriz, R. W., Wolfman, N., Shaffer, M., Sehra, J., and Jones, S. S. (1997) A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J. Biol. Chem.* 272: 8567-8575.
69. Balsinde, J. and Balboa, M. A. (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal.* 17: 1052-1062.
70. Balboa, M. A. and Balsinde, J. (2006) Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 385-391.
71. Balsinde, J., Pérez, R., and Balboa, M. A. (2006) Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1344-1350.
72. Steinberg, S. J., Morgenthaler, J., Heinzer, A. K., Smith, K. D., and Watkins, P. A. (2000) Very long-chain acyl-CoA

- synthetases. Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 275: 35162-35169.
73. Watkins, P. A., Maignel, D., Jia, Z., and Pevsner, J. (2007) Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J. Lipid Res.* 48: 2736-2750.
74. Fujino, T., Kondo, J., Ishikawa, M., Morikawa, K., and Yamamoto, T. T. (2001) Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J. Biol. Chem.* 276: 11420-11426.
75. Luong, A., Hannah, V. C., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2000) Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 26458-26466.
76. Fujino, T., Takei, Y. A., Sone, H., Ioka, R. X., Kamataki, A., Magoori, K., Takahashi, S., Sakai, J., and Yamamoto, T. T. (2001) Molecular identification and characterization of two medium-chain acyl-CoA synthetases, MACS1 and the Sa gene product. *J. Biol. Chem.* 276: 35961-35966.
77. Kasuya, F., Yamaoka, Y., Igarashi, K., and Fukui, M. (1998) Molecular specificity of a medium chain acyl-CoA synthetase for substrates and inhibitors: conformational analysis. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1769-1775.
78. Watkins, P. A. (2008) Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *J. Biol. Chem.* 283: 1773-1777.
79. Pei, Z., Fraisl, P., Berger, J., Jia, Z., Forss-Petter, S., and Watkins, P. A. (2004) Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *J. Biol. Chem.* 279: 54454-54462.
80. Balgoma, D., Montero, O., Balboa, M. A. & Balsinde, J. (2010) Lipidomic approaches to the study of phospholipase A2-regulated phospholipid fatty acid incorporation and remodeling. *Biochimie* 92: 645-650.
81. Min, K. T. and Benzer, S. (1999) Preventing neurodegeneration in the *Drosophila* mutant bubblegum. *Science.* 284: 1985-1988.
82. Pei, Z., Jia, Z., and Watkins, P. A. (2006) The second member of the human and murine bubblegum family is a testis- and brainstem-specific acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 281: 6632-6641.
83. Steinberg, S. J., Morgenthaler, J., Heinzer, A. K., Smith, K. D., and Watkins, P. A. (2000) Very long-chain acyl-CoA synthetases. Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 275: 35162-35169.
84. Soupene, E. and Kuypers, F. A. (2008) Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp. Biol. Med (Maywood).* 233: 507-521.
85. Abe, T., Fujino, T., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Toh, H., Suzuki, H., and Yamamoto, T. (1992) Human long-chain acyl-CoA synthetase: structure and chromosomal location. *J. Biochem.* 111: 123-128.
86. Iijima, H., Fujino, T., Minekura, H., Suzuki, H., Kang, M. J., and Yamamoto, T. (1996) Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2. *Eur. J. Biochem.* 242: 186-190.
87. Fujino, T., Kang, M. J., Suzuki, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. (1996) Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3. *J. Biol. Chem.* 271: 16748-16752.
88. Van Horn, C. G., Caviglia, J. M., Li, L. O., Wang, S., Granger, D. A., and Coleman, R. A. (2005) Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. *Biochemistry.* 44: 1635-1642.

89. Cao, Y., Traer, E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1998) Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4). *Genomics*. 49: 327-330.
90. Kang, M. J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. T. (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 94: 2880-2884.
91. Oikawa, E., Iijima, H., Suzuki, T., Sasano, H., Sato, H., Kamataki, A., Nagura, H., Kang, M. J., Fujino, T., Suzuki, H., and Yamamoto, T. T. (1998) A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J. Biochem*. 124: 679-685.
92. 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.
93. Marszalek, J. R., Kitidis, C., Dirusso, C. C., and Lodish, H. F. (2005) Long-chain acyl-CoA synthetase 6 preferentially promotes DHA metabolism. *J. Biol. Chem*. 280: 10817-10826.
94. Malhotra, K. T., Malhotra, K., Lubin, B. H., and Kuypers, F. A. (1999) Identification and molecular characterization of acyl-CoA synthetase in human erythrocytes and erythroid precursors. *Biochem. J*. 344: 135-143.
95. Doege, H. and Stahl, A. (2006) Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)*. 21: 259-268.
96. Pohl, J., Ring, A., Hermann, T., and Stremmel, W. (2004) Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta*. 1686: 1-6.
97. Stahl, A. (2004) A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch*. 447: 722-727.
98. Eehalt, R., Fullekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T., and Stremmel, W. (2006) Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane-lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol. Cell. Biochem*. 284: 135-140.
99. Gimeno, R. E. (2007) Fatty acid transport proteins. *Curr. Opin. Lipidol*. 18: 271-276.
100. Mitchell, D. A., Vasudevan, A., Linder, M. E., and Deschenes, R. J. (2006) Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J. Lipid Res*. 47: 1118-1127.
101. Jackson, S. K., Abate, W., and Tonks, A. J. (2008) Lysophospholipid acyltransferases: novel potential regulators of the inflammatory response and target for new drug discovery. *Pharmacol. Ther*. 119: 104-114.
102. Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Yuki, K., and Shimizu, T. (2009) Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J. Lipid Res*. 50 Suppl: S46-51.
103. Shindou, H. and Shimizu, T. (2009) Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J. Biol. Chem*. 284: 1-5.
104. Hofmann, K. (2000) A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem. Sci*. 25: 111-112.
105. Lewin, T. M., Wang, P., and Coleman, R. A. (1999) Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry*. 38: 5764-5771.
106. Yamashita, A., Nakanishi, H., Suzuki, H., Kamata, R., Tanaka, K., Waku, K., and Sugiura, T. (2007) Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1. *Biochim. Biophys. Acta*. 1771: 1202-1215.

107. Kume, K. and Shimizu, T. (1997) cDNA cloning and expression of murine 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 663-666.
108. Stamps, A. C., Elmore, M. A., Hill, M. E., Kelly, K., Makda, A. A., and Finnen, M. J. (1997) A human cDNA sequence with homology to non-mammalian lysophosphatidic acid acyltransferases. *Biochem. J.* 326 (Pt 2): 455-461.
109. West, J., Tompkins, C. K., Balantac, N., Nudelman, E., Meengs, B., White, T., Bursten, S., Coleman, J., Kumar, A., Singer, J. W., and Leung, D. W. (1997) Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA Cell Biol.* 16: 691-701.
110. Eberhardt, C., Gray, P. W., and Tjoelker, L. W. (1997) Human lysophosphatidic acid acyltransferase. cDNA cloning, expression, and localization to chromosome 9q34.3. *J. Biol. Chem.* 272: 20299-20305.
111. Yuki, K., Shindou, H., Hishikawa, D., and Shimizu, T. (2009) Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: an enzyme with dual functions in the testis. *J. Lipid Res.* 50: 860-869.
112. Hollenback, D., Bonham, L., Law, L., Rossnagle, E., Romero, L., Carew, H., Tompkins, C. K., Leung, D. W., Singer, J. W., and White, T. (2006) Substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase \square evidence from membrane and whole cell assays. *J. Lipid Res.* 47: 593-604.
113. Koeberle, A., Shindou, H., Harayama, T., and Shimizu, T. (2010) Role of lysophosphatidic acid acyltransferase 3 for the supply of highly polyunsaturated fatty acids in TM4 Sertoli cells. *FASEB J.* 24: 4929-4938.
114. Montero-Morán, G., Caviglia, J. M., McMahon, D., Rothenberg, A., Subramanian, V., Xu, Z., Lara-González, S., Storch, J., Carman, G. M., and Brasaemle, D. L. (2010) CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *J. Lipid Res.* 51: 709-719.
115. Chen, X., Hyatt, B. A., Mucenski, M. L., Mason, R. J., and Shannon, J. M. (2006) Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 11724-11729.
116. Nakanishi, H., Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Ogasawara, R., Suwabe, A., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2006) Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J. Biol. Chem.* 281: 20140-20147.
117. Soupene, E., Fyrst, H., and Kuypers, F. A. (2008) Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105: 88-93.
118. Harayama, T., Shindou, H., and Shimizu, T. (2009) Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1. *J. Lipid Res.* 50: 1824-1831.
119. Mansilla, F., da Costa, K. A., Wang, S., Kruhoffer, M., Lewin, T. M., Orntoft, T. F., Coleman, R. A., and Birkenkamp-Demtroder, K. (2009) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer. *J. Mol. Med.* 87: 85-97.
120. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:Lyso-PAF acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 282: 6532-6539.
121. Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2008) Discovery essential of a lysophospholipid acyltransferase family for membrane asymmetry and diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 2830-2835.

122. Gijón, M. A., Riekhof, W. R., Zarini, S., Murphy, R. C., and Voelker, D. R. (2008) Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 283: 30235-30245.
123. Zhao, Y., Chen, Y. Q., Bonacci, T. M., Bredt, D. S., Li, S. Y., Bensch, W. R., Moller, D. E., Kowala, M., Konrad, R. J., and Cao, G. Q. (2008) Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283: 8258-8265.
124. Cao, J. S., Shan, D. D., Revett, T., Li, D. M., Wu, L. Y., Liu, W., Tobin, J. F., and Gimeno, R. E. (2008) Molecular identification of a novel mammalian brain isoform of acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferase with prominent ethanolamine lysophospholipid acylating activity, LPEAT2. *J. Biol. Chem.* 283: 19049-19057.
125. Lee, H. C., Inoue, T., Imae, R., Kono, N., Shirae, S., Matsuda, S., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Arai, H. (2008) *Caenorhabditis elegans* mboa-7, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. *Mol. Biol. Cell.* 19: 1174-1184.
126. Chilton, F. H. and Connell, T. R. (1988) 1-Ether-linked phosphoglycerides. Major endogenous sources of arachidonate in the human neutrophil. *J. Biol. Chem.* 263: 5260-5265.
127. Mueller, H. W., O'Flaherty, J. T., Greene, D. G., Samuel, M. P., and Wykle, R. L. (1984) 1-O-alkyl-linked glycerophospholipids of human neutrophils: distribution of arachidonate and other acyl residues in the ether-linked and diacyl species. *J. Lipid Res.* 25: 383-388.
128. Chilton, F. H. and Murphy, R. C. (1986) Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil. *J. Biol. Chem.* 261: 7771-7777.
129. Fonteh, A. N. and Chilton, F. H. (1992) Rapid remodeling of arachidonate from phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine pools during mast cell activation. *J. Immunol.* 148: 1784-1791.
130. Sugiura, T., Katayama, O., Fukui, J., Nakagawa, Y., and Waku, K. (1984) Mobilization of arachidonic acid between diacyl and ether phospholipids in rabbit alveolar macrophages. *FEBS Lett.* 165: 273-276.
131. Nieto, M. L., Venable, M. E., Bauldry, S. A., Greene, D. G., Kennedy, M., Bass, D. A., and Wykle, R. L. (1991) Evidence that hydrolysis of ethanolamine plasmalogens triggers synthesis of platelet-activating factor via a transacylation reaction. *J. Biol. Chem.* 266: 18699-18706.
132. Snyder, F., Lee, T. C., and Blank, M. L. (1992) The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor. *Prog. Lipid Res.* 31: 65-86.
133. Uemura, Y., Lee, T. C., and Snyder, F. (1991) A coenzyme A-independent transacylase is linked to the formation of platelet-activating factor (PAF) by generating the lyso-PAF intermediate in the remodeling pathway. *J. Biol. Chem.* 266: 8268-8272.
134. Venable, M. E., Nieto, M. L., Schmitt, J. D., and Wykle, R. L. (1991) Conversion of 1-O-[3H]alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine to lyso plateletactivating factor by the CoA-independent transacylase in membrane fractions of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266: 18691-18698.
135. Winkler, J. D., Sung, C. M., Huang, L., and Chilton, F. H. (1994) CoA-independent transacylase activity is increased in human neutrophils after treatment with tumor necrosis factor alpha. *Biochim. Biophys. Acta.* 1215: 133-140.
136. Balsinde, J., Fernandez, B., and Solis-Herruzo, J. A. (1994) Increased incorporation of arachidonic acid into phospholipids in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Eur J Biochem.* 221: 1013-1018.

137. Boilard, E. and Surette, M. E. (2001) Anti-CD3 and concanavalin A-induced human T cell proliferation is associated with an increased rate of arachidonate phospholipid remodeling. Lack of involvement of group IV and group VI phospholipase A2 in remodeling and increased susceptibility of proliferating T cells to CoA-independent transacylase inhibitor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 17568-17575.
138. Balsinde, J., Barbour, S. E., Bianco, I. D., and Dennis, E. A. (1994) Arachidonic acid mobilization in P388D1 macrophages is controlled by two distinct Ca²⁺-dependent phospholipase A2 enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 11060-11064.
139. Surette, M. E. and Chilton, F. H. (1998) The distribution and metabolism of arachidonate-containing phospholipids in cellular nuclei. *Biochem. J.* 330: 915-921.
140. Surette, M. E., Fonteh, A. N., Bernatchez, C., and Chilton, F. H. (1999) Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis.* 20: 757-763.
141. Surette, M. E., Winkler, J. D., Fonteh, A. N., and Chilton, F. H. (1996) Relationship between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry.* 35: 9187-9196.
142. Trimboli, A. J., Waite, B. M., Atsumi, G., Fonteh, A. N., Namen, A. M., Clay, C. E., Kute, T. E., High, K. P., Willingham, M. C., and Chilton, F. H. (1999) Influence of coenzyme A-independent transacylase and cyclooxygenase inhibitors on the proliferation of breast cancer cells. *Cancer Res.* 59: 6171-6177.
143. Winkler, J. D., Eris, T., Sung, C. M., Chabot-Fletcher, M., Mayer, R. J., Surette, M. E., and Chilton, F. H. (1996) Inhibitors of coenzyme A-independent transacylase induce apoptosis in human HL-60 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 956-966.
144. Chilton, F. H., Fonteh, A. N., Sung, C. M., Hickey, D. M., Torphy, T. J., Mayer, R. J., Marshall, L. A., Heravi, J. D., and Winkler, J. D. (1995) Inhibitors of CoA-independent transacylase block the movement of arachidonate into 1-etherlinked phospholipids of human neutrophils. *Biochemistry.* 34: 5403-5410.
145. Kramer, R. M. and Deykin, D. (1983) Arachidonoyl transacylase in human platelets. Coenzyme A-independent transfer of arachidonate from phosphatidylcholine to lysoplasmeneylethanolamine. *J. Biol. Chem.* 258: 13806-13811.
146. Robinson, M., Blank, M. L., and Snyder, F. (1985) Acylation of lysophospholipids by rabbit alveolar macrophages. Specificities of CoA-dependent and CoA-independent reactions. *J. Biol. Chem.* 260: 7889-7895.
147. Buczynski, M. W., Dumlaio, D. S., and Dennis, E. A. (2009) Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J. Lipid Res.* 50: 1015-1038.
148. Fitzpatrick, F. A. and Soberman, R. (2001) Regulated formation of eicosanoids. *J. Clin. Invest.* 107: 1347-1351.
149. Samuelsson, B., Dahlen, S. E., Lindgren, J. A., Rouzer, C. A., and Serhan, C. N. 1987. Leukotrienes and lipoxins - structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 237: 1171-1176.
150. Park, J. Y., Pillinger, M. H., and Abramson, S. B. (2006) Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* 119: 229-240.
151. Simmons, D. L., Botting, R. M., and Hla, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56: 387-437.
152. Basu, S. (2007) Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F2 α from physiology to new principles in inflammation. *Med. Res. Rev.* 27: 435-468.
153. Murphy, R. C. and Gijón, M. A. (2007) Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem. J.* 405: 379-395.

154. Aderem, A. A., Wright, S. D., Silverstein, S. C., and Cohn, Z. A. (1985) Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 161: 617-622.
155. Bonney, R. J., Wightman, P. D., Davies, P., Sadowski, S. J., Kuehl, F. A., Jr., and Humes, J. L. (1978) Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages. *Biochem. J.* 176: 433-442.
156. Rouzer, C. A., Scott, W. A., Cohn, Z. A., Blackburn, P., and Manning, J. M. (1980) Mouse peritoneal macrophages release leukotriene C in response to a phagocytic stimulus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 77: 4928-4932.
157. Scott, W. A., Zrike, J. M., Hamill, A. L., Kempe, J., and Cohn, Z. A. (1980) Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages. *J. Exp. Med.* 152: 324-335.
158. Balsinde, J., Fernández, B., Solís-Herruzo, J. A., and Diez, E. (1992) Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1136: 75-82.
159. Emilsson, A. and Sundler, R. (1984) Differential activation of phosphatidylinositol deacylation and a pathway via diphosphoinositide in macrophages responding to zymosan and ionophore A23187. *J. Biol. Chem.* 259: 3111-3116.
160. Wightman, P. D., Dahlgren, M. E., Davies, P., and Bonney, R. J. (1981) The selective release of phospholipase A2 by resident mouse peritoneal macrophages. *Biochem. J.* 200: 441-444.
161. 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.
162. Qiu, Z. H. and Leslie, C. C. (1994) Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269: 19480-19487.
163. Gijón, M. A., Spencer, D. M., Siddiqi, A. R., Bonventre, J. V., and Leslie, C. C. (2000) Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that do and do not mobilize calcium. Novel role of mitogenactivated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation. *J. Biol. Chem.* 275: 20146-20156.
164. Satake, Y., Díaz, B. L., Balestrieri, B., Lam, B. K., Kanaoka, Y., Grusby, M. J., and Arm, J. P. (2004) Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J. Biol. Chem.* 279: 16488-16494.
165. Balestrieri, B., Hsu, V. W., Gilbert, H., Leslie, C. C., Han, W. K., Bonventre, J. V., and Arm, J. P. (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.
166. Valera, I., Fernandez, N., Trinidad, A. G., Alonso, S., Brown, G. D., Alonso, A., and Crespo, M. S. (2008) Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 180: 5727-5736.
167. Parton, R. G. and Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 185-194.
168. Razani, B. and Lisanti, M. P. (2001) Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J. Clin. Invest.* 108: 1553-1561.
169. Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7289-7304.
170. Williams, T. M. and Lisanti, M. P. (2004) The caveolin proteins. *Genome Biol.* 5: 214.

171. Glenney, J. R., Jr. (1989) Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 264: 20163-20166.
172. Glenney, J. R., Jr., Kindy, M. S., and Zokas, L. (1989) Isolation of a new member of the S100 protein family: amino acid sequence, tissue, and subcellular distribution. *J. Cell. Biol.* 108: 569-578.
173. Glenney, J. R., Jr. and Zokas, L. (1989) Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell. Biol.* 108: 2401-2408.
174. Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., and Simons, K. (1992) VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell. Biol.* 118: 1003-1014.
175. Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., and Anderson, R. G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68: 673-682.
176. Scherer, P. E., Lewis, R. Y., Volonte, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D. S., van Donselaar, E., Peters, P., and Lisanti, M. P. (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 272: 29337-29346.
177. Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F., and Lisanti, M. P. (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 131-135.
178. Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S., and Lisanti, M. P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271: 15160-15165.
179. Liu, P., Rudick, M., and Anderson, R. G. (2002) Multiple functions of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277: 41295-41298.
180. Scherer, P. E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H. F., and Lisanti, M. P. (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoformspecific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270: 16395-16401.
181. Dupree, P., Parton, R. G., Raposo, G., Kurzchalia, T. V., and Simons, K. (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* 12: 1597-1605.
182. Le Lay, S. and Kurzchalia, T. V. (2005) Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim. Biophys. Acta.* 1746: 322-333.
183. Li, W. P., Liu, P., Pilcher, B. K., and Anderson, R. G. (2001) Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J. Cell. Sci.* 114: 1397-1408.
184. Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K., and Parton, R. G. (1995) De-novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8655-8659.
185. Parton, R. G., Joggerst, B., and Simons, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol.* 127: 1199-1215.
186. Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., and Allard, J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127: 1217-1232.
187. Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T. V. (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 6: 911-927.

188. Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C., and Lisanti, M. P. (1995) Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 9407-9411.
189. Li, S., Song, K. S., and Lisanti, M. P. (1996) Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 271: 568-573.
190. Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., and Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 10339-10343.
191. Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 5419-5422.
192. Gerber, G. E., Mangroo, D., and Trigatti, B. L. (1993) Identification of high affinity membrane-bound fatty acid-binding proteins using a photoreactive fatty acid. *Mol. Cell. Biochem.* 123: 39-44.
193. Trigatti, B. L., Anderson, R. G., and Gerber, G. E. (1999) Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 34-39.
194. Trigatti, B. L., Mangroo, D., and Gerber, G. E. (1991) Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 22621-22625.
195. Hnasko, R. and Lisanti, M. P. (2003) The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol. Interv.* 3: 445-464.
196. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H., and Kurzchalia, T. V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 293: 2449-2452.
197. Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G. J., Edelmann, W., and Lisanti, M. P. (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276: 38121-38138.
198. Cao, G., Yang, G., Timme, T. L., Saika, T., Truong, L. D., Satoh, T., Goltsov, A., Park, S. H., Men, T., Kusaka, N., Tian, W., Ren, C., Wang, H., Kadmon, D., Cai, W. W., Chinault, A. C., Boone, T. B., Bradley, A., and Thompson, T. C. (2003) Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am. J. Pathol.* 162: 1241-1248.
199. Zhao, Y. Y., Liu, Y., Stan, R. V., Fan, L., Gu, Y., Dalton, N., Chu, P. H., Peterson, K., Ross, J., Jr., and Chien, K. R. (2002) Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 11375-11380.
200. Scheiffele, P., Verkade, P., Fra, A. M., Virta, H., Simons, K., and Ikonen, E. (1998) Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 140: 795-806.
201. Razani, B., Combs, T. P., Wang, X. B., Frank, P. G., Park, D. S., Russell, R. G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (2002) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277: 8635-8647.
202. Sundstrom, C. and Nilsson, K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer.* 17: 565-577.

203. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-74.
204. Cerezo, A., Guadamillas, M. C., Goetz, J. G., Sánchez-Perales, S., Klein, E., Assoian, R. K., and del Pozo, M. A. (2009) The absence of caveolin-1 increases proliferation and anchorage- independent growth by a Rac-dependent, Erkindependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 29: 5046-5059.
205. Bosch, M., Mari, M., Herms, A., Fernández, A., Fajardo, A., Kassan, A., Giralt, A., Colell, A., Balgoma, D., Barbero, E., González-Moreno, E., Matias, N., Tebar, F., Balsinde, J., Camps, M., Enrich, C., Gross, S. P., García-Ruiz, C., Pérez-Navarro, E., Fernández-Checa, J. C., and Pol, A. (2011) Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr. Biol.* 21: 681-686.
206. Balsinde, J. & Mollinedo, F. (1991) Platelet-activating factor synergizes with phorbol myristate acetate in activating phospholipase D in the human promonocytic cell line U937. Evidence for different mechanisms of activation. *J. Biol. Chem.* 266: 18726–18730.
207. Cohn, Z. A. and Benson, B. (1965) The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry, and biochemistry. *J. Exp. Med.* 121: 153-170.
208. 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.
209. Balsinde, J., Fernández, B., and Solís-Herruzo, J. A. (1994) Ethanol inhibits zymosan-stimulated eicosanoid production in mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1210: 195-201.
210. Bonney, R. J., Wightman, P. D., Davies, P., Sadowski, S. J., Kuehl, F. A., Jr., and Humes, J. L. (1978) Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages. *Biochem J.* 176: 433-442.
211. Rothstein, T. L., Baeker, T. R., Miller, R. A., and Kolber, D. L. (1986) Stimulation of murine B cells by the combination of calcium ionophore plus phorbol ester. *Cell. Immunol.* 102: 364-373.
212. Vaartjes, W. J., Bijleveld, C., Geelen, M. J., and van den Bergh, S. G. (1986) No synergism between ionomycin and phorbol ester in fatty acid synthesis by isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 403-409.
213. Godfrey, R. W., Manzi, R. M., Gennaro, D. E., and Hoffstein, S. T. (1987) Phospholipid and arachidonic-acid metabolism in zymosan-stimulated human monocytes-modulation by cAMP. *J. Cell. Physiol.* 131: 384-392.
214. Balboa, M. A. and Balsinde, J. (2002) Involvement of calcium-independent phospholipase A2 in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 40384-40389.
215. 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.
216. Ghomashchi, F., Stewart, A., Hefner, Y., Ramanadham, S., Turk, J., Leslie, C. C., and Gelb, M. H. (2001) A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A2 α blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1513: 160-166.
217. Ono, T., Yamada, K., Chikazawa, Y., Ueno, M., Nakamoto, S., Okuno, T., and Seno, K. (2002) Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A2 α , pyrrophenone. *Biochem. J.* 363: 727-735.
218. Seno, K., Okuno, T., Nishi, K., Murakami, Y., Yamada, K., Nakamoto, S., and Ono, T. (2001) Pyrrolidine inhibitors of human

cytosolic phospholipase A2. Part II: synthesis of potent and crystallized 4-triphenylmethylthio derivative 'pyrrophenone'. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 587-590.

219. Balboa, M. A., Pérez, R., and Balsinde, J. (2008) Calcium-independent phospholipase A2 mediates proliferation of human promonocytic U937 cells. *FEBS J.* 275: 1915-1924.
220. Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1996) Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* 271: 6758-6765.
221. Hazen, S. L., Zupan, L. A., Weiss, R. H., Getman, D. P., and Gross, R. W. (1991) Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 266: 7227-7232.
222. Hooks, S. B. and Cummings, B. S. (2008) Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in cell growth and signaling. *Biochem. Pharmacol.* 76: 1059-1067.
223. Saavedra, G., Zhang, W., Peterson, B., and Cummings, B. S. (2006) Differential roles for cytosolic and microsomal Ca²⁺-independent phospholipase A2 in cell growth and maintenance of phospholipids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318: 1211-1219.
224. Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1996) Bromoenol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* 271: 31937-31941.
225. Fuentes, L., Pérez, R., Nieto, M. L., Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2003) Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 278: 44683-44690.
226. Bannenberg, G. L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E., Gotlinger, K. H., Hong, S., and Serhan, C. N. (2005) Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.* 174: 4345-4355.
227. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
228. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 25: 402-408.
229. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
230. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
231. Yokoyama, K., Shimizu, F., and Setaka, M. (2000) Simultaneous separation of lysophospholipids from the total lipid fraction of crude biological samples using two-dimensional thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* 41: 142-147.
232. Abu, E. O. and Oluwatowoju, I. (2009) Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 80: 189-194.
233. Thurnhofer, S. and Vetter, W. (2005) A gas chromatography/electron ionization mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8896-8903.
234. Igbavboa, U., Hamilton, J., Kim, H. Y., Sun, G. Y., and Wood, W. G. (2002) A new role for apolipoprotein E: modulating transport of polyunsaturated phospholipid molecular species in synaptic plasma membranes. *J. Neurochem.* 80: 255-261.

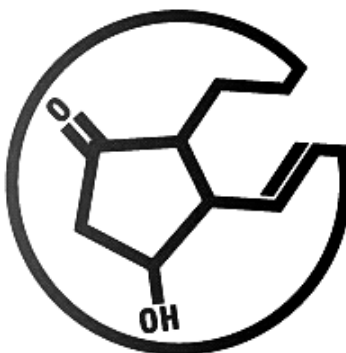
235. Balgoma, D., Montero, O., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2008) Calcium-independent phospholipase A2-mediated formation of 1,2-diarachidonoylglycerophosphoinositol in monocytes. *FEBS J.* 275: 6180-6191.
236. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
237. Wilson, D. B., Prescott, S. M., and Majerus, P. W. (1982) Discovery of an arachidonoyl coenzyme A synthetase in human platelets. *J. Biol. Chem.* 257: 3510-3515.
238. Venable, M. E., Nieto, M. L., Schmitt, J. D., and Wykle, R. L. (1991) Conversion of 1-O-[3H]alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine to lyso plateletactivating factor by the CoA-independent transacylase in membrane fractions of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266: 18691-18698.
239. Balsinde, J., Bianco, I. D., Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E. A. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 8527-8531.
240. Hoffman, T., Lizzio, E. F., Suissa, J., Rotrosen, D., Sullivan, J. A., Mandell, G. L., and Bonvini, E. (1988) Dual stimulation of phospholipase activity in human monocytes. Role of calcium-dependent and calcium-independent pathways in arachidonic acid release and eicosanoid formation. *J. Immunol.* 140: 3912-3918.
241. Pawlowski, N. A., Kaplan, G., Hamill, A. L., Cohn, Z. A., and Scott, W. A. (1983) Arachidonic acid metabolism by human monocytes. Studies with platelet-depleted cultures. *J. Exp. Med.* 158: 393-412.
242. 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.
243. Fonteh, A. N. and Chilton, F. H. (1993) Mobilization of different arachidonate pools and their roles in the generation of leukotrienes and free arachidonic acid during immunologic activation of mast cells. *J. Immunol.* 150: 563-570.
244. Tessner, T. G., Greene, D. G., and Wykle, R. L. (1990) Selective deacylation of arachidonate-containing ethanolamine-linked phosphoglycerides in stimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 265: 21032-21038.
245. Godfrey, R. W., Manzi, R. M., Gennaro, D. E., and Hoffstein, S. T. (1987) Phospholipid and arachidonic acid metabolism in zymosan-stimulated human monocytes: modulation by cAMP. *J. Cell. Physiol.* 131: 384-392.
246. Balboa, M. A., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1998) Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in arachidonic acid mobilization in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* 273: 7684-7690.
247. 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.
248. Pérez, R., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2006) Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. *J. Immunol.* 176: 2555-2561.
249. Matsuda, S., Inoue, T., Lee, H. C., Kono, N., Tanaka, F., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Arai, H. (2008) Member of the membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) family encodes a lysophospholipid acyltransferase with broad substrate specificity. *Genes Cells.* 13: 879-888.
250. Kazachkov, M., Chen, Q., Wang, L., and Zou, J. (2008) Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids.* 43: 895-902.

251. Reinhold, S. L., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M., and McIntyre, T. M. (1989) Phospholipid remodeling in human neutrophils. Parallel activation of a deacylation/reacylation cycle and platelet-activating factor synthesis. *J. Biol. Chem.* 264: 21652-21659.
252. Tou, J. S. (1989) Platelet-activating factor regulates phospholipid metabolism in human neutrophils. *Lipids.* 24: 812-817.
253. 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.
254. Ruipérez, V., Astudillo, A. M., 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.
255. Ruipérez, V., Casas, J., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2007) Group V phospholipase A2-derived lysophosphatidylcholine mediates cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 179: 631-638.
256. Mashek, D. G., Bornfeldt, K. E., Coleman, R. A., Berger, J., Bernlohr, D. A., Black, P., DiRusso, C. C., Farber, S. A., Guo, W., Hashimoto, N., Khodiyar, V., Kuypers, F. A., Maltais, L. J., Nebert, D. W., Renieri, A., Schaffer, J. E., Stahl, A., Watkins, P. A., Vasiliou, V., and Yamamoto, T. T. (2004) Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J. Lipid Res.* 45: 1958-1961.
257. Morimoto, R., Shindou, H., Oda, Y., and Shimizu, T. (2010) Phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 at Ser34 enhances platelet-activating factor production in endotoxin-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* 285: 29857-29862.
258. Miller, L. J., Schwarting, R., and Springer, T. A. (1986) Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation. *J. Immunol.* 137: 2891-2900.
259. Balsinde, J. and Mollinedo, F. (1990) Induction of the oxidative response and of concanavalin A-binding capacity in maturing human U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1052: 90-95.
260. Wiederhold, M. D., Anderson, K. M., and Harris, J. E. (1988) Labelling of lipids and phospholipids with [3H]arachidonic acid and the biosynthesis of eicosanoids in U937 cells differentiated by phorbol ester. *Biochim. Biophys. Acta.* 959: 296-304.
261. Winkler, J. D., Sung, C. M., Bennett, C. F., and Chilton, F. H. (1991) Characterization of CoA-independent transacylase activity in U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1081: 339-346.
262. Bomalaski, J. S., Freundlich, B., Steiner, S., and Clark, M. A. (1988) The role of fatty acid metabolites in the differentiation of the human monocyte-like cell line U937. *J. Leukoc. Biol.* 44: 51-57.
263. Koehler, L., Hass, R., Wessel, K., DeWitt, D. L., Kaefer, V., Resch, K., and Goppelt-Struebe, M. (1990) Altered arachidonic acid metabolism during differentiation of the human monoblastoid cell line U937. *Biochim. Biophys. Acta.* 1042: 395-403.
264. Myers, R. F. and Siegel, M. I. (1984) The appearance of phospholipase activity in the human macrophage-like cell line U937 during dimethyl sulfoxide induced differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 217-224.
265. Rzigalinski, B. A. and Rosenthal, M. D. (1994) Effects of DMSO-induced differentiation on arachidonate mobilization in the human histiocytic lymphoma cell line U937: responsiveness to sub-micromolar calcium ionophore A23187 and phorbol esters. *Biochim. Biophys. Acta.* 1223: 219-225.
266. Withnall, M. T., Pennington, A., and Wiseman, D. (1995) Characterisation of cytosolic phospholipase A2 as mediator of the

- enhanced arachidonic acid release from dimethyl sulphoxide differentiated U937 cells. *Biochem. Pharmacol.* 50: 1893-1902.
267. Harkewicz, R., Fahy, E., Andreyev, A., and Dennis, E. A. (2007) Arachidonate-derived dihomoprostaglandin production observed in endotoxin-stimulated macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* 282: 2899-2910.
268. Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J., and Semenkovich, C. F. (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR α in liver. *Cell.* 138: 476-488.
269. Gargalovic, P. and Dory, L. (2003) Caveolins and macrophage lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 44: 11-21.
270. Harris, J., Werling, D., Hope, J. C., Taylor, G., and Howard, C. J. (2002) Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. *Trends Immunol.* 23: 158-164.
271. Kiss, A. L. and Geuze, H. J. (1997) Caveolae can be alternative endocytotic structures in elicited macrophages. *Eur. J. Cell. Biol.* 73: 19-27.
272. Kiss, A. L. and Kittel, A. (1995) Early endocytotic steps in elicited macrophages: omega-shaped plasma membrane vesicles at their cell surface. *Cell. Biol. Int.* 19: 527-538.
273. Shin, J. S., Gao, Z., and Abraham, S. N. (2000) Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science.* 289: 785-788.
274. Gargalovic, P. and Dory, L. (2001) Caveolin-1 and caveolin-2 expression in mouse macrophages. High density lipoprotein 3-stimulated secretion and a lack of significant subcellular co-localization. *J. Biol. Chem.* 276: 26164-26170.
275. Lei, M. G. and Morrison, D. C. (2000) Differential expression of caveolin-1 in lipopolysaccharide-activated murine macrophages. *Infect. Immun.* 68: 5084-5089.
276. Werling, D., Hope, J. C., Chaplin, P., Collins, R. A., Taylor, G., and Howard, C. J. (1999) Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 66: 50-58.
277. Yan, S. R., Fumagalli, L., and Berton, G. (1996) Activation of SRC family kinases in human neutrophils. Evidence that p58C-FGR and p53/56LYN redistributed to a Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction, also enriched in the caveolar protein caveolin, display an enhanced kinase activity. *FEBS Lett.* 380: 198-203.
278. Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., and Lisanti, M. P. (2004) Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol. Rev.* 84: 1341-1379.
279. Cohen, A. W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T. M., Wang, X. B., Iyengar, P., Brasaemle, D. L., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (2004) Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes.* 53: 1261-1270.
280. Heimerl, S., Liebisch, G., Le Lay, S., Bottcher, A., Wiesner, P., Lindtner, S., Kurzchalia, T. V., Simons, K., and Schmitz, G. (2008) Caveolin-1 deficiency alters plasma lipid and lipoprotein profiles in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 826-833.
281. Pohl, J., Ring, A., and Stremmel, W. (2002) Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J. Lipid Res.* 43: 1390-1399.
282. Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., and Stremmel, W. (2006) Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 416-423.

283. Febbraio, M., Guy, E., Coburn, C., Knapp, F. F., Jr., Beets, A. L., Abumrad, N. A., and Silverstein, R. L. (2002) The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Mol. Cell. Biochem.* 239: 193-197.
284. Le Lay, S., Blouin, C. M., Hajdouch, E., and Dugail, I. (2009) Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791: 514-518.
285. Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., and Stahl, A. (2006) FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol. Cell. Biol.* 26: 3455-3467.
286. Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Balgoma, D., Gil-de-Gómez, L., Ruipérez, V., Guijas, C., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2011) Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1811: 97-103.
287. Rouzer, C. A., Ivanova, P. T., Byrne, M. O., Brown, H. A., and Marnett, L. J. (2007) Lipid profiling reveals glycerophospholipid remodeling in zymosanstimulated macrophages. *Biochemistry.* 46: 6026-6042.
288. Rouzer, C. A., Ivanova, P. T., Byrne, M. O., Milne, S. B., Marnett, L. J., and Brown, H. A. (2006) Lipid profiling reveals arachidonate deficiency in RAW264.7 cells: Structural and functional implications. *Biochemistry.* 45: 14795-14808.
289. Razani, B., Schlegel, A., Liu, J., and Lisanti, M. P. (2001) Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 494-499.
290. Balboa, M. A., Shirai, Y., Gaietta, G., Ellisman, M. H., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (2003) Localization of group V phospholipase A2 in caveolin-enriched granules in activated P388D1 macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* 278: 48059-48065.
291. Gaudreault, S. B., Chabot, C., Gratton, J. P., and Poirier, J. (2004) The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity. *J. Biol. Chem.* 279: 356-362.
292. Graziani, A., Bricko, V., Carmignani, M., Graier, W. F., and Groschner, K. (2004) Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A2-dependent EDHF formation. *Cardiovasc. Res.* 64: 234-242.
293. Lv, X. J., Li, Y. Y., Zhang, Y. J., Mao, M., and Qian, G. S. (2010) Over-expression of caveolin-1 aggravate LPS-induced inflammatory response in AT-1 cells via upregulation of cPLA2/p38 MAPK. *Inflamm. Res.* 59: 531-541.
294. Liou, J. Y., Deng, W. G., Gilroy, D. W., Shyue, S. K., and Wu, K. K. (2001) Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276: 34975-34982.
295. Gargalovic, P. and Dory, L. (2003) Cellular apoptosis is associated with increased caveolin-1 expression in macrophages. *J. Lipid Res.* 44: 1622-1632.
296. Lei, M. G., Tan, X., Qureshi, N., and Morrison, D. C. (2005) Regulation of cellular caveolin-1 protein expression in murine macrophages by microbial products. *Infect. Immun.* 73: 8136-8143.
297. Wang, X. M., Kim, H. P., Song, R., and Choi, A. M. (2006) Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34: 434-442.
298. Medina, F. A., de Almeida, C. J., Dew, E., Li, J., Bonuccelli, G., Williams, T. M., Cohen, A. W., Pestell, R. G., Frank, P. G., Tanowitz, H. B., and Lisanti, M. P. (2006) Caveolin-1-deficient mice show defects in innate immunity and inflammatory immune response during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 74: 6665-6674.
299. Medina, F. A., Cohen, A. W., de Almeida, C. J., Nagajyothi, F., Braunstein, V. L., Teixeira, M. M., Tanowitz, H. B., and

- Lisanti, M. P. (2007) Immune dysfunction in caveolin-1 null mice following infection with *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Microbes Infect.* 9: 325-333.
300. Herrero, A. B., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., Cuevas, C., Balsinde, J. & Moreno, S. (2008) Levels of SCS7/FA2H-mediated fatty acid 2-hydroxylation determine the sensitivity of cells to antitumor PM02734. *Cancer Res.* 68: 9779–9787.
301. Barroso, E., Rodríguez-Calvo, R., Serrano-Marco, L., Astudillo, A. M., Balsinde, J., Palomer, X. & Vázquez-Carrera M. (2011) The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -lipin-1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology* 152: 1848–1859.
302. Astudillo, A. M., Pérez-Chacón, G., Meana, C., Balgoma, D., Pol, A., del Pozo, M. A., Balboa, M. A. & Balsinde, J. (2011) Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* 286: 35299–35307.
303. Astudillo, A. M., Balgoma, D., Balboa, M. A. & Balsinde, J. (2012) Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim Biophys. Acta* 1821: 249–256.



**THE EICOSANOID
RESEARCH DIVISION**
VALLADOLID