

TRABAJO DE FIN DE MASTER

Estudio de las desaturasas de ácidos grasos FADS1 y FADS2 en macrófagos

Lidia Fernández Caballero

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

July 13, 2018

1. INTRODUCCION

1.1. Inflamación y receptores tipo Toll

La inflamación es una respuesta inmune del organismo a la lesión o infección del tejido mediante el reclutamiento de células inmunes reguladoras (1). Unas de las moléculas que participan en la respuesta inmune son los receptores tipo Toll (TLR), que reconocen estructuras microbianas conservadas e inducen la activación de macrófagos, así incrementan su patogenicidad y citotoxicidad, y llevan a la producción de moléculas inflamatorias (2). Algunos agonistas de estos receptores TLR son el zimosán, un homogeneizado derivado de las paredes celulares de levadura, y el ácido lipoteicoico (LTA), componente de la pared de las bacterias gram (+), para TLR2 (3, 4) y el lipopolisacárido bacteriano (LPS), un componente principal de la pared celular de bacterias gram (-), para TLR4 (5) (Figura 1). La señalización de TLR se induce por el reclutamiento selectivo de proteínas adaptadoras intracelulares que contienen el dominio receptor Toll/IL-1 (TIR) en el dominio TIR citoplásmico del TLR. Estas proteínas adaptadoras incluyen el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (excepto en el caso de TLR3), la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP), el adaptador TIR que contiene un dominio que induce IFN- β (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) (4). Además de los patógenos, ciertos ácidos grasos saturados también son capaces de desarrollar la llamada inflamación estéril por su capacidad de activación de TLR2 y TLR4 (6, 7).

Por el contrario, ácidos grasos poliinsaturados como el ácido docosaheptaenoico (DHA) disminuyen la activación (6).

1.2. Metabolismo de los ácidos grasos

Los ácidos grasos actúan como moléculas de señalización en diversas funciones biológicas, como la regulación del metabolismo de los lípidos, la división celular y la inflamación (9). Mediante el proceso de β -oxidación, que tiene lugar principalmente en la mitocondria se obtiene energía a partir de ellos (4). Por cada ácido graso se obtienen 131 ATP, mientras que de una molécula de glucosa 36 ATP, lo que hace que obtener energía de ellos sea más efectivo a pesar de ser un proceso más lento. Dentro de la célula se pueden encontrar no esterificados, tras haber entrado en ella a través de proteínas transportadoras específicas (10) o por difusión; pero la mayoría se esterifican con glicerol dando lugar a los glicerolípidos, proceso que tiene lugar en la cara citosólica de la membrana microsomal (11).

Los ácidos grasos se clasifican según el número de carbonos y de dobles enlaces, y la posición de estos últimos. De esta manera, los ácidos grasos monoinsaturados son aquellos que contienen un único doble enlace, en contraste con los ácidos grasos poliinsaturados que contienen dos o más dobles enlaces, y los ácidos grasos saturados que no tienen dobles enlaces (12). Las desaturasas de ácidos grasos son enzimas que catalizan la introducción de dobles enlaces *cis* en posiciones específicas de la cadena de ácido graso (13). Las

células de mamífero tienen actividad Δ^9 , Δ^6 y Δ^5 y Δ^4 -desaturasa, donde el número indica la posición en la que se introduce el doble enlace, contando desde el extremo carboxilo terminal (9) (Figura 2).

1.3. Implicación de los ácidos grasos monoinsaturados en patologías humanas

Hay mucha literatura que sugiere que los ácidos grasos monoinsaturados son beneficiosos en la dieta humana (14). Una dieta rica en ellos, por ejemplo, ácido oleico (18:1*n*-9), ácido palmitoleico (16:1*n*-7) o ácido vaccénico (18:1*n*-7)], se asocia con un aumento de los niveles de HDL y su correspondiente reducción de triglicéridos (12) y con una disminución de enfermedades coronarias del corazón (15).

El ácido palmitoleico ha sido definido como una hormona lipídica, o lipoquina, que coordina la interacción metabólica entre el hígado y tejido adiposo (16). En modelos animales se ha sugerido que el ácido palmitoleico favorece la sensibilidad a insulina en tejidos periféricos, estimula la secreción de insulina por las células β del páncreas, incrementa la β -oxidación hepática protegiendo de esteatosis, y mejora el perfil lipídico en sangre (17). Sin embargo, diversos estudios en humanos han proporcionado resultados en muchos casos contradictorios con los obtenidos en animales. Así, se ha observado que los niveles en sangre de ácido palmitoleico están habitualmente elevados en personas con obesidad y síndrome metabólico. Estos hallazgos podrían ser un reflejo de elevados niveles de la enzima Δ^9 desaturasa (estearoil-CoA desaturasa-1) en hígado (18). Así pues, a día de hoy no puede afirmarse que el ácido palmitoleico funcione como una adipoquina también en humanos, aunque la bibliografía en su conjunto coincide en sugerir una clara tendencia a la compartimentación en los efectos del ácido palmitoleico, así como una gran importancia del origen metabólico de dicho ácido graso (tejido adiposo o hígado) (16-19).

Guijas *et al.*, 2016 han descrito que los monocitos humanos sintetizan, además del ácido palmitoleico (16:1*n*-7), un ácido graso inusual, el ácido *cis*-7-hexadecenoico (16:1*n*-9) (Figura 3), el

cual se ha visto que se acumula en los lípidos neutros de las gotas lipídicas de los monocitos (20). Las gotas lipídicas son inclusiones citosólicas presentes en la mayoría de las células eucarióticas que contienen un núcleo rico en lípidos neutros, como triacilglicerol y ésteres de colesterol, cuyo interés ha aumentado últimamente debido a su asociación con trastornos inflamatorios y metabólicos que implican un exceso de almacenamiento de lípidos, incluyendo diabetes, obesidad y enfermedad cardiovascular (21). La acumulación de un ácido graso inusual (16:1*n*-9) en estas gotas lipídicas da la posibilidad que éste pueda constituir un biomarcador de la formación de monocitos espumosos y una diana para la intervención en estados tempranos de enfermedad cardiovascular. Además, se ha encontrado que el 16:1*n*-9 posee actividad antiinflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo*, comparable con la de los ácidos grasos n-3 (20).

Por otro lado, Astudillo *et al.*, 2018 han descrito la presencia del ácido sapiénico [16:1*n*-10 (ácido 6-*cis*-hexadecenoico)], cuyo doble enlace es introducido por la enzima desaturasa FADS2, en macrófagos peritoneales y, especialmente, en líneas celulares macrofágicas en cultivo, cuando se consideraba único de humanos. También han visto que el 16:1*n*-10 muestra actividad antiinflamatoria, al igual que otros isómeros del ácido palmitoleico (16:1*n*-7 y 16:1*n*-9), aunque en su caso es menos potente; y que los niveles de 16:1*n*-10 dependen tanto de mecanismos de competencia por el sustrato como del aumento de la expresión de *Fads2*. Por otra parte, la desaturación por medio de FADS2 de ácido linoleico (18:2*n*-6) a ácido γ -linolénico (18:3*n*-6) sería preferible a la desaturación de ácido palmítico a 16:1*n*-10, lo que explicaría que las células que contienen altos niveles endógenos de ácido linoleico producen 16:1*n*-10 en menor cantidad y viceversa (14).

1.4. Papel de las Δ^5 y Δ^6 desaturasas en el metabolismo lipídico

Además de participar en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, las Δ^5 y Δ^6 desaturasas, codificadas respectivamente por los genes *Fads1* y *Fads2*, son las enzimas limitantes para la

conversión de ácidos grasos poliinsaturados, y se reconocen como los principales determinantes de los niveles de éstos (22). Además, Park *et al.*, 2015 han demostrado que el producto del gen *Fads2* también puede, directamente, Δ^4 desaturar $22:5n-3 \rightarrow 22:6n-3$ y $22:4n-6 \rightarrow 22:5n-6$ (23). Ambos genes, *Fads1* y *Fads2*, se localizan en un *cluster* en el cromosoma 11 (11q12-13.1) (24).

Las Δ^5 y Δ^6 desaturasas son enzimas clave en el metabolismo de los ácidos grasos n-3 y n-6, lo que permite la formación de metabolitos de cadena larga a partir del ácido α -linoleico ($18:3n-3$) y ácido linoleico ($18:2n-6$) procedentes de la dieta (22). Por otro lado, numerosos estudios indican que la actividad de la Δ^6 desaturasa es inducida por una dieta baja en ácidos grasos esenciales, y suprimida por dietas ricas en vegetales y aceites de pescado (25). Además, FADS1 es la única enzima Δ^5 desaturasa de mamíferos capaz de producir los importantes ácidos grasos poliinsaturados ácido araquidónico ($20:4n-6$) y ácido eicosapentaenoico ($20:5n-3$) a partir de los sustratos ácido dihomo- γ -linoleico ($20:3n-6$) y ácido eicosatetraenoico ($20:4n-3$), respectivamente (26) (Figura 4).

1.5. Papel de los ácidos grasos derivados de la actividad Δ^5 y Δ^6 -desaturasa en enfermedades inflamatorias

La inflamación crónica de bajo grado se identifica como el desencadenante principal de la patogénesis del síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y diversos procesos carcinogénicos (27), y es regulada por mediadores lipídicos y citoquinas. Los ácidos grasos poliinsaturados (n-6 y n-3) son los precursores de los mediadores lipídicos y, así, juegan un papel importante en la regulación de la inflamación. Generalmente, los ácidos grasos n-6 (por ejemplo el ácido araquidónico) promueven la inflamación, mientras que los ácidos grasos n-3 (por ejemplo, el ácido eicosapentaenoico ($20:5n-3$) y el ácido docosahexaenoico ($22:5n-3$)) tienen propiedades antiinflamatorias (28). Los mediadores lipídicos se producen durante la inflamación en dos grandes oleadas con efectos opuestos, cuando las células cambian el tipo de mediadores producidos de pro- a anti-inflamatorios. Este proceso es llamado *class*

switching, y el mejor ejemplo son los eicosanoides derivados de ácido araquidónico, donde la producción de prostaglandinas proinflamatorias inmediatamente después del estímulo, es seguida progresivamente por la acumulación de lipoxinas antiinflamatorias, un proceso que inicia la resolución de la inflamación y el retorno a la homeostasis (20).

Los estudios de Gromovsky *et al.* 2017 revelan que FADS1 regula el inicio y resolución de la inflamación, y la interacción entre ácidos grasos endógenos y exógenos (es decir, procedentes de la dieta) en enfermedades caracterizadas por inflamación (26). Por otro lado, He *et al.* 2012 muestran que la Δ^6 desaturasa está regulada positivamente en los tejidos tumorales, y que la supresión de su expresión o actividad da como resultado una reducción notable del crecimiento tumoral, asociada con una disminución de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico, angiogénesis e inflamación en tejidos tumorales (29).

También se ha visto que ratones *knockout* de FADS2 manifiestan algunas patologías, como disfunción de la espermiogénesis, dermatitis ulcerativa y ulceración en el duodeno y la unión ileocecal (30).

Cabe mencionar que existen polimorfismos de un único nucleótido en el *cluster* de genes *FADS* (*FADS1-2-3*) que han sido identificados repetidamente en estudios de asociación genómica, incluyendo fuertes asociaciones con obesidad, diabetes mellitus tipo 2, dislipemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico, enzimas hepáticas elevadas, enfermedades en las arterias coronarias y enfermedades del corazón (26).

Con todo esto, y según lo mostrado por los efectos antiinflamatorios y supresores de tumores de la inhibición Δ^6 desaturasa en modelos de ratones, la modulación de la actividad Δ^5/Δ^6 desaturasa parece ser un objetivo prometedor en diferentes condiciones patológicas (22).

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha hecho constar anteriormente, la desaturasa Δ^6 está implicada en la formación de ácidos grasos mono- y poli-insaturados (por ejemplo, ácido sapiénico, araquidónico o DHA), los cuales están altamente implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria (6, 28). Además, la ausencia de la FADS2 altera la respuesta inmune que ocurre en enfermedades tales como el cáncer (29) y la aterosclerosis (15). Teniendo en cuenta estos antecedentes, la hipótesis de trabajo que se presenta es la siguiente: durante la respuesta inflamatoria se podría producir una alteración de los niveles celulares de ácidos grasos mono- y poli-insaturados debido a una regulación de la expresión de FADS2.

El objetivo principal del presente estudio es analizar el comportamiento de la enzima FADS2 en macrófagos activados con estímulos TLR. Puesto que se conoce que la expresión basal de FADS2 difiere entre distintos tipos celulares (Figura 5), mientras los diferentes ácidos grasos que derivan de su acción tienen el mismo efecto antiinflamatorio, resulta interesante estudiar la enzima en diferentes tipos celulares. En este caso, se han utilizado la línea celular macrófágica RAW 264.7 y macrófagos peritoneales de ratón.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Cultivo de línea celular

Se ha utilizado la línea celular murina macrófágica RAW 264.7 (ATCC®TIB-71™), que proviene de la ascitis de un tumor inducido por la inyección intraperitoneal del virus Abelson de leucemia murina. Estas células se mantienen en cultivo en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) previamente inactivado a 56 °C durante 20 minutos, L-glutamina 2 mM, y penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) como antibióticos. A partir de ahora se referirá este medio como DMEM completo. Estas células se siembran en frascos para cultivo celular con una superficie de 75 cm², con 20 ml de DMEM completo, y se dejan crecer en un incubador a 37

°C, con un aporte del 5% de CO₂ y una humedad del 90%. No se supera en ningún caso una confluencia superior al 90%. En el momento en el que las células llegan al 90% de confluencia, se procede a su subcultivo. Para ello, se raspan suavemente las células en el propio medio y se plaquean, del orden de 1 000 000 a 3 000 000 de células, en un nuevo frasco de cultivo celular.

En la figura 6 se muestra la morfología típica de las células macrófágicas RAW 264.7 en cultivo, tanto en condiciones basales como estimuladas.

3.2. Obtención de macrófagos peritoneales

Los macrófagos peritoneales se obtienen de ratones Swiss, con una edad comprendida entre las 8 y 12 semanas, sacrificados con dióxido de carbono y posterior dislocación cervical. Se les retira la piel abdominal y se les inyecta 5 ml de PBS frío en la cavidad abdominal con una jeringuilla con aguja de tamaño 25G. Tras agitar suavemente el animal, se vuelve a recoger el líquido intraperitoneal. Las células obtenidas se centrifugan durante 10 minutos a 300 xg y temperatura ambiente. Se resuspenden en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), previamente inactivado a 56 °C durante 20 minutos, y penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) como antibióticos (medio RPMI completo) y se siembran en placas de 6 pocillos 2 000 000 células/pocillo. La purificación de macrófagos se realiza por adherencia a la superficie de la placa de cultivo, fenómeno que ocurre dentro de las 4 horas posteriores a su cultivo. Pasado este tiempo se elimina el medio de cultivo para eliminar todas aquellas células que no se hayan adherido, sustituyéndose por nuevo RPMI completo. Los macrófagos peritoneales se mantienen en un incubador a 37 °C, con un aporte del 5% de CO₂ y una humedad del 90%.

En la figura 7 se muestra la morfología típica de macrófagos peritoneales en cultivo, tanto en condiciones basales como estimuladas

3.3. Técnicas de detección del mRNA

Extracción del RNA - La extracción del RNA total de las muestras celulares se lleva a cabo utilizando

el reactivo PRImeZOL™ siguiendo las instrucciones del fabricante (Canvax Biotech). Este procedimiento de extracción consta de una primera lisis de la muestra en el detergente catiónico tiocianato de guanidinio, seguido de extracciones orgánicas y precipitación con alcohol.

La concentración de RNA se cuantifica por espectrofotometría en el Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), midiendo la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm, donde los ácidos nucleicos tienen su pico de absorbancia. La pureza del RNA se evaluó a partir del ratio de absorbancia 260/280 nm, aceptando como puras aquellas muestras cuyo ratio tenía valores próximos a 2.

PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) - En la RT-PCR, se obtiene DNA complementario (cDNA) a partir de una hebra de RNA, a través de la enzima transcriptasa reversa. Para ello, se usa el Kit Verso cDNA Synthesis de Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizan 1.000 ng de RNA, a los que se les añade una mezcla que contiene el tampón de síntesis de cDNA, la enzima transcriptasa reversa, dNTPs, oligoDTs y el llamado *RT enhancer*. Se eligen oligoDTs como cebadores puesto que se anillan con las colas poli(A) del mRNA eucariota, frente a los decámeros producidos al azar, a más correctos en la obtención de RNA sin cola poli(A) (por ejemplo: rRNA, tRNA o RNA no-codificante) El *RT enhancer* degrada las cadenas dobles de DNA durante la transcripción del RNA, eliminando el posible DNA contaminante, y haciendo innecesario el tratamiento previo con DNasa I. La síntesis de cDNA se realiza a 43 °C durante 1 hora, tras la que se inactiva la enzima a 95 °C durante 3 minutos.

PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) - Mediante la RT-qPCR se amplifica y cuantifica el cDNA que tenemos en la muestra. Se lleva a cabo en el 7500 Real Time PCR System, utilizando el cDNA obtenido en la transcripción reversa, oligonucleótidos directos y reversos, y la mezcla Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) que contiene la DNA polimerasa Taq, dNTP, Mg²⁺, el tampón óptimo para la eficiencia máxima de la enzima

polimerasa y SYBR Green y, además, por separado un colorante que se añade para compensar las variaciones no relacionadas con la PCR en la fluorescencia.

En la RT-qPCR, primero se hace una desnaturalización del DNA que, al calentarse, se separa en dos cadenas monocatenarias. Después, en la fase de anillamiento, los oligonucleótidos específicos del gen que se quiere amplificar se unen a la cadena complementaria, permitiendo que fije en su extremo 3' la polimerasa. Por último, en la fase de extensión, se van formando las cadenas por complementariedad a partir de los cebadores que se han unido. El programa de temperaturas usado para la amplificación del DNA es el siguiente:

1. Preincubación o desnaturalización inicial 95 °C, 3 minutos.
2. Amplificación (40 ciclos):
 - a. Desnaturalización 95 °C, 12 segundos.
 - b. Anillamiento 60 °C, 16 segundos.
 - c. Extensión 72 °C, 28 segundos
3. Curva de disociación (*melting curve*):
 - a. 95 °C, 15 segundos.
 - b. 60 °C, 1 minuto.
 - c. 95 °C 1 minuto.
 - d. 60 °C 15 segundos.
4. Enfriamiento

Se hace una cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (31) comparando los valores de C_T de nuestro gen de interés con los valores de C_T de un gen constitutivo de referencia, en este caso *Gapdh*.

3.4. Cuantificación de proteínas

La concentración de la proteína se determina mediante el método Bradford (32). Se trata de un ensayo colorimétrico para medir la concentración de proteínas en solución. Se basa en el cambio de absorbancia máxima de 465 a 595 nm del colorante azul brillante Coomassie G-2510 tras su unión específica a las proteínas en un medio ácido. Para correlacionar la absorbancia con la concentración de proteína, se aplica la Ley de Beer- Lambert, empleando una curva estándar con albúmina de suero bovino cada vez que se realiza el ensayo. La

absorbancia se midió a 595 nm en el espectrofotómetro BioPhotometer plus (Eppendorf).

3.5. Western Blot

Esta técnica se utiliza para medir los niveles de expresión de proteínas. Primero, se realiza una electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE), donde las proteínas se separan en función de su tamaño. El detergente utilizado es dodecilsulfato sódico (SDS), el cual desnaturiza la estructura tridimensional de las proteínas y les confiere carga negativa, de forma que las proteínas migran hacia el ánodo. Se utilizan dos geles contiguos, uno de empaquetamiento situado en la parte superior, y otro de resolución en la parte inferior. Posteriormente, se realiza la transferencia de las proteínas separadas por peso molecular a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Immobilon®-P. Una vez en este soporte, las proteínas son expuestas a la unión de anticuerpos específicos para una determinada secuencia de aminoácidos (los denominados epítomos antigénicos).

En primer lugar, las muestras se reducen y desnaturizan en tampón de carga, que contiene el SDS, a 95 °C durante 5 minutos. Después, se lleva a cabo la electroforesis en cubetas MiniProtean™ (Bio-Rad laboratories) con tampón de electroforesis, utilizando geles de empaquetamiento al 4% de acrilamida/bis (37.5:1) al 30% (Bio-Rad laboratories) y geles de resolución al 10, 12 o 15% de acrilamida, dependiendo del tamaño de las proteínas de interés. Se deja unos 30 minutos a 60 V, con el fin de optimizar el empaquetamiento, y luego se sube a 120 V, durante 90 minutos.

Después, se hace la transferencia desde el gel de poliacrilamida a la membrana (Western Blot). Para ello, se cortan láminas de papel Whatman™ 17 Chr (0.92 mm) y una membrana de transferencia de PVDF, humedeciéndolas en tampón de transferencia ácido (N-ciclohexil-3-aminopropanesulfónico) (CAPS). La membrana debe quedar hacia el ánodo para que las proteínas, con carga negativa debido al SDS, migren del gel a la membrana. La transferencia se realiza en condiciones de humedad utilizando el citado CAPS.

Se aplica un amperaje constante de 300 mA durante 90 minutos.

Una vez dada la transferencia, se hace el bloqueo incubando en agitación suave durante toda la noche a 4 °C, con leche al 5% (p/v) en PBS, para bloquear los sitios activos de la membrana que no han sido ocupados por proteína. Se lava tres veces con PBS, siendo cada lavado de 10 minutos, y se añade el anticuerpo primario, preparado a su dilución correspondiente (detallado en el siguiente párrafo) en leche al 0,5% en PBS-Tween 0,1%. Se incuba en agitación suave, 1 hora a temperatura ambiente. Se lava tres veces con PBS-Tween 0,1%, 10 minutos de duración por lavado, para eliminar el exceso de anticuerpo. Entonces, se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora, en agitación suave, a temperatura ambiente. Después, se lava de nuevo tres veces con PBS-Tween 0,1%.

Se han utilizado los anticuerpos primarios producidos en conejo frente a iNOS y FADS2 (diluidos 1:1000) y producidos en ratón frente a β -actina (diluido 1:20 000); y los anticuerpos secundarios producido en burro frente IgG de conejo (diluido 1:10 000 para iNOS y 1:5000 para FADS2) y producido en oveja frente IgG de ratón (diluido 1:5000), ambos unidos a peroxidasa.

Para proceder a la detección de los anticuerpos, las membranas se incuban 1 minuto con ECL + H₂O₂, un método de quimioluminiscencia enzimática para la detección de anticuerpos conjugados con peroxidasa. La señal originada se detecta en películas autorradiográficas-Fuji-Medical-X-Ray Film (Fujifilm), colocando la película sobre la membrana en un cassette de revelado (GE HealthCare). Las películas se revelan en el sistema de revelado (Curix 60, AGFA). El análisis de cuantificación se realizó refiriendo la densidad de la banda a la de una proteína constitutiva (β -actina). Para ello, las películas se escanean en el GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories) con el programa Quantity One v.4.5.2. y, posteriormente, se cuantifica el área correspondiente a cada banda mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH).

3.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresan como el valor de la media \pm el error estándar de la media. La significación estadística se ha realizado mediante el Test de la t de Student de dos colas, para datos no apareados, considerándose significativos los valores de $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de la inhibición de FADS2 sobre la expresión génica de moléculas inflamatorias en la línea celular RAW 264.7 estimulada con agonistas TLR.

Como se ha mencionado anteriormente, los ácidos grasos producidos gracias a la actividad desaturasa Δ^5 y Δ^6 actúan inhibiendo la respuesta inflamatoria (6, 22). Por este motivo, en primer lugar se estudió qué efecto tiene sobre la respuesta inflamatoria que la célula esté incapacitada para la formación de dichos ácidos grasos.

Como se muestra en la figura 8, el compuesto SC-26196, inhibidor de FADS2 (IC₅₀ 0,1 μ M) (34), no tiene efecto en la respuesta basal de las células RAW 264.7. Sin embargo, sí parece interferir en la capacidad de respuesta de estas células cuando son estimuladas con agonistas TLR, aunque parece que el efecto es específico de la respuesta a LPS. Se puede ver que con la inhibición de la actividad FADS2 se potencia la respuesta inflamatoria en las células RAW 264.7 frente a LPS, ya que aumenta la expresión génica de *Il6*, *Nos2* y *Ccl2*. En cambio, en el caso de la respuesta frente a zimósán o LTA, otros agonistas TLR, no parece darse esta regulación.

4.2. Expresión de *Fads1* y *Fads2* en la línea celular RAW 264.7 y en macrófagos peritoneales

Puesto que la actividad FADS2 parece estar implicada en la respuesta inflamatoria, ya que su inhibición aumenta los niveles de moléculas inflamatorias, se consideró interesante estudiar el efecto de la estimulación con LPS sobre la expresión de *Fads1* y *Fads2* en la línea celular

RAW 264.7 y en macrófagos peritoneales mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Los niveles de expresión génica de ambas desaturasas disminuyen con la estimulación con LPS, y dicha disminución es más notable a mayor tiempo de estimulación (Figura 9A y 9B). Se confirma que estos experimentos se han hecho realmente dentro de un contexto inflamatorio con el análisis de marcadores inflamatorios (Figura 9C).

Por otro lado, a pesar de no parecer existir una implicación directa de la actividad FADS2 en la respuesta inflamatoria de las células RAW 264.7 frente a zimósán o LTA, se analizó igualmente la expresión de ambas desaturasas en células estimuladas con estos agonistas.

Al igual que en la estimulación con LPS, con zimósán y LTA también se observa una disminución de la expresión de *Fads1* y *Fads2*, aunque la variación es menor en el caso de LTA (Figura 10). Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas.

Además, estudios previos realizados en el laboratorio muestran que los niveles basales de expresión génica de *Fads2* difieren entre células primarias y línea celular (14), por lo que tras el estudio en las RAW 264.7, se procedió a analizar qué ocurre en células primarias. Para ello, se aislaron y cultivaron macrófagos peritoneales obtenidos de ratones Swiss, del modo que se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Viendo que la respuesta inflamatoria era máxima a 6 horas de estimulación en el caso de las células RAW 264.7 (figura 9C), y que la disminución de *Fads2* resulta evidente en este momento, 6 horas fue el tiempo elegido como punto de estimulación.

En los macrófagos peritoneales, los niveles de expresión de *Fads2* no varían notablemente (Figura 11A), mientras que los de *Fads1* disminuyen con la estimulación con LPS (Figura 11B). También se estimularon con zimósán (200 μ g/ml), para conocer qué sucede en estas condiciones, pero por problemas metodológicos desconocidos hubo una mortalidad celular inesperada tras las 6 horas de estimulación, por lo que no se han podido obtener estos datos (Figura 7C). De igual manera que con la

línea celular, se confirma que estos experimentos se hicieron realmente dentro de un contexto inflamatorio (Figura 11C). En cambio, en este experimento no se han observado diferencias estadísticamente significativas.

4.3. Medida de los niveles de la proteína FADS2 en la línea celular RAW 264.7 y en macrófagos peritoneales

Una vez obtenidos los datos de expresión génica se procedió a estudiar si estas variaciones referían a un cambio en la expresión de la proteína. Los niveles de la proteína se midieron mediante inmunodetección de la proteína, utilizando un anticuerpo específico frente a FADS2.

En el caso de la línea celular RAW 264.7, la proteína disminuyó bajo las condiciones de estimulación con LPS en la estimulación durante 16 horas (Figura 12A), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. En cambio, los datos no resultaron reproducibles en la estimulación de 8 horas, pero se muestra un ejemplo del análisis por inmunodetección (Figura 12B).

En los macrófagos peritoneales parece darse un aumento de la proteína tras la estimulación con LPS, tanto a 8 horas, como a 16 horas, siendo mayor el aumento en el segundo caso (Figura 13), aunque debe considerarse un resultado preliminar ya que procede de un único experimento.

Los resultados muestran que en células RAW 264.7 la proteína sigue la misma tendencia que el RNA con la estimulación durante 16 horas, es decir, disminuye. Por otro lado, en macrófagos peritoneales, en los cuales la expresión génica de *Fads2* no variaba tras la estimulación, se ve un aumento de la proteína tanto a 8 como a 16 horas.

5. DISCUSION

Como ya se ha mencionado anteriormente, se sabe que ácidos grasos como el ácido araquidónico, el DHA o el ácido palmitoleico, y su isómero el ácido sapiénico, derivados de la actividad desaturasa FADS1 y FADS2 (22), están implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria (6, 28).

Por ello, suponemos que durante la respuesta inflamatoria hay alteración de los niveles celulares de ácidos grasos debido a una regulación de la expresión de estas desaturasas. Para estudiarlo, se analizó el comportamiento de estas enzimas en macrófagos activados con estímulos TLR.

En primer lugar, se ha estudiado el efecto de la inhibición de FADS2 sobre la expresión génica de moléculas inflamatorias estimuladas con agonistas TLR, viéndose un aumento de la respuesta inflamatoria cuando la actividad FADS2 está inhibida, en concreto, en la respuesta frente a LPS. Esto apunta que, como se pensaba, FADS2 puede ser un modulador activo de la respuesta inflamatoria.

Por este motivo, pareció interesante estudiar el efecto de la estimulación con LPS sobre la expresión génica de *Fads1* y *Fads2*. Los resultados muestran que, en la línea celular RAW 264.7, los niveles de ambas desaturasas disminuyen tras la estimulación con LPS, y también lo hacen con otros agonistas TLR (LTA y zimosán), aunque en menor medida. Puesto que estudios previos mostraban que los niveles basales de la expresión génica de *Fads2* no son iguales entre líneas celulares y células primarias, el estudio se hizo también en macrófagos peritoneales. En este caso, no parece que existan variaciones en la expresión de *Fads2*, mientras que *Fads1* disminuye su expresión en la estimulación con LPS. Puede que las diferencias en cuanto a la expresión de *Fads2* entre ambos tipos celulares en la respuesta a LPS sean debidas a la diferencia que existe en los niveles basales de su expresión génica que, como muestra la literatura, son mayores en la línea celular (14), lo que sugiere la necesidad de una expresión basal mínima de *Fads2* para verse esta respuesta. Esto sugiere la posibilidad de una regulación *feed-back* negativa con una inhibición de *Fads2* por sus productos.

Posteriormente, se estudió si estas variaciones en la expresión génica implican cambios en la expresión de la proteína. No se han obtenido datos concluyentes en una estimulación de 8 horas con LPS sobre la línea celular, ya que los resultados no han sido reproducibles entre los diferentes experimentos. Sin embargo, en la estimulación de

16 horas se ve una clara disminución en los niveles de expresión de la proteína, siguiendo la misma tendencia que el RNA. Esto implica que, en este caso, la estimulación inflamatoria puede estar promoviendo una degradación de la proteína. Por otro lado, tanto a 8 como 16 horas de estimulación, parece haber un aumento de la expresión de FADS2 en macrófagos peritoneales; aunque este dato es preliminar, ya que procede de un único experimento. Este resultado en células primarias apoyaría la hipótesis del papel modulador de FADS2 en la respuesta inflamatoria, donde la desaturasa aumentaría sus niveles para cumplir un papel de inhibición sobre dicha respuesta.

Por lo tanto, lo observado en macrófagos peritoneales apunta a un papel de FADS2 de inhibición sobre la respuesta inflamatoria. Por otro lado, la disminución de la expresión de ambas desaturasas a nivel génico, y de FADS2 a nivel de la proteína, al menos a mayores tiempos de estimulación (16 horas), en la línea celular, sugiere la necesidad de una desregulación de esta proteína para continuar dando una mayor respuesta inflamatoria en este tipo de células. En vista a estos resultados, podríamos suponer una regulación de FADS2 diferente según el tipo celular. Por ello sería interesante hacer experimentos para ver si existen cofactores específicos que puedan estimular FADS2.

Sin embargo, aunque en ciertos experimentos no se han obtenido resultados estadísticamente significativos, parece clara la tendencia del comportamiento de las desaturasas FADS1 y FADS2 en condiciones de estimulación inflamatoria.

Debido a que parece verse una alteración en la expresión de FADS2 durante la estimulación inflamatoria, y que ácidos grasos derivados de su actividad desaturasa están implicados en dicha respuesta, sería interesante realizar estudios de lipidómica para ver cómo varían sus niveles. Cabría esperar que aquellos derivados de la actividad de

esta enzima reduzcan sus niveles tras aplicar estímulos inflamatorios en la línea celular, donde su expresión disminuye bajo estas condiciones, y aumenten en macrófagos peritoneales, donde la expresión de FADS2 aumenta. Esto apoyaría el papel de FADS2 en la inhibición de la respuesta inflamatoria a través de la producción de ácidos grasos antiinflamatorios.

Como bibliografía adicional se citan otros artículos previos del grupo sobre los que se basa este trabajo [35-44].

6. CONCLUSIONES

6.1. El aumento de mediadores inflamatorios con la inhibición de FADS2 apunta a esta enzima como un modulador activo de la respuesta inflamatoria, sobre la cual la proteína cumpliría un papel de inhibición según los resultados obtenidos en macrófagos peritoneales.

6.2. La aparente existencia de una necesidad mínima de expresión basal de *Fads2* para darse una disminución de su expresión génica sugiere la posibilidad de una regulación *feed-back* negativa con una inhibición de *Fads2* por sus productos.

6.3. La regulación de FADS2 parece ser diferente dependiendo del tipo celular, por ello sería interesante hacer experimentos para ver si existen cofactores específicos que puedan estimular FADS2.

6.4. Aunque en ciertos experimentos no se han obtenido resultados estadísticamente significativos, parece clara la tendencia del comportamiento de las desaturasas FADS1 y FADS2 en condiciones de estimulación inflamatoria.

6.5. Aún son necesarios diferentes experimentos para conocer la regulación de estas desaturasas en la respuesta inflamatoria, si existen cofactores que la estimulen, y sus consecuencias sobre los niveles de ácidos grasos relacionados con la inflamación.

REFERENCES

- Roy, A., Srivastava, M., Saqib, U., Liuc, D., Faisal, S. M., Sugathan, S., Bishnoi, S. and Baig M. S. 2016. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. *Int. J Immunopharmacol.* 40: 79–89.
- González, M. J., Ruiz-García, A., Monsalve, E. M., Sánchez-Prieto, R., Laborda, J., Díaz-Guerra, M. J. M. and Ruiz-Hidalgo, M. J. 2015. DLK1 is a novel inflammatory inhibitor which interferes with NOTCH1 signaling in TLR-activated murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 45: 2615–2627.
- Taghavi, M., Mortaz, E., Khosravi, A., Vahedi, G., Folkerts, G., Varahram, M., Kazempour-Dizaji, M., Garssen, J. and Adcock, I. M. 2018. Zymosan attenuates melanoma growth progression, increases splenocyte proliferation and induces TLR-2/4 and TNF- α expression in mice. *J. Inflamm.* 15: 1–10.
- Nguyen, T. T. N., Seo, E., Choi, J., Le, O. T. T., Kimb, J. Y., Jou, I., Lee, S. Y. 2017. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α contributes to Toll-like receptor 2-mediated immune responses in microglial cells stimulated with lipoteichoic acid. *Cell. Signal.* 38: 159–170.
- Tsukamoto, H., Takeuchi, S., Kubota, K., Kobayashi, Y., Kozakai, S., Ukai, I., Shichiku, A., Okubo, M., Numasaki, M., Kanemitsu, Y., Matsumoto, Y., Nochi, T., Watanabe, K., Aso, H. and Tomioka, Y. 2018. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1–IKK ϵ –IRF3 axis activation. *J. Biol. Chem.* 293: 10186–10201.
- Hwang, D. H., Kim, J. A. and Lee, J. Y. 2016. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 785: 24–35.
- Nicholas, D. A., Zhang, K., Hung, C., Glasgow, S., Aruni, A. W., Unternaehrer, J., Payne, K. J., Langridge, W. H. R. and De Leon, M. 2017. Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β . *PLoS One.* 12: e0176793.
- Núñez Miguel, R., Wong, J., Westoll, J. F., Brooks, H. J., O'Neill, L. A. J., Gay, N. J., Bryant, C. E. and Monie, T. P. 2007. A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. *PLoS One.* 8: e788.
- Guillou, H., Zdravce, D., Martin, P. G. P. and Jacobsson, A. 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49: 186–199.
- Lafontan, M. and Langin, D. 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* 48: 275–297.
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B. and Dumon, H. 2008. Liver lipid metabolism. *J. Animal Physiol. Animal Nutr.* 92: 272–283.
- Schwingshackl, L. and Hoffmann, G. 2012. Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients* 4: 1989–2007.
- Park, W. J., Kothapalli, K. S., Lawrence, P., Tyburczy, C., and Brenna, J. T. 2009. An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *J. Lipid Res.* 50: 1195–1202
- Astudillo, A. M., Meana, C., Guijas, C., Pereira, L., Lebrero, P., Balboa, M. A. and Balsinde, J. 2018. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* 59: 237–249.
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W. S., Howard, B., Karanja, N., Lefevre, M., Rudel, L., Sacks, F., Van Horn, L., Winston, M. and Wylie-Rosett, J. 2006. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006 A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *AHA Scientific Statement* 114: 82–96.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M. and Hotamisligil, G. S. 2008. Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell* 134: 933–944.
- Yang, Z. H., Miyahara, H. and Hatanaka, A. 2011. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* 10:120-128.
- Gong, J., H. Campos, S. McGarvey, Z. Wu, R. Goldberg, and A. Baylin. 2011. Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 186–191.
- Mozaffarian, D., H. Cao, I. B. King, R. N. Lemaitre, X. Song, D. S. Siscovick, and G. S. Hotamisligil. 2010. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 92: 1350–1358.
- Guijas, C., Meana, C., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., Balsinde, J. 2016. Foamy Monocytes Are Enriched in cis-7-Hexadecenoic Fatty Acid (16:1n-9), a Possible Biomarker for Early Detection of Cardiovascular Disease. *Cell Chem. Biol.* 23: 689–699.

21. Guijas, C., Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Gil-de-Gómez, L., Balboa, M. A. and Balsinde, J. 2012. Simultaneous Activation of p38 and JNK by Arachidonic Acid Stimulates the Cytosolic Phospholipase A₂-dependent Synthesis of Lipid Droplets in Human Monocytes. *J. Lipid Res.* 53: 2343–2354.
22. Tosi, F., Sartori, F., Guarini, P., Olivieri, O. and Martinelli, N. 2014. Delta-5 and Delta-6 Desaturases: Crucial Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid-Related Pathways with Pleiotropic Influences in Health and Disease. J. Camps (ed.), *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases. Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics* (pp. 61-81). Springer.
23. Park, H. G., Park, W. J., Kothapalli, K. S. D. and Brenna, J. T. 2015. The fatty acid desaturase 2 (FADS2) gene product catalyzes D4 desaturation to yield n-3 docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid in human cells. *FASEB J.* 29: 3911–3919.
24. Glaser, C., Heinrich, J. and Koletzko, B. 2010. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism Clin. Exp.* 59: 993–999.
25. Cho, H. P., Nakamura, M. T. and Clarke, S. D. 1999. Cloning, Expression, and Nutritional Regulation of the Mammalian D-6 Desaturase. *J. Biol. Chem.* 274: 471–477.
26. Gromovsky, A. D., Schugar, R. C., Brown, A. L., Helsley, R. N., Burrows, A. C., Ferguson, D., Zhang, R., Sansbury, B. E., Lee, R. G. Morton, R. E., Allende, D. S., Parks, J. S., Spite, M. and Brown, J. M. 2018. Δ -5 Fatty Acid Desaturase FADS1 Impacts Metabolic Disease by Balancing Proinflammatory and Proresolving Lipid Mediators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38: 1–30.
27. Tian, Y., Katsuki, A., Romanazzi, D., Miller, M. R., Adams, S. L., Miyashita, K. and Hosokawa, M. 2017. Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) Downregulates mRNA Expression of Pro-inflammatory Factors in LPS-activated Murine Macrophage Like RAW 264.7 Cells. *J. Oleo. Sci.* 66: 1149–1156.
28. Kang, J. X. and Weylandt, K. H. 2008. Modulation of Inflammatory Cytokines by Omega-3 Fatty Acids. Quinn, P.J. and Wang, X (ed), *Lipids in Health and Disease* (pp 133-143). Springer.
29. He, C., Qu, X., Wan, J., Rong, R., Huang, L., Cai, C., Zhou, K., Gu, Y., Qian, S. Y., Kang, J. X. 2012. Inhibiting delta-6 desaturase activity suppresses tumor growth in mice. *PLoS One.* 7: e47567.
30. Hayashi, Y., Shimamura, A., Ishikawa, T., Fujiwara, Y. and Ichi, I. 2018. FADS2 inhibition in essential fatty acid deficiency induces hepatic lipid accumulation via impairment of very low-density lipoprotein (VLDL) secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496: 549-555.
31. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ C(T)}. *Method. Methods* 25: 402–408.
32. 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.
33. Blish, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37: 911–917.
34. Harmon, S. D., T. L. Kaduce, T. D. Manuel, and A. A. Spector. 2003. Effect of the Δ 6 desaturase inhibitor SC-26196 on PUFA metabolism in human cells. *Lipids* 38: 469–476.
35. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103–1113.
36. Astudillo, A. M., D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 249–256.
37. Guijas, C., J. P. Rodríguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A₂ regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1841: 1661–1671.
38. Balgoma, D., O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Lipidomic approaches to the study of phospholipase A₂-regulated phospholipid fatty acid incorporation and remodeling. *Biochimie* 92: 645–650.
39. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Meana, J. M. Rubio, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J. Immunol.* 190: 5169–5177.
40. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Guijas, V. Magriotti, G. Kokotos, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 192: 752–762.
41. Rubio, J. M., J. P. Rodríguez, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2015. Group V secreted phospholipase A₂ is up-regulated by interleukin-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J. Immunol.* 194: 3327–3339.

42. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, P. Lebrero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2017. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Front. Immunol.* 8: 1251.
43. Peña, L., C. Meana, A. M. Astudillo, G. Lordén, M. Valdearcos, H. Sato, M. Murakami, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2016. Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A₂ in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 1083–1095.
44. Guijas, C., A. M. Astudillo, L. Gil-de-Gómez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages: comparison with arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1386–1393.

