

# Señalización mediada por lípidos y lipidómica en la respuesta inmune innata

Jesús Balsinde

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

October 5, 2012

**Transcripción del seminario impartido en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de Pamplona el viernes 5 de octubre de 2012 (Slide 1) [1].**

Tradicionalmente se ha considerado que los lípidos cumplen dos misiones principales en fisiología: servir como fuente energética a partir de los nutrientes y como soporte estructural de las membranas celulares (Slide 2 – Classical View of Lipids). Sin embargo esta visión ha cambiado enormemente, para bien, en los últimos 30-40 años con el descubrimiento de que los lípidos son clave en señalización (Slide 3 – Current View of Lipids). Se han descubierto sistemas de señalización intracelular que conectan estímulos externos con la ejecución de respuestas específicas. Destacamos tres de ellas; las que utilizan fosfolipasa C, esfingomielinasa y fosfolipasa A<sub>2</sub> como amplificadores. Esta última utiliza múltiples mensajeros, tanto intra como extracelulares y, aunque presente en todas las células, es de un interés especial en células de la inmunidad innata [2-4]. Papel de los eicosanoides en el cuerpo humano, regulando un sinnúmero de acciones fisiológicas que se muestran en la figura (Slide 4 – Role of Eicosanoids in the Human Body). El papel de la inflamación se ilustra con el famoso cartoon de Nature Reviews in Immunology (Lawrence et al., 2, 787-795, 2002) (Slide 5 – Untitled). La importancia de los lípidos e inflamación es tal que incluso ha llegado a afectar a la evolución del ser humano. Si hemos tardado dos millones y medio de años en llegar al homo sapiens, en sólo treinta años estamos asistiendo a la aparición de un nuevo eslabón en la evolución humana; el homo obesus (Slide 6 – Lipids, Inflammation and Evolution). En la siguiente diapositiva tenemos un obeso feliz (Slide 7 – The Risks of Eating Too Much Fat). Obélix no lo sabe, pero su riesgo de padecer un accidente cerebrovascular es tres veces mayor que el de una persona normal; su riesgo de ser hipertenso es también tres veces mayor; su riesgo de sufrir un problema cardiovascular es cuatro veces mayor y su riesgo de padecer diabetes de tipo 2 es tres veces mayor. De aquí pasamos a introducir el concepto de lipidómica con la cita de Ed (Slide 8 – What Is Lipidomics?) y la definición “oficial” de los europeos (Slide 9 – What Is Lipidomics?), para explicar después que la herramienta de uso es la espectrometría de masas (Slide 10 – Lipidomics: Mass Spectrometry) e introducir nuestro laboratorio como un pionero de la lipidómica en España y nuestro foco principal en el ácido araquidónico y todo lo que de él se deriva (Slide 11 – Lipidomics in Valladolid). Nuestros estudios incluyen fundamentalmente glicerofosfolípidos con araquidónico lo que hace obligado volver de nuevo a la cascada del AA regulada por fosfolipasas A<sub>2</sub> (Slide 12 – Role of Phospholipase A<sub>2</sub> in Arachidonic Acid Release) [5], con énfasis en las clases de fosfolípidos atacadas (Slide 13 – Role of Phospholipase A<sub>2</sub> in Arachidonic Acid Release). Se hace necesario ahora explicar cómo funciona el proceso de remodelación vía aciltransferasas y transacilasas independientes de CoA (Slide 14 – Free AA Levels Depend on a Deacylation/Reacylation Cycle) (Slide 15 – AA Incorporation Into and Remodeling Between Phospholipids) [3, 6, 7]. Como diapositiva de cierre se hace la analogía de las enzimas haciendo soka-tira (Slide 15 – The Arachidonic Acid Tug of War), lo que concluye la introducción teórica.

Comienza la exposición de resultados del laboratorio con el trabajo de David Balgoma relativo a la identificación de marcadores lipídicos de activación (Slide 17 – Lipidomics as a Useful Approach to Identify Markers of Activation) [8,9]. Se describe en detalle el procedimiento utilizado y se introduce el uso de pirrofenona, inhibidor de cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  [10,11], que nos sirve de control en estos experimentos. Antes de comenzar con los resultados propiamente dichos, se hace necesario explicar el mundo en que se nombran los fosfolípidos (Slide 18 – Glycerophospholipids – Nomenclature). Se utiliza como ejemplo PC(18:0/20:4) y se termina comentando el caso especial de los éteres, ya que en células fagocíticas es muy frecuente que si en posición 2 hay AA, haya un éter en posición 2. En la siguiente diapositiva se muestra el araquidonoma de los monocitos humanos clasificado por clases de fosfolípidos (Slide 20 – AA-Containing Phospholipids in Unstimulated Human Monocytes). Se muestran los time-courses de las diferentes clases de fosfolípidos, PC (Slide 21 – Time-dependent Changes of Major AA-containing PC Species After Zymosan Stimulation), PI (Slide 22 – Time-dependent Changes of Major AA-containing PI Species After Zymosan Stimulation), and PE (Slide 23 – Time-dependent Changes of Major AA-containing PE Species After Zymosan Stimulation) y se enfatiza la aparición de especies que muestran un comportamiento inusual, ya que aumentan [9]. Terminamos con las conclusiones de estos experimentos (Slide 24 – Conclusions) y se hace notar el interés en estudiar qué papel pueden tener estos lípidos inusuales durante la activación celular. Ello nos lleva a la estrategia de introducir estas especies en las células utilizando carriers polibásicos (Slide 25 – Intracellular Delivery of Anionic Phospholipids) [12].

En la siguiente parte de la charla hablaremos de gotas lipídicas (Slide 26 – Lipid Droplets). Estimulación de los monocitos con AA exógeno y visualización de lipid droplets con Bodipy (Slide 27 – AA Induces Lipid Droplet Formation) y se confirma por espectrometría de masas un incremento en triacilglicerol y ésteres de colesterol (Slide 28 – AA Induces Neutral Lipid Formation) [13]. Por supuesto, AA es un lípido; por tanto, la producción de lípidos neutros bajo estas condiciones podría resultar simplemente de la entrada pasiva de este ácido graso en los lípidos celulares. Pero también existe la posibilidad de que el AA realmente active las células y promueva la formación de lípidos neutros a partir de otros ácidos grasos presentes en las células (Slide 29 – AA Effects on Lipid Droplet Formation). Para diferenciar entre ambas posibilidades usamos triacsina C, un inhibidor de algunas acil-CoA sintetasas que previene la utilización de ácido graso exógeno por las células y por tanto bloquearía la componente pasiva pero no la activa. Eso es lo que se muestra en la siguiente diapositiva (Slide 30 – TAG Fatty Acid Composition in Lipid Droplets), que demuestra que AA realmente activa la formación de gotas lipídicas a través de la movilización de diversos ácidos grasos a lípidos neutros. En la siguiente diapositiva se hace notar que en términos relativos el ácido palmítico es el más enriquecido (Slide 31 – Fatty Acid Content of TAG and CE). A continuación se estudia si esta aparición elevada de ácidos grasos en lípidos neutros proviene de fosfolípidos u ocurre de novo (Slide 32 – Origin of the Fatty Acids – Possibilities). Mediante GC/MS se mide el contenido total de ácidos grasos en las células y se observa que está elevado lo que demuestra una activación de la síntesis de novo (Slides 33 y 34 – Total Fatty Acid Content of Human Monocytes). Mediante qPCR se demuestra que la expresión de los cuatro genes que controlan la síntesis de ácidos grasos están incrementados (Slides 35 y 36 – Expression of Genes Involved in *de novo* Fatty Acid Synthesis). Termina esta parte de la charla con la diapo resumen correspondiente (Slide 37 – Lipid Inflammatory Signals Regulate Cellular Lipid Metabolism).

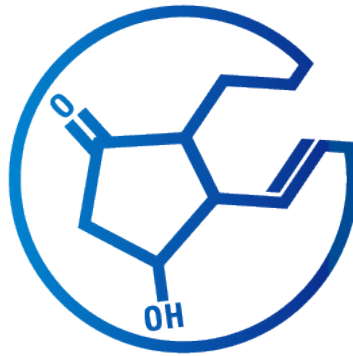
En la última parte de la charla hablaremos de la identificación de nuevas rutas de activación celular mediante lipidómica; el caso de la caveolina-1 (Slide 38 – Lipidomics as a Useful Approach to Identify New Protein Effectors Involved in Inflammation). Se explica lo que es la caveolina-1 (Slide 39 – Caveolae and Caveolin-1) y se describen los ratones k.o. (Slide 40 – Caveolin-1 KO Mice). Después se describe que en macrófagos de estos ratones hay una clara elevación de la incorporación de AA en lípidos (Slide 41 – AA Incorporation Into Phospholipids) y se muestran las especies individuales que capturan este AA por LC/MS (Slide 42 – AA Incorporation Into Phospholipids) [14]. Estos cambios persisten en el tiempo? Se hace necesario analizar especies en el equilibrio (Slide 43 – Untitled). Se comienza midiendo niveles totales de ácidos grasos por GC/MS que muestran que el contenido total de AA no varía (Slide 44 – Phospholipid

Fatty Acid Content) [14]. Posteriormente se analiza por LC/MS la distribución en fosfolípidos del AA endógeno y se señalan las variaciones (Slide 45 – AA Containing Phospholipids). En la siguiente diapositiva se muestran los datos por clases de fosfolípidos (Slide 46 – Equilibrium). Los datos sugieren variaciones en la transacilasa independiente de CoA, por lo que se mide su actividad que, efectivamente, está incrementada en los KO (Slide 47 – CoA-IT Activity Is Augmented in Homogenates from Cav-1-deficient Cells) [14]. Se mide a continuación la liberación de AA estimulada por zimosán, un estímulo prototípico de macrófagos [15,16] y se observa que está disminuido (Slides 48 y 49 – AA Mobilization in Control and Cav-1-deficient Mice) [14]. Los eicosanoides también están disminuidos (Slide 50 – Eicosanoid Production in Control and Cav-1-deficient Mice) [14]. Se concluye con la diapositiva resumen de rigor, donde se muestran gráficamente con flechas los cambios observados y se concluye que estos datos lipidómicos han permitido descubrir la participación de caveolina-1 en los procesos de liberación y metabolismo de AA (Slide 51 – Caveolin-1). Se muestran para finalizar los datos preliminares con el modelo de peritonitis (Slide 52 – Infiltración de neutrófilos en modelo de peritonitis inducido por zimosán) y se da por concluido con la diapositiva final de resumen (Slide 53 – The Lipidomics Approach to Cellular Signaling). Diapositiva de agradecimientos mostrando el cartel de nuestro macrófago cargado de lípidos del CIBERDEM'11 (Slide 54 – Acknowledgments). Muchas gracias por su atención. (Diapositivas descartadas en refs. 17-21).

#### REFERENCES

1. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol.* 186: 6004–6013.
2. Balsinde, J., M. V. Winstead, and E. A. Dennis. 2002. Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2-6.
3. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A<sub>2</sub> and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103–1113.
4. 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.
5. Balsinde, J., M. A. Balboa, P. A. Insel, and E. A. Dennis. 1999. Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 175-189.
6. Balsinde, J. 2002. Roles of various phospholipases A<sub>2</sub> in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* 364: 695-702.
7. Pérez, R., X. Matabosch, A. Llebaria, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2006. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J. Lipid Res.* 47: 484-491.
8. Balgoma, D., O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2008. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>-mediated formation of 1,2-diarachidonoyl-glycerophosphoinositol in human monocytes. *FEBS J.* 275: 6180–6191.
9. Balgoma, D., A. M. Astudillo, G. Pérez-Chacón, O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* 184: 3857–3865.

10. Balboa, M. A., and J. Balsinde. 2002. Involvement of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 40384–40389.
11. Balboa, M. A., R. Pérez, and J. Balsinde. 2008. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> mediates proliferation of human promonocytic U937 cells. *FEBS J.* 275: 1915–1924.
12. Casas, J., M. A. Gijón, A. G. Vigo, M. S. Crespo, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2006. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A<sub>2</sub> to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol. Biol. Cell* 17: 155–162.
13. Guijas, C., G. Pérez-Chacón, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gómez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid Res.* 53: 2343–2354.
14. Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, C. Meana, D. Balgoma, A. Pol, M. A. del Pozo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to reduced eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* 286: 35299–35307.
15. Balsinde, J., B. Fernández, and E. Diez. 1990. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* 144: 4298–4304.
16. Balsinde, J., B. Fernández, J. A. Solís-Herruzo, and E. Diez. 1992. Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1136: 75–82.
17. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Peña, L. Gil-de-Gómez, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J. Biol. Chem.* 287: 10894–10904.
18. Casas, J., Meana, C., Esquinas, E., Valdearcos, M., Pindado, J., Balsinde, J. & Balboa, M. A. (2009) Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A<sub>2</sub> to phagosomes in human macrophages. *J. Immunol.* 183: 2767–2774.
19. Ruipérez, V., A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Coordinate regulation of Toll-like receptor-mediated arachidonic acid mobilization in macrophages by group IVA and group V phospholipase A<sub>2</sub>s. *J. Immunol.* 182: 3877–3883.
20. Pérez, R., M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2006. Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. *J. Immunol.* 176: 2555-2561.
21. Pérez, R., R. Melero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2004. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 279: 40385-40391.



**THE EICOSANOID  
RESEARCH DIVISION**  
VALLADOLID

The grid contains 55 numbered thumbnails, each representing a slide from a presentation. The thumbnails are arranged in 5 rows and 11 columns. The last cell in the fifth row (row 5, column 11) is empty. The thumbnails include various scientific content such as chemical structures, graphs, diagrams, and text-based slides.