



Proyecto de fin de máster

“Mecanismos de activación de monocitos humanos por derivados oxidados del ácido araquidónico”

Trabajo realizado por: Miguel Ángel Bermúdez Arias

Tutor: Jesús Balsinde Rodríguez

Índice

INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Cuantificación de la oxidación del ácido araquidónico a lo largo del tiempo en diferentes condiciones (BHT y N ₂)	9
Identificación de los productos oxidados obtenidos del ácido araquidónico.....	13
Incubación de células THP-1 con ácido araquidónico y derivados oxidados del ácido araquidónico.....	13
RESULTADOS.....	15
Cuantificación de la oxidación del ácido araquidónico a lo largo del tiempo en diferentes condiciones (BHT y N ₂)	15
Identificación de los productos oxidados obtenidos del ácido araquidónico.....	19
Incubación de células THP-1 con ácido araquidónico y derivados oxidados del ácido araquidónico.....	24
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29

Introducción

La aterosclerosis es la principal causa de enfermedades cardiovasculares y la diabetes la acelera. La aterosclerosis comienza con la activación anormal de las células endoteliales, que se produce por ejemplo, por el aumento de lípidos en la sangre (dislipidemia) o azúcar en la sangre (diabetes). Las células endoteliales liberan una amplia variedad de productos con potencial inflamatorio que pueden atraer monocitos y favorecer así su interacción con las células endoteliales, cuyo resultado es la infiltración de los monocitos activados en la pared del vaso.(1) Allí, los monocitos se diferenciarán en macrófagos y absorberán una enorme cantidad de lípidos que se han depositado en ese espacio (principalmente ésteres de colesterol), almacenándolos en gotas lipídicas, convirtiéndose así en células espumosas, y estableciendo una placa de ateroma. Con el tiempo, las células del músculo liso proliferarán y llegarán a la zona rica en macrófagos lo que empeorará el proceso (Fig. 1).

Los gotas lipídicas (LD) son inclusiones citoplasmáticas que se producen prácticamente en todo tipo de células, están formadas por una monocapa de fosfolípidos compuesta de una variedad de proteínas y cuyo interior hidrofóbico contiene TAG (triacilglicerol) y CE (ésteres de colesterol)(2-5). Durante muchos años se consideró que estas gotas lipídicas eran orgánulos de almacenamiento de lípidos neutros para su uso en caso de necesidades energéticas. Hoy en día se sabe que además de almacenar lípidos neutros, las LD tienen una amplia variedad de roles en la fisiología celular. Las LD pueden servir como plataformas de señalización para que diferentes tipos de enzimas puedan interactuar, esto es particularmente cierto para las enzimas de señalización de lípidos; fosfolipasa citosólica $A_2\alpha$ (cPLA α),(6) la ciclooxigenasa-2 o lipina-1, todas localizadas en este orgánulo. En segundo lugar, se ha encontrado que las LD juegan un papel clave en el desarrollo y progresión de los trastornos metabólicos inflamatorios, de los cuales los más comunes son las enfermedades cardiovasculares.

Entre los muchos compuestos secretados por las células endoteliales que pueden afectar a los monocitos hay uno con un amplio rango de actividad biológica, el ácido araquidónico (AA). Las células endoteliales secretan grandes cantidades de este ácido graso.(7)

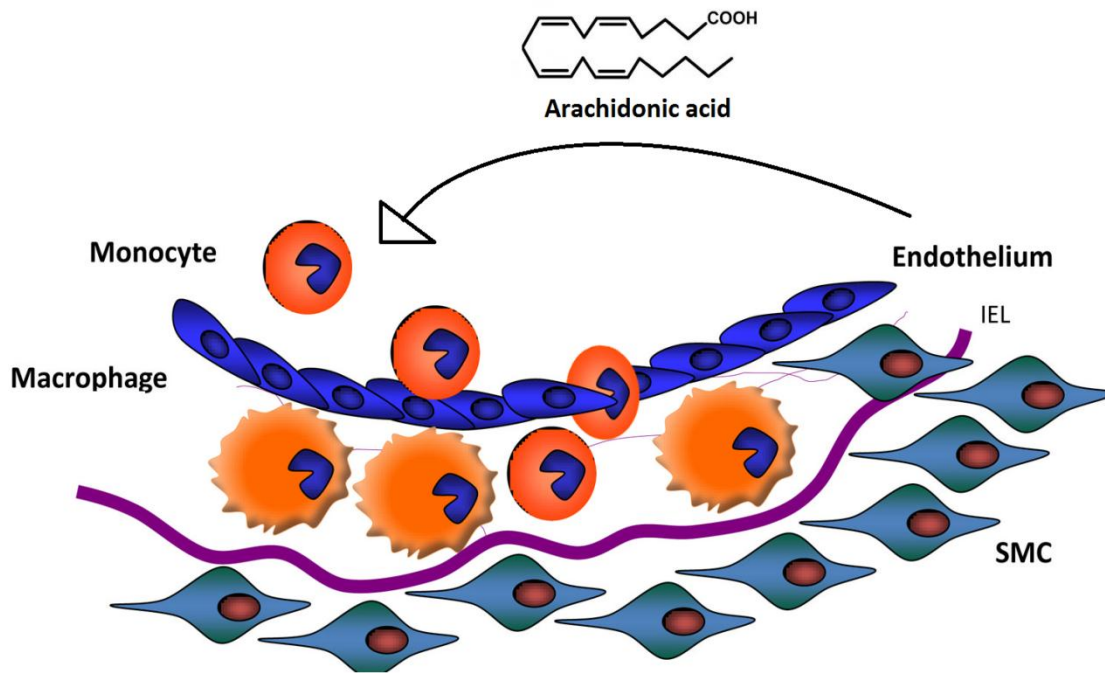


Fig.1. Esquema representativo de la iniciación de la lesión aterosclerótica. IEL, Lamina interna elástica; SMC, células musculares lisas.

Se ha comprobado experimentalmente que en monocitos humanos expuestos a $10 \mu\text{M}$ de AA, una concentración fisiopatológicamente relevante, se induce la formación de gotas lipídicas.(8) Como se muestra en la Fig. 2, los monocitos expuestos a AA producen una gran cantidad de gotas de lípidos, teñidas en verde con el colorante Bodipy. Con las mediciones de masa se confirmó que en las células tratadas con AA efectivamente producen cantidades elevadas de ambos TAG y CE (Fig. 3). Este efecto parece ser específico, ya que otros ácidos grasos como el palmítico (16:0) no tienen efecto a estas concentraciones (Fig. 2). Estos datos sugieren que los monocitos pueden comenzar a convertirse en células espumosas incluso antes de cruzar la capa endotelial, e incluso antes de convertirse en un macrófago real.

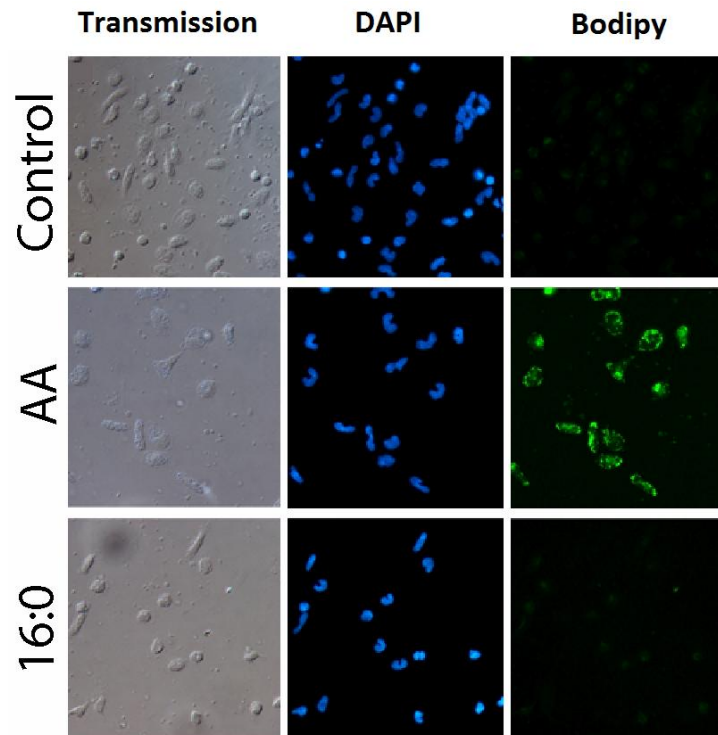


Fig.2. Formación de las LD inducida por AA y ácido palmítico. Monocitos incubados durante dos horas con 10 μ M de los dos ácidos grasos anteriores. Tras la fijación e incubación fueron teñidas con BODIPY493/503(2 μ g/ml) para visualizar las LD y DAPI (1 μ g/ml) para teñir el núcleo.

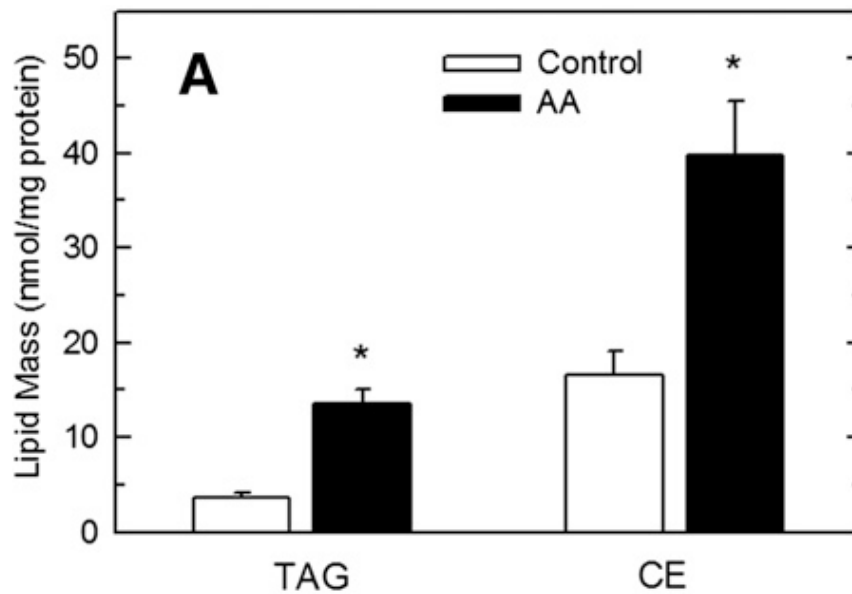


Fig.3. Inducción de la formación de TAG y CE en monocitos humanos tratados con AA. Células tratadas durante 2 horas con 10 μ M de AA. Análisis de estos compuestos con GC-MS tras la conversión de glicerol de ácidos grasos y esteres de colesterol en esteres metílicos de ácidos grasos.

Después de que el AA haya sido liberado de los fosfolípidos en condiciones de estimulación celular, puede ser metabolizado a eicosanoides a través de cuatro vías diferentes; a través de la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, citocromo p450 y oxidaciones no enzimáticas (Fig. 4).(9)

Estas vías producen gran cantidad de compuestos, tales como prostaglandinas, tromboxanos, isoprostanos, leucotrienos, lipoxinas y ácidos epoxieicosatrienoicos, todos los cuales pueden actuar de forma paracrina a través de receptores específicos de membrana.(10)

La síntesis de PGH_2 vía ciclooxigenasa es el primer paso para la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del AA. La ciclooxigenasa incorpora oxígeno molecular y forma PGG_2 que es posteriormente reducido para formar PGH_2 por la acción del sitio activo de la peroxidasa. PGH_2 es el sustrato de diferentes sintasas de prostaglandinas y tromboxanos, las cuales son expresadas en tejidos y células de manera selectiva y conducen a la formación de PGE_2 , PGD_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y TXA_2 .(11) Estos compuestos ejercen importantes funciones biológicas, como son la modulación del tono del músculo liso, la permeabilidad vascular, fiebre y agregación de plaquetas.(12)

Los leucotrienos, eoxinas, lipoxinas y ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs) se sintetizan a partir del AA por las enzimas lipoxigenasas (5-,12- y 15-lipoxigenasas) que añaden oxígeno molecular de forma estereoespecífica al AA. La 5-lipoxigenasa forma ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) que se metaboliza a LTA_4 en un segundo paso. LTA_4 es inestable y rápidamente se puede convertir en LTB_4 , un potente quimioatrayente para los leucocitos polimorfonucleares. Además, LTA_4 se puede convertir en LTC_4 que es precursor de LTD_4 y LTE_4 . Estos leucotrienos constituyen las sustancias de reacción lenta de anafilaxia que actúan en la respuesta alérgica.(13)

Las eoxinas se producen de una manera similar a la formación de leucotrienos, pero por la acción de 15-lipoxigenasa,(14) y son casi tan potentes como los leucotrienos derivados de 5-lipoxigenasa.(15)

Las lipoxinas son generadas por biosíntesis transcelular y tienen diferentes roles antiinflamatorios.(16)

Otros metabolitos, incluyendo los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y sus productos de la hidrólisis del anillo epóxido, ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs) son

derivados de las enzimas citocromo-P450(17). Las EETs se han asociado con propiedades antiinflamatorias en enfermedades cardiovasculares.(18)

La cuarta vía de producción de eicosanoides es la oxidación del ácido araquidónico de forma no enzimática para producir un grupo de compuestos conocidos como isoprostanos. Como las reacciones de radicales impulsados no son estereoselectivas, se generan diferentes isómeros con estructuras similares a las de las prostaglandinas. Debido a su origen, los isoprostanos se han utilizado como marcadores de estrés oxidativo. También se genera por esta vía no enzimática, y por tanto no estereoselectiva, un variado número de derivados mono- dihidroxilados del AA análogos a los producidos vía de las lipoxigenasas pero con diferentes configuraciones espaciales.(19)

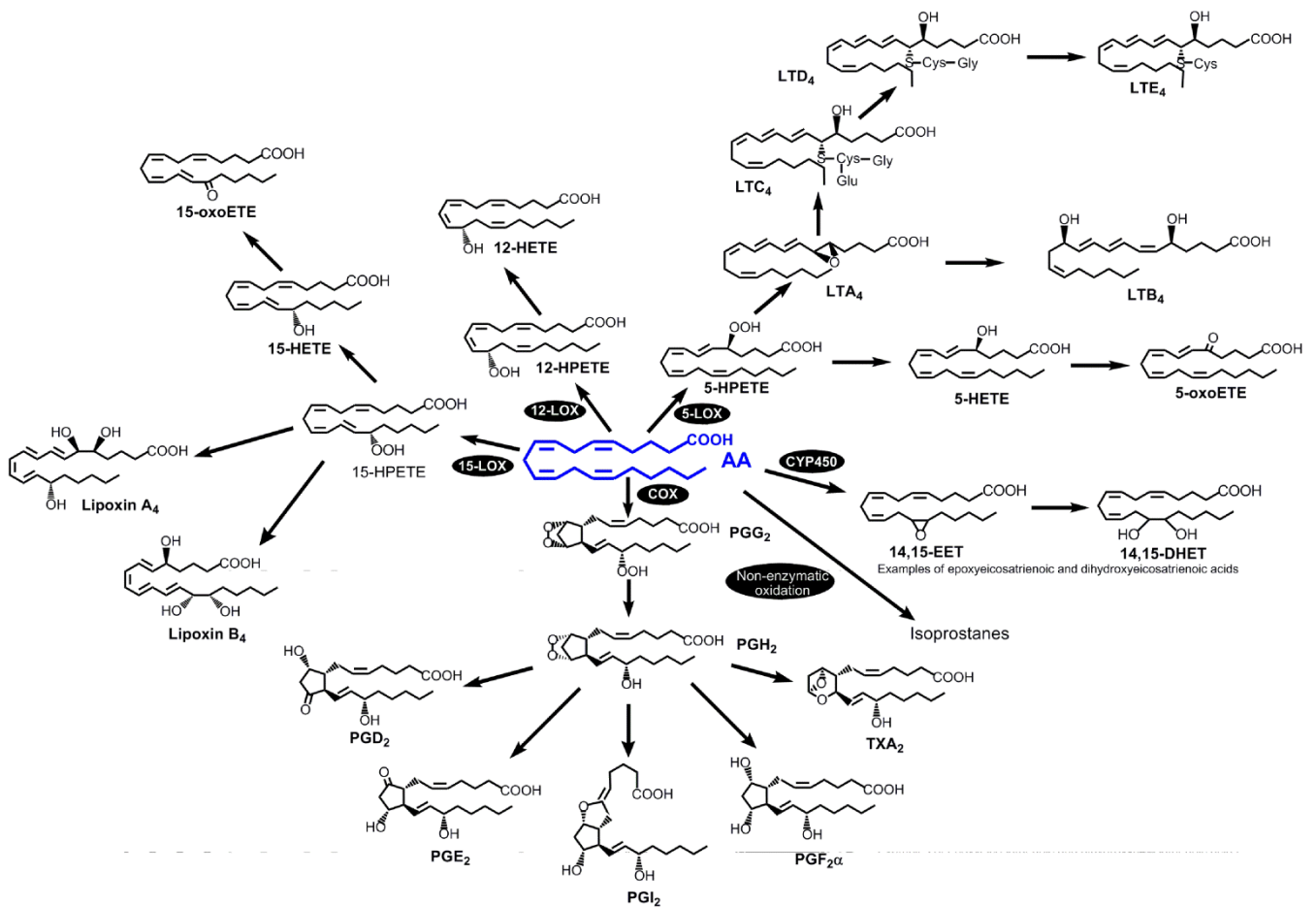


Fig.4. Las cuatro vías del metabolismo del AA en eicosanoides: ciclooxigenasa, lipoxigenasa, citocromo P-450 y las reacciones de oxidación no enzimática(9).

Objetivos

A la vista de estos antecedentes descritos, el objetivo general de este trabajo es por un lado analizar los grados de oxidación espontánea que se producen en el ácido aráquidónico a lo largo del tiempo, en diferentes condiciones, e identificar los diferentes productos obtenidos de estas oxidaciones. Una vez identificados los diferentes estados oxidados se analizará su posible actividad biológica, examinando su capacidad para promover la formación de gotas lipídicas.

Materiales y métodos

Cuantificación de la oxidación del AA a lo largo del tiempo a diferentes condiciones (BHT y N₂)

Disolventes utilizados:

- Metanol
- Butil-hidroxi-tolueno o E-321 (0.01%) en metanol
- Cloroformo/etanol(2:1)
- Análisis de eicosanoides (AA): Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS):
 - Solvente A: hexano:isopropanol (30:40)
 - Solvente B: hexano:isopropanol:acetato de amonio+H₂O (30:40:7)

Equipamiento utilizado:

El análisis de los derivados oxidados de AA se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)(20).

El espectrómetro de masas es un artefacto que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/mz).

Actualmente existen diferentes métodos para "filtrar" los iones respecto a su relación masa/carga. El que se utiliza en este proyecto es el denominado triple cuadrupolo, que consta de 3 cuadrupolos seguidos. Cada uno de ellos compone de 4 barras alargadas en formación cuadrada, conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos. A dichos pares (polos) se les aplica una tensión de radiofrecuencia variable que sintoniza con un determinado ión. Cuando existe sintonía entre el ion que está pasando por ellas y la frecuencia aplicada, dicho ion continúa su camino desviándose todos los demás no sintonizados fuera del cuadrupolo y de esta manera no impactan en el detector.

Existen diferentes métodos de operación para el analizador de masas de triple cuadrupolo, en este proyecto se han utilizado los siguientes:

Barrido completo (*full scan*). En el equipo con triple cuadrupolo (QqQ), el primer analizador MS1 (Q1) hace un barrido completo y registra espectros de masas de cada uno de los analitos que emergen de la columna del HPLC, se ionizan y se fragmentan

en iones moleculares y sus diferentes iones-producto. Éste será la base para la identificación presuntiva (cuando se usan bases de datos de espectros de masas) o confirmatoria (cuando se usan compuestos-patrón certificados). Los cuadrupolos Q2 (q) y Q3 (analyzer de masas MS2) operan solo en modo de transmisión de iones.

Barrido de ion(es) seleccionado(s) (SIM, *Selected Ion Monitoring*). En este caso, el primer analyzer, MS1 (Q1) solo deja pasar un ion o varios iones seleccionados, típicos o característicos del analito-*target*, que se busca selectivamente en una mezcla compleja.

Los otros dos cuadrupolos, Q2 y Q3 (MS2), sólo transmiten estos iones filtrados por el MS1 (Q1).

Barrido de ion-fragmento (*Product ion scan*). Este modo de adquisición consiste en la selección de un *ion precursor* o un *ion-padre* en el primer analyzer (MS1, Q1), que opera en modo de monitorización de ion seleccionado. El ión-padre escogido por el MS1 (Q1) se dirige luego a la cámara de colisiones activadas (o celda de colisiones), cuyo rol lo cumple el segundo cuadrupolo, Q2 o “q”. El analyzer Q2 (q) opera sólo con la radiofrecuencia aplicada (*RF-mode*), que permite transmitir los iones desde Q1 al analyzer MS2 (Q3). El gas de colisión, les proporciona la energía adicional (proceso de excitación de iones) que con el potencial aplicado en el Q2 (q) permite acelerar los iones y convertir parte de su energía cinética en la energía interna *adicional* (rotacional, vibracional y electrónica). El incremento de la energía interna de los iones conduce a su disociación y a la formación de diversos iones-fragmento (iones-producto), que se dirigen luego al segundo analyzer (MS2, Q3). En la Fig.5 aparece una representación esquemática de este modo de operación(21, 22).

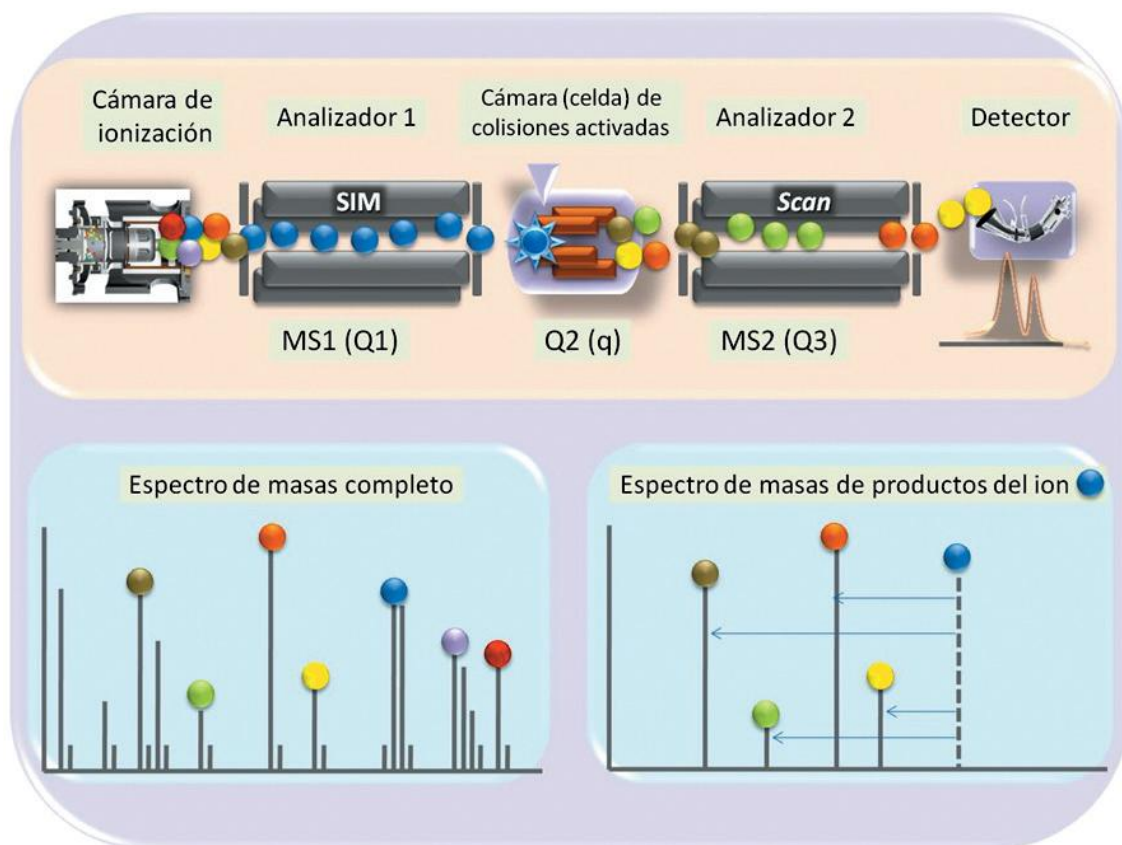


Fig.5. Triple cuadrupolo: modo de operación de registro de iones-producto (*Product ion scan*). En el primer analizador MS1 (Q1), que opera de modo SIMS, se filtran los iones de interés, que luego se dirigen a la cámara (celda) de colisiones activadas (Q2 o q) donde se “activan” y se fragmentan; los iones-producto se analizan en el segundo analizador MS2 (Q3) que opera en modo *full scan*, haciendo barrido de masas (m/z) menores que la del ion-precursor.

Condiciones del HPLC

El cromatógrafo líquido de alta resolución es un Angilent 1260 está equipado por un sistema de bombas cuaternario Angilent G1311C, un inyector automático Angilent G1329B. Se realizó con una precolumna de C18 y una columna SUPELCOSIL LC-18. Se hizo a un flujo total de la columna= 600 μ l/min con una duración total de 25min y una inyección de 40 μ l de la disolución de interés(20, 23).

El gradiente utilizado es el siguiente:

t (min)	% A	t (min)	% A
0	100	18	25
3	75	18.5	10
11	55	20	STOP
13	40	--	--

Condiciones del espectrómetro de masas

El flujo proveniente del cromatógrafo se introduce en un electrospray de un espectrómetro de masas API2000 triple cuadrupolo. Los parámetros de la fuente fueron los siguientes: voltaje, -4500V; *courtain gas*, 25 libras por pulgada cuadrada; gas nebulizador, 40 libras por pulgada cuadrada; gas de desolvatación, 80 libras por pulgada cuadrada; temperatura, 550°C.

El modo analizador se fijó para el seguimiento programado de reacción múltiple con ionización negativa, definiendo cada analito m/z del ión padre como masa Q1 y la relación m/z de su fragmento de iones hijo como masa Q3, y asociarlos al tiempo de retención cromatográfica para mejorar el número de analitos recogidos en una sola serie cromatográfica. La ventana de tiempo de retención se establece en 120s. Otros parámetros que fueron fijados para todos los analitos: Potencial de entrada, 10V; potencial de enfoque, 350V y el potencial de colisión de salida, 10V(20).

Preparación de las muestras

Se disuelve los 50mg de residuo seco de AA en 1ml de metanol obteniendo así una disolución de 50mg/ml (solución principal).

Muestras utilizadas en el día 0:

De la disolución principal se traspara 1 µL en un tubo eppendorf, se seca el disolvente y se resuspende en 250 µL del eluyente A utilizado para el análisis de eicosanoides con el HPLC-MS.

Se introducen 50 µL de esta disolución en el vial utilizado para el HPLC-MS, en el que se inyectarán 40 µL.

Muestras para la ver los valores de oxidación del AA en BHT.

Se traspara 1 µL de la disolución principal a un bote ámbar en el que se añaden 499µL de metanol y 5 µL de BHT al 0.01%(w/v). Posteriormente se introducirá N₂ al bote, se sella y se almacena a -20°C.

Muestras para la ver los valores de oxidación del AA en N₂.

Se traspasa 1 µL de la disolución principal a un bote ámbar en el que se añaden 499µL de metanol. Posteriormente se introducirá N₂ a bajo flujo durante aproximadamente 30s, se sella con parafilm y se deja a -20°C.

Para analizar todas las muestras que se han oxidado a las diferentes condiciones se secan el disolvente, se diluye en 250 µl del eluyente A y se introducen 50 µL de esta disolución en el bote especial para el HPLC-MS, en el que se inyectarán 40 µL.

Identificación de los productos oxidados obtenidos del AA.

Para analizar los diferentes compuestos que se han obtenido procedentes de las oxidaciones no enzimáticas del AA se utilizó el método de "Product ion scan" de forma que se selecciona las relaciones de m/z según los que productos que se quiera obtener. Se ha buscado los hidróxidos y epóxidos en la relación m/z de 319, ya que su m/z es el resultado de la suma del ácido araquidónico más la ganancia de un oxígeno, los óxidos en la relación m/z de 317 ya que la m/z es el resultado de la ganancia de un oxígeno más la pérdida de dos unidades de hidrógeno y por último hidroperóxidos en la relación m/z de 335 ya que se produce la adición de dos unidades de oxígeno en el compuesto.

Gracias a este método se va a poder obtener los fragmentos mayoritarios en MS3 de cada relación de m/z que se han puesto en MS1 (319, 317, 335 m/z) posibilitando así su identificación con ayuda de la bibliografía(24, 25).

Para ello se introducen en el espectrómetro de masas los siguientes parámetros: Scan type: Product Ion (MS2) 319, 317, 335 m/z, rango m/z: 50-350, DP-18.

Incubación de células THP-1 con AA y derivados oxidados de AA

THP-1 es una línea celular establecida a partir de la sangre de un paciente joven con leucemia monocítica aguda. La línea presenta características de monocito y también puede ser diferenciada a macrófago con ésteres de forbol. Sin diferenciar no es adherente y se cultiva en suspensión.(26)

Proceso experimental

Se dispone de 3 frascos que contienen cada uno alrededor de 5 millones de células THP-1 en 5 ml de medio incompleto. Se dejan reposar durante una hora. Posteriormente se añade la cantidad de estímulo necesario para que se tenga una

concentración de 50 μ M en cada frasco. En uno no se añade ningún estímulo (control), el otro se añade ácido araquidónico y en el último se añade ácido araquidónico que se ha dejado 5 días a temperatura ambiente.

Pasadas 6 horas de la estimulación, se recogen el contenido de cada frasco, se centrifuga durante 10 min a 1200 rpm, se decanta y se resuspende en 1 ml de PBS pasando el contenido a un tubo eppendorf. Se vuelve a centrifugar durante 5 min a 2000 rpm y se decanta. Posteriormente se pegan las células añadiendo al pellet 500 μ l de paraformaldehído 4% sacarosa 3% (a 37°C) dejándolas durante 15 min a temperatura ambiente. Después se centrifugan 5min a 2000 rpm y se decanta el sobrenadante (eliminando así el paraformaldehído). Se lavan con PBS y se dejan con 1ml de PBS a 4°C hasta su tinción.

Para realizar la tinción se centrifuga 5 min a 2000 rpm y se resuspende en 1ml de Bodipy 2 μ g/ml disuelto en PBS, dejándolo así 10 min, manteniéndolo en oscuridad y agitando cada 2-5 min. Pasado el tiempo se realiza el mismo proceso pero tiñéndolo con DAPI 1 μ g/ml durante 10 min, realizando un lavado al final con PBS.

Pasado el tiempo correspondiente se montan las células con gelvatol dejando las muestras en oscuridad durante 24-48 horas para su análisis por microscopía.

Resultados

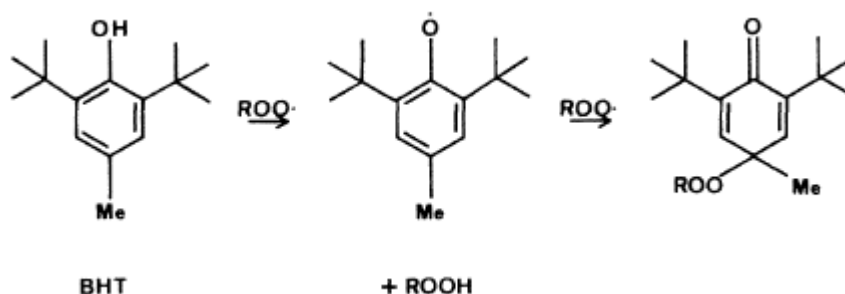
Análisis de la oxidación del AA a lo largo del tiempo en diferentes condiciones (BHT y N₂)

En este experimento se trata de analizar el grado de oxidación no enzimática que tiene el ácido araquidónico durante su almacenamiento.

Las condiciones que más se utilizan para evitar su oxidación son: el almacenaje con el antioxidante BHT (butil-hidroxi-tolueno o E-321) y la administración de una atmósfera inerte (N₂).

Por ello, en este apartado se analiza la cantidad de producto que se oxida a lo largo del tiempo, y por otro lado, las posibles diferencias en cuanto a la cantidad de producto oxidado en los diferentes medios.

El BHT (butil-hidroxi-tolueno) es un producto que se suele añadir a diferentes sustancias para evitar su oxidación. Este compuesto reacciona con moléculas de radicales peróxido, convirtiéndolas en sustancias mucho menos activas, evitando así la propagación de la oxidación.(27)



La administración de una atmósfera inerte (N₂) es una forma de evitar lo máximo posible la presencia del O₂ favoreciendo así la estabilidad de los compuestos impidiendo la formación de radicales peróxido y la posterior fase de propagación.

Estas dos formas de almacenar los ácidos grasos son las más comunes a nivel de laboratorio, por lo que se ha evaluado los diferentes grados de oxidación en el ácido araquidónico almacenado con N₂ y con un 0.01%(w/v) de BHT en metanol.

En la siguiente gráfica se han analizados de forma comparativa la cantidad de ácido araquidónico que tenemos a lo largo del tiempo de almacenaje en las dos condiciones

citadas anteriormente. Para este análisis se realizó un “full scan” en el espectrómetro de los productos que provienen del HPLC.

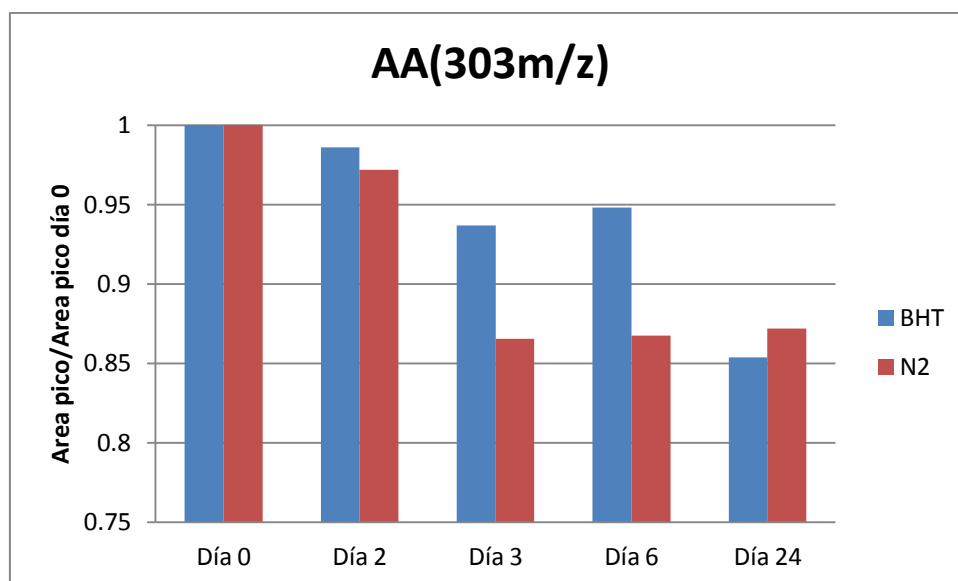


Fig.6. Representación de la cantidad de AA analizado por el HPLC-MS a lo largo del tiempo. El área del pico de cada día se divide entre el área del pico en el día 0

En este primer gráfico se puede observar que la cantidad de ácido araquidónico va disminuyendo a lo largo del tiempo de almacenaje debido a la autoxidación y a la degradación del compuesto.

Por otra parte también se puede observar que en los días día 3 y 6 existe una menor pérdida del compuesto en los que se encuentran tratados con BHT al 0.01% en metanol que los que se encuentran en atmósfera de N₂.

Posteriormente lo que se quiere ver es la cantidad de estos compuestos que se han ido formando por la oxidación. Para ello se hizo una búsqueda de relaciones m/z donde se pudieran observar los compuestos oxidados de ácido araquidónico. Se analizaron las relaciones de 319 y 335 m/z.

- 317m/z es la relación donde se encuentran los hidróxidos y epóxidos del ácido araquidónico (303.3 m/z (AA) + 16 m/z (oxígeno) = 319m/z total).
- 335m/z es la relación donde se encuentran los hidroperóxidos del ácido araquidónico (303.3 m/z (AA) + 2x16m/z (oxígenos) = 335m/z total).

En la Fig.7 y la Fig.8 se puede comprobar que la cantidad de productos oxidados de ácido araquidónico, en las dos condiciones, aumentan más del doble a partir del segundo día y que posteriormente se observa que esta cantidad se mantiene constante a medida que pasa el tiempo.

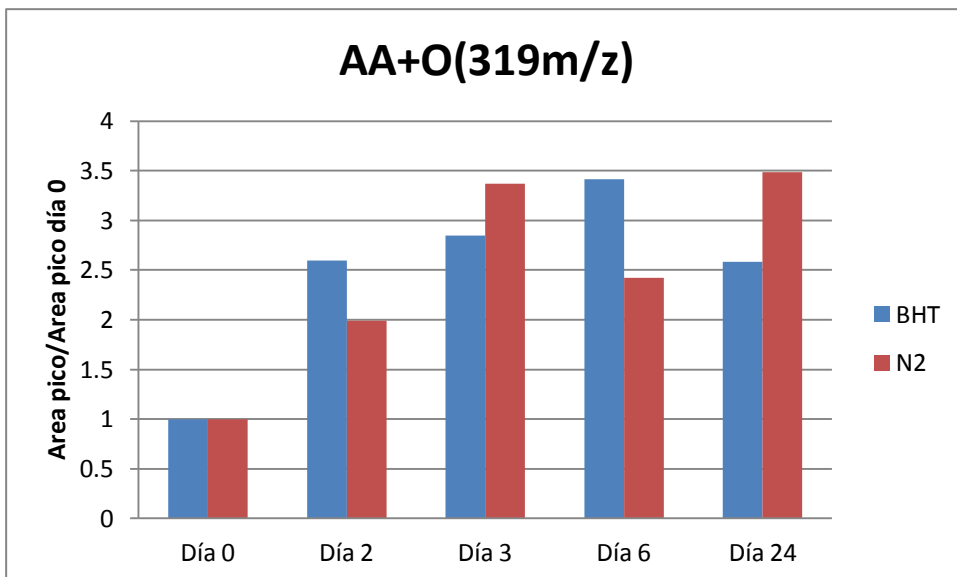


Fig.7. Representación de la cantidad de AA+0(319m/z) analizado por el HPLC-MS a lo largo del tiempo. El área del pico de cada día se divide entre el área del pico en el día 0.

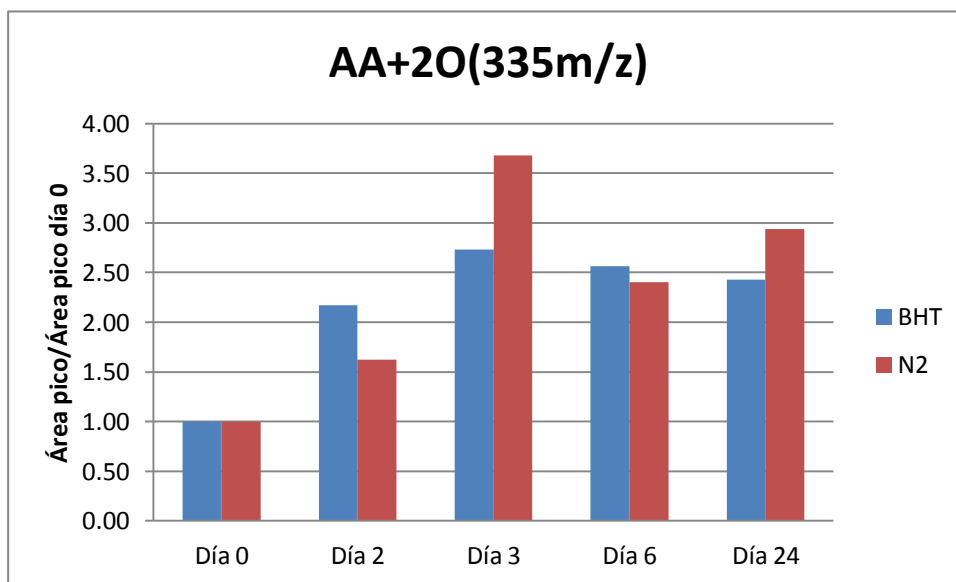


Fig.8. Representación de la cantidad de AA+2O (335m/z) analizado por el HPLC-MS a lo largo del tiempo. El área del pico de cada día se divide entre el área del pico en el día 0.

En la Fig. 9 se observa el porcentaje que se tiene del ácido araquidónico oxidado: AAox (AA+O(319m/z) y AA+2^o (335m/z)) en las muestras respecto a la cantidad total de ácido araquidónico (oxidado y sin oxidar). Se contabilizó por una parte la suma del área de de los productos oxidados que se han analizado (AA+O (319m/z) y AA+2^o (335m/z)) y se hizo el cociente entre la suma total los productos oxidados más el ácido araquidónico que permanece inalterado.

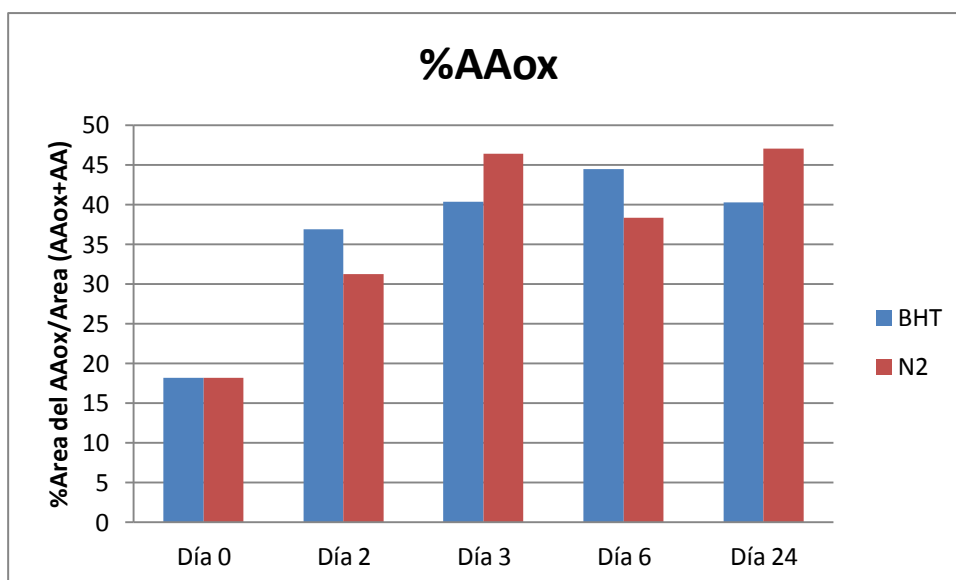


Fig.9. Análisis del porcentaje del área del ácido araquidónico (AA+O (m/z319) y AA+20 (m/z335)) respecto a la suma de las áreas del ácido áraquidónico oxidado y sin oxidar a lo largo del tiempo.

En este caso se puede observar que en la muestra directamente obtenida de la casa comercial contiene más de un 15% de derivados oxidados de ácido araquidónico y que ya en el segunda día en ambas condiciones existe más del 30% del compuesto oxidado. Por otra parte se puede observar que la cantidad de compuesto oxidado a partir del día 3 se mantiene constante alrededor del 40%.

En conclusión se puede deducir que el ácido araquidónico obtenido directamente de la casa comercial ya contiene alrededor de un 15% de oxidación y que ya al segundo día de almacenaje esta cantidad se dobla, manteniéndose más o menos constante a partir del día 3. En el apartado de la conservación del compuesto se puede observar que el almacenado en atmósfera inerte (N₂) resiste menos la oxidación y la degradación en los primeros días con respecto al almacenado en BHT al 0.01%.

Identificación de los productos oxidados del AA obtenidos

En este apartado lo que se ha tratado es de identificar los compuestos que se han obtenido en el almacenaje del ácido araquidónico comparándolos con la bibliografía.

Para ello, primero se realizó un barrido completo (“full scan”) del ácido araquidónico (almacenado varios días) con una concentración 5 veces superior a la utilizada en los experimentos anteriores, con el objetivo de poder observar mejor los analitos obtenidos en el periodo de oxidación no enzimática (Fig.10). Los compuestos más polares van a aparecer a tiempos de retención más bajos, debido a las condiciones de la instrumentación, por lo que se deduce que los derivados oxidados del ácido araquidónico se encontrarán a tiempos de retención menor que el propio ácido araquidónico.

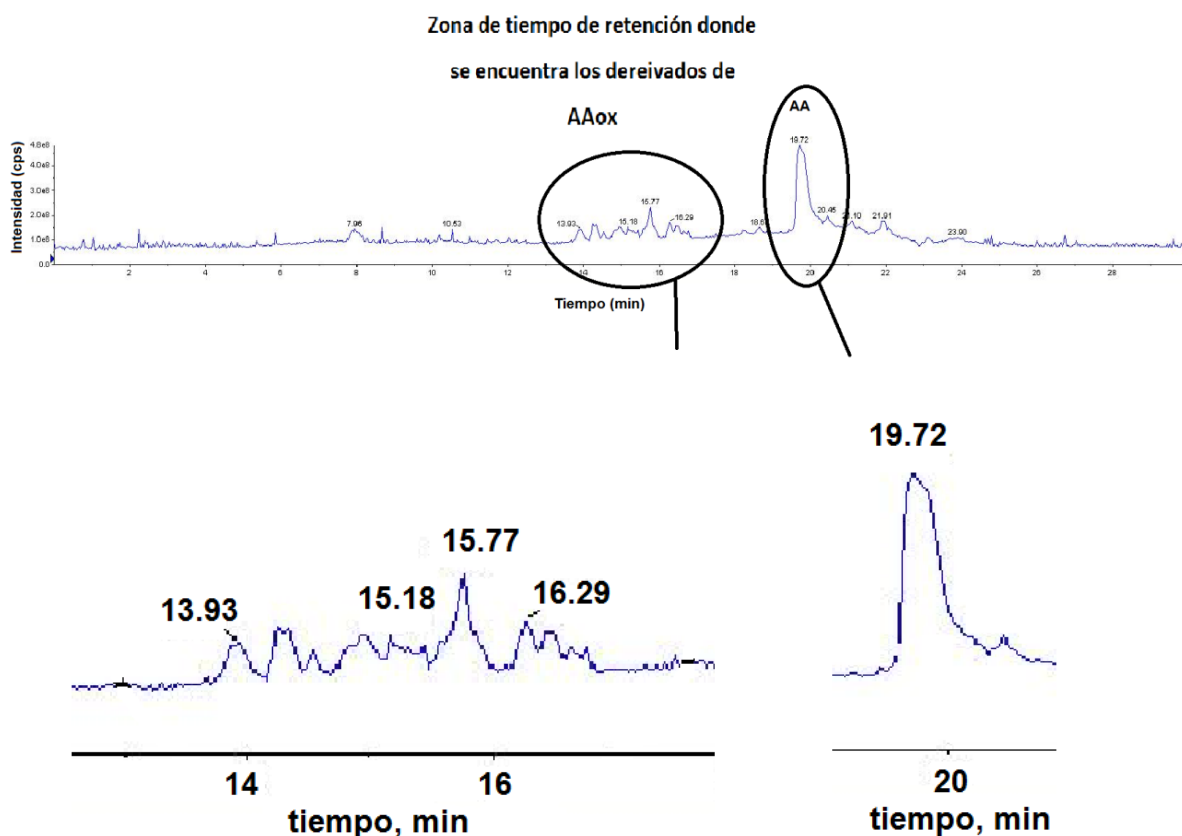


Fig.11. Cromatograma obtenido en el HPLC-MS utilizando el método de “full scan” en una muestra almacenada durante 20 días en BHT al 0.01%.

Para llevar a cabo la identificación de estos compuestos, se tiene que saber qué relaciones de m/z hay que buscar.

- Los hidróxidos y epóxidos del ácido araquidónico se encuentran en la relación m/z de 319, ya que es el resultado de la suma de la relación m/z del ácido araquidónico (303 m/z) más la ganancia de un oxígeno (16 m/z).
- Los óxidos del ácido araquidónico se encuentran en la relación 317 m/z ya que es la suma de la relación m/z del ácido araquidónico (303 m/z) más la ganancia de un oxígeno (16 m/z) y la pérdida de dos unidades de hidrógeno (1 m/z).
- Los hidroperóxidos del ácido araquidónico se encuentran en la relación m/z de 335 ya que es la suma de la relación m/z del ácido araquidónico (303 m/z) más la ganancia de dos unidades de oxígeno (16 m/z).

Una vez que se sabe en qué relaciones m/z hay que buscar, en el propio cromatograma anterior se pueden filtrar estas relaciones m/z , y poder ver los picos correspondientes a estas relaciones citadas y ver sus tiempos de retención (Fig.11).

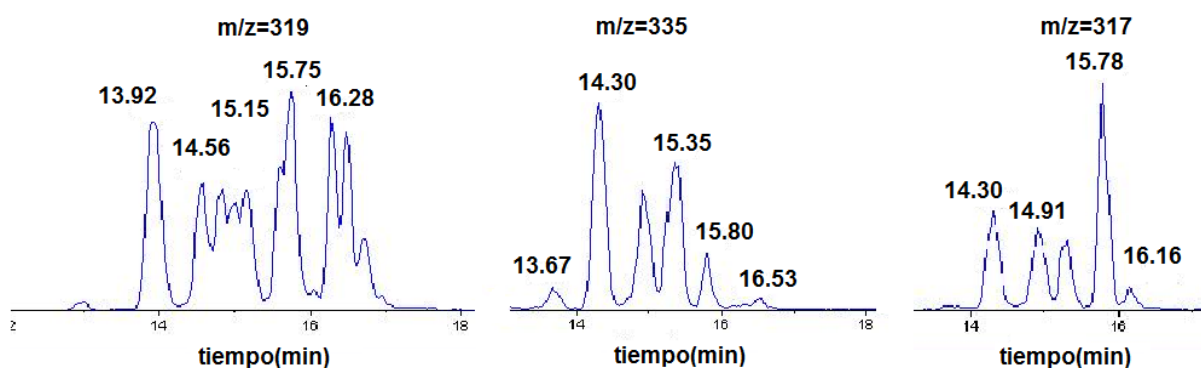


Fig.11. Espectros de las diferentes m/z seleccionadas a partir de la fig.10.

Posteriormente para llevar a cabo la identificación de los diferentes picos que se han obtenido de este filtrado, hay que utilizar el método de “product ion scan” que nos proporciona el espectrómetro, ya permite hacer una fragmentación de forma específica de una determinada relación m/z .

Sabiendo cuales son estos fragmentos de cada una de las relaciones m/z que se va a buscar, es posible la identificación de cada uno de ellos comparándolos con los de la bibliografía ya que cada compuesto se fragmenta de diferente forma dependiendo de la posición de los dobles enlaces y de los grupos funcionales presentes.

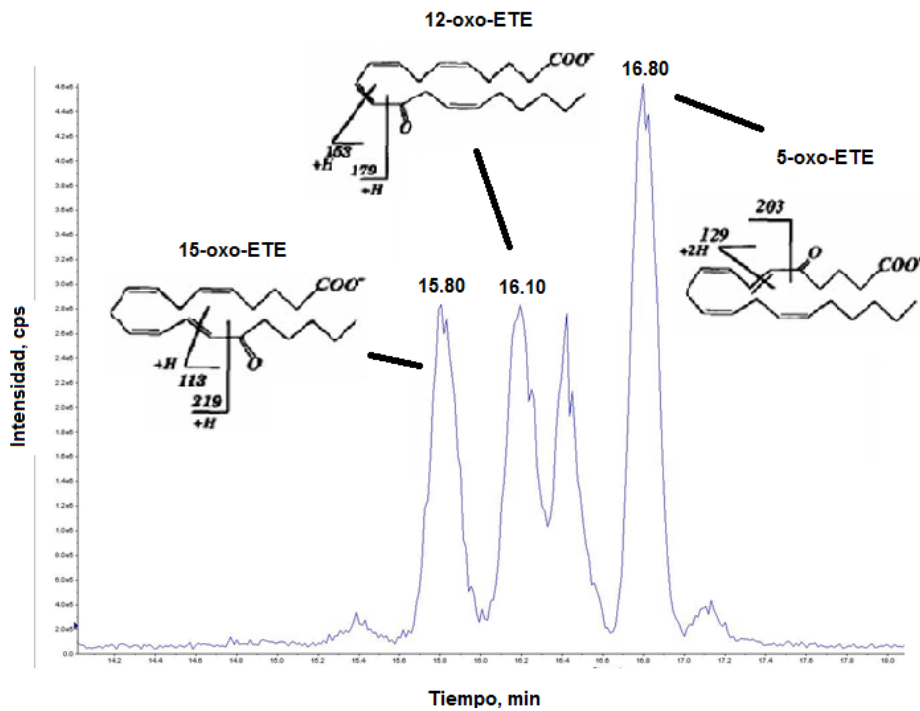


Fig.12. Cromatograma obtenido del HPLC-MS del ácido araquidónico almacenado durante 20 días seleccionando la relación $m/z=317$. Productos identificados con el método de “product ion scan” y la bibliografía.

En la Fig.12 se analiza en el cromatograma la relación $m/z=317$ a través del método “product ion scan” y se logran identificar, comparándolos con la bibliografía, los diferentes óxidos del ácido araquidónico. Se observa en la propia figura los compuestos identificados y sus fragmentos mayoritarios obtenidos.

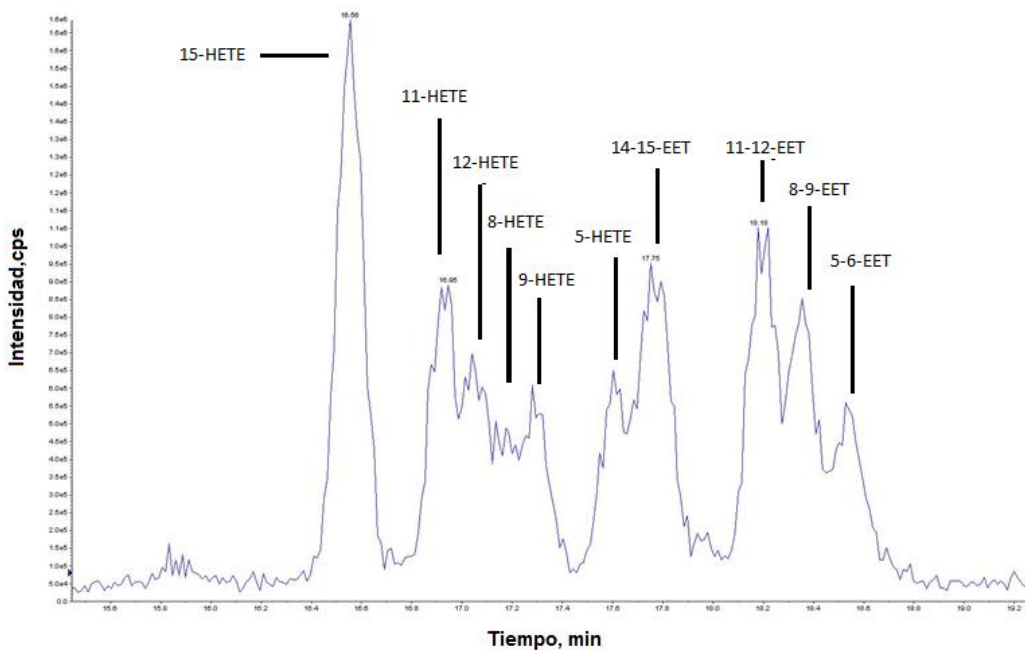


Fig.13. Cromatograma obtenido del HPLC-MS del ácido araquidónico almacenado durante 20 días seleccionando la relación $m/z=319$. Productos identificados con el método de “product ion scan” y la bibliografía.

En la Fig.13 se analiza en el cromatograma la relación $m/z=319$ a través del método “product ion scan” y se logran identificar, comparándolos con la bibliografía, los diferentes hidróxidos y epóxidos del ácido araquidónico. Se representan los diferentes compuestos identificados en las Fig.14 y Fig.15 con sus respectivos fragmentos mayoritarios.

15-HETE		9- HETE	
11-HETE		8-HETE	
12-HETE		5-HETE	

Fig.14. Hidróxidos identificados de la relación $m/z=319$

5-6-EET		11-12-EET	
8-9-EET		14-15-EET	

Fig.15. Epóxidos identificados de la relación $m/z=319$

En la Fig.16 se analiza en el cromatograma la relación $m/z=335$ a través del método “product ion scan” y se logran identificar, comparándolos con la bibliografía, los diferentes hidroperóxidos del ácido araquidónico.

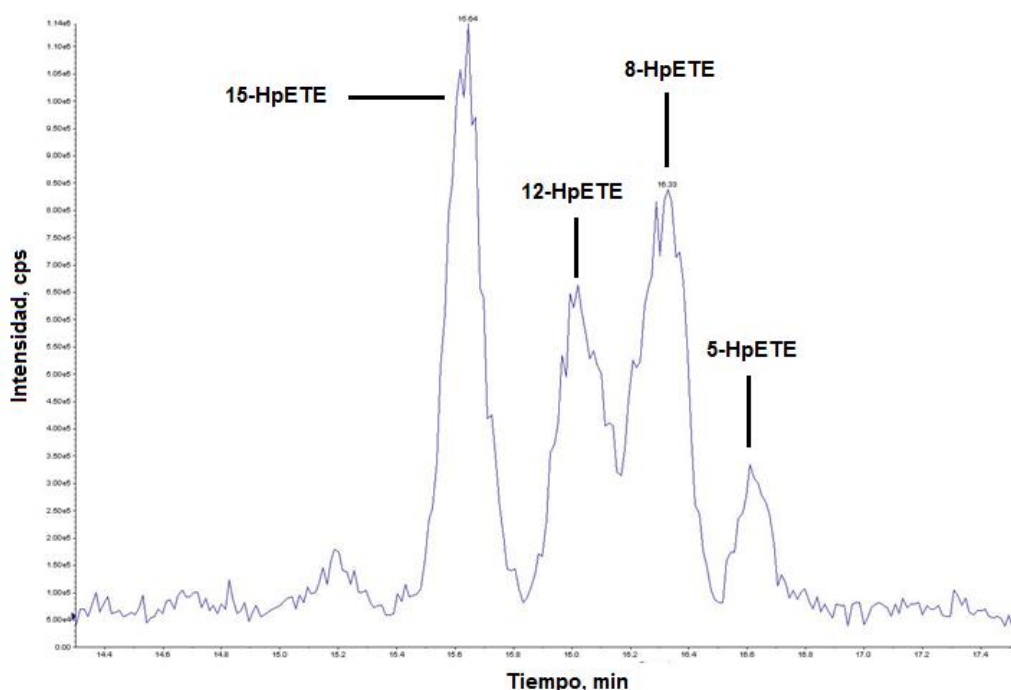


Fig.16. Espectro obtenido del HPLC-MS del AA almacenado durante 20 días seleccionando la relación $m/z=335$

Se representan los diferentes compuestos identificados en las Fig.17.

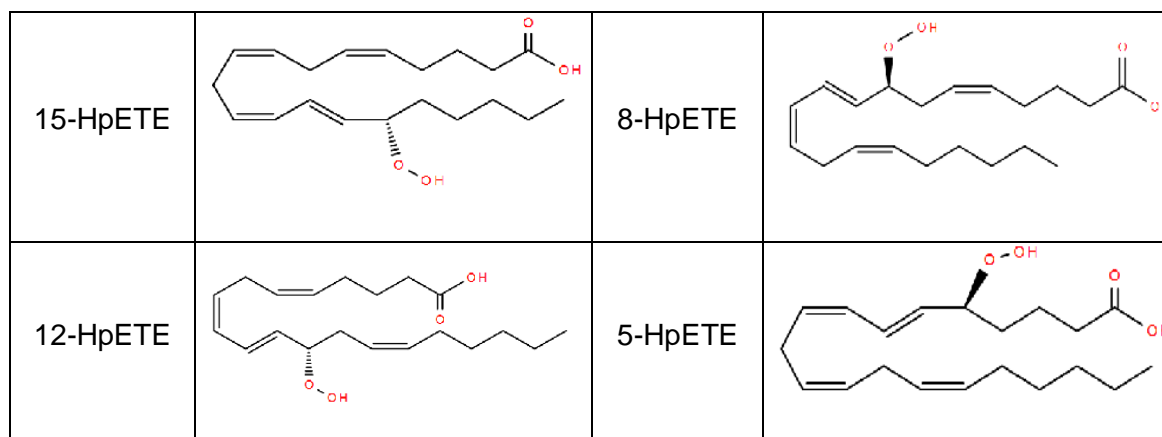


Fig.17. Hidroperóxidos identificados de la relación $m/z=319$

Gracias a este método se ha podido identificar casi 17 compuesto derivados de la oxidación no enzimática del ácido araquidónico. Se puede inferir de estos datos en la mayoría de los experimentos en los que se utiliza AA como estímulo, también se van a añadir grandes cantidades de compuestos oxidados que podrían poseer actividad biológica per se.

Incubación de células THP-1 con AA y derivados oxidados de AA

En este experimento se ha tratado de investigar las posibles diferencias en la formación de lipid droplets al tratar las células THP-1 con AA y con AAox.

Se ha comprobado experimentalmente que en monocitos humanos se produce la formación de estas gotas lipídicas al incubar células con ácido araquidónico(8), por lo que aquí se trata de comprobar esa formación de LD con AA y ver qué ocurre cuando las incubamos con un compuesto de ácido araquidónico que ha sido dejado durante varios días a temperatura ambiente para que se produjera la oxidación.

Para ello se ha seguido el protocolo anteriormente citado y se han tratado de ver esa formación de LD con la microscopía utilizando dos tinciones. El DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, por lo que con esta tinción permite diferenciar los núcleos e indicarnos si se encuentra la célula viva (cromatina difusa), muerta o en proceso de apoptosis (cromatina condensada). Por otra parte se ha utilizado el BODIPY 493/503, se trata de otro marcador fluorescente que se une a lípidos neutros presentes en grandes cantidades, lo que lo hace perfecto para comprobar la formación de las gotas lipídicas en las células.

Una vez montadas las células en los portas se llevan al microscopio de fluorescencia donde se realizan diversas fotos en diferentes condiciones.

En las fotos mostradas en la Fig. 19 se puede comprobar que en las células control que no han recibido ningún tratamiento, no se produce la formación de gotas lipídicas. En el caso de las células que han sido tratadas con ácido araquidónico se puede comprobar que sí se han formado las LD de forma abundante. Por otra parte si se observa la foto de las células que han sido tratadas con productos oxidados de ácido araquidónico, se puede llegar a observar que se han producido un mayor número de gotas lipídicas, a la vez que se puede ver que la intensidad de la fluorescencia de las gotas es mayor que en las tratadas con sólo ácido araquidónico.

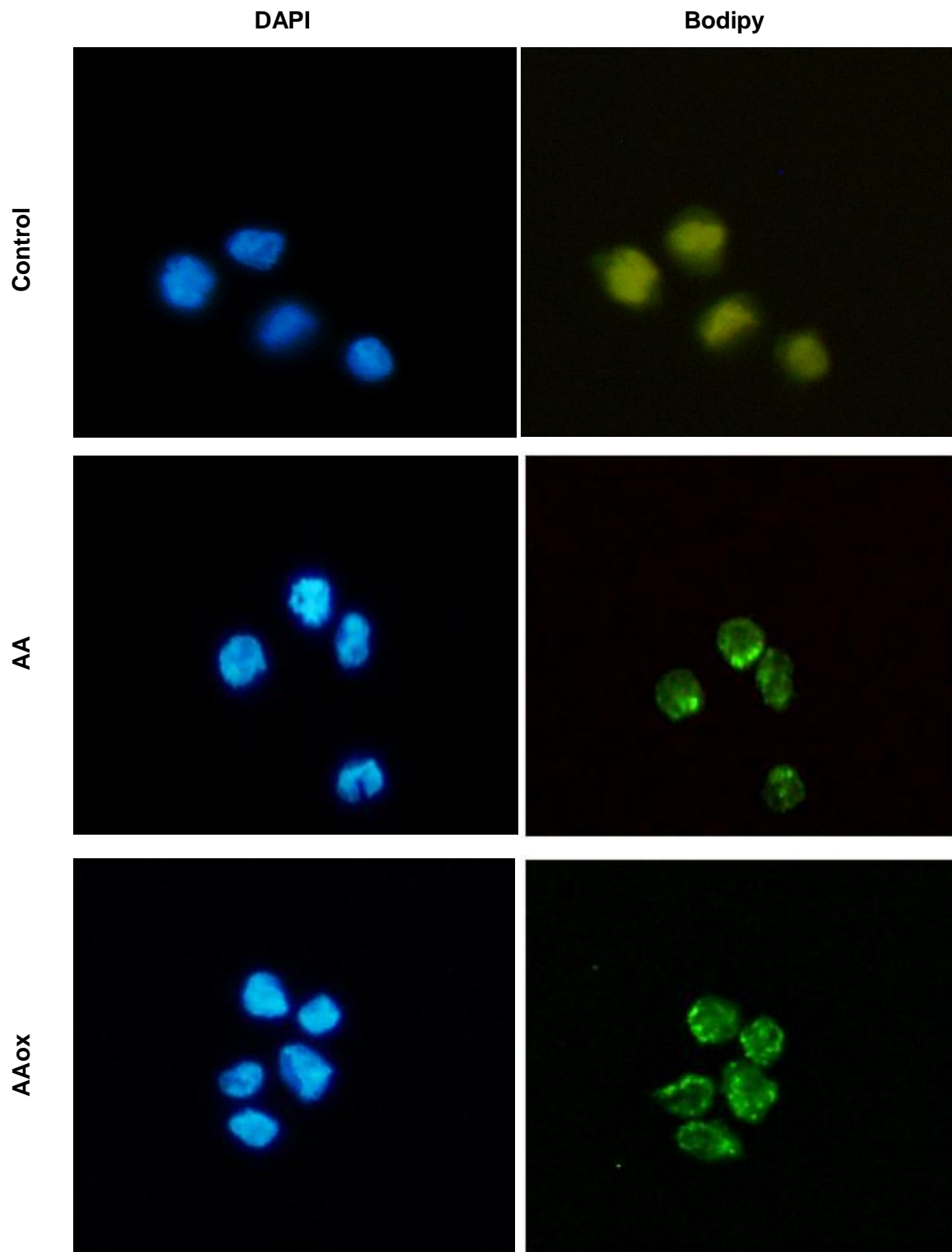


Fig.18. Imágenes de formación de LD en células THP-1 a través microscopía de fluorescencia (20x). Incubación de células THP-1 con 50 μ M de cada compuesto durante 6h. Columna de la izquierda teñida con DAPI (1 μ g/ml) para observar los núcleos y la de la derecha con Bodipy 493/503 (2 μ g/ml) para observar las LD.

Por estas observaciones se puede concluir que se ven claras diferencias entre las células tratadas con AA y con AA más oxidado, siendo estas últimas las que más formación de LD se generan.

Discusión

Se sabe que en lesiones ateroscleróticas las células endoteliales secretan grandes cantidades de diferentes compuestos que pueden afectar a los monocitos, uno de ellos es el ácido araquidónico. Pero lo que no se sabe es si este es el compuesto responsable de su activación y posterior infiltración en la pared del vaso o es algún derivado del ácido araquidónico el responsable.(28)

En este trabajo lo que se ha tratado es de primero comprobar el grado de oxidación que contienen ya los compuestos de ácido araquidónico obtenidos directamente del proveedor, y ver qué grado de oxidación va adquiriendo con el tiempo de almacenaje.

Tras la vista de los resultados se ha comprobado que estos compuestos obtenidos directamente del proveedor ya contienen un alto grado de oxidación a tener en cuenta y que a medida que va pasando el tiempo, incluso tratándolos con tratamientos antioxidantes como son el uso de BHT y de atmósfera inerte, su oxidación va aumentando considerablemente, obteniéndose en el tercer día del almacenaje alrededor de un 40% del compuesto oxidado.

En este mismo experimento se comprobó que hay una diferencia bastante importante respecto al uso del BHT con respecto a la atmósfera inerte, ya que con el antioxidante se consigue que se produzca menor proporción de derivados oxidados del ácido graso en los primeros días.

Estos aspectos a considerar pueden ser clave a la hora de realizar un experimento en el que se utilicen ácidos grasos con un alto grado de insaturación, ya que si no se tienen en cuenta se puede llegar a resultados erróneos.

Por otra parte es interesante saber cuáles son esos productos que se forman en la oxidación no enzimática, ya que de esta forma se sabe los diferentes compuestos que se van a utilizar en el experimento que se desee, evitando así la posibilidad de obtener datos no representativos.

Una vez identificados y cuantificados estos derivados oxidados del ácido araquidónico, lo que interesa es saber si alguno de estos compuestos puede ser el responsable de la activación de los monocitos en la lesiones ateroscleróticas. Para saber si se produce la activación de los monocitos se evaluó la formación de gotas lipídicas, ya que se trata de un proceso que ocurre cuando se activan este tipo de células.

En el último experimento se comprueba que se produce una mayor activación de los monocitos en aquellos que han sido tratados con una mayor concentración de

derivados oxidados de ácido araquidónico, que en aquellos que fueron tratados con una concentración baja de estos. Estos resultados son dignos a considerar, ya que se pensaba que esta activación se producía por este ácido graso, pero no por ninguno de los metabolitos procedentes de su oxidación.

A la vista de estos datos obtenidos se podrían completar la información obtenida con ayuda de diferentes experimentos. Por una parte para observar bien la diferencia entre la incubación de monocitos con ácido araquidónico y sus derivados oxidados, se podría separar el ácido araquidónico de sus derivados oxidados gracias a la cromatografía líquida de alta resolución. Es posible la separación de estos compuestos ya que tienen tiempos de retención bastante diferentes y a partir de ahí se puede llegar a incubar los monocitos sólo con los derivados oxidados y por otra parte sólo con el ácido araquidónico.

Por otra parte se podría cuantificar esta diferencia que existe en la formación de las gotas lipídicas y por lo tanto en su activación a través de la citometría.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- Al analizar el ácido araquidónico obtenido directamente obtenido de la casa comercial se observa que ya contiene más de un 15% de oxidación, y esta cantidad de oxidación se duplica al segundo día de almacenaje tanto con BHT como en atmósfera de nitrógeno.
- A partir del día 3 la oxidación del compuesto en estas condiciones se mantiene más o menos constante con un porcentaje de oxidación de más del 35%.
- Durante los primeros días de almacenamiento se comprueba que el compuesto almacenado en atmósfera de nitrógeno resiste menos a la oxidación y degradación que este mismo compuesto con BHT al 0.01% en metanol, ya que posteriormente estos valores se van igualando.
- Debido a la capacidad del HPLC-MS de fragmentar los compuestos de una determinada relación m/z, se han podido identificar unos 17 productos de oxidación del AA formados únicamente por la autooxidación durante el almacenamiento de este compuesto en BHT y en N₂. Gracias a esta gran cantidad de producto formados, al alto porcentaje de oxidación que se produce y a su rápida formación de estos compuestos, se deberían tener muy en cuenta a la hora de realizar cualquier experimento con el ácido araquidónico.
- Gracias al análisis de la formación de las gotas lipídicas en células THP-1 por microscopía, se puede observar que tras incubarlas con AA y derivados oxidados de AA, se han observado importantes diferencias tanto en número como en tamaño, siendo estas últimas las que mayor número y tamaño tienen de LD.

Bibliografía

1. Huber, J., A. Furnkranz, V. N. Bochkov, M. K. Patricia, H. Lee, C. C. Hedrick, J. A. Berliner, B. R. Binder, and N. Leitinger. 2006. Specific monocyte adhesion to endothelial cells induced by oxidized phospholipids involves activation of cPLA2 and lipoxygenase. *J Lipid Res* **47**: 1054-1062.
2. Pol, A., S. P. Gross, and R. G. Parton. 2014. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* **204**: 635-646.
3. Reue, K. 2011. A thematic review series: lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res* **52**: 1865-1868.
4. Walther, T. C., and R. V. Farese, Jr. 2009. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 459-466.
5. Welte, M. A. 2015. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol* **25**: R470-481.
6. Guijas, C., J. P. Rodriguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochim Biophys Acta* **12**: 1661-1671.
7. Kanter, J. E., and K. E. Bornfeldt. 2013. Inflammation and diabetes-accelerated atherosclerosis: myeloid cell mediators. *Trends Endocrinol Metab* **24**: 137-144.
8. Guijas, C., G. Perez-Chacon, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gomez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 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.
9. 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.
10. Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871-1875.
11. Buczynski, M. W., D. S. Dumlao, and E. A. Dennis. 2009. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res* **50**: 1015-1038.
12. Stables, M. J., and D. W. Gilroy. 2011. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* **50**: 35-51.
13. Samuelsson, B., S. E. Dahlen, J. A. Lindgren, C. A. Rouzer, and C. N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**: 1171-1176.
14. Weibel, G. L., M. R. Joshi, C. Wei, S. R. Bates, I. A. Blair, and G. H. Rothblat. 2009. 15(S)-Lipoxygenase-1 associates with neutral lipid droplets in macrophage foam cells: evidence of lipid droplet metabolism. *J Lipid Res* **50**: 2371-2376.
15. Feltenmark, S., N. Gautam, A. Brunnstrom, W. Griffiths, L. Backman, C. Edenius, L. Lindbom, M. Bjorkholm, and H. E. Claesson. 2008. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 680-685.
16. Fredman, G., and C. N. Serhan. 2011. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J* **437**: 185-197.
17. Sacerdoti, D., A. Gatta, and J. C. McGiff. 2003. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **72**: 51-71.
18. Spector, A. A., X. Fang, G. D. Snyder, and N. L. Weintraub. 2004. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* **43**: 55-90.

19. Jahn, U., J. M. Galano, and T. Durand. 2008. Beyond prostaglandins--chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 5894-5955.
20. Dumlao, D. S., M. W. Buczynski, P. C. Norris, R. Harkewicz, and E. A. Dennis. 2011. High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acyl ethanolamines. *Biochim Biophys Acta* **1811**: 724-736.
21. Harkewicz, R., and E. A. Dennis. 2011. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annu Rev Biochem* **80**: 301-325.
22. Brugger, B. 2014. Lipidomics: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* **83**: 79-98.
23. Rubio, J. M., J. P. Rodriguez, L. Gil-de-Gomez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2015. Group V secreted phospholipase A2 is upregulated by IL-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J Immunol* **194**: 3327-3339.
24. Murphy, R. C., R. M. Barkley, K. Zemski Berry, J. Hankin, K. Harrison, C. Johnson, J. Krank, A. McAnoy, C. Uhlson, and S. Zarini. 2005. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. *Anal Biochem* **346**: 1-42.
25. Deems, R., M. W. Buczynski, R. Bowers-Gentry, R. Harkewicz, and E. A. Dennis. 2007. Detection and quantitation of eicosanoids via high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods Enzymol* **432**: 59-82.
26. Chanput, W., J. J. Mes, and H. J. Wichers. 2014. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* **23**: 37-45.
27. Yehye, W. A., N. A. Rahman, A. Ariffin, S. B. Abd Hamid, A. A. Alhadi, F. A. Kadir, and M. Yaeghoobi. 2015. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *Eur J Med Chem* **101**: 295-312.
28. Navab, M., S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, G. M. Buga, G. Hough, A. C. Wagner, and A. M. Fogelman. 2012. High-density lipoprotein and 4F peptide reduce systemic inflammation by modulating intestinal oxidized lipid metabolism: novel hypotheses and review of literature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 2553-2560.