



Universidad de Valladolid



MASTER
EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Y GENÉTICA MOLECULAR

Trabajo fin de máster

Estudio de los niveles de ácido docosahexaenoico (22:6n-3) en macrófagos peritoneales de ratón

Memoria presentada por Laura Pereira de Blas

Tutor: Jesús Balsinde

Septiembre 2016

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 3 |
| Introducción | 4 |
| Objetivos | 10 |
| Materiales y métodos | 10 |
| Instrumentación | 10 |
| Cromatografía líquida de alta resolución | |
| Cromatografía de gases | |
| Nomenclatura | 11 |
| Procedimientos | 12 |
| Extracción de macrófagos peritoneales de ratón | |
| Preparación de zimosán opsonizado y estimulación de macrófagos peritoneales | |
| Medida de la cantidad de proteína | |
| Extracción de lípidos y separación por TLC | |
| Derivatización de ácidos grasos | |
| Resultados | 17 |
| Medida de la cantidad de proteína | |
| Caracterización de los niveles del DHA en macrófagos peritoneales mediante HPLC-MS. | |
| Caracterización de los niveles del DHA en diferentes especies de lípidos de macrófagos peritoneales de ratón mediante GS-MS. | |
| Caracterización de los niveles del DHA en diferentes especies de fosfolípidos de macrófagos peritoneales de ratón mediante GS-MS. | |
| Discusión | 26 |
| Conclusión | 28 |
| Bibliografía | 29 |

Abreviaturas

AA: ácido araquidónico (20:4n-6)

ALA: ácido α -linolénico (18:3n-3)

BMP: bis(monoacilglicerol)fosfato

CE: esteres de colesterol

DAG: diacilglicerol

DHA: ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (22:6n-3)

EPA: ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (20:5n-3)

ELOVL: elongasa

GC-MS : cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

HPLC-MS: cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

LA: ácido linoleico

LTB₄: leucotrieno B₄

PBS: tampón fosfato salino

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PGE₂, PGI₂: prostaglandinas E₂ e I₂

PI: fosfatidilinositol

PL: fosfolípidos

PS: fosfatidilserina

PUFA: ácido graso poliinsaturado

RvD1, RvD2 y RvD3: resolvinas de la serie D: 1, 2 y 3

RvE1: resolvina de la serie E1

SPMs: mediadores especializados pro-resolutivos

TAG: triacilglicerol

TLC: cromatografía en capa fina

Introducción

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son ácidos grasos que contienen más de dos dobles enlaces en su cadena carbonada y son considerados importantes nutrientes bioactivos que regulan muchas condiciones fisiológicas. Las dos familias de PUFAs de mayor relevancia para la salud y nutrición humana, son la familia de los omega-6 (o n-6) y la de los omega-3 (o n-3). Esta diferenciación se basa en la localización del primer doble enlace a partir del grupo metilo terminal. Así, para los ácidos grasos omega-6, dicho doble enlace se encuentra entre el sexto y séptimo átomo de carbono, mientras que para los ácidos grasos omega-3 se sitúa entre el tercer y cuarto átomo de carbono. [1,2]

En la Figura 1 se muestran las reacciones metabólicas más importantes para obtener, a partir del ácido linoleico (LA) y del ácido α -linolénico (ALA), sus derivados con más insaturaciones: ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Desde un punto de vista nutricional, LA y ALA son ácidos grasos esenciales ya que no pueden ser sintetizados *de novo* por el organismo, sino que deben tomarse de la dieta. Para dar lugar al resto de la familia participan varias enzimas desaturasas, que introducen un doble enlace en la estructura carbonada; y elongasas (ELOVL) que son las responsables de añadir dos unidades de carbono a la cadena [3].

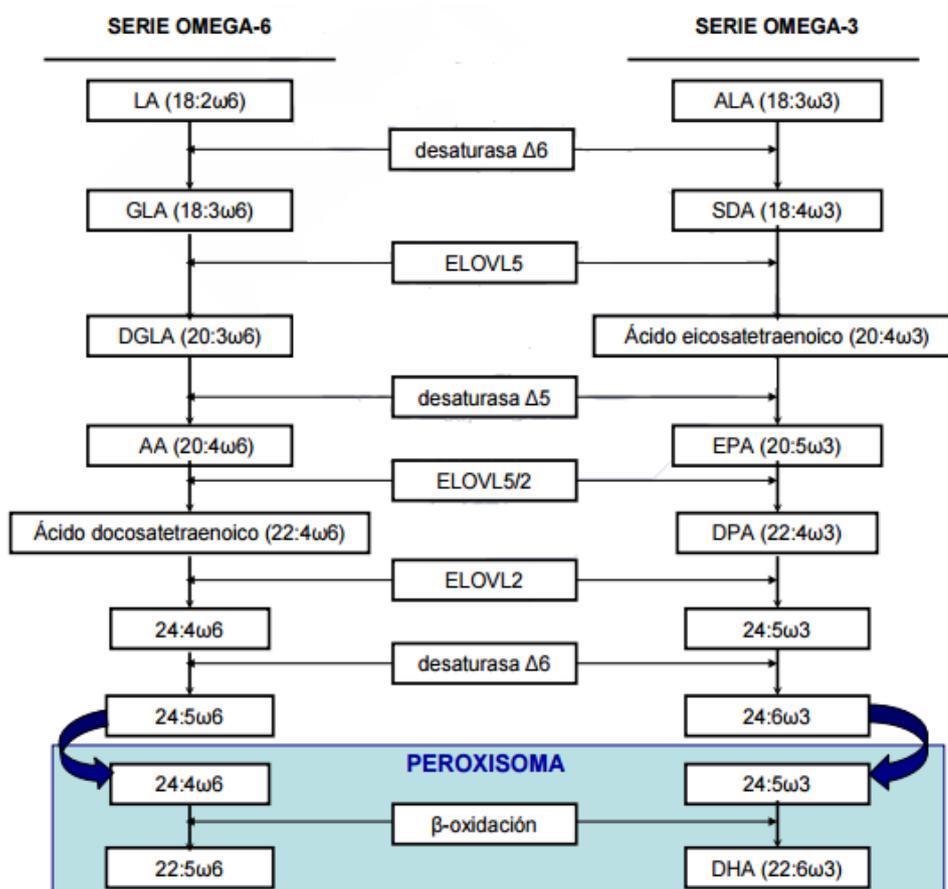


Figura 1. Rutas de biosíntesis de ácidos grasos insaturados omega-6 y omega-3. El primer paso es la inserción de un doble enlace en el ácido linoleico (LA) y en el ácido α -linolénico (ALA) para dar lugar al

ácido γ -linolénico (GLA) y al ácido estearidónico (SDA) respectivamente. Posteriormente, con la adición de dos unidades de carbono se obtienen el ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA) y el ácido eicosatetraenoico (20:4 ω 3). En la serie ω 6, siguiendo al DGLA por la inserción del doble enlace, se obtiene el ácido araquidónico (AA) que seguirá el proceso hasta obtener el ácido graso más insaturado de la serie en el peroxisoma. En cuanto a la serie ω 3, una vez obtenido el ácido eicosapentaenoico (EPA), por la acción de la elongasa ELOVL5 o 2, se obtiene el ácido docosapentaenoico (DPA) que mediante la acción de la elongasa ELOVL2, la desaturasa Δ 6 y una β -oxidación parcial dará lugar al ácido docosahexaenoico (DHA).

Sin embargo, la síntesis *de novo* de EPA y DHA a partir del ALA es poco eficiente y, por tanto, para alcanzar los niveles adecuados de estos ácidos grasos, éstos deben ser ingeridos en la dieta, fundamentalmente de productos marinos.

Los ácidos grasos que se forman se incorporan a los fosfolípidos (PL), triacilgliceroles (TAG), diacilgliceroles (DAG) y a los ésteres de colesterol (CE) [4]. Las dos familias de PUFAs poseen numerosas funciones, tales como la composición de la membrana celular, los mecanismos de señalización mediados por receptores, la expresión génica y la producción de moléculas de señalización.

Tanto el AA, el EPA como el DHA son muy importantes en la composición de los fosfolípidos de la membrana. Además, el DHA es el ácido graso n-3 más abundante en numerosos tejidos como retina, córtex cerebral y específicamente en los fosfolípidos de la membrana externa del fotorreceptor y en las membranas sinaptosomales, por lo que la disminución de este ácido graso en las membranas puede alterar propiedades tanto físicas como funcionales [5]. Se ha visto que el enriquecimiento en EPA y DHA puede incrementar significativamente la fluidez de las membranas, ya que son ácidos grasos muy flexibles debido a su elevado número de insaturaciones. Esto hace posible la modulación de la actividad de las proteínas presentes en la membrana como son los canales iónicos, los receptores y los transportadores, alterando así las cascadas de señalización intracelular. [6]

Los omega-3 PUFAs también pueden modificar la composición de las denominadas balsas lipídicas. Éstas son microdominios presentes en la membrana que están formados por colesterol y esfingolípidos altamente empaquetados y cuando dichos ácidos se incorporan a estas zonas, el contenido de colesterol y esfingomielina se ve reducido, lo que permite la modulación de las rutas de señalización celular tal como se muestra en la figura 2. [7]

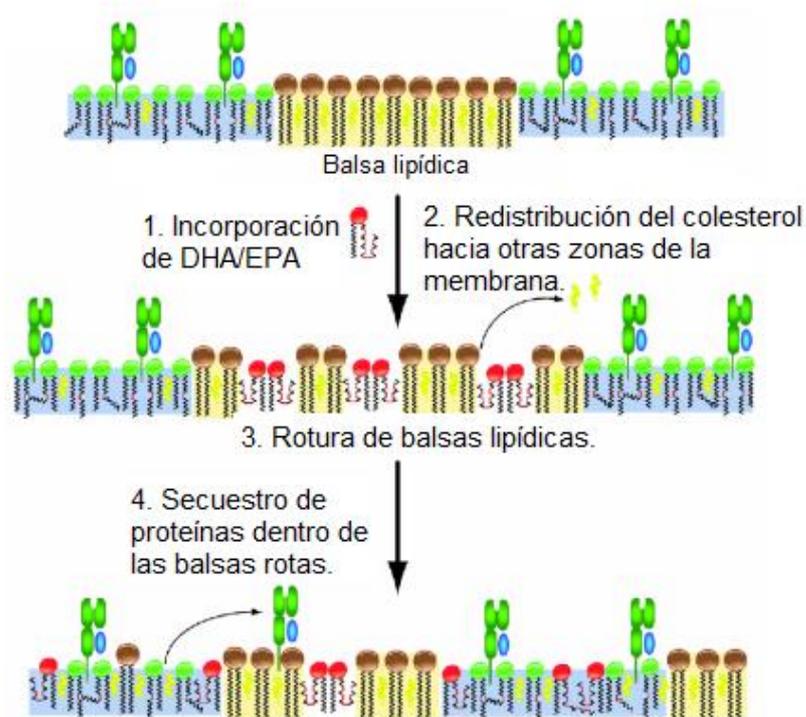


Figura 2. Modelo propuesto por el cual los n-3 PUFA interrumpen la organización de las balsas lipídicas.

También se ha observado una conexión entre estos ácidos grasos y los procesos inflamatorios, ya que los ácidos grasos n-3 pueden ser capaces de reducir los mecanismos inflamatorios tan importantes en patologías como la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares o aterosclerosis. [8].

La inflamación es un mecanismo inmediato de defensa que nos protege frente a cualquier tipo de agresión externa. En una respuesta inflamatoria aguda se producen muchas señales químicas, algunas de origen microbiano y otras sintetizadas por el propio organismo. Entre estas últimas señales químicas, las que se originan a partir de la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados son de gran interés debido a su multitud de funciones y su potencial manipulación farmacológica [9].

Después de producirse una agresión tisular, los metabolitos derivados del ácido araquidónico (ácido graso omega-6), denominados eicosanoides, son cruciales para iniciar los cuatro signos característicos de la inflamación (enrojecimiento, calor, dolor e hinchazón). Como parte de la respuesta vascular, los leucocitos, estimulados por las prostaglandinas PGE₂ y PGI₂ y el leucotrieno LTB₄, migran hacia la zona dañada con el fin de detener el daño y eliminar la causa de la agresión. Más tarde se produce un cambio de mediador lipídico de eicosanoides a derivados de ácidos grasos omega-3, que señalizan el final de la respuesta pro-inflamatoria aguda y el comienzo de las tareas de reparación. Lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas, conocidas en conjunto como mediadores especializados pro-resolutivos (SPMs), son los grupos de moléculas producidos a partir de los ácidos omega-3 durante la respuesta inflamatoria [1, 11] (Figura 3).

Los macrófagos, estimulados por resolvinas y protectinas, limpian los neutrófilos apoptóticos restaurando la homeostasis en la zona dañada. Los signos de resolución incluyen el secuestro de citoquinas pro-inflamatorias, limpieza de neutrófilos

de la superficie epitelial, fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos y eliminación de la inflamación e invasores. Generalmente, este proceso inflamatorio ocurre de manera regulada, sin embargo, un fallo en esta resolución da lugar a un aumento de las prostaglandinas y leucotrienos, fibrosis e inflamación crónica [9, 10].

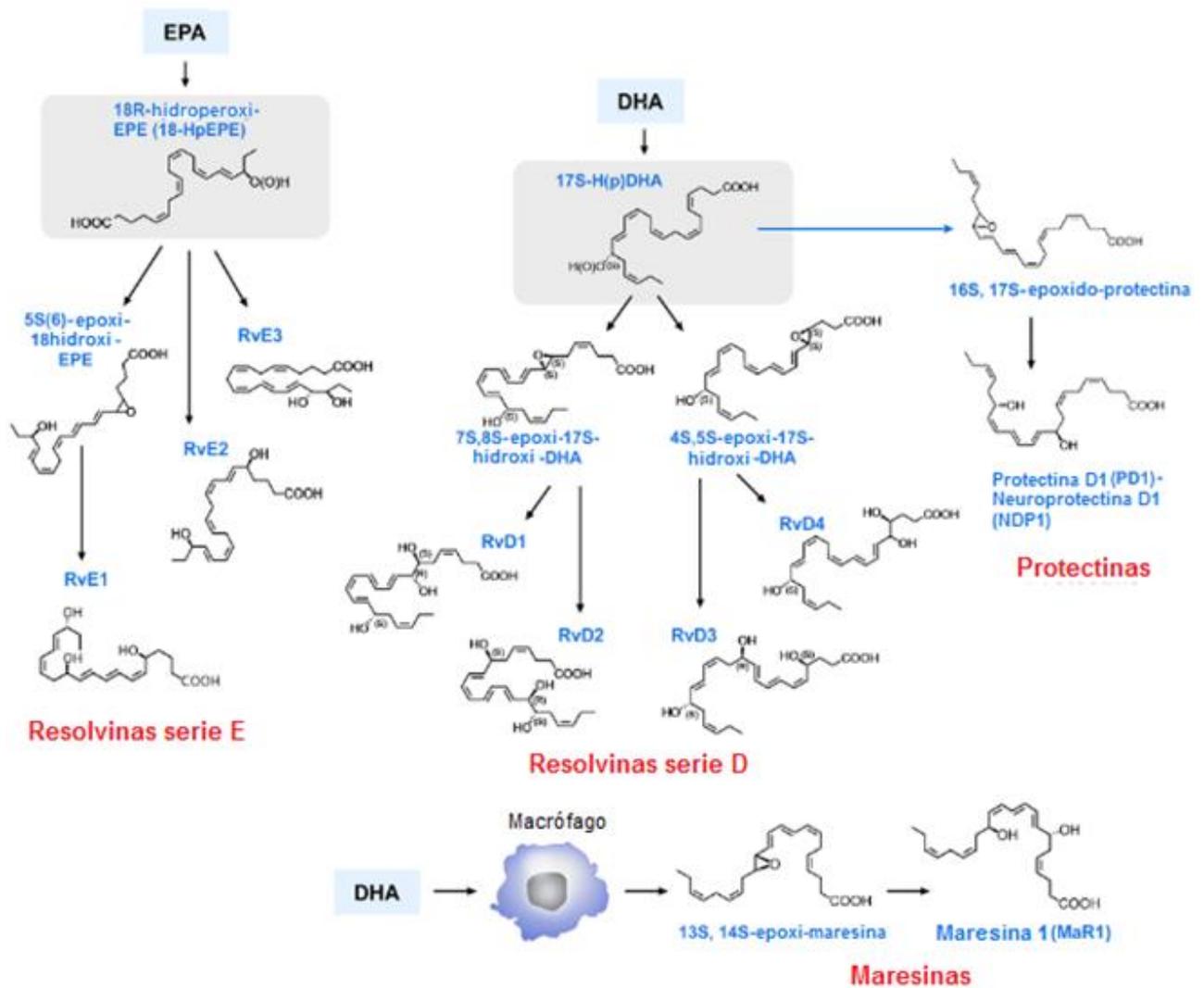


Figura 3. Esquema de la síntesis y acciones de los metabolitos derivados del EPA y DHA.

El EPA da lugar a compuestos con baja actividad pro-inflamatoria o incluso con actividad anti-inflamatoria que puede contrarrestar los efectos producidos por el AA [12]. El suministro de la resolvina E1 (RvE1) a un modelo de ratón con neumonía se ha asociado a la reducción de citoquinas pro-inflamatorias, descenso de la acumulación de leucocitos, menor cantidad de bacterias y una mejora en la supervivencia. Además de mejorar la fagocitosis de los macrófagos y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). [9]

En 2003, Hong et al identificaron en sangre humana, cerebro de ratón y células gliales humanas una serie de compuestos derivados del DHA a los que denominaron

docosatrienos y resolvinas de la serie 17S que podían regular mecanismos en la inflamación reduciendo la expresión de citoquinas [13].

Por otra parte, las acciones “in vivo” de RvD1 y RvD2, procedentes del DHA, se presentan en muchas patologías, como la obesidad y patologías que afectan al sistema vascular, respiratorio, renal y ocular, y en procesos que incluyen dolor, fibrosis y cicatrización de la herida. Sus labores en el influjo de neutrófilos, en la resolución de los macrófagos y en la reducción de mediadores pro-inflamatorios (PAF, LTB₄ y prostaglandinas) son fundamentales para el organismo. Por otra parte, se vio en un modelo de peritonitis de ratón que dentro de los exudados, RvD3 aparece tarde en la resolución, sugiriendo que posee un papel específico limitando la infiltración de neutrófilos y regulando a los macrófagos. [10]

Otro de los metabolitos del DHA identificados es la maresina (MaR1), que aparece en los últimos pasos de la resolución de la inflamación y cuyas potentes acciones pro-resolutivas y regenerativas de tejidos supera a la RvD1. [9]

Por otra parte, también se ha comprobado cómo la RvD1 formada vía 15-LO/5-LO y el intermediario 13S,14S-epóxido-maresina son capaces de inhibir la producción de citoquinas y de estimular el cambio de fenotipo de los macrófagos de M1 (pro-inflamatorio) a M2 (anti-inflamatorio). Los macrófagos de tipo M2 producen perfiles con menores niveles de LTB₄ y prostaglandinas que las células M1. Esto asocia a los macrófagos M2 a una actividad anti-inflamatoria y reparativa lo cual puede proteger contra la obesidad inducida por la inflamación del tejido adiposo, la resistencia a la insulina y enfermedades metabólicas [14, 10].

En cuanto a la serie de las protectinas, la protectina D1 (PD1) exhibe una actividad anti-inflamatoria además de poder activar la resolución de la inflamación. También ofrece potentes acciones protectoras en tejidos como el cerebro, en las células de la retina y en el sistema inmunológico. En el tejido neuronal, se conoce con el nombre de neuroprotectina D1 (NPD1) para reflejar su sitio de biosíntesis y acción. [11, 10]

Además, con dietas ricas en EPA y DHA se ha observado cómo se ha disminuido los niveles de AA en los tejidos lo que conlleva a una menor producción de eicosanoides pro-inflamatorios y un aumento por otra parte de los metabolitos anti-inflamatorios provenientes de dichos ácidos [15, 16].

La presencia de DHA y EPA también disminuye los niveles de los marcadores pro-inflamatorios como IL-6, TNF- α , INF- γ y CRP (C-reactive protein) mientras que los marcadores anti-inflamatorios IL-10 y TGF- β aumentan de nivel.

Objetivo

Debido a la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs-LC) de la serie ω -3 y los pocos estudios que hay sobre su forma de actuar en el organismo, este trabajo tiene como objetivo principal la caracterización de los niveles del ácido docosahexaenoico (22:6n-3), conocido por sus siglas DHA, en las distintas clases de lípidos neutros como en los diferentes fosfolípidos en muestras de macrófagos peritoneales de ratón mediante HPLC-MS y GS-MS y su posible movilización en condiciones de activación celular.

Materiales y métodos

Instrumentación:

Para el análisis de las diferentes clases de lípidos en muestras de macrófagos peritoneales de ratón se ha utilizado un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectroscopia de masas (HPLC-MS) y un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (GC-MS).

HPLC-MS

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica por la cual se separan compuestos gracias al paso de una fase móvil a través de una columna que contiene una fase estacionaria. Los diferentes compuestos, al pasar por la columna, interaccionan de distinta manera con la fase estacionaria y se va produciendo la separación.

El equipo de HPLC consta de un desgasificador para no permitir el paso de burbujas de aire a la columna, una bomba que introducirá la muestra y la fase móvil, un muestreador automático, una columna y un detector de masas. El equipo utilizado en este trabajo es un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1260 Infinity equipado con una bomba cuaternaria Agilent G1311C y un muestreador automático Agilent G1329B.

En este trabajo se utiliza una precolumna de sílice seguida de una columna Fortis HILIC (150x3mm y 3 μ m de tamaño de poro) y como fase móvil un gradiente de disolvente A (hexano/isopropanol, 30:40) y disolvente B (hexano/isopropanol/20mM acetato amónico en H₂O, 30:40:7) como se dispone en la tabla 1:

Tabla 1. Gradiente de disolventes utilizado para el análisis con el equipo de HPLC-MS.

| Tiempo (min) | % B |
|--------------|-----|
| 0 | 25 |
| 5 | 25 |
| 15 | 60 |
| 20 | 95 |
| 40 | 95 |
| 41 | 25 |
| 55 | FIN |

El cuanto a la detección, el espectrómetro de masas nos permite analizar con gran precisión la composición de nuestra muestra, separando las especies moleculares dependiendo de su relación masa/carga (m/z). Por tanto, es necesario el uso de un sistema que permita ionizar la muestra, que en este caso, se utiliza la ionización por electroespray (ESI). El analito se introduce disuelto en un solvente volátil por un capilar de metal muy pequeño y cargado, debido a la repulsión de las cargas eléctricas, el líquido se sale del capilar forma una nube de pequeñas gotas altamente cargadas. A la vez que se va evaporando el solvente, las moléculas de analito se aproximan y se repelen hasta que, finalmente, cuando la repulsión vence a la tensión superficial, estallan en gotas. Una vez que se forman los iones se mueven hacia el analizador de masa.

Actualmente hay distintos tipos de analizadores de masa, tales como la trampa iónica, de triple cuadrupolo, de tiempo de vuelo, orbitrap, etc. El analizador utilizado en este trabajo es el de triple cuadrupolo. Cada cuadrupolo consta de cuatro barras cilíndricas de metal cargadas dos a dos positiva y negativamente que sirven de electrodos que consiguen separar los iones de diferentes masas (m/z).

Cuando los iones atraviesan el campo eléctrico creado por el cuadrupolo, adquieren una trayectoria oscilatoria de manera que, sólo aquellos cuya frecuencia es resonante, es decir, que coincide con la del cuadrupolo, poseerán una trayectoria estable y podrán llegar hasta el detector. Éste generalmente es un electromultiplicador que mide la corriente eléctrica de los iones, la amplifica y digitaliza para convertirla en una señal gráfica.

Entre los diferentes métodos de operación del analizador de masas se utilizó el **Multiple Reaction Monitoring (MRM)**. Este método es muy selectivo y sensible para detectar iones específicos dentro de muestras biológicas complejas. Como se puede observar en la figura 4, este proceso se basa en la selección de un precursor en Q1 que será fragmentado posteriormente en la celda Q2. Posteriormente, en Q3 sólo serán analizados fragmentos de una masa específica. En este caso, en Q1 se selecciona el ion molecular del PL $[M-H]^-$ excepto para el caso de la PC que para poder detectarlo en modo negativo se forma un aducto con acetato. En cuanto a Q3, se selecciona el ion correspondiente a DHA $[M-H]^- = 327.2$ midiendo así solo las especies que contengan dicho ácido graso.

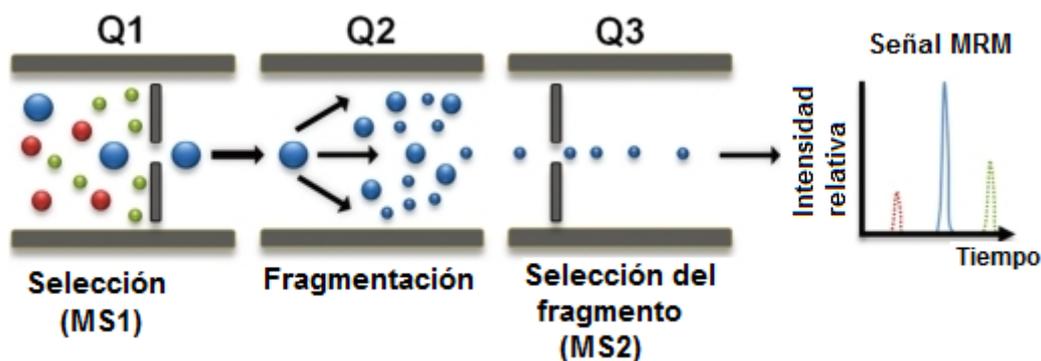


Figura 4. Triple cuadrupolo: funcionamiento del método MRM (multiple reaction monitoring)

GC-MS

La cromatografía de gases es una técnica en la que la muestra volatilizada se separa por su paso a través de una columna cromatográfica gracias a un gas inerte que actúa como fase móvil.

El sistema consta de varios componentes como el gas portador, el sistema de inyección automático de la muestra, la columna que se encuentra en un horno y el detector, que en este caso será un espectrómetro de masas.

Por tanto, es esencial que la muestra pase a estar formada de iones y para ello hay diferentes fuentes de ionización. En este caso, se utilizó impacto electrónico sobre moléculas volátiles generando así iones positivos o la fragmentación de la muestra en iones positivos más pequeños. Una vez obtenidos los iones, éstos pasan al analizador de masa que en el caso de este trabajo es un cuadrupolo simple.

El equipo utilizado es un cromatógrafo de gases Agilent 6890 N con un detector de masas Agilent 5975 MS en modo de impacto electrónico (EI, 70 Cv) y equipado con un inyector automático Agilent 7693 *autosampler* y una columna AgilentDB23 (60m de longitud x 250 µm de diámetro interno x 0.15 µm de espesor). En el horno, la temperatura se mantuvo a 50°C durante 1 minuto, después incrementó hasta 175°C a una velocidad de 25°C/min, posteriormente alcanzó los 215°C aumentando a un rango de 1.25°C/min, con una rampa final en la que se alcanzó los 235°C a una velocidad de 10°C/min.

La adquisición de datos se realizó en modo scan para la identificación de compuestos y en modo SIM para la cuantificación. Para identificar los compuestos se usaba tanto el tiempo de retención característico de cada uno como una librería de espectros NIST.

Nomenclatura

La nomenclatura para los fosfolípidos y los lípidos neutros sigue las pautas establecidas por Lipid Maps (<http://lipidmaps.org>).

Entre los lípidos neutros se encuentran el triacilglicerol (TAG) y el diacilglicerol (DAG) formados por un cuerpo de glicerol al que se unen tres o dos ácidos grasos respectivamente mediante un enlace éster. También en este grupo de lípidos están incluidos los esteres de colesterol (CE) que se caracterizan por poseer un ácido graso esterificado al grupo hidroxilo del colesterol.

En cuanto a los fosfolípidos, están formados por un cuerpo de glicerol al que se unen una cabeza polar mediante un enlace fosfodiéster en la posición sn-3, y dos ácidos grasos unidos mediante un enlace éster en las posiciones sn-1 y sn-2. La cabeza polar podrá variar entre colina, serina, etanolamina o inositol dando lugar a fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI) respectivamente. Por otro lado, entre paréntesis, se pone los dos ácidos grasos unidos a la cadena de glicerol en la posiciónsn-1 y sn-2, estableciendo el número de átomos de carbono seguido del número de insaturaciones que poseen.

Así, por ejemplo, el fosfolípido PC(18:0/22:6) es un grupo glicerol con una cabeza polar formada por un residuo de colina y con el ácido esteárico (18:0) y con el DHA (22:6n-3) en las posiciones sn-1 y sn-2 respectivamente.

En los eucariotas, el 20% de los glicerofosfolípidos son plasmalógenos. Éstos se caracterizan por poseer un ácido graso unido mediante un enlace éter de vinilo en la posición sn-1. Para nombrarlo simplemente se introduce una "P" antes del ácido graso en cuestión. Por ejemplo: PC(P-18:0/22:6).

Por otra parte, el ácido graso de la posición sn-1 también se puede unir mediante un enlace éter. En este caso, la nomenclatura utilizada es poner una "O" delante del ácido graso, por ejemplo: PC(O-18:0/22:6).

Procedimientos:

Extracción de macrófagos peritoneales de ratón

- Tampón fosfato salino 1x (PBS)
- RPMI 1640, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y 10% de FBS.
- Metanol/agua 1:1 (v:v)
- Ratones Swiss 2-3 meses.

Los animales se sacrifican mediante exposición a CO₂. Posteriormente se abre la piel abdominal, se les inyecta 5 ml de PBS frío con la ayuda de una jeringa y tras agitar la zona durante unos segundos se recoge el fluido intraperitoneal con la misma jeringa. Tras juntar todo el fluido intraperitoneal, se centrifuga durante 10 min a 1200 rpm y las células se cultivan en placas Petri de 100x20mm en medio RPMI 1640, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y 10% de FBS. Se incuban durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ con el fin de que los macrófagos se adhieran.

Preparación de zimosán opsonizado y estimulación de macrófagos peritoneales.

- Zimosán (20 mg/ml)
- PBS 1x
- Suero humano sin activar.
- RPMI 1640, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (medio sin suero)

Una vez que los macrófagos se encuentran adheridos a la superficie tras las 4 horas de incubación, se elimina el medio de cultivo, se lava con PBS 1x y se añaden 10 ml a cada placa de medio sin suero dejando las placas en la incubadora durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se añade a las placas control 1ml de medio sin suero y a las placas "problema" 1ml de zimosán opsonizado y se incuba durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂.

Para la preparación de este zimosán opsonizado se coge una alícuota de 500µl de zimosán guardado a -20°C a una concentración de 20mg/ml en alícuotas de 1 ml. Se sonica (3 veces durante 15 s) y se precipita centrifugando a 12000 rpm durante 1 minuto. Después de eliminar el sobrenadante, se resuspende en 1ml de suero humano (sin activar) y se mantiene en un baño durante 20 minutos a 37°C agitando cada 5 minutos. Tras ese tiempo, se lava dos veces con PBS 1x centrifugando en cada caso durante 1 min a 12000 rpm. En el último lavado, se vuelve a resuspender en 1 ml de medio incompleto y se vuelve a sonicar 3 veces durante 15 s estando así listo para su uso.

Tras la estimulación de una hora, se elimina el medio y se lava con PBS 1x. Las placas se colocan en hielo, se añaden 400 µl de metanol/agua 1:1 (v/v) a cada una y con ayuda de un raspador se levantan las células y se recogen en tubos y se guardan a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Medida de la cantidad de proteína.

- Albúmina (1mg/ml)
- Agua milliQ
- Reactivo Bradford

Para medir la cantidad de proteína se siguió el método Bradford [17]. Para ello se realiza una línea de calibrado con seis disoluciones de albúmina de concentraciones 0, 1, 3, 5, 7 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a la que se le añade la mezcla Bradford/agua 200:700 (v/v). También se preparan dos disoluciones con 2 μl de las muestras control y a las que también se les añade la mezcla Bradford/agua 200:700 (v/v). Las cantidades de los reactivos para cada disolución se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Volúmenes de reactivo Bradford, albúmina/muestra o agua utilizados para cada disolución.



| | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 | Control | ZO |
|---|------|------|------|------|------|------|---------|------|
| H₂O (μl) | 100 | 99 | 97 | 95 | 93 | 90 | 98 | 98 |
| Albúmina o Muestra (μl) | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 | 2 | 2 |
| Bradford:H₂O 200:700 (μl) | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 |
| V_{TOTAL} | 1 ml | 1 ml |

Todas las disoluciones se miden en el fotómetro Eppendorf Biophotometer plus de tal manera que, con los datos obtenidos de absorbancia de las muestras, podemos calcular la cantidad de proteína que poseemos.

Extracción de lípidos y separación por cromatografía en placa fina (TLC)

- Estándares internos:
 - o Separación de fosfolípidos: PC(15:0/15:0); PE(17:0/17:0) y PS(14:0/14:0)
 - o Separación de lípidos: PC(17:0/17:0); DAG(17:0/17:0); TAG(17:0/17:0) y CE(22:1)
- Cloroformo (CHCl₃)
- Metanol
- Agua milliQ
- Patrones para la TLC:
 - o Separación de fosfolípidos: PE mix; PC(P-18:0/20:4); PS mix y PI mix.
 - o Separación de lípidos neutros: Ac. Oleico; CE(22:1); TAG(18:2/18:2/16:0); DAG(18:1/18:1).
- Hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (v/v/v)
- Cloroformo/metanol/amoniaco 28% 120/75/8 (v/v/v)
- Ácido bórico al 1.5% en etanol/agua 1:1 (v/v)

A las células, que se encuentran en metanol/agua 1:1 (v/v) en un volumen de 400 μ l, se añaden los correspondientes estándares internos, que nos darán una idea del porcentaje de recuperación obtenido tras los procesos de tratamiento de la muestra.

Se procede a la extracción de los lípidos celulares siguiendo el protocolo descrito por Bligh & Dyer [18] e ilustrado en la figura 5.

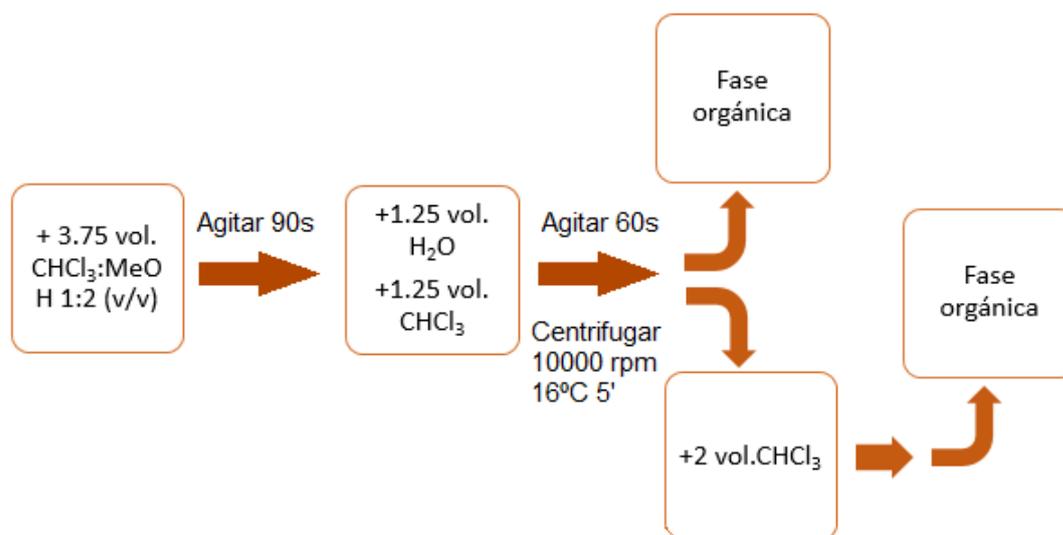


Figura 5. Esquema del protocolo Bligh & Dyer

Se añaden 3,75 volúmenes, respecto al volumen de la fase acuosa inicial, de cloroformo/metanol 1:2 (v/v) y se agita durante 90 segundos. Posteriormente, se añade 1,25 volúmenes de H₂O y de cloroformo, se agita de nuevo durante 60s y se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 minutos a 16°C para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Una vez separadas, se extrae la fase orgánica a otro tubo de 1.5 ml y la fase acuosa se sigue tratando. Para volver a extraer los lípidos de la fase acuosa, se añaden 2 volúmenes de cloroformo, se agita de nuevo 60s y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se extrae de nuevo la fase orgánica juntándola con la fracción anterior. La fase orgánica extraída se concentró hasta sequedad y se procedió a la separación de los lípidos mediante cromatografía en placa fina (TLC).

El extracto lipídico obtenido se disuelve en 18 μ l de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se pincha junto con 2 μ l de patrones de las diferentes clases de lípidos en una placa de TLC como se muestra en la figura 6.

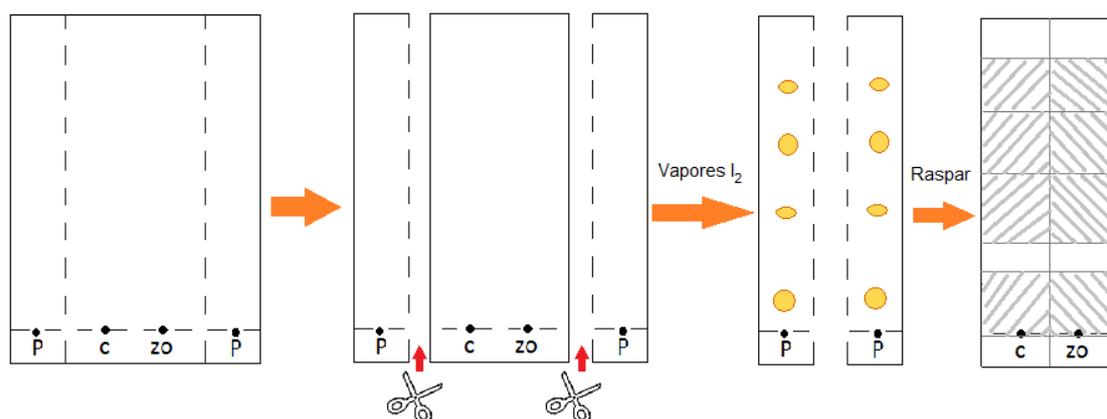


Figura 6. Representación del proceso de la TLC.

En el caso de la separación de lípidos neutros, la placa se activa previamente mediante calor durante 1 hora a 60°C y se utiliza el sistema: hexano/dietil éter/ácido acético 70:30:1 (v/v/v) para la TLC. [19]

En el caso de la separación de distintas clases de PL se utilizó el sistema cloroformo/metanol/amoniaco 120/75/8 (v/v/v) donde la TLC previamente fue impregnada por, primero, cloroformo/metanol 1:1 (v/v) y después por ácido bórico al 1.5% en etanol/agua 1:1 (v/v) [20].

En ambos casos, la zona de la TLC donde se habían pinchado los estándares se cortó y se expuso a vapores de yodo, permitiendo así ver la localización de las manchas y poder situar los lípidos de las muestras (Figura 6). Estas porciones donde se encontraban los diferentes lípidos se raspan con la ayuda de una espátula y posteriormente se introducen en tubos de 2 ml para reextraer los lípidos de la sílice. Para ello, se añade 1 ml de cloroformo/metanol 1:2 (v/v), se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min a 16°C y se recoge la fase orgánica obtenida. A continuación, se vuelve a añadir para reextraer 1 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) siguiendo el mismo proceso de centrifugado y recogida de fase orgánica.

Derivatización de ácidos grasos

- Cloroformo/metanol 2:1 (v/v)
- KOH 0.5 M en metanol
- HCl 0.5 M
- Hexano

La derivatización de los ácidos grasos es necesaria para su posterior análisis en el equipo de gases masas ya que los ácidos grasos no son volátiles. Al realizar la saponificación convertimos esos ácidos grasos en esteres metílicos de los ácidos grasos, compuestos ya volátiles y por tanto analizables en el equipo.

La fase orgánica extraída de la TLC se concentra, se redissuelve en 50 μl de cloroformo/metanol 2:1 v/v y se introduce en un tubo de vidrio roscado donde se añaden 500 μl de KOH 0.5 M en metanol. Se mantiene en un baño a 37°C durante 1 hora en agitación con el fin de que se produzca la transmetilación de los ácidos grasos.

Una vez finalizada la reacción se neutraliza añadiendo 500 μl de HCl 0,5 M. Para extraer los esteres metílicos se añade 2ml de hexano y tras vortear durante 30s

aproximadamente, se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min a 16°C y se recoge la fase orgánica en eppendorfs nuevos. Esta fase orgánica se guarda a -80°C hasta su posterior análisis.

Resultados

Medida de la cantidad de proteína.

El objetivo de esta medida es saber de cuanta cantidad de muestra se parte para realizar los experimentos y normalizar los resultados con respecto a dicha medida.

Tras la preparación de las líneas de calibrado de albúmina y de las muestras tal como se ha explicado anteriormente, el equipo nos aporta la absorbancia de cada disolución, tal como muestra la tabla 3.

Tabla 3. Absorbancia medida con el fotómetro Eppendorf Biophotometer plus: línea de calibrado de 0 a 10 µg/µl y las muestras control y zimosán por duplicado.

| Absorbancia | Concentración (µg/ml) |
|-------------|--------------------------|
| 0.000 | 0 |
| 0.089 | 1 |
| 0.232 | 3 |
| 0.367 | 5 |
| 0.490 | 7 |
| 0.663 | 10 |
| 0.159 | Control 1 |
| 0.154 | Control 2 |
| 0.157 | Zimosán 1 |
| 0.159 | Zimosán 2 |

Una vez que se obtienen los datos, se realiza la representación de la absorbancia frente a la concentración (µg/ml) (Figura 7) obteniendo una recta de la cual se puede calcular la concentración de proteína en las muestras problema.

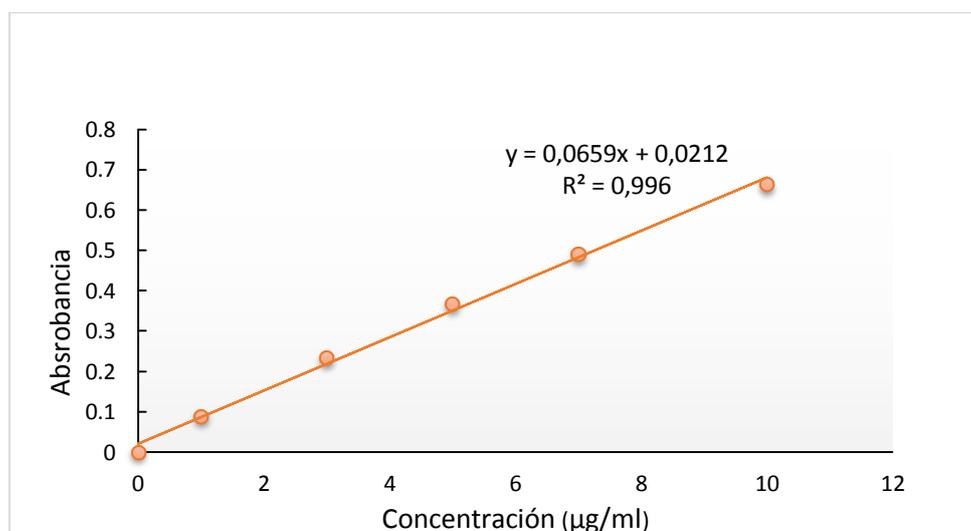


Figura 7. Representación de la absorbancia frente a la concentración de la línea de calibrado.

En la tabla 4 se representan los datos de la concentración obtenidos para nuestra muestra control y zimosán. Sabiendo que inicialmente añadimos 2 μl de cada muestra a la disolución, dividimos entre 2 para obtener la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y posteriormente, midiendo el volumen que tenemos en cada tubo de 1.5 ml de la muestra podemos calcular la cantidad total de proteína que poseemos.

Tabla 4. Cálculos para obtener la cantidad de proteína total de las muestras control y zimosán en μg .

| Muestra | Concentración | Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | V_{Total} muestra (μl) | μg totales muestra |
|---------|---------------|--|---|----------------------------------|
| Control | 2.05 | 1.03 | 345 | 354.16 |
| Zimosán | 2.06 | 1.03 | 355 | 401.83 |

Caracterización de los niveles del DHA en macrófagos peritoneales mediante HPLC-MS

Estudios de diferentes autores han mostrado que el DHA se incorpora tanto a fosfolípidos de las membranas celulares de forma muy rápida y de forma prioritaria a fosfatidiletanolamina (PE) y después a fosfatidilcolina (PC) [21]. Para comprobar la distribución y los cambios del DHA en las distintas especies de fosfolípidos en macrófagos peritoneales de ratón se estimularon las células durante 1 hora con zimosán opsonizado y fueron analizadas mediante HPLC-MS obteniendo las siguientes especies representadas en concentración estandarizadas con la cantidad de proteína medida de cada muestra (Figuras 8, 9 y 10).

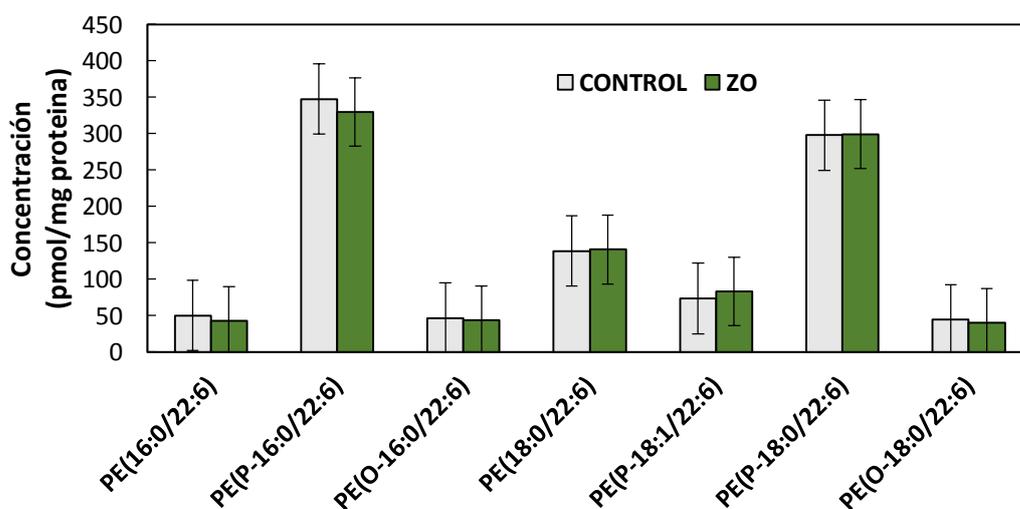


Figura 8. Representación de las especies de fosfatidiletanolamida (PE) de la muestra control y la muestra estimulada con zimosán opsonizado (ZO). Medida mediante HPLC-

MS. Las células fueron tratadas de la manera descrita en el apartado “Materiales y métodos”. Los experimentos se realizaron tres veces y se muestran como medias \pm SD.

Como se puede observar en la figura 8 y comparando con las figuras 9 y 11, de todas las clases de fosfolípidos los que más abundan son las especies de PE alcanzando niveles de hasta 350 pmol/mg proteína, tal como ya vieron en los estudios de las células leucémicas y en eritrocitos humanos. De estas especies cabe destacar PE(P-16:0/22:6), PE(P-18:0/22:6) y PE(18:0/22:6) con niveles cercanos a 350, 300 y 150 pmol/mg proteína respectivamente.

En cuanto a las diferencias entre el control y ZO, se puede observar una pequeña bajada en la especie PE(P-16:0/22:6) y una leve subida para PE(P-18:1/22:6) Y PE(18:0/22:6). Sin embargo, son cambios no significativos.

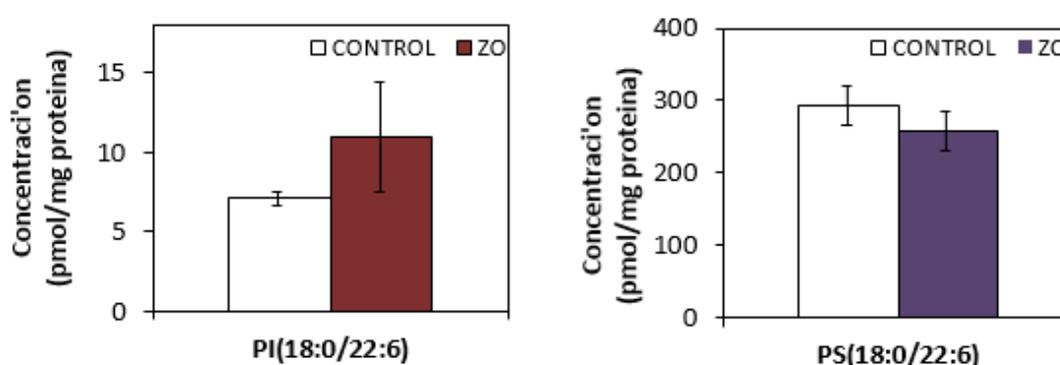


Figura 99. Representación de las especies de PI y PS de la muestra control y la muestra estimulada con zimosán. Medida mediante HPLC-MS. Las células fueron tratadas de la manera descrita en el apartado “Materiales y métodos”. Los experimentos se realizaron tres veces y se muestran como medias \pm SD.

Para el fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS) sólo se identificó una especie para cada tipo de fosfolípido. Los niveles de PS se asemejan más a los niveles que obtuvimos para las especies de PE mientras que los niveles de PI son mucho más bajos, al igual que para los PC. Al igual que en los otros casos, los cambios en PS no son significativos, lo que indica que el zimosán opsonizado no influye en los cambios de distribución del DHA. En cuanto al PI, se observa un aumento de casi el doble para la muestra tratada con zimosán opsonizado.

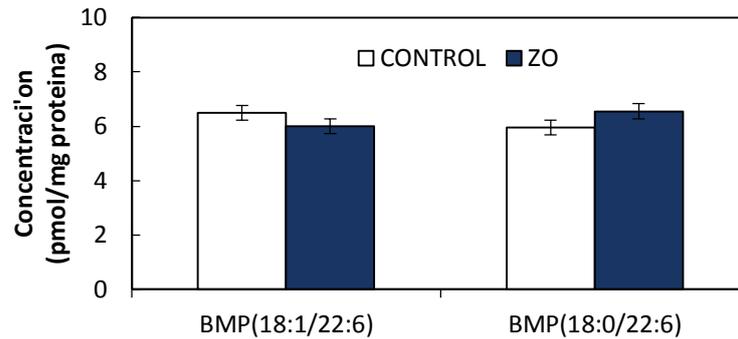


Figura 10. Representación de las especies de BMP de la muestra control y la muestra estimulada con zimosán opsonizado (ZO). Medida mediante HPLC-MS. Las células fueron tratadas de la manera descrita en el apartado “Materiales y métodos”. Los experimentos se realizaron tres veces y se muestran como medias \pm SD.

También se encontró DHA en especies fosfolípídicas no habituales, tales como BMP (bis(monoacilglicerol)fosfato). Los BMP son compuestos que poseen dos esqueletos de glicerol unidos a un grupo fosfato (Figura 11).

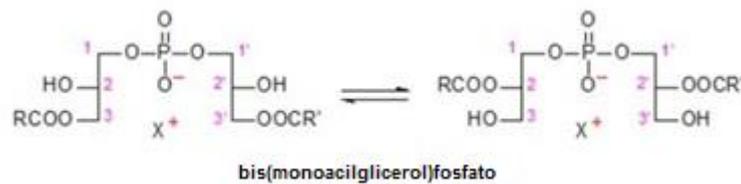


Figura 11. Representación de la especie BMP (Bis(monoacilglicerol)fosfato)

Comparando con las especies de PE de la figura 9, se puede ver como la concentración es mucho menor, y sólo hay dos especies: (BMP(18:1/22:6) y BMP(18:0/22:6)). Además, los cambios entre la muestra control y la muestra estimulada con zimosán opsonizado no son significativos, por lo que la estimulación tampoco produce cambios en estas especies con DHA.

Estos datos sugieren que, al estimular con el zimosán opsonizado, el DHA no es hidrolizado por las fosfolipasas de modo significativo, tal como ocurre con el AA donde se puede observar cómo sus niveles bajan de modo muy notable al estimular los macrófagos [22, 23].

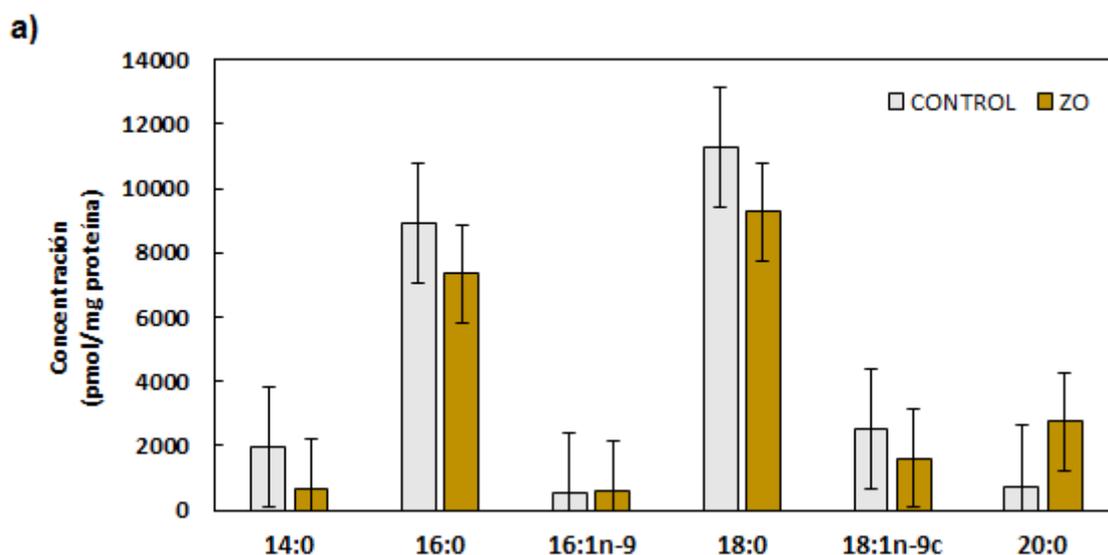
Contrariamente a nuestras expectativas, no se detectaron especies de PC conteniendo DHA. Esto es probablemente debido a que dichas especies no se ionizan de modo efectivo bajo nuestras condiciones experimentales.

Caracterización de los niveles del DHA en diferentes especies de lípidos de macrófagos peritoneales de ratón mediante GC-MS

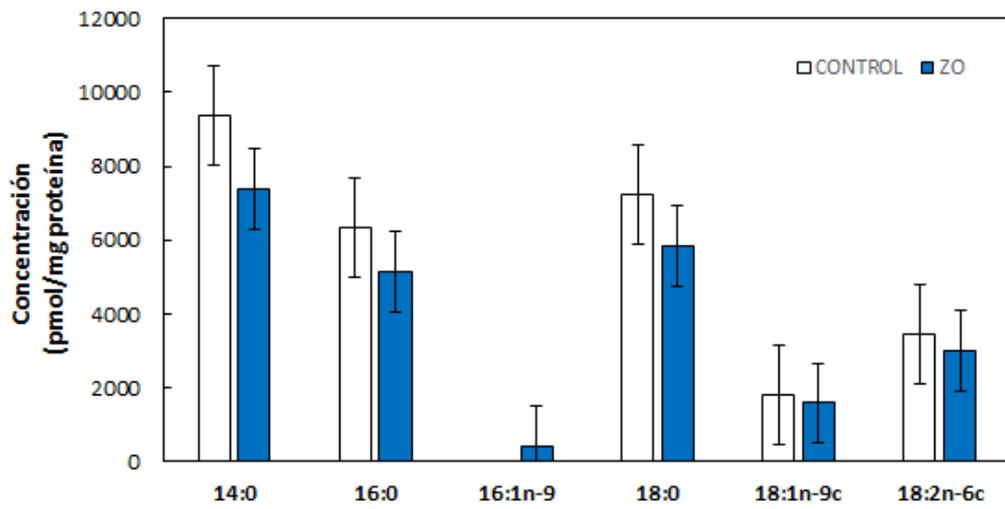
Debido a la imposibilidad de detectar especies de PC conteniendo DHA mediante de HPLC-MS se decidió realizar experimentos mediante la técnica de GC-MS al ser un equipo más sensible.

El mayor inconveniente de esta técnica es la imposibilidad de identificar especies moleculares, sino que sólo pueden identificarse los diferentes ácidos grasos que pueda haber en cada clase.

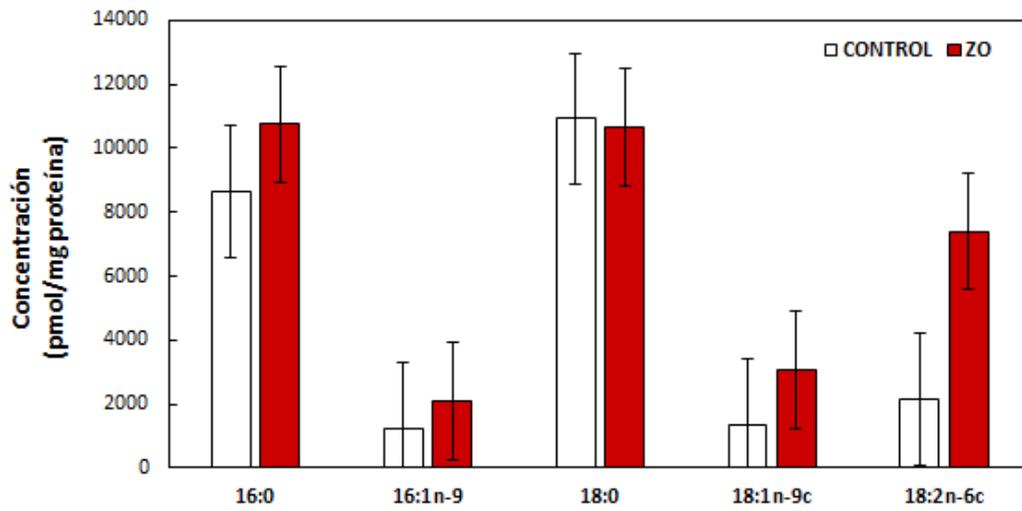
En un primer estudio mediante GC-MS se midieron la cantidad y distribución de los ácidos grasos en las distintas clases de lípidos: triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG), ésteres de colesterol (CE) y fosfolípidos (PL). Para ello, se estimularon los macrófagos peritoneales de ratón durante 1 hora con zimósán opsonizado. Tras el posterior tratamiento, donde se extrajeron y se separaron por TLC las distintas clases de lípidos neutros, las muestras fueron analizadas mediante GC-MS obteniendo los siguientes gráficos donde la cantidad de proteína se expresa en concentración (pmol/mg proteína) (Figura 12).



b)



c)



d)

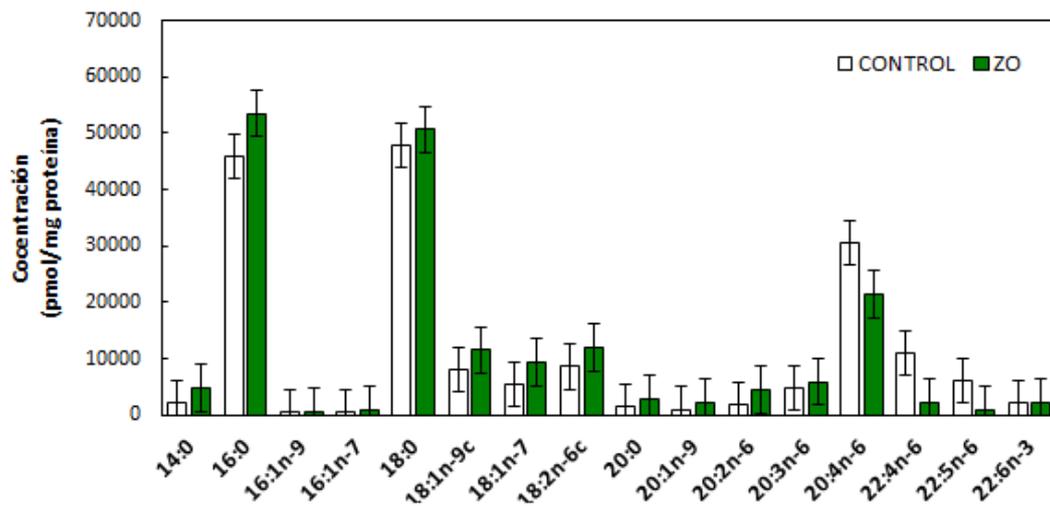


Figura 10. Representación de los ácidos grasos presentes en forma de a) triacilglicerol (TAG), b) diacilglicerol (DAG), c) ésteres de colesterol (CE) y d) fosfolípidos (PL) de la muestra control y la muestra estimulada con zimosán opsonizado (ZO). Medida mediante GS-MS. Las muestras después de ser tratadas como sigue el procedimiento descrito en “Materiales y métodos” se sometieron a una separación por TLC. Los experimentos se realizaron tres veces y se muestran como medias \pm SD.

Como se puede observar en las gráficas anteriores, la especie de interés, el DHA (22:6n-3), sólo se ha identificado en los fosfolípidos y en una baja cantidad.

Respecto al resto de ácidos grasos, los más abundantes son el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0) en todos los tipos de lípidos estudiados, añadiendo el ácido mirístico (14:0) en el DAG.

Que el zimosán ha hecho efecto en estos experimentos se puede comprobar fácilmente observando si el AA (20:4n-6) disminuye sus niveles con la exposición de dichas partículas. Como se puede observar en el gráfico de los fosfolípidos, sí se aprecia una bajada significativa del nivel del AA en fosfolípidos (figura 12d), sin embargo, las diferencias entre las muestras control y las muestras estimuladas del resto de ácidos grasos y en concreto del DHA no son significativas. Esto vuelve a indicar, que en cuanto al DHA, no se ven cambios en la composición.

Caracterización de los niveles del DHA en diferentes especies de fosfolípidos de macrófagos peritoneales de ratón mediante GS-MS

Debido a que en el anterior estudio el DHA sólo se encontraba en las especies de fosfolípidos, el siguiente experimento se centró en determinar sus niveles en los distintos fosfolípidos mediante el equipo de GS-MS.

Para ello, se siguió el mismo procedimiento estimulando las muestras durante 1 hora con zimosán opsonizado. Una vez que se estimularon las células y se extrajeron los lípidos, se separaron las distintas clases de fosfolípidos por TLC y tras su reextracción de la sílice pasaron a medirse e identificarse con el equipo. Los datos obtenidos se encuentran representados en la Figura 13.

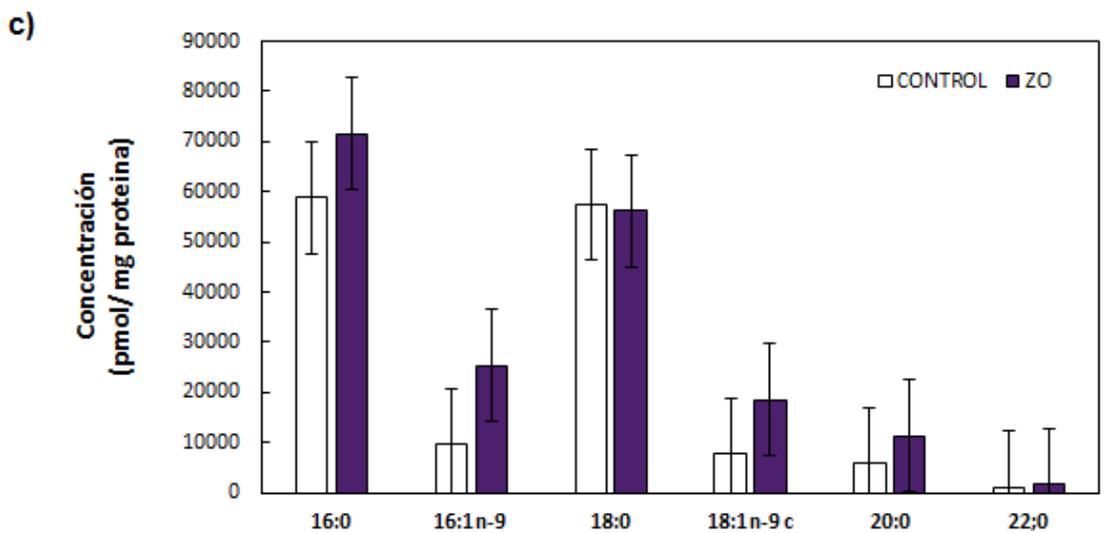
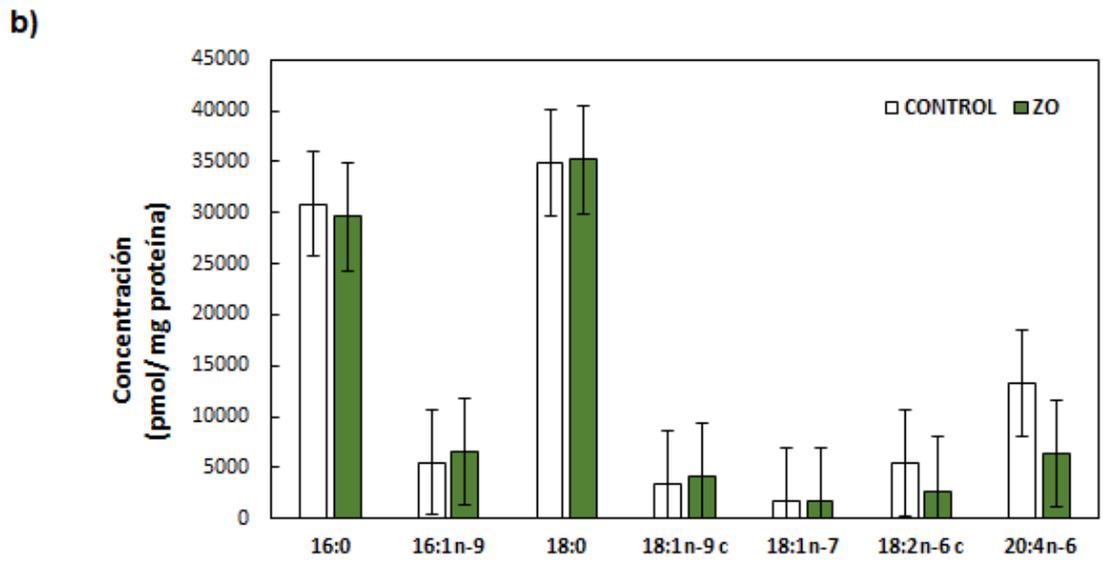
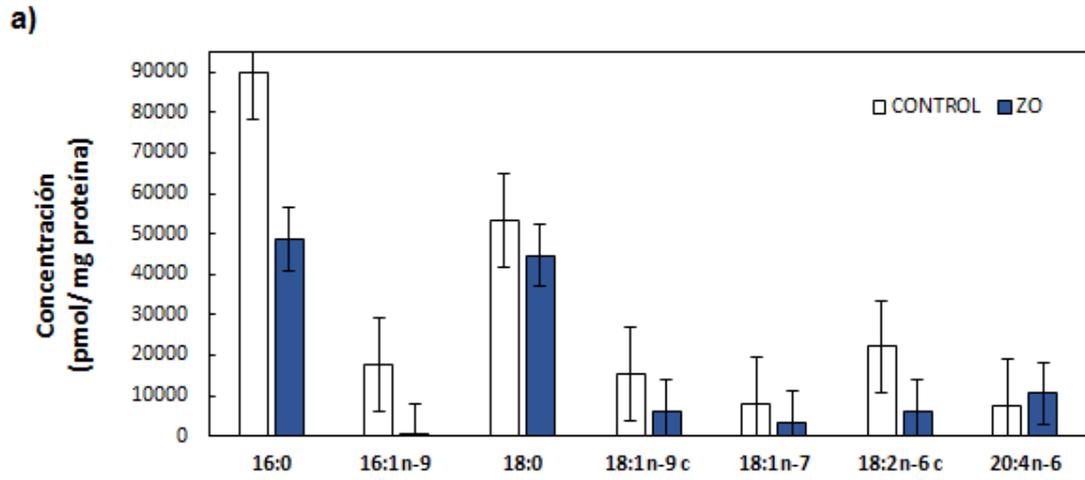


Figura 11. Representación de los ácidos grasos presentes en forma de a) fosfatidilcolina (PC), b) fosfatidiletalonamida (PE) y c) fosfatidilserina (PS) de la muestra control y la

muestra estimulada con zimosán osonizado (ZO). Medida mediante GS-MS. Las muestras después de ser tratadas como sigue el procedimiento descrito en “materiales y métodos” se sometieron a una separación por TLC. *Los experimentos se realizaron tres veces y se muestran como medias \pm SD.*

Cabe destacar que para realizar los gráficos se necesita la presencia de un patrón interno para poder calcular el rendimiento obtenido a lo largo de todo el proceso. En el caso del PI no se posee un patrón interno por lo que la representación de los datos obtenidos podría estar falseada al no poder realizarse el cálculo del rendimiento y por tanto, a pesar de tener los datos y de identificar los ácidos grasos presentes en PI, no se muestran los resultados obtenidos en la memoria.

Observando las gráficas de la figura 13, se puede comprobar de nuevo cómo los ácidos mayoritarios (ácido palmítico y ácido esteárico) se encuentran en las tres especies de fosfolípidos.

En ninguno de los tres tipos de fosfolípidos se pudo identificar de modo concluyente la presencia de DHA (22:6n-3). Esto se puede deber a que ya, inicialmente, partíamos de niveles muy bajos de DHA en fosfolípidos que se han podido perder a lo largo del proceso de preparación de la muestra.

Discusión

Los macrófagos son células que poseen altos niveles de ácido araquidónico esterificado en los glicerofosfolípidos de su membrana. Esto hace que dichas células sean una buena fuente de eicosanoides, compuestos tan importantes en las reacciones del sistema inmunológico ya que modulan tanto la producción de citoquinas como la capacidad fagocítica así como la diferenciación y migración de los macrófagos. [24]

En este trabajo, con el fin de seguir el estudio en macrófagos peritoneales de ratón se ha querido analizar los niveles de otro ácido graso importante en la inflamación como es el DHA y cómo cambian sus niveles al estimular las células con un inductor a la inflamación como es el zimosán opsonizado.

Al reunir los resultados obtenidos en este trabajo se observa, primero, que los niveles del ácido docosahexaenoico en macrófagos peritoneales de ratón son muy bajos tanto a nivel de fosfolípidos como a nivel de los distintos tipos de lípidos. Esto provoca una limitación a la hora del estudio ya que el tratamiento de la muestra es un proceso largo con numerosos pasos en los cuales se va perdiendo muestra haciendo que al final, como ocurría en el caso de la caracterización de las diferentes clases de fosfolípidos, se pierda el DHA.

Como posibles soluciones a este inconveniente se podría o bien cambiar el modelo de célula o bien enriquecer dichas células con DHA con el fin de aumentar esos niveles y poder identificar adecuadamente las distintas especies.

El segundo aspecto que podemos observar de los resultados obtenidos es la distribución del DHA en las diferentes clases de lípidos como de fosfolípidos y los cambios que se producen por la estimulación de los macrófagos con zimosán opsonizado.

A pesar de estudios previos en los que concluían que el DHA se incorporaba prioritariamente a las especies de PE y PC en la monocapa interna de las membranas [21], con el primer experimento donde se caracterizaba los niveles de los diferentes fosfolípidos mediante HPLC-MS se puede observar que efectivamente, las especies de PE son las más abundantes, pero, sin embargo, no se llega a la misma conclusión con las especies de PC. Esto se puede deber a que el modo de trabajo con el espectrómetro de masas es con un potencial negativo que favorece la formación de iones de PI, PE y PS pero no para la formación de PC. Sin embargo, al cambiar el equipo de análisis al GC-MS no se pudo identificar el DHA en los diferentes tipos de fosfolípidos debido a sus bajos niveles.

Por otra parte, viendo las gráficas se puede comprobar que la estimulación con zimosán opsonizado no provoca cambios significativos en la distribución lipídica del DHA o no son tan evidentes como ocurre con el ácido araquidónico. Para el resto de ácidos grasos sí se observan leves variaciones ya sea aumento o disminución de los niveles, sin embargo, siguen sin ser significativos.

Debido a la falta de tiempo, los experimentos se han realizado 3 veces cada uno, por lo que podrían verse modificados al aumentar el número de veces que se realicen pudiendo llegar a ser significativas algunas diferencias de ácidos grasos que se veían en las gráficas. Por otra parte, se podía completar información realizando el

mismo estudio con distintos estímulos diferentes al zimosán y ver si éstos tienen efecto en la movilización del DHA en macrófagos.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos podemos concluir que en los macrófagos peritoneales de ratón:

- Los niveles de DHA distintas clases de fosfolípidos son muy bajos, siendo mayoritario en PE.
- En los lípidos neutros, el DHA sólo se encuentra en los PL mientras que en los TAG, DAG y CE no se ha identificado.
- No se producen cambios en la distribución de DHA al estimular las células con zimosán opsonizado.

Bibliografía

- [1] Wiktorowska-owczarek, A., M. Berezinsk, and J. Z. Nowak. 2015. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv. Clin. Exp. Med.* **24**: 931-941.
- [2] Min Lee, J., H. Lee, S. Kang, and W. J. Park. 2016. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* **8**: 23.
- [3] Russo, G. L. 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol.* **77**: 937-946.
- [4] Calder, P. C. 2004. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin. Sci.* **107**: 1-11.
- [5] Neuringer, M., W. E. Connor, D. S. Lin, L. Barstad, and S. Luck. 1986. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega-3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 4021-4025.
- [6] Ehringer, W., D. Belcher, S. R. Wassall and W. Stillwell. 1990. A comparison of the effects of linolenic (18:3 Ω 3) and docosahexaenoic (22:6 Ω 3) acids on phospholipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids.* **54**: 79-88.
- [7] Shaikh, S. R. 2012. Biophysical and Biochemical mechanisms by which dietary polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. *J. Nutr. Biochem.* **23**: 101-105.
- [8] Arnoldussen I. A. C., and A. J. Kiliaan. 2014. Impact of DHA on Metabolic Diseases from Womb to Tomb. *Mar. Drugs.* **12**: 6190-6212.
- [9] Buckley, C. D., D. W. Gilroy, and C. N. Serhan. 2014. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity.* **40**: 315-327.
- [10] Serhan, C. N. 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* **510**: 92-101.
- [11] Bannenberg, G., and C. N. Serhan. 2010. Specialized Pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update. *Biochim. Biophys. Acta.* **18**: 1260-1273.
- [12] Serhan, C. N., N. Chiang and T. E. Van Dyke. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 349-361.
- [13] Hong S., K. Gronert, P. R. Devchand, R. L. Moussignac, and C. N. Serhan. 2003. Novel Docosatrienes and 17S-Resolvins generated from Docosahexaenoic Acid in Murine Brain, Human Blood and Glial cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 14677-14687.
- [14] Titos, E., B. Rius, A. González-Pérez, C. López-Vicario, E. Morán-Salvador, M. Martínez-Clemente, V. Arroyo, and J. Clària. 2011. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic Acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J. Immunol.* **187**: 5408-5418.

- [15] Komprda, T. 2012 Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: a review. *J. Funct. Foods*. **4**: 25-38.
- [16] Groeger, A. L., C. Cipollina, M. P. Cole, S. R. Woodcock, G. Bonacci, T. K. Rudolph, V. Rudolph, B. A. Freeman, and F.J. Schopfer. 2010. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 433-441.
- [17] Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- [18] Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- [19] Guijas C., G. Perez-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 A₂-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid. Res.* **53**: 2343-2354.
- [20] Fine, J. B., and H. Sprecher. 1982. Unidimensional thin-layer chromatography of phospholipids on boric acid-impregnated plates. *J. Lipid. Res.* **23**: 660-663.
- [21] Stillwell, W., and S. R. Wassall. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids.* **126**: 1-27.
- [22] 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.
- [23] Balsinde, J., M. V. Winstead, and E. A. Dennis. 2002. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* **531**: 2-6.
- [24] 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.