



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas





Lipoxigenasas de macrófagos humanos y síntesis de mediadores lipídicos inflamatorios

Sofía Abramo Gaione

Programa de Desarrollo de las Ciencia Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

> Montevideo 2024









Título: Lipoxigenasas de macrófagos humanos y síntesis de mediadores lipídicos inflamatorios

Autora: Sofía Abramo Gaione

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título: Magíster en Ciencias Biológicas Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Área Biología, Subárea Bioquímica

Facultad de Ciencias, UdelaR/ Ministerio de Educación y Cultura

Directora: Dra. Lucía González Perilli

Profesora Adjunta del Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República

Investigadora del Centro de Investigaciones Biomédicas.

Codirector: Dr. Homero Rubbo

Profesor Titular del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Investigador del Centro de Investigaciones Biomédicas.

Tribunal de tesis: Dra. María Moreno (Presidenta), Dra. Florencia Irigoin, Dra. Lucía Turell

Montevideo, Julio de 2024

Agradecimientos

A quienes tuvieron que ver directamente con la tesis:

-A mi tutora, Lucía, por la iniciativa de invitarme al laboratorio y por la dedicación y compromiso con los que me recibió y acompañó en mis primeros años de laboratorio. Por introducirme al mundo de la inflamación, por todos los conocimientos y destrezas que me transmitió con espíritu docente y el foco en priorizar mi formación. Por darme un rol activo en el proyecto desde un inicio y por su integridad humana y científica, cualidades de las que también he aprendido mucho.

-A mi cotutor, Homero, por abrirme las puertas del grupo, por permitirme trabajar con libertad, por aportar su mirada en perspectiva, y por impulsarme a continuar formándome.

-A Mauricio por todo lo que me ha enseñado, de oxilipinas y de ciencia, por el tiempo dedicado a discutir resultados con rigurosidad y entusiasmo por comprender.

-A los demás integrantes, actuales y pasados, del grupo lípidos, con quienes discutimos el proyecto y primeros resultados de esta tesis en zooms pandémicos. En especial a Irene y Beatriz por su apoyo.

-A Mariana Di Domenico, por enseñarme Microscopía y por la grata compañía en las largas tardes de fotos.

-A Cecilia Casaravilla, por recibirme en su laboratorio e instruirme en citometría de macrófagos con la mejor disposición.

-A Paola Rosenberg, por encargarse de las extracciones sanguíneas y preparación de reactivos.

A quienes fueron parte o apoyaron esta etapa:

-A las y los integrantes del Departamento de Bioquímica y el CEINBIO por el espíritu colaborativo genuino. A aquellas y aquellos con quienes compartimos preparación de concurso, docencia, mesada y sobremesas. A quienes dedicaron su tiempo a ayudarme con un equipo, protocolo o la elaboración de una idea. A quienes me hicieron pensar con sus preguntas y aportes en los seminarios y reuniones.

-A Rafael, por hacer posible que desarrolle mi tesis en un espacio formativo de excelente calidad como lo es el CEINBIO.

-A la Facultad de Medicina, mi doble casa de estudios.

-A la Universidad de la República por la formación que me ha brindado.

-A los apoyos económicos: la Comisión Académica de Posgrados (CAP) por la Beca de Apoyo a posgrados y la Beca de finalización; PEDECIBA por las alícuotas de estudiante; CSIC que financió un proyecto I+D a Lucía González; al PAYS por el tiempo para la escritura de esta tesis.

-A los recursos libres que me facilitaron acceder a la literatura: Portal Timbó (ANII) y Sci Hub.

A quienes acompañaron esta etapa y son parte de todo mi camino: Santi, mi familia y amistades.

Lista de abreviaciones

2-AG: 2 acil-glicerol AA: ácido araquidónico AAS: ácido acetilsalicílico Ac: anticuerpo ADA: ácido adrénico AG: ácidos grasos AINEs: antiinflamatorios no esteroideos ALA: ácido alfa-linolénico Arg1: Arginasa 1 BMDM: macrófagos derivados de médula ósea de ratón BHT: antioxidante butil hidroxitolueno CD: grupo de diferenciación CLP: proteína similar a coactosina COX: ciclooxigenasa cPGES: prostaglandina E sintasa citosólica cPLA2: fosfolipasa A2 citosólica CQ: citoquina CYP: citocromos P450 CysLT: cisteinil- leucotrieno DAMP: patrón molecular asociado a daño DE: desvío estándar DGLA: ácido di-homo-y-linolénico DHA: ácido docosahexaenoico DMEM: medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMSO: dimetilsulfóxido DP1: receptor de prostaglandinas D DPA: ácido docosapentaenoico dPBS: buffer fosfato salino dDulbeeco EET: ácido epoxieicosatetraenoico ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima EPA: ácido eicosapentaenoico EP: receptor prostanoides E EpOME: ácidos epoxioctadecenoicos FITC: fluoresceína-5-isotiocianato FLAP: proteína activadora de 5-lipoxigenasa FMO: controles fluorescencia menos uno fMLF: N-formilmetionil-leucil-fenilalanina FP: receptor de prostaglandinas F FSC: dispersión lumínica frontal, del inglés forward scatter GLA: ácido gamma-linolénico GM-CSF: factor estimulador de colonias de monocitos y de granulocitos GPR: receptor acoplado a proteína G GPX: glutatión peroxidasa HDHA: ácido hidroxidocosahexaenoico HEPES: solución amortiguadora ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico HEPE: ácido hidroxieicosapentaenoico HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico

HODE: ácido hidroxioctadienoico HpDHA: ácido hidroperoxidocosahexaenoico HpEPE: ácido hidroperoxieicosapentaenoico HpETE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico HPLC: cromatografía líguida de alta resolución HpODE: ácido hidroperoxioctadienoico HpOTrE: ácido hidroperoxioctatrienoicos HRP: peroxidasa de rábano ICAM: molécula de adhesión intracelular 1 IFN-y: Interferón gamma IkB: Inhibidor del factor nuclear kappa B IL: interleuguina iNOS: óxido nítrico sintasa inducible IRF: factor de respuesta a interferón IP: receptor de prostaglandinas I IS: estándar interno JAK: guinasa Janus LA: ácido linoleico LT: leucotrieno LOD: límite de detección LOQ: límite de cuantificación LOX: lipoxigenasa LPS: lipopolisacárido LPA: ácido lipoteicoico IPLA2: fosfolipasa A2 lisosomal LX: lipoxina Mar: maresina MAPK: quinasa activada por mitógenos M-CSF: factor estimulador de colonias de monocitos MK2: quinasa de MAPK 2 moDCs: células dendríticas derivadas de monocitos M(IFN-y), M(IFN-y/LPS), M(LPS): macrófagos polarizados a fenotipo similares a M1 en la bibliografía M(IL-4), M(IL-10): macrofagos polarizados a fenotipos similares a M2 en bibliografía M_{II-4}: macrófagos polarizados con IL-4 durante el trabajo de tesis M_{LPS}: macrófagos polarizados con LPS durante el trabajo de tesis M_{Nv}: macrófagos naive obtenidos con PMA M_{Nv(GM-CSF)}: macrófagos naive obtenidos con GM-CSF M_{Nv(M-CSF)}: macrófagos naive obtenidos con M-CSF mPGES: prostaglandina E sintasa microsomal MRM: monitoreo de reacciones múltiples (del inglés Multiple Reaction Monitoring) MS: espectrometría de masas MUFA: ácido graso monoinsaturado NF-kB: factor de transcripción nuclear kappa B NLR: receptor tipo NOD NOD: dominio de oligomerización y unión a nucleótidos NRF2: factor nuclear eritroide similar al factor 2 oxPL: oxofosfolípido PAF: factor activador plaquetario

PAF-AH-PLA2: fosfolipasa A2 activada por hidrolasas PAF PAMP: patrón molecular asociado a patógenos PBMCs: células mononucleares de sangre periférica PBS: solución amortiguadora fosfato (del inglés Phosphate Buffer Saline) PD: protectina D PE: ficoeritrina PEBP1: proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1 PG: prostaglandina PGDH: prostaglandina deshidrogenasa PGDS: prostaglandina D sintasa PGFS: prostaglandina F sintasa PGHTS: prostaglandina endoperóxido sintasa PGIS: prostaglandina I sintasa PI3-k: fosfatidilinositol-3-quinasa PKA: proteína quinasa A PKB: proteína guinasa B PKC: proteína guinasa C PL: fosfolípido PLA2: fosfolipasa A2 PMA: diéster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato POX: actividad peroxidasa PPAR: receptor activado por proliferación de peroxisoma PRRs: receptores de reconocimiento de patrones PUFA: ácido graso poliinsaturado RIPA: amortiguador de lisis celular (del inglés Radioimmunoprecipitation assay) RLR: receptor tipo gen inducible por ácido retinoico (tipo RIG) RNS: especies reactivas del nitrógeno ROS: especies reactivas del oxígeno RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute RvD: resolvinas D RvE: resolvinas E SBF: suero bovino fetal sEH: époxido hidrolasa soluble SOCS: proteínas supresoras de la señalización de CQ SPE: extracción en fase sólida sPLA2: fosfolipasa A2 secretada SPMs: mediadores lipídicos prorresolutivos especializados SSC: dispersión lumínica lateral, del inglés side scatter STAT: factor transductor de señales activadores de la transcripción TAM: macrófagos asociados a tumores TGF: factor de crecimiento transformante TLR: receptor tipo toll TMB: tetrametilbencidina TNF: factor de necrosis tumoral TP: receptor de tromboxanos TRPV1: receptor potencial transitorio vaniloide 1 TX: tromboxano TXAS: tromboxano A sintasa Zym: zymosan

Nota: se utiliza la letra s al final de las abreviaturas para indicar el plural.

Resumen

La inflamación es una respuesta fisiopatológica universal que tiene el objetivo de mantener la homeostasis. Su relevancia biomédica se evidencia en el creciente número de condiciones patológicas asociadas a inflamación crónica. Los macrófagos, presentes en todos los tejidos del organismo, desempeñan funciones clave en la homeostasis y exhiben una notable plasticidad fenotípica, lo que los posiciona como actores centrales en la transición de la fase inicial hacia la resolución del proceso inflamatorio. Este proceso es dirigido por una diversidad de mediadores inflamatorios, dentro de los cuales destacan las oxilipinas, lípidos bioactivos derivados de la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados liberados de las membranas celulares. Las lipoxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX) y citocromos P450 (CYP), junto con sus proteínas activadoras y enzimas asociadas, generan más de 150 moléculas con efectos biológicos potentes y diversos, de manera temporal y espacialmente coordinada. Estudios previos sugieren que los fenotipos de macrófagos inducidos durante la inflamación expresan y distribuyen diferencialmente las isoformas LOX, pero la literatura muestra discrepancias en este aspecto. En este trabajo se estudió la expresión, localización subcelular y síntesis de oxilipinas de macrófagos humanos polarizados. Para ello, se realizó la puesta a punto del cultivo de macrófagos primarios derivados de monocitos de sangre, modelo de referencia para el estudio de la biología de macrófagos humanos. Los macrófagos fueron polarizados a los fenotipos MLPS y M_{IL-4}, que fueron caracterizados por su morfología, expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo y producción de citoquinas por ELISA. La expresión de todas las isoformas LOX de leucocitos humanos fue determinada por Western Blot, con un patrón diferencial entre fenotipos. Mientras que 5-LOX se expresó de manera similar en ambos fenotipos, su proteína activadora (FLAP) se observó predominantemente en los MLPS. Las isoformas 12-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2 se encontraron mayormente o exclusivamente en M_{IL-4}. La compartimentación de las 5-LOX y 15-LOX1 fue explorada por inmunofluorescencia detectando para ambas isoformas una tinción predominantemente nuclear, sin cambios significativos por el estímulo con zymosan y de forma similar entre los fenotipos. El perfil de oxilipinas fue analizado por un método de lipidómica basado en HPLC-MS/MS, previamente desarrollado en el laboratorio, que permitió identificar y cuantificar eicosanoides, octadecanoides y docosanoides derivados de los ácidos araquidónico, eicosapentaenoico, linoleico y docosahexaenoico (AA, EPA, LA, DHA respectivamente). En macrófagos polarizados suplementados con PUFAs y estimulados con zymosan, se observó una mayor cantidad de PGE2 y TxB2 en el fenotipo M_{LPS}, sin diferencias en los derivados monohidroxilados de los PUFAs. Se detectaron marcadores de las vías de síntesis de Maresinas (14-HDHA), RvD (17-HDHA) y RvE (18-HEPE). Si bien se logró detectar LXA4, los mediadores lipídicos prorresolutivos especializados (SPMs) del DHA y EPA, no fueron detectados en ninguna condición. Esto concuerda con observaciones de otros grupos de investigación que cuestionan tanto la posibilidad de detectar SPMs en muestras biológicas como la relevancia fisiológica de estas oxilipinas. Además, se evaluaron líneas celulares para el estudio de las oxilipinas producidas por las LOX de macrófagos. Los macrófagos derivados de la línea de monocitos THP-1, polarizados a M_{LPS} y M_{IL-4}, presentaron una expresión de la maquinaria biosintética y un perfil de oxilipinas muy similar al de los macrófagos derivados de monocitos sanguíneos. Por tanto, se postulan como una herramienta valiosa para el estudio de las LOX de macrófagos y la resolución de la inflamación a nivel celular.

Palabras clave

MACRÓFAGOS, LIPOXIGENASAS, OXILIPINAS, INFLAMACIÓN, RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Abstract

Inflammation is a universal pathophysiological response aimed at maintaining homeostasis. Its biomedical relevance is evidenced by the increasing number of pathological conditions associated with chronic inflammation. Macrophages, present in all body tissues, play key roles in homeostasis and exhibit remarkable phenotypic plasticity, positioning them as central actors in the transition from the initial phase to the resolution of the inflammatory process. This process is directed by a diversity of inflammatory mediators, among which oxylipins, bioactive lipids derived from the oxygenation of polyunsaturated fatty acids released from cell membranes, stand out. Lipoxygenases (LOX), cyclooxygenases (COX), and cytochromes P450 (CYP), along with their activating proteins and associated enzymes, generate more than 150 molecules with potent and diverse biological effects, in a temporally and spatially coordinated manner. Previous studies suggest that macrophage phenotypes induced during inflammation differentially express and distribute LOX isoforms, but the literature shows discrepancies in this regard. In this work, we studied the expression, subcellular localization, and synthesis of oxylipins in polarized human macrophages. For this purpose, we optimized the culture of primary macrophages derived from blood monocytes, a reference model for studying the biology of human macrophages. The macrophages were polarized to the M_{LPS} and M_{IL-4} phenotypes and were characterized by their morphology, surface marker expression by flow cytometry, and cytokine production by ELISA. The expression of all LOX isoforms in human leukocytes was determined by Western Blot, showing a differential pattern between phenotypes. While 5-LOX was similarly expressed in both phenotypes, its activating protein (FLAP) was predominantly observed in M_{IPS} . The 12-LOX, 15-LOX1, and 15-LOX2 isoforms were mostly or exclusively found in M_{II-4} . The compartmentalization of 5-LOX and 15-LOX1 was explored by immunofluorescence, detecting both isoforms predominantly in the nucleus, with no changes due to zymosan stimulation and similarly between phenotypes. The oxylipin profile was analyzed by a lipidomics method based on HPLC-MS/MS previously developed in the laboratory, which allowed the identification and quantification of eicosanoids, octadecanoids, and docosanoids derived from arachidonic, eicosapentaenoic, linoleic, and docosahexaenoic acids (AA, EPA, LA and DHA respectively). In polarized macrophages supplemented with PUFAs and stimulated with zymosan, higher amounts of PGE2 and TxB2 were observed in the M_{LPS} phenotype, with no differences in the monohydroxylated derivatives of PUFAs. Markers of the maresin (14-HDHA), RvD (17-HDHA), and RvE (18-HEPE) synthesis pathways were detected. While LXA4 was detected, DHA and EPA SPMs were not detected under any condition, in line with observations from other research groups guestioning the feasibility of detecting SPMs in biological samples and their physiological relevance. Additionally, cell lines were evaluated for the study of oxylipins produced by macrophage LOX. Macrophages derived from the THP-1 monocyte line, polarized to M_{LPS} and M_{IL-4}, presented biosynthetic machinery expression and oxylipin profiles very similar to those of macrophages derived from blood monocytes, proposing them as a valuable tool for the study of macrophage LOX and the resolution of inflammation at the cellular level.

Keywords

MACROPHAGES, LIPOXYGENASES, OXYLIPINS, INFLAMMATION, RESOLUTION OF INFLAMMATION

Lista de figuras

Figura 1. Componentes del circuito inflamatorio	7
Figura 2. Secuencia de eventos de la respuesta inflamatoria aguda	10
Figura 3. Marcadores fenotípicos de macrófagos	18
Figura 4. Principales lípidos bioactivos	20
Figura 5. Modificaciones oxidativas de fosfolípidos y ácidos grasos	21
Figura 6. Vías de síntesis de los principales prostanoides	25
Figura 7. Principales vías del AA iniciadas por 5-LOX	28
Figura 8. Vías de síntesis de SPMs del DHA y EPA	31
Figura 9. F2-Isoprostanos producidos por oxidación no enzimática del AA	33
Figura 10. Vías COX, LOX y CYP del AA	34
Figura 11. Esquema global de las principales oxilipinas producidas a partir de PUFAs por vías COX, LOX, CYP y mediadas por radicales libres	35
Figura 12. Regulación de la localización subcelular y actividad 5-LOX por fosforilaciones	42
Figura 13. Purificación de células mononucleares de sangre periférica	47
Figura 14. Diferenciación de monocitos a macrófagos e inducción de fenotipos de macrófagos	48
Figura 15. Diseño de Citometría de Flujo multicolor para estudiar la expresión de marcadores de superficie en macrófagos derivados de monocitos de sangre	51
Figura 16. Protocolo de identificación y cuantificación de oxilipinas en cultivos de macrófagos por SPE y HPLC-MS/MS	56
Figura 17. Análisis por Microscopía de campo claro de cambios morfológicos durante la diferenciación y polarización de macrófagos derivados de PBMCs	59
Figura 18. Análisis descriptivo de tamaño y forma por Microscopía de campo claro durante la diferenciación y polarización de macrófagos derivados de PBMCs	60
Figura 19. Identificación por Citometría de flujo de poblaciones celulares en células derivadas de PBMCs polarizadas	62
Figura 20. Puesta a punto de la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos con PMA	63
Figura 21. Análisis por Citometría de flujo de expresión de marcadores fenotípicos de superficie en células derivadas de PBMCs polarizadas	65
Figura 22. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares identificadas en el estudio de marcadores fenotípicos de superficie en células derivadas de PBMCs polarizadas	69

Figura 23. Análisis por Citometría de flujo de expresión de marcadores fenotípicos de superficie en macrófagos derivados de monocitos THP-1 <i>naive</i> y polarizados	23
Figura 24. Determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de macrófagos polarizados derivados de monocitos de sangre por ELISA	74
Figura 25. Estudio por Western Blot de expresión de 5-LOX (izquierda) y FLAP (derecha) en macrófagos polarizados	76
Figura 26. Expresión por Western Blot de 12-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2 en macrófagos estimulados con zym	78
Figura 27. Comparación por Western Blot de la expresión de las isoformas LOX en situación basal y posterior al estímulo con zym.	79
Figura 28. Estudio por Western Blot de expresión de COX-2 en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados	79
Figura 29. Estudio por Microscopía Confocal de la localización subcelular de 5-LOX y 15-LOX1 en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados	82
Figura 30. Identificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en M _{IL-4} derivados de monocitos THP-1 en condiciones basales	84
Figura 31. Identificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados en condiciones basales	86
Figura 32. Determinación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en medio RPMI sin suero	89
Figura 33. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS para evaluar el efecto del estímulo con zymosan en macrófagos derivados de monocitos THP-1 polarizados a M_{IL-4}	92
Figura 34. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS para evaluar el efecto del estímulo con zymosan en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados	93
Figura 35. Determinación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en sobrenadantes y lisados celulares.	95
Figura 36. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS de macrófagos derivados de monocitos de sangre suplementados con AA, DHA y EPA	98
Figura 37. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS en sobrenadantes de macrófagos derivados de monocitos THP-1 suplementados con DHA y EPA	99
Figura 38. Búsqueda de SPMs del DHA por HPLC-MS/MS en M _{IL-4} derivados de monocitos de sangre suplementados con DHA	100
Figura 39. Análisis comparativo de oxilipinas por HPLC-MS/MS en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados a fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4}	102
Figura 40. Identificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en macrófagos J774.A1 polarizados en condiciones basales y estimulados con zym	104

Lista de tablas

Tabla I. Líneas celulares para el estudio de la biología y bioquímica de los macrófagos	15
Tabla II. Isoformas LOX humanas y ortólogos de ratón	27
Tabla III. Receptores de SPMs	37
Tabla IV. Oxilipinas en lisados más sobrenadantes de macrófagos primarios M _{IL-4}	101

Tabla de contenidos

Agradecimientos	iii
ista de abreviaciones	iv
Resumen	v
Abstract	vi
_ista de figuras	vii
_ista de tablas	xi
Tabla de contenidos	xii
Prefacio	1
NTRODUCCIÓN	2
1. Inflamación	2
1.1. Evolución del concepto	2
1.2. Componentes de las vías inflamatorias	4
1.2.1. Estímulos Inflamatorios	4
1.2.2. Sensores	5
1.2.3. Mediadores o señales inflamatorias	5
1.2.4. Células y tejidos blanco	6
1.3. Respuesta inflamatoria aguda: fase inicial y resolución	8
1.4. Regulación de la inflamación	10
2. Macrófagos	12
2.1. Funciones	12
2.2. Ontogenia y plasticidad fenotípica	12
2.3. Modelos de estudio	13
2.3.1. Principales modelos celulares para el estudio de la inflamación	14
2.3.2. Polarización y denominación de fenotipos en cultivo	15
2.3.3. Identificación de fenotipos	16
3. Oxilipinas	18
3.1. Definiciones y clasificación	18
3.1.1. Lípidos bioactivos	18
3.1.2. Modificaciones oxidativas de lípidos: oxilipinas y oxofosfolípidos	20
3.1.4. Clasificación de oxilipinas	22
3.2. Metabolismo	23
3.2.1. Fosfolipasas y Ciclo de Lands	23
3.2.2. Vías enzimáticas	23
3.2.3. COX	23
3.2.4. LOX	25
3.2.5. CYP	29
3.2.6. Biosíntesis de SPMs	30
3.2.7. Vías no enzimáticas	32
3.2.8. Catabolismo y excreción	36
3.3. Receptores	36
3.4. Funciones	37
3.4.1. Prostanoides	37
3.4.2. Leucotrienos	37
3.4.3. Monohidroxilados del AA: HETEs	38

3.4.4. Monohidroxilados de LA: HODEs	. 38
3.3.5. Monohidroxilados del DHA y EPA: HDHAs e HEPEs	. 38
3.3.6. SPMs del AA, DHA y EPA	. 38
3.3.7. Isoprostanoides	38
3.4. Métodos de estudio de las vías de síntesis de oxilipinas	. 38
3.5. Farmacología de las vías de síntesis de oxilipinas y otras vías inflamatorias	39
4. Antecedentes del trabajo	. 40
4.1. Expresión de LOX, COX y FLAP en fenotipos de macrófagos humanos	40
4.2. Compartimentación de la maquinaria de síntesis de oxilipinas	.41
4.3. Perfil de oxilipinas de fenotipos macrofágicos	43
4.3. Modelos de estudio de las LOX de macrófagos	. 43
OBJETIVOS	. 45
1. Objetivo general	45
2. Objetivos específicos	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46
1. Cultivo celular	. 46
1.1. Obtención y cultivo de monocitos primarios de sangre	. 46
1.2. Cultivo de monocitos THP-1	.47
1.3. Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos	.47
1.4. Cultivo de macrófagos murinos J774.A1	.47
1.5. Inducción de fenotipos de macrófagos	. 48
1.6. Suplementación con PUFAs	. 48
1.7. Estímulo inflamatorio con zym	49
2. Caracterización fenotípica de los macrófagos	49
2.1. Análisis de adherencia y morfología	49
2.2. Estudio de expresión de moléculas de superficie	50
2.3. Determinación del perfil de citoquinas	52
3. Determinación de expresión proteica	. 52
4. Análisis de la localización subcelular de proteínas	53
5. Identificación y cuantificación de oxilipinas	. 54
5.1. Recolección de muestras	. 54
5.2. Preparación de las muestras	. 54
5.3. Análisis de oxilipinas	55
5.4. Procesamiento de datos	. 56
6. Análisis estadístico	. 57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	. 58
1. Caracterización de los fenotipos de macrófagos humanos	. 58
1.1. Rendimiento de la purificación de monocitos de sangre	. 58
1.2. Morfología celular y adherencia	58
1.3. Expresión de moléculas de superficie	. 64
1.4. Secreción de citoquinas	74
2. Expresión de isoformas LOX y proteínas asociadas	75
3. Análisis preliminar de la localización subcelular de 5-LOX y 15-LOX1	. 80
4. Identificación y cuantificación de oxilipinas producidas por los fenotipos macrofágicos	83
4.1. Identificación de oxilipinas en sobrenadantes en condiciones basales	83

4.2. Evaluación del efecto del estímulo inflamatorio con zymosan	9
4.3. Comparación de oxilipinas liberadas a los sobrenadantes e intracelulares	5
4.4. Búsqueda de SPMs en macrófagos suplementados con PUFA precursores9	6
4.5. Comparación del perfil de oxilipinas de los fenotipos macrofágicos 10	1
4.6. Análisis de oxilipinas en macrófagos J774.A110	4
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	6
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS10	8
APÉNDICES11	6
Apéndice 1. Método de análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS11	6
1.1. Listado de oxilipinas analizadas 11	6
1.2. Separación cromatográfica de las oxilipinas analizadas11	8
1.3. Parámetros de ESI- MS/MS utilizados para el análisis por MRM11	9
1.4. Curvas de calibración12	:1
1.5. Límites de detección y cuantificación12	3
1.6. Detección de estándares de oxilipinas en medio de cultivo	24
Apéndice 2. Anticuerpos y otras tinciones empleadas en inmunoensayos12	25
2.1. Anticuerpos conjugados utilizados para Citometría de Flujo12	25
2.2. Anticuerpos primarios utilizados para Western BlotBlot	:5
2.3. Anticuerpos y otras tinciones utilizados para Inmunofluorescencia por Microscopía Confocal12	25
Apéndice 3. Controles del estudio de marcadores de superficie por Citometría de Flujo12	26
3.1 Macrófagos primarios12	26
3.2 Macrófagos THP-112	27
Apéndice 4. Réplicas de Western Blot 12	28
4.1. Réplicas de Western Blot anti-5-LOX12	.8
4.3. Réplicas de Western Blot anti-FLAP12	29
4.4. Réplicas de Western Blot anti-15-LOX113	0
4.5. Réplicas de Western Blot anti-15-LOX213	51
4.6. Western Blot anti-12-LOX13	51
4.7. Réplicas de Western Blot anti-COX213	2
Apéndice 5. Factores de normalización de análisis cuantitativo de MS13	3

Prefacio

La inflamación es un fenómeno biológico universal, cuya importancia en el proceso saludenfermedad resulta cada vez más evidente. Ahondar en la comprensión de sus bases fisiológicas y patológicas reviste, por tanto, una gran importancia.

Una amplia variedad de moléculas lipídicas conocidas como lípidos bioactivos han emergido como reguladores de múltiples procesos celulares. Dentro de estos, las oxilipinas, producto de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, tienen un rol central en la inflamación y en procesos homeostáticos y se encuentran implicados en múltiples patologías. Así, los lípidos, antes conocidos por sus funciones estructurales y energéticas y relegados en el mundo de la señalización celular, han capturado la atención de múltiples grupos de investigación e impulsado el desarrollo de áreas como la lipidómica.

Algunos de los mecanismos de regulación de la producción y reconocimiento de estos mediadores lipídicos inflamatorios, han sido develados. Nuestro grupo se ha dedicado a estudiar la bioquímica oxidativa de los lípidos bioactivos de la inflamación y las enzimas que los sintetizan. Esta tesis se enmarca dentro de una línea de trabajo que busca contribuir a la comprensión de los mecanismos involucrados en la resolución activa del proceso inflamatorio por los macrófagos humanos. Por un lado, constituye el trabajo de puesta a punto de modelos celulares para el estudio de las lipoxigenasas y sus productos en la modulación de la inflamación. Por otro lado, contribuye a la discusión vigente en el área de resolución de la inflamación sobre la detección *in vitro* y la relevancia fisiológica de los mediadores lipídicos prorresolutivos producidos por los leucocitos.

Se hará una introducción al estado del arte de la inflamación, al conocimiento sobre los macrófagos (actores celulares en los que se enfoca el trabajo), a las oxilipinas y a las lipoxigenasas responsables de su síntesis. Todos estos temas están estrechamente interconectados y son objeto de una vasta bibliografía. Si bien su división puede resultar algo artificial, persigue el fin de dar un marco teórico ordenado para luego hacer énfasis en los antecedentes concretos del trabajo de tesis. Las secciones "Materiales y métodos" y "Resultados y discusión" están estructuradas de igual forma: comienzan por la caracterización de los modelos de macrófagos, continúan con el estudio de la expresión y localización de las lipoxigenasas, y cierran con el análisis de oxilipinas. El capítulo final pretende integrar y sintetizar la discusión de los diferentes apartados y plantea las perspectivas que surgen de esta tesis.

INTRODUCCIÓN

1. Inflamación

1.1. Evolución del concepto

La inflamación es un fenómeno conocido por la humanidad desde tiempos ancestrales cuyo concepto ha ido evolucionando y se encuentra hasta el día de hoy en revisión. La primera descripción científica de la inflamación data del siglo I DC cuando Celsus definió los cuatro signos cardinales, rubor, edema, calor y dolor, asociados a procesos infecciosos y heridas. Un quinto signo cardinal, la alteración de la funcionalidad, fue aportado en el siglo XIX por Virchow, quien además vislumbró las bases patogénicas detrás de dicha manifestación clínica. Evidenció cambios vasculares como la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad y la migración leucocitaria desde los vasos sanguíneos a los tejidos inflamados¹. A finales del siglo XIX Metchnikoff identificó a los fagocitos como actores celulares clave en la eliminación de patógenos. Propuso que los cambios vasculares de la inflamación no era un accidente de la biología, sino que eran inducidos para reclutar a los fagocitos al sitio de infección ² y se refirió al proceso como "inflamación fisiológica" ¹.

Durante el siglo XX, múltiples mecanismos de la respuesta inflamatoria aguda a infecciones y daño fueron descifrados ³. Con el avance de la Inmunología, la inflamación se estableció como el principal mecanismo de la rama innata del sistema inmune. Inmunidad innata es el nombre que se ha dado a la primera línea de defensa frente a las infecciones y el daño tisular, desarrollada tempranamente en la evolución por los organismos multicelulares. Se caracteriza por ser inmediata, estereotipada y por su incapacidad de "aprender" de las exposiciones para mejorar la respuesta frente a nuevos eventos, a contraposición de la especificidad y memoria inmunológica de la evolutivamente más cercana rama adaptativa del sistema. La inflamación en el contexto de la inmunidad innata, se concibe como una reacción tisular que aporta rápidamente los mediadores de la defensa del huésped a la zona de la infección y/o daño tisular para eliminar el patógeno y/o el tejido dañado que desencadenó la reacción ⁴.

Si bien la inflamación así descrita persigue el objetivo de eliminar un agente potencial o efectivamente dañino, en la medicina occidental ha prevalecido la idea de la inflamación como un signo de enfermedad y un fenómeno deletéreo para la salud ⁵. En favor de ello, se ha establecido que tiene un papel central en la patogenia de un número creciente de las más diversas enfermedades. Una respuesta inflamatoria exacerbada, es responsable de daño en enfermedades alérgicas y de complicaciones de infecciones agudas como en la clásica tormenta de citoquinas ⁶. La inflamación juega un rol en múltiples desórdenes inmunológicos como el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis y otras patologías autoinmunes 7. Estas condiciones de inflamación desencadenada por factores no infecciosos se conoce como inflamación estéril y han cobrado relevancia en los últimos años. Se ha establecido que reacciones inflamatorias estériles sostenidas de baja intensidad conducen a un estado patológico conocido como inflamación sistémica crónica a bajo grado asociado a múltiples enfermedades crónicas. Hay fuerte evidencia de su participación en el desarrollo y progresión de la diabetes tipo 2, el sindrome metabólico y la enfermedad cardiovascular⁸. Se ha asociado además con un riesgo incrementado de diversas enfermedades no transmisibles como la esteatosis hepática no alcohólica, la hipertensión, la enfermedad renal crónica, varios tipos de cáncer, la depresión, la disfunción cognitiva y patologías neurodegenerativas como el Alzheimer ^{7–9}. En contextos específicos la inflamación crónica ha cobrado un rol tan importante, que ha dado lugar a la incorporación de términos como inflammaging para el estado inflamatorio asociado al envejecimiento ¹⁰ y metainflammation para el vinculado a la obesidad y el sindrome metabólico⁸.

Por otro lado, en las últimas décadas se ha demostrado que los componentes de las vías inflamatorias están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos, como el metabolismo celular, la remodelación tisular, la termogénesis, la regulación del eje hipotálamo-hipofisario y la comunicación entre distintos órganos y sistemas, en ausencia de un estímulo infeccioso o daño manifiesto. La inducción de la inflamación por factores como la inanición, hipoxia, hipotermia o hipertermia, desencadena mecanismos de defensa metabólicos, fisiológicos y comportamentales dirigidos a evitar el daño tisular ¹¹. Esta evidencia condujo a la idea de que la inflamación tiene un rol en continuamente sensar las perturbaciones homeostáticas y producir señales para mantener la homeostasis del organismo, comportándose como un buffer (amortiguador) multiorgánico 9. A dichos efectos, la homeostasis se concibe como el mantenimiento de determinadas características cuantitativas del sistema, variables reguladas, dentro de un rango óptimo. Un circuito homeostático está compuesto por estímulos, sensores, señales y efectores, elementos que como se describe más adelante, se identifican claramente en las vías inflamatorias². Se ha propuesto que la inflamación integra una red homeostática de control y restauración tisular a través de la cual el sistema inmune interactúa con los dos otros sistemas mayores de comunicación entre órganos y tejidos, los sistemas endócrino y nervioso ¹⁰.

Es necesario entonces, conectar el concepto de la inflamación como reguladora de la homeostasis con la evidencia de su participación en condiciones donde hay una clara desregulación de la homeostasis local y/o sistémica. En principio, inflamación y homeostasis podrían parecer estados totalmente contrapuestos y, de hecho, por mucho tiempo se definió homeostasis como la ausencia de inflamación². En el proceso de restaurar la homeostasis, la respuesta inflamatoria conduce a una disrupción temporal de la misma. Por ejemplo, durante una infección, la inflamación induce cambios a nivel local y sistémico metabólicos, neuroendocrinos y comportamentales dirigidos a conservar la energía y dirigir los nutrientes a la activación del sistema inmune⁸. Precisamente, la inflamación tiene un orden de prioridad superior respecto al de muchas funciones homeostáticas porque el beneficio del desarrollo de la respuesta inflamatoria, en general, supera los costos de una alteración transitoria de la homeostasis. Esta propiedad acarrea una vulnerabilidad para el desarrollo de patologías por disrupción de la homeostasis con respuestas inflamatorias exacerbadas o que se perpetúan conduciendo a la inflamación crónica². En la inflamación sistémica crónica a bajo ruido asociada a patologías crónicas no transmisibles, se atribuye esta disrupción a inductores vinculados al estilo de vida occidental de las sociedades industrializadas ausentes durante la mayor parte de la historia evolutiva de la especie⁸.

Otra función relevante a mencionar de la inflamación, es la de comunicar la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa, integrando así las acciones del sistema inmune ⁴. Por largo tiempo se consideró que la memoria inmunológica era exclusivamente generada por las células de la inmunidad adaptativa por el proceso de recombinación génica de los linfocitos. En los últimos años, se descubrió que las células de la inmunidad innata también poseen la capacidad de adaptar su respuesta a nuevos estímulos mediante una modalidad de memoria que se ha dado a conocer como "inmunidad entrenada" ^{10,12}. Este descubrimiento implica que las características de una respuesta inflamatoria dejan una impronta a forma de modificaciones epigenéticas en las células innatas, que facilitan la recurrencia o persistencia de la inflamación en el huésped e incluso en su descendencia. La reprogramación funcional de las células innatas a largo plazo es evocada por estímulos. Si bien esta inmunidad ha evolucionado para proteger el organismo frente a la infección, también tiene implicancias patológicas ¹². Cómo la inflamación

las patologías asociadas a inflamación sistémica crónica a bajo ruido, es un área aún en estudio.

La vastedad de funciones de la inflamación descritas demuestran que es un fenómeno crucial para la fisiología humana y explican lo desafiante que resulta encontrar una definición que englobe la diversidad de reacciones inflamatorias sin resultar demasiado vaga. A la luz de los conocimientos actuales, la inflamación puede entenderse como una respuesta a una perturbación, como un proceso para eliminar la fuente de dicha perturbación y/o como un estado alterado del sistema ya sea protector o patológico ¹¹. Medzhitov propone englobar estas tres acepciones definiendo la inflamación como un amplio espectro de respuestas dependientes del contexto. En un extremo se encuentra la respuesta inflamatoria aguda a infecciones históricamente conocida, en el extremo opuesto los procesos inflamatorios que regulan basalmente la homeostasis y entre ambos un continuo gradual de respuestas inflamatorias de intensidad variable y características particulares ¹¹. En ese rango intermedio, más o menos alejada de la situación basal, se posiciona la inflamación sistémica crónica a bajo grado, que justamente ha sido denominada por algunos autores como para-inflamación por ser un estado cercano a la inflamación clásicamente descrita ¹³. Las reacciones inflamatorias convergen en el hecho de que son desencadenadas por condiciones de disrupción de la homeostasis y operan mediante una serie de componentes comunes para restaurar dicha homeostasis². En el siguiente apartado se describen estos componentes comunes.

1.2. Componentes de las vías inflamatorias

Como se mencionó anteriormente, las vías inflamatorias presentan una organización general análoga a la de otros circuitos homeostáticos, con cuatro componentes universales: i) inductores o estímulos que inician la respuesta; ii) células sensoras que monitorean y reconocen los estímulos; iii) señales o mediadores inflamatorios generados por estas células; iv) tejidos blancos de las señales a nivel local y sistémico (**Figura 1**)^{2,11}.

1.2.1. Estímulos Inflamatorios

Los inductores o estímulos pueden ser tanto exógenos como endógenos. Los inductores exógenos de origen microbiano se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés). Son un grupo limitado definido de patrones moleculares conservados y en su mayoría esenciales, compartidos por clases de microorganismos (bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, hongos, clases de virus). Son estructuras no presentes en el hospedero y expresadas por microorganismos tanto patógenos como comensales. Incluyen ácidos nucleicos como ARNs doble cadena presente en algunos virus, proteínas bacterianas con aminoácidos modificados como la N-formilmetionina o el péptido N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLF), glicoproteínas bacterianas con residuos manosa terminales, algunos lípidos y glúcidos complejos como el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas, el ácido lipoteicoico (LPA) de las gram positivas y betaglucanos de levaduras, entre otros ⁴. Además, hay estímulos exógenos no microbianos que incluyen alérgenos, irritantes, cuerpos extraños y algunos compuestos tóxicos ¹³. Los estímulos endógenos son señales de estrés celular, daño o disfunción tisular. El daño tisular puede ser mecánico (como en el trauma), guímico o biológicamente inducido, este último sería el caso del daño inducido por infecciones ¹³. Las señales de daño celular se conocen como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés) y consisten fundamentalmente en moléculas intracelulares que se liberan al medio extracelular con la lisis celular. Un ejemplo son las proteínas de choque térmico, chaperonas normalmente intracelulares que son inducidas en respuesta al estrés celular. En algunas situaciones las células inmunes activadas liberan DAMPs conocidas como alarminas para potenciar la respuesta a la infección o daño ⁴. En la inflamación sistémica crónica a bajo grado, hay una amplia variedad de inductores posibles aún poco caracterizados que traducen estrés o disfunción celular ¹³. Se ha acuñado el término exposoma para referirse al conjunto de estímulos químicos, físicos y biológicos a los que ha estado expuesto un organismo a lo largo de la vida intra y extrauterina ⁸.

Los estímulos del circuito inflamatorio pueden actuar de manera retrospectiva en relación al daño tisular. Por ejemplo, una infección genera un daño y las DAMPs pueden actuar como inductor retrospectivo. También hay inductores prospectivos, que activan la respuesta antes de que se genere el daño, para lo cual se requiere que el inductor sea parte del ambiente natural en la historia evolutiva del organismo. En la respuesta a infecciones son inductores prospectivos los PAMPs. En la respuesta inflamatoria que regula los diversos procesos homeostáticos mayores, metabolitos y moléculas que traducen inanición, deshidratación, hipoxia o hipotermia pueden actuar como inductores prospectivos que se anticipan a un potencial daño por estas condiciones ¹¹.

1.2.2. Sensores

Los sensores son células centinelas como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos y células epiteliales, que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) a los que se unen diferentes PAMPs y DAMPs. Los PRRs se agrupan en varias familias de las cuales la más conocida son los receptores tipo toll (TLRs por sus siglas en inglés), glicoproteínas de membrana muy conservadas de las que existen 9 isoformas humanas. Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en las membranas plasmáticas. El LPS y el LPA bacterianos se unen a TLR4 y TLR2 respectivamente⁴, mientras que el betaglucano de levadura zymosan es un ligando TLR2¹⁴. Los TLRs 3, 7, 8 y 9 se encuentran en el retículo endoplasmático y membranas de los endosomas, donde reconocen ácidos nucleicos virales y bacterianos. Además de los TLRs, son PRRs de superficie los receptores de lectina tipo C que identifican residuos manosa, dentro de los cuales el más estudiado es el CD206 de macrófagos ⁴. Completan el repertorio de PRRs de membrana los receptores scavenger o barrenderos y los receptores de péptidos bacterianos con residuos de N-formilmetionina. Los PRRs citosólicos finalmente, incluyen la familia de receptores tipo dominio de oligomerización y unión a nucleótidos (tipo NOD, NLRs por sus siglas en inglés) responsables de la formación del inflamasoma, receptores tipo gen inducible por ácido retinoico (tipo RIG, RLRs por sus siglas en inglés) que detectan ARN viral, y receptores de ADN viral y bacteriano ⁴ (Figura 1).

El reconocimiento del estímulo por los sensores de las células innatas activa vías de transducción de señales que desencadenan la producción de mediadores inflamatorios y promueven las demás funciones inflamatorias de la célula ¹¹.

1.2.3. Mediadores o señales inflamatorias

Los mediadores o señales inflamatorias se pueden clasificar en los siguientes grupos: aminas vasoactivas (histamina, péptidos vasoactivos), fragmentos de componentes del complemento, citoquinas (CQ), enzimas proteolíticas y mediadores lipídicos ¹³. Las características y propiedades de los lípidos señalizadores de la inflamación, de especial interés para esta tesis, se profundizarán en el apartado 3 de esta sección. Dentro de los mediadores proteicos, merecen especial atención las CQ, que son polipéptidos, proteínas y glicoproteínas de bajo peso molecular, de estructura y función diversas, secretadas por las células inmunes. Las CQ son mensajeros de comunicación intercelular que ejercen acciones autócrinas, parácrinas y endócrinas al ser reconocidas por receptores transmembrana en sus células blanco, razones por las cuales han sido incluídas como hormonas de clase II ¹⁵. La nomenclatura de las CQ es inconsistente, algunas se denominan con el término interleuquina (IL; referente a la comunicación entre leucocitos) seguido de un número, mientras que otras se nombran por alguna de sus actividades biológicas ⁴. Las funciones biológicas de las CQ incluyen: a) la defensa antiviral (interferones), b) la comunicación entre leucocitos para regular la inmunidad (IL-1 a IL-38); c) la migración y reclutamiento celular (quimioquinas); d) la regulación del

crecimiento y desarrollo de determinados tipos celulares (por ejemplo, los factores estimuladores de colonias de monocitos y de granulocitos- monocitos, M-CSF y GM-CSF también conocidas como CSF-1 y CSF-2), de tejidos específicos o del desarrollo tisular global (por ejemplo los factores de crecimiento tumoral TNF- α y β); e) otras funciones como el metabolismo y balance iónico ¹⁶. Un ejemplo icónico de CQ proinflamatoria es la IL-1 β , producida principalmente por macrófagos activados por membranas bacterianas, zymosan, GM-CSF, mediadores lipídicos proinflamatorios como los leucotrienos e IL-1 β en sí misma, con efectos locales y sistémicos. La IL-1 α es una CQ proinflamatoria emparentada que ejerce funciones a nivel local ¹⁷.

Distintos receptores en las células sensoras dan lugar a la producción de diferentes mediadores inflamatorios. La unión de ligandos a los TLRs dimeriza los dominios citoplasmáticos conocidos como TIR (tipo receptor Toll/ IL-1) lo cual induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan quinasas que a su vez activan diferentes factores de transcripción. Los principales son el factor de transcripción nuclear (NF-KB), la proteína activadora 1 y los factores de respuesta a interferón (IRFs). Distintas combinaciones de adaptadores e intermediarios de las vías le atribuyen efectos únicos y efectos compartidos a la señalización por diferentes TLRs. Los IRFs promueven la producción de interferones de tipo I como el interferón-y (IFN-y), importantes para la respuesta antiviral⁴. La familia de factores de transcripción nuclear kappa B (NF-kB) tiene un rol central en la respuesta inflamatoria. Basalmente los dímeros de NF-KB se encuentran en el citoplasma inactivados por unión a la quinasa IkB. En respuesta a la señalización de PRRs de membrana y citosólicos, IkB es fosforilada y degradada, NF-kB es liberado y migra al núcleo donde regula la transcripción de genes proinflamatorios como IL-1, TNF y quimioquinas 7. Por otro lado, los NLRPs responden a la unión de ligandos formando un complejo conocido como inflamasoma que genera la forma activa de las citoquinas IL-1 e IL-18. Los RLRs activan IRFs al igual que algunos TLRs ⁴.

1.2.4. Células y tejidos blanco

Se pueden diferenciar dos clases de blancos que expresan receptores para las señales inflamatorias (**Figura 1**). El primero son los blancos efectores, células inmunológicas, cuya acción tiende a eliminar el estímulo causante del daño para retornar a la homeostasis, es decir, ejerce una retroalimentación negativa o de resistencia en el circuito. El otro blanco, son células de órganos y tejidos no efectores que modifican su función para apoyar la acción del blanco efector, como una respuesta adaptativa a la perturbación que la desencadenó ¹¹. Por ejemplo, en una infección el TNF-a, la IL-1 y la IL-6 producidos por los macrófagos en el sitio de infección, tienen como blanco efector por acción paracrina a las células endoteliales, macrófagos y neutrófilos en los que activan la respuesta inflamatoria aguda para eliminar el patógeno. Además, de forma endocrina actúan a nivel de los hepatocitos induciendo la síntesis de proteínas conocidas como reactantes de fase aguda, y a nivel de las células endoteliales hipotalámicas estimulan la síntesis del mediador lipídico prostaglandina E2 (PGE2) que induce los cambios comportamentales en el huésped necesarios para adaptarse a la situación de defensa contra la infección ¹.

Los mecanismos de señalización de las señales inflamatorias en las células blanco implican vías de transducción de señales a nivel intracelular. La señalización intracelular de las CQ depende del tipo de receptor con el que actúan. Pueden activar vías rápidas, como la quimiotaxis, que involucran la movilización de iones e interacciones proteicas. Las vías lentas modifican la expresión génica y suelen involucrar la fosforilación de mensajeros intracelulares por quinasas de residuos de tirosina, serina y treonina, y el reclutamiento de proteínas adaptadoras que continúan la transducción de la señal. La activación de la transcripción está finalmente a cargo de factores de transcripción que se unen a promotores en los genes blanco.

Un grupo de receptores de CQ están acoplados a proteínas G, otro a moléculas con actividad tirosina o serina-treonina quinasa. Es el caso de las quinasas Janus (JAK) y el factor transductor de señales activadores de la transcripción (STAT) por el que señalizan muchos IFN-γ e IL como IL-6, de las proteínas SMAD por las que señaliza el TGF y de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Otra clase de receptores de CQ tiene actividad tirosina quinasa intrínseca y reclutan proteínas adaptadoras que activan factores nucleares como NF-κB ¹⁶. La unión de IL-1 a su receptor activa a NF-κB y factores de transcripción de genes proinflamatorios ¹⁷. Otra vía inflamatoria relevante es la fosfatidil-inositol-3-quinasa y la proteína quinasa B (PKB). Todas estás vías se encuentran estrechamente interconectadas ¹⁸. Los mediadores lipídicos inflamatorios actúan a nivel de distintos receptores de membrana que junto a sus vías de señalización, se mencionan en el apartado 4.



Figura 1. Componentes del circuito inflamatorio. Se esquematizan los elementos que constituyen el circuito inflamatorio: estímulos, células sensoras, mediadores o señales inflamatorias y blancos. Los estímulos y los receptores presentes en macrófagos se amplían en el recuadro de la derecha. CQ: citoquinas; PRR: Receptores de reconocimiento de patrones; TLR: Receptores tipo Toll; R: Receptor; RLR: Receptor tipo Rig; CDS: Sensores citosólicos de ADN; NLR: Receptores tipo Nod; ADN: Ácido desoxirribonucleico; ARN: Ácido ribonucleico. Esquema elaborado con *Biorender.com*, basado en ^{4,11}.

Es oportuno aclarar que, si bien las clasificaciones y divisiones de los componentes del circuito adoptadas resultan útiles para comprender el modo en que operan las vías inflamatorias, la realidad es mucho más compleja. Las vías de señalización activadas por PAMPs y DAMPs y las activadas por mediadores inflamatorios, como las CQ, tienen puntos de convergencia y señales intracelulares comunes que a su vez se regulan entre sí. Además, una misma célula puede ser al mismo tiempo sensora y blanco en un circuito. Por ejemplo, en una infección los macrófagos pueden sensar la presencia de PAMPs por sus TLR y liberar señales inflamatorias que actúan de forma autocrina o paracrina sobre la misma célula o sobre otros macrófagos que amplifican señales y ejercen funciones efectoras ^{4,18}. Algunas propiedades de las vías inflamatorias también complejizan su análisis. Las señales inflamatorias son pleiotrópicas ya que las células blanco de diferentes tejidos y dentro de un mismo tejido expresan diferentes receptores que determinan un amplio repertorio de efectos posibles tras el reconocimiento de la señal. Otra propiedad de las vías inflamatorias es la redundancia de señales, diferentes mediadores pueden inducir un mismo efecto a nivel de una célula blanco. A su vez, dos o más

mediadores inflamatorios actuando en un mismo blanco pueden tener acciones sinérgicas y/o antagónicas de cuyo balance resulta un efecto particular dependiente del contexto ^{9,16}.

1.3. Respuesta inflamatoria aguda: fase inicial y resolución

Presentados los componentes del circuito, se pasa a describir la secuencia de eventos de la respuesta inflamatoria aguda a infecciones y daño (**Figura 2**), a la que se hizo una aproximación en los apartados anteriores. El curso temporal que tiene lugar en este extremo del espectro de reacciones inflamatorias, es de utilidad para ilustrar cómo se integran los componentes del circuito y para introducir los mecanismos de regulación del mismo.

Cuando un microorganismo ingresa a un tejido en el que no se encuentra normalmente, los PAMPs son reconocidos por los PRRs de macrófagos residentes, células epiteliales y otras células sensoras. Se activan vías de transducción de señales intracelulares que determinan la producción de mediadores lipídicos como el leucotrieno B4 (LTB4) y la prostaglandina E2 (PGE2) y quimioquinas proinflamatorias. La PGE2 induce la vasodilatación necesaria para aumentar el flujo sanguíneo en el tejido y la permeabilidad vascular. Junto con algunos elementos del complemento y componentes bacterianos como péptidos con N-formilmetionina, el LTB4 y las guimioguinas tienen un efecto guimioatrayente sobre los neutrófilos circulantes ^{19,20}. El gradiente de CQ determina la dirección de la migración celular hacia el sitio de infección o daño. A nivel de los capilares venosos, los neutrófilos atraviesan el endotelio a través de una secuencia de interacciones con las células endoteliales que es orguestada por la expresión secuencial de moléculas de adhesión celular y sus ligandos en la superficie de los leucocitos y las células endoteliales. Primero se da una unión de baja afinidad dependiente de selectinas que permite el rodamiento de los leucocitos por la superficie capilar. Las E-selectinas son receptores de carbohidratos expresados por el endotelio en respuesta a CQ producidas por los macrófagos residentes del tejido, en respuesta al LPS y otras moléculas microbianas. Los ligandos de E-selectinas son diferentes glicoproteínas expresadas por granulocitos y monocitos. Las L-Selectinas en cambio son expresadas por leucocitos y se unen a sialomucinas expresadas por el endotelio en respuesta a señales proinflamatorias. En segundo lugar, se da una interacción de mayor afinidad entre integrinas leucocitarias y ligandos endoteliales. Las integrinas aumentan su afinidad en respuesta a la unión de quimioquinas a receptores de membrana, y esto permite luego el pasaje de los neutrófilos hacia el tejido. El reclutamiento selectivo de neutrófilos se debe a que los macrófagos tisulares inducen primero la síntesis de la quimioquina CXCL8 reconocida por neutrófilos⁴. Una vez en el tejido, los neutrófilos ejercen sus funciones efectoras a través de la liberación de sus gránulos, la fagocitosis de patógenos y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, y liberan CQ proinflamatorias que activan otras células inmunes²¹. En una segunda etapa, se reclutan monocitos sanguíneos por el mismo mecanismo dependiente de quimioatrayentes y moléculas de adhesión celular específicas en los monocitos y células endoteliales. Las CQ presentes en el tejido, en especial los factores de crecimiento, inducen la diferenciación de los monocitos a macrófagos ⁴. Las funciones de los macrófagos residentes y derivados de monocitos de sangre en la eliminación de patógenos se detallan en el apartado 2.

Clásicamente se pensaba que la respuesta inflamatoria culmina por la mera dilución de las señales inflamatorias una vez que el estímulo cesaba. Hace algunas décadas el descubrimiento de mediadores que dirigían activamente la resolución de la inflamación condujo a un cambio de paradigma ⁷. A nivel molecular, la resolución de la inflamación requiere del catabolismo y antagonización de las señales proinflamatorias. A nivel celular, el número de células inflamatorias debe reducirse. A nivel tisular, la integridad estructural debe restaurarse ²². Tres procesos simultáneos son clave para lograr los cambios a todos estos niveles: el cese del reclutamiento de neutrófilos circulantes, la apoptosis y remoción de los neutrófilos ya reclutados

y la reprogramación de los macrófagos. El cese del reclutamiento de neutrófilos requiere de una reducción de los quimioatrayentes incluyendo quimioquinas y mediadores lipídicos proinflamatorios²². La remoción de los neutrófilos es necesaria porque son células de diferenciación terminal, corta vida media y de rápido recambio, por lo que su migración desde la médula ósea a los tejidos inflamados es generalmente unidireccional ²³. Recientemente se ha descrito que los neutrófilos pueden retornar a la circulación mediante un proceso de migración transendotelial reversa ²¹. De todas formas, en la mayoría de los casos los neutrófilos del tejido inflamado inician diferentes mecanismos de muerte celular que resultan claves para la cinética de la resolución²³. La muerte celular programada, apoptosis, puede ser inducida por los patógenos directamente²³, por ligandos expresados por macrófagos y por citoquinas como TGF-β²². Mientras que la apoptosis es controlada, otras formas proinflamatorias de muerte celular como la necroptosis, piroptosis, NETosis implican la lisis de la membrana con lo que se liberan gránulos y DAMPs que van en detrimento de la resolución ²³. Una vez que los neutrófilos expresan sus señales apoptóticas, los macrófagos se encargan de eliminarlos mediante un proceso similar a la fagocitosis de patógenos conocido como eferocitosis que es considerado un hito de la resolución²². El tercer proceso necesario para la resolución, el cambio en la función de los macrófagos, se desencadena por mecanismos extrínsecos e intrínsecos que incluyen una reprogramación del metabolismo energético ²². El fenotipo adquirido por los macrófagos en la fase resolutiva se caracteriza por liberar señales prorresolutivas que permiten la reparación del tejido y restauración de la homeostasis ²⁰.

En síntesis, la reacción inflamatoria aguda elimina el patógeno o estímulo causante pero esto no es suficiente para controlar la respuesta sino que hay una fase de resolución activa. La inflamación no resuelta (en inglés *nonresolving inflammation*) se puede generar cuando un estímulo es recurrente, por una respuesta excesiva o alterada inicial o por la emergencia de estímulos secundarios luego de la eliminación del patógeno ^{10,11}. Fallos en la resolución pueden conducir a inflamación crónica, daño tisular excesivo o una reparación inadecuada con alteraciones estructurales como fibrosis ⁷ que se asocian a las patologías mencionadas en el apartado 1.



Disrupción de la homeostasis

Retorno a la homeostasis

Figura 2. Secuencia de eventos de la respuesta inflamatoria aguda. La homeostasis sufre una disrupción por un patógeno o daño tisular estéril. Las células sensoras detectan los estímulos y liberan mediadores proinflamatorios activando la respuesta vascular. La quimioquinas y el LTB4 funcionan como quimioatrayentes para reclutar neutrófilos que migran a través del endotelio al tejido y ejercen su función efectora. En una segunda fase se reclutan monocitos que adoptan un perfil resolutivo secretando mediadores lipídicos prorresolutivos y removiendo neutrófilos por eferocitosis, para retornar a la homeostasis. Los fallos en esta etapa de resolución pueden conducir a inflamación exacerbada y/o inflamación crónica. LTs: Leucotrienos; PGs: prostaglandinas. Modificado de ²⁰.

1.4. Regulación de la inflamación

Como se mencionó anteriormente, en ausencia de reguladores negativos, la respuesta inflamatoria es patológica para el hospedero, razón por la cual está finamente regulada. Los mecanismos de control de la magnitud y duración de la respuesta han sido estudiados, con foco en las señales inflamatorias y la actividad de las células efectoras ¹¹.

De acuerdo a su efecto, los mediadores que regulan la inflamación han sido clasificados en antiinflamatorios y prorresolutivos o contrainflamatorios (en inglés *counterinflammatory*). Ya se presentaron los mediadores proinflamatorios encargados de activar la respuesta inflamatoria. Los mediadores que antagonizan o bloquean una señal proinflamatoria (por ejemplo, el reclutamiento de polimorfonucleares) se conocen como antiinflamatorias, mientras que los que estimulan un evento resolutivo (por ejemplo, la apoptosis de los neutrófilos) o de reparación son consideradas mediadores prorresolutivos o mediadores contrainflamatoria ^{7,11}. Los mediadores antiinflamatorios son expresados como una función de la magnitud de la respuesta que regulan mientras que los contrainflamatorios se producen en función de una consecuencia de la respuesta (por ejemplo, la eliminación del patógeno) ya que activar la resolución antes de eliminar el patógeno conlleva a un ciclo fútil ¹¹. Sin embargo, se ha identificado que apenas inicia la respuesta inflamatoria programas coordinados de resolución son inducidos para la biosíntesis de los mediadores necesarios en la fase de resolución ²⁴.

Los mediadores antiinflamatorios más conocidos son CQ como IL-4, IL-10 y TGF-β. La IL-4, producida por mastocitos y células T de fenotipo Th2, actúa sobre los macrófagos suprimiendo la secreción de CQ proinflamatorias. Además, la IL-4 antagoniza la actividad de IL-1 induciendo el receptor de IL-1 tipo 2 que rápidamente internaliza IL-1 y la elimina de la circulación. Otra CQ antiinflamatoria es la IL-10, producida principalmente por linfocitos Th2 pero también por

algunos macrófagos. Su reconocimiento por los macrófagos reduce la secreción de quimioquinas y de las CQ proinflamatorias IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α ¹⁷. Los corticoides endógenos son también señales antiinflamatorias, producidas por el sistema endócrino, que controlan la magnitud de las respuestas¹¹.

Algunas señales antiinflamatorias operan por retroalimentación negativa. Por ejemplo, las vías JAK-STAT inducen la expresión de proteínas supresoras de la señalización de CQ (SOCS) que inhiben la actividad de las JAK quinasas reduciendo la señalización por los receptores que las activaron ¹⁷. El metabolismo energético de las células inmunes activadas también ejerce una retroalimentación negativa. Por ejemplo, en los macrófagos expuestos a ligandos TLR4 se acumula el metabolito antiinflamatorio itaconato derivado de los intermediarios que aumentan su concentración por enlentecimiento del ciclo de Krebs. El itaconato inhibe la succinato deshidrogenasa, lo que aumenta la concentración de succinato y disminuye la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que entre otras consecuencias desestabiliza a HIF y suprime la transcripción de IL-1β. Fuera de la mitocondria, inhibe la glucólisis a diferentes niveles, inhibe el inflamasoma y a nivel nuclear activa factores de transcripción antiinflamatorios como el factor nuclear eritroide similar al factor 2 (NRF2) ²⁵. Otro ejemplo de retroalimentación negativa es la observación de que la acidificación del pH consecuencia de la reacción inflamatoria aguda inhibe la respuesta transcripcional de macrofagos activada por LPS ²⁶.

En cuanto a los mediadores prorresolutivos, la visión actual de la naturaleza de la resolución de la inflamación está dominada por mediadores lipídicos prorresolutivos especializados (SPMs) sintetizados por macrófagos y neutrófilos, señalizadores en los que se profundiza más adelante. Sin embargo, es probable que al igual que la fase inicial de la respuesta inflamatoria, la inducción de la resolución esté orquestada por una red de mediadores proteicos y lipídicos²². Dentro de los mediadores proteicos conocidos se destacan la Anexina A1, la hormona adrenocorticotrópica y la acetilcolina y otros neuropéptidos. Además, se han incluído como mediadores de la resolución a gases como el H₂S y el CO y purinas como la adenosina ⁷. Algunas fuentes de señales contrainflamatorias probables son los linfocitos T reguladores que tienen un rol importante en la homeostasis tisular ¹¹.

Muchas de las vías activadas por los mediadores inflamatorios convergen en puntos comunes cuya regulación temporal en la respuesta inflamatoria es también clave para la resolución. Por ejemplo, en los macrófagos NF-κB que es una molécula central en la fase proinflamatoria, modula también la resolución. Esto es posible en parte por la expresión diferencial de subunidades del dímero funcional en el curso temporal de la respuesta inflamatoria. Así como los mediadores inflamatorios ejercen retroalimentación negativa, blancos como NF-κB también regulan su propia respuesta. NF-κB es un regulador negativo de la secreción de IL-1β y la activación del inflamasoma ⁷. Un punto de convergencia de vías antiinflamatorias de macrófagos es NRF2 que sensa el estrés oxidativo de la célula y su activación por moléculas electrofílicas induce la transcripción de genes antiinflamatorios ²⁵.

Otro grupo de inmunoreguladores cuyo efecto sobre la resolución de la inflamación está en estudio son los metabolitos producidos por la microbiota ¹⁰.

Hay que notar además, que para algunos mediadores se han descrito tanto funciones antiinflamatorias como prorresolutivas y en otros casos la clasificación en la bibliografía es discordante. Es probable que en el futuro sean descritas funciones prorresolutivas de mediadores antiinflamatorios conocidos y que en el mapa de señales inflamatorias se vayan dibujando funciones inmunorreguladoras solapadas. Los mecanismos de regulación de la inflamación son evidentemente complejos.

2. Macrófagos

2.1. Funciones

Ya se han introducido los macrófagos, leucocitos clave de las reacciones inflamatorias. A continuación se jerarquizan algunos aspectos de su biología.

La función más conocida de los macrófagos es la defensa frente a patógenos mediante la fagocitosis y otros procesos dirigidos a la eliminación de microbios. Se define fagocitosis a la captación de partículas de más de 0.5 µm a través de un envoltorio de membrana, similar a la endocitosis de ligandos solubles. Los macrófagos junto con monocitos, neutrófilos, células dendríticas, osteoclastos y eosinófilos han sido bautizados "fagocitos profesionales" por esta capacidad. Hay un espectro de mecanismos de captación dependientes del tamaño de la partícula, los receptores involucrados y la participación del citoesqueleto; fagocitosis se utiliza particularmente para referir a la captación de patógenos y tóxicos. En los macrófagos, el objetivo es eliminar el patógeno por lo que una vez internalizado el fagosoma se fusiona selectivamente con vesículas intracelulares y con lisosomas para formar fagolisosomas. Se da una acidificación progresiva que permite la acción de hidrolasas ácidas que degradan las macromoléculas²⁷. Los macrófagos expresan la enzima NADPH oxidasa fagocítica que reduce oxígeno molecular a anión radical superóxido en el interior de la vacuola fagocítica. Esta enzima se ensambla y activa por TLRs y otras señales. Además la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) produce el radical óxido nítrico. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno reaccionan entre sí, a la vez que oxidan y dañan macromoléculas del patógeno, con lo que contribuyen a su erradicación ²⁸.

Como se mencionó en el apartado 1, los macrófagos son además células sensoras del circuito inflamatorio, que en contexto de infección reconocen PAMPs y DAMPs y envían citoquinas, mediadores lipídicos inflamatorios y otras señales a las células endoteliales, otros leucocitos y blancos no efectores. De este modo no solo tienen funciones efectoras sino también señalizadoras, amplificando la respuesta inflamatoria a patógenos. Además, durante la respuesta a patógenos, los macrófagos actúan como células presentadoras de antígenos para las células T, conectando la inmunidad innata con la adaptativa ⁴.

Los macrófagos están involucrados en una amplia gama de procesos celulares más allá de la defensa inmunológica ²⁹. Como adelantaba Metchnikoff, los macrófagos son células cruciales para el mantenimiento de la homeostasis. Los macrófagos residentes en los tejidos juegan roles importantes en el estado estacionario. Funcionan como transductores de señales del microambiente para generar respuestas celulares y enviar señales con el fin de mantener la homeostasis. Participan del metabolismo del hierro, bilirrubina, calcio, metabolismo lipídico y de aminoácidos para mantener la homeostasis del organismo a nivel global. Además, los macrófagos residentes en cada tejido participan del desarrollo, la reparación y remodelación tisular a través de procesos como la angiogénesis y en algunos casos fibrosis. En cada tejido tienen funciones específicas que mantienen la integridad del mismo y se adaptan al contexto. Un mecanismo homeostático de los macrófagos es la eferocitosis, que como se mencionó anteriormente, consiste en la remoción de células muertas y *debris* (detritos celulares) por un proceso similar a la fagocitosis de patógenos ²⁹.

2.2. Ontogenia y plasticidad fenotípica

Los macrófagos son el único tipo celular presente en todos los órganos del organismo, incluso en tejidos avasculares ²⁹. Durante décadas se creyó que los macrófagos residentes en tejidos eran continuamente repoblados por monocitos sanguíneos circulantes derivados de progenitores de la médula ósea adulta. Este concepto se fundó con la definición jerárquica del sistema fagocítico mononuclear que posicionaba a los precursores monocíticos en la médula ósea, los monocitos en la sangre y los macrófagos en los tejidos ³⁰. Al día de hoy se concibe que los monocitos sanguíneos son efectivamente generados en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas multipotentes que dan lugar a precursores del linaje mieloide, aunque su grado de precompromiso (*pre-commitment*) hacia los sublinajes de monocitos, granulocitos y células dendríticas y su potencialidad, están en revisión ³¹. En la década de 2010 hubo un hallazgo revolucionario en el campo: la mayoría de los macrófagos residentes en tejidos tienen un origen embrionario y son mantenidos por señales de autorenovación locales. El recambio a partir de monocitos derivados de la médula ósea reclutados de la circulación se restringe a algunos tejidos específicos y es un contribuyente menor en condiciones basales con un rol más relevante durante la respuesta inflamatoria ³².

La identificación de diferentes orígenes condujo a replantear cuál es el determinante de la identidad o fenotipo de los macrófagos. Se propuso que los macrófagos derivados de monocitos circulantes en sangre son de naturaleza inflamatoria mientras que los residentes tienen un rol en restaurar la homeostasis ^{29,32}. En línea con esto, se ha visto que los macrófagos residentes presentan una plasticidad reducida producto de su larga estadía en el microambiente tisular³³. Sin embargo, todos los macrófagos pueden responder a varios estímulos y poseen la capacidad de cambiar su fenotipo en respuesta a cambios en el microambiente²⁹. Bleriot y col. concluyen en una revisión reciente, que el fenotipo de un macrófago es determinado por cuatro factores: la ontogenia, los factores locales presentes en cada nicho, las señales inflamatorias y el tiempo de residencia en el tejido ³⁴. Es decir, que tanto el origen como el contexto son determinantes de los fenotipos macrofágicos. En otra revisión reciente, Guilliams y Svedberg proponen, basados en hallazgos con macrófagos pulmonares, un modelo para explicar el flujo de poblaciones macrofágicas durante la inflamación. En el estado basal o estacionario (steady state), los macrófagos residentes tisulares mantienen la homeostasis. Ante la activación de la respuesta inflamatoria, los monocitos que se reclutan durante la inflamación se pueden diferenciar en macrófagos de corta vida media o en macrófagos residentes. Los macrófagos que permanecen en el tejido conservan una impronta inflamatoria a forma de memoria epigenética del evento inflamatorio que los reclutó 33.

Entre las señales que inciden en los fenotipos se encuentran los PAMPs, CQ y mediadores inflamatorios lipídicos. Los factores de crecimiento son CQ determinantes para el mantenimiento y modificación de los fenotipos. Es sabido que en el estado basal predomina el M-CSF, que induce un fenotipo promotor del crecimiento celular, angiogénesis y otras funciones homeostáticas. Durante una respuesta inflamatoria, los macrófagos tisulares producen transitoriamente GM-CSF que inclina los macrófagos en diferenciación hacia un fenotipo proinflamatorio ²⁹. Las demás señales inflamatorias presentes en el tejido terminan de definir el fenotipo resultante en un contexto y momento dado.

2.3. Modelos de estudio

Los macrófagos son ampliamente utilizados para el estudio a nivel celular de la inflamación. Existen múltiples modelos disponibles tanto *in vitro* como *in vivo*. Dentro de los modelos *in vitro*, son de particular interés los cultivos celulares que ofrecen la posibilidad de controlar y mantener relativamente constante el ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, tensión de O_2 y CO_2) y las condiciones fisiológicas (concentración de nutrientes y algunas hormonas). En cambio, los cultivos primarios tienen la ventaja de su origen natural que representa más adecuadamente la situación *in vivo*, pero presentan varias desventajas que limitan su uso. Las líneas celulares humanas y de ratón inmortalizadas originadas a partir de células cancerosas son una importante alternativa por asociar menor variabilidad y mayor reproducibilidad, consecuencia en parte de su homogeneidad genética. Otras ventajas de las

líneas inmortalizadas es que su caracterización suele ser más sencilla y una vez establecido el modelo se puede criopreservar para continuar utilizándolo. Permiten también escalar el trabajo por la disponibilidad de una muestra de mayor tamaño y fácil acceso. Asimismo, reducen el uso de animales de experimentación con sus implicancias éticas. Las limitaciones de los cultivos celulares se centran en el cuestionamiento de su validez para emular las funciones fisiológicas *in vivo*, porque muchas veces las células no expresan el fenotipo observado *in vivo* consecuencia de cambios en el microambiente. Las diferencias se deben fundamentalmente a la pérdida de interacciones intercelulares y con la matriz celular presentes en la arquitectura tridimensional del tejido, parcialmente conservadas en sustrato de dos dimensiones. Además, muchos nutrientes y señales sistémicas, principalmente endocrinas y nerviosas, están ausentes. Mientras estas limitaciones sean tenidas en cuenta, los modelos celulares de 2 dimensiones son en general herramientas válidas y muy útiles ³⁵.

2.3.1. Principales modelos celulares para el estudio de la inflamación

Dentro de los sistemas celulares para el estudio de la inflamación y la biología de los macrófagos, los monocitos de sangre venosa periférica humana son los precursores más extensamente utilizados y la referencia contra la cual contrastar las características de los demás modelos. Otros macrófagos primarios muy utilizados en la literatura son los macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDMs) y los peritoneales de ratón residentes o reclutados tras el estímulo intraperitoneal con tioglicolato, zymosan u otros inductores inflamatorios. Una distinción no menor es que los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana y los derivados de monocitos THP-1 son ambos derivados de células sanguíneas. Sin embargo, la mayoría de los conocimientos en macrófagos de ratón son o bien derivados de médula ósea o bien diferenciados de tejidos, es decir, con menor o mayor grado de madurez o diferenciación. Existen además varias líneas celulares humanas y de ratón que se utilizan para sustituir los cultivos primarios, algunas ya diferenciadas a macrófagos y otras monocíticas en las que se debe inducir la diferenciación a macrófagos ^{36,37}. Cada sistema tiene sus ventajas y desventajas, algunas inherentes a los cultivos primarios o de línea celular, otras vinculadas a diferencias entre especies y otras propias del modelo particular. Las características principales de los macrófagos derivados de monocitos de sangre y de las líneas celulares de mayor relevancia para esta tesis se presentan a continuación.

Los macrófagos derivados de monocitos de sangre son purificados de la fracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Se puede partir de sangre venosa completa de donantes o de capas leucocitarias (*buffy coats*) habitualmente provistas por bancos de sangre. Las células sanguíneas se separan por una centrifugación diferencial que logra separar los eritrocitos y granulocitos de mayor peso de los monocitos y linfocitos (células mononucleares) de menor peso. Existen varios métodos para purificar los monocitos de los PBMCs que incluyen la selección por adherencia y distintos *kits* de selección magnética basados en anticuerpos que reconocen moléculas de superficie expresadas por monocitos o linfocitos. Los monocitos purificados de sangre son diferenciados a macrófagos con los factores de crecimiento por un tiempo de 5 a 7 días. En general, se incuban con GM-CSF para sesgar los macrófagos hacia los fenotipos proinflamatorios, mientras que se utiliza M-CSF para inclinarlos hacia los fenotipos antiinflamatorios, resolutivos o reparadores ^{38,39}.

Las líneas inmortalizadas de monocitos humanos THP-1 y U-937 son rutinariamente utilizadas como sustituto de los monocitos aislados de PBMCs (**Tabla I**). Los THP-1 conservan la mayoría de las vías inflamatorias incluyendo la vía TLR4/ NF-κB⁴⁰, presentan una capacidad de migración en respuesta a quimiotácticos como el LTB4⁴¹, una función fagocítica⁴⁰ y una respuesta a LPS⁴², más similar a la de los monocitos primarios, por lo que se han considerado el modelo más cercano a los mismos. Para la diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos se han utilizado distintos estímulos siendo el más efectivo el éster

forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Son indicadores de una diferenciación completa a macrófagos la adherencia al sustrato, cambios morfológicos como la adopción de una forma estrellada y el aumento del cociente núcleo/ citoplasma, una alta capacidad fagocítica y la expresión de determinados marcadores de superficie (como se describe a continuación para la identificación de fenotipos)^{42,43}. Además, se puede verificar la diferenciación de los monocitos a macrófagos por citometría de flujo mediante los parámetros de dispersión lumínica frontal (forward scatter, FSC) vinculado al diámetro celular, y lateral (side scatter, SSC) vinculado a la complejidad interna de la célula, fundamentalmente a su granularidad ^{44,45}.

Las líneas celulares de ratón (Mus musculus) más utilizadas son J774A.1 y RAW264.7 (Tabla I), modelos bien establecidos y de amplio uso en inmunología y biología celular. Ambas líneas celulares son macrófagos ya diferenciados, tienen funciones fagocíticas y pueden adoptar fenotipos de macrófagos. Sin embargo, se han reportado marcadas divergencias en los perfiles de expresión de proteínas inflamatorias y funciones inflamatorias de macrófagos RAW.2647 de diferentes fenotipos con respecto a sus equivalentes THP-1⁴⁶.

Basada en ^{47,48} .							
	Especie y cepa	Sexo	Origen	Modo de cultivo/ t de duplicación	Diferenciaci ón	Características	
THP-1	Humana	Μ	Monocitos de paciente (SM) con leucemia monocítica aguda	Suspensión / 16 hs	PMA Vitamina D TGF	Expresan:TLR2, TLR4, CD14, CD36, CD3 (CD11b/CD18) Fagocitosis+++	
U937	Humana	Μ	linfoma histiocítico	Suspensión / 48-72 hs	PMA	HLA clase I +++	
J774. A1	Ratón BALB/c	F	Exudado de ascitis carcinomatosa de reticulosarcoma	Semi-adherente/ 17 hs	Ya diferenciadas	Expresión génica más similar a macrófagos peritoneales que RAW 264.7.	
RAW. 264.7	Ratón BALB/c	Μ	Líquido ascítico de un modelo de leucemia inducida por virus Abelson	Semi-adherente/ 11 hs	Ya diferenciadas	Mayor expresión de iNOS que J774.A1	

Tabla I. Líneas celulares para el estudio de la biología y bioquímica de los macrófagos.

2.3.2. Polarización y denominación de fenotipos en cultivo

Los macrófagos son por tanto, células diferenciadas con una gran plasticidad fenotípica. El proceso por el cual estímulos como citoquinas y ligandos TLR inducen patrones de expresión génica y proteica particulares en macrófagos, se conoce como activación ³⁶. Polarización es un término habitualmente empleado como sinónimo de activación ³⁶ pero que corresponde a una distribución binaria (en polos) de los fenotipos posibles de la célula 49. En los próximos capítulos de este trabajo se utilizará el término polarización puesto que, como se verá más adelante, refleja el protocolo empleado y porque además se diferencia de otros procesos como la activación enzimática producto de estímulos inflamatorios.

La nomenclatura aplicada para definir el fenotipo resultante de la polarización de un macrófago in vitro es confusa. En la década de 1990 se observaron efectos opuestos de la incubación con IFN-y y/o LPS respecto a IL-4 en la expresión génica. Se adoptaron los términos de fenotipo "clásico" para los polarizados con IFN-γ y/o ligandos TLR y "alternativo" para los polarizados con IL-4. En los 2000, se propuso la terminología M1- M2 por analogía con las respuestas Th1 y Th2 de los linfocitos T cooperadores ³⁶. Los macrófagos M1 son aquellos inducidos por productos microbianos, ligandos TLR y CQ Th1 como IFN-y y TNF-a, mientras que los M2 son los inducidos por CQ como IL-4, IL-10 e IL-13 secretadas por células innatas y linfocitos Th2 50. Más adelante, se expandieron las definiciones de los M2 con letras (M2a, M2b, M2c, M2d) para distinguir distintos escenarios de polarización con la idea de que existe un espectro de activaciones posibles que no puede reducirse a dos grupos ^{36,51}. El fenotipo M2a corresponde al inducido por IL-4 y/o IL-13, M2b por inmunocomplejos y LPS, M2c por glucocorticoides, TGF-β o IL-10 y M2d son los macrófagos asociados a tumores (TAM) 52. Si bien no se popularizó una clasificación en subgrupos para los perfiles M1, hay diferencias fenotípicas entre aquellos inducidos con LPS, IFN-γ o LPS más IFN-γ³⁶. A pesar de que la dicotomía M1/M2 claramente no emula la complejidad existente in vivo, en múltiples patologías se han caracterizado en los tejidos macrófagos con fenotipos que se asemejan fuertemente a los polarizados in vitro. Además, la simplificación del espectro de activación de los macrófagos es necesaria para establecer modelos reproducibles por distintos grupos de trabajo. Por tanto, se vio la necesidad de definir estándares de polarización en distintos escenarios experimentales. En 2014, se publicó un consenso de referentes en el área con propuestas de lineamientos experimentales y criterios mínimos para la generación y denominación de macrófagos polarizados in vitro. La situación de un macrófago no polarizado o no activado se describe habitualmente como condición naive, aunque algunos trabajos continúan usando el nombre M0. En cuanto a la nomenclatura, se recomienda nombrar al fenotipo por el estímulo al que se expuso ³⁶. Para facilitar la lectura, se tradujo la nomenclatura de los trabajos citados en el resto de la tesis. No se incluye el factor de crecimiento con el que se indujo la diferenciación a macrófagos puesto que hay, en general, consenso respecto a su uso. Se nombran los fenotipos por el estímulo polarizador al que se expusieron los macrófagos diferenciados. Por ejemplo, M(LPS), M(LPS/IFN-y), M(IL-4) para referir a los estimulados con LPS, LPS e IFN-y e IL-4, respectivamente.

Actualmente, los análisis de transcriptómica de célula única (single-cell) están facilitando la identificación de las vías de activación de monocitos derivados de macrófagos en tejidos inflamados y al mismo tiempo ampliando y complejizando el espectro de fenotipos de macrófagos descritos. Recientemente, Sanin y col. identificaron que en ratones las vías de activación de los macrófagos derivados de monocitos de sangre frente a diferentes estímulos se pueden agrupar en cuatro grupos: i) una vía "fagocítica" reguladora, ii) una vía "inflamatoria" productora de CQ, iii) una de "estrés oxidativo" y antimicrobiana, iv) y una "remodeladora" de la matriz extracelular ^{53,54}. Las dos primeras fueron las más comunes y presentan semejanzas con los macrófagos conocidos históricamente como M2 y M1, respectivamente. Realizaron además un metanálisis y mediante análisis bioinformáticos con bases públicas de secuenciación de ARN, verificaron que los perfiles transcripcionales se conservan en diferentes tejidos y diferentes condiciones patológicas. Concluyeron que los macrófagos derivados de monocitos sangre adoptan una de estas funciones conservadas distintivas reclutados de independientemente del tejido o estímulo desencadenante ^{53,54}. En conjunto, estas nuevas tecnologías probablemente potenciarán el desarrollo de modelos celulares que reflejen más adecuadamente las condiciones fisiológicas.

2.3.3. Identificación de fenotipos

Los macrófagos polarizados expresan diferentes moléculas en su superficie, factores de transcripción y enzimas, y secretan diferentes mediadores inflamatorios. Cada uno de estos elementos se utilizan para identificar los fenotipos de macrófagos *in vitro*. Dada la gran variedad de fenotipos y la continuidad de los espectros de activación, se tiende a utilizar combinaciones de distintas clases de marcadores para comprobar los fenotipos ³⁶ (**Figura 3**).

Al igual que para otras células inmunes, los fenotipos de macrófagos pueden ser identificados por la expresión de determinadas moléculas de superficie características. Estas moléculas son cruciales para la identificación de señales, la adhesión celular y la comunicación celular e incluyen receptores, transportadores, canales, proteínas de adhesión celular y enzimas.

Muchas de ellas se han descubierto con la producción de anticuerpos monoclonales específicos y han llevado al desarrollo de análisis de citometría de flujo multiparamétricos conocidos como inmunofenotipificación. Existen más de 400 de estas moléculas abreviadas CD (del inglés clusters of differentiation) que han sido numeradas y agrupadas en paneles que posibilitan la discriminación de subgrupos de leucocitos de forma consistente por la comunidad científica 55,56. Una fuente habitual de confusión es que los marcadores fueron en su mayoría descritos en primer término para los macrófagos murinos y no todos se veificaron en los macrófagos humanos. En línea con la discusión del trabajo de Sanin y col. que se presentó anteriormente, es probable que mover el foco de los genes individuales a perfiles transcripcionales, permita una mejor transferencia de los hallazgos en modelos de ratón a los modelos humanos en el futuro ⁵³. El principal marcador de superficie de macrófagos como tipo celular es la integrina CD11b, expresada por la línea mieloide con una alta expresión en monocitos y macrófagos y baja expresión en células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) ^{55,56}. Otro marcador de diferenciación es CD14 que aumenta su nivel de expresión con respecto a los monocitos y tiene muy baja o nula expresión en moDCs 43,57. Dentro de los marcadores de M(LPS), M(IFN-y) y M(LPS/IFN-y), se encuentran las integrinas CD54 y CD80 ⁵⁸. CD54, también conocida como molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), es un ligando de integrinas leucocitarias. CD80, también conocida como B7-1, es una molécula coestimuladora que interactúa con el receptor CD28 de los linfocitos T. Constituye la segunda señal del macrófago como célula presentadora de antígenos, necesaria para activar la respuesta linfocitaria tras el reconocimiento de antígenos por el MHC de clase II⁴. CD206, mencionado como PRR en el apartado 1, es un receptor de manosa codificado por el gen MRC1, utilizado como marcador de M(IL-4) y M(IL-10)⁴³. CD163 tiene una baja expresión en monocitos y alta expresión en M(IL-10), mientras que su expresión en M(IL-4) y M(IL-4/IL-13) es variable. Es inducido por IL-10 y reprimido por TNF-a y estímulos inflamatorios como el LPS. Fue descrito como receptor scavenger de hemoglobina ya que la capta y captura por conjunción a haptoglobina. Además, une y degrada la CQ proinflamatoria similar a TNF inductora de apoptosis 50,59. CD200R es también un marcador de polarización M(IL-4)60 La expresión de CD11b, CD163 y CD206 en macrófagos polarizados con LPS, IFN-y, IL-4 e IL-10 es cualitativamente similar en macrófagos polarizados derivados de monocitos de sangre y derivados de monocitos THP-1⁴³. Los descritos son los CD humanos más utilizados, algunos de los marcadores murinos según ³⁶ también se incluyen en la Figura 3.

Por otro lado, las citoquinas son marcadores fenotípicos muy utilizados para identificar fenotipos de leucocitos. Son medidas tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, en general se miden las CQ secretadas pero también se realizan medidas intracelulares o totales. Los M(LPS) y M(LPS/IFN- γ) humanos se caracterizan por secretar IFN- γ , IL-1 β y TNF- α . Por el contrario, los M(IL-10) secretan grandes cantidades de IL-10³⁶, CQ que es secretada en menores cantidades por los M(IL-4)⁶¹ (**Figura 3**).

La expresión diferencial de algunos factores de transcripción como distintas clases de STAT, SOCS e IRF se utiliza también para diferenciar los fenotipos ^{36,50} (**Figura 3**).

Otro método para la identificación de los fenotipos se basa en el metabolismo diferencial de la arginina por dos vías; i) la síntesis de 'NO y citrulina por la iNOS a partir de arginina, NADPH y O_2 , ii) la degradación de arginina por la Arginasa 1 (Arg1) ^{36,51}. Se puede estudiar la actividad de las enzimas midiendo; i) NO_2^{-} , producto estable de la degradación de 'NO, ii) urea, producto de la reacción de la Arg1. En macrófagos de ratón, los fenotipos M(LPS/IFN) y M(IL-4), presentan característicamente mayor actividad iNOS y Arg1, respectivamente ⁶². En cuanto a la expresión de las enzimas, si bien las células murinas expresan iNOS en respuesta a LPS, IFN-γ, IL-1β, TNF-α o IL-6, la inducción de la iNOS humana requiere de una mezcla completa de citoquinas (en general IFN-γ, IL-1β y TNF-α) ⁶³. La expresión de Arg1 para definir fenotipos es también

problemática porque la enzima no solo se induce en M(IL-4), sino también en macrófagos residentes tisulares, en los expuestos a determinados patógenos y en menor nivel en M(LPS) y M(LPS/IFN)^{36,64}. Por tanto, no resultan marcadores prácticos para verificar los fenotipos, fuera de aplicaciones donde las enzimas son de particular interés.

Una diferencia importante en el metabolismo de los extremos de los fenotipos macrofágicos es el metabolismo energético. Los M(LPS) y M(LPS/IFN) presentan un metabolismo fundamentalmente glucolítico, mientras que los M(IL-4) son más dependientes de la fosforilación oxidativa ⁵⁰.

		M(IL-4)	M(IL-10)	M(LPS)	M(LPS+IFN _Y)	M(IFNy)
Factores de	Н	pSTAT6 +++ pSTAT1 -ve lfr4, Socs2	pSTAT3 + Nfil3 Sbno2, Socs3	pSTAT1 + pSTAT6 -ve Socs1, Nfkbiz	pSTAT1 + pSTAT6 -ve Socs1, Nfkbiz, Irf5	pSTAT1 +++ Socs1
transcripción	М	IRF4, SOCS1*, GATA3*	SOCS3	IRF5	pSTAT1 +++ IRF5, IRF1	pSTAT1 +++
	н		1110	Tnf, 116, 1127 1L-1β	Tnf, 116, 1127, 1123a, 1112a	
CQ	М			TNF, IL6, IL1B	TNF, IL6, IL1B, IL12A, IL12B, IL23A	
	н	Ccl17, Ccl24 Ccl22				
Quimiocinas	М	CCL4*, CCL13* CCL17, CCL18		CXCL10, IL8	CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11	CCL18-ve
CD	н	CD206, CD163, CD200R	CD163+++		CD80 CD54 CD68	CD80 CD54 CD68
	Μ	CD163				
Metabolismo de	н	Arg1+++		Arg1+, Nos2+	Arg1+, Nos2+++	ldo1 Nos2 +++,
aminoácidos	М				IDO1, KYNU	IDO1, KYNU

Figura 3. Marcadores fenotípicos de macrófagos. Se presentan los principales factores de transcripción, CQ (IL y quimioquinas), receptores y otras moléculas de superficie, proteínas de matriz extracelular, enzimas del metabolismo de aminoácidos y otros marcadores utilizados en la bibliografía. Se comparan los marcadores murinos y humanos. Adaptada de ³⁶.

3. Oxilipinas

3.1. Definiciones y clasificación

3.1.1. Lípidos bioactivos

Los lípidos son un grupo de macromoléculas biológicas hidrofóbicas o anfipáticas muy diversas clásicamente asociados a funciones de estructura y almacenamiento energético. No solo son los principales componentes de las membranas celulares y muy eficientes fuentes de energía metabólica, sino que poseen notables funciones señalizadoras a nivel intracelular e intercelular. Los lípidos más prevalentes en las células de mamíferos son los ácidos grasos (AG) libres, las ceramidas, los fosfolípidos (PLs; incluyen glicerofosfolípidos y esfingolípidos), los mono- di- y triacilgliceroles, y los esteroles. Las características de cada estructura determinan la probabilidad de sufrir diferentes modificaciones. Estas modificaciones dan lugar a una enorme diversidad de derivados lipofílicos que completan lo que se conoce como lipidoma, el conjunto de lípidos de las células ⁶⁵.

Unos de los principales lípidos susceptibles a modificaciones son los PL de las membranas celulares. Dentro de estos, los glicerofosfolípidos se componen de dos AG unidos por enlace éster al primer (sn1) y segundo (sn2) carbonos de una molécula de glicerol, y un grupo de cabeza muy polar o cargado unido por enlace fosfodiéster al tercer carbono (sn3) del mismo. Los glicerofosfolípidos más abundantes (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina), presentan un amino en su grupo de cabeza. Los plasmalógenos y el factor activador plaquetario (PAF) son glicerofosfolípidos que en sn1 establecen un enlace éter en lugar de éster. Los bloques de construcción de los PLs, los AG, son lípidos simples formados por una cadena alquílica de 4 a 36 carbonos con un grupo carboxílico terminal polar. La distribución de AG que componen los PLs de membrana varía en los distintos organismos y diferentes tejidos de un mismo organismo. En general, contienen en sn1 un grupo acilo graso saturado de 16 o 18 carbonos; y en sn2 uno monoinsaturado (MUFA) o poliinsaturado (PUFA) de 18, 20 o 22 carbonos ⁶⁶.

Los PUFAs no solo influyen en la función celular por modificar las propiedades físicas de las membranas, sino que también son precursores de lípidos señalizadores muy reactivos con funciones fisiológicas y patológicas de relevancia. Los lípidos modificados inciden en una variedad tan grande de procesos celulares, que se ha propuesto incluso que las modificaciones que sufren los lípidos constituyen un epilipidoma, en analogía con el epigenoma y el epiproteoma ⁶⁵.

Se han bautizado así como lípidos bioactivos a los derivados de PUFAs, que ejercen una amplía variedad de funciones señalizadoras tras ser reconocidos por interacciones de alta afinidad con receptores acoplados a proteínas G (GPRs) en sus células blanco. Estrictamente, son lípidos bioactivos los eicosanoides clásicos, mediadores prorresolutivos especializados (SPMs, del inglés *specialized pro-resolving mediators*), lisoglicerofosfolípidos, lisoesfingolípidos y endocanabinoides ^{67,68} (**Figura 4**).



Figura 4. Principales lípidos bioactivos. Se esquematizan los principales grupos de lípidos bioactivos derivados de fosfolípidos de membrana: eicosanoides, SPMs, endocanabinoides y derivados de esfingolípidos y glicerofosfolípidos. 2-AG: 2-araquidonilglicerol; PEA: palmitoiletanolmaida, OEA: oleiletanolamida, AEA: anandamida, PAF: factor activador de plaquetas; Cer: ceramida; SM: esfingomielina; SP1: esfingosina-1-fosfato ; PS: fosfatidilserina, PI: fosfatidilinositol; PA:; LPC: lisofosfatidilcolina. El resto de las abreviaturas se corresponden con las del texto. Adaptada de ⁶⁷.

3.1.2. Modificaciones oxidativas de lípidos: oxilipinas y oxofosfolípidos

Los PLs de membrana pueden ser oxidados en varios sitios (**Figura 5**). Los enlaces éter son susceptibles de ataque radicalar y oxidación por electrófilos. Los grupos de cabeza polar con aminas también pueden ser oxidados. Son sin embargo las cadenas hidrocarbonadas de los AG, las que dan lugar a la mayor cantidad de modificaciones oxidativas. El ataque radicalar involucra la abstracción de un átomo de H para formar un radical centrado en carbono, donde se incorpora un oxígeno molecular formando un radical peroxilo. Las insaturaciones aumentan la susceptibilidad oxidativa ya que los H pueden ser sustraidos facilmente de atomos de carbono dialquílicos, es decir, que contienen dobles enlaces en configuración *cis* separados por metilenos (**Figura 5A**). Así los PUFAs, que presentan dos, tres o más dobles enlaces (dienos, trienos o polienos), tienen una susceptibilidad creciente a las modificaciones oxidativas ^{65,69}. Los radicales peroxilo pueden reaccionar intramolecularmente para formar un endoperóxido que a su vez puede sufrir un reordenamiento para dar lugar a un anillo ciclopentenona. Los hidroperóxidos pueden reducirse a alcoholes o epóxidos, y tanto estos como los radicales peroxilos pueden sufrir fragmentaciones que generan aldehídos de cadena corta. A su vez, pueden ser reducidos a alcoholes u oxidados a ácidos carboxílicos (**Figura 5B**).⁶⁵.

Estas oxidaciones radicalares pueden ser tanto enzimáticas como no enzimáticas, con algunas diferencias en los mecanismos y productos resultantes. Las vías no enzimáticas dependen de la reacción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), como el radical hidroxilo (OH•), con los AG. En presencia de grandes concentraciones de ROS, tienen lugar reacciones autocatalíticas en las que el radical peroxilo, en lugar de reaccionar intramolecularmente, sustrae un H de un ácido graso adyacente generando un peróxido lipídico

y un nuevo radical lipídico que perpetúa el ciclo de peroxidación lipídica hasta reaccionar con una molécula que lleva a la terminación del proceso ^{65,70}.



clivaje de la cadena hidrocarbonada

Rearreglo de cadenas largas tras inserción de O₂

Figura 5. Modificaciones oxidativas de fosfolípidos y ácidos grasos. A. Sitios susceptibles de modificaciones oxidativas en un glicerofosfolípido. Los enlaces éter vinilo se encuentran sólo en un tipo particular de fosfolípidos: los plasmalógenos. Los grupos de cabeza polar varían en distintos fosfolípidos, aquellos que tienen un grupo amina son fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilcolina (PC) **B.** Principales productos derivados de la oxidación por ataque radicalar de cadenas de AG insaturados. Adaptada de ⁶⁵.

Otra clase de reacciones radicalares de lípidos involucran la incorporación de heteroátomos. Es el caso de las RNS que además de provocar peroxidación lipídica, pueden nitrar y nitroxidar MUFAs y PUFAs para formar AG nitrados ⁶⁵. Estos lípidos poseen propiedades electrofílicas que les confieren la capacidad de inducir modificaciones postraduccionales sobre proteínas blanco alterando la expresión génica y la función celular ⁷¹. Si bien los AG nitrados no señalizan por GPRs específicos, conceptualmente también podrían ser considerados lípidos bioactivos ya que son derivados de AG de membrana con potentes acciones biológicas.

Los principales PUFAs precursores de lípidos bioactivos son el ácido araquidónico (AA; ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico o 20:4n-6), el ácido eicosapentaenoico (EPA; ácido

5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoico o 20:5n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA; ácido 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoico o 22:6n-3), el ácido linoleico (LA; ácido

ácido 9Z,12Z-octadecadienoico 0 18:2n-6) el ácido α-linolénico (ALA; У 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoico o 18:3n-3). Otros PUFAs precursores son el ácido adrénico (ADA; ácido 7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoico o 22:4n-6), el ácido docosapentaenoico (DPA; 22:5n-3), el ácido gamma-linolénico (GLA; ácido 6Z,9Z,12Z-octadecatrienoico o 18:3n-6) y el ácido di-homo-y-linolénico (DGLA; ácido 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoico o 20:3n-6) 69.72. Los PUFAs de la serie Ω -3 (EPA y DHA) y Ω -6 (AA, ADA, GLA) pueden ser adquiridos de la dieta o ser sintetizados endógenamente por reacciones de elongación y desaturación a partir de los precursores de la serie Ω-3 y Ω-6, ALA y LA, respectivamente. Ambos precursores son considerados nutricionalmente esenciales ya que las células humanas no poseen $\Delta 12$ y $\Delta 15$ desaturasas capaces de introducir dobles enlaces más allá de la posición Δ10 hacia el extremo metilo terminal. La bioconversión es sin embargo muy poco eficiente; en la serie Ω -6 solo el 5% del LA se transforma en AA y en la serie Ω -3 sólo un 5-10% del ALA se transforma en EPA y menos de 1% en DHA. Además, la enzima limitante de las vías de síntesis, la desaturasa $\Delta 6$, presenta mayor afinidad por LA que por ALA 73. Todos estos factores contribuyen a que la disponibilidad de EPA y DHA en las membranas biológicas termine dependiendo del aporte exógeno y sea por tanto muy variable entre individuos e incluso interindividualmente en el tiempo.

Oxilipinas es el término asignado a los lípidos bioactivos resultantes de la oxigenación u oxidación de PUFAs originarios de fosfolípidos de membrana por al menos un paso de dioxigenación. También se conoce como PUFAs oxigenados o acilos grasos oxigenados, y de los lípidos bioactivos mencionados anteriormente, incluyen a los eicosanoides clásicos y los SPMs. Su síntesis puede ser por vía enzimática catalizada por una o varias mono y/o dioxigenasas intracelulares, o no enzimática por ROS ^{69,74}. La síntesis enzimática de oxilipinas por lipoxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX) y epoxigenasas de la familia de citocromos P450 (CYP), da lugar a productos estereoespecíficos mientras que la síntesis no enzimática genera productos no estereospecíficos ⁷⁵.

Además de la oxidación de PUFAs liberados por las fosfolipasas, pueden oxidarse los PUFAs esterificados que están formando PL de membrana, dando lugar a la formación de oxofosfolípidos (oxPLs). Al igual que las oxilipinas, los oxPLs pueden producirse por vía enzimática o no enzimática ⁶⁹. Una diferencia importante entre los oxPLs y las oxilipinas de síntesis enzimática, es que los oxPLs como compuestos permanecen en la membrana por su lipofilicidad. Su mecanismo de señalización es por tanto diferente al de las oxilipinas; se ha propuesto que operan a través de interacciones proteína-proteína de baja afinidad y mediante alteraciones de la electronegatividad de membrana que modifican la posibilidad de interacción de otras proteínas ⁷⁰. Si bien por este motivo los oxPLs no entran dentro de la definición de lípidos bioactivos, también podrían incluirse en un concepto ampliado.

3.1.4. Clasificación de oxilipinas

De acuerdo al número de carbonos del precursor, las oxilipinas se agrupan en: octadecanoides derivados del LA y ALA (de 18 carbonos), eicosanoides derivadas del AA, EPA y DGLA (de 20 carbonos), y docosanoides derivados del DHA, AdA y DPA (de 22 carbonos)⁶⁹.

Siguiendo este sistema de clasificación, los eicosanoides incluyen a las prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs), lipoxinas (LXs), hepoxilinas y resolvinas E (RvD), además de los hidroxi- hidroperoxi, epoxi y oxo-eicosanoides. Los docosanoides incluyen a las resolvinas D (RvD), protectinas D (PD), maresinas (Mar) y también los derivados hidroxi-, hidroperoxi-, epoxi y oxo-docosanoides. Como se puede apreciar, los SPMs (RvE, RvD, Mar, PD, y LX) comprenden a varias familias derivadas de diferentes precursores, que han sido agrupadas por su función en la inflamación ⁷⁶.
3.2. Metabolismo

La síntesis y degradación de las oxilipinas involucra múltiples procesos, algunos de ellos catalizados por enzimas que son reguladas durante la respuesta inflamatoria. Se tratan a continuación la liberación y esterificación de los AG precursores a los PLs, las vías oxidativas enzimáticas principales (COX, LOX y CYP), las oxidaciones no enzimáticas y el catabolismo de las oxilipinas.

3.2.1. Fosfolipasas y Ciclo de Lands

Los PUFAs precursores no están generalmente disponibles en su forma de AG libres sino que la mayor parte de la reserva de PUFAs está esterificada a PLs de membrana. Las fosfolipasas A2 (PLA2) son las encargadas de hidrolizar los enlaces éster de la posición sn2 en la que se localizan mayoritariamente los PUFAs, dando lugar a una oxilipina y un lisofosfolípido. Dado que, como se verá, la mayoría de las oxigenasas actúan sobre PUFAs libres, la movilización de PUFAs por las PLA2 es un punto de control que regula la disponibilidad de sustrato para las vías de síntesis de oxilipinas ⁷⁷.

Han sido descritas más de treinta PLA2 que se agrupan en seis familias: secretadas (sPLA2), calcio-independientes, citosólicas (cPLA2), activadas por hidrolasas PAF (PAF-AH-PLA2), lisosomales (IPLA2) y adiposas. La cPLA2 α (grupo IVA) es la principal responsable de la liberación de los PUFAs y las sPLA2 de grupo IIA y V amplifican su acción ⁷⁷.

cPLA2α es la única que posee preferencia por PLs con AA en sn2, también tiene actividad sobre EPA pero no sobre DHA. Es regulada a nivel transcripcional; las citoquinas proinflamatorias, entre otros estímulos de las vías NF-κB, inducen su expresión. La actividad de la enzima depende de la concentración intracelular de Ca²⁺. Basalmente se encuentra en el citosol, pequeños incrementos del Ca²⁺ dirigen la enzima al Golgi e incrementos mayores la guían al retículo endoplásmico y membrana perinuclear ⁷⁷. Por otra parte, la actividad de cPLA2α es regulada por fosforilaciones en sitios Ser vía MAPK y es estimulada por varios segundos mensajeros ^{78,79}.

Las PLA2 participan del Ciclo de Lands encargado del reciclaje de AG de PLs. La composición de AG en sn2 está controlada por un balance entre la actividad hidrolítica de las PLA2 por un lado, y la suma de la activación de los AG libres por acil-CoA sintetasas más la actividad lisofosfolípido: acil-CoA aciltransferasa que incorpora los AG a lisofosfolípidos por otro ⁷⁷.

El ciclo de Lands es también una vía alternativa o indirecta para la formación de oxPLs. Primero, una PLA2 hidroliza un PUFA que es oxidado por una oxigenasa o por ROS dando lugar a una oxilipina. Luego una aciltransferasa la reesterifica en un lisofosfolípido dando lugar a un oxPL ⁷⁰. En el sentido contrario, cuando se generan oxPLs de origen no enzimático, las PLA2 encargadas de hidrolizarlos son las PAF-AH-PLA2 y la I-PLA2 para dar las correspondientes oxilipinas ⁷⁷. Asimismo, los lisofosfolípidos resultantes de la movilización de PUFAs también presentan propiedades señalizadoras y son considerados lípidos bioactivos ^{65,68} (**Figura 4**).

3.2.2. Vías enzimáticas

En términos generales, se puede decir que la síntesis enzimática de oxilipinas tiene como primer paso, la liberación del PUFA de membrana por las PLA2. La oxigenación de los PUFAs es iniciada por COX y LOX y en menor medida por los CYP. En función del AG precursor y de las oxigenasas que lo metabolizan, se pueden obtener una gran diversidad de oxilipinas ⁷⁶. A continuación se presentan las enzimas y las principales características de las vías de síntesis. *3.2.3. COX*

La comúnmente conocida como COX es la enzima prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS, EC 1.14.99.1). Es un homodímero de secuencia que se comporta como un heterodímero funcional, con un monómero encargado de la catálisis y otro que tiene un rol

regulador alostérico. Cada monómero tiene tres dominios; el dominio catalítico es bifuncional: tiene una actividad peroxidasa (POX) y una actividad ciclooxigenasa (COX) separadas en dos sitios activos, ambas dependientes del grupo prostético hemo.

Las COX son responsables de la síntesis de prostanoides, que incluyen tanto prostaglandinas (PGs) como tromboxanos (TXs). Las PGs de síntesis endógena contienen un anillo ciclopentano, un doble enlace trans entre el C-13 y C-14 y un OH en el C-14. Se distinguen por letras que indican la naturaleza y posición de los sustituyentes del anillo. Un número posterior índica el número de insaturaciones en las cadena laterales del anillo: 2 para las PGs derivadas del AA, 1 para PGs del DGLA (derivado del GLA), 3 para PGs del EPA y 4 para las PGs del DHA. Algunas agregan un símbolo griego que indica la orientación de los OH del anillo. Los TXs tienen una nomenclatura similar ⁷⁸.

La actividad COX requiere de una peroxidación inicial del hemo, tras la cual el AA es di-oxigenado a PGG2 por la actividad COX y luego reducido al endoperóxido PGH2 por la actividad POX. El producto de la oxidación del AA por las COX, PGH2, es convertido por diferentes sintasas en las demás prostanoides de la serie 2. Las prostaglandina E sintasas microsomales y citosólicas (mPGES, cPGES) dan lugar a PGE2, la prostaglandina D sintasa (PGDS) a PGD2, la prostaglandina I sintasa (PGIS) a PGI2 o prostaciclina, las prostaglandinas F sintasas a PGF2a y la tromboxano A sintasa (TXAS) a TXA2 (**Figura 6**). El mismo tipo de catálisis tiene lugar sobre los otros PUFAs principales, dando lugar a prostanoides de las demás series ^{80,81}.

Hay dos isoformas COX expresadas en mamíferos: la COX-1 (PGHS-1 codificada por el gen PGTHS1) y la COX-2 (PGHS-2 codificada por PGTHS2). La COX-1 se expresa en bajos niveles en la mayoría de los tipos celulares, razón por la cual es considerada constitutiva. La COX-1 se expresa en altos niveles en el endotelio, monocitos, plaguetas, células tubulares renales y células inmunes residentes en tejidos. La COX-2 es inducida en monocitos, macrófagos y células tumorales por diferentes estímulos guímicos que incluyen ligandos TLR, CQ proinflamatorias, factores de crecimiento, estrés mecánico e hipotonicidad. A nivel del cerebro, la médula y pelvis renal, algunas células del tracto gastrointestinal y los vasos sanguíneos, la COX-2 es de expresión constitutiva. Ambas isoformas se localizan en la membrana del retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear donde la COX-2 está más concentrada. La COX-2 se encuentra también en el Golgi y en gotas lipídicas citoplasmáticas ^{76,80-82}. En cuanto a la especificidad de sustrato, la COX-1 prefiere AA y cataliza con menor eficiencia la oxidación de EPA, DHA y DPA. La COX-2, producto de un bolsillo más amplio en su sitio activo, tiene mayor flexibilidad y acepta como sustrato AA, EPA y DHA y con menor eficiencia DPA. También es capaz de metabolizar 2-acilgliceroles (2-AG) ۷ araquidoniletanolamida (AEA) por lo que participa en la síntesis de endocannabinoides 83. Ambas isoformas tienen regulación alostérica por AG, con lo que se adaptan al tono de sustrato presente en la célula. El AA es en ambos casos un modulador positivo y para COX-2 también lo son los demás PUFAs sustrato. Los AG no sustrato son moduladores positivos para COX-2 y negativos para COX-1⁸¹.

El acoplamiento funcional de las isoformas COX con sintasas también presenta algunas diferencias que contribuyen al perfil de prostanoides resultante. La COX-1 se acopla preferentemente con TXAS, PGDS, PGFS y las cPGES. La COX-2 más frecuentemente se asocia a PGIS y a las mPGES a nivel de la membrana perinuclear. Estos acoplamientos dependen de la migración de las sintasas, por lo que varía durante el curso temporal de la respuesta inflamatoria. También hay diferencias en la expresión de sintasas entre tipos celulares; los macrófagos por ejemplo, expresan mayormente PGES y TXAS por lo que sus principales prostanoides son PGE2 y TXA2, este último tiene corta vida media y es rápidamente convertido en TXB2^{6,84}.



Figura 6. **Vías de síntesis de los principales prostanoides.** Se indican las etapas de síntesis de PGH2 a partir de AA por la COX, las sintasas corriente abajo (TXAS, PGIS, PGFS, isoformas de PGES y PGDS) que producen los diferentes prostanoides y los principales receptores acoplados a proteínas G que los reconocen (DP1-2, EP1-4, FP, IP, TP). Las abreviaturas se corresponden con las del texo. Adaptado de ⁷⁸.

Una actividad catalítica particular de la COX-2 es promovida por el ácido acetilsalicílico (AAS, aspirina), inhibidor COX que acetila un residuo Ser de la enzima. Mientras que COX-1 es completamente inhibida por esta acetilación, en la COX-2 favorece una reacción tipo LOX (ver más adelante), que a partir de AA produce como principal producto el hidroperóxido 15R-HpETE⁷⁶.

3.2.4. LOX

Las LOX son dioxigenasas que a nivel estructural se componen de una cadena polipeptídica única de 75- 100 KDa, plegada en dos dominios unidos por un bucle. El dominio N-terminal es un dominio pequeño de unión a membrana, dependiente de Ca²⁺, que facilita el acceso al AG sustrato y regula la actividad. El dominio C-terminal es el catalítico y se encuentra coordinado a hierro no hémico a nivel del bolsillo de unión al sustrato ^{85,86}. Recientemente se ha observado

que las LOX pueden dimerizar y se cree que probablemente funcionen en un equilibrio monómeros y dímeros ⁷⁶.

Las LOX catalizan la dioxigenación de PUFAs libres y esterificados con al menos dos dobles enlaces cis metileno-interrumpidos, a distintos hidroperóxidos regio y estereoselectivos. La catálisis requiere al igual que en las COX, de la oxidación inicial, en este caso del Fe²⁺ a Fe³⁺ por hidroperóxidos. La síntesis del hidroperóxido ocurre en cuatro etapas: i) la abstracción estereoespecífica de un H por el Fe³⁺, ii) un reordenamiento radicalar, iii) la inserción de una molécula de oxígeno en el extremo opuesto (antarafacial) del sustrato para formar un radical peroxilo, iv) la reducción del radical para reciclar el Fe²⁺ y rendir el hidroperóxido correspondiente ^{85,86}.

Las isoformas LOX de humanos y ratón se presentan en la Tabla II. El genoma humano tiene seis genes LOX funcionales nombrados como ALOX por la abreviatura del inglés arachidonate lipoxigenase (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5). El gen ALOX5 se localiza en el cromosoma 10, mientras que todos los demás genes están formando un cluster en el cromosoma 17. Estos genes codifican para seis isoformas diferentes de las cuales cinco tienen actividad primaria dioxigenasa. ALOXE3 codifica para una proteína con actividad dioxigenasa muy restringida que funciona primariamente como una hidroperóxido isomerasa convirtiendo hidroperóxidos a epoxialcoholes y cetonas. Tradicionalmente, las isoformas se han nombrado por su regio y estereoselectividad, es decir, en función de la posición y orientación espacial en la que oxigenan al AA. Así, los 5 genes que codifican dioxigenasas dan lugar a las isoformas 5-LOX, 12-LOX, 12R-LOX, 15-LOX1, y 15-LOX2. Solo se indica la quiralidad en la 12R-LOX puesto que es la excepción, todas las demás isoformas generan estereoisómeros S. Los prefijos 5-12- y 15 indican la posición en que insertan el oxígeno molecular en el AA, principal sustrato de las LOX. Sin embargo, estas enzimas también pueden oxigenar LA, ALA, GLA, EPA y DHA, por lo que se ha promovido el uso de una nueva nomenclatura basada en genes (ejemplo, ALOX5 para la isoforma codificada por ALOX5) 76,85-87. Dado que en la literatura en el área de oxilipinas e inflamación sigue prevaleciendo la clasificación anterior, se mantiene en este trabajo.

Los genes de ratón ortólogos a los de las LOX funcionales humanas se localizan en regiones sinténicas del cromosoma 6 (*alox5*) y cromosoma 11 (demás isoformas). Además, hay un séptimo gen LOX funcional en ratón que en humanos corresponde a un pseudogen. Las isoformas 5-LOX, pl12-LOX y 12-RLOX murinas tienen una alta homología y similares propiedades enzimáticas a las 5-LOX, 12-LOX y 12-RLOX humanas. En cambio, la 12/15-LOX y 8-LOX murina presentan diferencias relevantes con sus ortólogas humanas 15-LOX1 y 15-LOX2. La 12/15-LOX murina tiene actividad principalmente 12-dioxigenasa, mientras que en la 15-LOX1 es fundamentalmente una 15-dioxigenasa. Por otra parte, mientras que la 15-LOX2 humana oxida también en posición -15 al AA, su ortólogo 8-LOX murino, con el que tiene un 78% de homología, es una 8-dioxigenasa ^{85,88}. Realizadas estas puntualizaciones sobre las LOX de ratón, en el resto de la tesis se hace referencia a las isoformas humanas salvo que se especifique lo contrario.

Isoformas ortólogas proteína (gen)		E.C.	Sustratos preferenciales	Expresión mayoritaria (tipo celular/ tejido)	Ref. compl.
Humana	Ratón				
5-LOX (ALOX5)	5-LOX (alox5)	1.13.11.34	AA, 5-HpHETE, EPA > DHA EpoxiOH del EPA y DHA	Leucocitos (ΜΦ, monocitos, ΝΦ eosinófilos, mastocitos, células dendríticas, linfocitos B) Pulmones, placenta.	89
15-LOX1 o 12/15-LOX (ALOX15)	12/15-LOX (alox15)	1.13.11.33	DHA > EPA > AA > GLA > LA	Leucocitos (ΜΦ, eosinófilos) reticulocitos, células epiteliales (bronquios), reticulocitos.	
15-LOX2 (ALOX15B)	8-LOX (alox15b)	1.13.11.33	DHA > EPA > AA > GLA > LA	Leucocitos (MΦ, NΦ), células epitaliales (piel y anexos, prostata, esofago, mamas, vesícula), fibroblastos (corazón, placenta), neumocitos II, glía entérica	88,90
12-LOX o pl12-LOX (ALOX12)	pl12-LOX (alox12)	1.13.11.31	DHA y EPA > AA DGLA, GLA, LA	Plaquetas, células epiteliales (piel) células β-pancreáticas	91
12-RLOX (ALOX12B)	12-RLOX (alox12B)	1.13.11.31	AA, DGLA, GLA, > LA, EPA, DHA	Células epiteliales (piel y anexos amígdalas, bronquios), linfocitos B	
eLOX-3 (ALOXE3)	eLOX-3 (aloxE3)	5.4.4.7	AA, DGLA, GLA, > LA, EPA, DHA	Células epiteliales (piel)	
pseudogen	eLOX12 (alox12e)	1.13.11.31		Piel (células epiteliales)	

Tabla II. Isoformas LOX humanas y ortólogos de ratón. Adaptada de ^{76,85,86}.

EC: número de clasificación enzimática obtenido de ^{92,93}. MΦ: macrófagos, NΦ: neutrófilos. Prefijos pl: tipo plaquetaria, e: tipo epidérmico. Las referencias complementarias (Ref. compl.) corresponden a los tipos celulares/ tejidos no incluídos o detallados en las revisiones de la que se adaptó la tabla.

Los hidroperóxidos resultantes de la actividad LOX sobre el AA se denominan ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HpETEs), los del LA hidroperoxioctadienoicos (HpODEs), los del GLA hidroperoxioctatrienoicos (HpOTrEs), los del EPA hidroperoxieicosapentaenoicos (HpEPEs) y los del DHA hidroperoxidocosahexaenoicos (HpDHAs o HpDOHEs). Estos hidroperóxidos, productos primarios de las LOX, son inestables y son rápidamente convertidos en productos secundarios por varias rutas. Una ruta involucra la reducción a sus derivados hidróxidos por peroxidasas; así los HpETEs dan lugar a HETEs, los HpODEs a HODEs, los HpOTrEs a HOTrEs, los HpEPEs a HEPEs y los HpDHAs a HDHAs. Estos hidróxidos de AG pueden ser oxidados por deshidrogenasas dando lugar a formas cetona (oxo-ETEs, oxo-ODEs, etc.). Un segundo destino de los hidroperóxidos es la conversión a epóxidos, reacción que puede ser catalizada por 5-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2 mediante una actividad conocida como LTA4 sintasa. Un tercer destino de los hidroperóxidos es la transformación en una amplia gama de lípidos bioactivos por oxidaciones sucesivas catalizadas por proteínas acopladas a las LOX que varían para las diferentes isoformas 76,85. Se describen a continuación las particularidades y principales vías de síntesis de las LOX presentes en leucocitos: 5-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2. Se describe además la 12-LOX por su relevancia en la síntesis de SPMs.

La 5-LOX se expresa mayormente en leucocitos, incluyendo monocitos y macrófagos y en menor grado en células dendríticas y linfocitos B. Se caracteriza por requerir de la asistencia de varias proteínas solubles y asociadas a membrana que actúan como reguladores alostéricos o proteínas de andamiaje. La más importante es la proteína activadora de 5-LOX (FLAP), una proteína no enzimática transmembrana que se comporta como un andamio para el acceso de la enzima al sustrato. Una proteína de unión al citoesqueleto de actina conocida como proteína similar a coactosina (CLP), también es importante para la actividad de la 5-LOX. Además, la 5-LOX requiere de la actividad PLA2 puesto que sólo actúa sobre AG libres⁸⁹.

La 5-LOX dioxigena AA a 5-HpHETE, intermediario que puede derivar hacia tres rutas (**Figura 7**). La primera es la síntesis de LTs que comienza con la propia 5-LOX convirtiendo el 5-HpETE en el epóxido LTA4. El LTA4 producto de la 5-LOX es un intermediario inestable, precursor de todos los demás LTs, cuyo destino depende de las enzimas accesorias que se expresan en el tipo celular. La LTA4 hidrolasa hidroxila el LTA4 a LTB4, mientras que la LTC4 sintasa conjuga LTA4 con glutatión reducido (GSH) para formar LTC4. El LTC4 es el precursor de los cisteinil leucotrienos (cys-LTs: LTC4, LTD4 y LTE4) ⁸⁹. La segunda ruta que puede seguir el 5-HpETE es la reducción por glutatión peroxidasas (GPX) a 5-HETE ^{86,89}. En leucocitos y linfocitos B, el 5-HETE puede a su vez ser oxidado por la 5-hidroxieicosanoide deshidrogenasa NADP+ dependiente (5-HEDH) a su forma cetona (5-oxo-ETE). Además de la activación de cPLA2 y 5-LOX por Ca²⁺ y fosforilaciones, la síntesis de 5-oxo-ETE precisa de la elevación de la relación NADP+/NADPH intracelular, situación que es favorecida en leucocitos durante el estallido respiratorio por la actividad NOX2 ⁹⁴. El tercer destino del 5-HpHETE es la formación de lipoxina A4 (LXA4), una SPM que puede sintetizarse por varias vías como se verá más adelante.

La 5-LOX tiene como sustrato preferencial AA y el 5-HpETE pero también actúa sobre EPA y DHA y epoxi-alcoholes derivados de la oxidación de estos por las 15-LOXs. Si bien la conversión de EPA en 5-HpEPE es casi tan elevada como la del AA, la transformación del DHA en 7-HpDHA es mucho más lenta, cercana al 1% de la del AA⁸⁹.



Figura 7. **Principales vías del AA iniciadas por 5-LOX**. Se ilustran las vías de síntesis de LTs, LXs, y 5-oxo-ETE con las enzimas responsables y los receptores con la clase de proteína G que activan (i: inhibidora de adenilato ciclasa, s: estimuladora de adenilato ciclasa, q: activadora de fosfolipasa C); GSH: glutatión reducido; GGT: Gamma-Glutamil Transferasa; dipept: dipeptidasa. Las demás abreviaturas se corresponden con las del texto. Adaptada de ⁹⁴.

La 12-LOX se expresa fundamentalmente en las plaquetas y células epiteliales y tiene preferencia por DHA y EPA a los que oxigena en posición 14 y 12 para dar 14-HpDHA y 12-HpEPE. También actúa sobre el AA dando 12-HpETE ^{76.91}.

Existen dos isoformas LOX que catalizan la peroxidación del AA y EPA en posición 15 y DHA en posición 17: 15-LOX1 y 15-LOX2 (15-LOXs). Las 15-LOXs no requieren de proteínas accesorias para oxidar PUFAs libres como la 5-LOX, pero su actividad sobre sustratos esterificados a PLs es facilitada por la formación de un complejo con una proteína de andamiaje conocida como proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1 (PEBP1) ⁷⁶. Además de PEBP1, algunas proteínas reguladoras y la glutatión peroxidasa 4 (GPX4) se asocian a este complejo que controla la síntesis de oxPLs por 15-LOXs ⁹⁵.

La 15-LOX1 tiene una alta expresión en eosinófilos, el epitelio bronquioalveolar y en algunos monocitos y macrófagos. 15-LOX2 se expresa de forma constitutiva mayormente en células epiteliales de distintos tejidos y también se encuentra en bajos niveles en fibroblastos, neutrófilos, monocitos y macrófagos. La 15-LOX2 es muy específica en su catálisis, solo genera 15- hidroperóxidos de los eicosanoides: transforma el AA en 15-HpETE, el EPA a 15-HpEPE. De igual forma, convierte el DHA a 17-HpDHA, el LA a 13-HpODE y el GLA a 13-HpOTrE. La 15-LOX1, en cambio, tiene la peculiaridad de catalizar tanto la formación de 15como 12-hidroperóxidos de eicosanoides y 14- como 17-hidroperóxidos de docosanoides, razón por la cual se la conoce también como 12/15-LOX. In vitro la relación para el AA es 93% 15-HpHETE y 7% 12-HpHETE, para el EPA es 84% 15-HpEPE y 16% 12-HpEPE, mientras que para DHA es 59% 17-HpDHA y 41% 14-HpDHA.^{85,87,88,90}. En orden decreciente, la preferencia de sustratos de las 15-LOXs es DHA, EPA, AA, GLA, LA ⁷⁶. Los hidroperóxidos y algunos hidróxidos del AA y LA aumentan la actividad de las 15-LOXs y modifican la especificidad del sustrato. Los hidroperóxidos sintetizados por la 12-LOX y 15-LOXs dan lugar a distintos productos. De la vía del AA, el 12-HpETE puede ser epoxidado e hidroxilado a hepoxilinas por la 12-LOX o 15-LOX1, y las hepoxilinas pueden a su vez ser hidrolizadas a dioles por epóxido hidrolasas solubles (sEH). Análogo a la síntesis de LTA4 por 5-LOX, la 15-LOX1 puede formar el epóxido 14,15-LTA4, que luego da lugar a moléculas similares a los Cys-LTs, en una ruta descrita mayormente en eosinófilos, por lo que se conoce a estos productos como eosinas. Los hidróxidos y cetonas se producen de forma análoga a la vía 5-LOX. De relevancia, el 15-HpETE puede también ser precursor de lipoxinas, mientras que los hidroperóxidos de DHA y EPA son precursores de los demás SPMs ⁹⁶.

Las LOX tienen además otras funciones no mediadas por oxilipinas que mayormente dependen de su capacidad de oxigenar AG polienoicos que se encuentran formando lípidos complejos. Anteriormente se mencionaron los oxPLs de síntesis enzimática. La 15-LOX capaz de oxidar PUFA esterificados a fosfolípidos, es la principal fuente de oxPLs por oxidación directa, contrario a la 5- y 12-LOX que alimentan la síntesis de oxPLs a través del Ciclo de Lands ⁷⁰. Por otro lado, la oxidación de ésteres de colesterol, lipoproteínas y membranas biológicas puede modificar su estructura y su función, mecanismos que parecen ser importante para las funciones de las LOX en eritropoyesis, la diferenciación epidérmica y en la aterogénesis. Además, las oxidaciones catalizadas por las LOX pueden alterar la homeostasis redox de la célula generando estrés oxidativo. Entre otras consecuencias, esto modifica la transcripción y traducción de genes sensibles a señales redox. Las LOX pueden estar contribuyendo así a las vías de señalización que modifican los fenotipos de las células durante la respuesta inflamatoria ⁸⁵. Asimismo, la oxidación de lípidos de membrana por las 15-LOX puede modificar el reconocimiento de señales interfiriendo con la señalización intracelular de los PPRs ⁸⁸. *3.2.5. CYP*

La tercera vía oxidativa de PUFAs implica a los Citocromos P450 (CYP), una enorme familia de enzimas cuya función más conocida es el metabolismo de xenobióticos lipofílicos y compuestos endógenos como esteroles, vitaminas liposolubles y AG⁸⁴. Son monoxigenasas hémicas que pueden catalizar muchos tipos de oxidaciones, siendo las relevantes al metabolismo de oxilipinas las epoxidaciones y hidroxilaciones. En cuanto a estas últimas, además de hidrolizar

los PUFAs para generar HETEs y los demás derivados hidroxilados tipo LOX, los CYP pueden introducir hidroxilaciones en carbonos ω dando ω -HETEs. El sustrato preferencial de la mayoría de los CYP es EPA, DHA y AA se metabolizan a velocidades similares y también metabolizan LA. A partir de AA producen ácidos ω-hidroxieicosatetraenoicos (6-, 17-, 18-, 19- y 20-HETE) y epoxieicosatetraenoicos (EETs). La CYP2C8 es la isoforma humana más prevalente en distintos tejidos y da lugar a la producción de 11,12-EET y 14,15-EET. A partir de EPA sintetizan ácidos epoxieicosatetraenoicos (EpETEs) e hidroxieicosapentaenoicos (HEPEs). А partir de DHA genera ácidos epoxidocosapentaenoicos е hidroxidocosahexaenoicos (HDHAs). A partir de LA, genera ácidos epoxioctadecenoicos (EpOME, principalmente 9,10-EpOME y 12,13-EpOME). Los epóxidos pueden ser metabolizados por epóxido hidrolasas solubles (sEH) a sus correspondientes dioles. Por ejemplo, los epóxidos del LA se metabolizan a diHOMEs (9,10-diHOME y 12,13-diHOME) 71,97. 3.2.6. Biosíntesis de SPMs

Como se describió, las LOX generan como productos primarios hidroperóxidos que pueden ser reducidos a ácidos monohidroxilados. Estos productos secundarios pueden ser nuevamente sustrato de las isoformas LOX, cuyas regioespecificidades dan lugar a distintas combinaciones específicas de ácidos dihidroxilados y trihidroxilados. De esta forma se sintetizan los SPMs, por oxidaciones secuenciales del DHA, EPA y AA que dependen de al menos dos actividades oxigenasas distintas ²⁰. Si bien las distintas isoformas LOX son las principales enzimas responsables de la síntesis de SPMs, también participan en las vías de algunos SPMs las CYP y la COX-2 acetilada (**Figura 8**).

Las lipoxinas (LX) son una familia de derivados trihidroxilados del AA que incluyen a la LXA4, LXB4 y sus epímeros producidos por COX-2 acetilada por AAS (15-epi-LXA4 y 15-epi-LXB4). Su síntesis requiere de una actividad 5-LOX y una actividad 12- o 15-LOX, a través de tres posibles vías: 5-LOX/ 12-LOX, 15-LOX/ 5-LOX, COX-2 acetilada/ 5-LOX ⁶.

Las resolvinas E son derivadas del EPA cuyas vías de síntesis están inconclusas ⁷⁶. Las RvE1, RvE2 y RvE3 derivan del 18-HpEPE sintetizado por CYP o COX-2 acetilada, mientras que la RvE4 deriva del 15-HpETE y se sintetiza por vía 15/5-LOX ⁹⁸ (**Figura 8A**).

La SPMs derivadas del DHA son las maresinas, protectinas y resolvinas D. La síntesis de maresinas (del inglés <u>ma</u>crophage mediators in <u>resolving inflammation</u>) depende de la transformación del 14-HpDHA a un estereoisómero específico del intermediario epóxido ácido 13,14-epoxidocosahexaenoico, de cuya hidrólisis enzimática surgen la maresina 1 (Mar1; 7,14-diHDHA) y la maresina 2 (Mar2; 13,14-diHDHA). Dado que las Maresinas derivan de 14-HpDHA requieren de un primer paso de actividad 12-dioxigenasa, vía 12-LOX o 15-LOX1 ⁹⁹ (**Figura 8B**). La síntesis de protectinas y resolvinas D comienza con la síntesis de 17-HpDHA por la 15-LOX1. Una peroxidasa forma el 17-HDHA que puede sufrir una o dos hidroxilaciones más por la 5-LOX para dar las distintas resolvinas D. La conversión del HpDHA en un intermediario epóxido que luego se hidroliza, da lugar a las protectinas. Los intermediarios epóxido también pueden conjugarse a glutatión para generar péptidos conjugados de maresinas, protectinas y resolvinas D (MCTR1, PCTR1 y RCTR1) ⁷⁶ (**Figura 8B-C**).



Figura 8. cont. en siguiente página



Figura 8. Vías de síntesis de SPMs del DHA y EPA. Se presentan las estructuras y vías de síntesis de Resolvinas E (A), Resolvinas D (B), Protectinas y Maresinas (C). Las abreviaturas se corresponden con las del texto. Adaptada de ^{98,100}.

Como las isoformas LOX se expresan diferencialmente en los distintos tejidos y tipos celulares, se ha propuesto que la síntesis de algunos productos di y trihidroxilados requiere de la acción de más de un tipo celular. El proceso implica que un tipo celular sintetiza un hidroperóxido intermediario específico que difunde o es transportado a una célula adyacente en cuyos PL de membrana se incorpora el intermediario. Luego, la PLA2 libera el hidroperóxido y las dioxigenasas del segundo tipo celular sintetizan el producto final. Por ejemplo, para la síntesis de oxilipinas se ha visto que cooperan los neutrófilos que expresan 5-LOX con las plaquetas que expresan 12-LOX ^{6,96}.

3.2.7. Vías no enzimáticas

La oxidación no enzimática de PUFAs da lugar a estructuras cíclicas de estereoquímica variada como isoprostanos, neuroprostanos y fitoprostanos colectivamente llamados isoprostanoides, término que alude a su isomería con las PGs producidas por la COX. Son también oxilipinas de síntesis no enzimática las familias de furanos, así llamados por poseer un anillo tetrahidrofurano ^{101,102}.

Los isoprostanoides se nombran con letras que indican la PG con la que su anillo es análogo. A partir del AA, se generan primero G2-isoprostanos (isómeros de PGG2), luego por reducción del hidroperóxido se forman H2-isoprostanos (isómeros de PGH2) que se reducen completamente a F2-isoprostanos (isómeros de PGF2). A su vez, existen tantos regioisómeros como carbonos bisalílicos. Así, para los F2-isoprostanos (derivados del AA) se describen la serie 5-, 12-, 8-, o 15- (**Figura 9**), siendo las series 5- y 15- las más abundantes. Una nomenclatura alternativa abrevia isoprostanos como iP y describe los regioisómeros como III–VI. Otros isoprostanos del AA son los E2-isoprostanos y D2-isoprostanos (isómeros de la PGE2 y PGD2), que se forman a partir de G2-isoprostanos ^{101–103}. Los eicosanoides cíclicos derivados de oxidación no enzimática del EPA se conocen como F3-lsoprostanos, los

docosanoides derivados del DHA y DPA se conocen como F4-Neutroprostranos y F3-Neuroprostanos, mientras que los derivados del LA son fitoprostanos ¹⁰².

Una característica distintiva de los isoprostanoides es que contrario a los prostanoides, contienen las cadenas laterales del anillo ciclopentano en posición *cis*⁷⁸.



Figura 9. F2-Isoprostanos producidos por oxidación no enzimática del AA. Se indica en colores las posiciones de los hidroxilos que dan el nombre a cada serie. Adaptado de ¹⁰².

Las vías de síntesis de oxilipinas a partir de AA por vía enzimática y no enzimática se resumen en la **Figura 10**. Como se puede apreciar, se pueden generar una enorme diversidad de metabolitos derivados de este PUFA por acción conjunta de una importante variedad de enzimas. El mapa global de las oxilipinas del AA, EPA, DHA, LA, ALA, ADA Y DGLA se puede observar en la **Figura 11**.



Figura 10. Vías COX, LOX y CYP del AA. Se presentan las vías COX (violeta), actividad hidroxilasa de CYP (rojo), actividad epoxigenasa de CYP (azul), 5-LOX (naranja), 15-LOX (verde), 12-LOX (amarillo) y no enzimáticas (gris). Dentro de cada vía enzimática las enzimas involucradas se marcan en recuadros grises. Algunas vías de inactivación por deshidrogenasas y catabolismo, se presentan por fuera de las nubes. GGT: Gamma-Glutamil Transferasa; HXEX: hepoxilina epóxido-hidrolasa. El resto de las abreviaturas se corresponden con las del texto. Obtenida de ⁹⁶.



Figura 11. Esquema global de las principales oxilipinas producidas a partir de PUFAs por vías COX, LOX, CYP y mediadas por radicales libres. Las siglas se corresponden con la nomenclatura utilizada en el texto. Adaptada de ¹⁰⁴.

3.2.8. Catabolismo y excreción

El descubrimiento de los SPMs como señales contrarreguladoras ha aportado a la comprensión de cómo se culmina la inflamación, más allá de la mera dilución de los mediadores proinflamatorios. Sin embargo, dado que las oxilipinas tienen potentes efectos biológicos, su inactivación y remoción es también controlada.

Una forma de inactivación de oxilipinas involucra algunas de las rutas biosintéticas mencionadas anteriormente. PGs, LTs y HETEs son inactivados por conversión a su formas cetona (oxo) por diferentes deshidrogenasa (ejemplo: 5-PGDH y 15-PGDH), en tanto que los epóxidos son inactivados por las epóxido hidrolasas solubles (sEH)^{78,96}.

El catabolismo de prostanoides implica, en general, modificaciones que aumentan su solubilidad en agua y favorecen la excreción urinaria ⁹⁶. La farmacocinética de los eicosanoides clásicos ha sido estudiada; la mayoría tienen una vida media corta, aparecen inmediatamente en plasma y desaparecen en minutos. Se detectaron metabolitos estables en orina, plasma y tejidos, producto de una β -oxidación parcial denominados dinores (2 carbonos menos) y tetranores (4 carbonos menos), para los cuales se verificó la degradación a nivel de los peroxisomas ⁷⁴. Algo similar ocurre para los isoprostanos, de los cuales se detectan metabolitos dinores y tetranores en orina, además de isoprostanos conjugados a taurina y glucurónido ¹⁰¹. Para algunas SPMs, como la PD1, también se ha identificado el catabolismo a metabolitos dinores y tetranores similares ¹⁰⁰. Recientemente, se evidenció que las oxilipinas son degradadas por β -oxidación en las mitocondrias de macrófagos mediante una vía desacoplada de la fosforilación oxidativa. Este descubrimiento sugiere que la β -oxidación puede ser otro punto de control en las vías de oxilipinas ⁷⁴.

3.3. Receptores

Las oxilipinas median sus actividades biológicas de forma autocrina y, menos frecuentemente, endocrina ⁷⁸, a través de la unión a receptores acoplados a proteínas G (GPRs), que logran activar a concentraciones picomolares o inferiores ⁷⁰. Estos receptores se componen de diferentes complejos de proteínas G: activadoras (Gs) o inhibidoras (Gi) de la adenilato ciclasa o activadoras de fosfolipasas C (Gq). Los GPRs modifican así la producción de segundos mensajeros intracelulares como el AMPc, GMPc, fosfatidilinositoles y Ca²⁺, que terminan alterando la expresión génica y otros procesos celulares ¹⁵.

Existen ocho GPRs de prostanoides: el receptor de PGD (DP1), el receptor de PGF (FP), el de PGI (IP), cuatro subtipos del receptor prostanoide E (EP1-4) y el receptor de TX (TP). Hay además variantes de *splicing* de algunos de estos receptores que amplían el repertorio de blancos de los prostanoides. La PGI2 es también reconocida por el receptor activado por proliferación de peroxisoma (PPAR)δ⁸⁴. Los receptores de leucotrienos son el CysLT1, CysLT2 y CysLTE, que reconocen cys-LTs, mientras que los receptores LTB4R (BLT1) y LTB4R2 (BLT2) reconocen LTB4¹⁰⁵. El LTB4 también es reconocido por PPARα. Algunos HpETEs, HETEs y diHETEs son reconocidos por los receptores TRPV1, PPARα o PPARγ⁶. 5-HETE, 12-HETE y 15-HETE son potentes ligandos PPARα y PPARγ. 12-HpHETE, 12-HETE y 15-HETE se unen a BLT2⁹⁶. Los EETs también tiene como blanco PPARα y PPARγ. Las hepoxilinas son ligandos del receptor potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1)⁶. Para 5-oxo-ETE, hay un GPR específico caracterizado denominado receptor oxoeicosanoide ¹⁰⁶.

El primer receptor de SPMs descrito fue el receptor de lipoxina A (ALX), pero las lipoxinas también son ligandos del GPR32 y del receptor de CysLT1, en el que se cree que compiten con

LTD4 ⁹⁶. Posteriormente, se descubrieron varios de los GPRs que reconocen SPMs, en general, a concentraciones del orden picomolar inferior a nanomolar ^{100,107} (**Tabla III**).

Tabla III. Receptores de SPMs. Adaptada de ^{100,107}					
SPM	GPRs				
Lipoxina A4	ALX(FRP2); GPR32				
Resolvina E1	BLT1; ChemR23				
Resolvina D2	GPR18/DRV2				
Maresina 1	LGR6				
Protectina D1	GPR37				
Resolvina D1	ALX(FRP2); GPR32				
Resolvina D2	GPR18/DRV2				
Resolvina D5	GPR101				

ALX/FPR2: Receptor formil-peptido 2; LGR6: Receptor 6 acoplado a proteínas G que contiene repeticiones ricas en leucina; ChemR23: Receptor quimiotáctico huérfano 23.

3.4. Funciones

Las oxilipinas tienen una amplia variedad de funciones en diferentes tejidos. Hay extensa evidencia que indica que las oxilipinas sintetizadas por COX, LOX y CYP juegan un rol importante en la iniciación y desarrollo de muchas de las patologías con componente inflamatorio mencionadas en el apartado 1. Varias oxilipinas, enzimas encargadas de sus síntesis y receptores de oxilipinas se han hallado desregulados en patologías crónicas que incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades autoinmunes sistémicas y neurodegenerativas ^{68,75,108}.

Las oxilipinas son mediadores inflamatorios que resultan claves en la transición de la etapa inicial a la resolución de la respuesta inflamatoria aguda, o su eventual transición a un proceso inflamatorio crónico. Como se mencionó en el apartado 1, uno de los eventos claves para la resolución es el cambio de perfil de los mediadores lipídicos (oxilipinas) producidos en el sitio inflamatorio por macrófagos y neutrófilos (**Figura 2**). Se ha caracterizado la transición de un exudado proinflamatorio inicial compuesto por eicosanoides clásicos (PGs, TXs y LTs) hacia un exudado resolutivo en el que priman los SPMs²⁰. A continuación se describen brevemente las principales funciones de familias de oxilipinas y algunos intermediarios de sus vías de síntesis. *3.4.1. Prostanoides*

Los PGs y TXs sintetizados basalmente por la COX-1 tienen funciones homeostáticas en múltiples tejidos, que incluyen la regulación de la agregación plaquetaria y hemostasia, la gastroprotección y la hemodinamia renal ⁸². El TXA2, producido por plaquetas y otras células, mantiene la homeostasis de la agregación plaquetaria, mientras que la PGI2 (prostaciclina), producida por el endotelio, inhibe la agregación plaquetaria ⁶. Algunas prostaglandinas tejido específicas sintetizadas por la COX-2 regulan procesos en condiciones fisiológicas particulares vinculados a la reproducción, fisiología renal, neurotransmisión y secreción pancreática ⁸². Además, las PGs están involucradas en la angiogénesis y el crecimiento de varias clases de tumores sólidos ¹⁰⁹.

En la inflamación aguda, las PGs son centrales en la respuesta vascular donde la PGE2 potencia la extravasación de neutrófilos. A su vez, PGE2 y PGD2 puede evocar funciones resolutivas y PGE2 juega un rol en la inducción del cambio de clase de mediadores lipídicos ²⁰. *3.4.2. Leucotrienos*

El LTB4, como se mencionó en el apartado de inflamación, es un potente quimioatrayente leucocitario e induce la activación de células inmunes. Los cys-LTs o péptido-leucotrienos, particularmente el LTD4, tienen un efecto broncoconstrictor y vasoconstrictor que es

responsable del rol de los LT en la anafilaxia, el asma y otras patologías alérgicas y respiratorias ^{85,105}.

3.4.3. Monohidroxilados del AA: HETEs

Los HETEs producidos por las LOX han sido implicados en procesos tan diversos como la angiogénesis, en el crecimiento y progresión tumoral, en la apoptosis neuronal, la secreción de insulina y la nocicepción. Concretamente, 12-HETE y 15-HETE tienen efectos protrombóticos ^{85,91 96}. De los HETEs vía CYP, el 20-HETE es el más estudiado por sus efectos proinflamatorios y vasorreguladores ⁸⁴.

3.4.4. Monohidroxilados de LA: HODEs

Los HODEs, y particularmente 13-HODE, son reguladores de la inflamación en la pared vascular¹¹⁰

3.3.5. Monohidroxilados del DHA y EPA: HDHAs e HEPEs

Los intermediarios de las vías de síntesis de SPMs son frecuentemente considerados marcadores de la ruta, pero como los hidroperóxidos son muy inestables, en general, se detectan sus formas monohidroxiladas. Así, el 14-HDHA se puede considerar un marcador de actividad de la vía de síntesis de Mar, el 17-HDHA de las de PD y RvD y el 18-HEPE de RvE. *3.3.6. SPMs del AA, DHA y EPA*

Los SPMs se consideran mediadores res

Los SPMs se consideran mediadores resolutivos puesto que potencian la eferocitosis, limitan el reclutamiento de neutrófilos al sitio inflamatorio y disminuyen la producción de mediadores proinflamatorios; todas las familias comparten estas propiedades. Además, contrario a lo esperado, han demostrado incrementar la capacidad de eliminación de patógenos ^{6,22}. Múltiples funciones específicas de cada SPM han sido descritas en modelos celulares, animales y en diversas condiciones y patologías humanas ²⁰.

3.3.7. Isoprostanoides

Los F2-Isoprostanos, son moléculas relativamente estables y su cuantificación es utilizada para medir peroxidación lipídica como indicador de estrés oxidativo. Actualmente se los reconoce no solo como biomarcadores e indicadores de procesos fisiopatológicos, sino también como señalizadores. El 15-F2t-IsoP (8-iso-PGF2α o iPF2α-III) es un vasoconstrictor renal, pulmonar, cardíaco y cerebral, un estimulador de la liberación de endotelina y de la proliferación del músculo liso vascular. Algunas de estas acciones son probablemente mediadas por receptores de prostanoides como el TP ^{102,103}. Recientemente se reportó que el cotratamiento de macrófagos con 15-F2t-IsoP durante el estímulo con LPS promueve el desarrollo de un fenotipo antiinflamatorio, lo que sugiere que los isoprostanos producidos en grandes cantidades en la respuesta inflamatoria aguda pueden tener una función contrarreguladora ¹¹¹.

3.4. Métodos de estudio de las vías de síntesis de oxilipinas

El estudio de las oxilipinas es de gran importancia en biomedicina. Las estrategias tradicionales de estudio incluían inmunoensayos como ELISA y espectrometría de masa (MS) tradicional, cuya capacidad de identificación y cuantificación es limitada. El desarrollo de métodos de lipidómica basados en MS acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS/MS), ha permitido identificar y cuantificar más de 150 oxilipinas distintas de forma simultánea en varias muestras biológicas ⁶.

Dada la diversidad de oxilipinas, una de las dificultades se encuentra en la nomenclatura. Algunos estándares mínimos para reportar oxilipinas en ensayos de lipidómica fueron establecidos en el consorcio *LIPID MAPS* y se resumen en ⁶⁹. El uso de nomenclatura abreviada de la estructura completa (Por ejemplo: FA 22:6(4Z,8E,10E,12E,16Z,19Z); 7OH, 14OH) es posible cuando la posición y naturaleza de los grupos funcionales es determinada por GC o HPLC- MS/MS. Las estructuras, incluyendo la estereoquímica, de las oxilipinas han sido caracterizadas por métodos químicos y espectroscópicos y se conocen sus espectros de MS,

de los que surgen los nombres comunes (Ejemplo: Maresina 1 para referir al FA 22:6(4Z,8E,10E,12E,16Z,19Z); 7OH, 14OH). Para utilizar con precisión los nombres comunes que hacen referencia a una molécula específica se requieren técnicas que puedan diferenciar los isómeros y no únicamente ómico. No siempre es posible con muestras biológicas deducir la estereoquímica de las estructuras pese a lo cual la asignación del nombre común a estos datos es permisible con ciertas consideraciones. Debe aclararse que la estereoquímica se asume basado en contexto del conocimiento y evidencia sobre la estructura, metabolismo y funciones de la molécula ⁶⁹. En el marco de esta tesis, se utilizan los nombres comunes de los SPMs a pesar de no tener la estereoisomería definida (Ejemplo: Maresina 1 para referir al 13,14-diDHA), y los aspectos mencionados anteriormente son contemplados en el análisis.

3.5. Farmacología de las vías de síntesis de oxilipinas y otras vías inflamatorias

La inflamación aguda y, más aún la inflamación crónica, tienen un impacto enorme en la carga asistencial y en la morbimortalidad de las sociedades industrializadas ¹⁰ por lo que más allá del valor mecanístico, ha habido un fuerte interés por parte de la academia y la industria en el desarrollo de tratamientos que modulen las vías inflamatorias.

A pesar de la complejidad y diversidad de las respuestas inflamatorias, existen una amplia variedad de blancos moleculares para su modulación farmacológica. Parte del desafío se debe a la redundancia de estas vías y la participación de muchos blancos en vías universales, lo que acarrea un riesgo de efectos secundarios sistémicos y locales importante ¹⁰. Un ejemplo de esto son los glucocorticoides, la clase de antiinflamatorios en uso clínico más potentes y ampliamente utilizados, que emulan el efecto de sus análogos endógenos. Su indicación prolongada se ve limitada por el efecto inmunosupresor, por el desarrollo de insulinorresistencia asociada a modulación del metabolismo energético a nivel hepático muscular y del tejido adiposo y por riesgo de osteoporosis. Entre otras acciones, los corticoides reprimen la expresión de genes inflamatorios como el de COX-2¹¹². Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son el otro gran grupo de antiinflamatorios de amplio uso clínico. Casi todos los AINEs son inhibidores reversibles de las COX con selectividad variables por sus isoformas, excepto el ácido acetilsalicílico (AAS), un inhibidor irreversible que acetila la enzima y es conocido por su efecto antiagregante plaquetario. Si bien los AINEs son una familia de fármacos muy efectivos en términos de analgesia y supresión de otros signos inflamatorios, tienen un perfil de efectos adversos amplio y potencialmente grave vinculado a su inhibición de funciones homeostáticas de las COX y sus productos en diferentes tejidos. Esto fue particularmente importante para los coxibs, inhibidores COX-2 selectivos 83. Los antileucotrienos son otros fármacos que actúan sobre las vías de síntesis de LTs por la 5-LOX. Se han aprobado para uso clínico el zileuton, un inhibidor reversible de la 5-LOX, y un grupo de antagonistas del receptor de Cys-LT colectivamente conocidos como lukasts 105. Si bien estos antagonistas han resultado útiles en el asma y algunas enfermedades alérgicas, se cree que su moderado efecto en relación a la potente actividad de los LTs, se deba a redundancia aún desconocida en los receptores de estas oxilipinas⁸⁵. Farmacoterapias antiinflamatorias de más reciente desarrollo incluyen la administración de citoquinas recombinantes y la neutralización de las mismas o bloqueo de sus receptores mediante anticuerpos monoclonales, utilizadas en el tratamiento de neoplasias hematológicas y no hematológicas, patologías autoinmunes e inflamatorias ¹⁷. Inhibidores duales COX-2/15-LOX están en fase clínica, con los que se busca un potente efecto antiinflamatorio por inhibición de prostanoides y LTs y un efecto supresor tumoral por la implicancia de ambas enzimas en la progresión tumoral ¹¹³. También interviniendo la vía de síntesis de oxilipinas, se están estudiando los inhibidores de sEH con el fin de bloquear la producción de DiHOMEs en desórdenes metabólicos ¹¹⁴. Otros fármacos antiinflamatorios en estudio son algunos nitroalquenos, moléculas electrofílicas derivadas de la nitración de ácidos grasos endógenos que, entre otras acciones, activan a NRF2¹¹⁵. Además se ha observado la inhibición de la COX por AG nitrados⁸⁰.

Tanto las inmunoterapias, como los mecanismos principales descritos para corticoides, inhibidores COX y antileucotrienos que se han mencionado, son de carácter antiinflamatorio, es decir, bloquean señales o vías inflamatorias. Así como algunas señales endógenas tienen efectos duales, también hay fármacos que se comportan al mismo tiempo como antiinflamatorios y prorresolutivos o contrainflamatorios. Para los glucocorticoides ¹¹⁶ y el AAS ²⁰ se han caracterizado efectos prorresolutivos adicionales a los efectos antiinflamatorios ya conocidos. Además se ha descrito que otros fármacos clásicos como las estatinas, modifican la producción de oxilipinas. Tanto el AAS como las estatinas promueven la generación de 15*R*-HETE a partir del AA por acetilación y *S*-nitrosilación de la COX-2, respectivamente, lo que conduce a la síntesis de lipoxinas ^{85,117}. Los glucocorticoides modifican la expresión de las 15-LOX de macrófagos; inducen la expresión de 15-LOX2 en todos los fenotipos y reprimen la de 15-LOX1 en fenotipo M(IL-4). Esto resulta en una mayor producción de SPMs en los M(LPS/IFN) que es de relevancia para evitar una respuesta exagerada en la primera etapa de la inflamación, aunque podrían ir en detrimento de la resolución por su efecto sobre los M(IL-4).

El cambio de paradigma en la concepción de la resolución de la inflamación, ha llevado al desarrollo de un área de investigación conocida como farmacología de la resolución que pretende generar estrategias para redirigir las vías inflamatorias hacia la síntesis de mediadores resolutivos o activar receptores de SPMs^{7,100}.

4. Antecedentes del trabajo

En los apartados anteriores se sintetizaron los conocimientos sobre la biología y bioquímica de la inflamación como fenómeno, los macrófagos como actores celulares, las oxilipinas como mediadores inflamatorios y las LOX y otras oxigenasas como responsables de sintetizarlos. En cada uno de estos puntos se reiteró el concepto de la función homeostática, más allá de la respuesta inflamatoria frente a patógenos o daño. Resulta llamativo cómo un mismo fenómeno, mismo tipo celular o misma clase de señales pueden regular procesos tan diversos o promover procesos *a priori* opuestos. Si bien algunos mecanismos han sido desvelados, la pregunta de cómo es regulada la transición de la respuesta inflamatoria aguda a la fase resolutiva y su extrapolación a condiciones de inflamación crónica, prevalece vigente y prioritaria.

Parte del desafío es tratar de comprender cómo el acoplamiento funcional de las diferentes enzimas involucradas en la síntesis de oxilipinas durante la inflamación permite controlar las respuestas. El estudio de estos procesos es complejo por los cambios dinámicos en la expresión y el tráfico subcelular simultáneo y secuencial de las enzimas involucradas ⁶.

La plasticidad fenotípica de los macrófagos es una propiedad que podría dar respuesta a muchas de las interrogantes. Algunas observaciones sobre la distribución de isoformas LOX y oxilipinas de fenotipos macrofágicos en distintos modelos, indican que los cambios en la expresión y localización de las LOXs juegan un rol en la regulación del cambio de clase (*switch*) de mediadores inflamatorios (**Figura 2**)^{14,58,118}. Sin embargo, la relación espacial y temporal entre los mediadores lipídicos inflamatorios liberados y la distribución de la maquinaria de síntesis de oxilipinas en los fenotipos de macrófagos, está aún en construcción. Los principales antecedentes al respecto se presentan a continuación.

4.1. Expresión de LOX, COX y FLAP en fenotipos de macrófagos humanos

En función de sus fenotipos y los estímulos inflamatorios a los que se exponen, se ha reportado que los macrófagos humanos pueden expresar COX-1, COX-2, 5-LOX, 15-LOX1, 15-LOX2 y

FLAP ¹⁴. Se ha observado que los macrófagos diferenciados con GM-CSF expresan mayores niveles de 5-LOX que aquellos diferenciados con M(CSF) ³⁹ y que la expresión de 5-LOX en macrófagos completamente polarizados es discretamente superior en M(IFN) o M(IFN/LPS) que en M(IL-4) ^{14,58}. Se ha descrito que la transcripción de su proteína activadora, FLAP, es inducida en distintas células innatas por GM-CSF, LPS, TNF-α, corticoides e hipoxia ¹⁰⁵. Se ha reportado que FLAP se expresa en M(IFN) ¹⁴ o M(LPS/IFN-γ) ⁵⁸ predominantemente, con nula o mínima expresión en M(IL-4).

Sobre la 12-LOX, el primer antecedente es del trabajo de Wuest y col. en el cual observaron niveles muy bajos del transcrito en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados, similares a los de los monocitos. Deng y col. en uno de los trabajos en que se descubrieron las Maresinas v sus vías de síntesis, observaron también "baios niveles" del transcrito en monocitos, macrófagos naive, M(LPS/IFN) y M(IL-4). Sin embargo, por citometría de flujo detectaron un aumento de la expresión proteica de 12-LOX en todos los fenotipos de macrófagos con respecto al fenotipo naive ¹¹⁹. En la posterior dilucidación de la vía de Maresinas trabajaron con 12-LOX de macrófagos recombinante y verificaron que es capaz de realizar la bioconversión ¹²⁰. A pesar de que no se encontraron otros trabajos que hayan verificado la expresión de 12-LOX en los macrófagos derivados de monocitos de sangre, desde entonces, en la bibliografía se mencionan indistintamente la síntesis de 14-HpDHA vía 12-LOX o 15-LOX1. En cuanto a la expresión de 12-LOX en líneas celulares, un trabajo en un modelo de hígado graso de ratón verificó que la síntesis de Mar1 en macrófagos hepáticos es preferencialmente por la p12-LOX y no por la 12/15-LOX murina. En este mismo trabajo, verificaron la expresión de 12-LOX en macrófagos naive de la línea RAW264.7 y macrófagos peritoneales a nivel de proteína y de monocitos THP-1 a nivel de ARNm¹²¹. Es decir, que las 12-LOX de macrófagos pueden tener un rol importante en la síntesis de SPMs.

Para las 15-LOXs, en cambio, hay varios estudios de transcripción y expresión proteica en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados. *Wuest y col.* observaron que a nivel de ARNm la expresión de 15-LOX2 aumenta durante la diferenciación de monocitos a macrófagos, mientras que 15-LOX1 se mantiene en niveles muy bajos similares a los de los monocitos ¹²². Ya se había descrito que la polarización con IL-4 e IL-13 aumenta la transcripción de *ALOX15*, gen de 15-LOX1 ¹²³. En el trabajo de *Wuest y col.* verificaron este fenómeno, y observaron también un aumento con LPS e hipoxia de forma independiente. Identificaron además que la expresión de 15-LOX1 inducida en M(IL-4) alcanza niveles algo superiores a la expresión de 15-LOX2 en estas mismas células. La expresión del ARNm de 15-LOX1 alcanzó un pico a las 48 horas de incubación con IL-4, mientras que la inducción de 15-LOX2 fue sostenida y gradual durante las 72 horas de incubación con IL-4 y LPS, ambas verificadas por Western Blot ¹²². Resultados similares fueron obtenidos más recientemente por Werz y col. que observaron inducción de 15-LOX1 en M(IL-4) a partir de las 24 horas de polarización y un aumento sostenido hasta las 72 horas ⁵⁸.

En cuanto a las COX de macrófagos, a nivel de ARNm está descrito que la diferenciación de los monocitos a macrófagos resulta en una disminución de ambas isoformas, que la polarización con LPS/IFN-γ aumenta la transcripción de COX-2 en detrimento de la de COX-1, y que la polarización con IL-4/IL-13 aumenta la transcripción y traducción de COX-1¹²³. Además, la COX-2, conocida como isoforma inducible, aumenta su expresión en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios. *Ebert y col.* observaron inducción con LPS y zymosan.

4.2. Compartimentación de la maquinaria de síntesis de oxilipinas

Algunos de los cambios dinámicos que tienen lugar en la maquinaria biosintética de oxilipinas han sido documentados combinando datos experimentales y biología computacional. Por

ejemplo, está establecida una estrecha relación entre las oxilipinas producidas por macrófagos en respuesta a estímulos TLR4 y el acoplamiento de las COX con sus sintasas ⁶.

Por el contrario, la localización subcelular de las LOXs varía en diferentes tejidos y tipos celulares; pueden ser citoplasmáticas y/o nucleares o menos frecuentemente de membrana plasmática ^{88,105}. La 5-LOX en reposo se encuentra soluble en el citosol o el núcleo y en respuesta al estímulo se trasloca a la envoltura nuclear (tanto cara citosólica como nuclear) para interactuar con FLAP y la cPLA2 y así sintetizar fundamentalmente LTs ¹²⁴. En la envoltura nuclear, el destino del LTA4 sintetizado depende de la compartimentación. Se ha descrito que la cara citosólica de la membrana nuclear favorece la producción de LTB4 mientras que la cara nuclear la de cys-LTs, como resultado de diferencias en el acoplamiento a sintasas ¹²⁵. La 5-LOX citosólica actúa a nivel de la membrana plasmática y las membranas perinucleares lo que reduce la síntesis de LTs ¹²⁴, y favorece la síntesis de LXs. Esto se da por la falta de acoplamiento a FLAP y LTA4 sintasa y, en teoría, por proximidad con las 15-LOXs ¹²⁵. Más recientemente, se observó que estas traslocaciones de 5-LOX son reguladas por fosforilaciones en distintos residuos Serina (Ser) de la enzima localizados en secuencias de localización o exportación nuclear de la enzima (**Figura 12**).



Figura 12. Regulación de la localización subcelular y actividad 5-LOX por fosforilaciones. La 5-LOX se trasloca a la membrana nuclear interna o externa para la síntesis de leucotrienos dirigida por la fosforilación de su Ser 271 vía MK2 o de su Ser 663 vía ERK1/2. La fosforilación en Ser 523 por PKA o PKC reduce la actividad de 5-LOX y la transloca al citosol donde puede convertir el 15-HETE en LXA4 o su epímero. Adaptada de (126).

Las fosforilaciones son inducidas por diferentes estímulos que activan cascadas de quinasas. Las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1 y 2 desencadenan la fosforilación en Ser 663 mientras que la quinasa de MAPK 2 (MK2) en Ser 271, ambas enzimas de la familia MAPK pueden ser activadas por estímulos inflamatorios. Estas dos fosforilaciones inducen la translocación de la enzima del citosol o el núcleo a la cara citosólica o nuclear de la membrana nuclear. Por el contrario, la fosforilación de Ser 523 por la proteínas quinasa A (PKA) o proteína quinasa C (PKC) mantiene a la 5-LOX en el citosol, donde puede participar en la producción de LXs a partir de 15S-HETE producido por las 15-LOXs o 15R-HETE por la COX-2 acetilada. PGE2 a través de los receptores EP2 y EP4 desencadena la fosforilación de 5-LOX en Ser 523 pero también en Ser 271. La fosforilación en Ser 523 es la única no verificada en la línea mieloide. Dados los efectos duales de las distintas fosforilaciones, se han propuesto como un punto de control de las vías por regulación postraduccional ^{126,127}.

El panorama sobre el tráfico subcelular de las 15-LOXs es menos claro, si bien es probable que mecanismos de regulación similares a los de la 5-LOX estén presentes. Del mismo modo, es esperable que las localizaciones subcelulares de las 15-LOXs en distintos tipos celulares e incluso fenotipos de un mismo tipo celular, sean distintos.

4.3. Perfil de oxilipinas de fenotipos macrofágicos

A nivel celular, la naturaleza de las células participantes, los estímulos desencadenantes del *switch* de oxilipinas y la maquinaria completa para la síntesis de SPMs, son aún parcialmente comprendidos. Si bien la síntesis transcelular de LXs y algunas resolvinas fue caracterizada en modelos de leucocitos humanos, la biosíntesis únicamente por macrófagos humanos no es aún bien comprendida ¹⁴.

En primer lugar, y de relevancia para los modelos de diferenciación in vitro, se ha observado que macrófagos *naive* obtenidos con GM-CSF y M-CSF en condiciones basales presentan similar perfil de oxilipinas. Sin embargo, tras el estímulo con LPS, fMLF o peptidoglicano, presentan diferentes perfiles diferenciados ³⁹, indicando un sesgo fenotípico por el factor de crecimiento.

En los macrófagos humanos polarizados, se ha descrito que en fenotipos M(LPS/IFN) y M(LPS) predominan los eicosanoides clásicos, mientras que en M(IL-4) disminuyen algunos de estos y aparecen, en grado variable, las familias de SPMs ^{58,118}. Sin embargo, las cantidades de SPMs son muy inferiores a los de PGs y LTs ¹⁴.

Se ha planteado la asociación entre la localización subcelular de 5-LOX y/o 15-LOX y el perfil de oxilipinas en macrófagos, con diferentes posturas sobre qué localizaciones determinan este perfil. Algunos autores plantean que el perfil de oxilipinas es condicionado por la ubicación subcelular de 15-LOX1 en reposo, nuclear favorece la síntesis de LTs y citoplasmática la de SPMs ^{58,127}. Por el contrario, *Norris y col.* en macrófagos M(IL-4) sometidos a hipoxia observaron que la síntesis de SPMs es favorecida por la translocación de 15-LOX1 al núcleo para colocalizar con 5-LOX ¹¹⁸. Las traslocaciones de las 15-LOXs entre compartimentos celulares podrían regularse por fosforilaciones dependientes de señales del microambiente tisular, tal como para la 5-LOX, pero modificaciones específicas aún no han sido descritas.

4.3. Modelos de estudio de las LOX de macrófagos

Por otro lado, los modelos celulares para el estudio del rol de las LOX y las oxilipinas en la resolución de la inflamación, son acotados. La mayoría de los trabajos *in vitro* citados anteriormente ^{39,58,118–120,122,128} utilizan el modelo de macrófagos derivados de monocitos de sangre, y no hay líneas celulares validadas o de uso extendido para esta aplicación. Disponer de líneas celulares humanas y/o líneas murinas con un comportamiento comparable resultaría de gran utilidad para el estudio de los mecanismos de regulación de las LOX.

Los macrófagos derivados de monocitos THP-1, resultan los más atractivos por su semejanza estructural y funcional con los macrófagos derivados de PBMCs. El uso de THP-1 en sustitución de los monocitos derivados de PBMCs tiene varias ventajas. La tasa de crecimiento es mucho más rápida, se pueden criopreservar y subcultivar, están exentos de contaminación con otros tipos celulares (linfocitos, plaquetas) y son genéticamente homogéneos. Está reportado que el gen *ALOX15* se transcribe en macrófagos THP-1 diferenciados con concentraciones de PMA de hasta 30 nM polarizados a M(IL-4)⁴³, pero no se encontraron antecedentes sobre la expresión de 15-LOX1 y 15-LOX2 a nivel de proteína en THP-1. *Benatzy y col.* recientemente realizaron una revisión de la expresión de 15-LOX2 en distintos tejidos y líneas celulares, en la que no describen ninguna línea de leucocitos que exprese la enzima⁸⁸.

En la exploración de líneas celulares posibles también corresponde valorar las líneas murinas. Si bien los macrófagos de ratones no tienen exactamente las mismas isoformas de LOXes, muchos de los trabajos sobre la biología de los macrófagos incluyendo la identificación de SPMs, se han llevado a cabo o transferido a modelos animales murinos. En el equipo de trabajo se cuenta con una amplia experiencia de cultivo de macrófagos J774.A1, una línea estable, de rápido crecimiento y ya diferenciada. De verificarse una consistencia en el perfil de oxilipinas y su maquinaria de síntesis, sería de utilidad contar con el modelo de macrófagos J774 polarizados

Sobre la síntesis de oxilipinas, se halló únicamente un reporte de análisis de prostanoides e isoprostanoides en macrófagos THP-1 *naive* ¹²⁹. Previo al desarrollo de esta tesis, no se encontraban en la bibliografía estudios de oxilipinas en macrófagos THP-1 ni en macrófagos J774.A1 polarizados.

Es así que se identificaron: una interrogante mecanística sobre la resolución de la inflamación, una asociación entre los fenotipos de macrófagos y el perfil de oxilipinas y una inconsistencia en la bibliografía relacionada a la distribución de las LOX de los fenotipos. Se plantea por tanto, que la maquinaria de LOXs de los fenotipos de macrófagos se encuentra diferencialmente regulada y esto condiciona el perfil de oxilipinas producidas. Además, se contempló una necesidad metodológica de disponer de modelos celulares más sencillos para el estudio de la regulación de las vías de síntesis de oxilipinas en macrófagos. En este contexto, esta tesis busca arrojar luz sobre los cambios dinámicos en la distribución y expresión de las LOXs de los fenotipos de macrófagos, para contribuir a comprender los mecanismos de resolución de la inflamación.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar las lipoxigenasas (LOX) de diferentes fenotipos de macrófagos humanos y su relación con la producción de oxilipinas a nivel celular.

2. Objetivos específicos

- Determinar la expresión y localización subcelular de las principales isoformas de LOX de un modelo de macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados a fenotipos proinflamatorio y proresolutivo/ antiinflamatorio.
- II. Caracterizar la producción de oxilipinas de los macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados a fenotipos proinflamatorio y proresolutivo/ antiinflamatorio.
- III. Evaluar líneas celulares para el estudio de las producción de oxilipinas derivadas de LOX de macrófagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

Se realizó un trabajo de tipo experimental utilizando distintos modelos celulares de macrófagos: i) un cultivo de macrófagos humanos primarios derivados de monocitos de sangre; ii) un cultivo de macrófagos humanos derivados de la línea de monocitos THP-1; iii) un cultivo de macrófagos de ratón de la línea diferenciada J774.

Las células fueron cultivadas en un incubador de atmósfera controlada a 37°C con 95% aire atmosférico/ 5% CO₂ y bandeja humidificadora. Se trabajó en cuarto de cultivo en condiciones de esterilidad con una cabina de flujo laminar.

1.1. Obtención y cultivo de monocitos primarios de sangre

Para generar el modelo de macrófagos primarios se purificaron células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMCs) de donantes. Se realizaron extracciones sanguíneas de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Facultad de Medicina. Se incluyeron voluntarios mayores de 18 años a los que se solicitó un ayuno de lípidos de 4 horas. Se consideraron criterios de exclusión: i) ser portador de una coagulopatía u otra condición con incremento del riesgo por venopunción; ii) haber consumido ácido acetilsalicílico en los últimos 7 días u otros antiinflamatorios no esteroideos en las últimas 24 horas. Los donantes otorgaron su consentimiento informado y se les asignó un código numérico que fue disociado de la identificación de las muestras.

El protocolo de obtención de monocitos de sangre (Figura 13) fue adaptado de ^{38,58}. Se colectaron aproximadamente 20 mL de sangre con material estéril en tubos con anticoagulante Li.Heparina o K₂EDTA y se procesaron en fresco. Se diluyó la sangre al medio con PBS libre de calcio y magnesio (PBS bajo en sales: NaCl 150 mM, KPi 10 mM, pH 7.4). Se purificaron las PBMCs por centrifugación diferencial en función de su densidad utilizando el medio Lymphoprep (STEMCELL Technologies) cuya densidad es de 1077 g/mL. De acuerdo a las indicaciones del fabricante, se colocaron 15 mL de Lymphoprep preincubado a temperatura ambiente en un falcon de 50 mL y sobre esta fase se colocaron 20 mL de la sangre diluida. Para separar los tipos celulares se realizó una centrifugación a 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente con baja aceleración y desaceleración 0. Fue recuperada la delgada capa blanca correspondiente a las PBMCs (buffy coat en inglés), de la interfase entre el Lymphoprep y el plasma rico en plaquetas. Se diluyó la misma en 3 volúmenes de PBS bajo en sales y se realizó un lavado por centrifugación a 250 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de la centrifugación (pellet) lavado fue resuspendido en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 con L-Glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, #R6504), glucosa 14 mM, bicarbonato de sodio 18 mM, tampón HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina, preparado a pH 7.40 con rojo fenol como indicador colorimétrico. Se suplementó el RPMI con 10% de suero bovino fetal (SBF) ¹³⁰. Previo a su uso, los sueros fueron inactivados mediante incubación a 56°C por 30 minutos con el fin de reducir los efectos negativos de factores del complemento termosensibles ³⁵. Los PBMCs resuspendidos en medio de cultivo fueron contados con una cámara de Neubauer en un microscopio óptico (objetivo 20X) y se plaquearon a una densidad de 0,5-1 x 10⁶ células/ mL en placa de cultivo de 6 pocillos o placa de Petri de 60 mm según se detalla en cada ensayo.



Figura 13. Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Se presentan los pasos para la obtención de los PBMCs mediante centrifugación diferencial. SVP: sangre venosa periférica; min: minutos; d: densidad; GR: glóbulos rojos. Esquema creado con *BioRender.com*

1.2. Cultivo de monocitos THP-1

Se obtuvieron monocitos THP-1 de *American Type Culture Collection* (ATCC, TIB-202). Se criopreservó la línea en Nitrógeno líquido y se cultivaron los monocitos en suspensión a una densidad de 2 - 5 x 10^5 células/mL en frascos de poliestireno de 25 o 75 cm² en RPMI suplementado con 10% SBF. Se subcultivaron por dilución adicionando medio fresco cada 2 a 3 días en función del cambio de coloración del rojo fenol y realizando un cambio de medio cada 7 días mediante centrifugación a 400 g por 5 minutos.

1.3. Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos

La diferenciación de los monocitos humanos a macrófagos se realizó con diferentes protocolos para el cultivo de línea celular y el cultivo de células primarias (**Figura 14A**).

Para inducir la diferenciación de los monocitos sanguíneos a macrófagos, se incubaron los PBMCs con factores de crecimiento por 7 días en placa de cultivo de poliestireno tratadas para cultivo en adherencia (Greiner Bio-One CELLSTAR®). Se utilizaron el "factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos" (GM-CSF, Sigma-Aldrich #G5035) y el "factor estimulante de colonias macrófagos" (M-CSF, Sigma-Aldrich #SRP3110) a concentración de 20 ng/mL en ambos casos, para dirigir la población hacia los fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4}, respectivamente ⁵⁸.

Para diferenciar las células THP-1 a macrófagos se incubaron 5 x 10⁵ monocitos/mL con el diéster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA) con PMA por 48 horas y se dejaron 48 horas en descanso en medio libre de PMA ^{44,131,132}. Se realizó una puesta a punto de la concentración óptima de PMA a utilizar en la que se evaluó el rango de 25 - 200 nM y se incluyó una condición control del vehículo dimetilsulfóxido (DMSO). Para los ensayos posteriores, se utilizó para la diferenciación de los monocitos una concentración de PMA de 25 nM (15 ng/mL).

1.4. Cultivo de macrófagos murinos J774.A1

Se obtuvieron células J774.A1 de ATCC (ATCC TIB-67). Se criopreservó la línea en Nitrógeno líquido y se cultivaron a una densidad de 2- 4 x 10^4 células/ cm² en frascos de poliestireno de 25 o 75 cm² en 5 o 12 mL. Se utilizó como medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) comercial 1.0 g/L de glucosa, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, a pH 7.40 con rojo fenol como indicador colorimétrico, suplementado con 10% SBF. Se subcultivaron levantando las células con espátula a una proporción 1:5 cada 7 días, con un cambio de medio al día 3 o 4 de acuerdo al viraje de color del rojo fenol.

1.5. Inducción de fenotipos de macrófagos

Los macrófagos *naive* adheridos en monocapa de ambos modelos fueron levantados por incubación con PBS- EDTA 5 mM durante 20 a 30 minutos a 37°C y posterior disgregación por pipeteo suave sistematizado. Se contaron con cámara de Neubauer y se plaquearon en placas de poliestireno tratadas en medio RPMI con 10% SBF de acuerdo al diseño de cada ensayo. Para obtener los fenotipos proinflamatorios se incubaron con lipopolisacárido (LPS) 100 ng/ml por 48 hs. Para obtener el fenotipo antiinflamatorio o prorresolutivo se incubaron con 20 ng/ml de interleuquina-4 (IL-4) humana (Sigma-Aldrich) para los macrófagos derivados de monocitos de sangre y monocitos THP-1 y 20 ng/ml de IL-4 de ratón por 48 hs ⁴³ (**Figura 14B**). Las subpoblaciones resultantes de esta etapa de polarización se nombran como M_{LPS} y M_{IL-4} siguiendo la nomenclatura recomendada ³⁶ y como subíndice para distinguirlos de los fenotipos referenciados de otros trabajos.



Figura 14. Diferenciación de monocitos a macrófagos (A) e inducción de fenotipos de macrófagos M_{LPS} y M_{IL-4} (B). Se esquematizan los protocolos de cultivo a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (panel superior) y de la línea de monocitos THP-1 (panel inferior). Esquema creado con *BioRender.com*

1.6. Suplementación con PUFAs

Con el fin de proporcionar sustrato para la síntesis de oxilipinas a los macrófagos polarizados, se suplementaron las células polarizadas con PUFAs con un protocolo adaptado de ^{118,133}. Se resuspendió AA, DHA y EPA (*Cayman Chemicals*) en DMSO (concentración en cultivo <1% v/v) y las diluciones fueron almacenadas en tubos de vidrio a -80°C desplazando el O₂ con N₂. La concentración empleada fue de 10 - 70 μ M y el tiempo de incubación de 3 horas u *overnight*. Para facilitar el recambio de AG con los PL, se adicionó seroalbúmina bovina (BSA) delipidada al 0.1% como transportador. Una vez culminada la incubación, se lavaron las células al menos 3 veces con medio de cultivo sin suero para remover los AG no captados.

1.7. Estímulo inflamatorio con zym

Para activar la respuesta inflamatoria de los macrófagos, se realizó un estímulo estéril con zymosan A (zym) en tampón fosfato *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (dPBS: CaCl₂ 0.9 mM, MgCl₂ 0.5 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.45 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.4) suplementado con Glucosa 5,5 mM y L-Arginina 1 mM. La concentración de zym empleada fue de 50 µg/mL y el tiempo de incubación de 30 a 90 minutos según se indica en cada ensayo ^{58,134}.

2. Caracterización fenotípica de los macrófagos

Se caracterizaron los macrófagos obtenidos mediantes las siguientes estrategias: observación de cambios morfológicos y adherencia, estudio de expresión de moléculas de superficie y producción de CQ características.

2.1. Análisis de adherencia y morfología

Se consideraron indicadores de diferenciación exitosa de los monocitos a M_{Nv} la adherencia al soporte de cultivo y los siguientes cambios morfológicos: i) aumento de tamaño, ii) aumento del cociente citoplasma/ núcleo, iii) dispersión y adopción de una morfología irregular, ameboide o estrellada característica de los macrófagos ^{131,135}. La adherencia de los M_{Nv} inducidos con diferentes concentraciones de PMA fue evaluada levantando y contando las células de la forma descrita anteriormente. Para comparar la morfología celular, los M_{NV} y polarizados fueron lavados y se observaron las células por microscopía óptica de campo claro. Se obtuvieron imágenes con un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse E200, objetivos 20X y 40X). En los macrófagos primarios, se seleccionaron imágenes representativas de al menos 3 campos de 3 réplicas de cada condición con las que se realizó un análisis de forma de carácter descriptivo en el procesador Fiji is Just Imagej (Fiji). Las imágenes fueron calibradas tomando como referencia fotografías de una regla de calibración comercial obtenidas con los mismos objetivos. Los diámetros celulares fueron medidos manualmente con la herramienta de selección lineal. Se corrigió la señal de fondo con la función Substract Background y para resaltar la periferia celular se aplicó el filtro Find Edges. Se seleccionaron manualmente las regiones de interés (ROI) correspondientes a cada célula completa presente en el campo, para las cuales se calcularon área (A), perímetro (P) y circularidad. La circularidad compara la relación entre A y P a la de un círculo mediante la ecuación 4πA/P², con valores en el rango de 0 - 1 correspondiendo 1 a un círculo perfecto. Se graficó Circularidad vs Área para las ROI de cada imagen y se estableció en dicho gráfico un punto de corte de área de 180 µm² (correspondiente a un diámetro máximo de aproximadamente 15 µm para un círculo perfecto), para excluir los linfocitos y seleccionar la población de monocitos o macrófagos según el caso. Se obtuvieron las medias (x) y desvíos estándar (DE) de área y circularidad de estos monocitos o macrófagos en cada condición experimental.

En macrófagos primarios polarizados se estudiaron las diferencias morfológicas por el patrón de dispersión lumínica mediante Citometría de Flujo. Los parámetros evaluados fueron forward scatter (FSC) relacionado al tamaño celular y side scatter (SSC) vinculado a la complejidad interna de la célula, particularmente a su granularidad. Para ello, se resuspendieron ~5 x 10⁴ células en dPBS, se adquirieron 10000 eventos en un equipo FacsCalibur (BD Bioscience) y se analizaron los resultados en el programa *FlowJo* (Versión 10.10.0, BD Bioscience). Se inspeccionó la calidad de los datos adquiridos con la herramienta *Check Sample Quality* según la cual se tomó como válidos para continuar el análisis los datos de las muestras que en el gráfico de Intensidad *vs* tiempo de cada parámetro presentaron variaciones comprendidas dentro de 2 desvíos estándar (DE) de la mediana de intensidad. Se obtuvieron gráficos de puntos bidimensionales de FSC-H vs SSC-H en los que se excluyeron las regiones de

desechos o detritos celulares (habitualmente nombradas *debris*) y se realizó un gate de las células totales. Se identificó en las mismas en FSC-A vs SSC-A las regiones correspondientes a linfocitos (R1) y macrófagos (R3) ⁴⁵.

2.2. Estudio de expresión de moléculas de superficie

Se estudió la expresión de marcadores de superficie por Citometría de Flujo tomando como referencia los trabajos ^{55,56,58}. Para seleccionar la población celular se utilizó CD11b y para caracterizar los fenotipos se seleccionaron dos marcadores de cada uno. Para definir el fenotipo proinflamatorio (inducido con LPS) se utilizaron las adhesinas CD54 y CD80, mientras que para el de perfil proresolutivo/ antiinflamatorio (inducido con IL-4) se emplearon CD163 y CD206. A continuación se describen los diseños empleados en cada uno de los modelos.

En los macrófagos primarios, se realizó una Citometría de Flujo multiparamétrica. Para ello, se plaquearon 3- 5 x 10⁵ células diferenciadas/ pocillo en placa de 48 pocillos, se polarizaron por 48 horas y se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo en V. Se centrifugaron en placa a 400 g por 4 minutos a 4°C. Se resuspendieron en suero humano decomplementado al 10% en tampón FACS (PBS con BSA al 0.1 %, EDTA 2 mM) y se incubaron 30 minutos en hielo para bloquear los receptores Fc. Se realizaron las tinciones de marcadores de superficie con 1 μg/ 10⁶ células de Ac monoclonales de ratón IgG1κ anti-humano conjugados a fluoróforos, en tampón FACS en hielo y oscuridad por 30 minutos. Se utilizaron dos paneles independientes: los M_{LPS} fueron teñidos con anti-CD11b PE-CY7, anti-CD80-PE y anti-CD54 FITC mientras que los M_{IL-4} fueron teñidos con anti-CD11b PE-CY7, anti-CD206 PE y anti-CD163-AlexaFluor488 (Apéndice 2.1). Se realizaron dos lavados, se resuspendieron las células en FACS y se añadió a las muestras la sonda de viabilidad TO-PRO-3 a concentración 1 µM 5 minutos previo a la adquisición. Los anticuerpos y diluciones empleados se detallan en el Apéndice 2.1. Se incluyeron además de las tinciones con el panel completo (Figura 15), condiciones sin tinción, tinciones individuales para cada Ac (en inglés single-stain) y controles fluorescencia menos uno (FMO, del inglés fluorescence minus one). Se introdujeron las muestras en un instrumento FacsCanto II (BD Bioscience). Se configuró la población de células a incluir y los voltajes de cada fluoróforo con los controles sin tinción y de tinciones individuales y se adquirieron al menos 20000 eventos de cada réplica.



Figura 15. Diseño de Citometría de Flujo multicolor para estudiar la expresión de marcadores de superficie en macrófagos derivados de monocitos de sangre. Las líneas verticales señalan la longitud de onda de excitación de los láseres empleados: Azul (488 nM), Rojo (633 nM). Las líneas punteadas indican los espectros de excitación de los fluoróforos, las áreas coloreadas sus respectivos espectros de emisión (intensidades relativas sin normalizar) y los recuadros los detectores y filtros. En macrófagos M_{IL-4} se utilizó un Ac conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 en lugar de FITC. Esquema creado con la plataforma *FluoroFinder Spectra Viewer*.

Los datos sin compensar fueron introducidos y analizados en el programa FlowJo de forma independiente para los MLPS y MIL-4. Para compensar el solapamiento de espectros, se construyeron matrices utilizando como control negativo a las células sin tinción y como positivo a las células con tinción simple. La calidad de los datos fue controlada con la herramienta Check Sample Quality con el criterio mencionado anteriormente y se realizó una limpieza de anomalías con el plugin FlowAl¹³⁶ para continuar el análisis únicamente con los eventos de alta calidad (FlowAlGoodEvents). La estrategia de ventanas de análisis jerárquico manual (gating en inglés) se ilustra en la sección de resultados. Se seleccionaron las células excluyendo los debris en el gráfico de FSC-H vs SSC-A. Se seleccionaron en las células los eventos individuales (singlets) en el gráfico de FSC-A vs FSC-H considerando que existen varios tipos celulares en la muestra y no esperamos una distribución en una única diagonal para todas las poblaciones. Se definió en las células individuales compensadas el gate de células TO-PRO-3 negativas de permeabilidad de membrana conservada (vivas). Se identificó en el gráfico de CD11b-PE-Cy7-A vs FSC-A a los macrófagos CD11b positivos (CD11b+) utilizando para el gate las poblaciones negativas esperadas en las muestras. Se definió el umbral de positividad para cada uno de los marcadores de fenotipo en gráficos bivariados del marcador correspondiente vs FSC-A con los FMO como control negativo en los que se seleccionó una proporción < 0,2% de células positivas. Se analizó la expresión de los dos marcadores de cada fenotipo en las células CD11b⁺ de cada grupo. Se realizó además un análisis de la proyección de las células positivas para cada marcador fenotípico en las poblaciones originarias o parentales (en inglés backgating) y de la distribución de las células CD11b⁺ en FSC-H vs SSC-A.

En las células THP-1, se realizaron medidas de expresión de CD54 y CD163 en M_{Nv} , M_{LPS} y M_{IL-4} por monomarcado. Se incubaron ~ 5 x 10⁵ células con Ac monoclonales IgG1 κ de ratón anti-humano conjugados anti-CD54-FITC o anti-CD163-AlexaFluor488 (anti-CD163-A488) a dilución 1: 200 en dPBS por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavaron las células, se resuspendieron en dPBS y se inyectaron en un equipo FacsCalibur (BD Bioscience).

Se configuró la población de células a incluir y los voltajes con los controles sin tinción y se adquirió 10000 eventos de cada muestra. El análisis se realizó en el programa *FlowJo* (BD Bioscience). Los parámetros FSC-H y SSC-H fueron utilizados para identificar las poblaciones con características de linfocitos (R1), monocitos (R2) y macrófagos (R3) y excluir los *debris*. La R2 fue definida utilizando un control de monocitos sin diferenciar (<0,2% positivas). Se definió en los histogramas de cada marcador el punto de corte utilizando los controles sin tinción (< 0,2% positivas) y se analizó para las células vivas las proporciones de células CD54⁺ y CD163⁺ en cada condición.

Los datos de citometría se presentan con histogramas de intensidad de fluorescencia y gráficos bivariados de tipo pseudocolor con una escala de color de densidad celular (en orden creciente: azul, verde, amarillo, anaranjado, rojo) o de contornos. Para la visualización se transformó los ejes de los canales de fluoróforos a una escala biexponencial. Los resultados de cada réplica se resumen en tablas con frecuencias relativas a la población parental de cada *gate*.

2.3. Determinación del perfil de citoquinas

Se determinaron las concentraciones de las interleuquinas IL-1a e IL-10 mediante la técnica de ELISA tipo sándwich con kits comerciales (Millipore #RAB0244 y RAB0269). Se incubaron ~ 3 x 10⁴ células polarizadas estimuladas con zym en RPMI 2,5% suero humano autólogo a 37°C por 24 horas y se colectaron los sobrenadantes acumulados. Las muestras de sobrenadantes fueron utilizadas puras, diluídas 1:2 y 1:5 con el tampón solución B y se incluyeron controles de medio de cultivo para evaluar interferencias. Se prepararon curvas de calibración mediante dilución seriada en solución B a partir de estándares en un rango de 0-150 pg/mL y 0-300 pg/mL para IL-10 e IL-1α respectivamente. El ELISA se realizó en placas de 96 pocillos pretratadas con un Ac dirigido a la citoquina de interés, en la que se incubaron overnight a 4°C las diluciones de la curva de calibración y muestras. Una vez culminada la incubación, se lavó con solución de lavado 4 veces (ciclo de lavado) y se incubó con Ac de detección biotinilados (1:80) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se realizó un ciclo de lavado y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente en agitación con estreptavidina, que se une selectivamente a la biotina, conjugada a peroxidasa de rábano (HRP). Se realizó un nuevo ciclo de lavado y se incubó con el reactivo colorimétrico tetrametilbencidina (TMB), sustrato de la HRP, por 30 minutos en agitación a temperatura ambiente protegido de la luz. Se detuvo la reacción por agregado de "solución stop" ácida y se midió absorbancia a 450 nm inmediatamente en lector de placa Varioskan Flash. Las concentraciones de IL fueron calculadas utilizando los parámetros de las curvas de calibración correspondientes.

3. Determinación de expresión proteica

La expresión proteica en los macrófagos fue estudiada por la técnica Western Blot. Se evaluó la expresión en lisados celulares de monocitos, M_{NV} , M_{LPS} y M_{IL-4} de forma basal y posterior al estímulo con zym por 90 minutos. Para lisar las células, se lavaron con dPBS y se incubaron en 70-100 µL del amortiguador *Radioimmunoprecipitation assay* (RIPA: 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1%, 0.5% sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, pH 8.0) en frío y agitación por 15 minutos. Se levantaron las células con scraper en frío y se centrifugaron a 15000 g por 20 minutos a 4°C, conservando los sobrenadantes a los que se añadió inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, #S8820) y se almacenó a -20°C. Posteriormente se diluyeron los lisados en tampón de muestra (Tris-HCI 62.5 mM, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.005%, pH 6.8) Alternativamente, se realizaron lisados levantando las células directamente en tampón de muestra con inhibidor de proteasas más DNAsa para degradar los ácidos nucleicos y así disminuir la viscosidad de la muestra. Previo al sembrado, se incubaron las muestras a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Se realizaron electroforesis desnaturalizantes en geles de acrilamida 10% (LOXs, COXs) o 15% (FLAP, Arginasa1) con SDS (SDS-PAGE). Se sembraron 10 - 20 µL de muestra equivalentes ~2x10⁵ células/ carril y se utilizó un marcador de peso molecular (PM) comercial (New England Biolabs #P7712). Las corridas se realizaron en sistema BioRad a 20 V en tampón de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% v/v en agua destilada, pH 8.3). Se transfirieron las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa en sistema húmedo a 20 V overnight en cámara fría o a 100 V por 2 horas en hielo, en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, MeOH 20% v/v en agua destilada, pH 8.3). Para controlar la calidad de la transferencia se realizó un tinción reversible de las membranas con colorante Ponceau (Ponceau S 0.1%, Ácido acético 5% en agua destilada). Seguidamente, se bloqueó la membrana con leche bovina descremada en polvo al 5% en PBS mediante incubación por 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Las membranas blogueadas fueron incubadas con Ac primarios (Apéndice 2) overnight en agitación a 4°C. Como control de carga se marcó las proteínas del citoesqueleto β-actina o α-tubulina por coincubación con el Ac primario de interés o incubación secuencial por 60 minutos a temperatura ambiente. Una vez culminada la incubación con Ac primario, se lavaron las membranas con PBS 0.1% tween 20 (solución de lavado) por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación (ciclo de lavado). El siguiente punto fue la incubación con Ac secundarios a dilución 1:15000 en solución de lavado por 60 minutos en agitación a temperatura ambiente y oscuridad. Se utilizaron Ac de emisión en el rango infrarrojo (IR), IR-Dye-800 e IR Dye-6b0 (Li-COR Biosciences) anti-rabbit o anti-mouse de acuerdo a la especie de origen de cada Ac primario. Se realizó un ciclo de lavado y se revelaron las membranas en un sistema de detección de fluorescencia en el IR (Odyssey, Li-COR Biosciences) con detectores a λ =700 y 800 nm.

El procesamiento de las imágenes adquiridas se realizó con el programa Image Studio Lite. Para la densitometría se utilizó las imágenes originales y para la presentación de los resultados se aplicaron filtros de ruidos y ajustes de brillo y contraste. En los casos en que interesaba analizar únicamente algunos de los carriles de la membrana, se recortó la imagen respetando la posición relativa de los fragmentos en la imagen original. Se seleccionaron imágenes representativas de los resultados de experimentos independientes, indicando el número (n) de réplicas y donantes para cada proteína. Para comparar la expresión entre fenotipos se normalizó la intensidad de señal de la proteína de interés con la del control de carga del mismo carril (intensidad normalizada).

Para las proteínas 5-LOX y 15LOX2 se verificó la capacidad de detección y especificidad cruzada de los anticuerpos anti-5-LOX y anti-15-LOX2 mediante dot blot y western blot utilizando proteínas recombinantes disponibles en el laboratorio. El no reconocimiento de las demás isoformas y la especificidad de los demás anticuerpos LOX por sus correspondientes isoformas, se asumen en base a lo reportado en las especificaciones de los proveedores ya que no se cuenta con controles positivos.

4. Análisis de la localización subcelular de proteínas

Para determinar la localización subcelular de las LOX y FLAP se realizó una inmunofluorescencia indirecta y se obtuvieron imágenes por microscopía confocal con macrófagos derivados de monocitos de sangre. Para ello, se plaquearon en una cámara con portaobjeto de plástico (permanox) los PBMC (~5-7 x 10⁵ células/ pocillo) o directamente los macrófagos polarizados (~1,5 x 10⁵ células/ pocillo) en medio de cultivo con 10% SBF y se dejaron adherir a 37°C por 6 horas. Se fijaron con paraformaldehído 3.7% en agua por 10 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con tritón 0.1% en PBS por 15 minutos a 37°C y se bloquearon con BSA 2% en PBS por 60 minutos a temperatura ambiente. Se

incubaron las diferentes condiciones con Ac primarios anti-5-LOX, anti-15-LOX1 y/o anti-FLAP en PBS 0.1% tween 2% BSA overnight a 4°C en ambiente humidificado. Posteriormente, se incubaron con Ac secundarios Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 594 y/o Alexa Fluor 637 a dilución 1:1000 en PBS 0.1% tween por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se marcó la cromatina nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1:1000 y el citoesqueleto de actina con 2 gotas/ mL de Faloidina-ActinRed555 (Invitrogen #R37112) por 30 minutos a temperatura ambiente. Tras cada uno de los pasos anteriores se realizó un ciclo de 3 lavados con PBS 0.1% tween. Finalmente, se montaron las placas en cubreobjetos de vidrio con un medio de montaje comercial. Se utilizaron las muestras en fresco o se guardaron en ambiente humidificado oscuro a 4°C. Además de las muestras, se incluyeron controles de autofluorescencia con células únicamente marcadas con DAPI y de inespecificidad de la tinción de los Ac secundarios con células no incubadas con Ac primarios.

Se adquirieron imágenes en un microscopio láser confocal (Leica SP5) con láseres de 405, 488, 543 y 633 nm. Se utilizó un objetivo 63X en medio aceite con una apertura numérica de 1.4. Se configuraron los parámetros de adquisición corrigiendo la señal de fondo con los controles negativos y se mantuvo igual ganancia, offset y potencia de los láseres durante la adquisición de todas las imágenes. Se obtuvieron imágenes de 1024 x 1024 píxeles de al menos 3 campos de cada réplica en vectores x e y. Las imágenes fueron extraídas en formato .tif y el procesamiento y análisis se realizó en el programa *Fiji is Just Imagej* (Fiji) ¹³⁷. Se presenta una selección manual a escala de fragmentos de 512 x 512 píxeles de campos representativos de las réplicas de cada ensayo.

5. Identificación y cuantificación de oxilipinas

El perfil de oxilipinas producidas por los fenotipos macrofágicos fue analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masa en tándem (MS/MS). El método de extracción, detección y cuantificación de oxilipinas en muestras biológicas empleado (**Figura 16**) fue desarrollado previamente en el laboratorio ¹³⁸.

5.1. Recolección de muestras

Se colectaron de forma independiente los sobrenadantes acumulados durante un determinado tiempo previo y posterior al estímulo con zym en dPBS o RPMI. Además de analizar las oxilipinas liberadas al medio extracelular por los macrófagos, se realizaron medidas en muestras de lisados celulares y en muestras totales incluyendo tanto sobrenadantes como lisados (**Figura 16.1**).

5.2. Preparación de las muestras

Dada la alta susceptibilidad oxidativa de los mediadores lipídicos a temperatura ambiente, una vez colectadas las muestras se les añadió el antioxidante butil hidroxitolueno (BHT) al 0.025% m-v y el análisis se hizo en el mismo día o dentro de las siguientes 48 hs. Para promover la precipitación proteica se añadió MeOH en un concentración final de 10 %v-v conteniendo un mix de estándares internos (IS). Las muestras se mantuvieron a -20°C por 30 minutos, se vortexearon, se centrifugaron a 14000 g por 30 minutos a 4°C y se conservaron los sobrenadantes del precipitado (**Figura 16.2**). En los casos en que se procesaron las muestras a las 24 o 48 hs, se centrifugaron con BHT a 5000 g por 10 minutos a 4°C y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. El descongelado se realizó de forma progresiva (-20°C *overnight*, hielo \sim 2 hs) y se procedió de la forma descrita anteriormente.

Una vez separados los sobrenadantes del precipitado proteico, se realizó una extracción en fase sólida (SPE) de las oxilipinas utilizando como fase estacionaria cartuchos poliméricos Strata X (33 µm, 60 mg, 3 mL; Phenomenex). Las columnas fueron activadas con MeOH 100%

y equilibradas con MeOH 10% v-v en agua pH= 3 (HCI). Se sembraron las muestras por encima de la fase líquida, se lavaron los cartuchos con MeOH 10% v-v, pH 3, asistido con bomba de vacío (~250 mmHg) y los ductos con MeOH 100%. Las oxilipinas fueron eluidas en 1 mL de MeOH 100% directamente sobre un tubo eppendorf (**Figura 16.3**).

El MeOH fue evaporado a presión reducida con temperatura controlada a 45°C en un concentrador de vacío (Speedvac) en ∞ 2 horas y se llevó a un volumen y concentración finales de 50 µL de MeOH 50% (**Figuras 16.4 y 16.5**). Se incluyeron controles de medio de cultivo RPMI o PBS que fueron sometidos al mismo procedimiento.

5.3. Análisis de oxilipinas

Se buscaron por HPLC- MS/ MS oxilipinas derivadas del LA, AA, EPA y DHA por vías COX, LOX, CYP y no enzimática (no enz) (**Figura 16.6**). La lista de analitos se detalla en el Apéndice 1.1.

Se realizó una cromatografía en fase reversa en un sistema HPLC Infinity 1260 (Agilent) con una columna Luna C18(2) (5 μ m, 2,0 x 100 mm, 100 A; Phenomenex) a 30°C. Como solventes se utilizó ácido fórmico 0.1% en agua (A) y ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo (B). El flujo fue de 300 μ L/minuto y el gradiente de solventes fue el siguiente: i) isocrático a 30% B de 0 a 0.1 minutos; ii) incremento lineal a 95% B hasta los 11 minutos; iii) isocrático a 95% B hasta los 15 minutos; iv) decremento a 30% B en 0.1 min; v) isocrático a 30% B por 5 minutos. La separación cromatográfica de los estándares externos con este protocolo se ilustra en el Apéndice 1.2. La capacidad de detectar las oxilipinas en medio de cultivo RPMI fue verificada y se presenta en el Apéndice 1.3.

El espectrómetro de masas utilizado es un QTRAP 4500 (ABSciex, Framingham, MA, USA) que consta de una fuente de ionización de electrospray (ESI) y un analizador híbrido triple cuadrupolo (Q) - trampa iónica lineal. El ESI fue utilizado en modo negativo y el análisis se realizó en modo MRM (del inglés Multiple Reaction Monitoring) que permite seguir de forma simultánea múltiples transiciones ion precursor / ion producto características del patrón de fragmentación de cada analito. Brevemente, en la fuente de ionización las oxilipinas se ionizan liberando el protón del grupo carboxilo dando lugar a la formación del ion pseudomolecular [M-H]- (ion precursor) que es filtrado en el primer cuadrupolo (Q1). En el Q2 un pequeño voltaje excita al ion precursor que colisiona con moléculas de nitrógeno fragmentándose, y se genera un perfil de iones producto que ingresan al Q3 para una nueva etapa de filtración en la que se selecciona al ion producto. Finalmente, en el detector los iones crean una corriente que es convertida en un pulso de voltaje. Las transiciones seguidas por MRM se detallan en el Apéndice 1.3. Durante el trabajo de tesis se utilizaron dos estrategias de MRM: i) Scheduled MRM (sMRM®) en que se buscó cada analito en un tiempo específico, utilizada para los ensayos con macrófagos THP-1; ii) MRM en periodos en que se dividió el análisis de MS en 4 periodos temporales y se distribuyó los analitos en estos 4 grupos de acuerdo a su tiempo de retención. Este segundo abordaje fue el empleado en todos los ensayos con macrófagos primarios. Esta diferencia responde únicamente al avance en el desarrollo del método de análisis de oxilipinas en el laboratorio, que se llevó a cabo en paralelo a esta tesis. Conceptualmente se puede considerar que se analizaron todas las muestras por el mismo método.



Figura 16. Protocolo de identificación y cuantificación de oxilipinas en cultivos de macrófagos por extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). Los pasos numerados se describen en el texto. AA: Ácido araquidónico, DHA: Ácido docosahexaenoico, EPA: Ácido eicosapentaenoico, IS: estándares internos. Esquema creado con BioRender.com

5.4. Procesamiento de datos

Para cuantificar las oxilipinas se construyeron curvas de calibración utilizando estándares externos (ES) de concentración conocida más IS deuterados con los cocientes *area ratio vs mass ratio* (ES/ IS). Las curvas de calibración utilizadas fueron adquiridas previamente empleando MeOH como solvente y aquellos compuestos para los que no se contaba con ES fueron cuantificados con la curva de calibración de la oxilipina más similar (calibrante) según se describe en el Apéndice 1.4. Para definir el límite de detección y límite de cuantificación (LOD y LOQ por sus siglas en inglés) de cada oxilipina se emplearon criterios de cociente señal/ ruido (S/N) internacionalmente aceptados ¹³⁹. Se calculó el *area ratio* del blanco más 3 veces su desvío estándar para el LOD y 10 veces su desvío estándar para el LOQ (LOQ₁₀), ambos detallados en el Apéndice 1.5.

El mix de IS añadido a las muestras contenía los siguientes lípidos deuterados: (d4)6k PGF1 α , (d4)TxB2, (d4)PGF2 α , (d4)PGE2, (d4)PGD2, (d8)15-HETE, (d8)12-HETE, (d8)5-HETE, (d4)8-isoPGF2 α , (d11)5-isoPGF2 α , (d5)RvD1, (d5)Mar1, (d4)RvE1, (d4)13-HODE y (d4)9-HODE (Cayman Chemicals). La cantidad de cada IS por muestra fue de 1000 o 1250 pg excepto para Mar1 que fue 500 o 625 pg.

En cada ensayo se verificó en primer término que en el cromatograma de corriente iónica total de las muestras se observara el patrón característico, atribuyendo las modificaciones drásticas en el mismo a posibles errores en la SPE. El procesamiento de los cromatogramas primarios de cada analito se realizó combinando análisis automatizado con el programa Multi Quant Pro (Versión 2.1, ABSciex) y posterior inspección manual. Se integraron las áreas de los picos que cumplieron los criterios de relación S/N mencionado para el LOQ₁₀. Las áreas obtenidas para cada analito fueron divididas por las de sus respectivos IS en la misma muestra (*area ratio*) y la masa de cada analito fue calculada utilizando la curva de calibración externa.

Por último, para corregir el error atribuible a la variabilidad en el tamaño de la muestra de cultivo, la masa de los analitos cuantificados fue normalizada por el número de células o por masa de proteínas totales en las células de las que se obtuvo cada sobrenadante. Para calcular la masa proteica, una vez colectados los sobrenadantes se levantaron las células en PBS con inhibidor de proteasas. Se realizó una lisis por congelamiento rápido (3 ciclos de 5 minutos en N₂ líquido) y los lisados fueron centrifugados a 5000 g por 5 minutos a 4 °C. La absorbancia a 210 nm (Abs₂₁₀), correspondiente a la absorbancia del enlace peptídico de las proteínas, fue medida empleando por espectrofotometría de flujo continuo utilizando un equipo de HPLC, tanto en las muestras como estándares de BSA en PBS. Se integraron las áreas de absorbancia, se restó la absorbancia del PBS con inhibidor a la obtenida para las muestras y se construyó una curva de calibración con BSA en PBS para calcular las concentraciones de proteína en cada muestra (Anexo 5).

6. Análisis estadístico

El análisis descriptivo de los datos primarios (cuantificación, cálculo de frecuencias, obtención de medidas de resumen) y la normalización de los mismos fueron descritos en cada apartado. El análisis comparativo y la construcción de gráficos se llevaron a cabo en el programa *Prism* (Versión 8.4.3, *GraphPad Software Inc*). Se resumen los resultados cuantitativos de comparación entre grupos con gráficos de barras de las medias y barras de error con el desvío estándar (DE). Los estadísticos y pruebas empleados en cada ensayo se indican en su Leyenda. Se contrastaron las medias entre dos grupos con la prueba de T para muestras independientes o en su defecto a prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Para comparar tres o más grupos se aplicó una prueba de ANOVA univariada y de encontrarse diferencias entre medias se realizaron comparaciones grupo contra grupo con la prueba de Tukey's. Para analizar el efecto de dos variables se aplicó pruebas de Anova de dos factores. Como nivel de significancia se consideró un $\alpha = 5\%$ o valor p < 0.05 y se indica en los gráficos con asteriscos las comparaciones que arrojaron diferencias estadísticamente significativas.

Para los experimentos realizados con cultivos primarios, se registró el código de donante de cada muestra. El número de réplicas de cultivo y el número de donantes se especifican en cada resultado. En los resultados en los que resulta de relevancia especificar el donante, se presenta precedido el código precedido del símbolo #.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de los fenotipos de macrófagos humanos

Para estudiar las LOXs de fenotipos de macrófagos humanos y su relación con la producción de oxilipinas a nivel celular, se trabajó con dos cultivos de macrófagos polarizados hacia los extremos del espectro fenotípico. Por un lado, los macrófagos derivados de monocitos de sangre, modelo celular humano de referencia para el estudio de la inflamación. Por otro lado, los macrófagos derivados de la línea de monocitos humanos THP-1. La caracterización de los modelos se llevó a cabo mediante el análisis de la morfología celular, el estudio de expresión de marcadores fenotípicos de superficie y el estudio de la producción de CQ características. Para los macrófagos derivados de monocitos de sangre, modelo celular de referencia en la literatura de resolución de la inflamación, se analizaron los cambios durante el proceso de diferenciación de los monocitos a macrófagos naive con GM-CSF o M-CSF (M_{NV(GM-CSF)}, M_{Nv(M-CSF}) y tras su polarización con LPS o IL-4 para obtener los fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4}, respectivamente. Los macrófagos derivados de monocitos THP-1 fueron evaluados en este trabajo como una línea celular representativa del modelo de macrófagos derivados de monocitos primarios, con el fin de aplicarlas al estudio de las LOX y las oxilipinas que producen. Se analizaron los cambios generados por la diferenciación de los monocitos a macrófagos naive (M_{NV}) con PMA y la inducción de los fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4}.

1.1. Rendimiento de la purificación de monocitos de sangre

Los macrófagos derivados de monocitos de sangre se obtuvieron a partir de muestras de sangre fresca de donantes sanos. Se obtuvo un rendimiento de PBMCs de 1.0- 1.7x10⁶ células/mL de sangre, lo cual está en el orden del límite inferior del rango de referencia ⁴. Se extrajeron en promedio 20 mL de sangre por lo que se obtuvieron 2.0 - 3.4x10⁷ PBMCs por muestra, muy por debajo de los ~6x10⁸ PBMCs por muestra que se obtienen a partir de concentrados leucocitarios (*buffy coats* o *leukopacks*) de bancos de sangre ³⁸. La proporción promedio de monocitos en los PBMCs es de un 15% ³⁸, con lo cual en las muestras de esta tesis se estima que se partió de 3 - 5x10⁶ monocitos totales para generar los macrófagos.

1.2. Morfología celular y adherencia

La morfología de las células primarias fue analizada por microscopía de campo claro (**Figura 16**) para determinar los cambios inducidos durante la diferenciación y polarización. En los PBMCs se identificaron dos poblaciones celulares predominantes: i) una de células de mayor tamaño con un diámetro de 15 - 22 µm, traslúcidas, redondeadas, con un único núcleo grande en forma de C, características de los monocitos; ii) otra población de células de tamaño pequeño con un diámetro de 8 - 12 µm, redondeadas, de núcleo grande bordeado de un fino reborde de citoplasma, correspondientes a linfocitos (**Figura 17A**). Además, se observó una mínima proporción de eritrocitos, plaquetas y restos celulares. Ambas condiciones *naive* presentaron un mayor tamaño y una forma más irregular que los monocitos (**Figura 17B**). En los macrófagos polarizados se observó un mayor aumento de tamaño con una importante heterogeneidad morfológica intragrupo. A pesar de ello, se logró establecer diferencias cualitativas, identificando en los M_{LPS} mayor proporción de células ahusadas con múltiples prolongaciones de membrana y en los M_{IL-4} mayor cantidad de células ameboides rodeadas de un halo citoplasmático particular. Tanto en las condiciones *naive* como en las polarizadas se observó una proporción minoritaria de linfocitos remanentes (**Figura 17C**).


Figura 17. Análisis por Microscopía de campo claro de cambios morfológicos durante la diferenciación y polarización de macrófagos derivados de PBMCs. Fotografías de PBMCs (A), $M_{NV(GM-CSF)}$ y $M_{NV(M-CSF)}$ (B) y M_{LPS} y M_{IL-4} (C). Se diferenciaron $2x10^6$ PBMCs por pocillo en placa de 6 pocillos y se polarizaron según se describe en Materiales y métodos. Las imágenes fueron obtenidas con objetivos 20X (A) o 40X (B y C). El procesamiento se realizó en FiJi: se calibraron, se ajustaron a igual escala (barra= 50 µm) y se corrigió la señal de fondo. Para la visualización ajustó el brillo y contraste. Se señalan células con características de linfocitos (flechas blancas) y de monocitos o macrófagos (flechas negras). La selección es representativa de 3 campos de 3 réplicas de cultivo y de lo observado para los demás donantes.

Asimismo, se obtuvieron descriptores de tamaño y forma de las células a partir de una selección de imágenes de microscopía de campo claro (**Figura 18**). Se midieron el área y perímetro de cada célula, parámetros de los que surge un valor de circularidad en el rango 0-1, siendo 1 un círculo perfecto. Ambos subgrupos *naive* presentaron un aumento de área con respecto a los monocitos y la polarización generó un mayor incremento de área. En cuanto a la forma, se observó un descenso en la circularidad promedio del campo de 0.97 en los monocitos a 0.70 y 0.75 en los M_{NV(GM-CSF)} y M_{NV(M-CSF)}, respectivamente. A su vez, en los M_{LPS} y M_{IL-4}, se apreció una discreta pérdida de circularidad a valores de 0.60 y 0.71 respectivamente.



Figura 18. Leyenda en la siguiente página

Figura 18. Análisis descriptivo de tamaño y forma por Microscopía de campo claro durante la diferenciación y polarización de macrófagos derivados de PBMCs. A. Imágenes de PBMCs, M_{NV(M-CSF)}, M_{LPS} y M_{IL-4} con sus gráficos de Circularidad *vs* Área. Se plaquearon 2 × 10⁶ PBMCs por pocillo en placa de 6 pocillos, que se diferenciaron y polarizaron según se describe en la sección de Métodos. Las fotografías fueron obtenidas en un Microscopio óptico de campo claro con objetivos 20X (PBMCs) o 40X (macrófagos *naive* y polarizados). El procesamiento y análisis de imágenes se realizó en Fiji: se calibraron y ajustaron a igual escala (barra de escala= 50 μm), se corrigió la señal de fondo y los bordes celulares fueron resaltados y seleccionados (líneas amarillas) para su análisis. Se graficó la Circularidad (4πA/P², adimensional) *vs* Área (μm²) de las células de cada campo. Se marcan en cada gráfico (cuadros anaranjados) las células consideradas monocitos o macrófagos. Se describe la media ± desvío estándar (DE) de cada condición. Monocitos: n= 30 células; M_{NV(M-CSF)}: n= 29 células; M_{NV(M-CSF)}: n= 24 células; M_{LPS}: n= 33 células; M_{IL-4}: n= 26 células. La selección de imágenes es representativa de al menos 3 campos de 3 réplicas de cultivo de 1 donante y de lo observado para los demás donantes.

Este análisis de carácter descriptivo refleja las características observadas en los cultivos obtenidos a partir de sangre de los demás donantes incluídos en el trabajo. Los resultados de área celular coinciden parcialmente con los de Rostam y col. En dicho trabajo reportan un aumento de área de los monocitos a los macrófagos naive y un incremento de área entre la condición naive y los M(IL-4) relativamente similar al observado en esta tesis, pero no para los M(IFN-y) que presentaron un tamaño similar al de macrófagos naive. En cuanto a la forma de las células, la descripción coincide: redondeadas en la condición de monocitos, algo más irregulares en las naive, irregular y con algunas ahusadas en los M(IFN-y), y aplanadas o expandidas en el fenotipo M(IL-4)⁶¹. Las diferencias entre los fenotipos simil M1 del trabajo citado con los obtenidos aquí, pueden deberse a que son M(IFN-y) y M(LPS), respectivamente. La morfología de los macrófagos primarios polarizados fue también estudiada mediante los parámetros de dispersión lumínica Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) por citometría de flujo, vinculados al tamaño celular y complejidad interna respectivamente (Figura 19). Excluyendo los desechos celulares (debris), se detectaron dos poblaciones celulares. La población predominante se localizó en el cuadrante superior derecho (R3: 89% en M_{LPS} 91% en M_{II-4} en promedio) de mayor tamaño y complejidad interna, características de macrófagos. La segunda nube de células de tamaño pequeño y menor granularidad corresponde a linfocitos remanentes de los PBMCs y representó una proporción menor (R1: 8% en MLPS, 4% en MIL-4 en promedio). La nomenclatura de las regiones de poblaciones celulares en el gráfico de FSC vs SSC se mantendrá para los restantes análisis (R1: linfocitos, R3: macrófagos).

La identificación de fenotipos macrofágicos por características intrínsecas se ha desarrollado en los últimos años. Danhauser y col. demostraron la capacidad de discriminar con alta precisión fenotipos de macrófagos derivados de monocitos humanos con imágenes de microscopía mediante técnicas de aprendizaje automático (machine learning). Descriptores como el diámetro y la circularidad celular obtenidos por microscopía de campo claro y la relación de áreas núcleo / citoplasma obtenida marcando estructuras por microscopía de fluorescencia, clasifican adecuadamente monocitos, macrófagos naive obtenidos con GM-CSF y con M-CSF ¹⁴⁰. Rostam y col. lograron distinguir además M(IFN-y) y M(IL-4) con imágenes de microscopía de fluorescencia en función del área celular, el área nuclear, las distribuciones e intensidades de la tinción del citoesqueleto y la cromatina ⁶¹. Más recientemente, se logró la clasificación de un espectro más amplio de macrófagos derivados de monocitos de sangre por estas técnicas ¹⁴¹. Otra característica intrínseca de las células aprovechada para identificar poblaciones de macrófagos es la autofluorescencia atribuida a la excitación de fluoróforos endógenos como nucleótidos de adenina, riboflavinas, coenzimas de flavina y organelos como la mitocondria y los lisosomas ⁶². El espectro de emisión de la autofluorescencia de los macrófagos excitados con un láser de 488 nm se centra entre 500 - 650 nm 142. La

diferenciación de fenotipos macrofágicos de células RAW264.7 y de macrófagos de piel humanos y murinos por autofluorescencia específica, ha mostrado ser robusta y se atribuye a diferencias en la actividad metabólica y organización mitocondrial entre fenotipos ^{62,142}.

En relación a la adherencia al soporte de cultivo (otro indicador de diferenciación macrofágica ⁴³), parte de las PBMCs plaqueadas se adhirieron progresivamente al sustrato y al culminar la incubación de 7 días con los factores de crecimiento correspondientes, se encontraban fuertemente adheridas. Los macrófagos *naive* y polarizados mantuvieron esta capacidad de adhesión al sustrato tras ser levantados y plaqueados nuevamente.

En síntesis, el análisis realizado indica que se logró diferenciar los monocitos de sangre a macrófagos y se obtuvieron dos fenotipos de macrófagos que presentan algunas características morfológicas diferentes, aunque en ambos casos destaca una gran diversidad de formas y tamaños.



Figura 19. Identificación por Citometría de flujo de poblaciones celulares en células derivadas de PBMCs polarizadas. Se plaquearon ~1 x 10^6 PBMCs por réplica en placa de 24 pocillos, se diferenciaron y se polarizaron a M_{LPS} y M_{IL-4} . Se suspendieron ~5 x 10^4 células en dPBS, se adquirieron 10000 eventos en un Citómetro de Flujo *FacsCalibur* y se analizó la dispersión en FSC-H *vs* SSC-H en *FlowJo*. Se excluyen las *debris* y se definen con el *gate* de células dos regiones (R1: linfocitos, R3: macrófagos). Representativo de n= 2 réplicas de cultivo de 1 donante.

Por otro lado, se generaron los macrófagos derivados de monocitos THP-1 por diferenciación con PMA. El rango de concentraciones de PMA utilizadas para la diferenciación en la

bibliografía oscila entre 16 y 620 nM (10 a 400 ng/mL), se ha reportado que concentraciones de 8- 25 nM logran baja adherencia, mientras que concentraciones mayores a 80 nM disminuyen la viabilidad y sesgan los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio. El tiempo de diferenciación reportado varía entre 1 y 5 días de estimulación con PMA continua seguidos de entre 1 y 3 días de descanso en medio de cultivo libre de PMA. La densidad óptima de sembrado es de 5 x 10⁵ monocitos/ mL y el tiempo óptimo de incubación continua con PMA es de 48 horas, seguido de al menos 48 horas de descanso en medio libre de PMA ^{44,130–132}. En base a estos antecedentes, para la puesta a punto del modelo de macrófagos THP-1, se evaluaron los cambios morfológicos y la adherencia tras la incubación por 48 horas con PMA en el rango de 25 a 200 nM (Figura 20). Esta incubación indujo la adherencia de prácticamente la totalidad de las células al soporte, un aumento homogéneo de tamaño y una pérdida de la forma redondeada uniforme característica de los monocitos, todos estos indicadores de la diferenciación a macrófagos. Estos cambios se sostuvieron luego de 48 horas de descanso en medio libre de PMA y fueron cualitativamente similares para las diferentes concentraciones de PMA. A su vez, el número de células adherentes tras la diferenciación, no presentó variaciones significativas entre las concentraciones de PMA (Figura 20A). En función de estos resultados y para obtener M_{NV} no sesgados hacia ningún fenotipo, se definió diferenciar los monocitos THP-1 con PMA 25 nM. La polarización de los M_{NV} provocó una diversificación de la morfología, con células algo más ahusadas en M_{LPS} y ameboides en M_{IL-4}, a semejanza de lo observado en los macrófagos primarios (Figura 20B).



Α

В



Figura 20. Puesta a punto de la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos con PMA. A. Se contaron las células adherentes luego de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de PMA seguidas de 48 horas de descanso en medio libre de PMA. Se grafica la media del número de células adherentes relativizado a la condición de PMA 25 nM. n=2 ensayos independientes. Comparación de medias con ANOVA de Brown- Forsythe de 1 factor para muestras independientes con varianzas desiguales, valor p=0.9319. B. Morfología de macrófagos THP-1 polarizados a fenotipo M_{LPS} y M_{IL-4}. Fotografías obtenidas en un microscopio de campo claro con cámara externa, objetivo 20X, imágenes a igual escala no calibradas. Representativas de n=3 campos de 3 réplicas. Las flechas indican ejemplos de células a cuya morfología se hace referencia en el texto.

De esta manera, también se logró obtener macrófagos a partir de monocitos THP-1, polarizados a dos fenotipos con morfologías diferenciadas. Contrario a los macrófagos primarios, la morfología de los macrófagos THP-1 polarizados fue relativamente homogénea dentro de cada condición.

1.3. Expresión de moléculas de superficie

Para identificar los fenotipos macrofágicos de las células primarias se llevó a cabo una citometría de flujo multicolor (**Figura 21**) que fue analizada con una estrategia de gating jerárquico. En el gráfico de FSC *vs* SSC, alrededor de la mitad de los eventos de alta calidad en la adquisición correspondieron a *debris* más células pequeñas de membrana dañada (de acuerdo a lo reportado en ¹⁴³). Estos eventos fueron excluidos del análisis y dentro de las células se seleccionaron los eventos individuales (*singlets*). Dentro de las *singlets*, las células vivas TO-PRO-3⁻ de permeabilidad de membrana conservada, representaron en promedio un 80% M_{LPS} y un 83% en los M_{IL-4}. En las células vivas se identificó la población de interés, macrófagos CD11b⁺, con un promedio de positividad de 15% en M_{LPS} y 7% en M_{IL-4}. Para las CD11b⁺, se analizó la expresión de los marcadores de fenotipo M1 (CD54 y CD80) en las muestras de M_{LPS} y fenotipo M2 (CD163 y CD206) en las muestras de M_{IL-4}, usando *gates* definidos con los controles FMO (Apéndice 3.1). En M_{LPS} se identificó un promedio de 96% de células CD80⁺ mientras que no se detectó señal de CD54 (**Figura 21A**). Con la misma estrategia, en M_{IL-4} se obtuvo un promedio de 95% de células CD206⁺ pero no se identificó CD163⁺ (**Figura 21B**).





Figura 21. cont. en siguiente página

С	M _{LPS}	M _{IL-4}	D	M _{LPS}	M _{IL-4}
Población (población parental)	Media (% de poblac	i ± DE ión parental)	Población	Media ± DE (% de CD11b ⁺)	
Células (Eventos)	50,2 ± 0,8	45,4 ± 0,4	CD54 ⁺	0,3 ± 0,2	
Vivas	00 4 + 0 7	045.07	CD80⁺	95,1 ± 1,1	
(Singlets)	90,4 ± 0,7	94,5 ± 0,7	CD163⁺		0,1 ± 0,1
CD11b⁺ (Vivas)	11,7 ± 0,4	5,4 ± 0,8	CD206⁺		93,8 ± 1,7

Figura 21. Análisis por Citometría de flujo de expresión de marcadores fenotípicos de superficie en células derivadas de PBMCs polarizadas. Se diferenciaron ~6 x 10⁶ PBMCs por réplica y se polarizaron ~3 x 10⁵ células según se describe en Métodos. Se bloquearon los receptores Fc con suero humano y se tiñeron las células con Ac conjugados (M_{LPS} : anti-CD11b PE-CY7, anti-CD80-PE y anti-CD54 FITC; M_{IL-4} : anti-CD11b PE-CY7, anti-CD206 PE y anti-CD163-AlexaFluor488) más la sonda sonda de viabilidad TO-PRO-3. Se presenta el análisis jerárquico realizado en *FlowJo para* los M_{LPS} (**A**) y M_{IL-4} (**B**). Se realizó una limpieza de anomalías automatizada, se excluyeron las *debris* conservando las células, se seleccionaron los eventos de célula única (singlets) y dentro de estos las células TO-PRO-3 (vivas). Se identificó la población de interés de macrófagos CD11b⁺ en los que se analizaron los marcadores fenotípicos con gates definidos según los controles FMO (Apéndice 3.1.1). Se presentan gráficos de puntos representados con pseudocolor e histogramas de intensidad. Se resumen la media ± desvío estándar (DE) del % de células positivas respecto a la población parental tanto para las etapas de selección de la población de interés (**C**) como para la expresión de los marcadores fenotípicos en la misma (**D**). n=3 réplicas de cultivo.

Resulta llamativa la elevada proporción de *debris* y células no viables. Una posible explicación, es que las células plaqueadas estuvieron expuestas a temperatura ambiente en medio de cultivo durante 30 minutos previo a ser levantadas para el ensayo. Otro posible factor contribuyente son los múltiples pasos de vortexeado, considerando la fragilidad mecánica que mostraron los macrófagos primarios durante la puesta a punto del modelo.

Es también llamativo el porcentaje de células CD11b⁻ observadas. En concordancia, a la inspección por microscopía óptica se observó una mayor proporción de células adherentes o semi-adherentes con características de linfocitos y monocitos respecto a lo habitual. Cabe aclarar que las características morfológicas de las células con aspecto de macrófagos en cada fenotipo sí se ajustaban a lo descrito en el subapartado anterior. En función de estas observaciones, se decidió analizar la consistencia de los resultados obtenidos en la citometría multicolor con los del estudio de identificación de poblaciones celulares por FSC vs SSC de la figura 19, considerando a estos últimos representativos de las condiciones experimentales habituales del trabajo de tesis (Figura 22). Para ello, se construyeron gráficos de puntos de FSC-A vs SSC-A con los datos de la citometría multiparamétrica (presentada en la figura 20) utilizando el gating de células vivas (Figura 22A). El primer aspecto a destacar es que respecto a la figura 19, se identifican una mayor proporción de células compatibles con linfocitos (R1: 28% en M_{LPS.} 39 % en M_{IL-4}) y una menor proporción de células compatibles con macrófagos distribuídas en el cuadrante superior derecho (R3: 14% en M_{LPS}, 11% en M_{IL-4}). Además de las poblaciones comprendidas en R1 y R3, se observa en la figura 21A una nube densa de tamaño y granularidad intermedia (R2: 50% en M_{LPS} 39 % en M_{IL-4}). Esta población presenta las características de células monocíticas por lo que probablemente corresponde a monocitos sanguíneos en los que no se logró inducir de forma efectiva o completa la diferenciación. Se estima que un factor importante puede haber sido el aumento del número de células por réplica con respecto a ensayos previos, ya que la densidad celular es crítica para la viabilidad de células dependientes de interacciones intercelulares como los macrófagos. Una densidad muy elevada impide la adecuada adherencia de las células al sustrato y la prolongación de pseudopodia, lo que puede resultar en una pobre diferenciación ¹³¹.

Continuando con el análisis de la citometría multiparamétrica, resulta de interés identificar en cuál de las regiones de FSC-A vs SSC-A se posicionan los macrófagos polarizados CD80⁺ v CD206⁺ así como conocer si hay células positivas para estos marcadores fuera de los gates jerárquicamente seleccionados. Para responder a estas interrogantes, se realizó una proyección del marcaje con CD80 y CD206 en cada uno de gráficos originarios (backgating) (Figura 22B). Mientras que el marcador CD206 se expresó únicamente en CD11b⁺, CD80 se expresó también en una nube de células CD11b. Los monocitos sanguíneos tienen muy baja expresión de CD80⁵⁵, por lo que estas células corresponden probablemente a una etapa de diferenciación macrofágica incompleta. Se identificaron células CD80⁺ y CD206⁺ tanto dentro de las vivas como en las TO-PRO-3⁺, dato a interpretar con prudencia considerando que los marcadores de superficie se pueden encontrar intracelularmente y ser expuestos en células con la permeabilidad de membrana alterada. Finalmente, en el FSC vs SSC de todos los eventos, ambos marcadores predominan en la región correspondiente a la R3 y no se observan en R1, siguiendo la nomenclatura anteriormente utilizada. Se observa a su vez una densidad importante de células en la R2, en concordancia con la presencia de células positivas para los marcadores en la nube de CD11b-. Es oportuno mencionar que en todos los ensayos de citometría presentados, entre 10 - 15% de los eventos se concentraron en los márgenes de los gráficos de FSC vs SSC, principalmente en el cuadrante superior derecho. Esto indica que se perdieron células correspondientes a R3 en la adquisición y que se está subestimando la proporción de macrófagos. En línea con esto, en el FSC vs SSC del backgating se aprecia cómo, según la predicción de contornos de la población, es probable que gran parte de los macrófagos de mayor granularidad hayan quedado fuera del rango adquirido.



Figura 22. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares identificadas en el estudio de marcadores fenotípicos de superficie en células derivadas de PBMCs polarizadas. A. Distribución en FSC-A *vs* SSC-H de las células M_{LPS} y M_{IL-4} vivas. Gráfico superior: se delimitan las regiones de las poblaciones identificadas (R1: Linfocitos, R2: Monocitos, R3: Macrófagos) y se presentan las proporciones para ambos fenotipos en la tabla. Gráfico inferior: se discriminan en un gráfico representativo las células CD11b⁻ (anaranjado) y CD11b⁺ (celeste). Se indican las frecuencias relativas a la población parental (Vivas). Gráficos correspondientes a una réplica de M_{IL-4} . B. *Backgating* de las células CD80⁺ en las muestras de M_{LPS} y CD206⁺ de M_{IL-4} . En la columna central se describe el gate seguido de la población seleccionada (recuadros negros) para cada fila. Las células CD80⁺ o CD206⁺ se presentan en rojo. El experimento fue descrito en la Figura 20 y el análisis fue realizado en *FlowJo*.

Con respecto a la proporción de macrófagos de cada condición positivos para los marcadores fenotípicos, se puede concluir que se verificó una elevada expresión de CD80 en M_{LPS} y CD206

en M_{IL-4}. En cambio, para CD54 y CD163 que no fueron identificados en las respectivas muestras en las que se esperaba su inducción, no es posible descartar la expresión ya que no se cuenta con controles biológicos positivos ni se evaluó el funcionamiento del anticuerpo por otro método. Un aspecto a tener en cuenta es la elevada autofluorescencia de los macrófagos al ser excitados con un láser 488 con un espectro de emisión que se solapa con el de FITC y PE. Este es un fenómeno conocido que incluso ha permitido la aplicación de la medición de autofluorescencia como parámetro para la identificación de poblaciones de macrófagos en distintas condiciones 62,142. En el ensayo en cuestión, se observó una mayor autofluorescencia en FITC y PE para la población en R3 respecto a R2 y R1, acorde a los esperado (Apéndice 3.1.2). Considerando que la expresión de los antígenos es probablemente baja, esta autofluorescencia podría estar restringiendo la ventana de detección del fluoróforo. Para mejorar este punto, podrían utilizarse anticuerpos conjugados a fluoróforos con emisión en el color rojo donde los macrófagos presentan mucho menor emisión intrínseca. Otro aspecto a mejorar del diseño para estos marcadores son los controles de compensación. Dado que se utilizaron células primarias teñidas con el mismo anticuerpo, no se logró una buena resolución de los picos positivo y negativo en los histogramas (Apéndice 3.1.3), lo que se podría solucionar marcando en su lugar proteínas de alta expresión en las células con anticuerpos conjugados a los mismos fluoróforos. Discutidos los aspectos metodológicos, es importante aclarar que el perfil de expresión de los CD11b+ observado, coincide exactamente con lo reportado por Werz y col. 58. En dicho trabajo, verificaron la inducción de CD80 y CD206 en cada fenotipo a partir de las 48 hs de polarización, mientras que para CD54 y CD163 únicamente obtuvieron una expresión significativa luego de 72 hs de polarización.

En suma, de este análisis complementario de la citometría multiparamétrica en macrófagos derivados de PBMCs, se deduce que una gran proporción de células monocíticas no completaron su diferenciación a macrófagos. A pesar de ello, la población de monocitos parcialmente diferenciados expuestos a LPS expresó el marcador fenotípico CD80. Se infiere además, que por problemas en la adquisición, la cantidad de macrófagos analizados subestima aquella presente en las muestras. De mayor jerarquía, se concluye que los marcadores fenotípicos de superficie CD80 y CD206 se posicionaron fundamentalmente en el R3 de FSC-A *vs* SSC-A (**Figura 22**), población que en las condiciones habituales de experimentación representó alrededor del 90% de las células (**Figura 19**).

Algunos aspectos a optimizar del protocolo en base a estos resultados. Primero, corresponde realizar una crítica al método de aislamiento de monocitos empleado (la selección por adherencia), a la luz de los resultados de citometría de flujo donde el % de linfocitos fue de al menos 5% en todos los casos. Los trabajos de Nielsen y col. y Hornschuh y col. compararon este método con respecto al aislamiento por selección magnética positiva de células CD14+, que se vale de anticuerpos anti-CD14 acoplados a beads magnéticas que son luego utilizadas para capturar las células marcadas. Evidenciaron un mayor rendimiento y pureza de monocitos asícomo una mayor pureza de macrófagos derivados de monocitos, con el método de selección magnética positiva ^{38,144}. Los fenotipos de macrófagos obtenidos a partir de ambos métodos de aislamiento, logran un perfil de marcadores fenotípicos similar, con algunas diferencias en el grado de inducción ³⁸. Si bien la selección positiva es más ventajosa en términos de pureza y rendimiento, hay que apreciar que no incluye a todas las subpoblaciones de monocitos sanguíneos. Los monocitos conocidos como "no clásicos" que se caracterizan por ser CD16 positivos y tener una baja expresión de CD14, también están implicados en muchas patologías inflamatorias ^{145,146}, por lo que excluirlos podría no ser representativo o conveniente en todos los casos. Nielsen y col. también reportan un impacto del método de aislamiento en los fenotipos de macrófagos obtenidos, con baja expresión de CD163 y alta de CD80 para el método de adherencia al plástico ³⁸. En esta tesis sin embargo, se logró una adecuada inducción del marcador CD206+, entre otros indicadores de polarización. Por último, el protocolo de inducción de los fenotipos macrofágicos también es variable en la bibliografía. Si bien se logró evidenciar indicadores de polarización en los M_{LPS}, probablemente coestimular con LPS e IFN-γ resulte en un fenotipo más polarizado ^{36,43}.

Por otra parte, en macrófagos derivados de monocitos THP-1 de fenotipos M_{Nv}, M_{LPS} y M_{IL-4}, se midió la expresión de un marcador de fenotipo M1 (CD54) y uno de fenotipo M2 (CD163) (Figura 23). Con el gate de células se definió en el gráfico de FSC vs SSC las poblaciones celulares con la nomenclatura utilizada anteriormente. Se identificó una R3 correspondiente a macrófagos y una R2 que corresponde a monocitos que no se diferenciaron completamente. El número de células CD54⁺ en la R3 fue reducido para todas las condiciones (M_{NV}: 0,76%, M_{LPS}: 0,19%, M_{IL-4}: 3,53%). Si bien se observó una discreta mayor proporción en M_{IL-4}, la validez de este dato es cuestionable ya que la proporción de células (40%) fue notoriamente inferior en relación a los M_{Nv} (81%) y M_{LPS} (90%), es decir, que en las M_{IL-4} hubo una gran cantidad de debris y células de membrana alterada que pueden presentar mayor autofluorescencia (Figura 23A). Para el marcador CD163, se detectó una proporción significativamente mayor de células positivas en el fenotipo M_{IL-4} (16%) respecto a M_{NV} (9%) y casi nulo marcaje en M_{LPS} (0.3%). Para las muestras marcadas con CD163 la proporción de células vivas fue similar entre las diferentes condiciones (85-92%), dándole validez a las diferencias de expresión halladas (Figura 23B). CD163 se ha observado en macrófagos THP-1 de fenotipo M(IL-10) pero no en M(IL-4)⁴³. Los marcadores CD206 y CD80 no pudieron ser evaluados en este modelo, pero se consideran una buena elección para completar la caracterización de los fenotipos y evaluar su semejanza con el modelo de macrófagos primarios.



45,0 ± 2,0

Figura	23.	cont.	en	siguiente	página

 $40,5 \pm 0,5$

M_{IL-4}

3,5 ± 0,1



Figura 23. Análisis por Citometría de flujo de expresión de marcadores fenotípicos de superficie en macrófagos derivados de monocitos THP-1 *naive* y polarizados. Se determinó la expresión de CD54 (A) y CD163 (B) en M_{Nv}, M_{LPS} y M_{IL-4} Se tiñeron 5 x 10⁵ células con anti-CD54-FITC o anti-CD163-AF488 por monomarcado. Se seleccionaron las células vivas excluyendo los *debris*. Se definieron R2 (monocitos) y R3 (macrófagos) con controles de monocitos (Apéndice 3.2). Se analizó la expresión de los marcadores en R3 según *gates* definidos con controles sin tinción. Se tabulan la media ± desvío estándar (DE) del % de células en el *gate* respecto a la población parental. n=3 réplicas de cultivo. CD163: Prueba de ANOVA de 1 vía valor p<0,0001. Prueba de Tukey's: ***M_{Nv} vs M_{LPS} valor p= 0,0001; ***M_{Nv} vs M_{IL-4} valor p= 0,0005; ****M_{Nv} vs M_{LPS} valor p<0,0001.

1.4. Secreción de citoquinas

Para complementar la caracterización de los fenotipos de macrófagos derivados de monocitos de sangre, se estudió la producción de una citoquina proinflamatoria (IL-1 α) y una citoquina antiinflamatoria (IL-10) (**Figura 24**). En sobrenadantes de macrófagos estimulados con zym, se observó una tendencia a mayor concentración de IL-1 α en M_{LPS} respecto a M_{IL-4} que no alcanzó significancia estadística (**Figura 24A**). La concentración de IL-10 liberada por ambos fenotipos en estas condiciones fue similar (**Figura 24B**). Esta tendencias son acordes a lo reportado, con mayor producción de IL-1 en fenotipos M(LPS) y M(LPS/IFN), sin una inducción marcada de la secreción de IL-10 en el fenotipo M(IL-4), que es característica del fenotipo M(IL-10) ³⁶.



Figura 24. Determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de macrófagos polarizados derivados de monocitos de sangre por ELISA. Se diferenciaron PBMCs, se polarizaron ~ $3x10^4$ macrófagos a los fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4} y se estimularon con zym overnight según se describe en Métodos. Se determinaron las concentraciones de IL-1 α (A) e IL-10 (B) en los sobrenadantes por ELISA. A la izquierda se presenta la curva de calibración con el estándar de interleuquina correspondiente. n=3 réplicas de cada concentración. A la derecha se comparan las medias ± DE entre los fenotipos. Prueba de T para muestras independientes; IL-1 α : valor p= 0,0733, IL-10: valor p= 0,6108. n=2 réplicas de cultivo por fenotipo. Se definió la concentración de cada muestra con la media de 3 réplicas de medida.

En síntesis, los modelos de macrófagos fueron analizados por distintos métodos. Como indicador de diferenciación se verificó en ambos modelos la adherencia al sustrato y los cambios morfológicos por microscopía, que a su vez correlacionaron con una migración en el patrón en FSC *vs* SSC por Citometría de flujo característica. En ambos modelos se evidenció una morfología diferencial entre los fenotipos por microscopía que coincide parcialmente con lo reportado. En los macrófagos primarios se confirmó la inducción de los marcadores fenotípicos de superficie, CD80 en M_{LPS} y CD206 en M_{IL-4}. A su vez, se observó una tendencia a una mayor producción de una citoquina proinflamatoria característica en los M_{LPS}. En los macrófagos derivados de THP-1, el análisis comparativo de expresión de marcadores de superficie arrojó

una mayor expresión de CD163, un marcador del fenotipo M(IL-4) en los M_{IL-4} . Considerados globalmente, estos resultados indican que se logró una polarización de los macrófagos de ambos modelos.

2. Expresión de isoformas LOX y proteínas asociadas

La expresión de las isoformas LOX en lisados de macrófagos fue estudiada mediante Western Blot. Se presentan en las figuras a continuación resultados representativos de las réplicas de cultivo y de los diferentes donantes estudiados. Los restantes ensayos realizados para cada proteína se encuentran en el Apéndice 4.

Se estudió la expresión de la 5-LOX y su proteína activadora (FLAP por sus siglas en inglés) (**Figura 25**). La 5-LOX se detectó en niveles similares en M_{IL-4} y M_{LPS} tanto en macrófagos derivados de monocitos de sangre (**Figura 25A**) como en macrófagos derivados de monocitos THP-1 (**Figura 25B**).

En macrófagos derivados de monocitos de sangre la expresión de FLAP fue notoriamente superior en el fenotipo M_{LPS} , sin detección o con niveles muy inferiores, según el donante, en el fenotipo M_{IL-4} (**Figura 25A**). En los macrófagos derivados de THP-1 la tendencia fue similar con una expresión mayor en los M_{LPS} (**Figura 25B**). Se observó en estos últimos una doble banda de FLAP en el rango de PM esperado, ausente en el fenotipo M_{IL-4} y no detectada en los lisados de macrófagos primarios.

La 5-LOX, se expresó en M_{LPS} y M_{IL-4} en cantidades similares, con algunas variaciones menores entre donantes (Apéndice 4). Si bien está establecido que se expresa en ambos fenotipos, se ha descrito que hay niveles algo inferiores en M(IL-4) respecto a M(IFN) y M(LPS/IFN) ^{14,58}. Variaciones en los niveles de expresión de 5-LOX de macrófagos polarizados a fenotipos opuestos han sido reportadas anteriormente y atribuidas a variabilidad entre donantes ¹⁴⁷.

FLAP en cambio, presentó una franca diferencia consistente entre donantes, con claro predominio en M_{LPS} y baja o nula expresión en M_{IL-4} , también con cierta variabilidad en el grado de expresión entre donantes. La nula o menor expresión en M_{IL-4} coincide con lo descrito por *Werz y col.* en M(LPS/IFN) ⁵⁸ y *Ebert y col.* en M(IFN) ¹⁴ vs M(IL-4).

Continuando con el análisis en macrófagos humanos, se evaluó la expresión de 15-LOX1, 15-LOX2 y la 12-LOX tras el estímulo con zym (**Figura 26**).

La 15-LOX1 no se detectó en los M_{Nv} derivados de THP-1 y fue inducida casi exclusivamente en el fenotipo M_{IL-4} en ambos modelos, acorde con lo reportado por varios autores ^{14,58,122}. Para la 15-LOX2 en cambio, no se logró una adecuada definición señal/ ruido en la mayoría de los ensayos. En el único ensayo de cada modelo en que se logró una adecuada detección y normalización de las bandas, se observó un patrón similar, con una mayor expresión en el fenotipo M_{IL-4} . En línea con ello, *Ebert y col.* reportaron que 15-LOX2 es inducida en la polarización de los macrófagos *naive* M-CSF a M(IL-4). Un hallazgo interesante de dicho trabajo, es que los niveles de ARNm de 15-LOX2 aumentan en ambos fenotipos de forma similar con respecto a los niveles en monocitos. El hecho de que no se vea un aumento de la proteína 15-LOX2 en M(IFN) en el trabajo de Ebert y col., y en M(LPS) en esta tesis, sugiere una regulación a nivel traduccional ¹⁴.

Por último, para la 12-LOX tampoco se logró un buen marcaje en la mayoría de las réplicas, por lo que se presentan los resultados de un único western blot de cada modelo. En macrófagos derivados de monocitos de sangre se observó 12-LOX en el fenotipo M_{IL-4} pero no en M_{LPS} . En concordancia, en macrófagos THP-1 bajo las mismas condiciones, se identificó 12-LOX en el fenotipo M_{IL-4} , menores cantidades en M_{Nv} y casi nula expresión en M_{LPS} . La 12-LOX es una isoforma plaquetaria en humanos con escasos reportes de su expresión en macrófagos ¹²², tal como se mencionó en los antecedentes.





Figura 25. Leyenda en la siguiente página

Figura 25. Estudio por Western Blot de expresión de 5-LOX (izquierda) y FLAP (derecha) en macrófagos polarizados. A. Macrófagos derivados de monocitos de sangre. Se diferenciaron PBMCs, se polarizaron a fenotipo a M_{LPS} y M_{IL-4} y estimularon con zym por 90 minutos. Se sembraron lisados equivalentes a ~5 x 10⁵ PBMCs originarios por carril de SDS-PAGE. 5-LOX: n=2 ensayos independientes de 2 donantes. Intensidad relativa a la de α-tubulina (α-tub). FLAP: n= 3 ensayos independientes de 4 donantes. Intensidad relativa a β-actina. **B.** Macrófagos THP-1. Se diferenciaron monocitos a M_{NV} , se polarizaron a M_{LPS} y M_{IL-4} y se estimularon con zym por 90 minutos. Se sembraron lisados equivalentes a ~2 x 10⁵ monocitos originarios por carril de SDS-PAGE y se realizó un Western Blot. 5-LOX: n= 4 ensayos independientes M_{NV} vs M_{IL-4} , n=2 ensayos independientes con M_{LPS} . Intensidad relativa a la de α-tub. **FLAP**: n=1. Intensidad relativa a la de α-tub. **C.** Macrófagos J774. Se polarizaron los macrófagos a fenotipo M_{LPS} y M_{IL-4} y se estimularon con zym por 90 minutos. Se realizó un Western Blot anti 5-LOX con lisados celulares. La carga proteica fue controlada con α-tub. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización de las imágenes. Se indican los PM de las proteínas del marcador en el carril izquierdo.

Además, se realizó una comparación de expresión de las isoformas LOX en condiciones basales y posterior a la incubación con zym por 90 minutos en los diferentes fenotipos de macrófagos derivados de monocitos THP-1 y de monocitos de sangre. No se observaron diferencias por el factor de estímulo inflamatorio (**Figura 27**). Este resultado coincide con lo observado tras 6 horas de estímulos TLR-2, -3 y -4 por *Ebert y col.*, que tampoco vieron cambios de expresión en FLAP por el estímulo ¹⁴. Es decir, que los cambios en la expresión de LOXs y FLAP serían generados por la diferenciación y polarización y no por el estímulo inflamatorio o activador de las enzimas.

Los macrófagos de ratón de la línea J774.A1 también fueron explorados como modelo para el estudio de las LOX. Se realizó un análisis preliminar de la expresión de 5-LOX en M_{Nv} , M_{LPS} y M_{IL-4} , en el cual se detectaron bajos niveles de la enzima únicamente en el fenotipo M_{IL-4} (**Figura 25C**).



Figura 26. Expresión por Western Blot de 12-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2 en macrófagos estimulados con zym. A. Macrófagos derivados de monocitos de sangre. Se diferenciaron PBMCs, se polarizaron a fenotipo a M_{LPS} y M_{IL-4} y estimularon con zym por 90 minutos según se describe en Métodos.Se sembraron lisados equivalentes a ~5 x 10⁵ PBMCs originarios por carril de SDS-PAGE y se realizó un Western Blot. 15-LOX1: n= 5 ensayos independientes de 2 donantes, intensidades relativas a la de α-tub. 15-LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 12-LOX: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 8. Macrófagos derivados de monocitos THP-1. Se diferenciaron células THP-1, se polarizaron y estimularon con zym 90 minutos según se describe en Métodos. Se sembraron lisados equivalentes a ~2 x 10⁵ monocitos originarios por carril de SDS-PAGE y se realizó un Western Blot. 15-LOX1: n= 4 ensayos independientes M_{Nv} vs M_{IL-4} , n= 1 M_{Nv} vs M_{IL-4} , intensidades relativas a la de α-tub. 12-LOX: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 2. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 12-LOX1: n= 4 ensayos independientes M_{Nv} vs M_{IL-4} , n= 1 M_{Nv} vs M_{IL-4} , intensidades relativas a la de α-tub. 2. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 2. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 2. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 3. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 3. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 3. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 3. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 3. LOX2: n=1, intensidades relativas a la de α-tub. 3. Se indican los PM de las proteínas del marcador de PM en el carril izquierdo.



Figura 27. Comparación por Western Blot de la expresión de las isoformas LOX en situación basal y posterior al estímulo con zym. A. Macrófagos derivados de monocitos de sangre. Se diferenciaron PBMCs, se polarizaron a fenotipo a M_{LPS} y M_{IL-4} y estimularon con zym por 90 minutos según se describe en Métodos. Se corrieron SDS-PAGE y realizaron Western Blot anti-5-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2. n=1. **B.** Monocitos THP-1 (Mo) y M_{NV} , M_{LPS} y M_{IL-4} derivados de THP-1. Se diferenciaron y polarizaron las células THP-1 según se describe en Métodos. Se sembraron lisados equivalentes a ~2 x 10⁵ monocitos originarios por carril de SDS-PAGE y se realizaron Western Blot anti-5-LOX y anti-15-LOX2. n=1. Se indican los PM de las proteínas del marcador de PM en el carril izquierdo.



Figura 28. Estudio por Western Blot de expresión de COX-2 en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados. Se diferenciaron PBMCs, se polarizaron a fenotipo a M_{LPS} y M_{IL-4} y se estimularon con zym por 90 minutos según se describe en Métodos. Se sembraron lisados equivalentes a ~5 x 10⁵ PBMCs originarios por carril de SDS-PAGE y se realizó un Western Blot. Se identificaron dos bandas de COX-2 nombradas como a y b que fueron cuantificadas independientemente. Se indican los PM de las proteínas del marcador de PM en el carril izquierdo. n= 1 ensayo de 2 donantes.

Finalmente, se estudió la expresión de la COX-2 para completar la caracterización de la expresión de oxigenasas inducibles en los fenotipos de macrófagos humanos. En macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados a fenotipo estimulados con zym se observó una banda de baja intensidad al PM esperado de alrededor de 75 KDa (en adelante COX-2a) y otra banda de mayor intensidad entre 55 KDa (en adelante COX-2b). No se detectaron diferencias entre grupos en la intensidad relativa de estas bandas (**Figura 28**). La detección de una doble banda ya ha sido reportada en otras células humanas a PM similares a los descritos¹⁴⁸.

En cuanto a los niveles de expresión, COX-2 se observó en ambos fenotipos tras el estímulo con zym. Esto también concuerda con los resultados de *Ebert y col.*, aunque en dicho trabajo observaron una inducción más pronunciada en el fenotipo M(LPS/IFN).¹⁴ Un trabajo reciente por *Hartung y col.*, describió por proteómica dirigida la expresión de la maquinaria de síntesis de oxilipinas de macrófagos derivados de monocitos de sangre de fenotipos *naive*, M(IFN-γ) y M(IL-4). Compararon la expresión basal y luego de 6 horas de estímulo con LPS. Como ya es sabido, COX-1 aparece en todas las condiciones. La COX-2 en cambio solo fue observada en los macrófagos polarizados y estimulados con LPS¹⁴⁷.

En suma, se determinó en los modelos de estudio la expresión de las LOX reportadas en macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre (5-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2) y la de la expresión de 12-LOX que resulta menos clara en la bibliografía. Mientras que la 5-LOX presenta una expresión similar en los M_{LPS} y M_{IL-4} , su proteína activadora FLAP, se encuentra más representada en los M_{LPS} . Por el contrario, la 15-LOX1 se expresa mayormente en M_{IL-4} y la 15-LOX2 se detectó solamente en M_{IL-4} . Se detectó además preliminarmente 12-LOX, isoforma no esperada en macrófagos.

La expresión de las LOX también fue confirmadas en macrófagos derivados de la línea celular THP-1 en los que presentó un patrón muy similar. En el trabajo de *Hartung y col.* se describió que macrófagos THP-1 *naive* diferenciados con Vitamina D + TGF, expresan COX-2 tras 6 horas de estímulo con LPS y expresan 5-LOX y FLAP tanto de forma basal como tras el estímulo con LPS, pero no encontraron 12- ni 15- LOXs ¹⁴⁷. En esta tesis se verificó que los macrófagos derivados de THP-1 diferenciados con PMA 25 nM y polarizados con LPS o IL-4 presentan todas las isoformas LOX reportadas en sus equivalentes derivados de monocitos de sangre y con el mismo patrón de expresión. Por tanto, la maquinaria de síntesis de oxilipinas del modelo de macrófagos THP-1 evaluado refleja adecuadamente la del modelo de referencia en la bibliografía.

En los macrófagos derivados de monocitos de sangre encontró un perfil de expresión de LOX consistente.

3. Análisis preliminar de la localización subcelular de 5-LOX y 15-LOX1

Se realizó un análisis preliminar de la localización subcelular de 5-LOX y 15-LOX1 en los fenotipos de macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados, de forma basal y posterior al estímulo con zym (**Figura 29**). Para identificar los compartimentos subcelulares se marcaron los núcleos celulares con DAPI y las fibras de actina del citoesqueleto con Faloidina. Con respecto al citoesqueleto y morfología, llama la atención la heterogeneidad de formas y la presencia de algunas estructuras de filamentos de actina, como prolongaciones. En ambos fenotipos se observan algunas células grandes e irregulares con una tinción suave de actina en el citosol y sitios de mayor intensidad con un patrón puntuado distribuido mayormente entorno al núcleo y en la membrana plasmática. Algo similar fue descrito para los M(IL-4) del trabajo de *Rostam y col.*, pero no para los M(IFN) en los que observaron células de tamaño más pequeño, forma redondeada y una textura de actina punteada muy compacta ⁶¹.

En las condiciones estimuladas con zym se pueden observar estructuras translúcidas (no marcadas ni autofluorescentes) compatibles con cuerpos fagocíticos de zym ^{149,150}. Se observan entre 1- 4 de estas partículas por célula en varias células de cada campo (flechas blancas). La periferia de los mismos se marca con actina y tanto con 15-LOX como con 5-LOX. En las imágenes analizadas no se constataron diferencias en las características de los cuerpos fagocitados entre fenotipos ni diferencias notorias en su cantidad.

Anteriormente, la localización de 5-LOX y 15-LOX1 fue estudiada en macrófagos derivados de monocitos de sangre de fenotipo M(IL-4) bajo condiciones de hipoxia ¹¹⁸, tras el estímulo con distintas bacterias patogénicas ⁵⁸, con resultados discordantes. En este trabajo se logró identificar las isoformas 5-LOX y 15-LOX1 con una localización predominante pero no exclusivamente nuclear, sin diferencias evidentes entre fenotipos y sin un efecto por el estímulo inflamatorio (zym) (**Figura 29**). En las muestras de otros donantes diferentes al presentado en la figura 27, se reprodujo la heterogeneidad dentro de las células de una misma condición y lo descrito en cuanto a la morfología y citoesqueleto. Tampoco se observaron diferencias claras en la distribución de 5-LOX y 15-LOX1 entre fenotipos.

El análisis se vio limitado por la calidad de las imágenes cuya segmentación automatizada no fue posible pese a distintas estrategias de reparación. Si bien se trata de una muestra compleja y pueden haber cuestiones metodológicas a optimizar, se plantea que la principal limitante fue el marcaje de los anticuerpos primarios anti-5-LOX y anti-15-LOX1.

Por tanto, es necesario realizar nuevos experimentos, para analizar la localización subcelular y colocalización de las enzimas que puedan ser comparados con las contradicciones en la bibliografía. Además, sería adecuado complementar el estudio de la localización subcelular por otras técnicas como, por ejemplo, fraccionamiento subcelular asociado a western blot.



Figura 29. Estudio por Microscopía Confocal de la localización subcelular de 5-LOX y 15-LOX1 en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados. Se realizó una inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular de 5-LOX y 15-LOX1 en macrófagos derivados de monocitos de sangre de fenotipo M_{LPS} y M_{IL-4} . Se marcaron los núcleos celulares con DAPI (azul) y las fibras de actina con Faloidina conjugada a AF555 (rojo). Las isoformas LOX fueron marcadas con su respectivo anticuerpo primario y con secundarios AF488 para 5-LOX (verde) y AF633 para 15-LOX1 (magenta). Se adquirieron las imágenes en un microscopio confocal con objetivo 63X en tamaño 1024 x 1024 píxeles. El procesamiento se realizó en FiJi. Las imágenes fueron calibradas y+g ajustadas a igual escala (barra de escala= 50 µm). Se seleccionaron fragmentos de 512 x 512 píxeles de 3 campos representativos de 2 réplicas de cultivo de 2 donantes. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización idénticos para todas las condiciones. Se señalan con flechas blancas cuerpos fagocíticos (ver texto).

4. Identificación y cuantificación de oxilipinas producidas por los fenotipos macrofágicos

Las oxilipinas producidas por los macrófagos fueron estudiadas por HPLC-MS/MS utilizando un método de MRM previamente desarrollado en el laboratorio ¹⁵¹. Los extractos lipídicos fueron obtenidos por una extracción en fase sólida (SPE) a partir de diferentes muestras de cultivo (sobrenadantes, lisados) y bajo distintas condiciones experimentales (basal, suplementadas con PUFAs y/o estimuladas con zym), tanto en macrófagos derivados de THP-1 como derivados de monocitos de sangre. Se describen las variantes experimentales que se fueron incorporando progresivamente en el curso del trabajo con el fin de optimizar la detección de oxilipinas en los modelos de macrófagos. Muchas de estas estrategias fueron dirigidas a la detección de mediadores lipídicos resolutivos de la inflamación (SPMs), de particular interés en esta tesis.

4.1. Identificación de oxilipinas en sobrenadantes en condiciones basales

Dado el interés en conocer si la línea celular THP-1 es capaz de sintetizar SPMs, se comenzó por analizar la producción de oxilipinas por macrófagos derivados de THP-1 de fenotipo $M_{\parallel -4}$. Se procesaron los sobrenadantes acumulados durante las 48 horas de polarización (Figura 30). Se detectaron en estas condiciones los PUFAs precursores AA, EPA y DHA (Figura 30A). Si bien no se detectó el precursor LA, se encontraron derivados del mismo por vía LOX (9-HODE y 13-HODE) y CYP (12,13-diHOME) (Figura 30B). Es oportuno aclarar que para el derivado vía CYP del LA se detectó señal solo con algunas de las transiciones buscadas y no se cuenta con estándares internos (IS) de la misma molécula, por lo que su identidad no pudo ser confirmada. De los eicosanoides derivados del AA por vía COX se hallaron únicamente TxB2 y PGE2, los prostanoides habitualmente más abundantes en los macrófagos por presentar una expresión elevada de TXAS y PGES⁶. De los derivados vía LOX del AA no se encontraron los monohidroxilados 5-HETE ni 12-HETE. Cabe mencionar que en estos primeros ensayos se llevó a cabo un método scheduled MRM con ventanas de tiempo estrechas definidas para cada transición de los analitos buscados. Por problemas en la adquisición de la transición del 15-HETE puntualmente en este ensayo, la presencia del mismo no pudo ser determinada.

El análisis utilizado no posee capacidad de diferenciar la quiralidad de los lípidos, por lo que no es posible afirmar que los analitos detectados son productos enzimáticos. La detección de ácidos oxidados en posiciones en las que se sabe que actúan preferencialmente las LOX descritas y no en otras posiciones, apoya el origen enzimático. Además, se monitoreó la presencia de F2-isoprostanos (5-iso-PGF2a, 8-iso-PGF2a) como indicadores de oxidación no enzimática del AA en las condiciones de trabajo. En este ensayo la señal de los mismos no alcanzó el límite de detección (LOD) (**Figura 30C**).

Por otro lado, se hallaron derivados monohidroxilados del DHA en diferentes posiciones asociados a la acción de las LOX o sin una enzima específica descrita. Se destacan el 14-HDHA, marcador de la vía de síntesis de Mar1, sintetizado enzimáticamente por la 12-LOX o 15-LOX1, y el 4-HDHA que es producido por vía 5-LOX (**Figura 30D**). Para el EPA, se identificó un monohidroxilado vía CYP, el 18-HEPE, marcador de la vía de síntesis de RvE (**Figura 30E**). No se detectó 12-HEPE, 15-HEPE ni otros metabolitos del EPA. Tampoco se identificaron SPMs del AA, EPA y DHA, habiendo detectado los correspondientes IS (d5)-RvD1 y (d5)Mar1 en las mismas muestras (**Figura 30F**).



Figura 30. cont. en siguiente página



Figura 30. Identificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en M_{IL-4} derivados de monocitos THP-1 en condiciones basales. Se diferenciaron 5 x 10⁵ monocitos THP-1 y se polarizaron a M_{IL-4} según se describe en Métodos. Se procesaron extractos de sobrenadantes acumulados en RPMI 10% SBF en las 48 horas de polarización. Se presentan los cromatogramas en intensidades relativas de los analitos (violeta) e IS (negro o gris) de relevancia para la identificación. Se agrupan los PUFA precursores (**A**), derivados del LA (**B**), eicosanoides del AA (**C**), monohidroxilados del DHA (**D**) y del EPA (**E**) y SPMs del AA, EPA y DHA (**F**). Correspondiente a la transición de mayor intensidad de cada analito ([1] en Apéndice 1.3). Representativo de n=2 réplicas de cultivo.

Dado que no se detectaron SPMs en la línea celular, se vio la necesidad de establecer la presencia de estas oxilipinas en el modelo de macrófagos derivados de monocitos de sangre, en el que fue anteriormente reportada tras diferentes estímulos ^{6,58}. Se analizaron las oxilipinas en sobrenadantes acumulados durante las 48 horas de polarización a M_{LPS} y M_{IL-4}, con una estrategia de MRM en 4 periodos (**Figura 31**). Se identificaron los precursores AA, DHA y EPA (**Figura 31A**), derivados del LA vía LOX (9-HODE, 13-HODE) y vía CYP (9,10-diHOME, 12,13-diHOME) (**Figura 31B**) y derivados del AA vía COX (PGE2, PGF2a, TXB2) y LOX (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE), en ausencia de isoprostanos (**Figura 31C**). Además, se observaron monohidroxilados del DHA vía LOX (14-HDHA, 4-HDHA, 7-HDHA entre otras) (**Figura 31D**). De los derivados del EPA se detectó 18-HEPE, producto de los CYP (**Figura 31E**). A destacar, a diferencia de los macrófagos THP-1, en ambos fenotipos del cultivo primario se obtuvo señal para LXA4 por encima del LOD (S/N ratio= 3.8) con la transición 351/115 [1], la de mayor intensidad de acuerdo a lo observado con el estándar externo (Apéndice 1.3), no así en las demás transiciones. Sin embargo, ninguna de las SPMs derivadas del DHA y EPA buscadas fueron detectadas (**Figura 31F**).



Figura 31. cont. en siguiente página



Figura 31. cont. en siguiente página



Figura 31. Identificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados en condiciones basales. Se diferenciaron $1,2 \times 10^6$ PBMC y se polarizaron a M_{LPS} y M_{IL-4}. Se procesaron extractos de sobrenadantes acumulados en RPMI 10% SBF en las 48 horas de polarización. Se presentan cromatogramas de HPLC-MS/MS en intensidades relativas de los analitos (anaranjado: M_{LPS}; violeta: M_{IL-4}) e IS de relevancia para la identificación (negro o gris). Se agrupan PUFA precursores (**A**), derivados del LA (**B**), eicosanoides del AA (**C**), monohidroxilados del DHA (**D**) y EPA (**E**) y SPMs del AA, EPA y DHA (**F**). Correspondiente a la transición de mayor intensidad de cada analito ([1], Apéndice 1.3). Representativo de n=2 réplicas de cultivo.

Asimismo, se realizaron controles de medio RPMI procesados de idéntica forma que las muestras (**Figura 32**). Todos los IS se detectaron adecuadamente, demostrando que el RPMI no interfiere significativamente con la extracción ni identificación de las oxilipinas. Contrario a lo esperado, se detectaron los precursores DHA y EPA (**Figura 32A**) y derivados del LA (**Figura 32B**). No se hallaron otros derivados del AA, DHA y EPA (**Figura 32C-D**). En controles con dPBS y agua igualmente procesados, también se identificaron los derivados del LA, por lo cual se estima que se podría tratar de un contaminante presente en las columnas de SPE o concentrado a partir del solvente durante la extracción. Por tanto, además de controles de MeOH 50% inyectados directamente, se incluyeron en cada ensayo controles del proceso

global con RPMI o dPBS, cuyas área ratio (analito/ IS) se restaron a las de las muestras para el análisis cuantitativo.



Figura 32. Determinación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en medio RPMI sin suero. Se realizó la extracción lipídica por SPE y análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS de controles con medio RPMI sin suero según se describe en Métodos. Se presentan cromatogramas en intensidades relativas de los precursores (A) y derivados del LA (B) detectados y oxilipinas del DHA (C) y EPA (D) no detectadas en RPMI pero sí en las muestras (Figuras 19 y 20). Correspondiente a la transición de mayor intensidad de cada analito ([1] en Apéndice 1.3). Representativo de n=2 réplicas.

4.2. Evaluación del efecto del estímulo inflamatorio con zymosan

Una vez identificadas las oxilipinas en sobrenadantes de ambos cultivos de macrófagos humanos polarizados, se pasó a estudiar el efecto del estímulo inflamatorio con zymosan (zym), ligando TLR2, sobre la liberación de oxilipinas.

En los macrófagos derivados de monocitos THP-1 se compararon las oxilipinas acumuladas en sobrenadantes de M_{II-4} durante las 48 horas de polarización respecto a las acumuladas durante la incubación con zym por 1 hora para cada réplica de cultivo con una estrategia sMRM (Figura 33). Pese al menor tiempo de acumulación de las condiciones post-zym, se observó en términos generales una mayor cantidad de oxilipinas liberadas posterior al estímulo. La liberación de PUFA precursores aumentó notoriamente, en un orden de magnitud para AA y EPA y cuatro veces para DHA (Figura 33A). Los derivados del LA aumentaron tras el estímulo con zym (Figura 33B). De los derivados vía COX del AA presentes en condiciones basales, se incrementó la cantidad de PGE2 y se detectaron además la PGD2, su producto de degradación tetranor-PGD2 y el tetranor-PGF2 α . Se vio una menor cantidad del metabolito tetranor-PGE2 en la condición post-zym, probablemente asociado a la diferencia en el tiempo de acumulación de sobrenadante a favor de la condición pre-zym. Para el TXB2 el comportamiento fue variable. De los derivados LOX del AA, se detectó 14,15-LTC4 y los monohidroxilados 5-HETE y 12-HETE (Figura 33C). El 15-HETE se detectó luego del estímulo con zym pero el pico no pudo ser integrado por los problemas en la adquisición mencionados anteriormente. La mayoría de los monohidroxilados del DHA fueron más abundantes en la condición post-zym, a excepto del 13-HDHA y 20-HDHA. El 18-HEPE se detectó en menor cantidad post-zym y no se detectaron otros derivados del EPA (Figura 33D). Las SPMs tampoco fueron detectadas post-zym en los macrófagos derivados de THP-1.



Figura 33. cont. en siguiente página

D. Derivados DHA y EPA



Figura 33. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS para evaluar el efecto del estímulo con zymosan en macrófagos derivados de monocitos THP-1 polarizados a M_{IL-4} . Se diferenciaron 5 x 10⁵ monocitos THP-1 y se polarizaron según se describe en Métodos. Se procesaron extractos de sobrenadantes acumulados en las 48 horas de polarización en RPMI 10% SBF (pre-zym) y 1 hora de incubación con zym en RPMI (post-zym). Se comparan las oxilipinas cuantificadas en cada réplica. Se agrupan los PUFA precursores (**A**), derivados del LA (**B**), eicosanoides del AA (**C**), monohidroxilados del DHA y del EPA (**D**). Cuantificación correspondiente a la transición de MS de mayor intensidad de cada analito ([1] en Apéndice 1.3). n=2 réplicas de cultivo identificadas con símbolos diferentes.

De la misma forma, se estudió el efecto del estímulo con zym en macrófagos primarios de fenotipo M_{LPS} y M_{IL-4} (**Figura 34**), con la estrategia de MRM en 4 periodos. En ambos fenotipos se observó un aumento en la cantidad de los PUFA precursores (**Figura 34A**) y en los derivados del LA por vía LOX y CYP (**Figura 34B**). Lo mismo se observó para LTB4, los HETEs y sus formas cetona, pero no para los derivados vía COX del AA que se presentaron en menor cantidad en la muestra post-zym (**Figura 34C**). Nuevamente, esto no necesariamente refleja un efecto del zym, sino que puede vincularse al menor tiempo de acumulación de muestra en la condición post-zym respecto a la pre-zym. En los derivados del DHA y EPA, hubo una importante variabilidad en el efecto, destacando que para el 14-HDHA (precursor de Maresinas) se observó un claro aumento por el estímulo (**Figura 34D-E**). El 17-HDHA no se produjo tampoco tras el estímulo. Las SPMs del DHA y EPA tampoco se detectaron post-zym en macrófagos primarios. Resulta interesante que la LXA4 observada en condiciones basales no fue detectada en los sobrenadantes post- zym. Una posibilidad es que esto se deba a una producción en bajas concentraciones que no alcanza el LOD en 1 hora de acumulación pero sí en las 48 horas de la condición pre-zym.



Figura 34. cont. en siguiente página

D. Derivados DHA y EPA



Figura 34. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS para evaluar el efecto del estímulo con zymosan en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados. Se realizó un análisis de oxilipinas en sobrenadantes de M_{LPS} (anaranjado) y M_{IL-4} (violeta). Se compara la masa de cada oxilipina en sobrenadantes acumulados durante las 48 horas de polarización en RPMI 10% SBF (pre-zym) respecto a las liberadas en los 60 minutos de incubación con zym en RPMI (post-zym) por las mismas células. Se comparan las oxilipinas cuantificadas en cada réplica. Se agrupan los PUFA precursores (**A**), derivados del LA (**B**), eicosanoides del AA (**C**), monohidroxilados del DHA y del EPA (**D**). Cuantificación correspondiente a la transición de MS de mayor intensidad de cada analito ([1] en Apéndice 1.3).

En términos generales, se evidenció una mayor liberación de precursores, oxilipinas del LA y derivadas del AA por vía LOX, tras el estímulo inflamatorio con zym en ambos modelos. La producción de oxilipinas del AA por vía COX mostró algunas diferencias entre modelos, con un aumento de las PGs post-zym en THP-1 pero no los primarios. Para la mayoría de los monohidroxilados del DHA se observó una mayor cantidad post-zym, incluídos el 14-HDHA precursor de Mar1 y el 17-HDHA precursor de RvD, este último solo presente en THP-1. El 4- y 7-HDHA (vía 5-LOX) se vieron incrementados en la condición post-zym en THP-1 pero no en primarios. El 18-HEPE, único derivado del EPA detectado, fue en ambos casos más abundante en la condición pre-zym. De todas formas, es probable que la menor concentración de algunos metabolitos en la condición post-zym se deba al menor tiempo de acumulación. Finalmente, como primera aproximación a la comparación del perfil de oxilipinas entre fenotipos, se puede afirmar que en términos de intensidades absolutas se constató un comportamiento similar para los M_{LPS} y los M_{L-4} de macrófagos primarios.
4.3. Comparación de oxilipinas liberadas a los sobrenadantes e intracelulares

En vistas de que no se detectaron SPMs en muestras de sobrenadantes de macrófagos estimulados y considerando que algunos investigadores trabajan con muestras de lisados celulares, se compararon las oxilipinas liberadas al medio y las contenidas intracelularmente. Se realizó un análisis cuantitativo comparativo entre sobrenadantes de cultivo y lisados celulares de macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados y estimulados con zym (**Figura 35**). Para la mayoría de los analitos que alcanzaron el LOQ, incluyendo precursores (**Figura 35A**), derivados del AA (**Figura 35C**) y del DHA vía LOX (**Figura 35D**), las cantidades en sobrenadantes y lisados celulares de la misma réplica fueron del mismo orden de magnitud. Para los derivados del LA (**Figura 35B**) y el 13-HDHA (**Figura 35D**), en cambio, se observaron mayores cantidades en los lisados celulares. Un dato interesante es que el 13-HDHA de los lisados celulares se observó en menores cantidades en el fenotipo M_{IL-4}, pero hay que tener en cuenta que este análisis cuantitativo no fue normalizado por el tamaño de las muestras.

A efectos de la decisión de continuar el análisis de oxilipinas con muestras de sobrenadantes y/o lisados celulares, no se observó una ventaja clara que justifique trabajar con los segundos. Se continúa analizando sobrenadantes de cultivo por considerarlo, además, de mayor relevancia fisiológica y menor complejidad experimental.



Figura 35. cont. en siguiente página



Figura 35. Determinación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en sobrenadantes y lisados celulares. Se diferenciaron 2×10^6 PBMC por pocillo, se polarizaron a fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4}, se suplementaron con AA, EPA y DHA 10 µM por 3 horas en medio de cultivo y se estimularon con zym por 60 minutos en dPBS. Se procesaron de forma independiente los sobrenadantes y lisados celulares de cada pocillo. Se cuantificaron las oxilipinas utilizando la transición de MS de mayor intensidad para cada analito ([1], Apéndice 1.3). Se comparan las masas de oxilipinas en sobrenadantes de cultivo (barras blancas) respecto a lisados celulares (barras negras) de cada réplica. n=3 réplicas de cultivo por fenotipo de 1 donante.

4.4. Búsqueda de SPMs en macrófagos suplementados con PUFA precursores

El último aspecto que se incorporó durante la puesta a punto del análisis de oxilipinas fue la suplementación con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) precursores. Se ha reportado que las líneas celulares, incluídos los THP-1, están depletadas en PUFAs con respecto a los leucocitos primarios frescos, y que los leucocitos primarios se depletan de PUFAs en solo cuatro días de cultivo con medios convencionales ^{133,152}. En particular, están empobrecidos en DHA y EPA ^{133,153}. La suplementación con PUFAs en el medio de cultivo logra enriquecer los PLs de membrana para compensar el déficit ¹³³. Por tanto, se incubaron las células con DHA, EPA y/o AA luego de la polarización y previo al estímulo con zym.

Se realizó un análisis cuantitativo en M_{IL-4} derivados de monocitos de sangre suplementados con AA, DHA y EPA (**Figura 36**). Frente al estímulo con zym, los M_{IL-4} suplementados con los

tres precursores liberaron al medio menor cantidad de AA que los no suplementados, similar de DHA y mayor cantidad de EPA. En los lisados celulares se observó un resultado similar, con menor concentración de AA y mayor de DHA y EPA en las células suplementadas respecto a las no suplementadas (**Figura 36A**).

Se continúa con el análisis del efecto de la suplementación con PUFAs sobre la síntesis y liberación de las oxilipinas derivadas de los mismos. En sobrenadantes de M_{IL-4} suplementados, se observaron similares cantidades de derivados LOX del AA (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE), pero menores de los derivados COX (TxB2, PGE2) (**Figura 36B**). Los monohidroxilados del DHA (7-HDHA, 14-HDHA, 13-HDHA) se hallaron en mayor cantidad con suplementación (**Figura 36C**), mientras que no se detectaron los monohidroxilados del EPA. Al igual que en los ensayos anteriores, no se detectaron SPMs.

Se evaluó además la suplementación selectiva con DHA y EPA, sin AA, para favorecer la síntesis de SPMs a partir de estos sustratos por la maquinaria enzimática de los macrófagos. Sin embargo, en los sobrenadantes de M_{LPS} y M_{IL-4} derivados de THP-1 suplementados con DHA y EPA tampoco se hallaron SPMs (**Figura 37**). En términos cualitativos no se observaron en este ensayo diferencias con las oxilipinas detectadas en el ensayo presentado en la figura 21. Resultados similares se observaron en sobrenadantes de macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados a fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4} suplementados con DHA y EPA donde tampoco se detectaron SPMs.



Figura 36. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS de macrófagos derivados de monocitos de sangre suplementados con AA, DHA y EPA. Se polarizaron a M_{LPS} y M_{IL-4} y se suplementaron con AA, DHA y EPA 10 µM por 3 horas según se describe en Métodos. Se analizaron extractos de sobrenadantes (blanco) y lisados celulares (negro) acumulados durante el estímulo con zym en RPMI sin suero por 60 minutos. Se comparan las cantidades de precursores (A), derivados del AA (B) y DHA (C), en sobrenadantes y células en las condiciones sin suplementar (-) y suplementadas (+) con AA, DHA y EPA (PUFA). Cuantificación correspondiente a la transición de MS de mayor intensidad de cada analito ([1], Apéndice 1.3).



Figura 37. Análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS en sobrenadantes de macrófagos derivados de monocitos THP-1 suplementados con DHA y EPA. Se diferenciaron 5 x 10⁵ monocitos THP-1 y se polarizaron a M_{LPS} y M_{IL-4} según se describe en Métodos. Se suplementaron las células con DHA 15 µM y EPA 70 µM por 30 minutos y se analizaron extractos de sobrenadantes acumulados durante el estímulo con zym en RPMI sin suero por 90 minutos. Se presentan los cromatogramas en intensidades relativas de los PUFA precursores y SPMs con la transición de MS de mayor intensidad de cada analito ([1], Apéndice 1.3).

Por último, se realizó un ensayo maximizando las condiciones de cultivo para favorecer la síntesis de SPMs derivadas del DHA como la Mar1 por los M_{IL-4} primarios. Los factores modificados fueron: i) se incrementó el número de PBMCs diferenciados por réplica, ii) se suplementaron las células polarizadas exclusivamente con DHA; iii) se añadió BSA como transportador de AG durante la suplementación; iv) se aumentó el tiempo de suplementación de 1- 3 horas a *overnight;* v) se realizaron extractos lipídicos totales de las muestras reuniendo tanto sobrenadantes como células. Bajo estas condiciones, se detectaron por encima del LOQ los precursores AA, EPA y DHA, derivados del AA (PGE2, TxB2, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE y su derivado cetona 15-oxoETE), monohidroxilados del DHA (4-HDHA, 7-HDHA, 13-HDHA, 14-HDHA, 16-HDHA, 20-HDHA) y derivados del LA (9-HODE, 13-HODE, 9,10-diHOME, 12,13-diHOME). Es decir que, si bien se detectó el intermediario 14-HDHA, no se halló el producto final de la vía, Mar1 (**Figura 38**). La concentraciones normalizadas por número de células de cada donante para las oxilipinas detectadas se resumen en la **Tabla IV**. Los precursores, encabezados por el AA, fueron los lípidos más abundantes en los extractos totales. De las oxilipinas, las más abundantes fueron las derivadas del LA, seguidas de las del



AA y en menor cantidad las del DHA. A destacar, para cada oxilipina los valores obtenidos para los donantes se mantienen en general en el mismo orden de magnitud.

Figura 38. Búsqueda de SPMs del DHA por HPLC-MS/MS en M_{IL-4} derivados de monocitos de sangre suplementados con DHA. Se diferenciaron ~4 x10⁷ PBMCs y se polarizaron a M_{IL-4} . 3 - 4 x 10⁶ células polarizadas fueron suplementadas con DHA 10 µM + BSA 0.1% en RPMI 10% SBF overnight y se estimularon con zym en dPBS por 1 hora. Se realizaron extractos lipídicos de sobrenadantes + células que se procesaron según se describe en Métodos. Se presentan los cromatogramas de 14-HDHA y de Maresina1 (Mar1) (transición [1]: 359.1-177.0) con su IS (d5)Mar1 (transición [1]: 364.0-177.0) de las muestras de n=2 donantes.

Ovilining	[] (pg/	′ 10 ⁶ células)
Oxilipina	Donante A	Donante B
AA	6.0 x 10 ³	1.4 x 10 ⁴
EPA	2.6 x 10 ³	7.1 x 10 ³
DHA	1.2 x 10 ³	2.6 x 10 ³
TXB2	2.4 x 10 ²	2.4 x 10 ²
PGE2	52.0	28.0
5-HETE	6.1 x 10 ²	4.6 x 10 ²
12-HETE	32.0	97.0
15-HETE	6.8 x 10 ²	1.5 x 10 ³
15-oxoHETE	37.1	39.3
4-HDHA	45.7	37.0
7-HDHA	52.8	77.0
13-HDHA	3,65	3.8
14-HDHA	4,49	1.1
16-HDHA	7,14	9.7
20-HDHA	8.21	6.1
13-HODE	4.1 x 10 ²	1.9 x 10 ³
9-HODE	3.9 x 10 ²	2.2 x 10 ³

Tabla IV. Oxilipinas en lisados más sobrenadantes de macrófagos primarios M_{IL-4}

Nota: Condiciones experimentales detalladas en la Figura 39.

4.5. Comparación del perfil de oxilipinas de los fenotipos macrofágicos

De lo presentado hasta el momento y como primera aproximación a la comparación del perfil de oxilipinas entre los fenotipos macrofágicos, se destaca que no hubo diferencias de relevancia en los lípidos identificados en condiciones basales (**Figuras 30 y 31**), ni luego de la estimulación con zym en términos de intensidades absolutas (**Figuras 32 y 33**).

En función de estos resultados, se definió realizar la comparación cuantitativa de las oxilipinas producidas por los fenotipos macrofágicos con el modelo de macrófagos primarios suplementados con AA, DHA y EPA y estimulados con zym (**Figura 39**). En este ensayo se encontraron derivados del AA por vía COX (PGE2, TxB2) y vía LOX (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE), derivados monohidroxilados del EPA vía LOX (12-HEPE) y vía CYP (18-HEPE) y derivados monohidroxilados del DHA de especificidad enzimática no conocida (16-HDHA y 20-HDHA), mientras que no se detectaron derivados del LA. Las concentraciones normalizadas de los analitos fueron similares entre fenotipos. Para la PGE2 y el TxB2 se observa una tendencia a mayor concentración en el fenotipo M_{LPS} que no alcanzó significancia estadística (**Figura 39A-D**). El 12-HETE se detectó en ambos fenotipos por debajo del LOQ (**Figura 39E**).

A. Precursores



Figura 39. Análisis comparativo de oxilipinas por HPLC-MS/MS en macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados a fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4} . Se diferenciaron 1,7 x 10⁶ PBMCs por réplica, se polarizaron, se suplementaron con AA, EPA y DHA 10 µM por 3 horas, se estimularon con zym 60 minutos en dPBS y se analizaron los sobrenadantes acumulados. Se cuantificaron los metabolitos que alcanzaron el LOQ para los cuales las masas se normalizaron por mg de proteína en las células de cada réplica. Las medias se compararon con la Prueba no paramétrica U de Mann Whitney para medias independientes, valor p>0.05 en todos los contrastes. Se presentan las concentraciones de los precursores (A), derivados del AA (B), DHA (C), EPA (D) y los cromatogramas del 12-HETE que fue detectado por debajo del LOQ (E). A su derecha se incluyen los cromatogramas de la transición de

12-HETE en controles con MeOH y el cromatograma del IS correspondiente en una muestra representativa. Resultados correspondientes a la transición de MS de mayor intensidad para cada analito ([1], Apéndice 1.3). n=3 réplicas de cultivo de 1 donante. *no enz*: enzima no descrita.

En síntesis, a partir de estos análisis de oxilipinas en macrófagos primarios polarizados, se lograron identificar prostanoides del AA sintetizados por vía CYP, leucotrienos del AA vía 5-LOX y derivados monohidroxilados del AA, EPA, LA y DHA por vías 5- y 12-/ 15-LOX y por vía CYP. Cabe destacar que se detectó una única SPM, la LXA4 (derivada LOX del AA), en ambos fenotipos de macrófagos primarios en condiciones basales (**Figura 31F**). Además, se hallaron los marcadores de la vía de Maresinas (14-HDHA) y Resolvinas E (18-HEPE) en ambos modelos celulares y el marcador de la vía de RvD (17-HDHA) de forma aislada en el modelo de THP-1.

Cabe destacar, que los macrófagos derivados de monocitos THP-1 presentaron un perfil de oxilipinas muy similar al de los macrófagos derivados de monocitos de sangre. Este tipo de análisis no ha sido reportado anteriormente. Recientemente, *Nouwade y col.* analizaron un grupo más acotado de eicosanoides del AA y derivados del LA en lisados de macrófagos THP-1 *naive* y polarizados por 24 horas con LPS. Hallaron únicamente TXB2, PGE2, PGF2α, 15-HETE, LXA4, 9-HODE y 13-HODE ¹⁵³. Este es, por tanto, el primer análisis de oxilipinas en macrófagos THP-1 polarizados a M(LPS) y M(IL-4).

En cuanto a la comparación de fenotipos, no hubo diferencias marcadas en los lípidos identificados y tampoco diferencias significativas en el análisis cuantitativo. Se observó una tendencia a mayor cantidad de TXB2 y PGE2 en M_{LPS} respecto a M_{IL-4} , lo que coincide con lo esperado y reportado por *Ebert y col.* con M(IFN) vs M(IL-4)¹⁴.

La investigación en SPMs es relativamente joven y la enorme mayoría de los descubrimientos han sido dirigidos por el grupo de Charles Serhan en Harvard desde la década de los '80. Durante el transcurso de esta tesis, se instauró un debate internacional sobre la posibilidad de detección y relevancia fisiológica de los SPMs. Esta discusión fue desencadenada por una revisión realizada por un grupo internacional de 18 autores referentes en análisis de lipidómica y encabezada por Schebb, donde cuestionan la relevancia biológica de los SPMs, critican las vías biosintéticas propuestas, los mecanismos de acción y GPRs descritos y fundamentalmente los protocolos de análisis de Serhan y sus grupos colaboradores. Estos autores concluyen que la capacidad de formar los productos trihidroxilados es extremadamente baja y que los SPMs dihidroxilados se detectan en niveles muy inferiores a los de los eicosanoides clásicos y los ácidos monohidroxilados. Sostienen que la detección de SPMs en leucocitos, se restringe a condiciones no fisiológicas como la estimulación con ionóforos de calcio y/o la suplementación con AG sustrato exógenos ¹⁵⁴. O Donnell y col. posteriormente publicaron otro trabajo en el que explicitan que los criterios de cuantificación de SPMs de los trabajos publicados por el laboratorio de Serhan (muchos de ellos en revistas de alto impacto) no cuentan con los estándares mínimos ¹³⁹. Estos planteos no sólo pusieron en cuestión la veracidad de los datos de SPMs sino que invitaron a reflexionar sobre el funcionamiento de los sistemas de publicación científica. A pesar de estos cuestionamientos, el grupo de Serhan, referente en SPMs, ha defendido la relevancia fisiológica y la capacidad de detección de estas oxilipinas en diferentes muestras biológicas y han argumentado la robustez de sus protocolos ^{107,155}, dando lugar incluso a enmiendas en algunos artículos.

En 2022, *Radmark* publicó una nueva revisión muy completa sobre la producción de oxilipinas en macrófagos, que integra los antecedentes mencionados anteriormente con los cuestionamientos aquí tratados. Concluyen que los principales productos de macrófagos derivados de monocitos de sangre de fenotipos M(IFN) o M(IFN/LPS) y M(IL-4), son PGE2 y TXB2. PGE2 según el contexto, puede tener funciones proinflamatorias (ejemplo: en la respuesta inflamatoria aguda), o inmunomoduladores. Lo mismo ocurre con TXB2 que puede

regular la función de células dendríticas y linfocitos T. De los productos 5-LOX, ambos espectros de polarización producen LTB4 y 5-HETE. El fenotipo M(IL-4) estimulado con bacterias es capaz de producir las Rv dihidroxiladas sin otro estímulo o suplementación ¹⁵⁶. En 2023, *Khant y col.* publicaron una revisión sobre la formación de oxilipinas en leucocitos humanos. Concluyen que la formación de SPMs trihidroxiladas (lipoxinas, RvD1-RvD4 y RvE1) en leucocitos es muy baja e indetectable, lo cual atribuye a una baja formación de epóxidos por la 5-LOX a partir de 15-HpETE, 18-HpEHTE y 17-HpDHA. Plantean que solo las dihidroxiladas (5,15-diHETE, 5,15-diHEPE,RvD5, RvE2 y RvE4) pueden ser detectados en leucocitos, pero en niveles aún mucho más bajos que los de PGs, LTs y derivados monohidroxilados. Además, cuestionan la relevancia fisiológica de los SPMs trihidroxilados en la resolución ya que se encuentran muy poco concentrados en leucocitos, son difícilmente detectados y sus receptores funcionales no han sido bien definidos ¹⁵⁷.

4.6. Análisis de oxilipinas en macrófagos J774.A1

En este punto, se evaluaron las oxilipinas producidas por los macrófagos murinos J774 como posible modelo de línea celular para el estudio de las LOX y oxilipinas. Se analizaron sobrenadantes de fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4} en condiciones basales y en respuesta al estímulo con zym, en los que se identificaron derivados COX del AA (PGD2, PGE2, PGF2 α , TXB2) en ausencia de isoprostanos, respaldando el origen enzimático de los prostanoides detectados. Los HETEs, derivados del EPA y DHA no fueron identificados (**Figura 40**). Es decir, que no se evidenció actividad de las LOX. La ausencia de derivados COX de DHA y EPA no reviste relevancia a estos efectos puesto que se trabajó con células no suplementadas y no se detectaron los precursores. De nuestro conocimiento, este es el primer análisis completo de oxilipinas en macrófagos J774.A1 polarizados. *Nouwade y col.* analizaron eicosanoides del AA en macrófagos J774 polarizados con LPS por 24 horas, en los que identificaron TXs, PGs y LXA4, pero no LTs ni HETEs ¹⁵³.

En concordancia con estos resultados, se detectaron muy bajos niveles de proteína 5-LOX en los J774.A1 en este trabajo. La expresión de la isoforma murina de actividad dual 12/15-LOX, no ha sido reportada en J774.A1, razón por la cual se han utilizado como modelo para el estudio del rol de la 12/15-LOX, células J774.A1 transfectados con plásmidos de la enzima ⁸⁵. En vistas de ello, no se profundizó en el análisis de oxilipinas de los J774.A1. Dentro de las líneas murinas, una alternativa a evaluar podrían ser los macrófagos de ratón RAW264.7, cuya expresión de isoformas COX y algunas LOX fue recientemente reportada ¹⁵⁸.

Figura 40. Identificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS en macrófagos J774.A1 polarizados en condiciones basales y estimulados con zym. Se polarizaron ~5x10⁵ células a M_{LPS} (anaranjado) y M_{IL-4} (violeta), se estimularon con zymosan (zym) y se analizaron las oxilipinas en los sobrenadantes. Se presentan los cromatogramas de HPLC-MS/MS en intensidades relativas de los analitos e IS de los derivados del AA vía COX, LOX y no enzimática (no enz). Correspondiente a la transición de mayor intensidad de cada analito ([1], **Apéndice 1.3**). Los demás derivados del AA y los derivados del DHA y EPA buscados no fueron encontrados. Representativo de n=2 réplicas de cultivo.

Figura en siguiente página



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los mecanismos de regulación de la respuesta inflamatoria resultan claves para la comprensión de su rol fisiológico y la patogenia de las múltiples enfermedades con componente inflamatorio descritas. La plasticidad de los macrófagos es un área de enorme interés en la que aún hay múltiples interrogantes. Un enigma fundamental para entender la regulación de la inflamación es el mecanismo por el cual se define la transición de la fase inicial de la respuesta inflamatoria aguda a la fase resolutiva. Esta transición es dirigida, al menos en parte, por oxilipinas, mediadores lipídicos sintetizados fundamentalmente por macrófagos residentes y diferenciados en el sitio inflamatorio. Las oxilipinas resolutivas son principalmente sintetizadas por isoformas LOX para las que se han observado diferencias de expresión y localización variables entre fenotipos de macrófagos en varios modelos. Se plantea que la regulación de las LOX a nivel de expresión génica y compartimentación, es clave para determinar el perfil de oxilipinas sintetizadas por los macrófagos y por tanto, para inducir la resolución de la inflamación.

En este trabajo se estudió la expresión, localización subcelular y síntesis de oxilipinas de macrófagos humanos polarizados. Para ello, se realizó la puesta a punto del cultivo de macrófagos primarios derivados de monocitos de sangre, modelo de referencia para el estudio de la biología de macrófagos humanos respaldado por una vasta bibliografía en el área de resolución de la inflamación. Los fenotipos macrofágicos, M_{LPS} y M_{IL-4}, presentaron diferencias morfológicas y una elevada inducción de los marcadores fenotípicos CD80 y CD206, respectivamente. Se discutieron algunos aspectos del protocolo de generación de macrófagos derivados de PBMCs polarizados que se podrían optimizar, de los que se destacan: i) aislar los monocitos de los PBMCs por un método de selección magnética ^{38,57}; ii) polarizar los macrófagos con LPS e IFN-γ, en lugar de únicamente LPS, para lograr una polarización más marcada ³⁶.

La maquinaria de síntesis de oxilipinas de los fenotipos generados se verificó a nivel de proteína, logrando reproducir lo reportado en la bibliografía con protocolos de polarización similares ^{14,58}. La 5-LOX se expresó en niveles similares en ambos fenotipos y su proteína activadora FLAP se expresó mayormente en M_{LPS} . 15-LOX1 y 15-LOX2 se expresaron únicamente en el fenotipo M_{IL-4} . La 12-LOX, importante para la síntesis de Maresinas, fue identificada en M_{IL-4} , lo que no había sido verificado anteriormente por western blot. La expresión de COX-1 es conocidamente constitutiva y la inducción de COX-2 fue verificada en ambos fenotipos.

Si bien la expresión de las principales LOX macrofágicas en los fenotipos estudiados fue concluyente y coherente con lo reportado en la bibliografía, la localización subcelular de las isoformas LOX aún requiere mayor análisis. 5-LOX y 15-LOX1 fueron observadas predominantemente en el núcleo, aunque también de forma difusa en el citosol, distribución que no presentó diferencias entre fenotipos ni por el estímulo TLR2. Resulta de interés establecer la colocalización de la 5-LOX y 15-LOX1 en condiciones basales y los cambios que se producen con diferentes estímulos ya que se ha visto que los cambios de localización pueden ser estímulo-dependientes ⁵⁸.

Las oxilipinas producidas por los fenotipos de macrófagos derivados de monocitos de sangre fueron analizadas por lipidómica con un método desarrollado previamente en el laboratorio. Se detectaron derivados del AA, LA, DHA y EPA por vías COX, 5-LOX, 12-LOX, 15-LOXs y CYP. No se identificaron SPMs en los sobrenadantes ni en lisados de macrófagos polarizados pese a suplementar con PUFAs y estimular con un ligando TLR2 (zym). Considerando que en el trabajo de *Werz y col.* se reportó que la síntesis de SPMs puede ser dependiente de la patogenicidad bacteriana ⁵⁸, se podría realizar un análisis de oxilipinas con el modelo

caracterizado pero utilizando patógenos no atenuados como estímulo en lugar de Zymosan. Otra opción es incubar además de con un estímulo TLR2 o TLR4 con el péptido fMLF, aunque en el trabajo de *Ebert y col.* tampoco identificaron SPMs en estas condiciones ¹⁴.

La dificultad para detectar SPMs es una problemática que trasciende a esta investigación, tal como reportó un consorcio de grupos que cuestionan la existencia y posibilidad de SPMs endógenas ¹⁵⁴.

Los macrófagos derivados de monocitos de sangre polarizados a fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4} son el modelo celular humano más utilizado para el estudio de las oxilipinas y LOX de macrófagos. Sin embargo, entre otras desventajas propias de los cultivos primarios, el número de monocitos purificados de una muestra de sangre fresca es acotado, el tiempo de cultivo es extenso y la variabilidad biológica es importante, esto último evidenciado en los resultados del análisis de oxilipinas y en los distintos niveles de expresión de las enzimas entre donantes. El último objetivo de la tesis fue evaluar líneas celulares para el estudio de los mediadores lipídicos inflamatorios producidos por las LOX de macrófagos. La línea murina J774, ampliamente utilizada para el estudio de la biología de los macrófagos no evidenció actividad LOX en el análisis de oxilipinas, por lo que no se presenta como un buen modelo para la aplicación buscada. De todas formas, tiene mayor relevancia el estudio en macrófagos humanos por las diferencias en las isoformas de 15-LOXs entre especies. Contemplando las diferentes funciones de los macrófagos de origen tisular y reclutados en la respuesta inflamatoria aguda, es muy probable que trabajar con una línea de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos emule con mayor precisión las condiciones fisiológicas. Los macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos THP-1 con PMA, se postulan por tanto como un buen modelo de línea para el estudio del rol de las LOX en inflamación. El estudio de expresión de LOX y FLAP y el análisis del perfil de oxilipinas de este trabajo, sustentan su ya conocida semejanza funcional y estructural con los monocitos de sangre. Los fenotipos M_{LPS} y M_{IL-4} inducidos presentaron una morfología acorde a lo reportado y se verificó en los M_{II-4} la inducción del marcador fenotípico CD163. La expresión de 5-LOX, FLAP, 12-LOX, 15-LOX1 y 15-LOX2 fue muy similar a la observada en los fenotipos de macrófagos derivados de monocitos de sangre, lo cual no se había reportado con anterioridad. En concordancia, las oxilipinas identificadas en sus sobrenadantes fueron similares, con derivados COX, LOX y CYP del AA, DHA y EPA. Como perspectivas de esta tesis, se plantea optimizar los modelos de macrófagos humanos,

Como perspectivas de esta tesis, se plantea optimizar los modelos de macrófagos humanos, integrando los aspectos previamente discutidos, y profundizar en la caracterización de los macrófagos derivados de THP-1 como modelo celular para el análisis de las oxilipinas en el contexto de la inflamación. Con estas herramientas, se espera avanzar en la comprensión de los cambios dinámicos en la maquinaria biosintética de oxilipinas, para contribuir a esclarecer los mecanismos subyacentes a la resolución de la inflamación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771–776 (2010).
- 2. Meizlish, M. L., Franklin, R. A., Zhou, X. & Medzhitov, R. Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **39**, 557–581 (2021).
- 3. Cavaillon, J.-M. Once upon a time, inflammation. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* (2021) doi:10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0147.
- 4. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. (Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, 2015).
- 5. Kulinsky, V. I. Biochemical aspects of inflammation. *Biochem. Mosc.* 72, 595–607 (2007).
- 6. Dennis, E. A. & Norris, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 511–523 (2015).
- 7. Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M. & Teixeira, M. M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front. Immunol.* **7**, (2016).
- 8. Furman, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **25**, 1822–1832 (2019).
- 9. Rankin, L. C. & Artis, D. Beyond Host Defense: Emerging Functions of the Immune System in Regulating Complex Tissue Physiology. *Cell* **173**, 554–567 (2018).
- 10. Nathan, C. Nonresolving inflammation redux. *Immunity* 55, 592–605 (2022).
- 11. Medzhitov, R. The spectrum of inflammatory responses. Science 374, 1070–1075 (2021).
- 12. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 375–388 (2020).
- 13. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
- 14. Ebert, R. *et al.* Long-term stimulation of toll-like receptor-2 and -4 upregulates 5-LO and 15-LO-2 expression thereby inducing a lipid mediator shift in human monocyte-derived macrophages. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **1865**, 158702 (2020).
- 15. Harper's Illustrated Biochemistry. (Mcgraw Hill, New York, 2023).
- 16. Dembic, Z. Introduction—Common Features About Cytokines. in *The Cytokines of the Immune System* 1–16 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-419998-9.00001-8.
- 17. Dembic, Z. Cytokines of the Immune System. in *The Cytokines of the Immune System* 143–239 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-419998-9.00006-7.
- 18. Xia, T. *et al.* Advances in the study of macrophage polarization in inflammatory immune skin diseases. *J. Inflamm.* **20**, 33 (2023).
- Cambier, S., Gouwy, M. & Proost, P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cell. Mol. Immunol.* **20**, 217–251 (2023).
- 20. Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92–101 (2014).
- 21. Ji, J. *et al.* Chemerin attracts neutrophil reverse migration by interacting with C–C motif chemokine receptor-like 2. *Cell Death Dis.* **15**, 425 (2024).
- 22. Schett, G. & Neurath, M. F. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat. Commun.* **9**, 3261 (2018).
- 23. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. How Neutrophils Meet Their End. *Trends Immunol.* **41**, 531–544 (2020).
- 24. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
- 25. Peace, C. G. & O'Neill, L. A. J. The role of itaconate in host defense and inflammation. *J. Clin. Invest.* **132**, (2022).

- 26. Wu, Z. *et al.* Control of Inflammatory Response by Tissue Microenvironment. *bioRxiv* 2024.05.10.592432 (2024) doi:10.1101/2024.05.10.592432.
- 27. Gordon, S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. Immunity 44, 463–475 (2016).
- Gonzalez-Perilli, L., Prolo, C. & Álvarez, M. N. Arachidonic Acid and Nitroarachidonic: Effects on NADPH Oxidase Activity. in *Bioactive Lipids in Health and Disease* (eds. Trostchansky, A. & Rubbo, H.) vol. 1127 85–95 (Springer International Publishing, Cham, 2019).
- 29. Mosser, D. M., Hamidzadeh, K. & Goncalves, R. Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 579–587 (2021).
- 30. Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449 (2016).
- Bassler, K., Schulte-Schrepping, J., Warnat-Herresthal, S., Aschenbrenner, A. C. & Schultze, J. L. The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 269–293 (2019).
- 32. Jenkins, S. J. & Allen, J. E. The expanding world of tissue-resident macrophages. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1882–1896 (2021).
- 33. Guilliams, M. & Svedberg, F. R. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nat. Immunol.* **22**, 118–127 (2021).
- 34. Blériot, C., Chakarov, S. & Ginhoux, F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* **52**, 957–970 (2020).
- 35. Freshney, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. (Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J, 2010).
- 36. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
- 37. Piatnitskaia, S. *et al.* Modelling of macrophage responses to biomaterials in vitro: state-of-the-art and the need for the improvement. *Front. Immunol.* **15**, (2024).
- Nielsen, M. C., Andersen, M. N. & Møller, H. J. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. *Immunology* 159, 63–74 (2020).
- Lukic, A. *et al.* GM-CSF- and M-CSF-primed macrophages present similar resolving but distinct inflammatory lipid mediator signatures. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **31**, 4370–4381 (2017).
- Mendoza-Coronel, E. & CastaÃf±Ãf³n-Arreola, M. Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study. *Pathog. Dis.* **74**, ftw052 (2016).
- 41. Riddy, D. M. *et al.* Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. *PLOS ONE* **13**, e0197177 (2018).
- 42. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **23**, 37–45 (2014).
- Baxter, E. W. *et al.* Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFNγ+LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J. Immunol. Methods* 478, 112721 (2020).
- 44. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A. & Donnelly, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* **430**, 64–70 (2016).
- 45. Cossarizza, A. *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* **49**, 1457–1973 (2019).
- 46. Li, P. et al. Comparative Proteomic Analysis of Polarized Human THP-1 and Mouse

RAW264.7 Macrophages. Front. Immunol. 12, 700009 (2021).

- 47. Khatua, S., Simal-Gandara, J. & Acharya, K. Understanding immune-modulatory efficacy *in vitro. Chem. Biol. Interact.* **352**, 109776 (2022).
- 48. Public Health England. European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC).
- Mezouar, S., Mege, J.-L., Mezouar, S. & Mege, J.-L. New Tools for Studying Macrophage Polarization: Application to Bacterial Infections. in *Macrophages* (IntechOpen, 2020). doi:10.5772/intechopen.92666.
- 50. Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T. & Castegna, A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
- 51. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
- 52. Zhang, Q. & Sioud, M. Tumor-Associated Macrophage Subsets: Shaping Polarization and Targeting. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 7493 (2023).
- 53. Sanin, D. E. *et al.* A common framework of monocyte-derived macrophage activation. *Sci. Immunol.* **7**, eabl7482 (2022).
- 54. Loke, P. & Lin, J.-D. Redefining inflammatory macrophage phenotypes across stages and tissues by single-cell transcriptomics. *Sci. Immunol.* **7**, eabo4652 (2022).
- 55. Kalina, T. *et al.* CD Maps—Dynamic Profiling of CD1–CD100 Surface Expression on Human Leukocyte and Lymphocyte Subsets. *Front. Immunol.* **10**, 2434 (2019).
- 56. Kužílková, D. *et al.* Standardization of Workflow and Flow Cytometry Panels for Quantitative Expression Profiling of Surface Antigens on Blood Leukocyte Subsets: An HCDM CDMaps Initiative. *Front. Immunol.* **13**, 827898 (2022).
- 57. Chometon, T. Q. *et al.* A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. *PLOS ONE* **15**, e0231132 (2020).
- 58. Werz, O. *et al.* Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat. Commun.* **9**, 59 (2018).
- 59. Skytthe, M. K., Graversen, J. H. & Moestrup, S. K. Targeting of CD163+ Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5497 (2020).
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O. & Lecureur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* 281, 51–61 (2013).
- Rostam, H. M., Reynolds, P. M., Alexander, M. R., Gadegaard, N. & Ghaemmaghami, A. M. Image based Machine Learning for identification of macrophage subsets. *Sci. Rep.* 7, 3521 (2017).
- 62. Hourani, T. *et al.* Label-free macrophage phenotype classification using machine learning methods. *Sci. Rep.* **13**, 5202 (2023).
- 63. Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K. & Schwarz, P. M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 255–266 (2004).
- 64. El Kasmi, K. C. *et al.* Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **9**, 1399–1406 (2008).
- 65. Spickett, C. M. Formation of Oxidatively Modified Lipids as the Basis for a Cellular Epilipidome. *Front. Endocrinol.* **11**, (2020).
- 66. Nelson, D. L., Cox, M. M. & Lehninger, A. L. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W.H. Freeman and Company; Macmillan Higher Education, New York, NY : Houndmills, Basingstoke, 2017).
- 67. Chiurchiù, V. *et al.* Lipidomics of Bioactive Lipids in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Where Are We? *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6235 (2022).
- 68. Chiurchiù, V., Leuti, A. & Maccarrone, M. Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Front. Immunol.* **9**, (2018).

- 69. Liebisch, G. *et al.* Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J. Lipid Res.* **61**, 1539–1555 (2020).
- O'Donnell, V. B., Aldrovandi, M., Murphy, R. C. & Krönke, G. Enzymatically oxidized phospholipids assume center stage as essential regulators of innate immunity and cell death. *Sci. Signal.* **12**, eaau2293 (2019).
- Delmastro-Greenwood, M., Freeman, B. A. & Wendell, S. G. Redox-Dependent Anti-Inflammatory Signaling Actions of Unsaturated Fatty Acids. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 79–105 (2014).
- 72. LIPID MAPS Consortium. LIPID MAPS® Lipidomics Gateway.
- 73. Lee, J., Lee, H., Kang, S. & Park, W. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* **8**, 23 (2016).
- 74. Misheva, M. *et al.* Oxylipin metabolism is controlled by mitochondrial β-oxidation during bacterial inflammation. *Nat. Commun.* **13**, 139 (2022).
- 75. Chaves-Filho, A. B. *et al.* Plasma oxylipin profiling by high resolution mass spectrometry reveal signatures of inflammation and hypermetabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **208**, 285–298 (2023).
- 76. Hajeyah, A. A., Griffiths, W. J., Wang, Y., Finch, A. J. & O'Donnell, V. B. The Biosynthesis of Enzymatically Oxidized Lipids. *Front. Endocrinol.* **11**, (2020).
- Astudillo, A. M., Balboa, M. A. & Balsinde, J. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. (2019) doi:10.13039/501100014180.
- Smith, W. L. & Murphy, R. C. Chapter 9 The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)* (eds. Ridgway, N. D. & McLeod, R. S.) 259–296 (Elsevier, Boston, 2016). doi:10.1016/B978-0-444-63438-2.00009-2.
- 79. Leslie, C. C. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* **56**, 1386–1402 (2015).
- 80. Wood, I. *et al.* Free radical-dependent inhibition of prostaglandin endoperoxide H Synthase-2 by nitro-arachidonic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **144**, 176–182 (2019).
- 81. Smith, W. L. & Malkowski, M. G. Interactions of fatty acids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and coxibs with the catalytic and allosteric subunits of cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **294**, 1697–1705 (2019).
- 82. Smith, W. L., DeWitt, D. L. & Garavito, R. M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 145–182 (2000).
- Rouzer, C. A. & Marnett, L. J. Structural and Chemical Biology of the Interaction of Cyclooxygenase with Substrates and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Chem. Rev.* 120, 7592–7641 (2020).
- 84. Wang, B. *et al.* Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 94 (2021).
- 85. Kuhn, H., Banthiya, S. & van Leyen, K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 308–330 (2015).
- 86. Wood, I., Trostchansky, A. & Rubbo, H. Structural considerations on lipoxygenase function, inhibition and crosstalk with nitric oxide pathways. *Biochimie* **178**, 170–180 (2020).
- 87. Snodgrass, R. G. & Brüne, B. Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages. *Front. Pharmacol.* **10**, 719 (2019).
- 88. Benatzy, Y., Palmer, M. A. & Brüne, B. Arachidonate 15-lipoxygenase type B: Regulation, function, and its role in pathophysiology. *Front. Pharmacol.* **13**, 1042420 (2022).
- 89. Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D. & Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell*

Biol. Lipids 1851, 331–339 (2015).

- Archambault, A.-S. *et al.* Comparison of eight 15-lipoxygenase (LO) inhibitors on the biosynthesis of 15-LO metabolites by human neutrophils and eosinophils. *PLOS ONE* 13, e0202424 (2018).
- 91. Zheng, Z. *et al.* The biological role of arachidonic acid 12-lipoxygenase (ALOX12) in various human diseases. *Biomed. Pharmacother.* **129**, 110354 (2020).
- 92. Kaneisha Laboratories, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27 (2024).
- 93. UniProt Consortium. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase. (2024).
- 94. Rokach, J. & Powell, W. S. Eicosanoid receptors as therapeutic targets for asthma. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **135**, 1945–1980 (2020).
- 95. Wenzel, S. E. *et al.* PEBP1 Wardens Ferroptosis by Enabling Lipoxygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell* **171**, 628-641.e26 (2017).
- 96. Buczynski, M. W., Dumlao, D. S. & Dennis, E. A. *Thematic Review Series: Proteomics.* An integrated omics analysis of eicosanoid biology1[S]. *J. Lipid Res.* **50**, 1015–1038 (2009).
- 97. Dyall, S. C. *et al.* Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. *Prog. Lipid Res.* **86**, 101165 (2022).
- Serhan, C. N., Libreros, S. & Nshimiyimana, R. E-series resolvin metabolome, biosynthesis and critical role of stereochemistry of specialized pro-resolving mediators (SPMs) in inflammation-resolution: Preparing SPMs for long COVID-19, human clinical trials, and targeted precision nutrition. *Semin. Immunol.* **59**, 101597 (2022).
- Chiang, N., Libreros, S., Norris, P. C., Rosa, X. de la & Serhan, C. N. Maresin 1 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions. *J. Clin. Invest.* 133, (2023).
- 100. Vidar Hansen, T. & Serhan, C. N. Protectins: Their biosynthesis, metabolism and structure-functions. *Biochem. Pharmacol.* **206**, 115330 (2022).
- 101. Milne, G. L., Dai, Q. & L. Jackson Roberts, I. I. The isoprostanes—25 years later. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 433 (2015).
- 102. Galano, J.-M. *et al.* Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: An overview of 25 years of research in chemistry and biology. *Prog. Lipid Res.* **68**, 83–108 (2017).
- 103. Roberts, L. J. & Milne, G. L. Isoprostanes. J. Lipid Res. 50, S219–S223 (2009).
- 104. Gladine, C. & Fedorova, M. The clinical translation of eicosanoids and other oxylipins, although challenging, should be actively pursued. *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab* 21, 27–30 (2021).
- 105. Haeggström, J. Z. Leukotriene biosynthetic enzymes as therapeutic targets. *J. Clin. Invest.* **128**, 2680–2690.
- 106. Cossette, C. *et al.* Metabolism of anti-inflammatory OXE (oxoeicosanoid) receptor antagonists by nonhuman primates. *Eur. J. Pharm. Sci.* **172**, 106144 (2022).
- 107. Serhan, C. N. & Chiang, N. Resolvins and cysteinyl-containing pro-resolving mediators activate resolution of infectious inflammation and tissue regeneration. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **166**, 106718 (2023).
- 108. Meng, Y.-W. & Liu, J.-Y. Pathological and pharmacological functions of the metabolites of polyunsaturated fatty acids mediated by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochrome P450s in cancers. *Pharmacol. Ther.* **256**, 108612 (2024).
- 109. Miciaccia, M. *et al.* Three-dimensional structure of human cyclooxygenase (hCOX)-1. *Sci. Rep.* **11**, 4312 (2021).
- 110. Vangaveti, V. N., Jansen, H., Kennedy, R. L. & Malabu, U. H. Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with

metabolic syndrome and cancer. Eur. J. Pharmacol. 785, 70-76 (2016).

- Putman, A. K. & Contreras, G. A. 15-F2t-Isoprostane Favors an Anti-Inflammatory Phenotype in RAW 264.7 Macrophages during Endotoxin Challenge. *Antioxidants* 11, 586 (2022).
- 112. Auger, J.-P. *et al.* Metabolic rewiring promotes anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Nature* **629**, 184–192 (2024).
- 113. Aliabadi, A., Khanniri, E., Mahboubi-Rabbani, M. & Bayanati, M. Dual COX-2/15-LOX inhibitors: A new avenue in the prevention of cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **261**, 115866 (2023).
- Hildreth, K., Kodani, S. D., Hammock, B. D. & Zhao, L. Cytochrome P450-derived Linoleic Acid Metabolites EpOMEs and DiHOMEs: A Review of Recent Studies. *J. Nutr. Biochem.* 86, 108484 (2020).
- 115. Schopfer, F. J., Vitturi, D. A., Jorkasky, D. K. & Freeman, B. A. Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide* **79**, 31–37 (2018).
- Rao, Z. *et al.* Glucocorticoids regulate lipid mediator networks by reciprocal modulation of 15-lipoxygenase isoforms affecting inflammation resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **120**, e2302070120 (2023).
- 117. Spite, M. & Serhan, C. N. Novel Lipid Mediators Promote Resolution of Acute Inflammation: Impact of Aspirin and Statins. *Circ. Res.* **107**, 1170–1184 (2010).
- 118. Norris, P. C., Libreros, S. & Serhan, C. N. Resolution metabolomes activated by hypoxic environment. *Sci. Adv.* **5**, eaax4895 (2019).
- 119. Deng, B. *et al.* Maresin Biosynthesis and Identification of Maresin 2, a New Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Mediator from Human Macrophages. *PLOS ONE* **9**, e102362 (2014).
- 120. Dalli, J. *et al.* The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. *FASEB J.* **27**, 2573–2583 (2013).
- 121. Han, Y.-H. *et al.* A maresin 1/RORα/12-lipoxygenase autoregulatory circuit prevents inflammation and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Invest.* **129**, 1684–1698 (2019).
- 122. Wuest, S. J. A., Crucet, M., Gemperle, C., Loretz, C. & Hersberger, M. Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* **225**, 121–127 (2012).
- 123. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression1. *J. Immunol.* **177**, 7303–7311 (2006).
- Luo, M., Jones, S. M., Peters-Golden, M. & Brock, T. G. Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12165–12170 (2003).
- 125. Newcomer, M. E. & Gilbert, N. C. Location, Location, Location: Compartmentalization of Early Events in Leukotriene Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 25109–25114 (2010).
- 126. He, Z. *et al.* Phosphorylation of 5-LOX: The Potential Set-point of Inflammation. *Neurochem. Res.* **45**, 2245–2257 (2020).
- 127. Cai, B. *et al.* MerTK signaling in macrophages promotes the synthesis of inflammation resolution mediators by suppressing CaMKII activity. *Sci. Signal.* **11**, eaar3721 (2018).
- 128. Dalli, J. & Serhan, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* **120**, e60–e72 (2012).
- 129. Lara-Guzmán, O. J. et al. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and

inflammatory biomarkers in human macrophages. Redox Biol. 15, 1–11 (2018).

- Shiratori, H. *et al.* THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol. Immunol.* 88, 58–68 (2017).
- 131. Liu, T. *et al.* Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLOS ONE* **18**, e0286056 (2023).
- Starr, T., Bauler, T. J., Malik-Kale, P. & Steele-Mortimer, O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. *PLOS ONE* **13**, e0193601 (2018).
- Poggi, P. *et al.* Membrane fatty acid heterogeneity of leukocyte classes is altered during in vitro cultivation but can be restored with ad-hoc lipid supplementation. *Lipids Health Dis.* 14, 165 (2015).
- 134. Sorgi, C. A. *et al.* Dormant 5-lipoxygenase in inflammatory macrophages is triggered by exogenous arachidonic acid. *Sci. Rep.* **7**, 10981 (2017).
- 135. Mohd Yasin, Z. N., Mohd Idrus, F. N., Hoe, C. H. & Yvonne-Tee, G. B. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation* **128**, 67–82 (2022).
- 136. Monaco, G. *et al.* flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. *Bioinformatics* **32**, 2473–2480 (2016).
- 137. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
- 138. Mastrogiovanni, M. Detección, cuantificación y análisis de oxilipinas en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica. (Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA., Montevideo, 2022).
- 139. O'Donnell, V. B. *et al.* Failure to apply standard limit-of-detection or limit-of-quantitation criteria to specialized pro-resolving mediator analysis incorrectly characterizes their presence in biological samples. *Nat. Commun.* **14**, 7172 (2023).
- 140. Dannhauser, D. *et al.* Single cell classification of macrophage subtypes by label-free cell signatures and machine learning. *R. Soc. Open Sci.* **9**, 220270 (2022).
- 141. Selig, M. *et al.* Prediction of six macrophage phenotypes and their IL-10 content based on single-cell morphology using artificial intelligence. *Front. Immunol.* **14**, (2024).
- 142. Bourdely, P. *et al.* Autofluorescence identifies highly phagocytic tissue-resident macrophages in mouse and human skin and cutaneous squamous cell carcinoma. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
- 143. Reardon, A. J. F., Elliott, J. A. W. & McGann, L. E. Fluorescence as an alternative to light-scatter gating strategies to identify frozen–thawed cells with flow cytometry. *Cryobiology* **69**, 91–99 (2014).
- 144. Hornschuh, M. *et al.* Negative Magnetic Sorting Preserves the Functionality of Ex Vivo Cultivated Non-Adherent Human Monocytes. *Biology* **11**, 1583 (2022).
- 145. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–e80 (2010).
- 146. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1–9 (2014).
- Hartung, N. M. *et al.* Development of a quantitative proteomics approach for cyclooxygenases and lipoxygenases in parallel to quantitative oxylipin analysis allowing the comprehensive investigation of the arachidonic acid cascade. *Anal. Bioanal. Chem.* **415**, 913–933 (2023).
- 148. Asting, A. G. *et al.* EGF receptor and COX-1/COX-2 enzyme proteins as related to corresponding mRNAs in human per-operative biopsies of colorectal cancer. *BMC Cancer*

13, 511 (2013).

- 149. Groves, E., Dart, A. E., Covarelli, V. & Caron, E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1957–1976 (2008).
- 150. Tollis, S., Dart, A. E., Tzircotis, G. & Endres, R. G. The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. *BMC Syst. Biol.* **4**, 149 (2010).
- 151. Mastrogiovanni, M. *et al.* HPLC-MS/MS Oxylipin Analysis of Plasma from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Biomedicines* **10**, 674 (2022).
- 152. Caron, J. P., Gandy, J. C., Brown, J. L. & Sordillo, L. M. Docosahexaenoic acid-derived oxidized lipid metabolites modulate the inflammatory response of lipolysaccharide-stimulated macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **136**, 76–83 (2018).
- 153. Nouwade, K. *et al.* Comprehensive analysis of oxylipins using reverse phase liquid chromatography and data dependent acquisition workflow on LTQ-Orbitrap® Velos Pro. *Talanta* **266**, 124921 (2024).
- 154. Schebb, N. H. *et al.* Formation, Signaling and Occurrence of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators—What is the Evidence so far? *Front. Pharmacol.* **13**, 838782 (2022).
- 155. Dalli, J., Gomez, E. A. & Serhan, C. N. Evidence for the presence and diagnostic utility of SPM in human peripheral blood | bioRxiv. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.28.489064v1.
- 156. Radmark, O. Formation of eicosanoids and other oxylipins in human macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **204**, 115210 (2022).
- 157. Kahnt, A. S., Schebb, N. H. & Steinhilber, D. Formation of lipoxins and resolvins in human leukocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **166**, 106726 (2023).
- 158. Huff, H. C., Kim, J. S., Ojha, A., Sinha, S. & Das, A. Real time changes in the expression of eicosanoid synthesizing enzymes during inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **174**, 106839 (2024).

Nota: Las referencias bibliográficas de esta tesis fueron gestionadas utilizando Zotero (<u>https://www.zotero.org/</u>)

APÉNDICES

Apéndice 1. Método de análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS

1.1. Listado de oxilipinas analizadas

Tabla Apéndice 1.1. Listado de oxilipinas buscadas por HPLC-MS/MS

Abreviación	Nombre	Clase de molécula	Precursor	Vía de síntesis
12,13-DiHOME	Ácido 12,13-Dihidroxi-Octadecenoico	diol	LA	CYP
9,10-DiHOME	Ácido 9,10-Dihidroxi-Octadecenoico	diol	LA	CYP
13-HODE	Ácido 13-Hidroxi-Octadecadienoico	alcohol	LA	LOX
13-oxoODE	Ácido 13-Oxo-Octadecatrienoico	cetona	LA	LOX
9-HODE	Ácido 9-Hidroxi-Octadecadienoico	alcohol	LA	LOX
9-oxoODE	Ácido 9-Oxo-Octadecadienoico	cetona	LA	LOX
AA	Ácido Araquidónico	-	-	-
6k PGF1α	6-Keto-Prostaglandina F1 α	triol/cetona	AA	COX
PGF2α	Prostaglandina F2α	triol	AA	COX
PGD2	Prostaglandina D2	diol/cetona	AA	COX
PGE2	Prostaglandina E2	diol/cetona	AA	COX
TxB2	Tromboxano B2	triol	AA	COX
LTB4	Leucotrieno B4	diol	AA	LOX
LXA4	Lipoxina A4	triol	AA	LOX
LXB4	Lipoxina B4	triol	AA	LOX
12-HETE	Ácido 12-Hidroxi-Eicosatetraenoico	alcohol	AA	LOX
12-oxoETE	Ácido 12-Oxo-Eicosatetraenoico	cetona	AA	LOX
15-HETE	Ácido 15-Hidroxi-Eicosatetraenoico	alcohol	AA	LOX
15-oxoETE	Ácido 15-Oxo-Eicosatetraenoico	cetona	AA	LOX
5-HETE	Ácido 5-Hidroxi-Eicosatetraenoico	alcohol	AA	LOX
5-oxoETE	Ácido 5-Oxo-Eicosatetraenoico	cetona	AA	LOX
8-HETE	Ácido 8-Hidroxi-Eicosatetraenoico	alcohol	AA	no-enz
9-HETE	Ácido 9-Hidroxi-Eicosatetraenoico	alcohol	AA	no-enz
11-HETE	Ácido 11-Hidroxi-Eicosatetraenoico	alcohol	AA	no-enz
17-HETE	Ácido 17-Hidroxi-Eicosatetraenoico	alcohol	AA	CYP
5-iso PGF2αVI	Isoprostano $F_{2\alpha}$ -Iv	triol/cetona	AA	no-enz

8-iso PGF2αIII	Isoprostano $F_{2\alpha}$ -lii	triol/cetona	AA	no-enz
EPA	Ácido Eicosapentaenoico	-	-	-
18-HEPE	Ácido 18-Hidroxi-Eicosapentaenoico	alcohol	EPA	CYP
12-HEPE	Ácido 12-Hidroxi-Eicosapentaenoico	alcohol	EPA	LOX
RvE1	Resolvina E1	triol	EPA	LOX
DHA	Ácido Docosahexaenoico	-	-	-
PD1	Protectina D1	diol	DHA	LOX
Mar1	Maresina 1	diol	DHA	LOX
RvD1	Resolvina D1	triol	DHA	LOX
RvD2	Resolvina D2	triol	DHA	LOX
RvD3	Resolvina D3	triol	DHA	LOX
RvD5	Resolvina D5	diol	DHA	LOX
4-HDHA	Ácido 4-Hidroxi-Docosahexaenoico	alcohol	DHA	LOX
7-HDHA	Ácido 7-Hidroxi-Docosahexaenoico	alcohol	DHA	LOX
11-HDHA	Ácido 7-Hidroxi-Docosahexaenoico	alcohol	DHA	no-enz
13-HDHA	Ácido 13-Hidroxi-Docosahexaenoico	alcohol	DHA	no-enz
14-HDHA	Ácido 14-Hidroxi-Docosahexaenoico	alcohol	DHA	LOX
16-HDHA	Ácido 16-Hidroxi-Docosahexaenoico	alcohol	DHA	no-enz
20-HDHA	Ácido 20-Hidroxi-Docosahexaenoico	alcohol	DHA	no-enz

AA: Ácido araquidónico, DHA: Ácido docosahexaenoico, EPA: Ácido eicosapentaenoico, aLA: Ácido alfa-linoleico, CYP: Citocromos P450, LOX: Lipoxigenasas, no-enz: sin enzima descrita. Modificado de ¹³⁸.





Figura Apéndice 1.2- Perfil de elución de oxilipinas del LA, AA, DHA y EPA por HPLC. Se presentan los cromatogramas en intensidades relativas de los estándares externos utilizando la transición más intensa (Transición [1], Apéndice 1.3). Escalas de tiempo fraccionadas para la visualización. Modificado de ¹³⁸.

1.3. Parámetros de ESI- MS/MS utilizados para el análisis por MRM

Q1	Q3	t dwell	ID	DP	CE
373.5	249.1	35	(d4) 6k PGF1α[1]	-80	-39
373.5	211.0	5	(d4) 6k PGF1a[2]	-80	-34
373.5	293.1	5	(d4) 6k PGF1α[3]	-80	-29
373.5	167.0	5	(d4) 6k PGF1α[4]	-80	-34
369.2	245.0	35	6k PGF1α[1]	-80	-39
369.2	351.0	5	6k PGF1α[2]	-80	-39
369.2	315.0	5	6k PGF1α[3]	-80	-39
369.2	163.0	5	6k PGF1α[4]	-80	-39
353.3	197.0	35	(d4) RvE1[1]	-80	-25
349.3	195.0	35	RvE1[1]	-80	-25
349.3	161.0	5	RvE1[2]	-80	-30
349.3	205.1	5	RvE1[3]	-80	-22
349.3	143.0	5	RvE1[4]	-80	-24
373.2	173.0	35	(d4) TXB2[1]	-80	-26
373.2	199.1	5	(d4) TXB2[2]	-80	-22
373.2	293.1	5	(d4) TXB2[3]	-80	-21
373.2	211.0	5	(d4) TXB2[4]	-80	-27
369.2	169.1	35	TxB2[1]	-80	-26
369.2	325.0	5	TxB2[2]	-80	-11
369.2	195.1	5	TxB2[3]	-80	-22
369.2	177.1	5	TxB2[4]	-80	-30
357.3	197.0	35	(d4) PGF2α/(d4) 8-iso PGF2α VI[1]	-80	-35
357.3	313.2	5	(d4) PGF2α/(d4) 8-iso PGF2α VI[2]	-80	-28
357.3	295.0	5	(d4) PGF2α/(d4) 8-iso PGF2α VI[3]	-80	-28
364.4	115.0	35	(d11) 5-iso PGF2αVI[1]	-80	-30
364.4	346.3	5	(d11) 5-iso PGF2αVI[2]	-80	-25
364.4	320.2	5	(d11) 5-iso PGF2αVI[3]	-100	-30
353.2	193.1	35	PGF2α/8-iso PGF2α VI[1]	-80	-35
353.2	291.2	5	PGF2α/8-iso PGF2α VI[3]	-80	-28
353.2	182.9	5	PGF2α/8-iso PGF2α VI[4]	-80	-35
353.2	115.0	35	5-iso PGF2αVI[1]	-80	-30
353.2	335.3	5	5-iso PGF2αVI[2]	-80	-25
353.2	317.0	5	5-iso PGF2αVI[4]	-80	-20
355.5	275.2	35	(d4) PGD2/E2[1]	-80	-19
355.5	193.1	5	(d4) PGD2/E2[2]	-80	-23
355.5	239.1	5	(d4) PGD2/E2[3]	-80	-28
351.2	271.2	35	PGE2/PGD2[1]	-80	-19
351.2	315.2	5	PGE2/PGD2[2]	-80	-14
351.2	333.2	5	PGE2/PGD2[3]	-80	-13
351.2	189.1	5	PGE2/PGD2[4]	-80	-23
351.1	221.0	35	LXB4[1]	-50	-22
351.1	115.0	35	LXA4[1]	-50	-22
351.1	217.0	5	LXA4[2]	-50	-28
351.1	235.0	5	LXA4[3]	-50	-20
351.1	135.0	5	LXA4[4]	-50	-22

Tabla Apéndice 1.3. Parámetros de ESI- MS/MS del análisis por MRM en periodos

380.2	141.0	35	(d5) RvD1[1]	-80	-20
380.2	121.0	5	(d5) RvD1[2]	-80	-30
375.1	147.0	35	RvD3[1]	-80	-25
375.1	181.0	5	RvD3[2]	-80	-23
375.2	137.0	5	RvD3[3]	-80	-22
375.2	175.0	35	RvD2[1]	-80	-30
375.2	215.0	5	RvD1/RvD2[2]	-80	-28
375.2	141.0	35	RvD1/RvD2[1]	-80	-20
375.2	233.0	5	RvD1[2]	-80	-20
375.2	121.0	5	RvD1[3]	-80	-35
359.1	199.0	50	RvD5[1]	-80	-20
359.1	141.0	10	RvD5[2]	-80	-19
359.1	261.0	10	RvD5[3]	-80	-21
364.5	177.0	50	(d5) MaR1[1]	-80	-22
364.5	157.0	10	(d5) MaR1[2]	-80	-20
359.1	177.0	50	Mar1[1]	-80	-22
359.1	297.0	10	Mar1[2]	-80	-21
359.1	250.0	10	Mar1[3]	-80	-21
359.1	341.0	10	Mar1[4]	-80	-20
359.1	221.0	10	Mar1[5]	-80	-24
359.2	153.0	50	PD1[1]	-100	-21
359.2	206.0	10	PD1[2]	-100	-21
359.2	123.0	10	PD1[3]	-100	-20
335.2	195.0	50	LTB4[1]	-100	-23
335.2	317.1	10	LTB4[2]	-100	-19
335.2	129.0	10	LTB4[3]	-100	-28
335.2	151.0	10	LTB4[4]	-100	-27
313.2	183.0	50	12,13 diHOME[1]	-100	-29
313.2	195.0	10	12,13 diHOME[2]	-100	-29
313.2	201.0	50	9,10 diHOME[1]	-100	-29
313.2	171.0	10	9,10 diHOME[2]	-100	-30
313.2	295.0	10	12,13 diHOME / 9,10 diHOME[3]	-100	-26
313.2	277.0	10	12,13 diHOME / 9,10 diHOME[4]	-100	-29
293.2	275.0	10	HOTrEs[1]	-90	-22
293.2	231.0	10	HOTrEs[3]	-90	-26
337.5	207.0	50	14,15-diHETrE[1]	-90	-24
337.3	319.0	10	diHETrEs[1]	-90	-24
361.5	229	50	19,20 DiHDPA[1]	-90	-22
337.5	167.0	50	11,12-diHETrE[1]	-90	-25
337.5	127.0	50	8,9-diHETrE[1]	-90	-27
293.2	171.0	50	9-HOTrE[1]	-90	-22
361.5	343	10	19,20 DiHDPA[2]	-90	-22
361.5	281	10	19,20 DiHDPA[3]	-90	-22
317.1	299.1	25	HEPE[1]	-100	-19
293.2	275.0	25	HOTrEs[2]	-90	-22
293.2	195.0	25	13-HOTrE[1]	-90	-28
337.3	319.0	25	diHETrEs[1]	-90	-24
337.3	127.0	25	8,9-diHETrE[1]	-90	-27
337.3	145.1	25	5,6-diHETrE[1]	-90	-22
293.2	171.0	25	9-HOTrE[1]	-90	-22
317.1	299.1	25	HEPE[1]	-100	-19

Q1: ion precursor; Q3: ion producto; t dwell: tiempo de adquisición; DP: potencial de desaglomeración ; CE: energía de colisión. Parámetros optimizados previamente en el laboratorio publicados en ¹⁵¹.

1.4. Curvas de calibración

Analito	IS	а	b	R ²	Ra	ingo (pg)
12,13 diHOME	(d5) MaR1	31.28735	0.00461	0.99999	25	2500
12,13 EpOME	(d4)13-HODE	0.19826	1.08E-04	0.99974	25	2500
9,10 diHOME	(d5) MaR1	225.14566	1.06863	0.99886	25	1250
9,10 EpOME	(d4)9-HODE	0.26935	1.87E-04	0.99943	25	2500
13-HODE	(d4)13-HODE	2.09516	0.00354	0.99976	25	2500
13-oxoODE	(d4)13-HODE	0.24426	0.0012	0.99976	25	2500
9-HODE	(d4)9-HODE	1.08524	0.05323	0.99758	25	2500
9-oxoODE	(d4)9-HODE	0.56833	0.00417	0.99741	25	2500
AA	(d8) 5-HETE	0.04221	0.00541			
6k PGF1α	(d4) 6k PGF1α	2.37925	0.01705	0.99581	25	2500
PGF2a	(d4) PGF2α	2.22926	0.03296	0.99522	25	2500
PGD2	(d4) PGD2	6.92117	0.04975	0.99453	25	2500
PGE2	(d4) PGE2	4.15027	0.0201	0.99817	25	2500
TxB2	(d4) TxB2	1.95717	0.0109	0.99575	25	2500
LTB4	(d5) MaR1	7.53503	-0.02112	0.99970	25	2500
LXA4	(d5) MaR1	5.62113	-0.0023	0.99813	50	1000
LXB4	(d5) MaR1	1.95314	0.00523	0.99763	25	500
12-HETE	(d8) 12-HETE	1.88272	0.00637	0.99992	25	2500
12-oxoETE	(d8) 12-HETE	0.52842	-0.00159	0.99978	25	2500
15-HETE	(d8) 15-HETE	1.5209	0.00216	0.99998	25	2500
15-oxoETE	(d8) 15-HETE	0.6503	0.00305	0.99994	25	2500
5-HETE	(d8) 5-HETE	1.25232	0.00505	0.99990	25	2500
5-oxoETE	(d8) 5-HETE	0.22993	-2.72E-04	0.99989	25	2500
8-HETE	(d8) 12-HETE	1.35855	0.00645	0.99980	25	2500
9-HETE	(d8) 12-HETE	0.38928	0.00131	0.99995	25	2500
11-HETE	(d8) 15-HETE	4.16814	0.01445	0.99990	25	2500
18-HEPE	(d8) 15-HETE	0.46928	-0.00117	0.99953	25	2500
RvE1	(d4) RvE1	1.7233	0.00245	0.99944	25	250
DHA	(d8) 5-HETE	0.26642	0.01722			
PD1	(d5) MaR1	2.81574	-0.00558	0.99989	25	2500
MaR1	(d5) MaR1	1.40761	0.00367	0.99998	25	2500
RvD1	(d5) RvD1	0.58949	0.01048	0.99885	50	1000
RvD2	(d5) RvD1	0.30054	3.00E-04	0.99769	25	500
RvD3	(d5) RvD1	0.6528	0.00114	0.99851	25	500
RvD5	(d5) MaR1	4.17593	0.00295	0.99971	25	500
7 HDoHE	(d8) 5-HETE	0.67953	3.73E-04	0.99990	25	2500
14 HDoHE	(d8) 12-HETE	4.62304	-0.00544	0.99977	25	2500
16 HDoHE	(d8) 15-HETE	2.03503	-0.0075	0.99956	25	2500

Curvas area ratio *vs* mass ratio (analito/ IS) con ajuste lineal. IS: estándar interno; a: pendiente de la recta; b: intercepto en y; R²: coeficiente de regresión lineal. Modificado de ¹⁵¹.

Tabla Apéndice 1.4.1. Calibrantes utilizados para los analitos sin estándar externo disponible

_

Analito	Calibrante
5-iso PGF2αVI	PGF2α
8-iso PGF2αIII	PGF2α
EPA	AA
12-HEPE	18-HEPE
4-HDHA	7-HDHA
10-HDHA	14-HDHA
11-HDHA	14-HDHA
13-HDHA	14-HDHA
20-HDHA	16-HDHA

1.5. Límites de detección y cuantificación

Tabla	Apéndice	1.5.	Límites	de	detección	(LOD) y	cuantificación	(LOQ ₁₀)	de	las
oxilipi	nas									

Oxilipina	LOD	LOQ ₁₀	Oxilipina	LOD	
PGF1α	1,10E+00	3,68E+00	13-HODE	5,11E+00	
vE1	6,88E-01	2,29E+00	12,13-EpOME	1,05E+01	
xB2	1,03E-01	3,44E-01	9-HODE	5,34E+01	
PGF2α	2,74E+01	9,13E+01	9,10-EpOME	6,60E+00	
-iso PGF2α VI	2,89E+01	9,62E+01	13-oxoODE	2,00E+01	
iso PGF2αVI	5,17E+00	1,72E+01	9-oxoODE	1,16E+01	
PGE2	3,53E+00	1,18E+01	17-HETE	1,08E+00	
PGD2	9,75E-01	3,25E+00	15-HETE	1,09E+00	
XB4	2,92E+00	9,72E+00	11-HETE	1,82E+00	
_XA4	5,77E-01	1,92E+00	8-HETE	1,90E+00	
RvD3	2,31E+00	7,69E+00	12-HETE	1,30E+00	
RvD2	1,36E+00	4,55E+00	9-HETE	1,62E+00	
RvD1	1,07E+01	3,56E+01	5-HETE	3,56E+00	
RvD5	6,21E-01	2,07E+00	15-oxoETE	3,96E+00	
/laR1	2,15E+00	7,16E+00	12-oxoETE	3,60E-01	
D1	4,84E-01	1,61E+00	5-oxoETE	6,61E-01	
TB4	5,88E-01	1,96E+00	20-HDoHE	2,21E-01	
2,13-DiHOME	3,73E-01	1,24E+00	16-HDoHE	2,56E-01	
,10-DiHOME	1,94E+00	6,48E+00	13-HDoHE	7,92E-02	
14,15-DiHETrE	9,34E-02	3,11E-01	14-HDoHE	5,65E-02	
19,20 DiHDPA	1,45E+00	4,85E+00	10-HDoHE	1,29E-01	
11,12-DiHETrE	1,19E+00	3,98E+00	11-HDoHE	7,31E-02	
3,9-DiHETrE	1,62E+00	5,38E+00	7-HDoHE	1,80E+00	
-HOTrE	4,36E+01	1,45E+02	4-HDoHE	1,68E+00	
13-HOTrE	2,51E+00	8,38E+00	AA	2,90E+02	
8-HEPE	1,35E+00	4,51E+00	DHA	8,29E+01	
2-HEPE	1,22E+00	4,05E+00	EPA	5,75E+01	

Los parámetros fueron previamente determinados en el laboratorio por ¹⁵¹.

1.6. Detección de estándares de oxilipinas en medio de cultivo



Figura Apéndice 1.6. Detección de estándares internos (IS) de oxilipinas en medio de cultivo por HPLC-MS/MS. Para descartar interferencias en la detección de las oxilipinas de sobrenadantes por componentes del medio de cultivo, se verificó la detección de los IS en controles de RPMI sin suero. Se presentan cromatogramas en intensidades relativas para la transición de mayor intensidad de cada IS ([1] en Apéndice 1.3). Representativo de n=2 réplicas.

Apéndice 2. Anticuerpos y otras tinciones empleadas en inmunoensayos

2.1. Anticuerpos conjugados utilizados para Citometría de Flujo

Tabla Apéndice 2.1. Anticuerpos conjugados y otras tinciones utilizadas para Citometría de Flujo

Marcador/ Blanco	Fluorocromo	Clona	Fabricante (código)
CD11b	PE-Cy7	ICRF 44	Biolegend #301322
			Santa Cruz Biotech
CD54	FITC	G-5	#8439
CD80	PE	2D10	Biolegend #305207
			Santa Cruz Biotech
CD163	Alexa Fluor 488	GHI/61	20066
CD206	PE	15-2	Biolegend #321105
TO-PRO-3			
(Cromatina)	TO-PRO-3	-	

2.2. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot

Tabla Apéndice 2.2. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot

Proteína blanco	Fabricante y código	Dilución
5-LOX	Abcam #169755	1:1000
12-LOX	Abcam #211506	1:1000
15-LOX1	Abcam #244205	1:1000
15-LOX2	Cayman #10004454	1: 200
FLAP	Åbcam #85227	1:1000
COX-2	Cayman #160112	1:1000
□-actina	Sigma-Aldrich #A5316	1:1000
a-tubulina	Sigma-Aldrich #T3526	1:1000

2.3. Anticuerpos y otras tinciones utilizados para Inmunofluorescencia por Microscopía Confocal

Tabla Apéndice 2.3. Anticuerpos primarios y otras tinciones utilizadas para IF por Microscopía Confocal

Nombre/ Blanco	Fabricante y código	Dilución	
5-LOX	Santa Cruz Biotech #136195	1: 50	
FLAP	Abcam #85227	1:100	
15-LOX1	Abcam #244205	1:100	
Faloidina (Actina)	Invitrogen #R37112	2 gotas/ mL	
DAPI (Cromatina)		1:1000	



Apéndice 3. Controles del estudio de marcadores de superficie por Citometría de Flujo

3.1 Macrófagos primarios

Figura Apéndice 3.1.1. Controles FMO del estudio de marcadores de superficie en células derivadas de PBMCs por Citometría de Flujo. Panel superior: Controles para marcadores de fenotipo M_{LPS} : CD80 y CD54. Panel inferior: Controles para marcadores de fenotipo M_{IL-4} : CD163 y CD206. Se realizaron gates para la población de células CD11b+ definiendo<0.2% de positivas para cada marcador. Condiciones experimentales en Figura 21.



Figura Apéndice 3.1.2. Autofluorescencia de las poblaciones derivadas de PBMCs del análisis de expresión de marcadores fenotípicos de superficie por Citometría de Flujo. Se observa la autofluorescencia en canales de PE (izquierda) y FITC (derecha). Se observa una mayor autofluorescencia de los macrófagos (R3, azul) respecto a monocitos (R2, amarillo) y linfocitos (R1, rojo) en el control sin tinción (mezcla de muestras). Experimento descrito en la Figura 21.



Figura Apéndice 3.1.3. Controles de compensación en canal verde del estudio de marcadores de superficie en células derivadas de PBMCs por Citometría de Flujo. A izquierda: CD54-FITC en M_{LPS}, a derecha: CD163-A488 en M_{IL-4}. Se observa el solapamiento de los histogramas de intensidad de fluorescencia. Experimento descrito en la Figura 21.





Figura Apéndice 3.2. Controles del ensayo de expresión de marcadores fenotípicos de superficie de células derivadas de monocitos THP-1 polarizadas por Citometría de Flujo. Gráfico de FSC-H *vs* SSC-H para la muestra de monocitos THP-1 utilizado para definir los gates R2 (monocitos) y R3 (macrófagos). No se identifica la R1 correspondiente a linfocitos ya que se partió de una línea de monocitos. Panel superior: células con tinción anti-CD54. Panel inferior: Células con tinción anti-CD163. Representativo de n=3 réplicas de cada tinción. Las condiciones experimentales se detallaron en la Figura 23.

Apéndice 4. Réplicas de Western Blot





Figura Apéndice 4.2. Réplicas de Western blot anti-5-LOX en macrófagos derivados de monocitos de sangre (A), THP-1 (B) y macrófagos J774 (C). Para las células primarias se describe el código de donante de cada ensayo y para algunos donantes se presentan resultados de réplicas independientes de cultivo de un mismo ensayo o ensayos independientes. La carga proteica fue controlada con una proteínas única (α -tubulina o β -actina) o mediante visualización del conjunto de proteínas con tinción de Ponceau. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización de las imágenes.



Figura Apéndice 4.3. Réplicas de Western blot anti-FLAP en macrófagos derivados de monocitos de sangre (A) y THP-1 (B). Se describe el código de donante de cada ensayo y para algunos donantes se presentan resultados de réplicas independientes de cultivo sembradas en un mismo ensayo o ensayos independientes. La carga proteica fue controlada con α -tubulina (α -tub) o β -actina o mediante visualización del conjunto de proteínas con tinción de Ponceau. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización de las imágenes.

4.3. Réplicas de Western Blot anti-FLAP

4.4. Réplicas de Western Blot anti-15-LOX1



Figura Apéndice 4.4. Réplicas de Western blot anti-15-LOX1 en macrófagos derivados de monocitos de sangre (A) y THP-1 (B). Se describe el código de donante de cada ensayo y para algunos donantes se presentan resultados de réplicas independientes de cultivo sembradas en un mismo ensayo o ensayos independientes. La carga proteica fue controlada con una proteínas única (α -tubulina o β -actina) o mediante visualización del conjunto de proteínas con tinción de Ponceau. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización de las imágenes.
4.5. Réplicas de Western Blot anti-15-LOX2



Figura Apéndice 4.5. Réplicas de Western blot anti-15-LOX2 en macrófagos derivados de monocitos de sangre (A) y THP-1 (B). Se describe el código de donante de cada ensayo. La carga proteica fue controlada con una proteínas única (α -tubulina o β -actina) o mediante visualización del conjunto de proteínas con tinción de Ponceau. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización de las imágenes.

4.6. Western Blot anti-12-LOX



Figura Apéndice 4.6. Réplicas de Western blot anti-12-LOX en macrófagos derivados de monocitos de sangre (A) y THP-1 (B). Se describe el código de donante de cada ensayo. La carga proteica fue controlada con una proteínas única (a-tubulina o β -actina) o mediante visualización del conjunto de proteínas con tinción de Ponceau. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización de las imágenes.

4.7. Réplicas de Western Blot anti-COX2



Figura Apéndice 4.7. Réplicas de Western blot anti-COX2 en macrófagos derivados de monocitos de sangre. Se describe el código de donante de cada réplica. La carga proteica fue controlada con β-actina y tinción de Ponceau. Se realizaron ajustes de brillo y contraste para la visualización.

Apéndice 5. Factores de normalización de análisis cuantitativo de MS



Figura Apéndice 5- Curva de calibración con BSA para la determinación de proteínas totales en las muestras del análisis de oxilipinas. La absorbancia a 210 nm (Abs_{210}) fue medida por espectrofotometría de flujo continuo utilizando un equipo de HPLC. Se integraron las Áreas de Abs_{210} de forma manual. Se construyó una curva de calibración con la proteína seroalbúmina bovina (BSA) con un rango de concentraciones de 0,0125 - 0,2000 mg/mL, utilizando para la dilución el amortiguador PBS con el que se obtuvieron las muestras. Se midió n=3 réplicas de dilución y medida de cada concentración. Se realizó un ajuste lineal con un R²=0.9975; parámetros: pendiente=5510, intercepto en y= 98.44. Esta curva fue utilizada para la cuantificación de los datos presentados en la figura 39.