



Universitat
de les Illes Balears

TERAPIA LÍPIDICA DE MEMBRANA COMO INDUCTOR DE CAMBIOS LIPÍDICOS

Catalina Jaume Bauza

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Aplicada

Especialidad Biotecnología y Salud

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2016-2017

Fecha 15 de Setiembre de 2017

Firma del autor

Tutor del Trabajo David López Jiménez

Firma Tutor

Cotutor/es del Trabajo Cori Ramón Juanpere y Javier Gullás León

Firma Cotutor/es

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Materiales	12
Cultivos celulares	12
Animales.....	12
Extracción lipídica.....	14
Digestión enzimática	14
Cromatografía en capa fina (TLC)	14
Cromatografía de gases	15
Cuantificación de proteínas	16
Cromatografía líquida de alta resolución – Espectrometría de masas (HPLC-MS)...	16
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	17
Digestión enzimática con PLA1 y PLA2	17
Niveles de 2OHOA en las fracciones de fosfolípidos	21
Estudio por espectrometría de masas de la banda recién identificada en TLC de extractos celulares tratados con 2OHOA.....	24
Niveles de los ésteres de colesterol en el tratamiento con 2OHOA	26
El 2OHARA disminuye los niveles de ácidos grasos aumentados como consecuencia de una isquemia cerebral inducida en ratas.	28
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO I. Abreviaturas	37

RESUMEN

Las funciones celulares están asociadas a la actividad proteica, por lo que la mayoría de tratamientos terapéuticos están dirigidos a modificar la actividad de proteínas implicadas en diversas disfunciones celulares. Estas proteínas interactúan con lípidos de la membrana y, por tanto, cambios en la composición de la bicapa lipídica pueden modular la propagación de las cascadas de señalización celular. La Terapia Lipídica de Membranas es un enfoque terapéutico en el que se utilizan moléculas naturales o de diseño racional para cambiar la estructura/composición de las membranas lipídicas con el objetivo de modificar la señalización celular y así revertir un estado patológico de la célula. Los ácidos grasos hidroxilados, como el ácido 2-hidroxioléico (2OHOA) y el ácido 2-hidroxiaraquidónico (2OHARA), inducen cambios importantes en la estructura y la composición de la membrana celular y se postulan como candidatos en diversas terapias. El 2OHOA se está estudiando en el tratamiento de tumores, lesiones de la médula espinal, hipertensión, diabetes y obesidad. El 2OHARA ha demostrado su efectividad en modelos de enfermedad que llevan asociados un proceso inflamatorio, como la isquemia cerebral. En el presente trabajo, se utilizan técnicas de cromatografía en capa fina y cromatografía de gases para estudiar los cambios lipídicos inducidos por el 2OHOA y el 2OHARA en diferentes líneas celulares humanas y en cerebros de ratas modelo de isquemia cerebral, respectivamente. El 2OHOA provoca la formación de dos nuevas especies lipídicas desconocidas tras el tratamiento, un esfingolípido y un lípido neutro. Además, se observa su presencia en los diferentes fosfolípidos. El 2OHARA es capaz de reducir los niveles de ácidos grasos, que se encuentran elevados en la isquemia cerebral.

INTRODUCCIÓN

En la década de 1970, Singer y Nicolson publicaron un modelo estructural de la membrana celular describiéndolo como un mosaico fluido de lípidos. Los lípidos mayoritarios de las membranas biológicas pertenecen a la familia de los fosfolípidos, que se encuentran organizados en la membrana formando una bicapa lipídica en la que se intercalan proteínas [1]. La membrana celular presenta una asimetría marcada por la distribución heterogénea de los distintos lípidos, ya que en la monocapa orientada hacia el interior de la célula predominan la PS y la PE, mientras que en la monocapa orientada hacia el medio extracelular se encuentran preferencialmente la PC y la SM. En las membranas celulares, podemos encontrar dos tipos de proteínas en base a la forma en que interactúan con la bicapa lipídica: las proteínas unidas en la cara intracelular y extracelular (proteínas periféricas), y las proteínas incrustadas dentro de la membrana a través de uno o varios dominios transmembranales (proteínas transmembrana). Las proteínas ayudan a la asimetría de la bicapa lipídica, ya que las proteínas intracelulares y extracelulares son diferentes. La asimetría es absoluta en cuanto a glicoproteínas y glicolípidos, ya que todos ellos se localizan en la cara extracelular de la membrana [2-4].

Desde que se postuló la teoría del mosaico fluido se ha mantenido la idea estructural de una bicapa lipídica para describir una membrana biológica, aunque se han dado más detalles de su composición, estructura e implicación en diversas funciones celulares. Así, por ejemplo, se conoce que la fluidez de la membrana no es tan grande como se pensaba, que la densidad de proteínas es mayor y que el grosor de la bicapa lipídica es variable permitiendo el anclaje de dominios proteicos transmembranales de distintos tamaños. Además, los lípidos se distribuyen de forma heterogénea en la membrana, provocando la formación de microdominios con una composición lipídica y proteica definida [4]. Se sabe que estos microdominios actúan como plataformas de señalización celular. Por ejemplo, la SM, el colesterol y varios tipos de glicoesfingolípidos y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol se asocian formando unos microdominios denominados *lipid rafts*, que se caracterizan por poseer una estructura líquida ordenada (Lo) (**Figura 1**) [5]. En cambio, la PE predomina en microdominios de estructura

líquida desordenada (Ld) debido al pequeño tamaño de su cabeza polar, lo que favorece un menor empaquetamiento, una mayor fluidez y mayor desorden lipídico [5, 6].

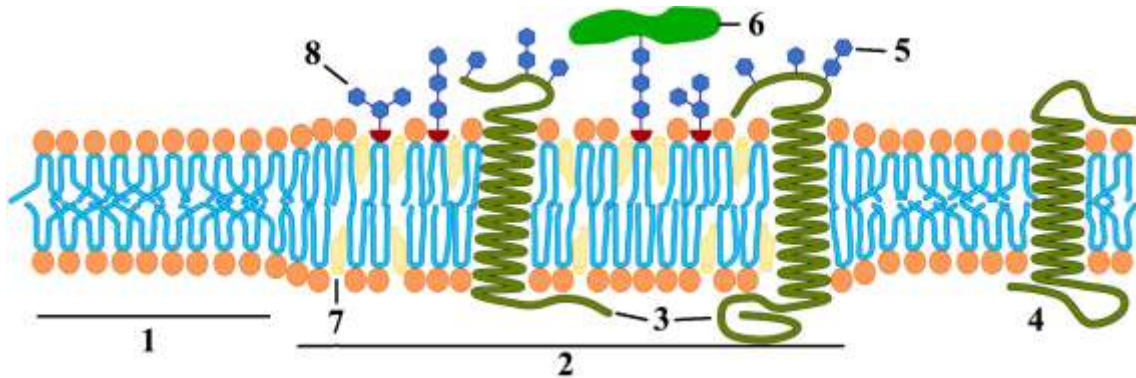


Figura 1. Esquema de una membrana celular con varios tipos de microdominios. Región líquida desordenada (1) y líquida ordenada de tipo *lipid rafts* (2) con proteínas transmembranales (3, 4), que pueden presentar glicosilaciones post-traduccionales (5). Los *lipid rafts* son microdominios donde se encuentran proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol (6), son ricos en colesterol (7) y glicosfingolípidos (8).

Las funciones celulares están asociadas a la actividad proteica y un mal funcionamiento o cambios en la expresión de las proteínas pueden, por lo general, desencadenar un estado patológico en el organismo. Así pues, la mayoría de tratamientos terapéuticos van dirigidos a modificar la actividad y/o expresión de dichas proteínas con el fin de corregir su mal funcionamiento y/o modular su expresión. Algunas de estas proteínas interactúan con lípidos de las membranas celulares y la interacción proteína-lípido es susceptible de ser modificada con el fin de controlar su actividad [4]. Dicha interacción depende, entre otros factores, de la carga y el volumen de la cabeza polar de los distintos lípidos. Por ejemplo, algunos de ellos tienen una carga negativa, que facilita la interacción de proteínas con aminoácidos de carga positiva. Otros lípidos, sin embargo, presentan una cabeza polar pequeña en relación a la parte hidrofóbica formada por las cadenas de AG, como es el caso de la PE. La presencia de PE en la membrana favorece la formación de regiones con un empaquetamiento más laxo de los lípidos que permiten la inserción de grupos isoprenilo presentes en proteínas como la subunidad $G\gamma$ o Ras [7]. Esta asociación de los lípidos con las proteínas convierte a los microdominios lipídicos en plataformas de señalización celular esenciales para la fisiología celular. Por tanto, la composición de la membrana tiene un papel importante en las cascadas de señalización celular, ya que cambios en la cantidad y el tipo de lípido pueden ir

asociados con alteraciones en la propagación del mensaje desde o hacia el interior celular.

Tanto en una situación fisiológica como patológica, una membrana celular puede experimentar cambios en la composición y las propiedades biofísicas de los microdominios y, en consecuencia, las proteínas que contienen y las señales celulares que propagan cambian [6]. La presencia de estos microdominios de estructura definida en la membrana puede favorecer la localización y regulación de determinadas proteínas de membrana claves como enzimas, receptores, canales y efectores favoreciendo la activación de las vías de señalización en las que están implicadas. Este enfoque ha sido utilizado para regular las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína en los microdominios utilizando compuestos naturales o de diseño racional dando lugar a la denominada Terapia Lipídica de Membrana. De esta forma, se pretende modular la señalización celular ofreciendo un tratamiento para una gran variedad de enfermedades [2, 6].

En la década de 1980, se demostró que las antraciclinas no necesitan ser internalizadas por la célula para destruir las células cancerígenas. Ésta fue una de las primeras evidencias de que los fármacos antitumorales, como la daunorrubicina y N,N-hexametileno-bis-acetamida pueden ejercer su función a través de su interacción con la membrana plasmática y la modificación de su estructura [2, 8]. El N,N-hexametileno induce la diferenciación celular y la detención del ciclo celular mediante la reducción de los niveles de DAG y colesterol esterificado [2]. En el caso de la doxorrubicina, un experimento realizado con un complejo de agarosa-doxorrubicina, demostró que aún no pudiendo penetrar al interior celular debido al tamaño que confiere la agarosa, la molécula es capaz de modular la estructura lipídica de la membrana y alterar la localización y actividad de proteínas de señalización al igual que la molécula no unida a agarosa [9]. En base a estos estudios se diseñaron diversos compuestos que por su estructura y composición fueran candidatos a modular las propiedades de las membranas biológicas.

La Terapia Lipídica de Membrana es un enfoque terapéutico en el que moléculas lipófilas diseñadas racionalmente se dirigen a las membranas celulares modulando su composición y estructura. Hay una serie de lípidos naturales que también tienen esta

capacidad, como el OA, un AG de 18 átomos de carbono que aumenta el desorden en la membrana gracias a su insaturación situada entre los carbonos 9 y 10, que le confiere una forma de bumerán. Sin embargo, sus análogos de 18 átomos de carbono, el ácido esteárico (saturado) y elaídico (insaturado trans), tienen forma de varilla y no afectan tanto a la estructura de la membrana. Así, los GPCR, la proteína G y sus efectores son modulados por el OA, pero no por el ácido esteárico ni el elaídico, y además se ha observado que una dieta rica en aceite de oliva (alto contenido en OA) como la Mediterránea está asociada a un menor riesgo de desarrollar cáncer [2, 10].

Los AG pueden contener un grupo hidroxilo en el segundo carbono de su cadena hidrocarbonada formando los 2OHAG. Estos últimos presentan un potencial terapéutico mayor que sus correspondientes AG no hidroxilados. Desde este punto de vista, se llevó a cabo el diseño racional de 2OHAG como posibles inductores de cambios lipídicos en las membranas celulares para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como el cáncer, los procesos inflamatorios, la enfermedad de Alzheimer, la obesidad, la diabetes y las lesiones de la médula espinal [11], las cuales tienen una relación muy directa con alteraciones en la composición y organización lipídica de las membranas celulares [6].

Uno de estos 2OHAG es el 2OHOA, que se está estudiando en el tratamiento de tumores [12], lesiones de la médula espinal [13], hipertensión [14], y obesidad [15, 16]. Se ha demostrado que es capaz de reducir la presión arterial sistólica a los valores normales en ratas hipertensas mediante la modulación de la composición lipídica y las propiedades de las membranas [2, 17]. Además, recientemente se ha concluido con resultados positivos un ensayo clínico de fase I/IIa para el tratamiento de gliomas y tumores sólidos en humanos (www.clinicaltrials.org; NCT01792310). Por otro lado, el 2OHARA, un derivado hidroxilado del ARA, ha demostrado su eficiencia como anti-inflamatorio no esteroideo, al inhibir la actividad de COX1 y COX2 y reducir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios. Además, tiene la capacidad de disminuir los niveles de TNF α [19]. Finalmente, el 2OHDHA se presenta como un potente candidato para revertir las deficiencias cognitivas asociadas a procesos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer [20].

La actividad antitumoral del 2OHOA se ha relacionado con la activación de la proteína de membrana PKC α . La translocación a la membrana y activación de PKC α induce la

activación y sobreexpresión de p21^{Cip1} y p27^{Kip1}, miembros de la familia CDKI. La sobreexpresión de CDKI inhibe la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6, que se han asociado con la hipofosforilación de la proteína de Rb. E2F1 es un factor de transcripción que induce la expresión de proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular y su regulación depende del estado de fosforilación de Rb. Así, E2F1 es reclutado e inactivado cuando Rb está hipofosforilada. Una de las dianas de E2F1 es el gen de la DHFR, esencial para la síntesis de DNA. Se ha observado una reducción de la expresión del gen DHFR en líneas celulares cancerígenas tratadas con 2OHOA. Además, las modificaciones que induce el 2OHOA en la membrana provocan la activación de las caspasas por la vía FasR activando, junto a DHFR, la apoptosis celular [22].

Por otro lado, se ha descrito que el 2OHOA provoca la traslocación de la proteína Ras de la membrana celular al citoplasma. Ras pertenece a una familia de proteínas periféricas que se unen a regiones de la membrana enriquecidas en PE a través de su dominio isoprenilo y que se activa de forma constitutiva en muchos tipos de cáncer. La exclusión de Ras de la membrana mediada por el 2OHOA inhibe la activación de las vías MAPK y PI3K/Akt, que están relacionadas con la pérdida de la diferenciación celular y la supervivencia de las células cancerígenas. El tratamiento con 2OHOA en células de glioma mejora la expresión de marcadores de diferenciación, tales como la GFAP y la glutamina sintasa. La sobreexpresión de estos marcadores en las células expuestas al 2OHOA sugiere una inducción de la diferenciación después de la regulación de DHFR (**Figura 2**) [2, 22].

El glioma es el tipo más común de tumor cerebral primario y se asocia con tasas de mortalidad muy elevadas y una alta resistencia a la quimioterapia y la apoptosis. El fármaco de referencia hasta el momento es la temozolomida, un agente alquilante, que logra aumentar una media de 2,5 meses la esperanza de vida de los pacientes. Se ha demostrado que el 2OHOA es más eficaz que la temozolomida en modelos de ratones y no muestra ninguna recaída aparente en la formación de tumores después del cese del tratamiento. Debido a su efecto anti-tumoral en modelos celulares y animales y su baja toxicidad, el 2OHOA fue reconocido recientemente como medicamento huérfano para el tratamiento de glioma por la Agencia Europea del Medicamento [2].

Diferentes estudios han demostrado que diversas vías metabólicas se encuentran alteradas en las células cancerosas. Entre ellas se observa un aumento de la síntesis de *novo* de lípidos para generar nuevas membranas biológicas debido a la mayor tasa de proliferación celular. Así, por ejemplo, en el tejido mamario, los perfiles lipídicos se encuentran alterados en el tejido tumoral y también en las células de alrededor [23]. Esto proporciona una evidencia de que los cambios a nivel lipídico pueden ocurrir antes que los cambios morfológicos asociados al tumor. Además, estos cambios lipídicos también pueden estar relacionados con la malignidad del tumor. Curiosamente, los CE se acumulan en diferentes tipos de células cancerígenas, entre las que se encuentran las procedentes del cáncer de próstata [21], cáncer de mama [23], glioblastoma [18] y cáncer de riñón. Concretamente en este último, se ha observado un aumento de 8 veces más de colesterol y 35 veces más de CE en comparación con las células de un riñón normal [24]. El aumento de colesterol y CE en las membranas favorece la formación de *lipid rafts* alterando, en consecuencia, las vías de señalización celular [23]. Así, la acumulación de los CE se ha asociado con un aumento de la progresión del ciclo celular y el crecimiento tumoral [24].



Figura 2. Interacción del 2OHOA con las membranas de las células tumorales. La translocación de PKC desde el citoplasma a la membrana celular provoca la parada del ciclo celular. La liberación de Ras al citoplasma inhibe la vía de las MAPK disminuyendo la proliferación celular.

El fundamento de la Terapia Lipídica de Membrana también ha sido utilizado para diseñar otras moléculas como el 2OHARA, actualmente en estudio para el tratamiento de isquemia cerebral. Este accidente cerebrovascular modifica la composición de las membranas celulares al provocar la ruptura de los fosfolípidos por acción de la PLA2 activada por diferentes estímulos inflamatorios, incluyendo lipopolisacáridos

bacterianos, citoquinas y alérgenos. El ARA, que es el AG poliinsaturado n-6 más abundante de la membrana celular, es liberado por la PLA2 al citosol donde está sujeto a la acción de diferentes enzimas. Los productos bioactivos derivados del ARA se liberan de las células activadas aumentando el estrés oxidativo y modulando la respuesta inflamatoria. Así, por ejemplo, COX1 (isoforma constitutiva) y COX2 (isoforma inducible) transforman el ARA en prostaglandina G₂, que a su vez es convertida por la acción de diferentes enzimas (isomerasas, reductasas y sintasas) en prostaglandinas D₂, E₂ y F_{2α} y tromboxanos, entre otros. La vía LOX metaboliza el ARA en hidroxiácidos y leucotrienos. La vía P450 provoca la formación de ácidos epoxieicosatrienoicos o ácidos 20-hidroxiexosatetraenoico [19, 25].

El 2OHARA fue diseñado de forma racional para inhibir la vía pro-inflamatoria del ARA evitando la formación de mediadores pro-inflamatorios. La síntesis del 2OHARA consiste en añadir un grupo hidroxilo al segundo carbono del ARA. La forma hidroxilada compite con el ARA para unirse al sitio activo de COX1 y COX2 inhibiendo su actividad. Además, se ha visto que el 2OHARA es capaz de disminuir la expresión de COX2 en los macrófagos y tiene la capacidad de disminuir los niveles de TNFα por lo que podría ser utilizado para el tratamiento de enfermedades que conllevan un proceso inflamatorio asociado, como es el caso de la isquemia cerebral [19].

OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es describir los cambios lipídicos originados por el tratamiento con ácidos grasos hidroxilados en células y animales. Este objetivo se puede desglosar en dos apartados, a saber:

1. Estudio de la incorporación del 2OHOA en distintas especies lipídicas en líneas celulares tumorales humanas, así como cambios en los niveles de CE ocasionados por el tratamiento con 2OHOA.
2. Análisis del perfil lipídico del cerebro de ratas en presencia y ausencia del tratamiento con 2OHARA tras la inducción de una isquemia cerebral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El medio de cultivo, la penicilina-estreptomicina, el ácido oleico, la tripsina, la fosfolipasa A1 (PLA1) de *Thermomyces lanuginosus* y la fosfolipasa A2 (PLA2) de páncreas porcino eran de Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, Estados Unidos). Los ácidos grasos hidroxilados fueron proporcionados por Lipopharma Therapeutics S.L. (ParcBit, Palma de Mallorca, España). El cloroformo, el metanol, el ácido acético y el sulfato de cobre (CuSO₄) se compraron a Scharlab (Barcelona, España).

Cultivos celulares

Se utilizaron células de glioblastoma humano (U87MG), células de adenocarcinoma alveolar de pulmón humano (A549) y fibroblastos humanos (MRC5) mantenidas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y una humedad relativa del 98%. Las células se cultivaron en el medio DMEM (*Dubelco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. En el caso de las MRC5, el medio se suplementó también con aminoácidos no esenciales (1:100; v:v). Las distintas líneas celulares se expandieron en placas de 100 mm de diámetro para después ser tratadas con 200 µM 2OHOA, 200 µM OA o vehículo mediante una única administración. Las células se recogieron por tripsinización pasadas 24 ó 48 horas del tratamiento. Las células recogidas se precipitaron por centrifugación a 500 xg, 5-10 min, a temperatura ambiente y tras realizar 2-3 lavados con PBS se resuspendieron en 650 µL de tampón hipotónico (20 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4). La suspensión celular se sonicó seis ciclos (10 s ON, 10 s OFF) a un 10% de amplitud. Tras centrifugar las muestras a 1000 xg, 10 min, 4°C, el sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se guardó a -20 °C hasta su uso. Una alícuota de 20 µL fue utilizada para la cuantificación de proteínas y el resto del volumen fue empleado en la extracción lipídica.

Animales

Se usaron ratas Sprague Dawley de 320-340 g a las que se indujo una isquemia cerebral focal en un hemisferio mediante una oclusión de la arteria cerebral media durante una

hora [25]. El hemisferio no dañado de cada animal se usó como control de tejido no isquémico. Se les administró un tratamiento de 2OHARA en una única dosis oral de 1 g/kg una hora después de la isquemia. El compuesto se disolvió en aceite de soja y etanol 7% (v:v). Este mismo vehículo se utilizó en el grupo de animales control (no tratados). Cada grupo estaba constituido por 3 ratas. 24 horas después del tratamiento los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de diferentes partes del cerebro para el análisis lipídico: (1) la corteza somatosensorial primarias y secundarias (S1HL, S1FL, S1DZ, S1BF y S2), (2) el caudado-putamen (Cpu) del núcleo estriado y (3) la corteza piriforme (Pir) (**Figura 3**) [26].

La cirugía y el tratamiento de los animales se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad de León, dirigido por el Prof. Arsenio Fernández López. Todos los procedimientos en animales se realizaron previo consentimiento del comité de bioética de la Universidad de León.

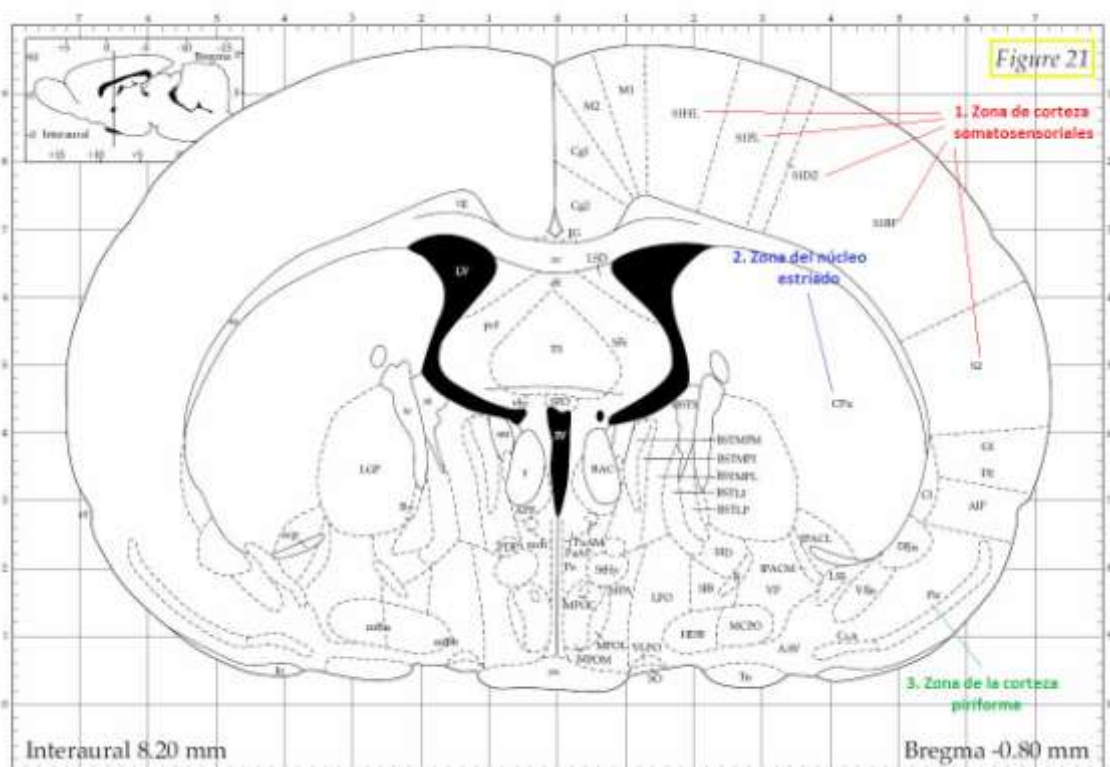


Figura 3. Corte transversal de un cerebro de rata donde se observan las distintas estructuras cerebrales en las que se divide. Se han señalado las tres zonas analizadas en el presente estudio; (1) las cortezas somatosensoriales, (2) el núcleo estriado y (3) la corteza piriforme.

Los fragmentos de tejido previamente pesados (20-50 mg) se diseccionaron con ayuda de un homogenizador Polytron PT3100 de Kinematica (Littaw-Luzern, Suiza) en 1 ml de tampón hipotónico (20 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4), seguido de una centrifugación a 800 xg, 15 min, 4°C. El sobrenadante se sonicó seis ciclos (10 s ON, 10 s OFF) a un 10% de amplitud. Tras centrifugar las muestras a 1000 xg, 10 min, 4°C; el sobrenadante se dividió en tres partes: 200 µL para el análisis de lípidos neutros, 200 µL para el análisis de fosfolípidos y el resto para la cuantificación de proteínas.

Extracción lipídica

La extracción lipídica tanto para fosfolípidos como para lípidos neutros se realizó en una mezcla de cloroformo:metanol:tampón hipotónico (2:1:0.6; v:v). Después de centrifugar a 1000 xg, 5 min, 4°C y eliminar la fase acuosa, la fase orgánica se lavó con una mezcla de metanol:tampón hipotónico (1:1; v:v). Después de volver a eliminar la fase acuosa, la fase orgánica restante se evaporó bajo un flujo de argón.

Digestión enzimática

La digestión enzimática se llevó a cabo utilizando 10 U/mL fosfolipasa A1 y/o 20 U/mL de fosfolipasa A2 durante 21 horas a 37°C en tampón 0,1 M Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 0,1% p/v Tx-100 (pH 8). Después, se realizaron extracciones lipídicas manteniendo las proporciones cloroformo:metanol:medio acuoso (2:1:0.6; v:v:v).

Cromatografía en capa fina (TLC)

Los films lipídicos obtenidos en la extracción se analizaron por TLC (*Thin Layer Chromatography*) utilizando placas de 20x20 cm con soporte de cristal, previamente lavadas en su fase móvil correspondiente durante la noche y activadas a 110°C durante 60 minutos. En el análisis de lípidos neutros se utilizó la fase móvil heptano:etil éter:ácido acético (74:21:4; v:v) durante 40 minutos. Los fosfolípidos se separaron en cloroformo:metanol:ácido acético:agua (60:50:1:4; v:v) durante 90 minutos. La tinción de las dos placas se realizó en una solución de 5% CuSO₄ (p/v), 4% H₃PO₄ (p/v) durante 10 segundos y se revelaron a 180°C durante 5 minutos. Los estándares se cargaron formando una escala ascendente de concentración, lo que posteriormente permitió hacer una recta patrón para cuantificar los distintos lípidos de las muestras.

Las placas de TLC fueron escaneadas en el densitómetro 800-GS y analizadas mediante el programa QuantityOne, ambos de Bio-Rad. Los datos de densitometría obtenidos se transformaron en cantidad de lípido mediante la extrapolación en la recta patrón y finalmente se normalizaron por la cantidad de proteína (nmol lípido/mg proteína).

Cromatografía de gases

Las placas de TLC se dejaron secar 20 minutos tras el desarrollo cromatográfico y los fosfolípidos se tiñeron de forma transitoria con vapores de yodo incubando la placa en una cubeta con perlas de yodo durante 15 min. Una vez teñida la placa, se marcaron y rascaron las distintas bandas que presentaban los mismos valores R_f que los estándares (SM, PC, PS, PI y PE). Además, se analizó también otra banda que no correspondía con ningún estándar conocido y que aparecía en las muestras tratadas con 2OHOA. Los raspados de sílice se lavaron tres veces con 1 mL de cloroformo:metanol (2:1; v:v) y posterior centrifugación a 500 $\times g$, 10 min, 4 °C. El sobrenadante de las tres centrifugaciones se pasó a un nuevo tubo para posteriormente ser evaporado bajo un flujo de argón.

Los fosfolípidos se resuspendieron en 166 μL de hexano y a continuación se añadieron 3 mL de metanol:cloruro de acetilo (10:1). La mezcla se incubó durante 90 min a 100 °C para llevar a cabo la transmetilación de los AG. Tras la reacción, la extracción de los AG metilados se realizó añadiendo 3 mL de agua, 1 mL de hexano y centrifugando a 1000 $\times g$, 5 min, 4°C. La fase superior se transfirió a un vial de 2 mL y se evaporó bajo un flujo de argón. La fase inferior fue lavada dos veces con 1 mL de hexano repitiendo el proceso. Al vial de 2 mL se le añadió 1 mL de hexano para resuspender los lípidos y analizarlos en el cromatógrafo de gases (**Figura 4**).

Los distintos AG se analizaron mediante un sistema de cromatografía de gases Agilent 7890A, equipado con un detector de ionización de llama y un auto-inyector 7693 (Santa Clara, CA). La columna capilar Agilent J&W HP-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.20 μm) fue utilizada con 1.8 mL/min de helio como gas portador y un *split ratio* de 1:5. Para el desarrollo cromatográfico, la columna fue equilibrada a 180°C durante 5 minutos, la temperatura se incrementó hasta 230 °C a una velocidad de 2 °C/min y luego hasta 280°C a una velocidad de 2°C/min. Finalmente, la columna se mantuvo a 280°C

electrospray positivo como método de ionización y la ventana de masas se ajustó entre 700 y 900 uma.

Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre parejas de datos se determinó mediante el test de la *t-Student* con un nivel de significación de 95% de confianza ($p < 0.05$) utilizando los programas Microsoft Excel 2007 y Sigma Plot.

RESULTADOS

Digestión enzimática con PLA1 y PLA2

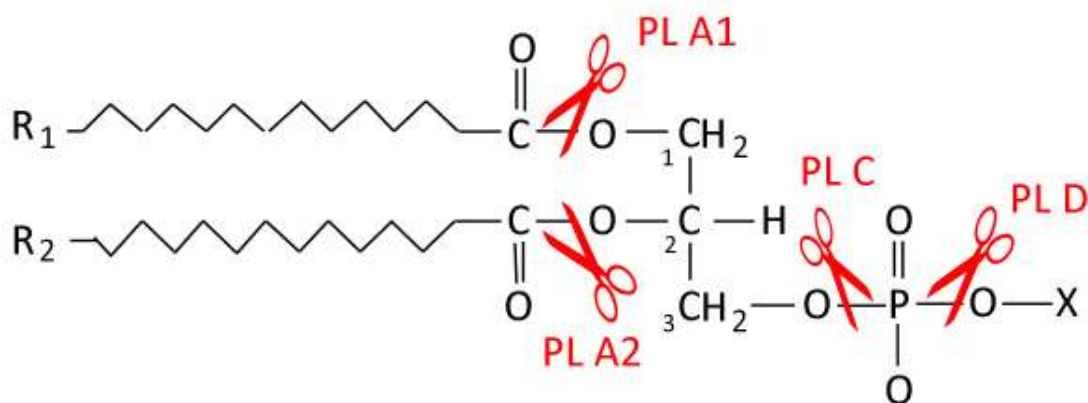


Figura 5. Puntos de corte de los distintos tipos de fosfolipasas (PL) sobre la estructura de un glicerofosfolípido. (R1) Cadena de ácido graso unida al carbono 1 del glicerol y (R2) cadena de ácido graso unida al carbono 2 del glicerol. El producto de corte de PLA1 y PLA2 es una cadena de AG libre y una molécula de lisofosfolípido. La PLC genera una molécula de diacilglicerol y la PLD una de ácido fosfatídico.

En estudios anteriores se describió, por medio de la cromatografía en capa fina, un aumento de los niveles de SM en cultivos celulares tras el tratamiento con 2OHOA [2]. Sin embargo, aumentando la resolución de esta técnica mediante el cambio de las proporciones de la fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético:agua (55:37,5:3:2; v:v:v:v) por (60:50:1:4; v:v:v:v), se consiguió observar que la banda inicialmente identificada como SM se desdoblaba en tres bandas distintas (**Figura 7**). Las dos bandas inferiores se corresponden a subpoblaciones de la SM con distinta longitud de las cadenas acílicas tal y como se ha descrito en otros estudios [28]. Con el objetivo de

identificar la naturaleza de la tercera banda, se llevaron a cabo digestiones enzimáticas con fosfolipasa A1 (PLA1) y fosfolipasa A2 (PLA2). La PLA1 hidroliza el enlace éster entre el carbono 1 del glicerol y la cadena de AG de un glicerofosfolípido, mientras que la PLA2 hidroliza el enlace éster entre el carbono 2 del glicerol y la otra cadena de AG (**Figura 5**) [29]. El producto de la reacción en ambos casos es una cadena de ácido graso libre y un glicerofosfolípido con una sola cadena de AG, es decir, un lisofosfolípido.

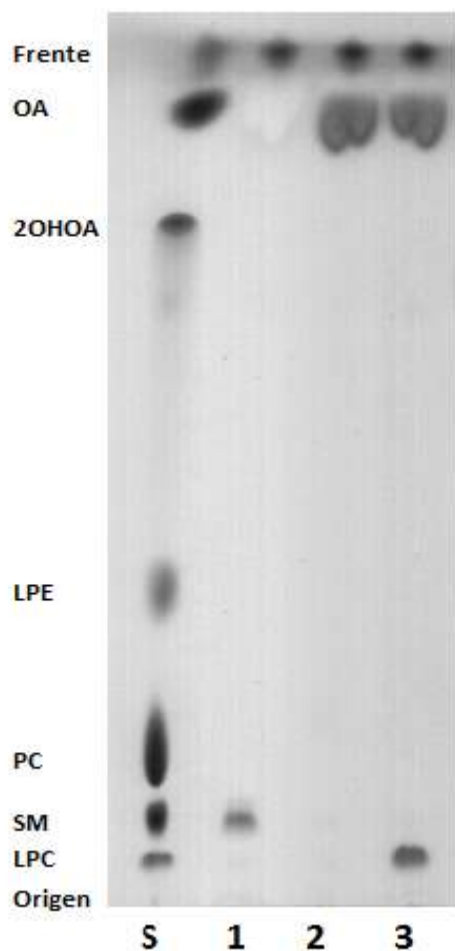


Figura 6. Estudio de la hidrólisis de PC y SM por PLA1 y PLA2. Placa de cromatografía en capa fina desarrollada con la fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético:agua (60:50:1:4; v:v:v:v) y teñida con H_3PO_4 : Cu_2SO_4 . La SM y PC se incubaron durante 21 horas en presencia de 10 U/mL PLA1 y/o 20 U/mL de PLA2. (Carril S) Carril de estándares. (Carril 1) 0.25 μ M SM incubada con PLA1 y PLA2. (Carril 2) 0.25 μ M PC incubada con PLA1. (Carril 3) 0.25 μ M PC incubada con PLA2.

El esqueleto de la SM está formado por una esfingosina, que es diferente al glicerol, y la única molécula de AG se une por un enlace amida que no puede ser hidrolizado por los enzimas PLA1 ni PLA2 (**Figura 6**). Así pues, la especificidad de corte de las fosfolipasas por los glicerofosfolípidos constituye una herramienta para saber si la tercera banda no identificada se trata de un lípido derivado del glicerol o si por el contrario se trata de un esfingolípido. Además, en caso de que esta molécula fuera susceptible a la hidrólisis por alguna de las fosfolipasas y tuviera unida en su estructura

una unidad de 2OHOA, ésta se observaría como producto de la reacción. En el experimento se usó la PLA1 de *Thermomyces lanuginosus*, que de acuerdo a las especificaciones del producto, además de hidrolizar el enlace éster del carbono 1 del glicerol, puede actuar de forma inespecífica como lipasa genérica hidrolizando cualquier enlace éster en glicerofosfolípidos y triglicéridos. Así pues, se observó que la PLA1 fue capaz de hidrolizar totalmente la PC tras 21 horas de digestión. La ausencia de lisofosfatidilcolina (LPC) indica que ambos enlaces éster de la PC fueron hidrolizados (**Figura 6**).

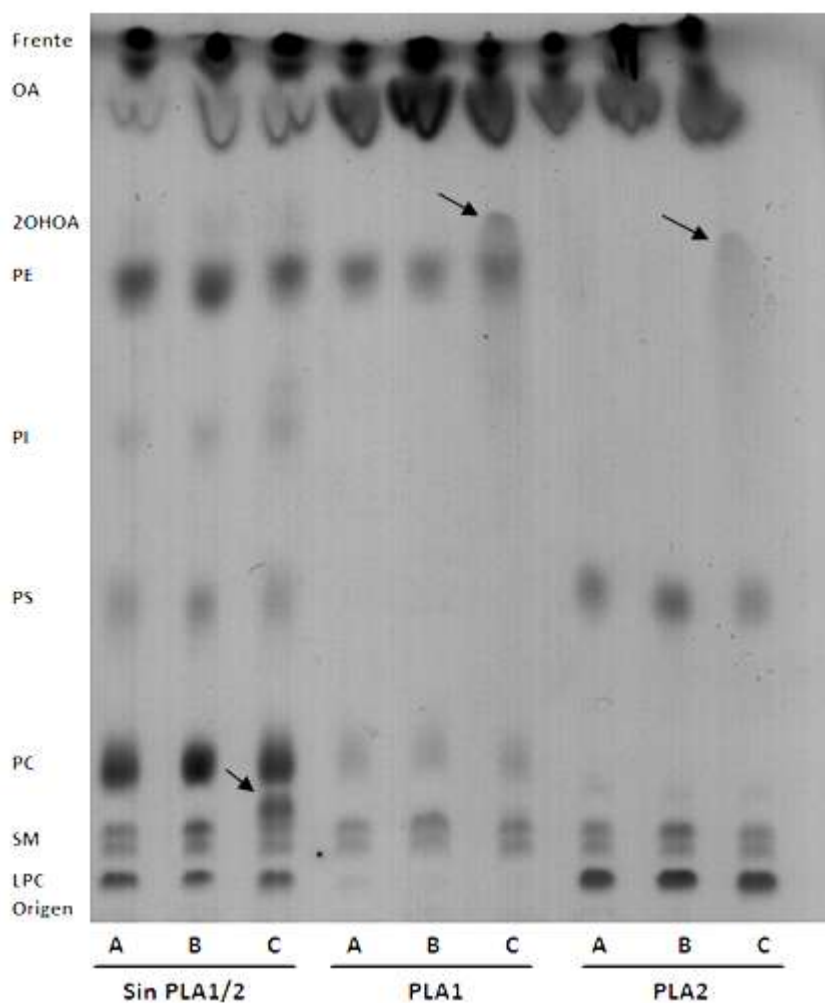


Figura 7. Placa de cromatografía en capa fina con los productos de la digestión con 10 U/mL PLA1 y 20 U/mL PLA2 durante 21 horas de los extractos celulares de A549 tratados con (A) 0 μ M 2OHOA/OA, (B) 200 μ M OA y (C) 200 μ M 2OHOA. Las flechas señalan la banda desconocida en las muestras tratadas con 2OHOA y sin digerir con PLAs y la aparición de otra banda con el mismo valor Rf que el 2OHOA tras la digestión con PLAs.

Se realizó la digestión de los extractos lipídicos de las líneas celulares A549 tratadas con 0 μ M OA/2OHOA (Control), 200 μ M OA y 200 μ M 2OHOA durante 24 horas. Cuando las diferentes muestras no fueron sometidas a la acción enzimática, se observó que en el control y el tratado con OA no aparecía la banda desconocida y, en cambio, sí lo hacía en el carril de los extractos lipídicos de células tratadas con 2OHOA. En los

extractos lipídicos sometidos a la acción de PLA1 y PLA2 no aparece la banda desconocida después del tratamiento con 2OHOA (**Figura 7**). Así, se confirmó que la banda desconocida no es SM ni ningún derivado esfingoide. Además, la digestión de esta banda desconocida provocaba la aparición de una banda con el mismo valor de movilidad relativa (Rf) que el estándar de 2OHOA libre. Este hecho indica, que la banda no identificada hasta el momento se trataba de un glicerofosfolípido con una o dos moléculas de 2OHOA esterificadas al glicerol en el lugar de una o dos cadenas de AG no hidroxilados. La posición de esta banda en la placa cromatográfica, cercana al estándar comercial de PC, invitó a pensar que se trataba de una molécula de PC modificada (**Figura 7**). La digestión de los extractos lipídicos de las células U87MG con los mismos tratamientos presentó resultados similares a los obtenidos con la línea celular A549 (**Figura 8**).

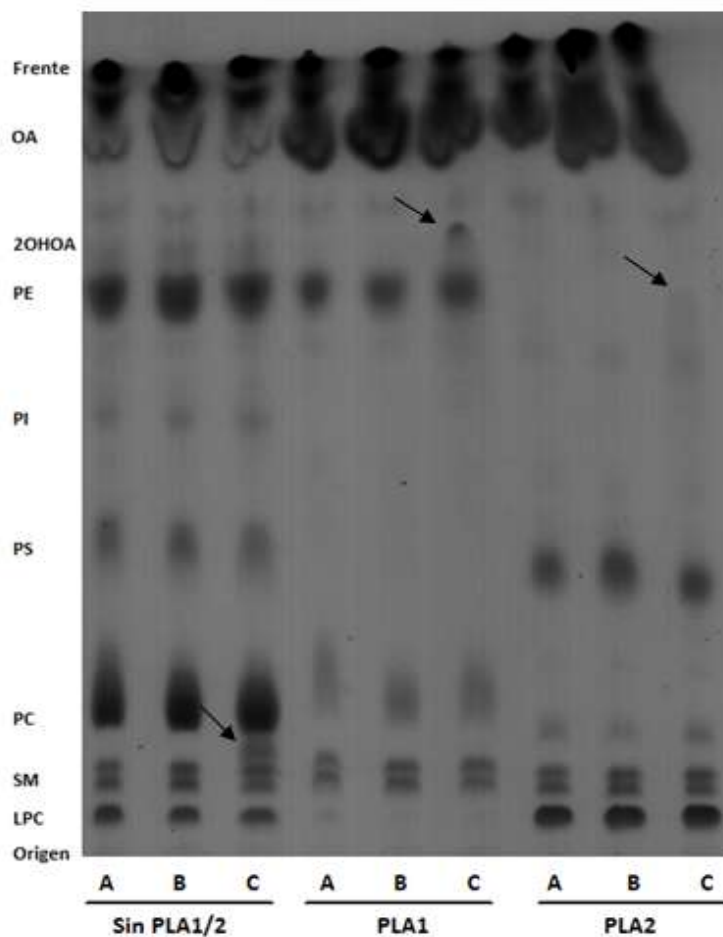


Figura 8. Placa de cromatografía en capa fina con los productos de la digestión con 10 U/mL PLA1 y 20 U/mL PLA2 durante 21 horas de los extractos celulares de U87MG tratados con (A) 0 μ M 2OHOA/OA, (B) 200 μ M OA y (C) 200 μ M 2OHOA. Las flechas señalan la banda desconocida en las muestras tratadas con 2OHOA y sin digerir con PLAs y la aparición de otra banda con el mismo valor Rf que el 2OHOA tras la digestión con PLAs.

Niveles de 2OHOA en las fracciones de fosfolípidos

Se estudiaron las líneas celulares MRC5 (fibroblastos humanos), U87MG (glioblastoma humano) y A549 (adenocarcinoma alveolar de pulmón humano) con el fin de observar la presencia o ausencia del 2OHOA en las distintas fracciones lipídicas (bandas) obtenidas por cromatografía en capa fina. Estas fracciones lipídicas correspondieron, ordenadas de menor a mayor Rf, a SM, banda desconocida, PC, PS, PI y PE. Tras la tinción no destructiva de los lípidos con vapores de yodo, se rascaron las distintas bandas, se extrajeron los lípidos y se llevó a cabo la transmetilación para el posterior análisis de los ácidos grasos que componen los distintos lípidos mediante cromatografía de gases.

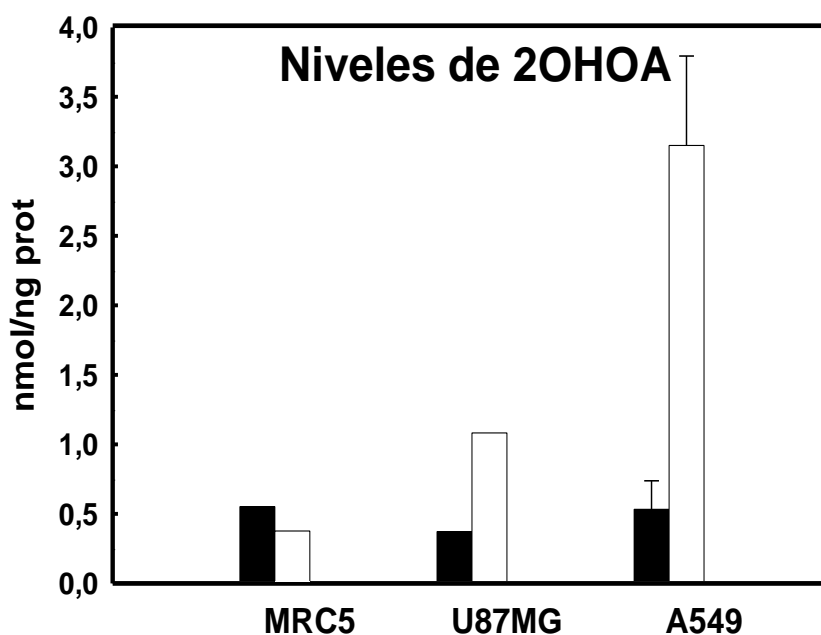


Figura 9. Niveles de 2OHOA presentes en la banda desconocida de las líneas celulares de fibroblastos humanos (MRC5), glioblastoma humano (U87MG) y adenocarcinoma alveolar humano (A549) tratadas durante 24 horas (barras negras) y 48 horas (barras blancas). Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases y los valores de ácidos grasos se normalizaron en base a la cantidad de proteína. Los datos se muestran como la media \pm error estándar (n=1-2).

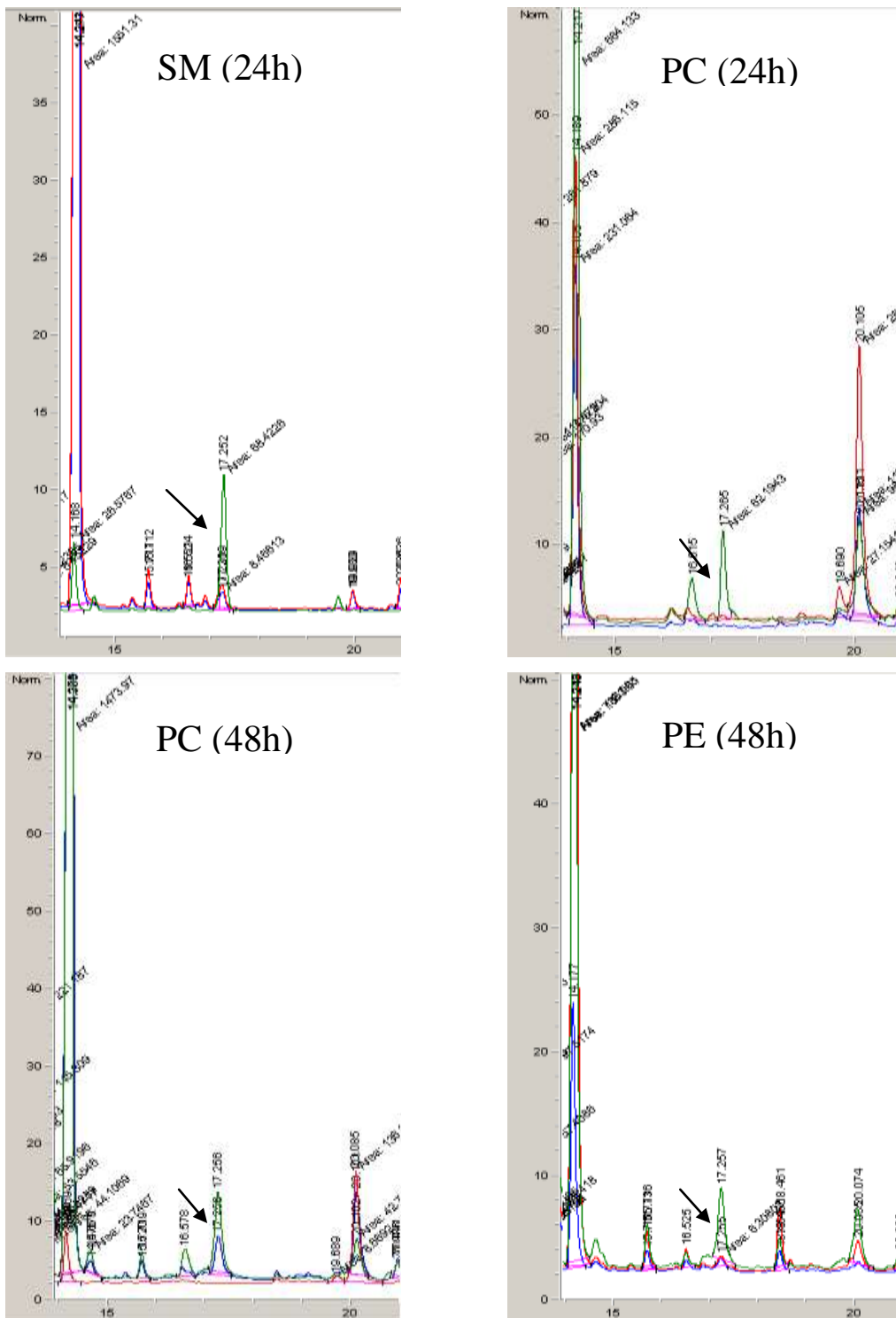


Figura 10. Cromatografía de gases de extractos lipídicos de células de glioma humano U87MG. Los cromatogramas muestran el perfil de ácidos grasos metilados de las poblaciones de esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) de las células U87MG tratadas con 0 μM OA/2OHOA (azul), 200 μM OA (rojo) y 200 μM 2OHOA (verde) durante 24/48 horas. Los ejes representan la señal del detector (pA) y el tiempo de retención (min). Las flechas indican el pico correspondiente al 2OHOA con un tiempo de retención de 17.25-17.26 min..

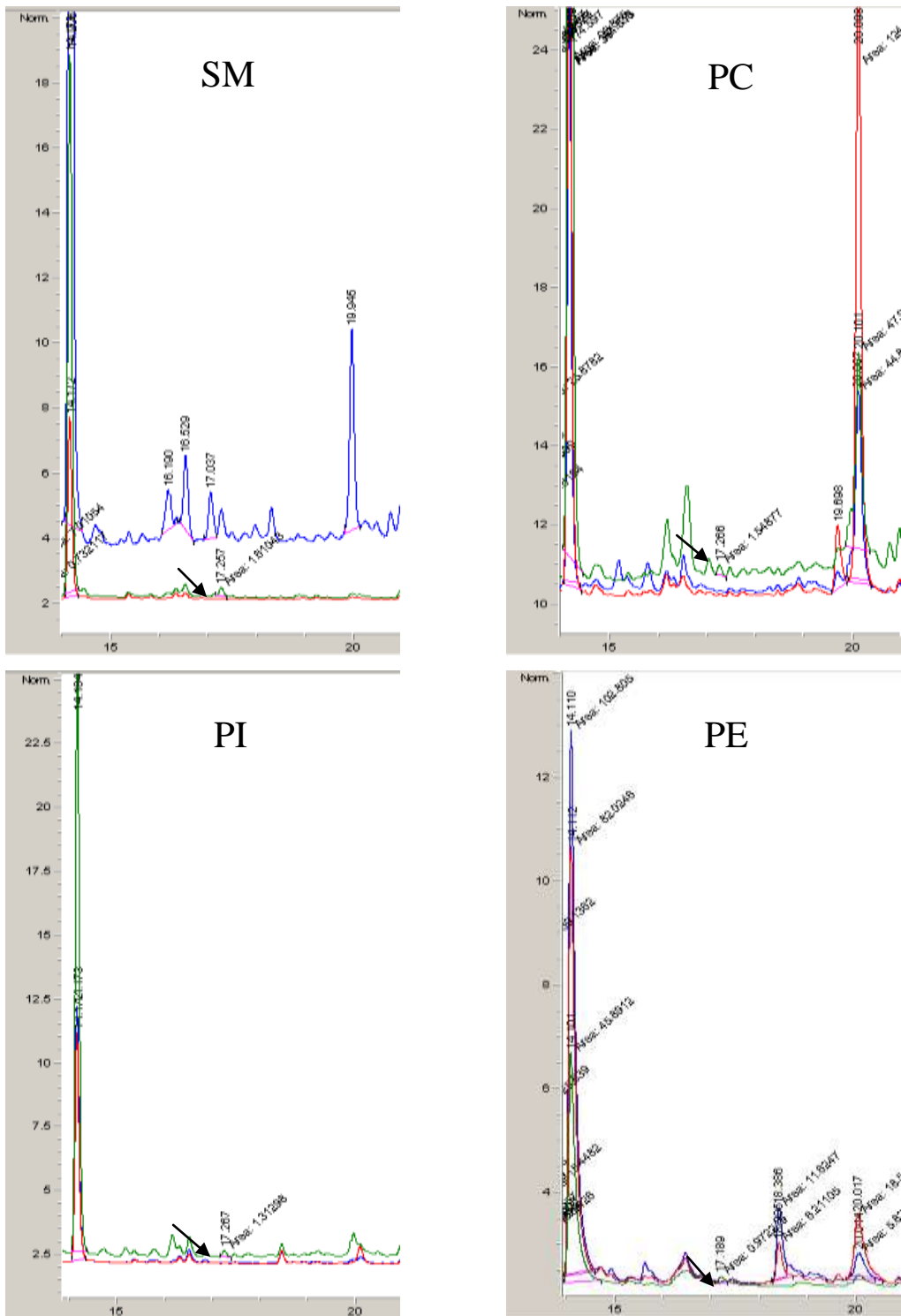


Figura 11. Cromatografía de gases de extractos lipídicos de fibroblastos humanos MRC5. Los cromatogramas muestran el perfil de ácidos grasos metilados de las poblaciones de esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE) de las células MRC5 tratadas con $0\mu\text{M}$ OA/2OHOA (azul), $200\mu\text{M}$ OA (rojo) y $200\mu\text{M}$ 2OHOA (verde) durante 48 horas. Los ejes representan la señal del detector (pA) y el tiempo de retención (min). Las flechas indican el pico correspondiente al 2OHOA con un tiempo de retención de 17.25-17.26 min.

En la banda desconocida de las tres líneas celulares se observó la presencia de un pico con el mismo tiempo de retención que el estándar de 2OHOA (17.25 – 17.26 min). Además, en las dos líneas cancerígenas, U87MG y A549, los niveles de 2OHOA aumentaron con el tiempo de exposición al tratamiento (24 vs 48 horas). En el caso de las células MRC5 no se observó un aumento, sino una ligera disminución a las 48 horas de tratamiento en comparación con 24 horas (**Figura 9**). Por tanto, la interacción del 2OHOA con la membrana lipídica induce la formación de al menos un nuevo lípido que contiene 2OHOA en su estructura.

En el análisis por cromatografía de gases de las fracciones de PC, SM, PI y PE se observó que el 2OHOA estaba presente en otros fosfolípidos pero con menos intensidad que en la banda recién identificada por TLC. Así, por ejemplo, en células U87MG incubadas con 2OHOA durante 24h, sólo se pudo detectar la presencia de 2OHOA en las fracciones de PC y SM. A las 48h, la intensidad del pico de 2OHOA aumenta en estos fosfolípidos e incluso aparece en otros tipos como en PE (**Figura 10**). Al igual que ocurría en el análisis de la banda recién identificada, la presencia de 2OHOA es mayor en las células de glioma (U87MG) (**Figura 10**) en comparación a las células de fibroblastos (MRC5). Como se aprecia en la **Figura 11**, se detectó un pico con el tiempo de elución del 2OHOA (17.25-17.26 min) en varios fosfolípidos analizados, pero de forma poco intensa y solo tras 48 horas de incubación. Así pues, el 2OHOA puede ocupar el lugar de la única cadena acílica de la SM y una o ambas posiciones en los distintos fosfolípidos. Por tanto, el 2OHOA interacciona con los distintos lípidos de la membrana celular y es internalizado por la célula donde puede ejercer su función.

Estudio por espectrometría de masas de la banda recién identificada en TLC de extractos celulares tratados con 2OHOA

Se usó la HPLC-MS con el objetivo de caracterizar la composición lipídica de la banda desconocida identificada en TLC. Se recogieron las bandas rascadas de la TLC correspondientes a PC, la banda desconocida y la SM tanto de células U87MG tratadas con 0 μ M de 2OHOA (Control) como tratadas con 200 μ M de 2OHOA.

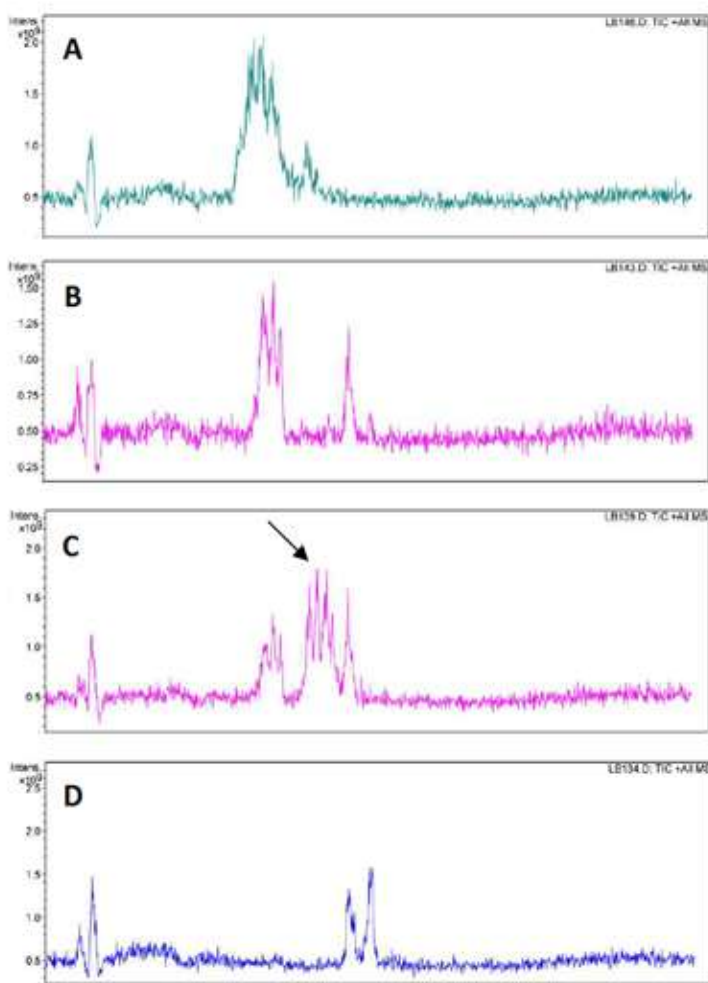


Figura 12. Cromatogramas de bandas rascadas de placas de cromatografía en capa fina tras el tratamiento de células U87MG con 2OHOA. (A) Rascado de la banda con el mismo valor Rf que la PC. (B) Rascado de la banda desconocida en células no tratadas con 2OHOA. (C) Rascado de la banda desconocida en células tratadas con 200 μ M 2OHOA. (D) Rascado de la banda con el mismo valor Rf que la SM. La flecha señala los picos específicos correspondientes a la banda desconocida. Los datos muestran el tiempo de retención (eje de abscisas) y la intensidad de señal del detector (eje de ordenadas). (Imágenes proporcionadas por la Dra. Raquel Almansa y el Dr. Luis Botella de *Medalchemistry*, Alicante).

La **figura 12** muestra los cromatogramas de HPLC de las muestras analizadas. En el cromatograma de la banda desconocida de células tratadas con 2OHOA se aprecian picos diferentes a los observados en el perfil de PC y SM (indicados con una flecha en la **Figura 12C**). Además de estos picos, se ven otros de menor intensidad coincidentes con los de PC y/o SM debido a que la separación entre las distintas especies lipídicas en TLC no sea completa. Esto explica por qué en el cromatograma de la banda desconocida de la muestra control, donde no se apreció tinción de yodo, se observen picos que coinciden con el patrón de PC y/o SM. Sin embargo, en esta muestra control no se observan los picos correspondientes a la nueva especie lipídica generada en células tratadas con 2OHOA. El análisis de las masas de estos picos se asignó a fosfatidilcolinas con una molécula de 2OHOA esterificada en su estructura (**Figura 13**).

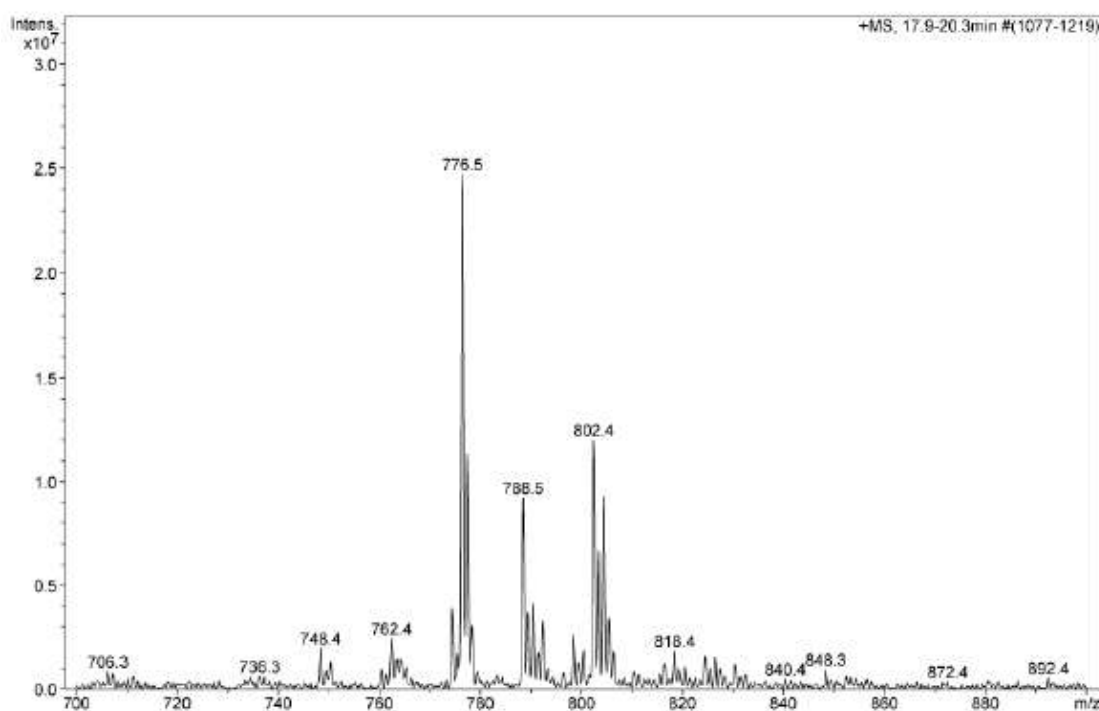


Figura 13. Promedio de las masas principales presentes en el pico cromatográfico de la banda desconocida. Las masas principales se asignaron a (802) PC con 2OHOA y OA, (776) PC con 2OHOA y ácido palmítico, (804) PC con 2OHOA y ácido esteárico y (774) PC con 2OHOA y ácido palmitoleico. Los datos muestran la intensidad de la señal (eje de ordenadas) y la relación masa/carga (m/z) (eje de abscisas). (Imagen proporcionada por Raquel Almansa y Luis Botella de *Medalchemistry*, Alicante).

Por otro lado, los extractos de SM mostraban dos picos cromatográficos y el análisis de masas desveló la presencia de dos poblaciones de SM con distinta longitud de cadenas acílicas (**Figura 12D**). Este dato respalda la presencia de las dos bandas de SM observadas en la TLC (**Figura 8**) y que previamente se han descrito en la literatura como subpoblaciones de este esfingolípidos con diferente longitud de cadena acílica [28]. En el estudio de espectrometría de masas no se detectó ninguna masa coincidente con el de una molécula de SM con 2OHOA.

Niveles de los ésteres de colesterol en el tratamiento con 2OHOA

Un estudio de lipidómica previo realizado por HPLC-MS en muestras de células U87MG tratadas con 0 - 200 μM 2OHOA desveló una disminución de 5 veces en los niveles de CE como consecuencia del tratamiento con 2OHOA. A consecuencia de este dato se decidió profundizar en el estudio caracterizando los lípidos neutros utilizando la técnica de cromatografía en capa fina.

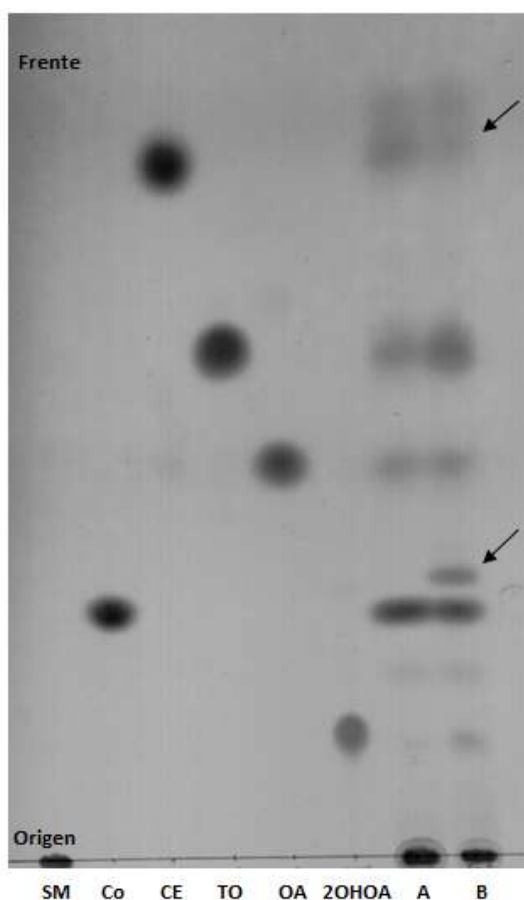


Figura 14. Placa de cromatografía en capa fina con la fase móvil heptano:etil éter:ácido acético (74:21:4; v:v:v) para el estudio de los niveles de los ésteres de colesterol en la línea celular U87MG sin tratamiento (calle A) y tratada con 200 μ M de 2OHOA (calle B). Estándares comerciales de esfingomielina (SM), colesterol (Co), éster de colesterol (CE), trioleína (TO), oleico (OA) y 2-hidroxioléico (2OHOA) se cargaron en calles diferentes. La flecha señala la presencia de una especie lipídica en los extractos de células tratadas con 2OHOA.

En la placa cromatográfica se pudo observar una disminución de los niveles de CE en las células U87MG tras el tratamiento con 2OHOA. Además, se detectó una banda no coincidente con ninguno de los estándares utilizados y que solamente estaba presente en los extractos de células tratadas con 2OHOA (**Figura 14**). Esta especie lipídica, a falta de más estudios que corroboren este dato, puede tratarse de un CE con 2OHOA esterificado. Los CE tienen una posición muy avanzada en la placa cromatográfica de lípidos neutros al ser una molécula muy apolar. El 2OHOA, por el contrario, se encuentra muy próximo al origen al tratarse de una molécula comparativamente más polar. Una molécula formada por 2OHOA esterificado al colesterol sería más polar que su análogo no hidroxilado y podría localizarse en los valores R_f de la banda identificada en la TLC de lípidos neutros. Esta idea también viene apoyada por el hecho de que este CE modificado solamente aparece en las células después del tratamiento con 2OHOA. Así pues, el tratamiento con 2OHOA podría desviar la producción CE naturales hacia la síntesis de colesterol esterificado con 2OHOA, explicando la disminución de los niveles de Ces observados en el estudio de espectrometría de masas antes mencionado.

El 2OHARA disminuye los niveles de ácidos grasos aumentados como consecuencia de una isquemia cerebral inducida en ratas.

Se analizaron los cambios en niveles de fosfolípidos y lípidos neutros inducidos por 2OHARA en el cerebro de ratas modelo de isquemia cerebral y se compararon con el de aquellos animales con daño cerebral no tratados. Ninguna especie lipídica, a excepción de los AG, mostraba diferencias significativas en las condiciones de estudio.

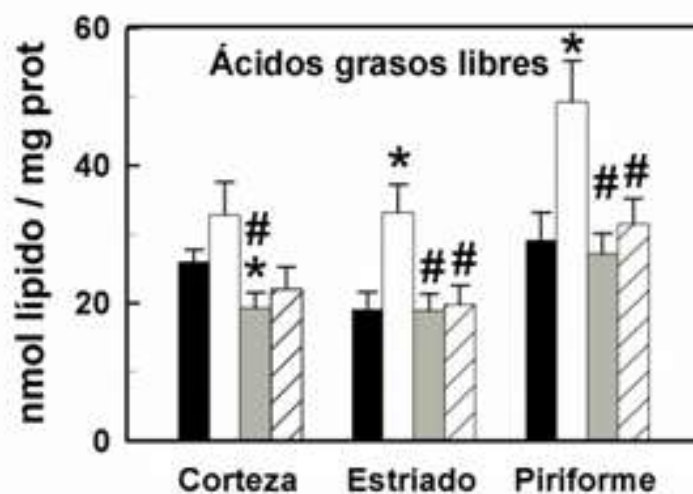


Figura 15. Niveles de ácidos grasos libres en la corteza somatosensorial (Corteza), núcleo estriado (Estriado) y la corteza piriforme (Piriforme) de ratas a las que se indujo una isquemia cerebral. Hemisferio sin daño isquémico de ratas no tratadas (control, barras negras); hemisferio con isquemia cerebral inducida no tratada (barras blancas); hemisferio sin daño isquémico y tratadas con 2OHARA (barras grises); y hemisferio con daño isquémico tratado con 2OHARA (barras rayadas). Las muestras se analizaron mediante TLC utilizando heptano:etil éter:ácido acético (74:21:4; v:v:v) como fase móvil. Las barras muestran la media \pm error estándar ($n=4-6$) de las cantidades de ácidos grasos normalizados por la cantidad de proteína (nmol lípido/mg prot.). * Indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) comparado con el grupo sin daño cerebral y no tratado. # Indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) comparado con el grupo con isquemia cerebral inducida no tratada.

El análisis de las tres regiones cerebrales del hemisferio isquémico de ratas no tratadas con 2OHARA mostraba un aumento significativo de los niveles de AG libres con respecto a las regiones del hemisferio sin daño cerebral de esos mismos animales (hemisferio control sin daño vascular). El tratamiento con 2OHARA provocó una marcada disminución de los niveles de AG libres en las ratas modelo de isquemia hasta llegar a alcanzar los niveles de AG libres presentes en los hemisferios cerebrales sin

daño isquémico, incluso en algunos casos estos niveles llegan a ser ligeramente inferiores. Además, al analizar el hemisferio sin daño isquémico tratado con la misma dosis de 2OHARA se observó que eran el grupo que presentaba menores niveles de AG libres (**Figura 15**), sugiriendo que el 2OHARA podría tener un efecto neuroprotector frente al daño inflamatorio producido tras la isquemia cerebral.

DISCUSIÓN

La Terapia Lipídica de Membrana establece que la interacción de moléculas naturales o de diseño racional puede producir cambios en la cantidad y el tipo de lípidos que componen la membrana. La composición de la bicapa lipídica tiene un papel importante en las cascadas de señalización celular, puesto que modificaciones en las interacciones lípido-proteína pueden alterar la propagación del mensaje [2].

De acuerdo a estas premisas, se sintetizaron análogos hidroxilados de AG con el fin de revertir el estado patológico de las células. Entre estas moléculas destacan el 2OHOA estudiado en tumores [12], lesiones de la médula espinal [13], hipertensión [14], diabetes y obesidad [15, 16]; el 2OHARA para procesos inflamatorios, como la isquemia cerebral [19] y el 2OHDHA para procesos neurodegenerativos [20].

El tratamiento de diferentes líneas celulares, tumorales y no tumorales, con 2OHOA indujo la aparición de una nueva banda cromatográfica no identificada hasta el momento. Posteriores estudios de digestión enzimática y espectrometría de masas permitieron identificar este nuevo lípido, describiéndolo como un glicerofosfolípido con una o dos moléculas de 2OHOA esterificadas al glicerol. Esta molécula podía ser hidrolizada por la acción de las enzimas PLA1 y PLA2, dando como producto de la reacción la molécula de 2OHOA libre. Además, el análisis por espectrometría de masas permitió confirmar que el glicerofosfolípido se trataba de una molécula de PC con 2OHOA esterificado. La presencia de esta PC esterificada con 2OHOA podría desempeñar un papel en el mecanismo de acción del 2OHOA para el tratamiento de células tumorales.

Los niveles de la PC esterificada con 2OHOA son ligeramente superiores en células tumorales en comparación con las no tumorales (fibroblastos). Además, los niveles aumentan en las líneas tumorales a medida que aumenta el tiempo de exposición al

tratamiento; sin embargo, los niveles se mantienen o incluso disminuyen en las células no tumorales. Por tanto, el tratamiento con 2OHOA induce la presencia de ácidos grasos hidroxilados en la estructura de los fosfolípidos de las membranas. Esto proporciona una evidencia de que el 2OHOA interacciona con las membranas celulares y ejerce su efecto en diferentes tipos de células tumorales más rápido que en células no tumorales [2].

Se han observado otros cambios lipídicos asociados al tratamiento con 2OHOA, como la disminución de los niveles de CE y la aparición de una nueva especie lipídica en células U87MG. A falta de datos confirmatorios, la síntesis de colesterol esterificado al 2OHOA podría explicar la disminución observada de los niveles de CE naturales tras el tratamiento con el 2OHOA. La desviación de la síntesis de CE hacia la esterificación del colesterol con 2OHOA disminuiría los niveles de CE naturales, lo que podría tener efectos importantes en la proliferación celular y, por tanto, en el crecimiento tumoral según se ha descrito en otros estudios [23, 24].

Se ha demostrado que los cambios a nivel lipídico pueden ocurrir incluso antes que los cambios morfológicos asociados al tumor [21]. Además, estos cambios pueden estar relacionados con la malignidad del tumor, ya que el colesterol y los CE se encuentran aumentados en las células tumorales lo que promueve la formación de *lipid raft* activando el ciclo celular [23]. Por tanto, un tratamiento que sea capaz de disminuir los niveles de CE puede reducir el crecimiento tumoral. Además, el 2OHOA ha demostrado ser potencialmente más eficaz que los fármacos de referencia hasta el momento para el tratamiento de gliomas debido a su efecto antitumoral en modelos celulares y animales y su baja toxicidad. Otros fármacos, como el N,N-hexametileno-bis-acetamida, ejercen su efecto mediante la reducción de los niveles de CE y diacilglicerol induciendo la diferenciación celular [8]. Por tanto, los niveles de CE podrían ser biomarcadores útiles para realizar un seguimiento del efecto del tratamiento y el crecimiento del tumor en los pacientes, ya que la cantidad de CE y colesterol son un indicador del proceso tumoral [24].

La otra enfermedad de interés relacionada con cambios lipídicos es la isquemia cerebral, que produce alteraciones a nivel proteico aumentando el nivel de expresión de la COX2 y a nivel lipídico principalmente aumentando los niveles de AG. El 2OHARA se ha

propuesto como agente neuroprotector en la isquemia cerebral, debido a su capacidad para inhibir la actividad de COX1 y COX2, reduciendo la síntesis de mediadores pro-inflamatorios y disminuyendo los niveles de TNF α [19].

Se conoce que los niveles de AG aumentan durante la isquemia cerebral y en otras condiciones patológicas como convulsión e hipoxia. El mecanismo implicado en la acumulación de AG incluye la reducción de la síntesis lipídica y la acción de las fosfolipasas A2 y C en los fosfolípidos de la membrana [30]. El aumento de AG observado en las tres regiones cerebrales analizadas de las ratas con isquemia cerebral inducida no tratadas con 2OHARA corrobora lo descrito en la literatura.

La recuperación de un infarto cerebral conlleva la normalización de los niveles de AG [31], por tanto, el 2OHARA podría ser utilizado como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento de pacientes con isquemia cerebral debido a su capacidad para disminuir los niveles de AG en ratas modelos de isquemia cerebral inducida. Además, podría ejercer como neuroprotector debido a su capacidad para disminuir los niveles de AG incluso en ratas sin isquemia.

El enzima encargado del aumento de los niveles de AG asociados a la isquemia cerebral es la PLA2, que ejerce su acción en los fosfolípidos de las membranas liberando los AG [30]. La actividad de este enzima está modulada por la inflamación, por lo que las propiedades antiinflamatorias del 2OHARA permiten disminuir la actividad transcripcional de la PLA2 disminuyendo la liberación de AG [25].

CONCLUSIONES

1. El 2OHOA induce cambios lipídicos en diferentes líneas celulares tumorales, así como no tumorales. Destaca la formación de una nueva especie de PC con una o dos moléculas de 2OHOA esterificadas. También provoca la formación de una especie de lípido neutro hasta ahora no identificada que podría tratarse de colesterol con una molécula de 2OHOA esterificada.
2. Los cambios lipídicos provocados por el 2OHOA evidencian su interacción con la membrana celular y un efecto intracelular, en este caso la modulación de rutas del metabolismo lipídico.
3. El tratamiento con 2OHARA provoca una disminución de los niveles de AG en las ratas modelo de isquemia cerebral inducida hasta llegar a recuperar los niveles normales, lo que sugiere que el 2OHARA podría tener un efecto protector frente a accidentes cerebrovasculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), 720–31.
2. Lladó, V., López, D. J., Ibarguren, M., Alonso, M., Soriano, J. B., & Busquets, X. (2014). Regulation of the cancer cell membrane lipid composition by NaChOleate: Effects on cell signaling and therapeutical relevance in glioma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(6), 1619–1627.
3. van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124.
4. Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438, 578–80.
5. Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572.
6. Escribá, P. V., Busquets, X., Inokuchi, J., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., ... Vígh, L. (2015). Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Progress in Lipid Research*, 59, 38–53.
7. Vögler, O., Barceló, J. M., Ribas, C., & Escribá, P. V. (2008). Membrane interactions of G proteins and other related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(7-8), 1640–1652.
8. Triton, T. R., & Yee, G. (1982). The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4556), 248–50.
9. Escribá, P. V., Sastre, M., & García-Sevilla, J. A. (1995). Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7595–9.
10. Prades, J., Funari, S. S., Gomez-Florit, M., Vögler, O., & Barceló, F. (2012). Effect of a 2-hydroxylated fatty acid on Cholesterol-rich membrane domains. *Molecular Membrane Biology*, 29(8), 333–343.

11. Ibarguren, M., López, D. J., Encinar, J. a., González-Ros, J. M., Busquets, X., & Escribá, P. V. (2013). Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), 2553–2563.
12. Torgersen, M. L., Klock, T. I., Kavaliauskiene, S., Klose, C., Simons, K., Skotland, T., & Sandvig, K. (2016). The anti-tumor drug 2-hydroxyoleic acid (Minerval) stimulates signaling and retrograde transport. *Oncotarget*, 7(52), 86871–86888.
13. Avila-Martin, G., Galan-Arriero, I., Ferrer-Donato, A., Busquets, X., Gomez-Soriano, J., Escribá, P. V., & Taylor, J. (2015). Oral 2-hydroxyoleic acid inhibits reflex hypersensitivity and open-field-induced anxiety after spared nerve injury. *European Journal of Pain*, 19(1), 111–122.
14. Alemany, R., Vögler, O., Terés, S., Egea, C., Baamonde, C., Barceló, F., ... Escribá, P. V. (2006). Antihypertensive action of 2-hydroxyoleic acid in SHR via modulation of the protein kinase A pathway and Rho kinase. *Journal of Lipid Research*, 47(8), 1762–70.
15. Gheorghe, A., Pérez de Heredia, F., Hunsche, C., Redondo, N., Díaz, L. E., Hernández, O., ... De la Fuente, M. (2017). Oxidative stress and immunosenescence in spleen of obese mice can be reversed by 2-hydroxyoleic acid. *Experimental Physiology*, 102(5), 533–544.
16. Vögler, O., López-Bellan, A., Alemany, R., Tofé, S., González, M., Quevedo, J., ... Escriba, P. V. (2008). Structure-effect relation of C18 long-chain fatty acids in the reduction of body weight in rats. *International Journal of Obesity*, 32(3), 464–473.
17. Prades, J., Alemany, R., Perona, J. S., Funari, S. S., Vögler, O., Ruiz-Gutiérrez, V., ... Barceló, F. (2008). Effects of 2-hydroxyoleic acid on the structural properties of biological and model plasma membranes. *Molecular Membrane Biology*, 25(1), 46–57.
18. Guo, D., Reinitz, F., Youssef, M., Hong, C., Nathanson, D., Akhavan, D., ... Mischel, P. S. (2011). An LXR agonist promotes glioblastoma cell death

- through inhibition of an EGFR/AKT/ SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discovery*, *1*(5), 442–456.
19. López, D. H., Fiol-deRoque, M. A., Noguera-Salvà, M. A., Terés, S., Campana, F., Piotto, S., ... Busquets, X. (2013). 2-hydroxy arachidonic acid: a new non-steroidal anti-inflammatory drug. *PLoS One*, *8*(8), e72052.
 20. Fiol-deRoque, M. A., Gutierrez-Lanza, R., Terés, S., Torres, M., Barceló, P., Rial, R. V., ... Rodríguez, J. J. (2013). Cognitive recovery and restoration of cell proliferation in the dentate gyrus in the 5XFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease following 2-hydroxy-DHA treatment. *Biogerontology*, *14*(6), 763–775.
 21. Yue, S., Li, J., Lee, S. Y., Lee, H. J., Shao, T., Song, B., ... Cheng, J. X. (2014). Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metabolism*, *19*(3), 393–406.
 22. Ibarguren, M., & López, D. J. (2014). The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1838*(6), 1518–1528.
 23. de Gonzalo-Calvo, D., López-Vilaró, L., Nasarre, L., Perez-Olabarria, M., Vázquez, T., Escuin, D., ... Llorente-Cortés, V. (2015). Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer*, *15*, 460.
 24. Gebhard, R. L., Clayman, R. V, Prigge, W. F., Figenshau, R., Staley, N. a, Reese, C., & Bear, a. (1987). Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma. *Journal of Lipid Research*, *28*(10), 1177–1184.
 25. Ugidos, I. F., Santos-Galdiano, M., Pérez-Rodríguez, D., Anuncibay-Soto, B., Font-Belmonte, E., López, D. J., ... Fernández-López, A. (2017). Neuroprotective effect of 2-hydroxy arachidonic acid in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*.

26. Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th Editio). San Diego: Academic Press.
27. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–75.
28. Ramstedt, B., Leppimäki, P., Axberg, M., & Slotte, J. P. (1999). Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *European Journal of Biochemistry*, *266*(3), 997–1002.
29. Kahl, D. (2002). GRAS Notice 000103: Lipase enzyme preparation from *Aspergillus oryzae* carrying a gene constructed from a modified *Thermomyces lanuginosus* lipase gene and a portion of the *Fusarium oxysporum* lipase gene.
30. Baskaya, M. K., Prasad, M. R., Donaldson, D., Rao, A. M., & Dempsey, R. J. (1996). Enhanced accumulation of free fatty acids in experimental focal cerebral ischemia. *Pearson Professional Ltd*, *54*(3), 167–171.
31. Paik, M. J., Li, W. Y., Ahn, Y. H., Lee, P. H., Choi, S., Kim, K. R., ... Lee, G. (2009). The free fatty acid metabolome in cerebral ischemia following human mesenchymal stem cell transplantation in rats. *Clinica Chimica Acta*, *402*(1-2), 25–30.

ANEXO I. Abreviaturas

2OHAG	ácidos grasos 2-hidroxilados
2OHARA	ácido 2-hidroxiaraquidónico
2OHDHA	ácido 2-hidroxicosaenoico
2HOHA	ácido 2-hidroxioléico
AG	ácidos grasos
ARA	ácido araquidónico
CDK	quinasa dependiente de ciclina
CDKI	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
CE	éster de colesterol
COX	ciclooxigenasa
DAG	diacilglicerol
DHFR	dihidrofolato reductasa
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
GPCR	receptores acoplados a proteínas G
GS	glutamina sintasa
LOX	lipooxigenasa
LPC	lisofosfatidil-colina
PBS	tampón fosfato salino
PC	fosfatidil-colina
PE	fosfatidil-etanolamina
PI	fosfatidil-inositol
PKC α	proteína quinasa C α
PLA	fosfolipasa
PS	fosfatidil-serina
Rb	retinoblastoma
SM	esfingomielina
TA	temperatura ambiente
TLC	cromatografía en capa fina