



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Análisis mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría
de masas del contenido de glicerofosfolípidos con enlaces vinil éter en
muestras biológicas**

Autor: David Amo Arranz

Tutores:

Jesús Balsinde Rodríguez (IBGM)

Álvaro Garrido Jiménez (IBGM)

Alfonso Pérez Encabo (UVa)

2025

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Abreviaturas y siglas empleadas en el texto	5
1. Introducción	8
1.1. Lípidos. Definición y clasificación.....	8
1.2. Lipidómica. Técnicas analíticas.....	8
1.3. Glicerofosfolípidos.	9
1.3.1. Estructura química	9
1.3.2. Glicerofosfolípidos con enlace éter	10
1.3.3. Nomenclatura simplificada de glicerofosfolípidos.....	11
1.3.4. Biosíntesis de fosfolípidos con enlace éter.....	12
1.3.5. Plasmalógenos. Estructura y propiedades fisicoquímicas. Funciones biológicas e implicaciones fisiopatológicas.	15
1.3.6. Reactividad química del enlace vinil éter.....	18
1.4. Análisis de glicerofosfolípidos mediante HPLC-MS.	19
1.4.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución	19
1.4.2. Espectrometría de masas.....	21
2. Objetivos.....	26
3. Materiales y métodos.....	27
3.1. Materiales	27
3.1.1. Cultivo celular.....	27
3.1.2. Material biológico.....	27
3.1.3. Disolventes y reactivos líquidos	27
3.1.4. Reactivos y productos sólidos.....	27
3.1.5. Lípidos	28
3.1.6. Equipamiento	28
3.2. Métodos experimentales	30
3.2.1. Cultivo celular.....	30
3.2.2. Cuantificación de proteína total en lisados celulares	30
3.2.3. Extracción de lípidos totales	31

3.2.4. Análisis de fosfolípidos de etanolamina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas	32
4. Resultados.....	37
4.1. Optimización de las condiciones de metanolisis ácida de plasmalógenos.....	37
4.1.1. Optimización de la concentración de ácido y tiempo de reacción.....	37
4.1.2. Evaluación de la quimioselectividad de la reacción	39
4.2. Análisis de fosfolípidos de etanolamina con enlace éter y vinil-éter en la línea celular macrofágica RAW264.7	40
5. Conclusiones.....	49
Bibliografía.....	50
Relación de figuras y tablas	56

Resumen

Los glicerofosfolípidos son lípidos anfipáticos que forman parte de las membranas biológicas. La estructura química de estas especies es diversa: mientras que la mayoría contienen dos ácidos grasos unidos por enlace éster al esqueleto de glicerol, algunos presentan, en la posición *sn*-1, un alcohol graso enlazado a través de un enlace éter o vinil éter, denominándose estos últimos plasmalógenos. En un contexto biológico, los plasmalógenos actúan como antioxidantes endógenos inactivando especies reactivas de oxígeno (ROS) y en las células del sistema inmune innato constituyen un importante reservorio de ácido araquidónico, precursor de los eicosanoides, lípidos bioactivos que actúan como mediadores en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. La determinación de plasmalógenos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), técnica extensamente empleada en el análisis de fosfolípidos, supone un reto analítico, ya que el tipo de enlace en la cadena *sn*-1 (éter o vinil éter) no puede elucidarse únicamente a partir del patrón de fragmentación. Para superar esta limitación, se ha puesto a punto una reacción de derivatización selectiva de plasmalógenos basada en su labilidad en medio ácido. El método se ha aplicado al estudio lipidómico de los fosfolípidos de etanolamina en la línea celular macrofágica murina RAW 264.7.

Abstract

Glycerophospholipids, are amphipatic lipids which are components of biological membranes. The chemical structure of these species is diverse: while most contain two fatty acids sterified to the glycerol skeleton, some exhibit, in the *sn-1* position, a fatty alcohol linked through an ether or vinyl ether bond, being the latter called plasmalogens. In a biological context, plasmalogens act as endogenous scavengers of reactive oxygen species (ROS) and in the cells of the innate immune system constitute an important reservoir of arachidonic acid, precursor of the eicosanoids, bioactive lipids that act as mediators in various physiological and physiopathological processes. The determination of plasmalogens by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), a widely applied technique for the analysis of phospholipids, poses an analytical challenge, since the moiety at *sn-1* position (1-O-alkyl or 1-O-alk-1'-enyl) cannot be elucidated from the fragment pattern solely. To overcome this limitation, a selective derivatization of plasmalogens based on its lability in acidic medium has been optimized. The method has been applied to the lipidomic study of ethanolamine phospholipids of RAW 264.7 murine macrophage cell line.

Abreviaturas y siglas empleadas en el texto

AA – Ácido araquidónico (del inglés Arachidonic Acid)

AGPS – Alquilglicerona fosfato sintasa (del inglés Alkylglycerone phosphate synthase)

CDP – Citidina difosfato (del inglés Citidine Diphosphate)

CE – Energía de colisión (del inglés Collision Energy)

CEPT1 – Colina/etanolamina fosfotransferasa 1 (del inglés Choline/ethanolamine phosphotransferase 1)

CID – Disociación inducida por colisión.

cps – Cuentas por segundo

CXP – Potencial de salida de la celda de colisión (del inglés Collision Cell Exit Potential)

DHAP – Dihidroxiacetona fosfato (del inglés Dihydroxyacetone phosphate)

DHRS7B - *Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B*

DMA - Dimetilacetal

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DP – Potencial de desagrupación (del inglés Declustering Potential)

EP – Potencial de entrada (del inglés Entrance Potential)

ePE – Especies de plasmaniletanolamina

ESI – Ionización por electroespray (del inglés Electrospray Ionization)

FAR1 – Acil-CoA reductasa 1 (del inglés Fatty Acyl-CoA Reductase 1)

FBS – Suero fetal bovino (del inglés Fetal Bovine Serum)

GnP – Glicerona fosfato (del inglés Glycerone Phosphate)

GnPAT – Glicerona fosfato acil transferasa (del inglés Glycerone Phosphate Acyl Transferase)

HILIC – Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (del inglés Hydrophilic interaction chromatography)

IU – Unidad Internacional (del inglés International Unit)

MRM – Monitorización de Reacción Múltiple (del inglés Multiple Reaction Monitoring)

m/z – Cociente masa/carga

NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (del inglés Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

NP-HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución en fase normal (del inglés Normal Phase High Performance Liquid Chromatography).

PAP – Fosfatasa de ácido fosfatídico (del inglés Phosphatidic Acid Phosphatase)

PBS – Tampón fosfato salino (del inglés Phosphate-buffered saline)

PEMT – Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (del inglés Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase)

PexRAP - Reductasa peroxisomal activadora de PPAR γ (del inglés Peroxisomal Reductase Activating PPAR γ)

PPAR γ – Receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (del inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)

pPE – Especies de plasmeniletanolamina

Q-TOF – Cuadrupolo – tiempo de vuelo (del inglés Quadrupole – Time Of Flight)

RDS – Etapa limitante de la velocidad (del inglés Rate-Determining Step)

ROS – Especies reactivas del oxígeno (del inglés Reactive Oxygen Species)

RP-HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (del inglés Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography)

SELENOI – Selenoproteína I

SEM – Error estándar de la media (del inglés Standard Error of the Mean)

SFA - Ácido graso saturado (del inglés Saturated Fatty Acid)

TMEM189 – Proteína transmembrana 189 (del inglés Transmembrane Protein 189)

XIC – Cromatograma de ion extraído (del inglés Extracted Ion Chromatogram)

1. Introducción

1.1. Lípidos. Definición y clasificación.

Los lípidos constituyen un grupo de biomoléculas heterogéneo y de gran diversidad estructural y funcional. Tradicionalmente, se ha considerado su insolubilidad en agua y su solubilidad en disolventes orgánicos (cloroformo, hexano, metanol) como su propiedad diferencial y definitiva. Esta definición clásica, muy extendida entre los textos de bioquímica general (1), excluye especies extensamente reconocidas como lípidos (gangliósidos, ácidos biliares conjugados, lipopolisacáridos...) al basarse exclusivamente en un criterio de solubilidad y ha sido progresivamente desplazada por otras de carácter más general, que los consideran desde una perspectiva biosintética y estructural. Así, de acuerdo con la definición propuesta por Fahy *et al.* (2), los lípidos son moléculas pequeñas, anfipáticas o hidrofóbicas, originadas total o parcialmente por condensación de carbaniones (tioésteres de acetoacilo, policétidos, etc.) o carbocationes de unidades de isopreno (prenoles y esteroides). El consorcio LIPID MAPS (Lipid Metabolites and Pathways Strategy) clasifica los lípidos en ocho categorías: ácidos grasos (FA), glicerolípidos (GL), glicerofosfolípidos (GP), esfingolípidos (SP), esteroides (ST), prenoles (PR), sacarolípidos (SL) y policétidos (PK) (3)

1.2. Lipidómica. Técnicas analíticas.

El término lipidoma, acuñado en 2001 (4), hace referencia al conjunto de especies lipídicas presentes en una célula, órgano o sistema biológico en general. La lipidómica, por consiguiente, podría entenderse como la caracterización y cuantificación completa de los lípidos presentes en una muestra, si bien en un sentido más extenso considera también su papel funcional en un contexto biológico definido, incluyendo su distribución entre los diversos orgánulos celulares membranosos, la caracterización de los mecanismos que median su interacción con otros lípidos y proteínas de membrana, así como sus alteraciones en condiciones fisiopatológicas o como respuesta a una perturbación (5).

De entre las técnicas analíticas aplicadas a los análisis lipidómicos, la espectrometría de masas (MS) ocupa una posición predominante, especialmente tras la introducción de la ionización por electrospray (ESI). Frecuentemente, los métodos incluyen una etapa de separación cromatográfica previa. En caso de no existir ésta, se habla de lipidómica *shotgun* o de infusión directa. Pueden mencionarse múltiples ventajas de los métodos basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas frente a los de infusión directa, tales como la posibilidad de

separar especies isobáricas e isoméricas, la determinación fiable de especies moleculares incluso a nivel de trazas y la minimización de efectos de matriz, particularmente, los relacionados con la supresión iónica (6), fenómeno especialmente prevalente cuando se emplea el electroespray como fuente de iones y cuya causa es la presencia en la matriz analítica de interferentes que reducen la eficacia de la ionización de los analitos, lo que impacta negativamente sobre la sensibilidad del método (7, 8). No obstante, la infusión directa continúa siendo un método de introducción de muestra de aplicación muy extendida, debido principalmente a su simplicidad y relativa rapidez, lo que la convierte en una herramienta muy útil en el cribado de alto rendimiento de metabolitos de naturaleza lipídica (6, 9).

Atendiendo al ámbito del análisis lipidómico, pueden diferenciarse dos metodologías: las no dirigidas (*untargeted*), que aspiran al análisis exhaustivo de los metabolitos lipídicos presentes en una muestra biológica, incluidos aquellos desconocidos *a priori* y las dirigidas (*targeted*), que circunscriben el foco del análisis a un grupo limitado de ellos (10). Ambas estrategias difieren asimismo en sus objetivos y la instrumentación analítica: mientras que en la primera predomina el empleo de espectrómetros de masas con analizadores de alto poder de resolución y exactitud de masa (como el de configuración híbrida cuadrupolo-tiempo de vuelo, Q-TOF y el orbitrap) con el fin de caracterizar nuevos lípidos y biomarcadores con potencial aplicabilidad clínica, en los análisis dirigidos se persigue la determinación cuantitativa o semicuantitativa de especies lipídicas involucradas en una o diversas rutas metabólicas, siendo los analizadores de triple cuadrupolo y el híbrido cuadrupolo-trampa lineal de iones (QqQ y Q-LIT, respectivamente) los de uso más extendido en esta modalidad (11).

1.3. Glicerofosfolípidos.

1.3.1. Estructura química

Los glicerofosfolípidos son elementos estructurales fundamentales de las membranas biológicas en los que dos ácidos grasos se hallan esterificados al primer y segundo átomos de carbono de una molécula de glicerol, ocupando la tercera posición un grupo de cabeza polar (colina, etanolamina, serina, glicerol o inositol) unido a través de un enlace fosfodiéster. La molécula de glicerol no es quiral, ya que presenta un plano de simetría que contiene al átomo de carbono central (Figura 1, izda.). No obstante, es proquiral, ya que la adición de un grupo fosfato a cualquiera de los grupos hidroxilo terminales para constituir glicerol 3-fosfato lo transforma en un compuesto quiral (12). Para identificar inequívocamente cada estereoisómero se emplea el

sistema *sn* (numeración estereoespecífica), en el que se adopta la convención de asignar el número 1 al carbono superior de la proyección de Fischer que presenta el grupo hidroxilo del carbono central orientado hacia la izquierda (Figura 1, dcha.) (13). En la mayoría de los organismos, con la única excepción de las arqueobacterias (14), los fosfolípidos de membrana derivan del *sn*-glicerol-3-fosfato.

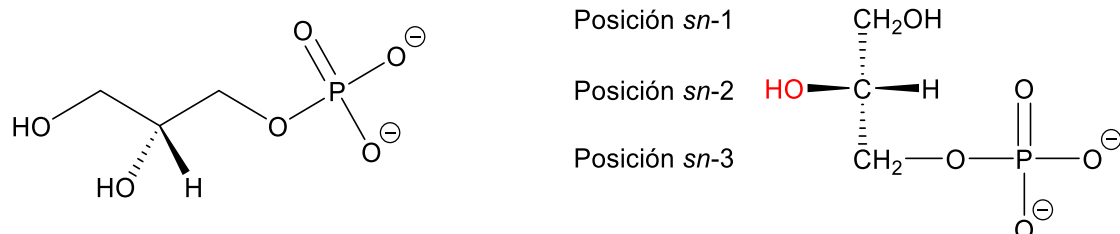


Figura 1.- Estructura del *sn*-glicerol 3-fosfato. Fórmula semidesarrollada (izda.) y proyección de Fischer (dcha.)

Los glicerofosfolípidos se nombran como derivados del ácido fosfatídico, anteponiendo el prefijo fosfatidil- al nombre de la cabeza polar (por ejemplo, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol).

1.3.2. Glicerofosfolípidos con enlace éter

Las diversas especies de glicerofosfolípidos presentes en una muestra biológica compleja difieren entre sí no únicamente en el grupo de cabeza polar, sino en el tipo de enlace presente en la posición *sn*-1 del esqueleto de glicerol. Así, junto a las especies derivadas del ácido fosfatídico (1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfato), con un ácido graso esterificado en dicha posición, existen otras que contienen un alcohol graso unido a través de un enlace 1-O-alkil éter o 1-O-alk-1'-enil éter (vinil éter), denominándose estos últimos plasmalógenos (Figura 2). Genéricamente, estas especies se nombran como derivados de los ácidos plasmánico (1-O-alkil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfato) y plasménico (1-O-alk-1'-enil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfato) anteponiendo los prefijos plasmanil- y plasmenil-, respectivamente, al nombre del grupo de cabeza polar (puede hablarse indistintamente, por ejemplo, de plasmalógenos de etanolamina y especies de plasmeniletanoamina). La mayoría de los lípidos con enlace éter presentan colina o etanolamina como cabeza polar, si bien se han descrito algunas especies con inositol o serina (15).

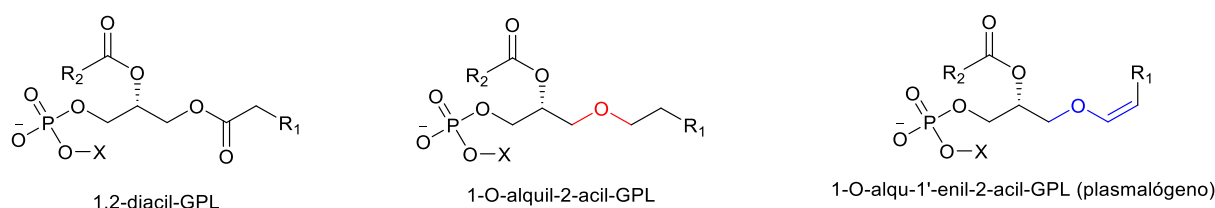


Figura 2.- Diversidad estructural de los fosfolípidos de membrana atendiendo al tipo de enlace en la posición *sn*-1 del esqueleto de glicerol: éster (izda.), éter (centro) o vinil éter (dcha.). X representa, genéricamente, un grupo de cabeza polar. GPL: glicerofosfolípido.

La cadena alquílica en la posición *sn*-1 procede, generalmente, de un alcohol graso saturado de 16 átomos de carbono (16:0) o bien uno saturado o monoinsaturado de 18 carbonos (18:0 o 18:1)(15). En los plasmalógenos, la posición *sn*-2 está ocupada, mayoritariamente, por ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), de 20 o 22 átomos de carbono, destacando por su abundancia relativa el araquidónico, 20:4 n -6 (AA) y el docosahexaenoico, 22:6 n -3 (DHA).

1.3.3. Nomenclatura simplificada de glicerofosfolípidos

Se ha adoptado en el presente trabajo la nomenclatura simplificada de lípidos recomendada por el consorcio LIPID MAPS. Dado que todos los analitos determinados en este trabajo son fosfolípidos o lisofosfolípidos, se describe brevemente dicha notación, basada en un sistema jerárquico, para esta categoría de lípidos (3):

- En primer lugar, se indica la subclase a la que pertenece el fosfolípido haciendo uso de las abreviaturas PC (glicerofosfocolina), PE (glicerofosfoetanolamina), PG (glicerofosfoglicerol), PI (glicerofosfoinositol) o PS (glicerofosfoserina). Las especies derivadas del ácido fosfatídico (glicerofosfatos) se denotan con PA.
- Seguidamente, y entre paréntesis, se indica la composición de las cadenas acílicas o alquílicas enlazadas al esqueleto de glicerol especificando el número de carbonos e insaturaciones separados por dos puntos. Cuando la técnica analítica permite la elucidación de la posición (*sn*-1 o *sn*-2) de los sustituyentes, ambos identificadores se separan con una barra diagonal (“/”). En caso contrario, se emplea la barra baja (“_”) como separador. Por ejemplo, la notación PE(18:0_18:1) debería emplearse cuando la distinción entre los isómeros posicionales PE(18:0/18:1) y PE(18:1/18:0) no sea posible.
- La presencia de un enlace éter o vinil éter se indica con los prefijos O- y P-, respectivamente. Téngase en cuenta que el doble enlace de la función vinil éter no se considera como una insaturación de la cadena alquílica.

- Los lisofosfolípidos, esto es, fosfolípidos carentes de una cadena acílica con un grupo hidroxilo libre, se denotan con las abreviaturas LPC, LPE, LPG, LPI o LPS y entre paréntesis, el identificador de la cadena acílica o alquílica.

1.3.4. Biosíntesis de fosfolípidos con enlace éter

La biosíntesis *de novo* de glicerofosfolípidos con enlace éter es un proceso bioquímico complejo que comienza en el peroxisoma celular y finaliza en el retículo endoplásmico.

Las primeras etapas de la síntesis tienen lugar en la matriz del peroxisoma celular (sombreado en rojo en la Figura 3). Allí, la glicerona fosfato (GnP, denominada anteriormente dihidroxiacetona fosfato, DHAP), producto de la glucólisis e importada desde el citosol, es acilada por la enzima GNPAT (glicerona fosfato acil transferasa), dando lugar a 1-acilglicerona fosfato. En la etapa siguiente tiene lugar la formación del enlace éter mediante el intercambio, catalizado por AGPS (alquilglicerona fosfato sintasa), del acilo graso incorporado anteriormente por un alcohol graso, sintetizado por FAR1 (y en menor medida, por su isoforma FAR2), un enzima peroxisomal que cataliza la reducción dependiente de NADPH de ácidos grasos, principalmente saturados o monoinsaturados conteniendo cadenas de 16 o 18 átomos de carbono. La disponibilidad de alcoholes grasos es el factor limitante de la ruta y su síntesis se halla regulada mediante un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel de proteína por degradación postraduccional de la enzima FAR1 en respuesta a una elevada concentración de plasmalógenos en la cara interna de la membrana citoplasmática (16).

La 1-alquil dihidroxiacetona fosfato se exporta al retículo endoplásmico (sombreado en verde en la Figura 3), donde experimenta una secuencia de transformaciones. En primer lugar, la actividad PexRAP dependiente de NADPH, codificada por el gen *Dhrs7b*, cataliza la reducción del grupo carbonilo, lo que conduce a la formación de 1-alquilglicerol-3 fosfato. Este intermedio experimenta una nueva acilación sobre el grupo hidroxilo recién generado catalizada por una alquil/acil-glicero-3-fosfato aciltransferasa (AAG3P-AT), quedando así introducido el ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 del producto final de la ruta. Las dos etapas consecutivas conducen a la introducción de la cabeza polar por hidrólisis del grupo fosfato catalizada por una fosfatidato fosfatasa (PAP) y posterior condensación del grupo de cabeza (etanolamina o colina). Estas últimas reacciones están catalizadas por SELENOI y CEPT1, enzimas que utilizan CDP-etanolamina (CDP-[Etn]) o CDP-colina (CDP-[Cho]), respectivamente, en reacciones de desplazamiento nucleófilo análogas a las descritas en la ruta de Kennedy de síntesis de fosfolípidos.

Los productos resultantes son una plasmanilcolina (ePC) o una plasmaniletanolamina (ePE), pudiendo esta última convertirse en la primera por trimetilación del grupo amino en una reacción catalizada por una metiltransferasa (PEMT1) que emplea S-adenosilmetionina como dador de grupos metilo (17). La plasmaniletanolamina es sustrato de TMEM189, una desaturasa dependiente de oxígeno molecular y NADPH que genera finalmente un plasmalógeno de etanolamina (pPE) al introducir un doble enlace de configuración *cis* contiguo a la función éter de la cadena O-alquílica (18). Los plasmalógenos de colina (pPC) se sintetizan a partir de los de etanolamina por sustitución de la cabeza polar en una compleja secuencia de reacciones (indicadas como dos flechas paralelas en la Figura 3), no habiéndose descrito por el momento una actividad desaturasa que genere pPC a partir de ePC (17).

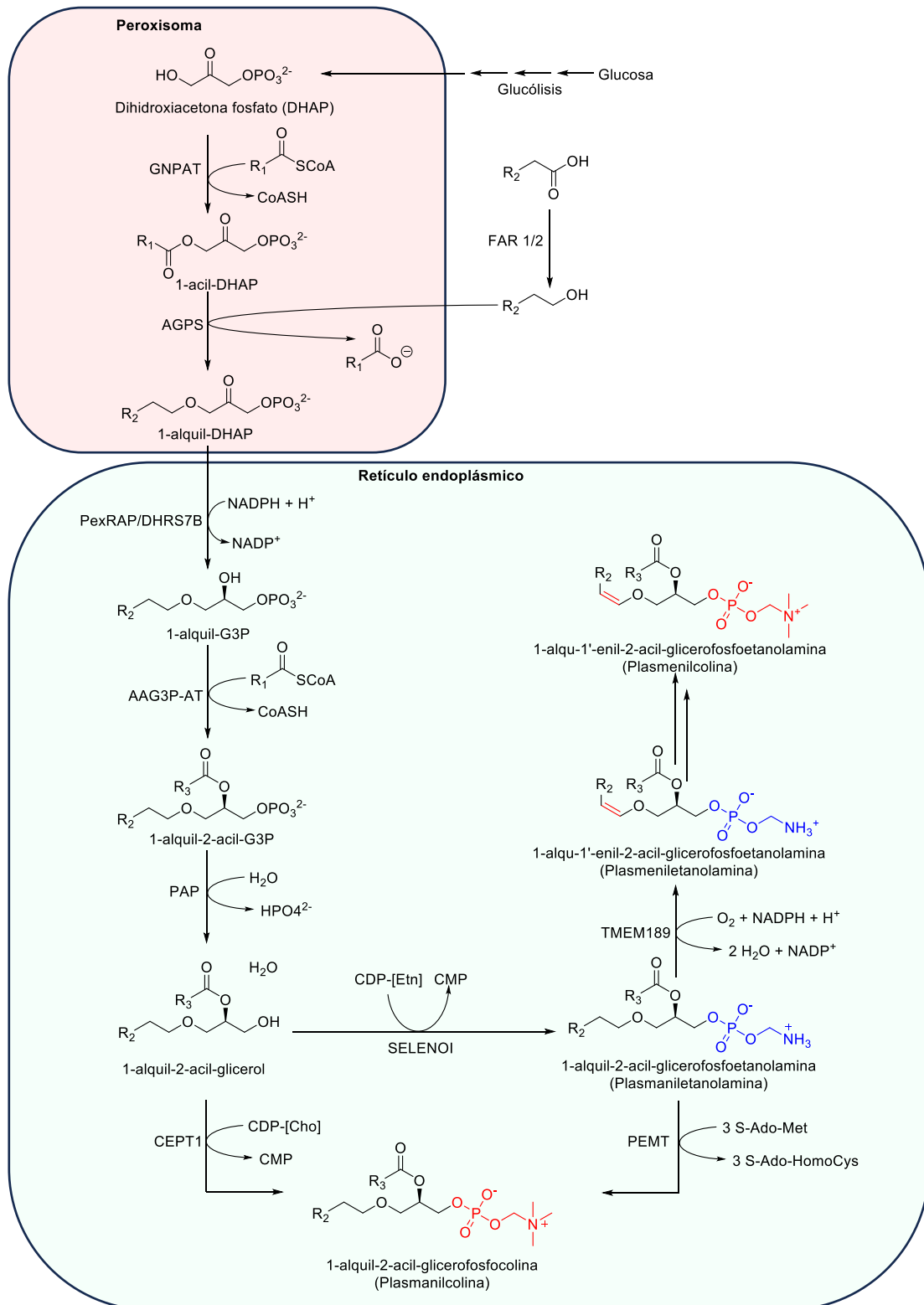


Figura 3.- Síntesis *de novo* de glicerofosfolípidos éter y vinil éter. En el peroxisoma tiene lugar la formación del enlace éter a partir de la condensación de un alcohol graso, producto de la reducción de un ácido graso por la reductasa FAR-1 (y en menor medida, FAR-2) y una molécula de dihidroxiacetona fosfato. La 1-alkil dihidroxiacetona fosfato se procesa posteriormente en el retículo endoplásmico. En la última etapa de la secuencia biosintética la desaturasa TMEM189 introduce la insaturación conjugada a la función éter para formar los plasmalógenos de etanolamina (pPE). Los plasmalógenos de colina (pPC) se forman a partir de los anteriores por sustitución de la cabeza polar.

1.3.5. Plasmalógenos. Estructura y propiedades fisicoquímicas. Funciones biológicas e implicaciones fisiopatológicas.

Los plasmalógenos son las especies de fosfolípidos con enlace éter más abundantes y cuyas funciones biológicas han sido caracterizadas con mayor profundidad. En mamíferos, los plasmalógenos constituyen hasta el 20 % de la fracción total de glicerofosfolípidos (15), si bien su distribución es heterogénea y depende del tejido o tipo celular: los plasmalógenos de colina son particularmente prevalentes en el tejido muscular esquelético y cardíaco, mientras que los de etanolamina predominan en el resto de órganos, particularmente en el tejido nervioso (donde son elementos constitutivos de las vainas de mielina y llegan a representar, en algunas regiones cerebrales, más del 90 % de la fracción de fosfolípidos de etanolamina), en el corazón, y en células del sistema inmunitario, tales como los neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos. La menor concentración de plasmalógenos se halla en el hígado, órgano desde el que se exportan a otros tejidos formando parte de lipoproteínas. A nivel subcelular, pueden encontrarse formando parte de la membrana nuclear y de orgánulos como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la mitocondria (15, 19).

Como se expuso anteriormente, el motivo estructural distintivo de los plasmalógenos es la presencia de un enlace vinil éter que, con respecto al enlace éster de los diacil-fosfolípidos, manifiesta una labilidad superior en medio ácido y frente a reactivos oxidantes, es más hidrofóbico y menos propenso a formar enlaces de hidrógeno (20). Estas propiedades están estrechamente relacionadas con su función biológica. Como consecuencia de su susceptibilidad a la oxidación, reaccionan rápida y preferentemente frente a radicales de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que se les ha atribuido un papel como antioxidantes endógenos al impedir la oxidación de lípidos de membrana sensibles, particularmente aquellas que contienen ácidos grasos poliinsaturados (Figura 4) (15).

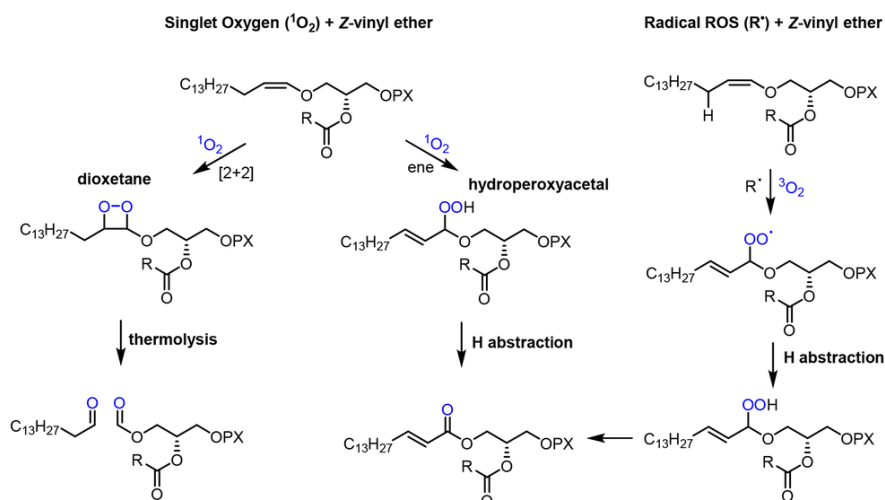


Figura 4.- Reactividad de plasmalógenos frente a radicales de especies reactivas de oxígeno (ROS) y oxígeno singlete (1O_2). En un contexto de estrés oxidativo, los plasmalógenos actúan como antioxidantes endógenos protegiendo de la oxidación a otras especies sensibles, como fosfolípidos de membrana que contienen ácidos grasos poliinsaturados. X: grupo de cabeza polar. Reproducido de (48).

Las características del enlace vinil éter en los plasmalógenos determinan también las propiedades físicas y estructurales de las membranas biológicas de las que forman parte: una mayor concentración de estas especies tiende a disminuir su fluidez debido a la contribución de dos efectos sinérgicos: por un lado, la ausencia de un grupo éster en la posición *sn*-1 favorece las interacciones intermoleculares de puente de hidrógeno entre las cabezas polares; por otro, el enlace vinil éter induce la alineación de las cadenas hidrocarbonadas perpendicularmente a la membrana celular mediante interacciones hidrofóbicas, lo que resulta en el empaquetamiento más compacto y rígido de los fosfolípidos de membrana (Figura 5). Los plasmalógenos de etanolamina son, junto con esfingomielinas y colesterol, componentes fundamentales de las balsas lipídicas, microdominios dinámicos y especializados de la membrana celular implicados en procesos de transducción de señales, endocitosis y formación de vesículas extracelulares (15, 19).

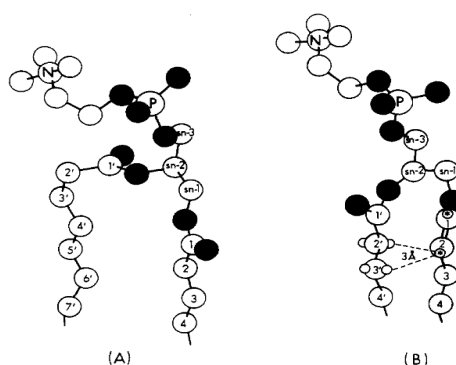


Figura 5.- Estructura de la fosfatidilcolina (A), elucidada a partir de difracción de rayos X y de la plasmenilcolina (B), predicha a partir de experimentos de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$). En la plasmenilcolina, el enlace vinil éter favorece las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales y un empaquetamiento más compacto de los fosfolípidos de membrana. Reproducido de (49).

En células del sistema inmune innato, los plasmalógenos constituyen un reservorio de ácidos grasos poliinsaturados, particularmente de ácido araquidónico (AA). Como parte de la respuesta inflamatoria, una fosfolipasa A_2 moviliza el ácido araquidónico proporcionando el sustrato para la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), mediadores lipídicos implicados en una gran diversidad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos(15, 19).

Se han descrito diversas patologías que cursan con deficiencias en el contenido celular de plasmalógenos, tanto congénitas como adquiridas. El primer grupo incluye la enfermedad de Niemann-Pick tipo C y trastornos peroxisomales como el síndrome de Zellweger y la condrodistrofia punctata rizomélica. En el contexto de las patologías neurodegenerativas adquiridas, en la Enfermedad de Alzheimer se ha demostrado una correlación entre la disminución de plasmalógenos en el sistema nervioso y la gravedad del proceso clínico. Si esta disminución es un factor que contribuye a la patogénesis de la enfermedad, una consecuencia derivada de la misma o una combinación de ambas es una cuestión aún no totalmente esclarecida (15).

1.3.6. Reactividad química del enlace vinil éter

Como consecuencia de la labilidad química del enlace vinil éter, los plasmalógenos reaccionan frente a una gran diversidad de agentes ácidos, electrófilos y oxidantes (Figura 6).

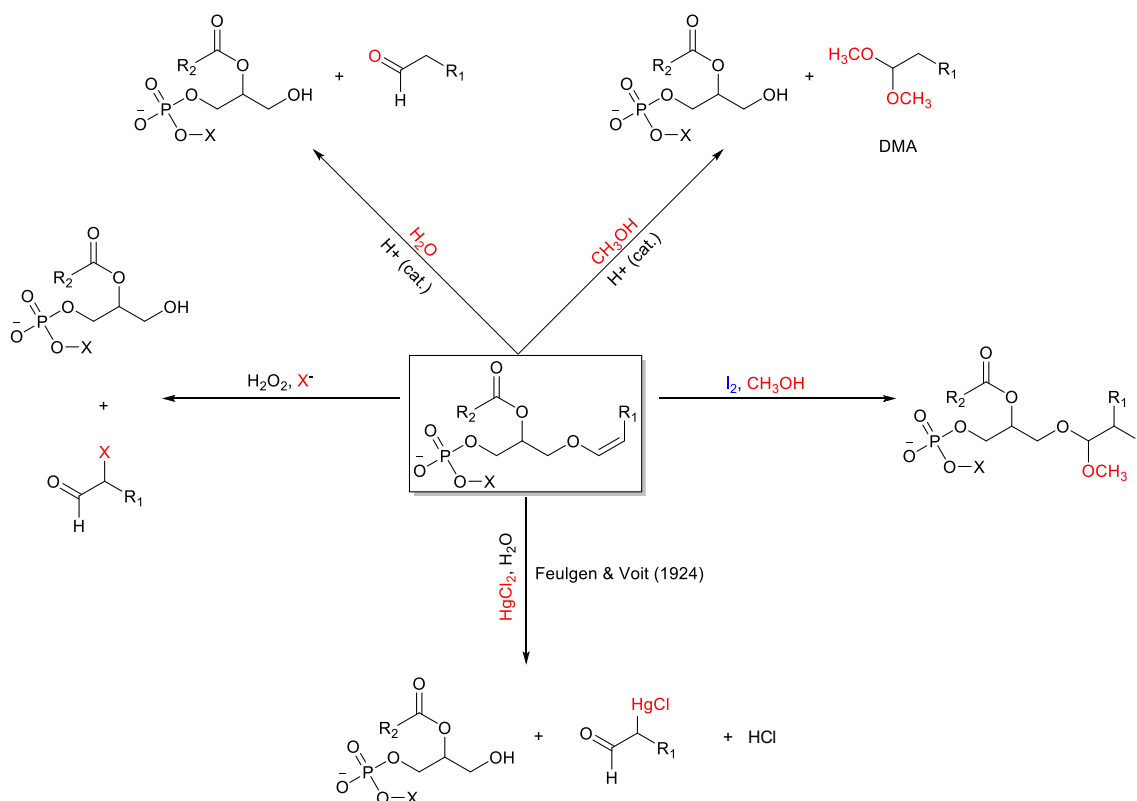


Figura 6.- Ejemplos representativos de la reactividad química del enlace vinil éter de los plasmalógenos. X: grupo de cabeza polar. DMA: dimetilacetal.

Como ejemplo representativo de la reactividad química de los plasmalógenos, cabe destacar, por su interés histórico, la reacción que condujo a Feulgen y Voit a su descubrimiento accidental en 1924: cuando un tejido biológico se trata con HgCl_2 , el enlace vinil éter de los plasmalógenos se fragmenta, liberando un aldehído graso al citoplasma y un lisofosfolípido. El tratamiento posterior de la muestra con el reactivo de Schiff, una tinción histoquímica específica para aldehídos libres provoca la coloración del citoplasma, aunque no del núcleo celular. Se denominó *plasmal* al aldehído citoplasmático responsable de la reacción de Schiff positiva y *plasmalógeno* a su precursor, por entonces aún no identificado (21).

Los plasmalógenos son sensibles, asimismo, a la hidrólisis catalizada por ácido, siendo los productos de reacción un aldehído graso y un lisofosfolípido. Cuando la reacción tiene lugar en presencia de un exceso de metanol, se obtienen, en lugar de aldehídos grasos, los correspondientes dimetilacetales (DMAs) (Figura 6). Esta última derivatización resulta especialmente adecuada para la determinación de plasmalógenos mediante cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas, ya que (i) su rendimiento es cuantitativo y (ii) los dimetilacetales presentan bajos puntos de ebullición (22).

Mecanísticamente, la hidrólisis ácida de plasmalógenos es referible a la de éteres α,β -insaturados, cuya cinética ha sido extensamente estudiada (Figura 7) (23). El mecanismo de reacción aceptado comienza con la adición de un protón al C- β del grupo vinil-éter, siendo ésta la etapa limitante de la velocidad de reacción. El carbocatión resultante, estabilizado por resonancia, reacciona rápida e irreversiblemente con agua formando un hemiacetal, que evoluciona finalmente a un lisofosfolípido y un aldehído graso.

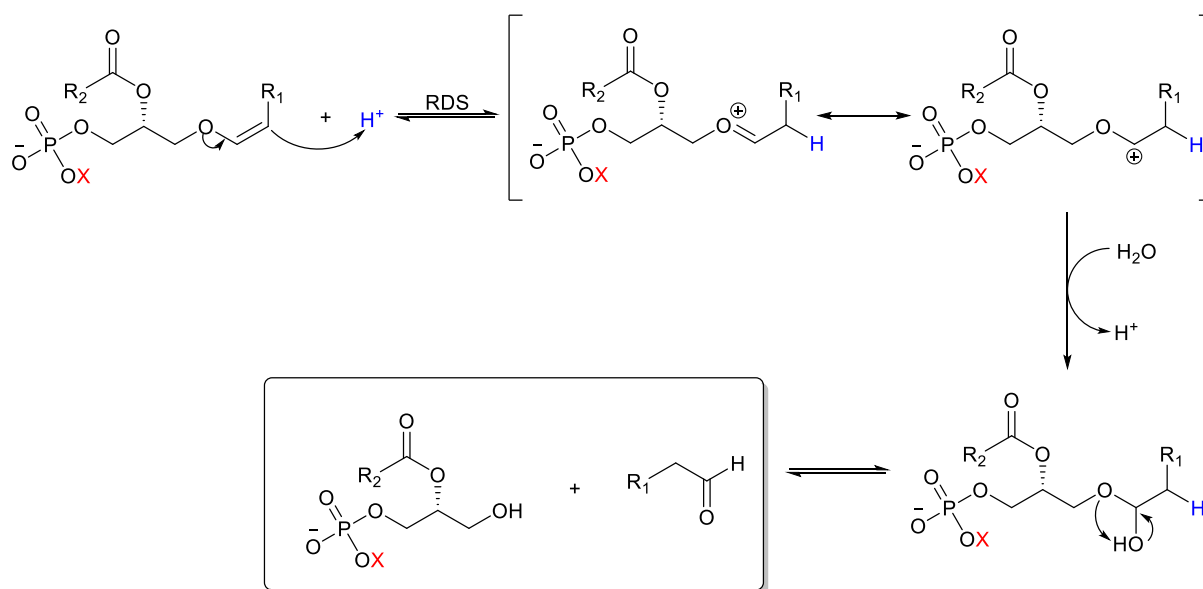


Figura 7.- Mecanismo propuesto para la hidrólisis de plasmalógenos catalizada por ácido. RDS: Rate Determining Step. X: grupo de cabeza.

1.4. Análisis de glicerofosfolípidos mediante HPLC-MS.

La técnica analítica de uso más extendido para el análisis dirigido de fosfolípidos es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). En esta sección se resumen los fundamentos de la técnica y se describe brevemente la instrumentación utilizada.

1.4.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía líquida en columna es una técnica analítica de separación en la que los componentes de una muestra se distribuyen entre una fase estacionaria sólida o líquida retenida en un recinto cilíndrico (columna) y una fase móvil líquida que la atraviesa. En la modalidad de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el empleo de fases estacionarias con tamaño

de partícula reducido (3-10 μm) y altas presiones de fase móvil permite alcanzar elevadas eficiencias de separación. Atendiendo a la polaridad relativa entre la fase móvil y estacionaria y el mecanismo de separación, pueden distinguirse tres modalidades cromatográficas:

- En la cromatografía de fase inversa (RP-HPLC), la fase móvil es polar y consiste generalmente en mezclas de agua con un modificador orgánico miscible (metanol, acetonitrilo, isopropanol, tetrahidrofurano...), mientras que la estacionaria es apolar o de baja polaridad, tales como el octilsilano (C_8) y el octadecilsilano (C_{18}). La propiedad que gobierna la separación en esta modalidad es la lipofilicidad, por lo que la retención de los analitos depende de la longitud y el número de insaturaciones de las cadenas laterales unidas al esqueleto de glicerol. Así, las especies con cadenas laterales de menor longitud y mayor número de insaturaciones presentan los menores tiempos de retención con respecto a aquellas más largas o saturadas (6).
- En la cromatografía en fase normal (NP-HPLC), la fase móvil es apolar o de baja polaridad (hexano/isopropanol, cloroformo/isopropanol...) y la estacionaria polar (sílica o sílica modificada). En esta modalidad, la separación de los fosfolípidos tiene lugar en función de la polaridad de los grupos de cabeza (Figura 8), por lo que proporciona un mecanismo de separación complementario a la fase inversa que permite la resolución de las distintas subclases de fosfolípidos. Una desventaja con respecto a la fase inversa es la mayor duración de las carreras cromatográficas (30-60 min), principalmente como consecuencia del empleo de columnas de mayor longitud (6).

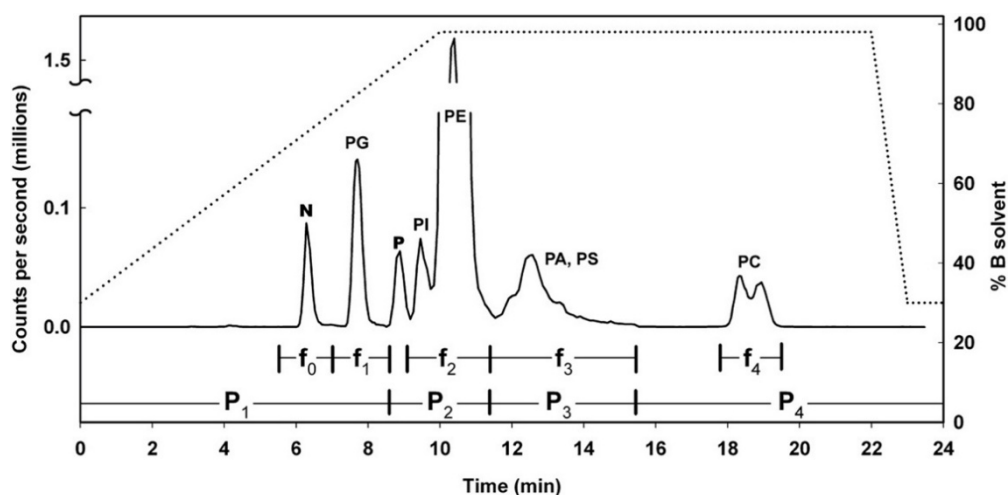


Figura 8.- Cromatograma de ion total (TIC) de los glicero fosfolípidos extraídos de una muestra biológica analizados mediante NP-HPLC-MS. En esta modalidad, los fosfolípidos se separan en sus subclases en función de la polaridad de sus grupos de cabeza. Reproducido de (24).

- Una tercera modalidad de empleo muy generalizado en la separación de fosfolípidos es la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), que emplea fases estacionarias polares (sílica y sus modificaciones) y fases móviles propias de la cromatografía en fase inversa (agua/acetonitrilo, agua/acetonitrilo/metanol...). Si bien se ha considerado tradicionalmente como una variante de la cromatografía en fase normal, los fenómenos que median la separación son más complejos. De entre los mecanismos implicados, el principal es el reparto de los analitos entre la fase estacionaria y una capa de agua adsorbida sobre la superficie de sílica (25). La separación, al igual que en la modalidad de fase normal, responde a las diferencias de polaridad de los grupos de cabeza. Como ventajas de esta modalidad frente a la NP-HPLC pueden enumerarse su mayor reproducibilidad, robustez y compatibilidad con la espectrometría de masas, así como la posibilidad de acoplamiento *en línea* a columnas de fase inversa en sistemas cromatográficos bidimensionales (6).

1.4.2. Espectrometría de masas

La técnica instrumental de elección para la determinación dirigida de glicerofosfolípidos es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), empleando el electrospray (ESI) como fuente de iones en la interfaz de acoplamiento HPLC-MS y analizador de triple cuadrupolo (26).

La ionización por electrospray es un método de ionización por desorción aplicable a analitos de naturaleza polar térmicamente lábiles, lo que, junto con la sencillez del acoplamiento a la cromatografía de líquidos lo convierte en una técnica óptima para la ionización de fosfolípidos (1). En la fuente de iones, la muestra líquida atraviesa una aguja capilar conductora rodeada por un electrodo cilíndrico, entre los que se establece una diferencia de potencial. Bajo la acción de un gas de nebulización, se obtiene una dispersión de gotas cargadas cuya desolvatación progresiva, asistida por un gas de secado, finaliza con la liberación en fase gaseosa de los iones de los analitos (Figura 9). Dado que estos no experimentan apenas fragmentación en la cámara de nebulización, obteniéndose íntegramente los pseudoiones moleculares $[M + H]^+$ o $[M - H]^-$ (o aductos de estos), se considera una fuente *blanda*. La carga de los iones obtenidos depende de la polaridad del voltaje diferencia aplicado al electrospray. Así, en los denominados modos positivo y negativo, el instrumento se configura para la generación y análisis de especies con dichas cargas.

Un analizador de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos dispuestos en serie, estando constituido cada uno de ellos por cuatro barras cilíndricas o de sección hiperbólica diametralmente

Introducción

opuestas. Los cuadrupolos de los extremos, denominados Q1 y Q3 en orden de proximidad a la fuente de ionización actúan como filtros de iones, en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación superpuesta de un potencial de corriente continua y otro de alterna en el orden de las radiofrecuencias. En el cuadrupolo central (Q2 o simplemente q) se produce la fragmentación de los iones filtrados por Q1 (iones precursores) procedentes de la fuente mediante colisiones con un gas inerte, técnica conocida como disociación inducida por colisión (CID). Los iones producto resultantes son filtrados a su vez por Q3 antes de alcanzar el detector (Figura 9).

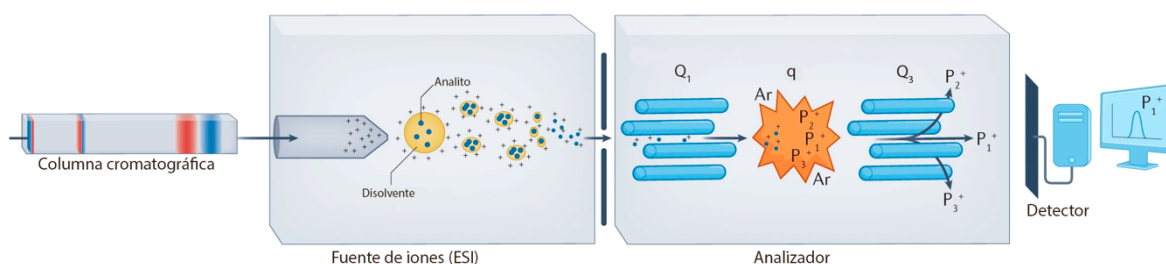


Figura 9.- Diagrama esquemático de un sistema HPLC-MS/MS con electrospray como fuente de iones y analizador de triple cuadrupolo operando en modo MRM. Adaptado de (50).

Los cuadrupolos Q1 y Q3 pueden actuar permitiendo el paso de un único ion de m/z definida o bien efectuar un barrido. De las posibles combinaciones de ambos modos de operación surgen los cuatro modos de adquisición disponibles en espectrometría de masas en tándem, a saber: barrido de ion precursor, barrido de ion producto, barrido de pérdida neutra y monitorización de reacción múltiple (MRM), siendo este último el más empleado en análisis lipidómicos dirigidos. En el modo MRM, se fija en Q1 la relación m/z de un ion precursor, que se fragmenta sucesivamente en la celda de colisión. El tercer cuadrupolo (Q3) filtra y transmite al detector uno de los iones producto generados (Figura 9). Una *transición* queda definida por la pareja de valores de m/z establecidos en Q1 y Q3. Las principales ventajas de este método de adquisición son su robustez, sensibilidad y especificidad.

El modo de ionización se escoge atendiendo a la carga en disolución característica de cada subclase de fosfolípidos. Las especies zwitteriónicas (PC y PE) pueden analizarse tanto en modo positivo como negativo, si bien se logran eficacias de ionización óptimas operando en modo positivo en el análisis de PC (detectándose como especies $[M+H]^+$ o aductos cargados positivamente) y en negativo en la determinación de PE (detectándose los iones $[M-H]^-$). Por otro lado, la ionización de los fosfolípidos cargados negativamente a pH neutro (PI, PA, PG y PS) produce mayoritariamente el ion correspondiente a la pérdida de un protón, $[M-H]^-$, por lo que se analizan preferentemente en modo negativo (26, 27). La carga de los iones moleculares

condiciona su patrón de fragmentación en la espectrometría de masas en tándem. Por ejemplo, si se consideran los espectros MS/MS de la especie PE(18:0/22:6) adquiridos en modo positivo y negativo (Figura 10-A y 10-B, respectivamente), puede observarse en el primero, como fragmento más abundante, el ion con m/z 651,4, producto de la pérdida neutra del grupo fosfoetanolamina de la cabeza polar (Figura 10-C). En el segundo, predominan los iones hijo correspondientes a los carboxilatos de los ácidos grasos 18:0 (m/z 283,4) y 22:6 (m/z 327,5), esterificados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del fosfolípido, respectivamente (Figura 10-D). Por consiguiente, la información estructural que se infiere de cada espectro es complementaria: el adquirido en modo positivo permite la identificación de la subclase de fosfolípido, y el de modo negativo, la caracterización de las cadenas laterales (26).

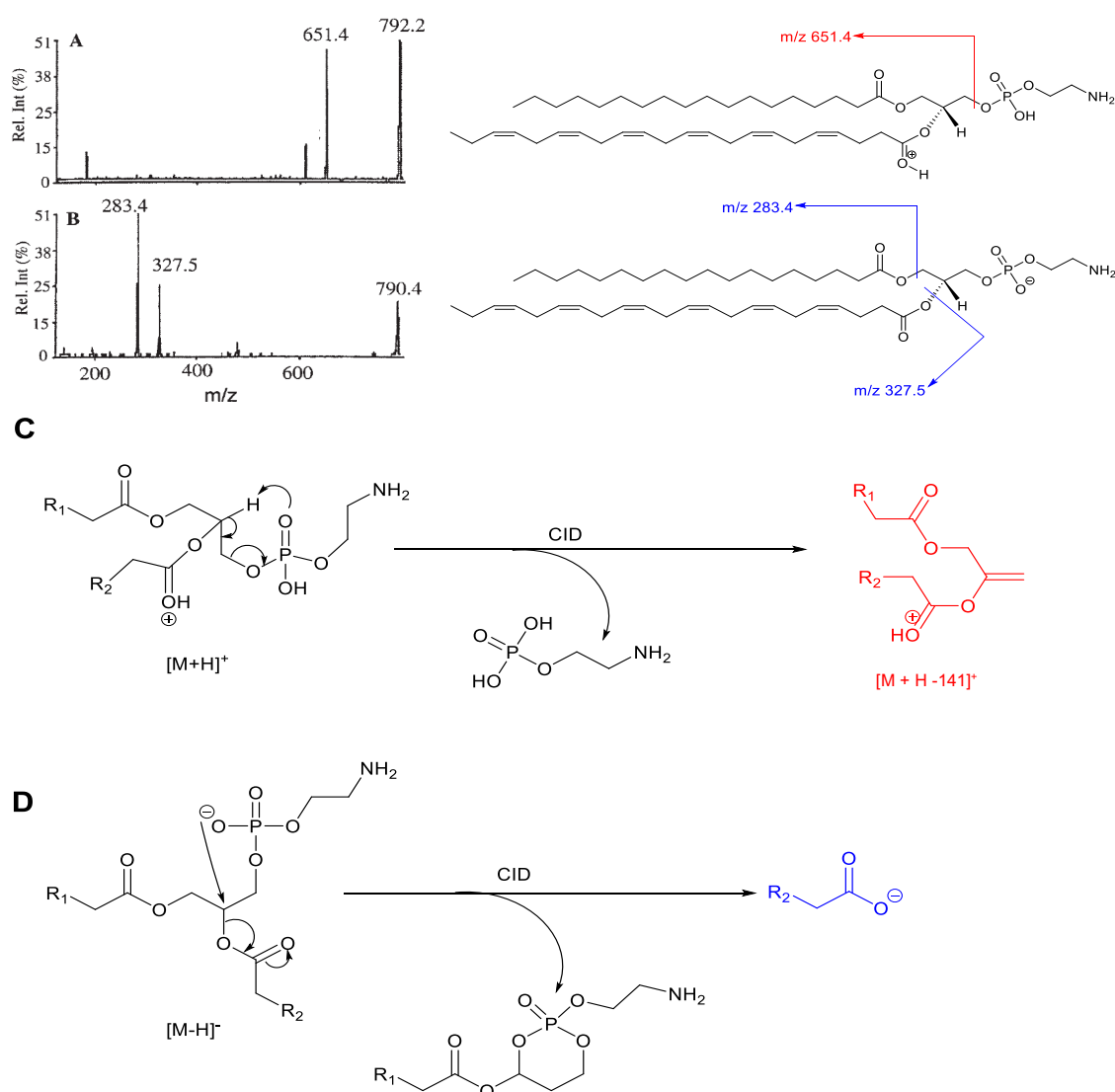


Figura 10.- Espectro de masas en tándem de la especie PE(18:0/22:6) en modo positivo (A) y negativo (B) con sus correspondientes patrones de fragmentación. En el modo positivo, el ion hijo de mayor abundancia es el resultante de la pérdida de fosfoetanolamina como fragmento neutro (esquema C). En el negativo, predominan los correspondientes a los carboxilatos de los ácidos grasos esterificados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 (esquema D). Reproducido de (26).

1.4.2.1. Limitaciones de la espectrometría de masas en tándem aplicada al análisis de fosfolípidos con enlace éter. Interferencias isobáricas.

Un problema analítico que surge en la determinación de glicerofosfolípidos con enlace éter mediante HPLC-MS/MS es la imposibilidad de elucidar el tipo de enlace (éter o vinil éter) en la cadena *sn-1* únicamente a partir del patrón de fragmentación. Considérese, a modo de ejemplo representativo, los espectros MS/MS adquiridos en modo negativo de la pareja de isómeros posicionales PE(P-18:0/20:4) y PE(O-18:1/20:4) (Figura 11). Ambas especies presentan la misma masa exacta y su patrón de fragmentación, que proporciona exclusivamente información estructural sobre el ácido graso esterificado en la posición *sn-2*, es idéntico. Por consiguiente, cada analito actúa recíprocamente como un interferente isobárico en la determinación del otro. Este tipo de interferencias, que no pueden resolverse incluso empleando analizadores de alto poder de resolución, supone una fuente de error cuando ambas especies coexisten en la matriz (28, 29).

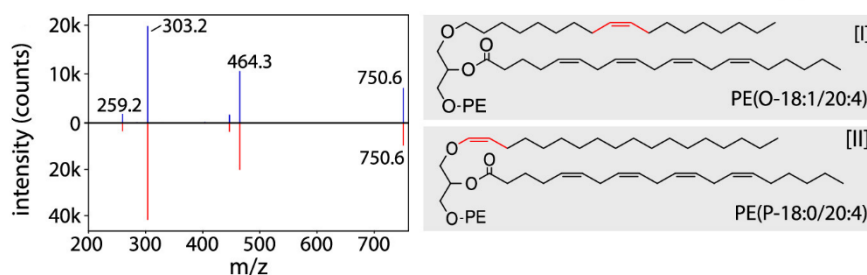


Figura 11.- (A) Espectros MS/MS con analizador de triple cuadrupolo, adquiridos empleando una fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modo negativo y disociación inducida por colisión (CID) de los isómeros PE(O-18:1/20:4) (en rojo) y PE(P-18:0/20:4) (en azul) (reproducido de (28)). Obsérvese que el patrón de fragmentación de ambas especies es idéntico, lo que las hace indistinguibles cuando se emplea dicha técnica analítica al no existir ningún ion producto que permita inferir el tipo de enlace en la posición *sn-1*.

Se han descrito diversas estrategias con la finalidad de superar esta limitación:

- La interferencia puede corregirse en la dimensión cromatográfica siempre y cuando se disponga de un método de separación que permita la resolución de ambos isómeros. La identificación de cada analito se efectúa entonces comparando sus tiempos de retención frente a los de patrones analizados en las mismas condiciones (28).
- Puede actuarse asimismo sobre las condiciones de fragmentación empleadas en la espectrometría de masas. Por ejemplo, es posible la obtención de iones producto específicos de cada isómero mediante la fragmentación secuencial de los aductos litiados de los iones precursores operando en modo positivo. No obstante, esta aproximación requiere

el empleo de analizadores que permitan la adquisición de espectros MS^n ($n > 2$), por lo que su aplicabilidad es limitada (30, 31). Asimismo, el empleo combinado de la disociación inducida por colisión y la disociación inducida por ozono (OzID) permite no únicamente la discriminación entre especies con enlace éter y vinil éter, sino también la elucidación de la posición de las insaturaciones en las cadenas alquílicas o acílicas (32).

- Una tercera alternativa consiste en la derivatización selectiva de los plasmalógenos previamente al análisis, obteniéndose productos no interferidos. Su determinación puede entonces efectuarse:
 1. Directamente, analizando los productos de la derivatización. Como ejemplo representativo de esta estrategia puede mencionarse el método basado en el marcaje selectivo del enlace vinil éter con yodo y metanol desarrollado por Fhaner *et al.* (33) (Figura 6).
 2. Por cuantificación diferencial, como la diferencia entre la señal analítica inter-ferida y la registrada en una muestra idéntica sometida a tratamiento ácido con la finalidad de hidrolizar selectiva y cuantitativamente los plasmalógenos (34–36).

2. Objetivos

La implicación de los plasmalógenos en procesos fisiológicos y fisiopatológicos justifica la necesidad de disponer de una metodología analítica que posibilite su determinación en muestras biológicas complejas, permitiendo la discriminación inequívoca entre especies con enlace éter y vinil éter. Atendiendo a este objetivo general, el plan de trabajo desarrollado ha consistido en:

- Optimizar las condiciones de reacción para la metanolisis selectiva de plasmalógenos en extractos lipídicos de muestras biológicas, explotando la labilidad en medio ácido del enlace vinil éter característica de estas especies.
- Aplicar la reacción de derivatización optimizada al estudio lipidómico de fosfolípidos de etanolamina en la línea celular macrofágica RAW 264.7 mediante HPLC-MS/MS, con especial énfasis en la distinción entre especies isoméricas plasmeniletanolamina (pPE) y plasmaniletanolamina (ePE)

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Cultivo celular

Medio BioWhittaker™ DMEM (4,5 g L-glucosa/L) sin L-glutamina (Lonza).

L-glutamina (Corning)

Penicilina (Gibco)

Estreptomicina (Gibco)

Suero fetal bovino (FBS) esterilizado (Gibco)

Frascos de cultivo celular (BD Biosciences)

Raspadores de células (BD Biosciences)

3.1.2. Material biológico

Células pertenecientes a la línea macrofágica RAW264.7 (ATCC TIB-71™) (American Type Culture Collection)

3.1.3. Disolventes y reactivos líquidos

Agua ultrapura Milli-Q® (Millipore)

Cloroformo, grado HPLC (Thermo Fisher)

Metanol, grado HPLC (Thermo Fisher)

Cloruro de hidrógeno en metanol (3N) (Supelco)

Hexano (mezcla de isómeros), grado HPLC (Sigma-Aldrich)

2-propanol, grado HPLC (Thermo Fisher)

Reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) (Bio-Rad)

3.1.4. Reactivos y productos sólidos

Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich)

Acetato de amonio (Sigma-Aldrich)

Yodo (Scharlau)

3.1.5. Lípidos

1,2-diheptadecanoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina (PE(17:0/17:0)) (Sigma-Aldrich)

1-(1Z-octadecenil)-2-oleil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina (PE(P-18:0/18:1)) (Avanti)

3.1.6. Equipamiento

3.1.6.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

Gradilla para fases móviles con desgasificador SRD-3200 (Thermo Fisher).

Inyector automático con compartimento de columna integrado UltiMate™ ACC-3000 (Thermo Fisher).

Bomba binaria UltiMate™ HPG-3400SD (Thermo Fisher).

Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo QTRAP 4500 (AB Sciex).

Fuente de iones Turbo V (AB Sciex).

Sonda de ionización por electrospray (ESI) TurboIonSpray (AB Sciex).

Columna Fortis HILIC FHI-030703 (150 mm x 3mm de diámetro interno, grosor de partícula: 3 µm) (Fortis Technologies).

Software de control y análisis de datos:

Analyst® 1.6.3 (AB Sciex)

Chromeleon™ Xpress 6.80 (Thermo Fisher)

MultiQuant 3.0.2 (AB Sciex)

3.1.6.2. Otros equipos

Homogeneizador ultrasónico de punta de inmersión directa Vibracell™ 75115 (Bioblock Scientific)

Espectrofotómetro BioPhotometer Plus, modelo 6132 (Eppendorf)

Concentrador centrífugo de vacío Concentrator 5301 (Eppendorf)

Cubetas para el desarrollo de placas de cromatografía en capa fina Fungicrom Separating Chambers (Fungilab)

Termobloque con agitador de plataforma ThermoMixer® C (Eppendorf)

3.1.6.3. Bases de datos y software

Bases de datos:

Bases de datos del consorcio Lipid MAPS (Lipid Metabolites and Pathways Strategy).

Base de datos de metabolitos del repositorio *Metabolomics Workbench*, elaborada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) en colaboración con el Centro de Supercomputación de la Universidad de California en San Diego (UCSD) (<https://www.metabolomicsworkbench.org/>).

Representación de gráficos:

OriginPro v. 10.1 (OriginLab)

SigmaPlot v. 11.0 (Systat Software)

Representación de estructuras químicas

ChemDraw v. 23.1 (Revvity Signals)

3.2. Métodos experimentales

3.2.1. Cultivo celular

Se escogió la línea celular macrofágica murina RAW264.7 como modelo biológico para la caracterización de glicerofosfolípidos de etanolamina. Dicha línea celular, establecida a partir de un tumor inducido en un ratón *BALB/c* macho por el virus de la leucemia murina de Abelson se emplea extensamente en el estudio de la actividad de mediadores de naturaleza lipídica involucrados en procesos inflamatorios (37, 38).

Las células se cultivaron en frascos de cultivo conteniendo 20 mL de medio DMEM suplementado con L-glutamina (2 mM), suero bovino fetal inactivado por choque térmico (10%, v/v), penicilina (100 IU/mL) y estreptomicina (100 µg/mL), que se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37 °C y atmósfera húmeda conteniendo un 5 % de CO₂.

Alcanzada una confluencia de aproximadamente un 80 % (cada 48 h) se procede al subcultivo. A tal efecto, las células adherentes se desprendieron mecánicamente de las paredes del recipiente mediante raspado, transfiriéndose a continuación el contenido íntegro del frasco a un tubo de fondo cónico, que se sometió a centrifugación durante 5 minutos y una fuerza centrífuga relativa de 250 g. Desechado el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en 1 mL de medio DMEM suplementado fresco, sembrándose finalmente 50 µL del resuspendido en un nuevo frasco conteniendo 20 mL del medio de cultivo, que se conservó en un incubador en las condiciones de temperatura y atmósfera anteriormente especificadas.

3.2.2. Cuantificación de proteína total en lisados celulares

La cuantificación de la proteína presente en muestras procedentes de cultivos celulares se llevó a cabo aplicando el método colorimétrico de Bradford (39), que se fundamenta en el desplazamiento batocrómico en la longitud de onda de absorción máxima (de 465 a 595 nm) que experimenta el Azul de Coomassie G-250 en medio ácido como resultado de la interacción no covalente con residuos aminoácidos básicos (Arg, His, Lys) e hidrofóbica con residuos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) (40).

Las células contenidas en un frasco de cultivo se desprendieron mecánicamente de las paredes mediante raspado una vez alcanzada una confluencia de aproximadamente el 80 %, tomándose una muestra de 10 µL de la suspensión para efectuar su conteo mediante microscopía óptica o, alternativamente, con un contador automático. El contenido íntegro del frasco se transfirió a un tubo de fondo cónico, que se centrifugó en idénticas condiciones a las empleadas en el proceso

de subcultivo. El precipitado celular resultante se lavó repetidamente con tampón fosfato salino (PBS) con objeto de eliminar el suero del medio de cultivo (ya que contiene lípidos que podrían interferir en el análisis) y se añadió a continuación un volumen suficiente de agua ultrapura para inducir la lisis celular por choque osmótico. El lisado así obtenido se sometió a homogeneización ultrasónica (3 pulsos de 15 segundos con una amplitud del 23 %), conservándose la muestra almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

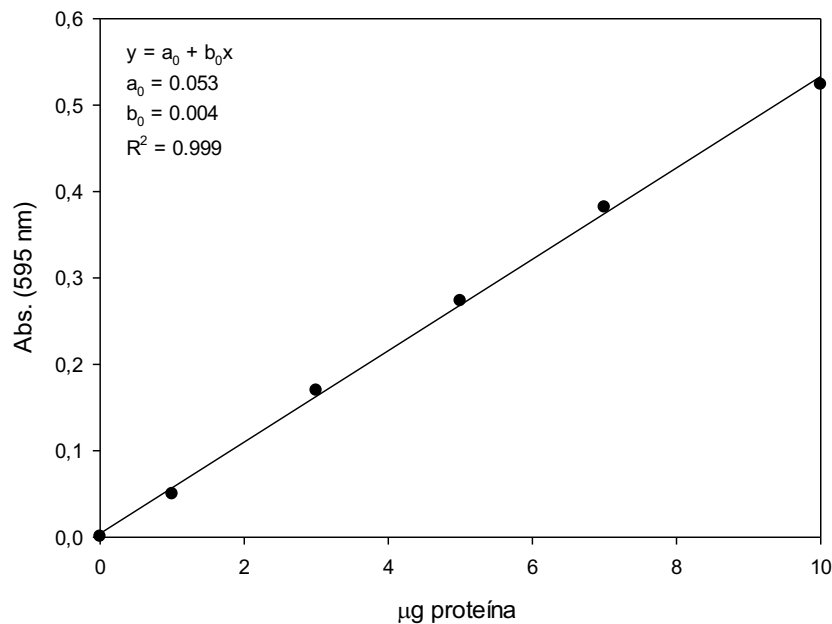


Figura 12.- Ejemplo de línea de calibrado para la aplicación del método de Bradford a la cuantificación de proteína en muestras de origen biológico. Se representa la absorbancia (Abs.), medida a 595 nm de disoluciones patrón con concentraciones conocidas de BSA.

La cuantificación de proteínas sobre la muestra cuya preparación acaba de describirse se efectuó aplicando el método del patrón externo. Para ello, se elaboró una línea de calibrado determinando mediante espectrofotometría de absorción molecular la absorbancia a 595 nm de disoluciones patrón conteniendo una cantidad conocida de albúmina de suero bovino (BSA) y un volumen fijo del reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay. La medición de la absorbancia en alícuotas del lisado celular conteniendo el mismo volumen de reactivo permite la determinación del contenido en proteína por interpolación lineal sobre la línea de calibrado (Figura 12).

3.2.3. Extracción de lípidos totales

Se adaptó el método descrito por Bligh y Dyer (41). Al medio acuoso conteniendo el lisado celular homogeneizado se añadieron 3,75 volúmenes (con respecto al volumen inicial) de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2, v/v) y, tras agitar vigorosamente, 1,25 volúmenes de H_2O y 1,25 volúmenes de CHCl_3 . El medio bifásico resultante, de composición relativa en volumen 1:1:0,9

(MeOH:CHCl₃:H₂O), se agitó y centrifugó a 15 °C durante 5 minutos y una fuerza centrífuga relativa de 9300 g. Tras retirar la fase clorofórmica inferior, se efectuó una segunda extracción añadiendo 2 volúmenes de CHCl₃ y procediendo en forma idéntica. El volumen combinado de sendas fases orgánicas, conteniendo el extracto lipídico, se evaporó mediante centrifugación a vacío, almacenándose el residuo seco a -20 °C para su análisis posterior.

3.2.4. Análisis de fosfolípidos de etanolamina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

La determinación semicuantitativa de especies de fosfatidiletanolamina se efectuó mediante HPLC-MS/MS. Con respecto a la etapa cromatográfica, se adaptó el método en fase normal desarrollado por Axelsen y Murphy (24), apto para la separación de glicerofosfolípidos en sus diversas subclases (PG, PI, PE, PA, PS y PC) en función de la polaridad de los grupos de cabeza.

El extracto lipídico seco, equivalente a 75 µg de proteína (determinada mediante el método de Bradford) se redisolvió en 100 µL de fase móvil A, constituida por una mezcla de isómeros de hexano y 2-propanol en una proporción de 30:40 (v/v), añadiéndose a continuación 100 pmol de 1,2-diheptadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PE(17:0/17:0)), especie no presente en la muestra problema, como patrón interno con el fin de corregir la variabilidad de la eficacia de la ionización.

Se inyectaron 10 µL de la muestra en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher), equipado con un inyector automático UltiMate ACC-3000 (Thermo Fisher), una bomba binaria UltiMate HPG-3400 (Thermo Fisher) y una columna Fortis HILIC FHI-030703 (150 mm de longitud x 3 mm de diámetro interno y 3 µm de diámetro de partícula de fase estacionaria) (Fortis Technologies) termostatada a 30 °C.

La fase móvil consiste en una mezcla de los disolventes “A” (isómeros de hexano /2-propanol, 30:40, v/v) y “B” (isómeros de hexano/2-propanol/acetato de amonio en H₂O (20 mM), 30:40:7, v/v/v) en régimen de elución en gradiente.

Durante la carrera cromatográfica, de 55 minutos de duración, el flujo de fase móvil se estableció constante en 400 µL/min. El gradiente comenzó con una proporción relativa de A del 75 % durante los primeros 5 minutos tras la inyección, disminuyendo linealmente hasta el 40 % en el intervalo de tiempo comprendido entre 5 y 15 minutos. Durante los 5 minutos siguientes, la proporción de A se reduce hasta el 5 %, manteniéndose dicha composición hasta los 40 minutos.

de carrera, momento en el que se incrementa hasta el 75 % en un período de 1 minuto, recuperándose la composición inicial, que se mantuvo durante 14 minutos adicionales con objeto de equilibrar la columna previamente a una nueva inyección de muestra.

El eluyente cromatográfico se transfirió a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex 4500, equipado en la interfase de acoplamiento con una sonda de ionización por electrospray TurboIonSpray instalada en una fuente de iones Turbo V (ambos comercializados por AB Sciex) configurándose el instrumento para operar en el modo de ionización negativo. Los parámetros de la fuente de ionización optimizados para el análisis de glicerofosfolípidos, así como los correspondientes al analizador de triple cuadrupolo en función de la clase de analito se exponen en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Parámetro	Valor óptimo
Presión del gas de nebulización (GS1)	50 psi
Presión del gas de desolvatación (GS2)	60 psi
Presión del gas de cortina (CUR)	30 psi
Voltaje aplicado a la sonda ESI (IS)	-4500 V
Temperatura de desolvatación (TEM)	425 °C

Tabla 1.-Parámetros de la fuente de ionización por electrospray optimizados para el análisis de glicerofosfolípidos.

Clase de analito	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)
PE, pPE y ePE	-40	-40	-10	-8
LPE	-100	-30	-10	-8

Tabla 2.- Potenciales óptimos del analizador de triple cuadrupolo para el análisis de glicerofosfolípidos de etanolamina. PE: especies de fosfatidiletanolamina, pPE: especies de plasmaniletanolamina, ePE: especies de plasmaniletanolamina y LPE: especies de lisofosfatidiletanolamina. DP: Declustering Potential (potencial de desagrupación), CE: Collision Energy (energía de colisión), EP: Entrance Potential (potencial de entrada a la celda de colisión), CXP: Collision Cell Exit Potential (potencial de salida de la celda de colisión).

Los analitos de interés, clasificados en cuatro categorías, a saber: especies de fosfatidiletanolamina (PE) (Tabla 3), de plasmaniletanolamina (ePE) derivadas de alcoholes grasos saturados y no interferidas isobáricamente con plasmalógenos (Tabla 4), de plasmeniletanolamina o plasmalógenos (pPE), lábiles en medio ácido y potencialmente interferidas con derivados de plasmaniletanolamina con una insaturación adicional en la cadena alquílica (Tabla 5) y especies de lisofosfatidiletanolamina (LPE) (Tabla 6) se detectaron empleando el modo de adquisición MRM (Monitorización de Reacción Múltiple). Atendiendo a criterios de carácter bioquímico se omitieron del análisis especies minoritarias, tales como aquellas que contienen en su estructura ácidos grasos con un número de átomos de carbono impar o superior a 22. Asimismo, la

ejecución de análisis preliminares, cuyos resultados no se exponen en este trabajo, derivó en la exclusión de diversos analitos considerados *a priori* cuya concentración en los extractos lipídicos de la línea RAW264.7 resultó ser inferior al límite de detección instrumental.

Para cada analito, la transición empleada para la cuantificación es la pareja de masas monoisotópicas correspondientes al ion precursor $[M-H]^-$ y al carboxilato producto de la fragmentación inducida por colisión.

Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃	Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃
PE(16:0/16:0)	690,5	255,2	PE(18:0/18:2)	742,5	279,2
PE(16:0/16:1)	688,5	253,2	PE(18:0/20:3)	768,5	305,2
PE(16:0/18:0)	718,5	283,2	PE(18:0/20:4)	766,5	303,2
PE(16:0/18:1)	716,5	281,2	PE(18:0/20:5)	764,5	301,2
PE(16:0/18:2)	714,5	279,2	PE(18:0/22:4)	794,5	331,2
PE(16:0/20:3)	740,5	305,2	PE(18:0/22:5)	792,5	329,2
PE(16:0/20:4)	738,5	303,2	PE(18:0/22:6)	790,5	327,2
PE(16:0/22:4)	766,5	331,2	PE(18:1/18:1)	742,5	281,2
PE(16:0/22:5)	764,5	329,2	PE(18:1/18:2)	740,5	279,2
PE(16:0/22:6)	762,5	327,2	PE(18:1/20:3)	766,5	305,2
PE(16:1/18:0)	716,5	283,2	PE(18:1/20:4)	764,5	303,2
PE(16:1/20:4)	736,5	303,2	PE(18:1/22:4)	792,5	331,2
PE(18:0/18:0)	746,5	283,2	PE(18:1/22:5)	790,5	329,2
PE(18:0/18:1)	744,5	281,2	PE(18:1/22:6)	788,5	327,2

Tabla 3.- Relación de transiciones MRM (Multiple Reaction Monitoring) de las especies de fosfatidiletanolamina (PE) analizadas en RAW264.7.

Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃	Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃
PE(O-16:0/16:0)	676,5	255,2	PE(O-18:0/16:0)	704,5	255,2
PE(O-16:0/16:1)	674,5	253,2	PE(O-18:0/16:1)	702,5	253,2
PE(O-16:0/18:0)	704,5	283,2	PE(O-18:0/18:0)	732,5	283,2
PE(O-16:0/18:1)	702,5	281,2	PE(O-18:0/18:1)	730,5	281,2
PE(O-16:0/20:1)	730,5	309,2	PE(O-18:0/18:2)	728,5	279,2
PE(O-16:0/20:3)	726,5	305,2	PE(O-18:0/20:3)	754,5	305,2
PE(O-16:0/20:4)	724,5	303,2	PE(O-18:0/20:4)	752,5	303,2
PE(O-16:0/20:5)	722,5	301,2	PE(O-18:0/20:5)	750,5	301,2
PE(O-16:0/22:4)	752,5	331,2	PE(O-18:0/22:4)	780,5	331,2
PE(O-16:0/22:5)	750,5	329,2	PE(O-18:0/22:5)	778,5	329,2
PE(O-16:0/22:6)	748,5	327,2	PE(O-18:0/22:6)	776,5	327,2

Tabla 4.- Relación de transiciones MRM (Multiple Reaction Monitoring) de las especies de plasmaniletanolamina (ePE) derivadas de los alcoholes palmítico (16:0) y esteárico (18:0), no interferidas isobáricamente con plasmalógenos analizadas en RAW264.7.

Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃	Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃
PE(P-16:0/16:0) / PE(O-16:1/16:0)	674,5	255,2	PE(P-18:0/20:3) / PE(O-18:1/20:3)	752,5	305,2
PE(P-16:0/16:1) / PE(O-16:1/16:1)	672,5	253,2	PE(P-18:0/20:4) / PE(O-18:1/20:4)	750,5	303,2
PE(P-16:0/18:0) / PE(O-16:1/18:0)	702,5	283,2	PE(P-18:0/20:5) / PE(O-18:1/20:5)	748,5	301,2
PE(P-16:0/18:1) / PE(O-16:1/18:1)	700,5	281,2	PE(P-18:0/22:4) / PE(O-18:1/22:4)	778,5	331,2
PE(P-16:0/18:2) / PE(O-16:1/18:2)	698,5	279,2	PE(P-18:0/22:5) / PE(O-18:1/22:5)	776,5	329,2
PE(P-16:0/20:1) / PE(O-16:1/20:1)	728,5	309,2	PE(P-18:0/22:6) / PE(O-18:1/22:6)	774,5	327,2
PE(P-16:0/20:3) / PE(O-16:1/20:3)	724,5	305,2	PE(P-18:1/16:0) / PE(O-18:2/16:0)	700,5	255,2
PE(P-16:0/20:4) / PE(O-16:1/20:4)	722,5	303,2	PE(P-18:1/16:1) / PE(O-18:2/16:1)	698,5	253,2
PE(P-16:0/20:5) / PE(O-16:1/20:5)	720,5	301,2	PE(P-18:1/18:1) / PE(O-18:2/18:1)	726,5	281,2
PE(P-16:0/22:4) / PE(O-16:1/22:4)	750,5	331,2	PE(P-18:1/20:3) / PE(O-18:2/20:3)	750,5	305,2
PE(P-16:0/22:5) / PE(O-16:1/22:5)	748,5	329,2	PE(P-18:1/20:4) / PE(O-18:2/20:4)	748,5	303,2
PE(P-16:0/22:6) / PE(O-16:1/22:6)	746,5	327,2	PE(P-18:1/20:5) / PE(O-18:2/20:5)	746,5	301,2
PE(P-18:0/16:0) / PE(O-18:1/16:0)	702,5	255,2	PE(P-18:1/22:4) / PE(O-18:2/22:4)	776,5	331,2
PE(P-18:0/16:1) / PE(O-18:1/16:1)	700,5	253,2	PE(P-18:1/22:5) / PE(O-18:2/22:5)	774,5	329,2
PE(P-18:0/18:1) / PE(O-18:1/18:1)	728,5	281,2	PE(P-18:1/22:6) / PE(O-18:2/22:6)	772,5	327,2
PE(P-18:0/18:2) / PE(O-18:1/18:2)	726,5	279,2			

Tabla 5.- Relación de transiciones MRM (Multiple Reaction Monitoring) de especies de plasmaniletanolamina (pPE) interferidas isobáricamente con especies de plasmaniletanolamina (ePE) con una insaturación adicional en la cadena O-alquílica analizadas en RAW264.7.

Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃	Especie	m/z Q ₁	m/z Q ₃
LPE(16:0)	452,3	255,2	LPE(20:4)	500,3	303,2
LPE(16:1)	450,3	253,2	LPE(20:5)	498,3	301,2
LPE(18:0)	480,3	283,2	LPE(22:4)	528,3	331,2
LPE(18:1)	478,3	281,2	LPE(22:5)	526,3	329,2
LPE(20:1)	506,3	309,2	LPE(22:6)	524,3	327,2
LPE(20:3)	502,3	305,2			

Tabla 6.- Relación de transiciones MRM (Multiple Reaction Monitoring) de las especies de lisofosfatidiletanolamina (LPE) analizadas en RAW264.7.

La cuantificación se efectuó por integración del área de pico en el cromatograma de ion extraído (XIC) correspondiente a la transición de cada una de las especies moleculares empleando el *software* MultiQuant 3.0.2 (AB Sciex) y refiriéndola al área de pico del patrón interno.

La cuantificación de los plasmalógenos (pPE) interferidos con especies de plasmaniletanolamina (ePE) se efectuó analizando por triplicado y en condiciones de repetibilidad una muestra control y otra expuesta a medio ácido (cloruro de hidrógeno en metanol). La optimización de los parámetros de la reacción (concentración de ácido, tiempo y temperatura) se discute en el apartado de Resultados, como parte del trabajo experimental. Siempre y cuando el rendimiento

de la reacción de derivatización se demuestre cuantitativo, la señal remanente de una transición interferida registrada en la muestra tratada puede atribuirse exclusivamente a una especie de ePE isómera estable en medio ácido. El área de pico corregida del plasmalógeno interferido (A_{pPE}) puede entonces calcularse como la diferencia entre las áreas de pico relativas al patrón interno, determinadas en el cromatograma de ion extraído de la transición común a ambas especies:

$$A_{pPE} (\%) = \left(\frac{A_{ctrl}}{A_{ctrl,PI}} - \frac{A_{HCl}}{A_{HCl,PI}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Siendo A_{ctrl} y $A_{ctrl,PI}$, respectivamente, las áreas integradas sobre el cromatograma de ion extraído de la transición interferida y el patrón interno en la muestra control y A_{HCl} y $A_{HCl,PI}$ las áreas análogas evaluadas en los cromatogramas de las muestras tratadas con ácido.

4.Resultados

4.1. Optimización de las condiciones de metanolisis ácida de plasmalógenos

La primera fase del trabajo experimental consistió en la optimización de las condiciones de metanolisis de plasmalógenos en medio ácido. El objetivo fue determinar aquellas que proporcionen una reacción cuantitativa, quimioselectiva y, deseablemente, rápida. Como punto de partida, se decidió emplear mezclas de cloroformo y cloruro de hidrógeno en metanol (3M) como medio de reacción, siendo los parámetros a optimizar el tiempo y temperatura de reacción y la concentración de ácido.

4.1.1. Optimización de la concentración de ácido y tiempo de reacción

En una serie de ensayos preliminares se evaluó cualitativamente la conversión en función del tiempo de reacción de una especie de plasmeniletanolamina. Para ello, se analizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) la masa de reacción resultante de tratar, a diversos tiempos comprendidos entre 1 y 30 minutos, temperatura ambiente y bajo agitación orbital, 20 nmol de un estándar de 1-(1Z-octadecenil)-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PE(P-18:0/18:1)) con un medio de reacción conteniendo una concentración de cloruro de hidrógeno de 0,2 M. La fase móvil consistió en una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ (28 %) (60:38:4, v/v/v).

En la placa cromatográfica revelada en yodo (Figura 13) se detectó, por comparación directa de la distancia de migración con la del patrón puro (carril denotado como “P” en la figura), plasmalógeno sin reaccionar en los tiempos comprendidos entre 1 y 20 minutos. Las bandas intensas observadas en todos los productos de reacción se asignaron a la lisofosfatidiletanolamina LPE(18:1), producto de la reacción de metanolisis, atribuyéndose su menor factor de retraso (R_f) con respecto al plasmalógeno a su mayor polaridad. A pesar de no detectarse reactivo de partida en TLC una vez alcanzados los 30 minutos de reacción, un análisis adicional del producto de reacción mediante HPLC-MS/MS (no mostrado), demostró que la reacción distaba de ser cuantitativa, lo que hizo necesario una posterior optimización. Se decidió aumentar la concentración de ácido a 0,5 M manteniendo en 30 minutos el tiempo de reacción.

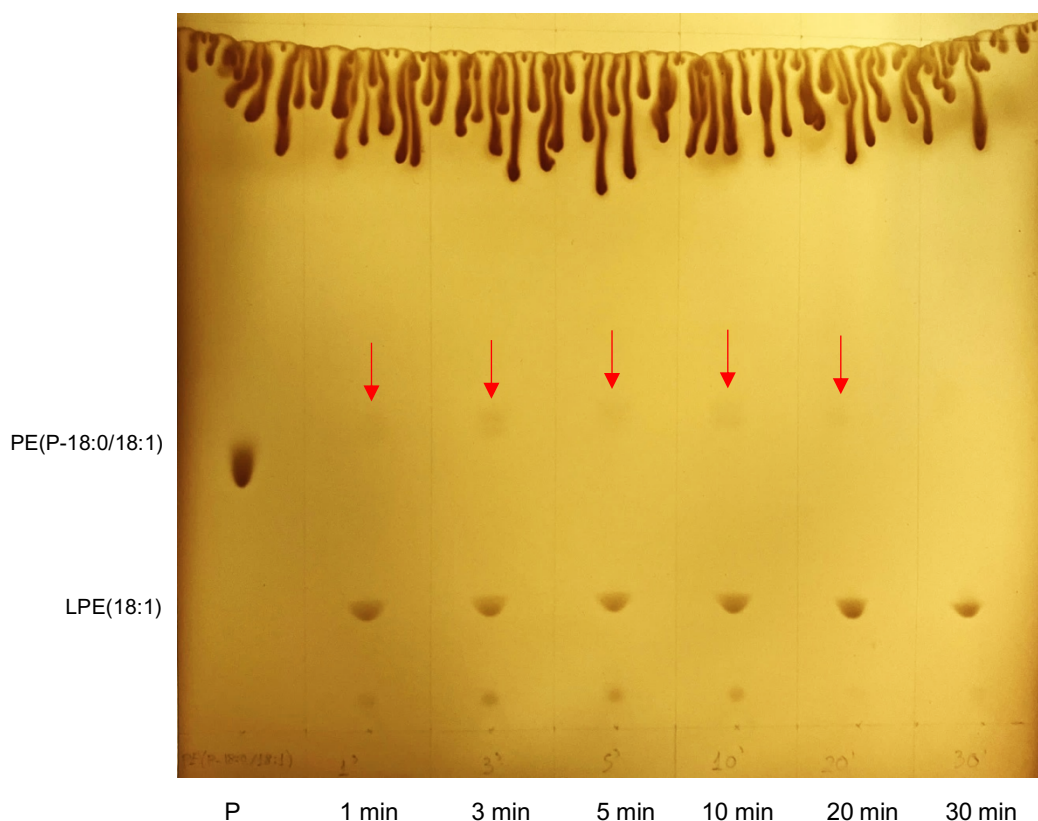


Figura 13.- Análisis por cromatografía en capa fina de un estándar del plasmalógeno PE(P-18:0/18:1), empleado como patrón (carril “P”) y de las masas de reacción, a diversos tiempos, obtenidas tras su metanolisis ácida. La desaparición total del producto de partida no se aprecia hasta los 30 minutos de reacción, detectándose plasmalógeno no reaccionado a tiempos inferiores (indicado con flechas).

La masa de reacción resultante de tratar el estándar en las nuevas condiciones y una muestra control se analizaron mediante HPLC-MS/MS, determinándose las especies PE(P-18:0/18:1) y LPE(18:1). En los cromatogramas resultantes de sendos análisis, representados conjuntamente en la Figura 14, puede apreciarse la disminución del pico cromatográfico correspondiente al plasmalógeno (identificado a un tiempo de retención de 17 min) y un incremento recíproco de la concentración de la lisofosfatidiletanolamina LPE(18:1). Esta última especie aparece en el cromatograma a un tiempo de retención superior como dos picos (tiempos de retención de 22,5 y 23,3 min), no totalmente resueltos, observación que puede atribuirse a la coexistencia de dos isómeros posicionales que difieren en la posición del esqueleto de glicerol al que se encuentra esterificado el ácido graso (*sn*-1 o *sn*-2) y que se encuentran en equilibrio por migración intramolecular del grupo acilo (42–45).

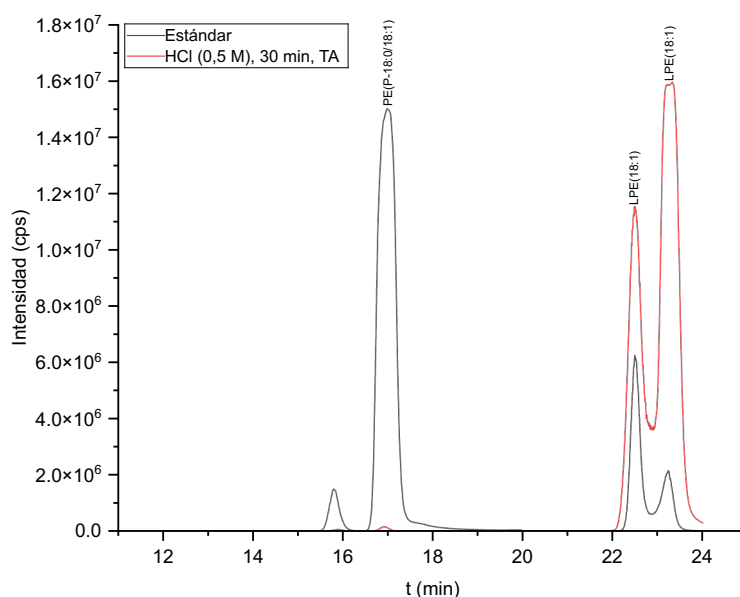


Figura 14- Análisis mediante HPLC-MS/MS de un estándar de PE(P-18:0/18:1) (cromatograma denotado como “Estándar”) y la masa de reacción resultante de tratar dicho plasmalógeno con un medio de reacción conteniendo una concentración de HCl de 0,5 M (cromatograma “HCl”). Se superponen los cromatogramas de ion extraído correspondientes a las transiciones de cuantificación del estándar y la lisofosfatidiletanolamina LPE(18:1) producto de la reacción. Obsérvese la desaparición del plasmalógeno (t_r 17 min) y el incremento de la señal de los picos correspondientes a los dos isómeros posicionales del producto (t_r 22,5 y 23,3 min).

Se estimó una conversión del plasmalógeno del 99,6 %, que se consideró satisfactoria.

4.1.2. Evaluación de la quimioselectividad de la reacción

Para que las condiciones de reacción anteriormente optimizadas sean trasladables al análisis de muestras biológicas, debe garantizarse la quimioselectividad hacia el grupo vinil éter característico de los plasmalógenos. En particular, se valoró la estabilidad de los enlaces éster, susceptibles a la transesterificación en las condiciones de reacción, en función de la concentración de ácido. Para ello, se determinó mediante HPLC-MS/MS el contenido total en especies mayoritarias de fosfatidiletanolamina (carentes de enlace vinil éter) en un extracto lipídico de la línea RAW 264.7, comparándose con el determinado en muestras sometidas a metanolisis con diversas concentraciones de cloruro de hidrógeno (0,5, 1 y 2 M).

De los resultados del análisis (Figura 15) se infiere que la estabilidad de las especies de fosfatidiletanolamina puede garantizarse únicamente con la menor de las concentraciones de ácido ensayadas (0,5 M), no observándose diferencias en el contenido total con respecto a la muestra

Resultados

control. Concentraciones de ácido superiores (1 M y 2 M) conducen a su degradación, lo que compromete significativamente la selectividad de la reacción.

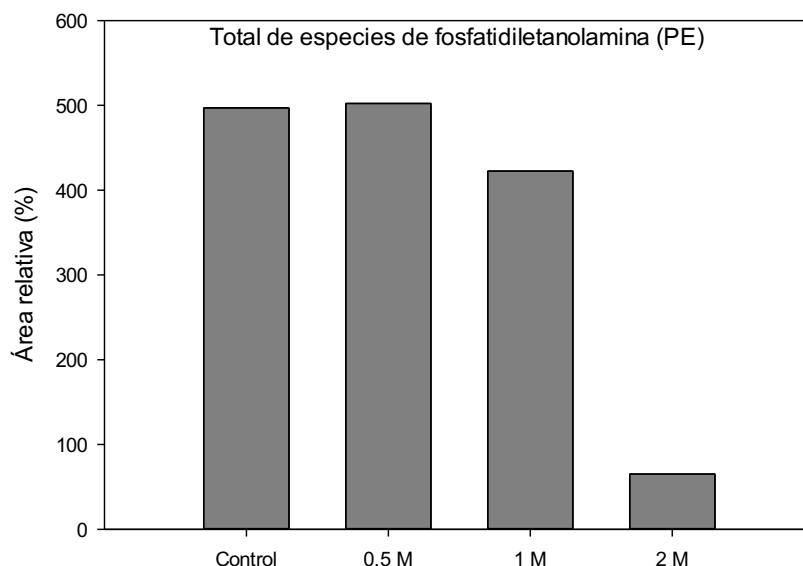


Figura 15.- Análisis mediante HPLC-MS/MS del contenido total en especies de fosfatidiletanolamina (PE) en extractos lipídicos de RAW264.7 tratados con medios de reacción conteniendo diversas concentraciones de cloruro de hidrógeno y comparación con una muestra control. Concentraciones de ácido superiores 0,5 M inducen la degradación de estas especies por transesterificación sobre el enlace éster, perdiéndose la quimioselectividad hacia la metanolisis del enlace vinil éter de los plasmalógenos. Se representan las áreas de pico relativas a la del estándar interno de un único experimento.

Atendiendo a los resultados de los experimentos anteriores, se concluyó que una concentración de cloruro de hidrógeno de 0,5 M (tiempo de reacción de 30 minutos a temperatura ambiente) es suficiente para lograr la metanolisis del enlace vinil éter de los plasmalógenos sin afectar a los enlaces de tipo éster.

4.2. Análisis de fosfolípidos de etanolamina con enlace éter y vinil-éter en la línea celular macrofágica RAW264.7

El método de derivatización optimizado se aplicó al análisis mediante HPLC-MS/MS de glicerofosfolípidos de etanolamina contenidos en extractos lipídicos procedentes de la línea celular macrofágica RAW264.7, haciendo especial énfasis en la caracterización de las especies moleculares de pPE y ePE. Se exponen a continuación los resultados de un experimento representativo analizado por triplicado.

Con respecto al perfil de especies de fosfatidiletanolamina (PE) (Figura 16), predominan aquellas especies moleculares que contienen ácido oleico (18:1) esterificado. Esta observación es consistente con el hecho de que este ácido graso es el más abundante y disponible en la línea celular RAW 264.7 (46).

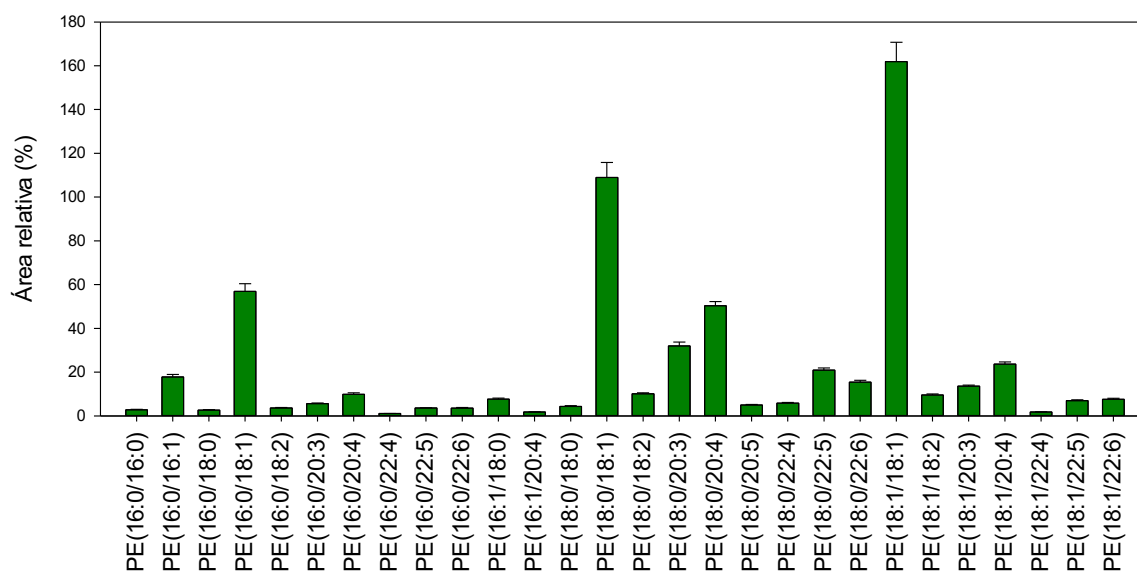


Figura 16.- Perfil de especies moleculares de fosfatidiletanolamina (PE) de un extracto lipídico de la línea celular RAW264.7. Los datos se representan como el promedio $\pm$ SEM del área de pico relativa (en tanto por ciento) con respecto a un estándar interno de un experimento analizado por triplicado.

En la determinación de plasmalógenos se consideraron las posibles interferencias ocasionadas por especies de ePE isóbaras no resueltas cromatográficamente. La desaparición de la señal analítica tras el tratamiento ácido en los cromatogramas de transiciones comunes a isómeros de pPE y ePE (listadas en la Tabla 5) permitió la identificación de los plasmalógenos. Cuando la pérdida de señal no es completa, el pico remanente se atribuyó a la especie interferente de ePE, estable en las condiciones de reacción.

Se ilustran en la Figura 17 dos cromatogramas representativos: el área del pico cromatográfico correspondiente a la transición característica de las especies moleculares isobáricas PE(P-18:0/20:5) y PE(O-18:1/20:5) experimenta una notable disminución tras el tratamiento ácido, lo que permite confirmar la presencia del plasmalógeno PE(P-18:0/20:5) en el extracto lipídico (Figura 17-A). El pico que persiste tras la metanolisis se asigna a la especie de plasmaniletanolamina PE(O-18:1/20:5), que interfiere en la determinación de la anterior. En el caso de la pareja

Resultados

de isómeros PE(P-16:0/22:6) y PE(O-16:1/22:6) la desaparición de la señal hasta un nivel indistinguible del ruido instrumental demuestra que el pico cromatográfico registrado en la muestra control corresponde íntegramente al plasmalógeno PE(P-16:0/22:6), siendo la concentración del hipotético interferente PE(O-16:1/22:6) inferior al límite de detección de la técnica (Figura 17-B).

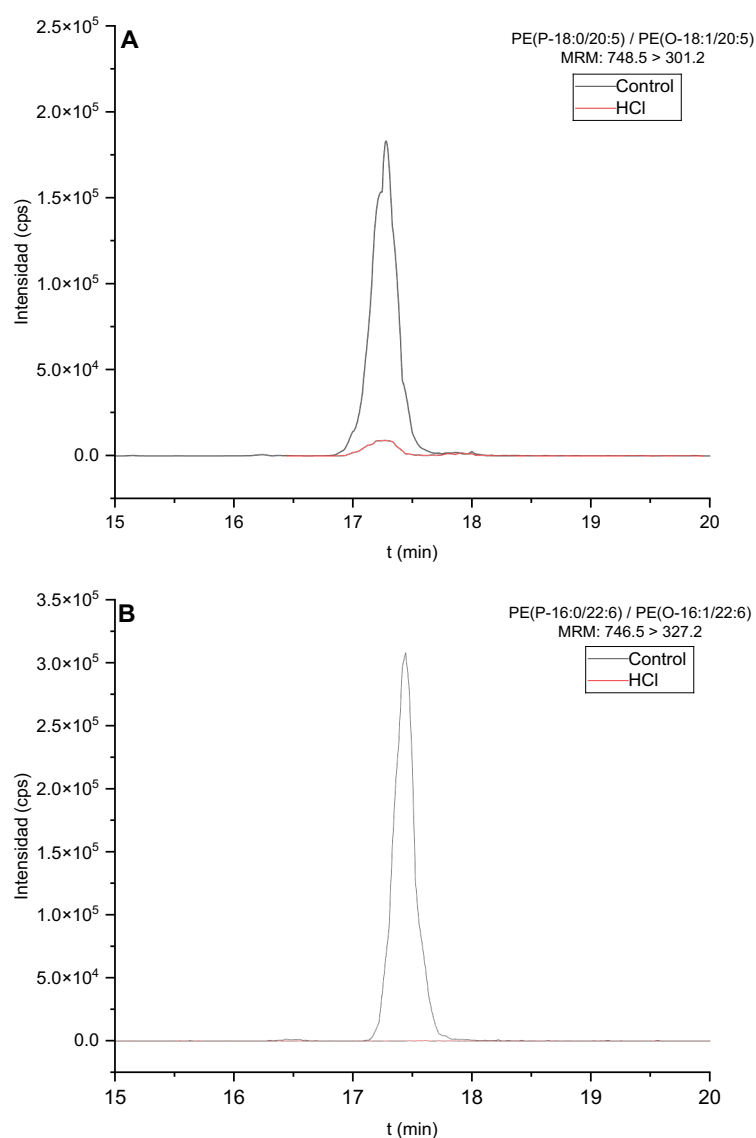


Figura 17.- Cromatogramas de ion extraído de las transiciones correspondientes a las parejas de analitos interferentes PE(P-18:0/20:5) / PE(O-18:1/20:5)(A) y PE(P-16:0/22:6) / PE(O-16:1/22:6) (B) analizados mediante HPLC-MS/MS en muestras control y sometidas a tratamiento ácido (representados en negro y rojo, respectivamente). La desaparición parcial (A) o total (B) de la señal analítica responde a la presencia de especies de plasmeniletanolamina lábiles en las condiciones de reacción. El pico cromatográfico remanente tras la metanolisis en el cromatograma (A) se asigna a la especie interferente de plasmaniletanolamina, estable en medio ácido.

En términos generales, las únicas interferencias significativas se observaron entre especies de pPE derivadas del alcohol esteárico (P-18:0) y de ePE con alcohol oleico (O-18:1) en la cadena *sn-1*, pudiendo detectarse y cuantificarse estas últimas en las muestras expuestas al tratamiento ácido. Se determinó la contribución relativa de cada isómero a la señal analítica (Tabla 7) de la muestra control, observándose que corresponde, mayoritariamente, a la especie de pPE. El mayor grado de interferencia aparece entre especies que contienen ácidos grasos saturados o monoinsaturados, mientras que en el caso de los poliinsaturados la contribución del isómero de ePE es minoritaria.

	pPE	ePE
PE(P-18:0/16:0) / PE(O-18:1/16:0)	60%	40%
PE(P-18:0/16:1) / PE(O-18:1/16:1)	83%	17%
PE(P-18:0/18:1) / PE(O-18:1/18:1)	85%	15%
PE(P-18:0/18:2) / PE(O-18:1/18:2)	88%	12%
PE(P-18:0/20:3) / PE(O-18:1/20:3)	95%	5%
PE(P-18:0/20:4) / PE(O-18:1/20:4)	96%	4%
PE(P-18:0/20:5) / PE(O-18:1/20:5)	96%	4%
PE(P-18:0/22:4) / PE(O-18:1/22:4)	93%	7%
PE(P-18:0/22:5) / PE(O-18:1/22:5)	93%	7%
PE(P-18:0/22:6) / PE(O-18:1/22:6)	96%	4%

Tabla 7.-Contribución relativa, en porcentaje, de cada especie de las parejas de isómeros P-18:0 y O-18:1 a la señal analítica interferida. pPE: especie de plasmeniletanolamina. ePE: especie de plasmaniletanolamina.

El perfil de las especies moleculares de pPE, calculado corrigiendo las áreas relativas de las especies interferidas (Ec. 1) se muestra en la 18-A. Atendiendo al grado de insaturación de los ácidos grasos esterificados en la posición *sn-2* (Figuras 18-B y 18-C), cabe destacar la mayor abundancia relativa de aquellos poliinsaturados (PUFAs), que representan el 58 % del contenido celular en plasmalógenos de etanolamina, predominando el ácido araquidónico (20:4), en consonancia con los resultados publicados previamente por el grupo de investigación (38). Los monoinsaturados (MUFAs), de entre los que sobresale nuevamente el oleico, constituyen un 34 %. Los plasmalógenos conteniendo ácidos grasos saturados (SFAs) resultaron comparativamente minoritarios.

Resultados

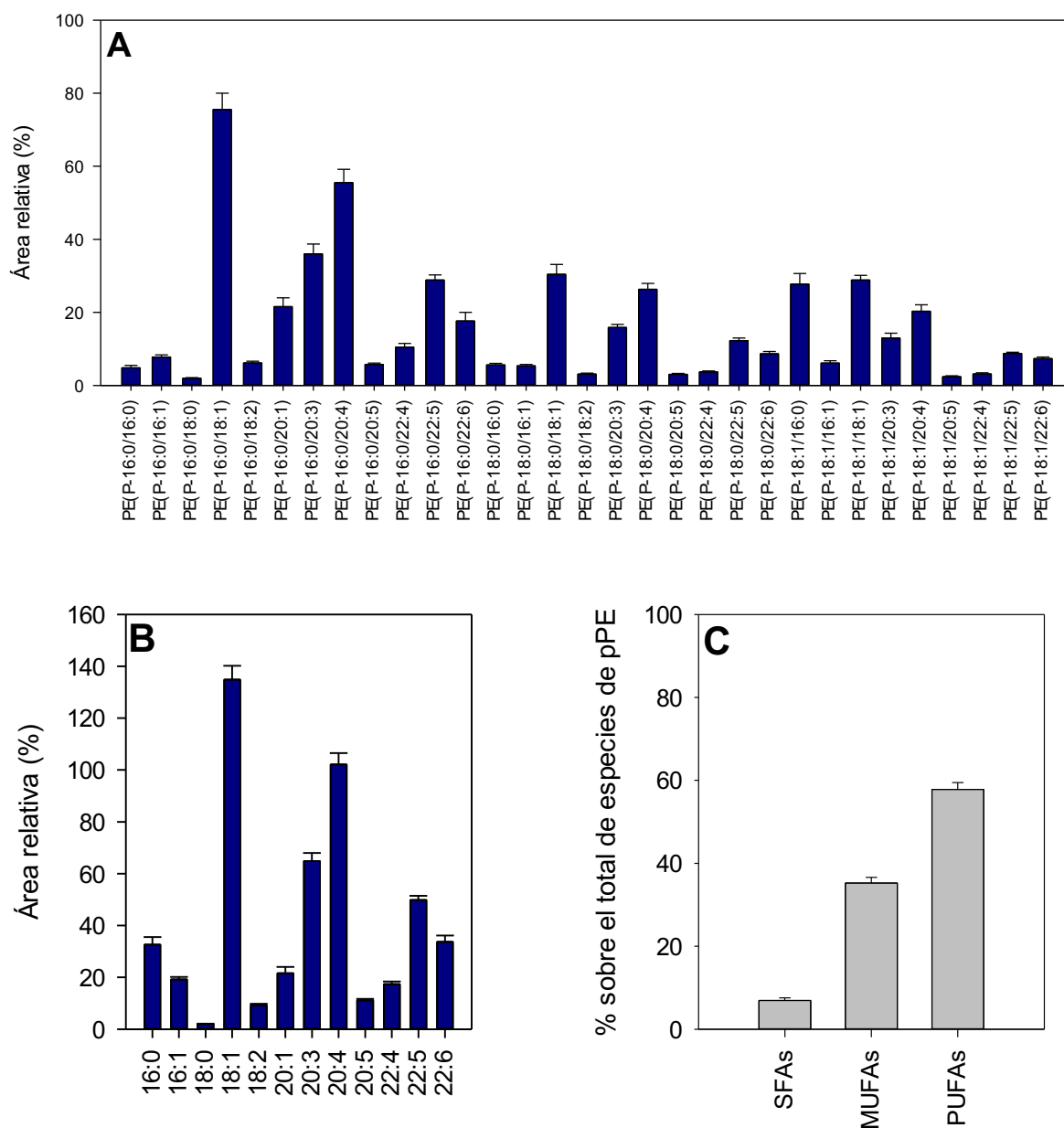


Figura 18.- (A): perfil de especies de plasmeniletanolamina cuantificadas en un extracto lipídico de la línea RAW264.7. (B) Composición de las especies de plasmeniletanolamina en función del ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 y (C) composición relativa sobre el total de especies de plasmeniletanolamina atendiendo al grado de insaturación de la cadena acílica. Los datos se representan como el promedio $\pm$ SEM del área de pico relativa (en tanto por ciento) correspondiente a cada metabolito con respecto a un estándar interno de un experimento analizado por triplicado.

El perfil de especies moleculares de plasmaniletanolamina (ePE) se presenta en la 19-A e incluye los analitos no interferidos contemplados en la Tabla 4, así como las especies moleculares O-18:1 interferidas con plasmalógenos P-18:0, cuya estrategia de cuantificación se expuso anteriormente. La diferencia más llamativa con respecto al perfil de especies de pPE es la menor abundancia relativa de especies con ácidos grasos poliinsaturados (Figuras 19-B y 19-C).

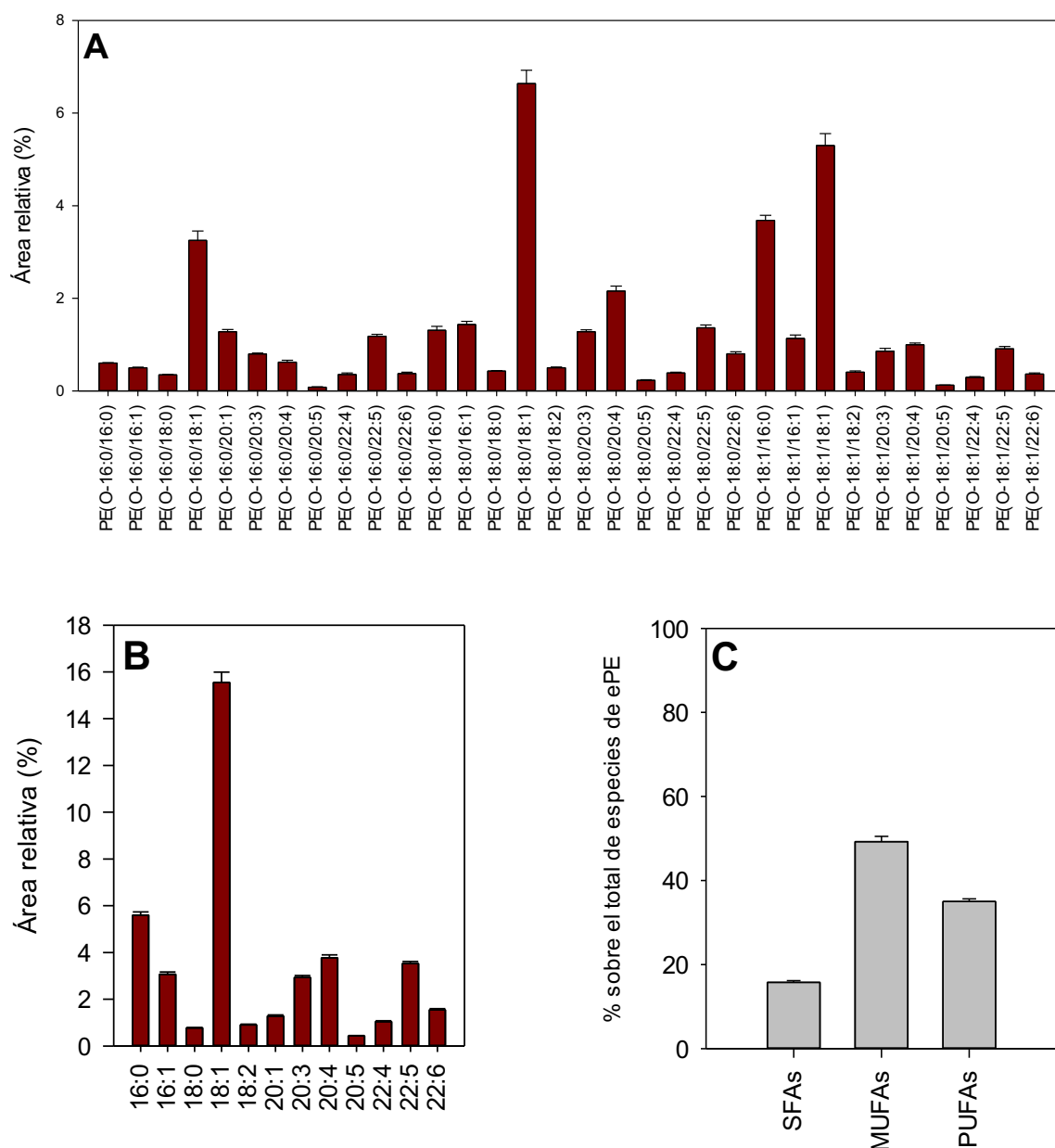


Figura 19.- (A): perfil de especies de plasmaniletanolamina (ePE) cuantificadas en un extracto lipídico de la línea RAW264.7. (B) Composición de las especies de ePE en función del ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 y (C) composición relativa sobre el total de especies de plasmaniletanolamina atendiendo al grado de insaturación de la cadena acílica. Los datos se representan como el promedio $\pm$ SEM del área de pico relativa (en tanto por ciento) correspondiente a cada metabolito con respecto a un estándar interno de un experimento analizado por triplicado.

Como análisis complementario, se determinaron las especies de lisofosfatidiletanolamina (LPE), productos de la reacción de metanolisis de plasmalógenos. En la comparación de los perfiles de muestras control y tratadas en medio ácido (Figura 20) se observa un aumento de la concentración de estas especies en la segunda condición proporcional a la abundancia relativa de los plasmalógenos precursores en la muestra. El perfil de abundancias relativas de LPE en la muestra tratada es muy semejante a la distribución de las especies de pPE (Figura 18-B) en función del ácido graso esterificado en *sn*-2.

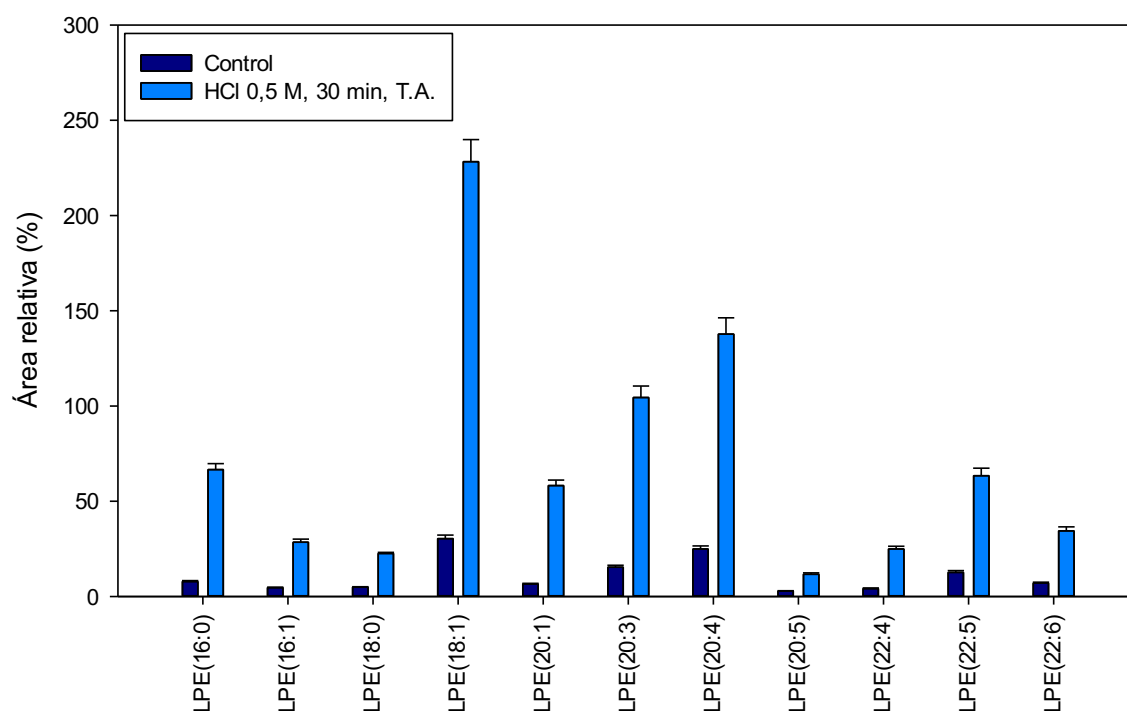


Figura 20.- Perfil de especies moleculares de lisofosfatidiletanolamina (LPE) de un extracto lipídico de la línea celular RAW264.7 cuantificadas en muestras control y sometidas a tratamiento en medio ácido. Los datos se representan como el promedio $\pm$ SEM del área de pico relativa (en tanto por ciento) correspondiente a cada metabolito con respecto a un estándar interno de un experimento analizado por triplicado.

Con respecto a la composición relativa de la fracción de fosfolípidos de etanolamina, se estimó que las especies de PE y pPE suponen, respectivamente, un 56,8 % y un 40,0 % del total. Las especies de ePE son comparativamente minoritarias, representando únicamente un 3,2 % (Tabla 8). Estos resultados se comparan favorablemente con los publicados previamente por Zoeller *et al.* empleando una técnica analítica diferente (HPLC-UV/Vis)(47), lo que refuerza la validez de los resultados obtenidos en este trabajo.

Resultados

	PE	ePE	pPE
Este trabajo	56.8 %	3,2 %	40,0 %
<i>lit.</i> (47)	61,1 %	2,8 %	36,1 %

Tabla 8.- Composición relativa de especies de PE, ePE y pPE con respecto al total de fosfolípidos de etanolamina en la línea celular RAW 264.7. Se comparan los resultados de este trabajo, determinados mediante HPLC-MS con los obtenidos por Zoeller *et al.* utilizando una técnica analítica diferente (HPLC-UV/Vis).

5. Conclusiones

1. Se han optimizado las condiciones para la metanolisis catalizada por ácido de plasmalógenos contenidos en extractos lipídicos procedentes de muestras biológicas. La reacción es rápida, cuantitativa y quimioselectiva hacia el enlace vinil éter, no evidenciándose degradación significativa de otras especies carentes de este grupo funcional.
2. La aplicación del método anterior al análisis de glicerofosfolípidos de etanolamina en la línea celular RAW 264.7 mediante NP-HPLC-MS/MS permite la identificación inequívoca de plasmalógenos y la corrección de las interferencias isobáricas causadas por especies de plasmaniletanolamina no resueltas cromatográficamente.
3. Únicamente se han detectado interferencias entre especies de pPE con alcohol esteárico (P-18:0) y de ePE con alcohol oleico (O-18:1).
4. En relación con la conclusión anterior, las interferencias más significativas se dan entre especies que contienen esterificados en *sn*-2 ácidos grasos saturados (SFAs) y monoin-saturados (MUFAs).
5. Los plasmalógenos constituyen, en la misma línea celular, el 40 % de la fracción de fosfolípidos de etanolamina, mientras que las especies de plasmaniletanolamina representan únicamente el 3,2 %. Esta distribución es consistente con la descrita en estudios previos.
6. La fracción de plasmalógenos se encuentra enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), siendo el más abundante el araquidónico (20:4).

Bibliografia

1. Gurr, M. I., and James, A. T. (1980) Lipid Biochemistry: An Introduction. *Lipid Biochemistry: An Introduction*. 10.1007/978-94-009-5907-1
2. Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., Van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., and Dennis, E. A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* **46**, 839–861
3. Liebisch, G., Fahy, E., Aoki, J., Dennis, E. A., Durand, T., Ejsing, C. S., Fedorova, M., Feussner, I., Griffiths, W. J., Köfeler, H., Merrill, A. H., Murphy, R. C., O'Donnell, V. B., Oskolkova, O., Subramaniam, S., Wakelam, M. J. O., and Spener, F. (2020) Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res.* **61**, 1539–1555
4. Kishimoto, K., Urade, R., Ogawa, T., and Moriyama, T. (2001) Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: suitable methods for “lipidome” analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* **281**, 657–662
5. Han, X., and Gross, R. W. (2003) Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res.* **44**, 1071–1079
6. Cajka, T., and Fiehn, O. (2014) Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **61**, 192–206
7. Wüthrich, C., Giannoukos, S., and Zenobi, R. (2023) Elucidating the Role of Ion Suppression in Secondary Electrospray Ionization. *J Am Soc Mass Spectrom.* **34**, 2498–2507
8. Mahmud, I., Wei, B., Veillon, L., Tan, L., Martinez, S., Tran, B., Raskind, A., de Jong, F., Liu, Y., Ding, J., Xiong, Y., Chan, W. K., Akbani, R., Weinstein, J. N., Beecher, C., and Lorenzi, P. L. (2025) Ion suppression correction and normalization for non-targeted metabolomics. *Nature Communications* 2025 16:1. **16**, 1–14

9. Surma, M. A., Herzog, R., Vasilj, A., Klose, C., Christinat, N., Morin-Rivron, D., Simons, K., Masoodi, M., and Sampaio, J. L. (2015) An automated shotgun lipidomics platform for high throughput, comprehensive, and quantitative analysis of blood plasma intact lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **117**, 1540
10. Cajka, T., and Fiehn, O. (2016) Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal Chem*. **88**, 524–545
11. Xu, T., Hu, C., Xuan, Q., and Xu, G. (2020) Recent advances in analytical strategies for mass spectrometry-based lipidomics. *Anal Chim Acta*. **1137**, 156–169
12. Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2017) *Lehninger principles of biochemistry*, 7th Ed. (Freeman, W. H. ed), W.H. Freeman and Company, New York
13. Liebisch, G. (2016) Stereospecific Numbering. *Encyclopedia of Lipidomics*. 10.1007/978-94-007-7864-1_2-1
14. Nishihara, M., Yamazaki, T., Oshima, T., and Koga, Y. (1999) sn-Glycerol-1-Phosphate-Forming Activities in Archaea: Separation of Archaeal Phospholipid Biosynthesis and Glycerol Catabolism by Glycerophosphate Enantiomers. *J Bacteriol*. **181**, 1330
15. Braverman, N. E., and Moser, A. B. (2012) Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1822**, 1442–1452
16. Honsho, M., Asaoku, S., and Fujiki, Y. (2010) Posttranslational Regulation of Fatty Acyl-CoA Reductase 1, Far1, Controls Ether Glycerophospholipid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. **285**, 8537–8542
17. Dorninger, F., Werner, E. R., Berger, J., and Watschinger, K. (2022) Regulation of plasmalogen metabolism and traffic in mammals: The fog begins to lift. *Front Cell Dev Biol*. **10**, 946393
18. Gallego-García, A., Monera-Girona, A. J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., and Elías-Arnanz, M. (2019) A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science (1979)*. **366**, 128–132
19. Balsinde, J., and Balboa, M. A. (2024) Plasmalogens in Innate Immune Cells: From Arachidonate Signaling to Ferroptosis. *Biomolecules*. 10.3390/BIOM14111461

Bibliografia

20. Bozelli, J. C., Azher, S., and Epand, R. M. (2021) Plasmalogens and Chronic Inflammatory Diseases. *Front Physiol.* **12**, 730829
21. Snyder, F. (1999) The ether lipid trail: a historical perspective. *Biochim Biophys Acta.* **1436**, 265–278
22. Gómez-Cortés, P., Rodríguez-Pino, V., Marín, A. L. M., and de la Fuente, M. A. (2019) Identification and quantification of dimethyl acetals from plasmalogenic lipids in lamb intramuscular fat under different derivatization procedures. *Journal of Chromatography B.* **1120**, 24–28
23. Frosolono, M. F., and Rapport, M. M. (1969) Reactivity of plasmalogens: kinetics of acid-catalyzed hydrolysis. *J Lipid Res.* **10**, 504–506
24. Axelsen, P. H., and Murphy, R. C. (2010) Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J Lipid Res.* **51**, 660–671
25. Buszewski, B., and Noga, S. (2011) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* **402**, 231
26. Pulfer, M., and Murphy, R. C. (2003) Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev.* **22**, 332–364
27. McDonald, J. G., Ivanova, P. T., and Brown, H. A. (2016) Approaches to Lipid Analysis. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition.* 10.1016/B978-0-444-63438-2.00002-X
28. Koch, J., Lackner, K., Wohlfarter, Y., Sailer, S., Zschocke, J., Werner, E. R., Watschinger, K., and Keller, M. A. (2020) Unequivocal Mapping of Molecular Ether Lipid Species by LC-MS/MS in Plasmalogen-Deficient Mice. *Anal Chem.* **92**, 11268–11276
29. Azad, A. K., Kobayashi, H., Md. Sheikh, A., Osago, H., Sakai, H., Ahsanul Haque, M., Yano, S., and Nagai, A. (2021) Rapid identification of plasmalogen molecular species using targeted multiplexed selected reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry and advances in the clinical lab.* **22**, 26–33
30. Hsu, F. F., and Turk, J. (2008) Structural characterization of unsaturated glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom.* **19**, 1681–1691

31. Koch, J., Watschinger, K., Werner, E. R., and Keller, M. A. (2022) Tricky Isomers—The Evolution of Analytical Strategies to Characterize Plasmalogens and Plasmalyl Ether Lipids. *Front Cell Dev Biol.* **10**, 864716
32. Pham, H. T., Maccarone, A. T., Thomas, M. C., Campbell, J. L., Mitchell, T. W., and Blanksby, S. J. (2013) Structural characterization of glycerophospholipids by combinations of ozone- and collision-induced dissociation mass spectrometry: the next step towards “top-down” lipidomics. *Analyst.* **139**, 204–214
33. Phaner, C. J., Liu, S., Zhou, X., and Reid, G. E. (2013) Functional Group Selective Derivatization and Gas-Phase Fragmentation Reactions of Plasmalogen Glycerophospholipids. *Mass Spectrometry.* **2**, S0015
34. Kayganich, K. A., and Murphy, R. C. (1992) Fast atom bombardment tandem mass spectrometric identification of diacyl, alkylacyl, and alk-1-enylacyl molecular species of glycerophosphoethanolamine in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Chem.* **64**, 2965–2971
35. Phaner, C. J., Liu, S., Ji, H., Simpson, R. J., and Reid, G. E. (2012) Comprehensive lipidome profiling of isogenic primary and metastatic colon adenocarcinoma cell lines. *Anal Chem.* **84**, 8917–8926
36. Murphy, E. J., Stephens, R., Jurkowitz-Alexander, M., and Horrocks, L. A. (1993) Acidic hydrolysis of plasmalogens followed by high-performance liquid chromatography. *Lipids.* **28**, 565–568
37. Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., and Król, M. (2018) Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One.* **13**, e0198943
38. Guijas, C., Astudillo, A. M., Gil-De-Gómez, L., Rubio, J. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2012) Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid. 10.1016/j.bbalip.2012.07.010
39. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248–254

Bibliografia

40. Brady, P. N., and Macnaughtan, M. A. (2015) Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. *Anal Biochem.* **491**, 43–51
41. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* **37**, 911–917
42. Plückthun, A., and Dennis, E. A. (1982) Acyl and Phosphoryl Migration in Lysophospholipids: Importance in Phospholipid Synthesis and Phospholipase Specificity. *Biochemistry.* **21**, 1743–1750
43. Okudaira, M., Inoue, A., Shuto, A., Nakanaga, K., Kano, K., Makide, K., Saigusa, D., Tomioka, Y., and Aoki, J. (2014) Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. *J Lipid Res.* **55**, 2178–2192
44. Hines, K. M., and Xu, L. (2019) Lipidomic consequences of phospholipid synthesis defects in Escherichia coli revealed by HILIC-ion mobility-mass spectrometry. *Chem Phys Lipids.* **219**, 15–22
45. Calvano, C. D., Bianco, M., Ventura, G., Losito, I., Palmisano, F., and Cataldi, T. R. I. (2020) Analysis of Phospholipids, Lysophospholipids, and Their Linked Fatty Acyl Chains in Yellow Lupin Seeds (*Lupinus luteus* L.) by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Molecules.* 10.3390/MOLECULES25040805
46. Quehenberger, O., Armando, A., Dumlao, D., Stephens, D. L., and Dennis, E. A. (2008) Lipidomics analysis of essential fatty acids in macrophages. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **79**, 123–129
47. Zoeller, R. A., Rangaswamy, S., Herscovitz, H., Rizzo, W. B., Hajra, A. K., Das, A. K., Moser, H. W., Moser, A., Lazarow, P. B., and Santos, M. J. (1992) Mutants in a macrophage-like cell line are defective in plasmalogen biosynthesis, but contain functional peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry.* **267**, 8299–8306
48. Tromans, J., Zhang, B., and Golding, B. T. (2024) Unlocking nature’s antioxidants: a novel method for synthesising plasmalogens. *Org Biomol Chem.* **22**, 7989–7995
49. Han, X., and Gross, R. W. (1990) Plasmenylcholine and Phosphatidylcholine Membrane Bilayers Possess Distinct Conformational Motifs. *Biochemistry.* **29**, 4992–4996

50. Thomas, S. N., French, D., Jannetto, P. J., Rappold, B. A., and Clarke, W. A. (2022) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nature Reviews Methods Primers* 2022 2:1. **2**, 1–14

Relación de figuras y tablas

FIGURA 1.- ESTRUCTURA DEL <i>SN</i> -GLICEROL 3-FOSFATO.....	10
FIGURA 2.- DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA ATENDIENDO AL TIPO DE ENLACE EN LA POSICIÓN <i>SN-1</i> DEL ESQUELETO DE GLICEROL	11
FIGURA 3.- SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS ÉTER Y VINIL ÉTER.....	14
FIGURA 4.- REACTIVIDAD DE PLASMALÓGENOS FRENTE A RADICALES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y OXÍGENO SINGLETE ($^1\text{O}_2$).....	16
FIGURA 5.- ESTRUCTURAS DE LA FOSFATIDILCOLINA Y LA PLASMENILCOLINA EN LAS PROXIMIDADES DE LA INTERFASE HIDROFÓBICO/HIDROFÍLICO	17
FIGURA 6.- EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DEL ENLACE VINIL ÉTER DE LOS PLASMALÓGENOS.....	18
FIGURA 7.- MECANISMO PROPUESTO PARA LA HIDRÓLISIS DE PLASMALÓGENOS CATALIZADA POR ÁCIDO	19
FIGURA 8.- CROMATOGRAMA DE ION TOTAL (TIC) DE LOS GLICEROFOSFOLÍPIDOS EXTRAÍDOS DE UNA MUESTRA BIOLÓGICA ANALIZADOS MEDIANTE NP-HPLC-MS.....	20
FIGURA 9.- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UN SISTEMA HPLC-MS/MS CON ELECTROSPRAY COMO FUENTE DE IONES Y ANALIZADOR DE TRIPLE CUADRUPOLO OPERANDO EN MODO MRM.....	22
FIGURA 10.- ESPECTROS DE MASAS EN TÁNDEM DE LA ESPECIE PE(18:0/22:6) EN MODO POSITIVO Y NEGATIVO ...	23
FIGURA 11.- (A) ESPECTROS MS/MS DE LOS ISÓMEROS PE(O-18:1/20:4) Y PE(P-18:0/20:4).....	24
FIGURA 12.- EJEMPLO DE LÍNEA DE CALIBRADO PARA LA APLICACIÓN DEL MÉTODO DE BRADFORD A LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN MUESTRAS DE ORIGEN BIOLÓGICO.....	31
FIGURA 13.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE UN ESTÁNDAR DEL PLASMALÓGENO PE(P-18:0/18:1) Y DE LAS MASAS DE REACCIÓN, A DIVERSOS TIEMPOS, OBTENIDAS TRAS SU METANOLISIS ÁCIDO.....	38
FIGURA 14.- ANÁLISIS MEDIANTE HPLC-MS DE UN ESTÁNDAR DE PE(P-18:0/18:1) Y LA MASA DE REACCIÓN RESULTANTE DE TRATAR DICHO PLASMALÓGENO CON UN MEDIO DE REACCIÓN CONTENIENDO UNA CONCENTRACIÓN DE HCl DE 0,5 M.....	39
FIGURA 15.- ANÁLISIS MEDIANTE HPLC-MS/MS DEL CONTENIDO TOTAL EN ESPECIES DE FOSFATIDILETANOLAMINA (PE) EN EXTRACTOS LIPÍDICOS DE RAW264.7 TRATADOS CON MEDIOS DE REACCIÓN CONTENIENDO DIVERSAS CONCENTRACIONES DE CLORURO DE HIDRÓGENO Y COMPARACIÓN CON UNA MUESTRA CONTROL.	40
FIGURA 16.- PERFIL DE ESPECIES MOLECULARES DE FOSFATIDILETANOLAMINA (PE) DE UN EXTRACTO LIPÍDICO DE LA LÍNEA CELULAR RAW264.7	41
FIGURA 17.- CROMATOGRAMAS DE ION EXTRAÍDO DE LAS TRANSICIONES CORRESPONDIENTES A LAS PAREJAS DE ANALITOS INTERFERENTES PE(P-18:0/20:5) / PE(O-18:1/20:5)(A) Y PE(P-16:0/22:6) / PE(O-16:1/22:6) (B) ANALIZADOS MEDIANTE HPLC-MS EN MUESTRAS CONTROL Y SOMETIDAS A TRATAMIENTO ÁCIDO.....	42
FIGURA 18.- (A): PERFIL DE ESPECIES DE PLASMENILETANOLAMINA CUANTIFICADAS EN UN EXTRACTO LIPÍDICO DE LA LÍNEA RAW264.7	44

FIGURA 19.- (A): PERFIL DE ESPECIES DE PLASMANILETANOLAMINA (EPE) CUANTIFICADAS EN UN EXTRACTO LIPÍDICO DE LA LÍNEA RAW264.7	46
FIGURA 20.- PERFIL DE ESPECIES MOLECULARES DE LISOFOSFATIDILETANOLAMINA (LPE) DE UN EXTRACTO LIPÍDICO DE LA LÍNEA CELULAR RAW264.7 CUANTIFICADAS EN MUESTRAS CONTROL Y SOMETIDAS A TRATAMIENTO EN MEDIO ÁCIDO	47
TABLA 1.-PARÁMETROS DE LA FUENTE DE IONIZACIÓN POR ELECTROESPRAY OPTIMIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS.	33
TABLA 2.- POTENCIALES ÓPTIMOS DEL ANALIZADOR DE TRIPLE CUADRUPOLO PARA EL ANÁLISIS DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS DE ETANOLAMINA	33
TABLA 3.- RELACIÓN DE TRANSICIONES MRM (MULTIPLE REACTION MONITORING) DE LAS ESPECIES DE FOSFATIDILETANOLAMINA (PE) ANALIZADAS EN RAW264.7.	34
TABLA 4.- RELACIÓN DE TRANSICIONES MRM (MULTIPLE REACTION MONITORING) DE LAS ESPECIES DE PLASMANILETANOLAMINA (EPE) DERIVADAS DE LOS ALCOHOLES PALMÍTICO (16:0) Y ESTEÁRICO (18:0), NO INTERFERIDAS ISOBÁRICAMENTE CON PLASMALÓGENOS ANALIZADAS EN RAW264.7.	34
TABLA 5.- RELACIÓN DE TRANSICIONES MRM (MULTIPLE REACTION MONITORING) DE ESPECIES DE PLASMANILETANOLAMINA (PPE) INTERFERIDAS ISOBÁRICAMENTE CON ESPECIES DE PLASMANILETANOLAMINA (EPE) CON UNA INSATURACIÓN ADICIONAL EN LA CADENA O-ALQUÍLICA ANALIZADAS EN RAW264.7.	35
TABLA 6.- RELACIÓN DE TRANSICIONES MRM (MULTIPLE REACTION MONITORING) DE LAS ESPECIES DE LISOFOSFATIDILETANOLAMINA (LPE) ANALIZADAS EN RAW264.7.....	35
TABLA 7.-CONTRIBUCIÓN RELATIVA, EN PORCENTAJE, DE CADA ESPECIE DE LAS PAREJAS DE ISÓMEROS P-18:0 Y O-18:1 A LA SEÑAL ANALÍTICA INTERFERIDA.	43
TABLA 8.- COMPOSICIÓN RELATIVA DE ESPECIES DE PE, EPE Y PPE CON RESPECTO AL TOTAL DE FOSFOLÍPIDOS DE ETANOLAMINA EN LA LÍNEA CELULAR RAW 264.7	48

