

Lipidómica y metabolómica: análisis por espectrometría de masas

Jesús Balsinde

*Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
47003 Valladolid, Spain*

November 21, 2018

La cromatografía líquida (LC) en combinación con la espectrometría de masas (MS) es una técnica de amplio uso en estudios de la lipidómica, rama de la metabolómica que se ocupa de caracterizar el conjunto de lípidos presentes en un sistema. LC/MS proporciona datos cualitativos y cuantitativos de una gran variedad de especies moleculares contenidas en muestras complejas y puede ser utilizada en dos maneras, “global” o “dirigida”, con el fin de obtener perspectivas globales o detalles de una clase de constituyentes en particular. Uno de los grandes usos de LC/MS por lo que respecta fundamentalmente a la metabolómica/lipidómica es la búsqueda de marcadores moleculares que puedan ser utilizados en el diagnóstico temprano de enfermedades. Con los grandes avances técnicos que se siguen produciendo cada día y el desarrollo de protocolos cada vez más precisos, es fácil imaginar que esta técnica proporcionará pronto valiosos resultados que ayudarán a comprender la patología, y por tanto al establecimiento de nuevas y mejores terapias y estrategias farmacológicas.

Espectrometría de masas, fundamentos generales.

Qué es la proteómica, la metabolómica y la lipidómica ([Slide 3](#)). Implicaciones de la lipidómica en medicina clínica ([Slide 4](#)). Definición de espectro de masas y espectrómetro de masas. Concepto m/z o relación masa/carga ([Slide 5](#)). Partes que componen un espectrómetro de masas ([Slide 6 – Configuration of a Mass Spectrometer](#)). Tipos de fuentes de ionización: ionización por electrospray ([Slide 7 – Electrospray Ionization](#)), ionización láser asistida por matriz MALDI ([Slide 8 – MALDI](#)) e ionización química a presión atmosférica ([Slide 9 – APCI](#)). Modos de ionización; positivo o negativo ([Slide 10 – Ionization Modes](#)). Tipos de analizadores de masas: el triple cuadrupolo ([Slide 11 – Triple Quadrupole](#)); tiempo de vuelo ([Slide 12 – Q-TOF](#)); trampa iónica ([Slide 13 – Ion Trap](#)); Orbitrap ([Slide 14 – Orbitrap](#)). Comparación de los diferentes tipos de analizadores de masas ([Slide 15 – Comparison of Mass Analyzers Used with ESI](#)). Configuración más habitual hoy para lipidómica es el triple cuadrupolo ([Slide 16 – Triple Quadrupole](#); repeat of [Slide 9](#)). Ya que vamos a hablar de lipidómica, para refrescar, he aquí la estructura de un fosfolípido ([Slide 17 – Glycerophospholipids. Nomenclature](#)). ([Slide 18 – empty transition slide](#)).

Modos de trabajo en tándem masas.

Hay varias estrategias, la más ‘tonta’, es el full mass scan ([Slide 19 – Various Modes of Tandem MS Analysis: Full Scan](#)) ([Slide 20 – Full Mass Scan](#)). Otras posibilidades más potentes son: escaneo de iones producto ([Slide 21 - Various Modes of Tandem MS Analysis: Product Ion Scan](#)) ([Slides 22 & 23 – Example](#)); escaneo de iones precursores ([Slide 24 - Various Modes of Tandem MS Analysis: Precursor Ion Scan](#)) ([Slide 25 – Example](#)); pérdida neutra ([Slide 26 - Various Modes of Tandem MS Analysis: Neutral Loss Scan](#)) ([Slide 27 – Example](#)); monitorización de reacción seleccionada ([Slide 28 - Various Modes of Tandem MS Analysis: SRM](#)) ([Slide 29 – Example](#)). ([Slide 30 – empty transition slide](#)).

Preparación de las muestras.

Dos modos: ([Slide 31 – Sample Preparation](#)): infusión directa ([Slide 32 – Shotgun](#)); dirigida ([Slide 33 – Targeted](#)).

Aplicaciones.

(Slide 34 – Applications): marcadores de activación (Slide 35 – Markers of Activation). El problema de la complejidad en las aproximaciones lipidómicas (Slide 36 – Lipidomics: Complexity?). Solución? La estrategia de “divide y vencerás” (Slide 37 – Lipid Categories).

Primer ejemplo, usando fosfolípidos de membrana (Slide 38 – Omega-6-Containing Phospholipids as Markers of Inflammation) (Slides 39 & 40 – Role of Phospholipase A₂ in Arachidonic Acid Release) (Slides 41, 42 & 43 – Glycerophospholipids. Nomenclature). Estrategias experimentales (Slide 44 – Lipidomic Profiling of Arachidonic Acid-containing Phospholipids). Resultados (Slide 45 – Arachidonic Acid-containing Phospholipids of Human Monocytes) (Slide 46 – Changes of AA-containing PC Species After Zymosan Stimulation) (Slide 47 – Changes of AA-containing PI Species After Zymosan Stimulation) (Slide 48 – Changes of AA-containing PE Species After Zymosan Stimulation). Especificidad de los efectos observados (Slide 49 – What About Other Stimuli?). Conclusiones (Slide 50 – Lipidomics as an approach to identify specific molecular markers in resting versus activated cells). (Slide 51 – empty transition slide).

Segundo ejemplo: lípidos neutros como marcadores tempranos de enfermedad cardiovascular (Slide 52 – Neutral Lipids as Early Markers of Cardiovascular Disease). Para recordar con que lípidos estamos, se muestran de nuevo las categorías de lípidos (Slide 53 – Lipid Categories; repeat of Slide 34). Definición de gotas lipídicas (Slides 54 & 55) y su importancia en la enfermedad cardiovascular (Slide 56 – Initiation of Atherosclerosis). Resultados (Slides 57 & 58 – AA Induces Lipid Droplet Formation) (Slide 59 – Fatty Acid Content of TAG and CE). Implicaciones (Slide 60 – Lipid Inflammatory Signals Regulate Cellular Lipid Metabolism). Conclusion final (Slide 61 – Lipid Markers of Activation). Despedida (Slide 62 – The Need for Metabolomics).

Aplicaciones (Slide 34 – Applications): marcadores de activación (Slide 35 – Markers of Activation). Es importante enfatizar que un lipidoma esta compuesto por miles de moléculas diferentes con estructuras químicas muy distintas entre sí. Qué quiere esto decir? (Slide 36 – Lipidomics = Complexity?). Que hacer lipidómica es inherentemente complejo, porque hay mucha variedad estructural (Slide 37 – Lipid Categories). Por tanto, pretender desentrañar el lipidoma completo de un sistema celular dado es muy complicado sino se poseen enormes recursos. Lo que se hace es la estrategia “Julio César”, divide y vencerás, cortar el lipidoma en pedacitos y estudiar aquel en que uno se siente más cómodo o crea que puede aportar más.

Primer ejemplo, usando fosfolípidos de membrana, búsqueda de biomarcadores de activación (diagnóstico): ácidos grasos omega-6 como marcadores de daño inflamatorio (Slide 38 – Omega-6-Containing Phospholipids as Markers of Inflammation). Los ácidos grasos omega-6 son precursores de moléculas con alto poder inflamatorio, llamados eicosanoides. Estos ácidos grasos omega-3 se encuentran en fosfolípidos de membrana; no en forma libre. Se produce “bajo demanda”, es decir bajo estimulación por receptor para producir los metabolitos oxigenados necesarios en cada ocasión. Y el resto del tiempo está “escondido” en los fosfolípidos de membrana (Slide 39 – Role of Phospholipase A₂ in Arachidonic Acid Release). En células humanas el AA se distribuye casi exclusivamente en tres clases de fosfolípidos, PC en rojo, PE en verde y PI en amarillo (Slide 40 – Role of Phospholipase A₂ in Arachidonic Acid Release). Es importante conocer pues en qué especies moleculares dentro de cada clase de fosfolípidos se halla el ácido araquidónico y cuales y cuanto de cada uno se usan durante la estimulación puesto que esta información puede ser muy útil para estudiar la regulación celular pero también a la hora de identificar marcadores de distintos estados de activación. Y como de fosfolípidos vamos a estar hablando, hagamos un inciso para recordar como son los fosfolípidos de membrana que portan araquidónico (Slides 41, 42 & 43 – Glycerophospholipids. Nomenclature). Este es el protocolo experimental utilizado para este tipo de aproximaciones (Slide 44 – Lipidomic Profiling of Arachidonic Acid-containing Phospholipids). En estos estudios se usaron monocitos humanos estimulados con zimosán, un derivado de levaduras. Esto va a activar las células y va a dar lugar a la activación de fosfolipasa A₂, lo que conducirá a la

liberación del AA, producción de eicosanoides y en resumen a una pérdida de AA de los fosfolípidos celulares. Entonces pararemos las reacciones, extraeremos los lípidos usando mezclas de cloroformo/metanol y analizaremos los fosfolípidos conteniendo AA con el espectrómetro de masas. Con esta información, aquí tenemos lo que yo llamo el araquidonoma de monocitos humanos (**Slide 45 – Arachidonic Acid-containing Phospholipids of Human Monocytes**). Este es ya un resultado ‘diagnóstico’, es ya una huella digital lipídica de los monocitos, porque presenta características únicas que lo hacen inmediatamente identificable como perteneciente a monocitos. Por ejemplo, el alto contenido de AA en plasmalógenos de PE, y el alto contenido de AA en una única especie de PI. Bien, lo que se hace ahora es analizar el comportamiento de cada una de ellas durante la activación celular. Lo que esperamos es que todas ellas bajen con el tiempo. Se muestran los time-courses de las diferentes clases de fosfolípidos, PC (**Slide 46 – Time-dependent Changes of Major AA-containing PC Species After Zymosan Stimulation**), PI (**Slide 47 - Time-dependent Changes of Major AA-containing PI Species After Zymosan Stimulation**), y PE (**Slide 48 – Time-dependent Changes of Major AA-containing PE Species After Zymosan Stimulation**) y se enfatiza la aparición de especies que muestran un comportamiento inusual, ya que aumentan. Estudios con otros estímulos indican que uno de ellos es específico de estímulo (**Slide 49 – What About Other Stimuli?**). Como conclusión de estos experimentos se hace notar el interés en estudiar qué papel pueden tener estos lípidos inusuales durante la activación celular, cuál es su función biológica (**Slide 50 – Conclusions: Marker of Yeast Infection?**).

Segundo ejemplo de búsqueda de marcadores de activación (diagnóstico): lípidos neutros como posibles marcadores de enfermedad cardiovascular (**Slide 52 – Neutral Lipids as Early Markers of Cardiovascular Disease**). Se muestra la slide de categorías para que se vea a qué nos referimos (**Slide 53 – Lipid Categories**). Estos lípidos neutros se almacenan en forma de enormes gotas lipídicas en el citoplasma de las células (**Slide 54 – Martín’s Macrophage, Untitled**). Si echamos un vistazo más de cerca a una de estas gotitas de lípidos, lo que vemos es algo como esto (**Slide 55 – Lipid Droplets**): una monocapa de fosfolípidos decorada con una variedad de proteínas y dentro de un núcleo hidrofóbico compuesto por triglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol (CE). Durante muchos años estas gotas de lípidos se consideraron únicamente como orgánulos inertes de almacenamiento de lípidos neutros para ser movilizados en caso de necesidad energética. Pero hoy sabemos que, además de ese papel de almacenamiento, las gotas de lípidos tienen una participación fundamental en el desarrollo y progresión de enfermedades metabólicas con base inflamatoria, de las cuales la más frecuente es la enfermedad cardiovascular.

Uno de los factores causantes de enfermedad vascular es la aterosclerosis (**Slide 56 – Initiation of Atherosclerosis**). En la fase inicial de la aterosclerosis, las células endoteliales se activan de modo anormal, p.ej. por altos niveles de glucosa en sangre, por altos niveles de lípidos, etc, lo que resulta en la secreción de componentes proinflamatorios al medio. Estos componentes atraen y activan los monocitos, que penetran en el espacio subendotelial, donde se diferencian a macrófagos y fagocitan la gran cantidad de lípido que se acumula en ese espacio y lo almacenan en forma de gotas lipídicas. Ello conducirá a la conversión de los macrófagos en foam cells, con el consiguiente establecimiento de la placa de ateroma. Con el tiempo, las células musculares lisas de la túnica media proliferarán y alcanzarán el área rica en macrófagos, lo que empeorará las cosas.

Los monocitos activados por productos de la célula endotelial (i.e. ácido araquidónico y otras cosas) incrementan su contenido en lípidos neutros al activar sus mecanismos de fabricación de ácidos grasos de novo (**Slide 57 – Arachidonic Acid Induces Neutral Lipid Formation**), los cuales a su vez se van a empaquetar en gotas lipídicas citoplásmicas (**Slide 58 – Arachidonic Acid Induces Neutral Lipid Formation**). Estos datos proporcionan un concepto muy importante, que es que los monocitos expuestos a productos del endotelio dañado están abocados a convertirse en células espumosas mucho antes de convertirse en macrófagos, e incluso mucho antes de alcanzar el espacio sub-endotelial. Esto añade un giro interesante al diagrama mostrado antes porque indica que en las primeras etapas de un proceso aterosclerótico habrá células espumosas no solo en el espacio subendotelial sino también en circulación. Y este es un concepto que podría tener relevancia clínica ya que, si usando un análisis simple, fuésemos capaces de identificar estos monocitos espumosos, identificando

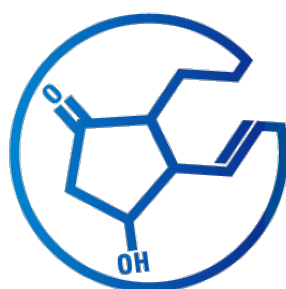
algún patrón molecular característico, tendríamos una gran herramienta de detección temprana de la enfermedad cardiovascular en sus etapas iniciales. Y esto es precisamente una de las cosas que se pueden estudiar empleando aproximaciones lipidómicas basadas en espectrometría de masas.

Usando esta técnica podemos determinar la composición en ácidos grasos de estos TAG and CE (**Slide 59 – Fatty Acid Content of TAG and CE**). Los ácidos grasos se nombran según su número de carbonos e insaturaciones; así, 14:0 sería palmitoleico, etc. Puede apreciarse que, desde un punto de vista cualitativo, los perfiles de ácidos grasos en TAG y CE son muy similares. Pero lo importante en esta diapositiva se resalta en el recuadro verde: 16: 1, o ácido palmitoleico. Hay muy poco en las células en reposo, pero aumenta mucho en las células activadas, en términos relativos el que más, por lo que debe tener algún significado biológico. Así, los monocitos humanos en respuesta a estímulo sintetizan ácido palmitoleico y lo almacenan en cantidades significativas en los lípidos neutros de las gotas de lípidos (**Slide 60 – Lipid Inflammatory Signals Regulate Cellular Lipid Metabolism**). Y quien sabe, quizá la detección de altos niveles de ácido palmitoleico en lípidos neutros de monocitos circulantes podría constituir ese marcador molecular de monocitos espumosos que pudiera tener utilidad diagnóstica. Para concluir, a modo de resumen, recordar la utilidad de la aproximación lipidómica para identificar los lípidos implicados en enfermedad (**Slide 61 – Lipid Markers of Activation**). Consideraciones finales: la necesidad de la metabolómica y la visión de Thudichum (**Slide 62 – The Need for Metabolomics**)...

REFERENCES

1. Griffiths, W. J., and Y. Wang. 2009. Mass spectrometry; from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem. Soc. Rev.* 38: 1882–1896.
2. Harkewicz, R., and E. A. Dennis. 2011. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 80: 301–325.
3. Brügger, B. 2014. Lipidomics: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 83: 79–98.
4. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103–1113.
5. Balgoma, D., O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Lipidomic approaches to the study of phospholipase A₂-regulated phospholipid fatty acid incorporation and remodeling. *Biochimie* 92: 645–650.
6. Astudillo, A. M., D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 249–256.
7. Guijas, C., J. P. Rodríguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A₂ regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1841: 1661–1671.
8. Balgoma, D., O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2008. Calcium-independent phospholipase A₂-mediated formation of 1,2-diarachidonoylglycerophosphoinositol in monocytes. *FEBS J.* 275: 6180–6191.
9. Balgoma, D., A. M. Astudillo, G. Pérez-Chacón, O. Montero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2010. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J. Immunol.* 184: 3857–3865.
10. Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, D. Balgoma, L. Gil-de-Gómez, V. Ruipérez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Influence of cellular arachidonic acid levels on phospholipid remodeling and CoA-independent transacylase activity in human monocytes and U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1811: 97–103.
11. Astudillo, A. M., G. Pérez-Chacón, C. Meana, D. Balgoma, A. Pol, M. A. Del Pozo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2011. Altered arachidonate distribution in macrophages from caveolin-1 null mice leading to

- reduced eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* 286: 35299–35307.
12. Guijas, C., A. M. Astudillo, L. Gil-de-Gómez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Phospholipid sources for adrenic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages: comparison with arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1386–1393.
 13. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Meana, J. M. Rubio, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J. Immunol.* 190: 5169–5177.
 14. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, C. Guijas, V. Magrioti, G. Kokotos, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s act on distinct phospholipid pools in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 192: 752–762.
 15. Rubio, J. M., J. P. Rodríguez, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2015. Group V secreted phospholipase A₂ is up-regulated by interleukin-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *J. Immunol.* 194: 3327–3339.
 16. Gil-de-Gómez, L., A. M. Astudillo, P. Lebrero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2017. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Front. Immunol.* 8: 1251.
 17. Rubio, J. M., A. M. Astudillo, J. Casas, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front. Immunol.* 9: 1723.
 18. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol.* 186: 6004–6013.
 19. Guijas, C., G. Pérez-Chacón, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gómez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A₂-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid Res.* 53: 2343–2354.
 20. Guijas, C., C. Meana, A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2016. Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease. *Cell Chem. Biol.* 23: 689–699.
 21. Astudillo, A. M., C. Meana, C. Guijas, L. Pereira, R. Lebrero, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2018. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* 59: 237–249.
 22. Meana, C., L. Peña, G. Lordén, E. Esquinas, C. Guijas, M. Valdearcos, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2014. Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J. Immunol.* 193: 4614–4622.
 23. Peña, L., C. Meana, A. M. Astudillo, G. Lordén, M. Valdearcos, H. Sato, M. Murakami, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2016. Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A₂ in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 1083–1095.



**THE EICOSANOID
RESEARCH DIVISION**
VALLADOLID