

TRABAJO DE FIN DE GRADO

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

David Amo Arranz

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

July 22, 2025

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), 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 lipídico de los fosfolípidos de etanolamina en la línea celular macrofágica murina RAW 264.7.

1. INTRODUCCION

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 definitoria. 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 término lipidoma, acuñado en 2001 (3),

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 (4).

De entre las técnicas analíticas aplicadas a los análisis lipídicos, 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 (5), fenómeno especialmente prevalente cuando se emplea el electrospray 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 (6, 7). 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 (5, 8).

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 (9). 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 (10).

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 (11). 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.) (12). En la mayoría de los organismos, con la única excepción de las arqueobacterias (13), los fosfolípidos de membrana derivan del sn-glicerol-3-fosfato.

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

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-glicerol-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-glicerol-3-fosfato) y plasménico (1-O-alk-1'-enil-2-acil-sn-glicerol-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 (14).

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)(14). 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, 20:4n-6 (AA) y el docosahexaenoico, 22:6n-3 (DHA).

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 (15):

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.

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. Allí, la glicerona fosfato (GnP, denominada dihidroxiacetona fosfato, DHAP), producto de la glucólisis e importada desde el citosol, es acilada por la enzima GNPAT, dando lugar a 1-acilglicerona fosfato. En la etapa siguiente tiene lugar la formación del enlace éter mediante el intercambio, catalizado por AGPS, 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 NA-DPH 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 Dhrr7b, cataliza la reducción del grupo carbonilo, lo que conduce a la formación de 1-alquilglicerol-3 fosfato. Este intermediario experimenta una nueva acilación sobre el grupo hidroxilo recién generado catalizada por una alquil/acil-glicerol-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 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).

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 (14), si bien su distribución es asimétrica 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 sub-celular, pueden encontrarse formando parte de la membrana nuclear y de orgánulos como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la mitocondria (14, 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) (14).

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 (14, 19).

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 A2 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 (14, 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 condrodisplasia 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 (14).

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).

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 di-metilacetales presentan bajos puntos de ebullición (22).

Mecanicamente, 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.

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.

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 eficacias de separación. Atendiendo a la polaridad relativa entre la fase móvil y estacionaria y el mecanismo de separación, pueden distinguirse tres modalidades cromato-gráficas:

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, acetoneitrilo, isopropanol, tetrahidrofurano...), mientras que la estacionaria es apolar o de baja polaridad, tales como el octilsilano (C8) y el octadecilsilano (C18). La propiedad que gobierna la separación en esta modalidad es la lipofilidad, 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 (5).

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.

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 (5).

La técnica instrumental de elección para la determinación dirigida de glicero fosfolípidos es la espectrometría de masas en tándem, 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 análisis 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. 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 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.

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 lipídicos 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. Una transición queda definida por la pareja de valores de m/z establecidos en Q1 y Q3. Es práctica habitual la cuantificación de los analitos registrando la transición de mayor intensidad (quantifier) y la adquisición simultánea de una secundaria (qualifier) menos intensa, a modo de confirmación. 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 9), 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 8-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 (Figuras 8-C y 8-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).

Un problema analítico que surge en la determinación de glicerofosfolípidos con enlace éter mediante HPLC-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 10). 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 co-existen en la matriz (28, 29).

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 litados 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 Phaner et al. (33) (Figura 6).

2. Por cuantificación diferencial, como la diferencia entre la señal analítica interferida y la registrada en una muestra idéntica sometida a tratamiento ácido con la finalidad de hidrolizar selectiva y cuantitativamente los plasmalógenos (34–36).

1. 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:

- 1) 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.

- 2) Aplicar la reacción de derivatización optimizada al estudio lipídico de fosfolípidos de etanolamina en la línea celular macrofágica RAW 264.7 mediante HPLC-MS, con especial énfasis en la distinción entre especies isoméricas de pPE y ePE.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Cultivo celular

2.2. Material biológico

2.3. Disolventes y reactivos líquidos

2.4. Reactivos y productos sólidos

2.5. Lípidos

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

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

2.6. Equipamiento

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)

2.7. 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)

2.8. Bases de datos y software

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/>).

3.9. 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 estreptomycin (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.

3.10. 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 °C hasta su utilización.

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 11).

3.11. 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 CHCl₃/MeOH (1:2, v/v) y, tras agitar vigorosamente, 1,25 volúmenes de H₂O y 1,25 volúmenes de CHCl₃. 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.

3.12. 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. 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 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)) 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).

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 transfiere 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 Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente.

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.

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 determinada para el patrón interno.

La cuantificación de los plasmalógenos interferidos con especies de plasmaniletanolamina se efectuó analizando por triplicado y en condiciones de repetibilidad una muestra control y otra expuesta a medio ácido. La optimización de los parámetros de la reacción (reactivos, 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 plasmaniletanolamina estable en medio ácido. El plasmalógeno interferido puede entonces cuantificarse como la diferencia entre las áreas de pico relativas, determinadas en el cromatograma de ion extraído de la transición común a ambas especies.

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. Se pretende 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.

En la placa cromatográfica revelada en yodo (Figura 12) 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 (Rf) 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 (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.

La masa de reacción resultante de tratar el estándar en las nuevas condiciones y una muestra control se analizaron mediante HPLC-MS, determinándose las

especies PE(P-18:0/18:1) y LPE(18:1). En los cromatogramas resultantes de sendos análisis, representados conjunta-mente en la Figura 13, 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).

Se estimó una conversión del plasmalógeno superior al 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, junto con el rendimiento cuantitativo ya demostrado, 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 comparó el contenido total en especies mayoritarias de fosfatidiletanolamina (carentes de enlace vinil éter), determinado mediante HPLC-MS, en un extracto lipídico control frente a otro sometido a metanolisis con diversas concentraciones de cloruro de hidrógeno (0,5, 1 y 2 M).

De los resultados del análisis semicuantitativo (Figura 14) 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 control. Concentraciones de ácido superiores (1 M y 2 M) conducen a su degradación, lo que compromete significativamente la selectividad de la reacción.

Atendiendo a los resultados de los experimentos anteriores, se determinaron las condiciones óptimas

de reacción:

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 de glicero-fosfolípidos 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 15), 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).

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 16 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. El pico que persiste tras la metanolisis se asigna a la especie de plasmániletanolamina PE(O-18:1/20:5), que interfiere en la determinación de la anterior. En el caso de la pareja 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.

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.

El perfil de las especies moleculares de pPE, calculado corrigiendo las áreas relativas de las especies interferidas se muestra en la Figura 17-A. Atendiendo al grado de insaturación de los ácidos grasos esterificados en la posición *sn*-2 (Figuras 17-B y 17-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.

El perfil de especies moleculares de plasmániletanolamina (ePE) se presenta en la Figura 18A 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 18B y 18C).

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 19) 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 16-B) en función del ácido graso esterificado en *sn*-2.

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.

5. CONCLUSIONES

5.1. 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.

5.2. La aplicación del método anterior al análisis de glicerofosfolípidos de etanolamina en la línea celular RAW 264.7 mediante NP-HPLC-MS permite la identificación inequívoca de plasmalógenos y la corrección de las interferencias isobáricas causadas por especies de plasmaniletanolamina no resueltas cromatográficamente.

5.3. Únicamente se han detectado interferencias entre especies de pPE con alcohol esteárico (P-18:0) y de ePE con alcohol oleico (O-18:1).

5.4. 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 monoinsaturados (MUFAs).

5.5. 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.

5.6. La fracción de plasmalógenos se encuentra enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), siendo el más abundante el araquidónico (20:4).

REFERENCES

1. Gurr, M. I., and James, A. T. (1980) Lipid Biochemistry: An Introduction. Lipid Bio-chemistry: 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. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. Cajka, T., and Fiehn, O. (2016) Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal Chem*. 88, 524–545
 10. 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
 11. Nelson, D. L., Cox, M. M., and Lehninger, A. L. (2013) *Lehninger principles of biochemistry*. [online] https://books.google.com/books/about/Lehninger_Principles_of_Biochemistry.html?hl=es&id=n9e1NAEACAAJ (Accessed June 30, 2025)
 12. Liebisch, G. (2016) Stereospecific Numbering. *Encyclopedia of Lipidomics*. 10.1007/978-94-007-7864-1_2-1
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 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 M.A. Balboa. 2024. Plasmalogens in innate immune cells: from arachidonate signaling to ferroptosis *Biomolecules* 14: 1461.
 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 Plasmalogen 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. Fhaner, 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. Fhaner, 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. & Balsinde, J. (2012) Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1386-1393.
39. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248–254
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. Plückerthun, 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. *J. Biol. Chem*. 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) Plasmalogen and Phosphatidylcholine Membrane Bilayers Possess Distinct Conformational Motifs. *Biochemistry* 29, 4992–4996
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.

55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Astudillo, A.M., C. Meana, C. Guijas, L. Pereira, P. 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.
59. 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.
60. Astudillo, A.M., M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1864: 772–783.
61. Rodríguez, J.P., C. Guijas, A.M. Astudillo, J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde, J. 2019. Sequestration of 9-hydroxystearic acid in FAHFA (fatty acid esters of hydroxy fatty acids) as a protective mechanism for colon carcinoma cells to avoid apoptotic cell death. *Cancers* 11: 524.
62. Lebrero, P., A.M. Astudillo, J.M. Rubio, L. Fernández-Caballero, G. Kokotos, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Cellular plasmalogen content does not influence arachidonic acid levels or distribution in macrophages: a role for cytosolic phospholipase A₂γ in phospholipid remodeling. *Cells* 8: 799.
63. Guijas, C., M.A. Bermúdez, C. Meana, A.M. Astudillo, L. Pereira, L. Fernández-Caballero, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2019. Neutral lipids are not a source of arachidonic acid for lipid mediator signaling in human foamy monocytes. *Cells* 8: 941.
64. Monge, P.; Garrido, A.; Rubio, J.M.; Magrioti, V.; Kokotos, G.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. The contribution of cytosolic group IVA and calcium-independent group VIA phospholipase A₂s to adrenic acid mobilization in murine macrophages. *Biomolecules* 2020, 10, 542.
65. Rodríguez, J.P., E. Leiguez, C. Guijas, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, C. Teixeira, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. A lipidomic perspective of the action of group IIA secreted phospholipase A₂ on human monocytes: lipid droplet biogenesis and activation of cytosolic phospholipase A₂α. *Biomolecules* 10: 891.
66. Gil-de-Gómez, L., P. Monge, J.P. Rodríguez, A.M. Astudillo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Phospholipid arachidonic acid remodeling during phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 274.
67. Astudillo, A.M., C. Meana, M.A. Bermúdez, A. Pérez-Encabo, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2020. Release of anti-inflammatory palmitoleic acid and its positional isomers by mouse peritoneal macrophages. *Biomedicines* 8: 480.
68. Astudillo, A.M., J.P. Rodríguez, C. Guijas, J.M. Rubio, M.A. Balboa, M.A., and J. Balsinde. 2021. Choline glycerophospholipid-derived prostaglandins attenuate TNFα gene expression in macrophages via a cPLA₂α/COX-1 pathway. *Cells* 10: 447.
69. Bermúdez, M.A., J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2022. Differential mobilization of the phospholipid and triacylglycerol pools of arachidonic acid in murine macrophages. *Biomolecules* 12: 1851.
70. Astudillo, A.M., M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2023. Compartmentalized regulation of lipid signaling in oxidative stress and inflammation: Plasmalogens, oxidized lipids and ferroptosis as new paradigms of bioactive lipid research. *Prog. Lipid Res.* 89: 101207.
71. Bermúdez, M.A., J.M. Rubio, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2022. Differential mobilization of the phospholipid and triacylglycerol pools of arachidonic acid in murine macrophages. *Biomolecules* 12: 1851.
72. Bermúdez, M.A., A. Garrido, L. Pereira, T. Garrido, M.A. Balboa and J. Balsinde. 2024. Rapid movement of palmitoleic acid from phosphatidylcholine to phosphatidylinositol in activated human monocytes. *Biomolecules* 14: 707.
73. Rodríguez, J.P., J. Casas, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2025. Bioactive lipid signaling and lipidomics in macrophage polarization: impact on inflammation and immune regulation. *Front. Immunol.* 16: 1550500.
75. 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.
76. 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: 1103–111.