VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS LIPIDÓMICO MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Autor: Enrique Ozcariz García

Tutor Profesional: Miriam Gil Serret

Tutor Académico: Javier Ugarte Chicote

Tarragona, 2018

Índice

DATOS DEL CENTRO **3**

AGRADECIMIENTOS **4**

RESUMEN **5**

1. INTRODUCCIÓN **6**

1.1 LÍPIDOS 6
1.1.1 Clasificación lipídica *6*
1.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN LIPÍDICA 8
1.2.1 Métodos de extracción tradicionales *9*
1.2.2 Método de extracción lipídica basado en diclorometano *10*
1.2.3 Método de extracción lipídica basado en metil-tert-butil éter *10*
1.2.4 Método de extracción lipídica basado en butanol *10*
1.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR 12
1.4 LIPIDÓMICA 13
1.4.1 Utilización de la resonancia magnética nuclear en la lipidómica *15*

2. OBJETIVOS **16**

3. METODOLOGÍA **16**

3.1 ESTUDIO DE PRECISIÓN DE TRES PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN LIPÍDICA 16
3.1.1 Preparación de los pools *16*
3.1.2 Determinación de la concentración de colesterol de la muestra *17*
3.1.3 Extracción lipídica manual partiendo de suero intacto *17*
3.1.4 Extracción lipídica mediante el uso del robot partiendo de suero intacto *18*
3.1.5 Extracción lipídica mediante el uso del robot partiendo de suero liofilizado *18*
3.1.6 Obtención y procesamiento de espectros de RMN *18*
3.2 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD LIPÍDICA A DIFERENTES TEMPERATURAS 19
3.2.1 Obtención de las muestras de suero *19*
3.2.2 Almacenamiento de las muestras a diferentes temperaturas *19*
3.2.3 Extracciones lipídicas *19*
3.2.3 Obtención y procesamiento de los espectros de RMN *20*

4. RESULTADOS **20**

4.1 ESTUDIO DE PRECISIÓN DE TRES PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN LIPÍDICA 20
4.2 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD LIPÍDICA A DIFERENTES TEMPERATURAS 25

5. CONCLUSIONES **32**

6. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO **32**

7. AUTOEVALUACIÓN **33**

BIBLIOGRAFÍA **34**

ANEXO I **37**

FIGURAS SUPLEMENTARIAS 37

ANEXO II 39

TABLAS SUPLEMENTARIAS 39

ANEXO III 41

NORMALIZACIÓN DE ÁREAS A UNIDADES DE CONCENTRACIÓN 41

Datos del centro

Biosfer Teslab es una empresa *spin-off* de la base biotecnológica surgida a partir de la Universidad Rovira i Virgili (URV) y el Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IIPSV). Se encuentra en Reus (Tarragona) y cuenta con las oficinas en Plaça de Prim, 10. Su principal misión consiste en acercar a la sociedad los avances llevados a cabo en la investigación biomédica, más concretamente, poner a disposición de la población una nueva herramienta capaz de predecir el riesgo de padecer una enfermedad o episodio cardiovascular.. El equipo promotor está liderado por el Dr. Roger Mallol y la Dra. Núria Amigó, los cuales han desarrollado conjuntamente el test *Liposcale* que la empresa comercializa. Dicho test permite la caracterización y cuantificación de las diversas subclases de lipoproteínas, presentes en muestras de suero o plasma sanguíneo, mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Por tanto, Biosfer Teslab trabaja con muestras de suero y plasma (provenientes de hospitales y laboratorios de empresas de seguros médicos, entre otros), a las cuales les aplica el ya mencionado test.

Todas las determinaciones experimentales se han llevado a cabo en el *Center for Omic Sciences* (COS, por sus iniciales en inglés), cuyas instalaciones se encuentran en la Avenida de la Universidad, 1 (Reus). El COS es un operador científico en el ámbito de la tecnología de las ómicas, equipado con innovadoras herramientas genómicas, transcriptómicas, metabolómicas y proteómicas. Este complejo ofrece asesoramiento científico y soporte en lo referente a diseño experimental a diversas empresas y universidades. Creado por la Universidad Rovira i Virgili es parte de la Infraestructura de Tecnologías Ómicas (IOT, por sus iniciales en inglés) reconocida como Infraestructura Científico Técnica Singular (ICTS) por el Ministerio de Economía y Competitividad de España.

Agradecimientos

En este apartado quiero mostrar mi agradecimiento a Elena Fresneda, Miriam Gil, Sandra Junza y Yasmina García por la donación de sangre realizada, la cual fue utilizada para realizar las pruebas de estabilidad. De igual manera quiero agradecer tanto a los miembros de BIOSFER TESLAB como a los del COS por el apoyo y asesoramiento prestado, así como, por el permiso otorgado para poder utilizar sus instalaciones. También quiero agradecer a mi tutor académico, Javier Ugarte Chicote, por las correcciones realizadas. Por último quiero hacer una mención especial a mi tutora profesional, Miriam Gil, por su ayuda durante la elaboración de este trabajo de fin de grado.

Resumen

Los lípidos son un amplio grupo de biomoléculas que presentan una gran variabilidad funcional y estructural. En la actualidad las ciencias ómicas, y entre ellas la lipidómica, se encuentran en pleno auge. Sin embargo aún existen ciertas limitaciones asociadas a todo estudio lipidómico que se han de superar, entre las que destacan: un método de extracción adecuado (siendo el recién desarrollado método de butanol:metanol el más apropiado), un correcto análisis de los resultados. La espectrometría de masas es la herramienta más utilizada en la lipidómica. Sin embargo, otras técnicas como la resonancia magnética nuclear están ganando protagonismo en este ámbito ya que ésta presenta ciertas ventajas interesantes como la no necesidad de derivatización de la muestra o su elevada reproducibilidad y sensibilidad. En este trabajo se pretende validar un protocolo de análisis lipidómico a partir de muestras de suero mediante resonancia magnética nuclear. Para ello, se estudió qué procedimiento de extracción es el más preciso (manual o extracción con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* habiendo liofilizado o no las muestras previamente) y la estabilidad lipídica tras ser almacenadas las muestras a distintas temperaturas (5°C, -20°C y -80°C) durante diferentes periodos de tiempo (1 día, 1 semana y 2 meses). Se observó que el procedimiento de extracción más preciso era el manual ya que es el que presentó los coeficientes de variación más bajos. Sin embargo, se demostró que la recuperación de glicerofosfolípidos y esfingolípidos era superior cuando se llevaban a cabo las extracciones con el robot. En lo referente a la estabilidad lipídica no se observó que los diferentes grupos lipídicos se mantuvieran estables a las condiciones de almacenamiento establecidas, pero tampoco se detectó que se produjera un proceso de degradación lipídica. Factores como el error experimental y la propia variabilidad intrínseca de los lípidos han podido contribuir a la obtención de resultados tan variables. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de optimizar el protocolo de extracción con el robot ya que la extracción manual no es compatible con una técnica de alto rendimiento como es la resonancia magnética nuclear. De igual manera, es necesario el estudio de factores adicionales (como los ciclos de congelación y descongelación a los que se ven sometidos las muestras) para una validación más completa del protocolo de análisis lipidómico presentado en este trabajo.

Palabras clave:

Lípido	Espectro
Lipidómica	Pool
Suero	Precisión
BUME	Coeficiente de variación
Resonancia magnética nuclear	Lisofosfocolina
Extracción lipídica	Estabilidad

1. Introducción

1.1 Lípidos

Los lípidos biológicos forman parte de un amplio grupo de biomoléculas que presenta una elevada diversidad química (véase *tabla 1*). La principal característica común que presenta este conjunto de moléculas es su carácter hidrofóbico. La diversidad estructural existente da lugar a un amplio rango de funciones, de entre las cuales la principal es el almacenamiento energético. Sin embargo, también residen en los lípidos funciones estructurales, de transporte o de señalización celular [1]. La ciencia encargada de su estudio a gran escala se denomina lipidómica, la cual ha adquirido una gran relevancia en diversos ámbitos (clínica, industria alimentaria…) en la última década (véase *apartado 1.4*).

1.1.1 Clasificación lipídica

El desarrollo exponencial de la lipidómica (véase *apartado 1.4*) implica la necesidad de sistemas adecuados y comprensibles de clasificación lipídica. En términos generales, los lípidos se definen como sustancias biológicas generalmente hidrofóbicas en la naturaleza y, en la gran mayoría de los casos, solubles en solventes orgánicos. A pesar de que estas propiedades químicas son aplicables a un amplio rango de especies lipídicas, es necesaria la formulación de definiciones más apropiadas basadas en la estructura y biosíntesis lipídicas. En base a lo dicho, el Comité Internacional de Clasificación y Nomenclatura Lipídica (CICNL) desarrolló el denominado "Sistema Comprensible de Clasificación Lipídica" en 2005 [2]. Dicho sistema define los lípidos como pequeñas moléculas anfipáticas o hidrofóbicas, las cuales pueden originarse (total o parcialmente) a partir de condensaciones basadas en carbaniones de tioésteres o mediante condensaciones basadas en carbocationes de unidades de isopreno. Como resultado se obtienen ocho categorías bien definidas (véase *tabla 1*) que cubren los dominios eucariota, procariota [3] y arquea, así como los lípidos sintéticos [4].

Tabla 1. Categorías lipídicas incluidas en el "Sistema Comprensible de Clasificación Lipídica". De cada categoría se incluye además del nombre, su correspondiente abreviatura (en inglés) y una estructura química representativa de la categoría. Tabla modificada a partir de [2], [3].

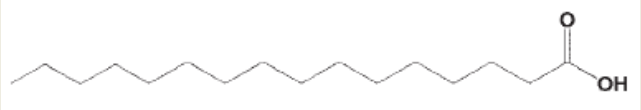
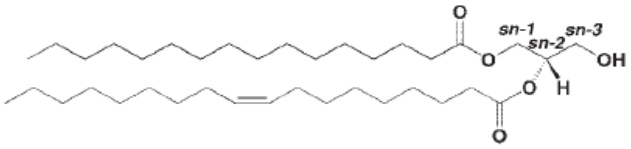
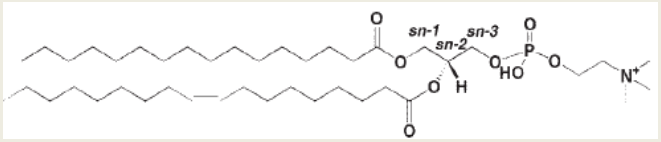
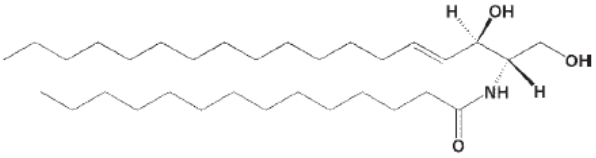
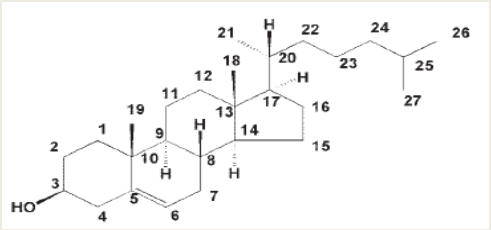
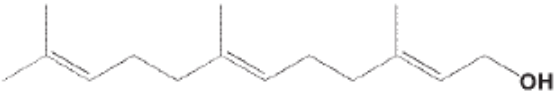
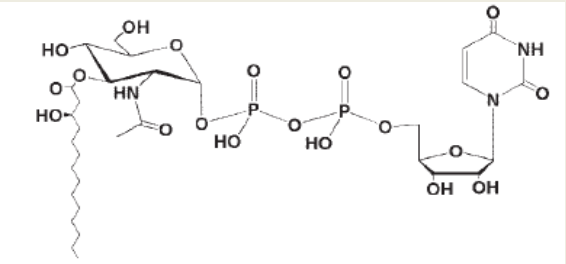
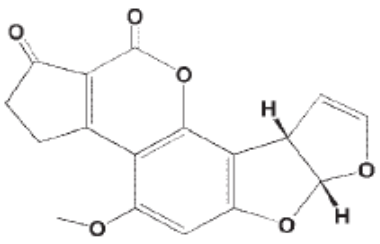
Categoría	Abreviación	Estructura representativa
Acilo Graso	FA	

Tabla 1. (Continuación).

Categoría	Abreviación	Estructura representativa
Glicerolípidos	GL	
Glicerofosfolípidos	GP	
Esfingolípidos	SP	
Lípidos de esterol	ST	
Lípidos de prenol	PR	
Sacarolípidos	SL	
Policétidos	PK	

Cada una de las ocho categorías presentes en la *tabla 1* puede subdividirse en numerosas clases y subclases. Por tanto, con el objetivo de facilitar la identificación de lípidos concretos, cada molécula lipídica posee un código único de 12 dígitos [4], que en ciertas ocasiones puede constar de un total de 14 (véase *tabla 2*) [3].

Tabla 2. Código identificativo de 12 dígitos. Descripción de cada uno de los dígitos que forman parte del código identificativo. Tabla modificada a partir de [3].

Carácter	Descripción	Ejemplo
1 - 2	Designación "LM" fija	LM
3 - 4	Código de dos letras referente a la categoría	PR
5 - 6	Código de dos dígitos referente a la clase	01
7 - 8	Código de dos dígitos referente a la subclase	03
9 - 10	Código de dos dígitos referente al cuarto nivel de clasificación	06
11 - 14	Código de cuatro cifras identificativo y único	0002

La clasificación mostrada en la *tabla 1* ha sido adoptada internacionalmente por la comunidad de lipidómica. Además, cuenta con el respaldo de la plataforma web *LIPID Metabolites and Pathways Strategy* (LIPID MAPS), la cual pone a disposición del usuario este método en su página web (http://www.lipidmaps.org) [3]. Sin embargo, debido a que la espectrometría de masas (MS, por sus iniciales en inglés) es la herramienta más utilizada en el campo de la lipidómica (véase *apartado 1.4*) y a que ésta no ofrece (en ausencia de ensayos químicos intermedios) los detalles estructurales contemplados por el Sistema Comprensible de Clasificación Lipídica, se tiende a usar una gran variedad de notaciones para las diferentes especies lipídicas. Estas denominaciones pueden no resultar suficientemente discriminativas en cuanto a la estructura, ya que suelen estar basadas en asunciones. Con el objetivo de reducir esta ambigüedad se ha desarrollado una notación lipídica estandarizada y práctica para las estructuras lipídicas derivadas de análisis de MS. Este sistema pretende añadir niveles de información definidos (véase *anexo I, figura suplementaria 1*) cuando no se disponen suficientes datos para emplear la nomenclatura disponible en LIPID MAPS. Esta notación cubre la mayoría de las subclases de cinco (FA, GL, GP, SP y ST) de las ocho categorías incluidas en el Sistema Comprensible de Clasificación Lipídica [5].

1.2 Métodos de extracción lipídica

El plasma sanguíneo presenta una elevada diversidad lipídica (véase *figura 1*). Este fluido es una de las muestras biológicas de partida más empleada en la lipidómica. Sin embargo, la extracción de las especies lipídicas residentes en ella puede resultar dificultosa, tal y como se ha mencionado previamente. La elevada diversidad estructural tiene como consecuencia que ningún método de extracción sea totalmente adecuado para todas las especies lipídicas [6]. Actualmente existen diversos métodos de extracción lipídica (véase *figura 2*), los cuales, se discutirán a continuación.

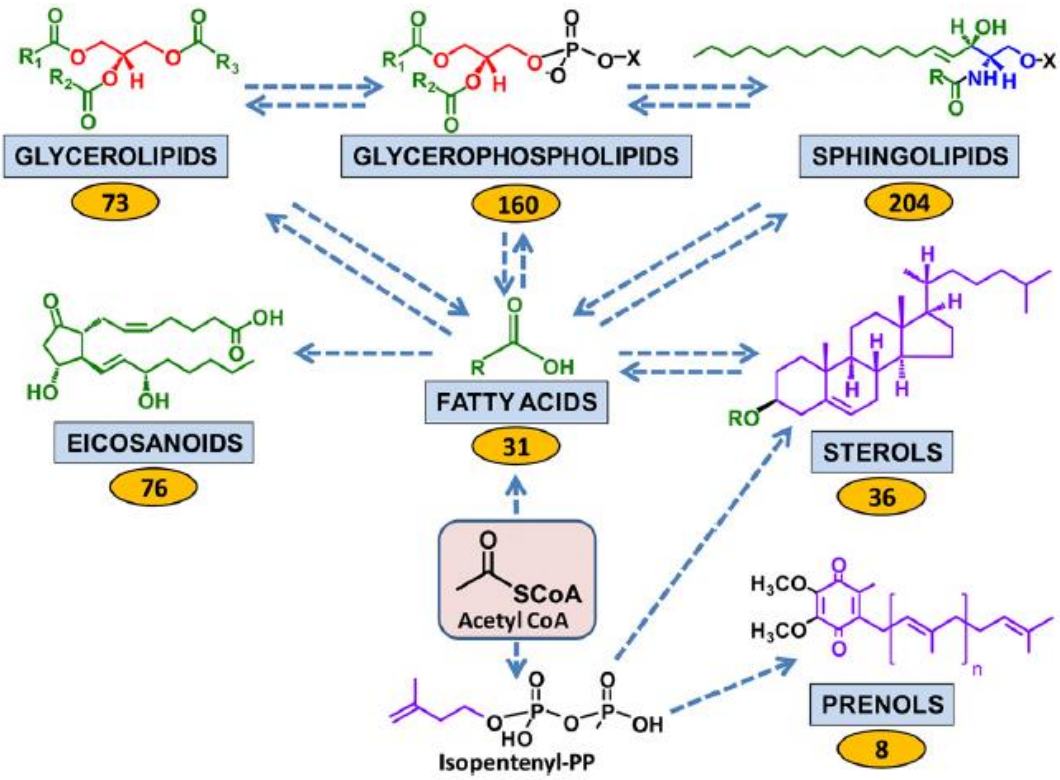


Figura 1. Diversidad lipídica presente en el plasma sanguíneo humano. El Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Renales y Digestivas (NIDDK, por sus iniciales en inglés) en colaboración con el Instituto Nacional de Estándares (NIST, por sus iniciales en inglés) produjo un material estándar de referencia (SRM 1950, en inglés) de plasma humano para los análisis metabólicos. Dicho material fue preparado a partir de la obtención de muestras de plasma de 100 individuos representativos de la población estadounidense, entre los cuales existió un mismo número de hombres que de mujeres. Dicho material puede ser usado en el ámbito de la química clínica para diversos propósitos diagnósticos basados en la identificación de metabolitos en el plasma. Las flechas representan las transformaciones que se dan entre las principales categorías lipídicas presentes en el plasma. Los números incluidos en las elipses amarillas hacen referencia al número de analitos cuantificados mediante MS para cada categoría lipídica. Figura obtenida de [7].

1.2.1 Métodos de extracción tradicionales

El método *Folch* descrito por Folch et al. en 1956 [8], junto con el método *Bligh and Dyer* descrito por Bligh et al. en 1959 [9] han sido los más utilizados a la hora de realizar una extracción lipídica. Esto es debido a que son generalmente rápidos y efectivos para llevar a cabo una extracción lipídica a partir de la mayoría de muestras biológicas [10]. Ambos métodos fueron originalmente diseñados para realizar una extracción lipídica a partir de tejidos animales mediante el uso de una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) [8] y cloroformo-metanol 1:2 (v/v) [9], respectivamente (véase *figura 2*). A pesar de su generalizado uso, ambos métodos presentan ciertas limitaciones para su utilización en el campo de la lipidómica. Entre ellas destacan: (1) el incremento del riesgo de contaminación al recuperar la fase orgánica, ya que ésta queda debajo tras producirse la separación bifásica (véase *figura 2*), (2) la dificultad de automatizar la extracción debido a la posición de la fase orgánica, (3) el uso de reactivos de carácter carcinógeno como el cloroformo [10] y (4) la producción de fosgeno y

ácido clorhídrico como resultado de la descomposición del cloroformo, pudiendo producirse así la modificación de especies lipídicas lábiles [11].

1.2.2 Método de extracción lipídica basado en diclorometano

Debido a su carácter carcinogénico y al riesgo ambiental que supone su utilización, la legislación europea restringe el uso del cloroformo a una concentración atmosférica máxima de 2 ppm (10 mg/m^3) en el lugar de trabajo. Dada esta situación, se propuso el reemplazo del cloroformo por diclorometano en los protocolos de extracción lipídica. A pesar de su toxicidad, este disolvente puede emplearse hasta alcanzar unos niveles de concentración máximos de 50 ppm (177 mg/m^3) en el lugar de trabajo. Además, resulta menos dañino para el medio ambiente y más económico que el cloroformo. En este método, el diclorometano se emplea conjuntamente con el metanol en una proporción de 2:1 (v/v). Sin embargo, una vez más la fase orgánica queda en la parte inferior (véase *figura 2*) y por tanto el uso de diclorometano mantiene algunas de las limitaciones observadas para los métodos tradicionales de extracción lipídica, como son el riesgo de contaminación y la dificultad de automatización [12].

1.2.3 Método de extracción lipídica basado en metil-*tert*-butil éter

El método de extracción lipídica basado en el uso de metil-*tert*-butil éter (MTBE) emplea el reactivo MTBE-metanol-agua en un ratio 10:3:2,5 (v/v/v). La sustitución del cloroformo por MTBE supone grandes ventajas, entre las que destacan: (1) la presencia de la fase orgánica en la parte superior al producirse la separación bifásica, debido a la baja densidad de este reactivo (véase *figura 2*), (2) la no toxicidad ni carácter carcinogénico del MTBE y (3) su naturaleza no corrosiva y su estabilidad química, no habiendo por tanto riesgo de dañar las especies lipídicas lábiles [11]. Sin embargo, este método presenta aún ciertas limitaciones. En primer lugar, la miscibilidad del MTBE con el agua hasta un cierto grado provoca que la fase orgánica contenga una elevada cantidad de contenido acuoso. Esto se traduce en un mayor tiempo de evaporación de solventes (bajo flujo de nitrógeno) y un mayor número de aductos de sodio (en comparación con los métodos de extracción basados en cloroformo) acompañado de una posible supresión iónica [10]. Además, el elevado ratio solvente-muestra complica la automatización del proceso de extracción [13].

1.2.4 Método de extracción lipídica basado en butanol

El método de extracción lipídica más reciente introduce butanol en sustitución del cloroformo utilizado en los métodos tradicionales. La primera etapa de esta metodología consiste en añadir una mezcla de butanol-metanol (BUME) en una proporción 3:1 a la muestra de plasma a analizar. El butanol es capaz de disolver incluso los lípidos más apolares y es además poco soluble en muestras acuosas. Sin embargo, al mezclarlo con metanol se incrementa su polaridad, permitiendo así la formación de interacciones tanto polares como no polares con la muestra de plasma. Como consecuencia se obtiene una única fase (en la primera ronda de extracción), en la cual puede observarse una fina y blanquecina suspensión proteica producida tras la desnaturalización causada por la adición de BUME a la muestra. Debido a la superior polaridad del butanol con respecto al MTBE y al cloroformo, la cantidad de metanol necesaria

para la producción de dicha fase es significativamente inferior, lo que abarata los costes del proceso [13].

Tras la adición del reactivo BUME (o solvente 1) se procede a añadir el solvente 2, habiendo sometido la muestra a un proceso de mezclado previo. El objetivo del solvente 2 es promover la separación lipídica de la muestra mediante la producción espontánea de dos fases: (1) una fase orgánica superior (debido a la baja densidad del butanol) en la que residirán los lípidos y gran parte del butanol y (2) una fase acuosa inferior en la que residirán componentes polares (como glucosa o aminoácidos), el metanol y el *buffer* añadido (del cual se hablará más adelante). Esta separación de los componentes de BUME se producirá siempre de la misma manera, independientemente del solvente 2 utilizado. El solvente empleado con mayor frecuencia es el heptano, el cual puede ser reemplazado por di-isopropil éter (DIPE) sin que se observe ninguna alteración en los niveles de los lípidos extraídos. A pesar de que puede ser empleado en solitario, se observa una mayor recuperación de fosfolípidos (concretamente de lisofosfocolina) cuando se utiliza combinado con acetato de etilo (EtAc, en inglés) en una proporción 3:1 (v/v) [13].

Por último se procede a la adición de un *buffer* el cual favorece la formación de las dos fases descritas. El ácido acético es el *buffer* más utilizado, estando su proporción comprendida entre un 0,1 % y un 1,0 % [13]. A pesar de que no se han observado daños ocasionados por este ácido en los lípidos más lábiles, una aproximación más reciente ha sustituido el ácido acético por cloruro de litio obteniendo la misma eficiencia en la extracción y evitando así cualquier posibilidad de dañar parte de los lípidos presentes en la muestra [10].

El método BUME presenta una serie de ventajas con respecto al resto de los métodos descritos previamente, que lo convierten en uno de los más adecuados para llevar a cabo estudios de lipidómica. En primer lugar, carece de todas las limitaciones asociadas al uso del cloroformo y descritas previamente. Sin embargo, su principal fortaleza reside en el bajo ratio de volumen solvente-muestra necesario (inferior a 4:1), lo que lo hace compatible con un robot multipipeta (con puntas de 200 µL) capaz de llevar a cabo una extracción simultánea de 96 muestras. Además, la formación espontánea de la fase orgánica y acuosa implica que sea innecesario centrifugar las muestras, permitiendo así una automatización absoluta del proceso. Por último, se ha confirmado por comparación que la eficiencia de extracción del método BUME es prácticamente idéntica a la del método *Folch* (el cual es el método de extracción lipídica de referencia) [13].

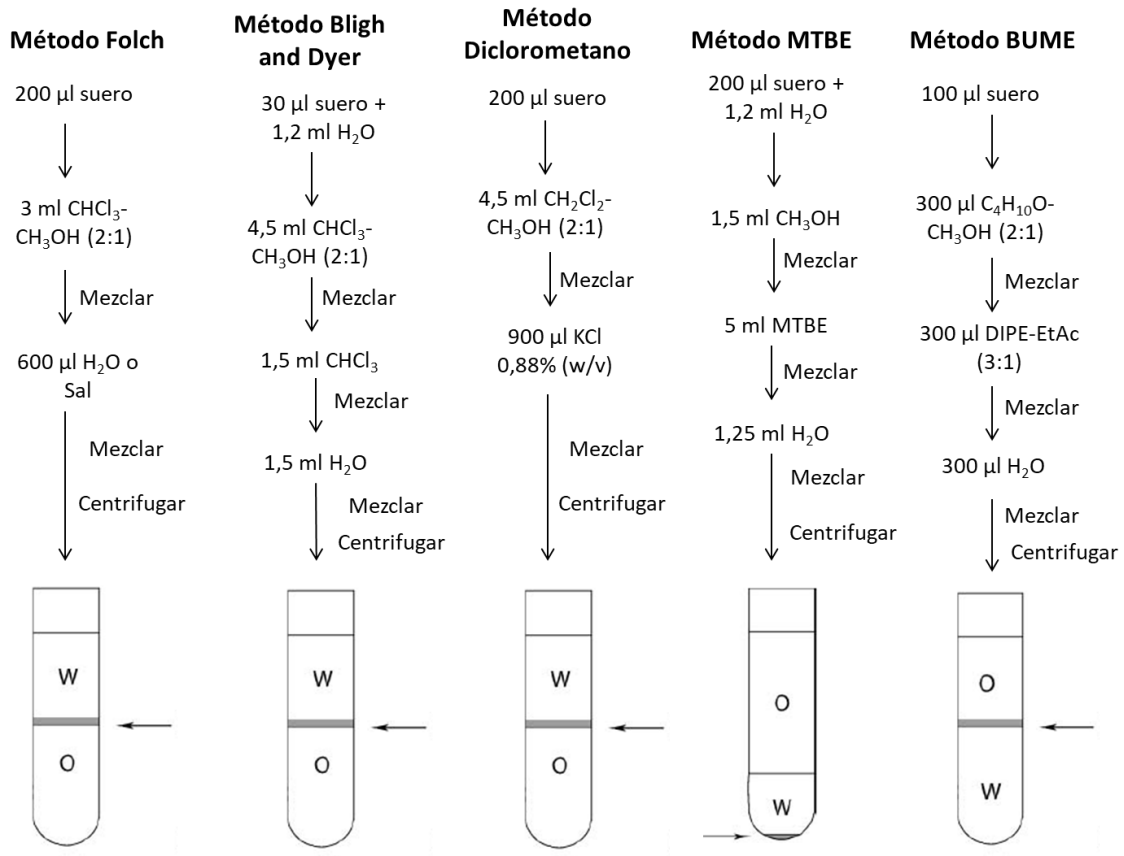


Figura 2. Principales métodos de extracción lipídica. Abreviaciones: Acuosa (W, en inglés), Orgánica (O, en inglés). Las flechas indican el lugar que ocupa la interfase proteica. Figura modificada a partir de [11].

1.3 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de RMN es una técnica generalmente empleada para la determinación estructural de compuestos orgánicos. Ésta solo puede ser aplicada a núcleos atómicos que presenten un número impar de protones, neutrones o de ambos. El hecho de cumplir esta característica atribuye a los núcleos en cuestión la capacidad de ser magnéticamente activos, es decir, de poseer espín (debido a que poseen carga positiva, y por tanto pueden rotar sobre su propio eje vertical). Entre estos elementos destacan el ^{1}H y ^{13}C, siendo la ^{1}H-RMN y la ^{13}C-RMN las espectroscopías más utilizadas. La RMN se basa en dicha capacidad magnética y coloca los núcleos magnéticamente activos bajo la influencia de un campo magnético B_O. Bajo la influencia de dicho campo, los espines (que se encontraban en orientaciones aleatorias) adquieren dos posibles posiciones: (1) los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo (denominándose estado de mínima energía α) o (2) los núcleos con espín negativo se orientan de manera opuesta al campo magnético (denominándose estado de máxima energía β). Tras la aplicación de B_O, la muestra es sometida a un breve e intenso pulso de radiación que se encuentra en la región de radiofrecuencia (rf). Dicha irradiación provoca un cambio en el estado energético en el que se encuentra cada núcleo, denominándose esta situación resonancia. Cuando los núcleos regresan a su estado inicial, emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β. El espectrómetro detecta estas señales y las registra en una gráfica de frecuencias frente a

intensidad, llamado espectro de RMN (véase *figura 4*). Las frecuencias de absorción varían para núcleos con entornos químicos diferentes, ya que estos núcleos pueden estar apantallados o desapantallados. A las variaciones en las frecuencias de absorción nuclear se las denomina desplazamiento químico, el cual se denota como δ y se expresa en partes por millón (ppm). La expresión de las frecuencias como desplazamientos químicos (en los espectros de RMN) permite que la posición de cada señal sea independiente de la magnitud del campo magnético aplicado. Por último, la intensidad de cada señal (y por tanto su área) es proporcional al número de núcleos que contribuyen a la misma [14].

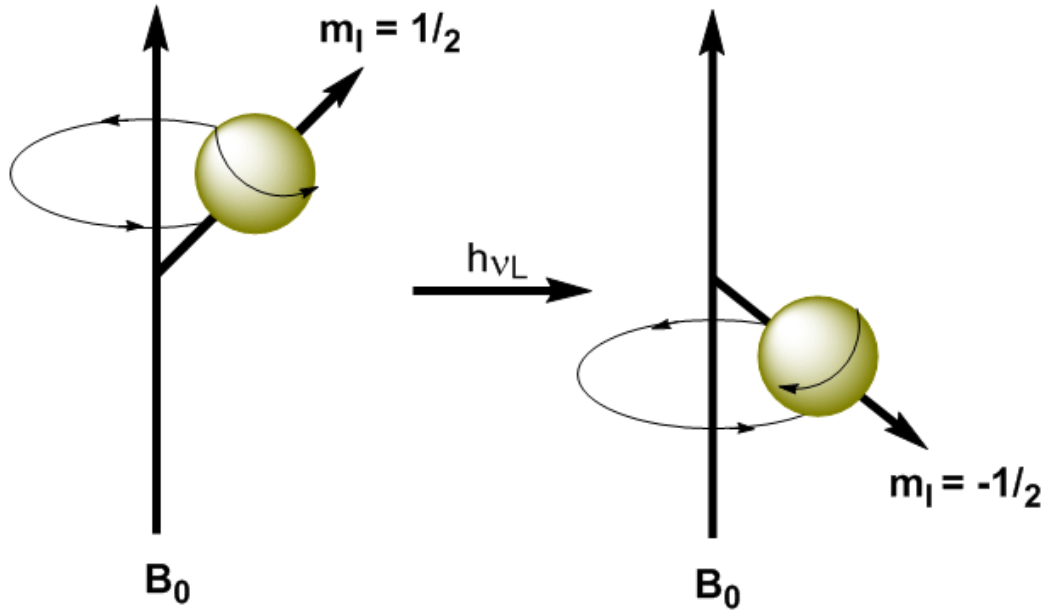


Figura 3. Niveles de energía presentados por los núcleos magnéticamente activos tras ser sometidos al efecto de un campo magnético. El estado α de energía (m = 1/2) se muestra representado en la imagen de la izquierda. En esta situación el núcleo magnéticamente activo presenta un movimiento de precesión sobre el eje Z, como consecuencia de estar bajo la influencia de un campo magnético. Al aplicársele un pulso de radiofrecuencia breve, el núcleo entra en resonancia y pasa al estado de alta energía β (m = -1/2), presentando en este caso una precesión en el plano XY. La frecuencia correspondiente a la diferencia entre ambos estados de energía será detectada por el espectrómetro. Abreviaciones: Campo magnético (B_0), Número cuántico (m), Pulso de radiofrecuencia ($h_{\nu L}$). Figura obtenida de [15].

1.4 Lipidómica

Los avances de la tecnología en el ámbito de las ciencias biológicas han dado lugar a una nueva era en lo que a investigación en biología de sistemas se refiere, mediante el desarrollo de las denominadas "ciencias ómicas". Este término incluye la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, las cuales permiten el análisis a gran escala de diversas moléculas en los organismos, favoreciendo así la comprensión de los mecanismos bioquímicos presentes en sistemas complejos. A pesar de los avances realizados en dichas ómicas, las herramientas necesarias para un comprensible análisis metabolómico se encuentran aún en proceso de desarrollo. La gran diversidad que presentan los numerosos metabolitos en cuanto a sus propiedades físico-químicas, junto con las posibles variaciones espacio-temporales en su concentración son los principales retos a los que deben enfrentarse las diferentes

metodologías dirigidas al estudio del metaboloma [4]. De entre las distintas clases de metabolitos existentes, los lípidos destacan como los que presentan una mayor diversidad. La lipidómica se trata de una ómica emergente que se perfila como una poderosa aproximación para comprender la biología lipídica [7].

El término "lipidómica" fue definido por Spener et al. [16] en 2003 como la determinación cuantitativa de todos los lípidos de un sistema celular en un momento concreto. Todo análisis lipidómico comienza con la extracción lipídica, para la cual existen diversos métodos disponibles (véase *apartado 1.2*), seguida de un procesamiento y análisis de los datos obtenidos. La MS es la herramienta más empleada en la lipidómica debido a su elevada sensibilidad y selectividad. En sus inicios (incluso antes de la definición del término lipidómica) la MS lipídica se realizaba por infusión directa para conseguir la ionización por electrospray (ESI, por sus iniciales en inglés), que pasó a denominarse *shotgun lipidomics.* En los años siguientes, dicha tecnología se acopló con la cromatografía líquida (LC, por sus iniciales en inglés) incrementándose así la selectividad y sensibilidad de los estudios lipidómicos basados en MS y dando lugar a la segunda herramienta más utilizada actualmente en lipidómica [6]. Sin embargo, otras tecnologías como la RMN son también empleadas en ensayos lipidómicos (véase *apartado 1.3.1*). En lo referente al procesamiento de los espectros obtenidos, existen diversos *softwares* para el análisis lipidómico basado en MS (véase *tabla 3*).

Tabla 3. Principales herramientas disponibles para el procesamiento de espectros lipídicos obtenidos por MS. De cada uno de ellos se especifica el nombre, el tipo de aproximación de MS que requiere, si proporciona o no valores cuantitativos de concentración, si ofrece o no resultados basados en el nivel molecular de la especie lipídica y su dirección web (excepto para *Lipid Search* que al no ser de acceso libre se incluye la casa comercial que lo distribuye). Tabla modificada a partir de [6].

Nombre	Tipo	Cuantificación	Estructura	URL
ALEX	Shotgun	Sí	No	http://www.msLipidomics.info
AMDMS-SL	Shotgun	Sí	Sí	https://pharmacometabolomics.duhs.duke.edu/resources-tools/sanfordburnham-medicalresearch-institute
LDA	LC	Sí	No	http://genome.tugraz.at/lda
LipidBlast	Ambos	No	Sí	http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast/
LipidQA	Shotgun	Sí	Sí	http://lipidqa.dom.wustl.edu/
Lipid Search	LC	Sí	Sí	Comercializado por Thermo Fisher Scientific
LipidXplorer	Shotgun	Sí	Sí	https://sourceforge.net/projects/lipidxplorer

A pesar de los avances actuales en el área de la lipidómica, existen aún numerosas limitaciones entre las que destacan: (1) la obtención y preparación de la muestra (debido a la sensibilidad de los lípidos a diversos factores analíticos, fisiológicos y ambientales), (2) la falta de automatización del análisis de los resultados obtenidos (debido a la gran diversidad

estructural) y (3) la falta de compuestos de referencia puros (lo que limita la cuantificación y verificación de compuestos poco comunes o minoritarios) [6]. Por tanto, el diseño de un estudio lipidómico requiere el control de la totalidad de los parámetros que puedan afectar a los resultados. Entre ellos destacan: (1) el procesamiento y (2) almacenamiento de la muestra, (3) los ciclos de congelación y descongelación a los que se ven sometidas las muestras, (4) el pretratamiento de la muestra, (5) el análisis de la muestra (MS, RMN…) y (6) diversos factores fisiológicos (edad, sexo, dieta…). Como consecuencia, los resultados obtenidos tras diferentes estudios lipidómicos no son siempre del todo comparables ni precisos. El desarrollo de un procedimiento experimental automatizado, el cual permita el control de estos factores, sería de gran utilidad en un futuro [17].

1.4.1 Utilización de la resonancia magnética nuclear en la lipidómica

Tal y como se ha mencionado previamente, la LC-MS es la principal técnica empleada en la lipidómica [18]. Sin embargo, esta herramienta debe competir con la presencia de múltiples analitos individuales (los cuales presentan diferentes masas y propiedades físicas) incluidos en una misma clase lipídica. En este respecto, la RMN presenta una gran ventaja, ya que mediante la integración de un pico (producido por uno o varios protones de un grupo voluminoso perteneciente a una clase lipídica) se puede determinar la concentración molar de toda esa clase (véase *anexo III*) independientemente de los sustituyentes exactos que presente [19]. Por tanto, esta técnica permite la cuantificación de las diversas especies lipídicas presentes en el plasma (véase *figura 1*) de una manera más directa y sencilla que la MS. Además de la cuantificación, la RMN puede utilizarse para la identificación de las diferentes especies lipídicas en base al desplazamiento químico que presenten sus señales (véanse *figura 4*) [20].

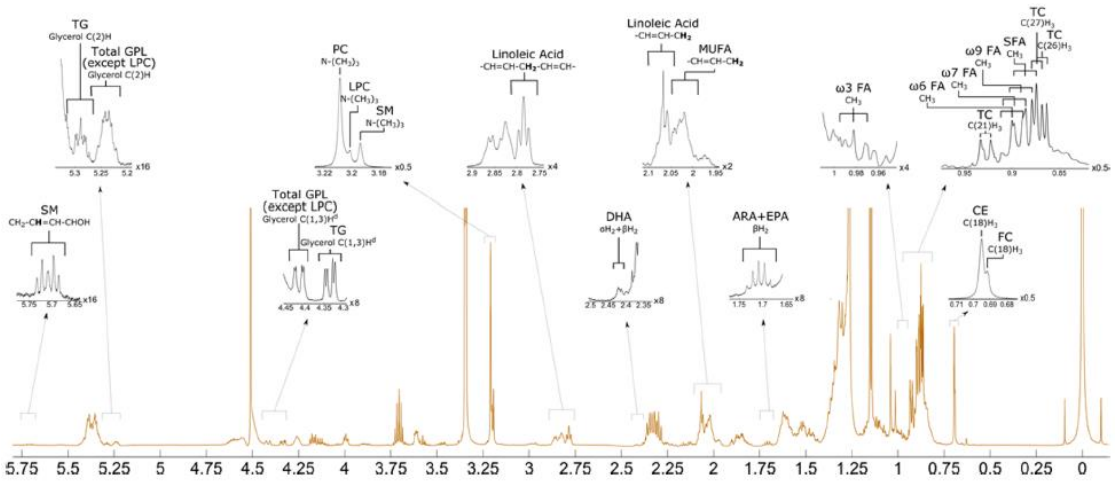


Figura 4. Espectro de extracto lipofílico plasmático obtenido por ^{1}H-RMN. En la figura se observan cada una de las señales correspondientes con las diferentes especies lipídicas presentes en la muestra. Abreviaciones: Colesterol libre (FC, por sus iniciales en inglés), Colesterol esterificado (EC, por sus iniciales en inglés), Colesterol total (TC, por sus iniciales en inglés), Ácidos grasos (FA, por sus iniciales en inglés), Ácidos grasos saturados (SFA, por sus iniciales en inglés), Ácido eicosapentanoico (EPA, en inglés), Ácido araquidónico (ARA, por en inglés), Ácido docosahexanoico (DHA, en inglés), Ácidos grasos monosaturados (MUFA, en inglés), Esfingomielina (SM, en inglés), Lisofosfocolina (LPC, en inglés), Fosfatidilcolina (PC, en inglés), Triglicéridos (TG, en inglés), Glicerofosfolípidos (GPL, en inglés). Figura obtenida de [21].

Adicionalmente, la RMN presenta una serie de características que la convierten en una herramienta atractiva para la realización de estudios lipidómicos: (1) la no necesidad de la derivatización o separación del compuesto, (2) su linealidad espectral que hace posible evitar el uso de múltiples estándares internos para su calibración cuantitativa [21], (3) un requerimiento mínimo de la preparación de la muestra [21], [22], (4) su carácter no destructivo que permite almacenar los lípidos intactos para futuros análisis y (5) su elevada reproducibilidad y sensibilidad [22]. A pesar de que el solapamiento de señales (debido a la interferencia provocada por otros componentes no lipídicos) podría resultar un problema, la RMN puede acoplarse a la LC o a una extracción lipídica previa (véase *apartado 1.2*) solucionando así esta limitación [20].

2. Objetivos

El estudio presentado en este trabajo de fin de grado tiene como objetivo principal validar un método de trabajo para análisis lipidómicos mediante RMN. Para su consecución se han establecido dos objetivos secundarios que se describen a continuación.

El primero de ellos consiste en determinar la manera más precisa de llevar a cabo la extracción lipídica mediante el método BUME. Entre las opciones disponibles se encuentran el método manual, la utilización del robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* (partiendo en ambos casos de suero intacto) y el empleo de dicho robot partiendo de suero liofilizado previamente (véase *apartado 3.1*).

En segundo lugar se pretende evaluar la estabilidad de los diversos grupos lipídicas presentes en la muestra, habiéndolas almacenado a diferentes tiempos (1 día, 1 semana y 2 meses) y temperaturas (5°C, -20°C y -80°C), mediante espectroscopía de RMN (véase *apartado 3.2*).

3. Metodología

3.1 Estudio de precisión de tres procedimientos de extracción lipídica

3.1.1 Preparación de los *pools*

En primer lugar, se procedió a preparar tres *pools* de suero a partir de muestras ya analizadas y congeladas a -20°C. Cada uno de los *pools* tenía como objetivo representar un perfil lipídico diferente. Por este motivo se emplearon los criterios de inclusión incluidos en la *tabla 4*. El primero de los *pools* pretendía reflejar un perfil lipídico bajo en triglicéridos (TG) y colesterol unido a la lipoproteína de baja densidad (colesterol-LDL, por sus iniciales en inglés). Los dos *pools* restantes pretendían reflejar un perfil lipídico medio y elevado, respectivamente. Tras haber preparado los tres *pools* en tubos *falcon* de 15 ml, se procedió a preparar alícuotas de 250 µl en *eppendorfs* de 2 ml. Se prepararon un total de 12 alícuotas de 250 µl por *pool*, además de una alícuota adicional de 200 µl para cada uno de los *pools*. Dichas alícuotas se mantuvieron congeladas a -20°C *overnight*.

Tabla 4. Criterios de inclusión para cada *pool*. La tabla incluye los valores de concentración (en mg/dl) establecidos como criterios de inclusión para cada *pool*.

	Pool		
	Bajo	**Medio**	**Alto**
Triglicéridos	< 130	130 - 150	> 150
Colesterol-LDL	< 100	100 - 130	> 130

3.1.2 Determinación de la concentración de colesterol de la muestra

Las alícuotas de 200 µl se emplearon para determinar la concentración total del colesterol de cada *pool*. Para ello se llevó a cabo el test *Liposcale*, el cual ha sido desarrollado por la empresa *Biosfer Teslab* (véase [23]). Para la realización de dicho test se partió de 200 µl de suero, los cuales se diluyeron con 300 µl de *buffer* fosfato 50 mM y 50 µl de óxido de deuterio (D_2O). Para realizar esta dilución se empleó el manipulador de muestras *Gilson*. Una vez finalizada la preparación de las muestras, se procedió a introducirlas en el *SampleJet* del espectrómetro *Bruker Avance III 600*. La programación del análisis de las tres muestras se realizó con el *software IconNMR* el cual permite la adquisición (totalmente automatizada) de los espectros de RMN, siendo necesarios un total de 15 minutos para el análisis de cada muestra. La determinación de la concentración del colesterol total de cada *pool* es necesaria para normalizar las áreas de las señales observadas en los espectros lipídicos a unidades de concentración (véase *anexo III*).

3.1.3 Extracción lipídica manual partiendo de suero intacto

La extracción se llevó a cabo mediante el uso del método BUME (véase *figura 2*). En primer lugar se descongelaron cuatro alícuotas pertenecientes a cada uno de los *pools*. A partir de cada alícuota se prepararon dos réplicas de 100 µl en *eppendorfs* de 2 ml (ya que el método BUME está estandarizado para dicho volumen). Una vez obtenidas las réplicas se añadieron 300 µl de BUME 3:1 (v/v) a cada una de ellas. Tras ser sometidas a un proceso de homogenización mediante el empleo de un vórtex, pudo observarse una suspensión blanca (a modo de *pellet*) correspondiente a la fracción proteica de la muestra. A continuación se adicionaron 300 µl de DIPE:EtAc en una proporción 3:1 (v/v) y de nuevo se procedió a vortexear las muestras. Entonces, se añadieron 300 µl de agua desionizada (la cual actúa como *buffer*). Tras un último proceso de vortexeado, se observó la formación espontánea de dos fases (una orgánica superior y una acuosa inferior), así como una interfase espumosa. El elevado grosor de la interfase hizo necesaria la centrifugación de las muestras durante 5 minutos, a 4°C y a 35000 rpm. Tras la centrifugación la separación observada resultó suficiente para la extracción de 360 µl de fase orgánica, los cuales fueron transferidos a tubos de cristal de 1 ml. Con el objetivo de maximizar la recuperación lipídica, se llevaron a cabo dos rondas de extracción adicionales. En ellas únicamente se añadieron 300 µl y 250 µl de DIPE:EtAc,

respectivamente. Tras los procesos de homogeneización y centrifugación correspondientes se recuperaron 320 µl y 200 µl de fase orgánica, obteniéndose un volumen final de 880 µl de fase orgánica. Los tubos contenedores de esta fase fueron sometidos a un proceso de secado bajo flujo de nitrógeno (con una duración total de cuatro horas), con el objetivo de eliminar los solventes de extracción. Por último, se llevó a cabo la reconstitución de la fracción lipídica restante con 700 µl de solvente deuterado de reconstitución cloroformo-metanol-agua ($CDCl_3$:CD_3OD:D_2O) en una proporción 16:7:1 (v/v). A dicho solvente se le añadió una gota de tetrametilsilano (TMS), el cual actúa como señal de referencia en el espectro de RMN. Como resultado se obtuvieron un total de 12 tubos de RMN con 700 µl de solvente de reconstitución (en el cual se encuentran disueltos los lípidos purificados). Los tubos fueron cerrados con tapones carentes de agujeros (para evitar así la evaporación del solvente) e introducidos en el *SampleJet* del espectrómetro para proceder a su análisis espectrométrico.

3.1.4 Extracción lipídica mediante el uso del robot partiendo de suero intacto

Otras cuatro alícuotas se emplearon para llevar a cabo la extracción lipídica, pero en este caso utilizando el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo*. Éste es un robot multipipeta capaz de extraer un total de 96 muestras de manera simultánea. Las pipetas utilizadas por este robot tienen una capacidad de 200 µl, sin embargo, se partió de nuevo de réplicas de 100 µl de muestra. El proceso de extracción es idéntico al explicado en el apartado *3.1.3* a excepción de que la homogenización se realiza mediante un proceso de *up and down* realizado por el propio robot. Es necesaria la colocación de las muestras, los tubos de cristal colectores de la muestra, las pipetas y los disolventes utilizados (BUME, DIPE:EtAc y D_2O) en posiciones concretas, de manera que el robot pueda actuar correctamente. Dicha distribución se muestra en la *figura suplementaria 2*. El procedimiento posterior para la obtención de los espectros de RMN es idéntico al explicado en el *apartado 3.1.3*.

3.1.5 Extracción lipídica mediante el uso del robot partiendo de suero liofilizado

Por último, las cuatro alícuotas restantes se extrajeron de manera idéntica a la explicada en el *apartado 3.1.4*. Sin embargo, las alícuotas de 200 µl fueron sometidas a un proceso de liofilización previo. La fracción restante del proceso de liofilización fue reconstituida en 100 µl de tampón fosfato 50 mM y se procedió a su extracción con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo*. La metodología seguida tras la extracción fue la misma que en los dos procedimientos previos.

3.1.6 Obtención y procesamiento de espectros de RMN

Tras la introducción de los tubos de RMN en un *rack* libre del *SampleJet* del espectrómetro *Bruker Avance III 600*, se llevó a cabo la obtención de los espectros de RMN. La configuración del espectrómetro se realizó con el *software TopSpin*. Se operó a una frecuencia de 600,2 MHz y a una temperatura de 286 K. El pulso aplicado fue de 90° y 64 scans. La medida de las muestras se realizó con el s*oftware IconNMR*. Por último, el procesamiento de los espectros obtenidos se realizó con el *software LipSpin* [21]. Además de visualizar los espectros esta

herramienta permite deconvolucionar las señales lipídicas, obteniéndose de esta manera el área correspondiente a cada una de ellas.

3.2 Evaluación de la estabilidad lipídica a diferentes temperaturas

3.2.1 Obtención de las muestras de suero

En primer lugar se reclutaron cinco voluntarios para ser sometidos a una extracción sanguínea de 5 ml (la cual se llevó a cabo en el Hospital Universitario Sant Joan de Reus). Las características de los individuos se muestran en la *tabla suplementaria 2*. Tras la obtención de las muestras sanguíneas se procedió a su centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, obteniéndose 3,5 ml de suero por cada individuo. A partir del suero obtenido para cada individuo se prepararon alícuotas de 220 µl para cada uno de los experimentos a desarrollar (véase *tabla 5*). Previamente, se obtuvo una alícuota de suero de 200 µl de cada individuo. A éstas se les aplicó el test *LipoScale* (experimento 1) tal y como se ha detallado en el *apartado 3.1.2*.

3.2.2 Almacenamiento de las muestras a diferentes temperaturas

En la *tabla 5* se resume el procedimiento experimental llevado a cabo. En ella también se indican la denominación dada a los diferentes experimentos y alícuotas, así como las temperaturas y los tiempos de almacenado de cada alícuota.

3.2.3 Extracciones lipídicas

Todas las extracciones se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento manual y el método BUME tal y como se ha descrito previamente. El procesamiento posterior a la extracción también fue el mismo que el utilizado para las determinaciones anteriores.

Tabla 5. Programación del protocolo experimental seguido. En la tabla se especifica cada experimento, las alícuotas preparadas (por cada individuo), la temperatura de almacenamiento, el tiempo de almacenamiento y la fecha en la que se llevó a cabo la extracción. Las alícuotas marcadas en rojo no pudieron prepararse porque no se dispuso de suficiente volumen.

Experimento	Alícuotas	Temperatura	Tiempo (días)	Extracción
2	E2A1 E2A2	Ambiente	0	04/12/2017
3	E3A1 E3A2	5	1	05/12/2017
4	E4A1 E4A2	5	7	11/12/2017
5	E5A1 E5A2	5	64	06/02/2018

Tabla 5. (Continuación).

Experimento	Alícuotas	Temperatura	Tiempo (días)	Extracción
6	E6A1 E6A2	-20	1	05/12/2017
7	E7A1 E7A2	-20	7	11/12/2017
8	E8A1 E8A2	-20	64	06/02/2018
9	E9A1 E9A2	-80	1	05/12/2017
10	E10A1 E10A2	-80	7	11/12/2017
11	E11A1 E11A2	-80	64	06/02/2018

3.2.3 Obtención y procesamiento de los espectros de RMN

Se emplearon los mismos *softwares* (descritos en el *apartado 3.1.6*) para la obtención y el procesamiento de los espectros de RMN obtenidos para los diferentes experimentos incluidos en la *tabla 5*.

4. Resultados

4.1 Estudio de precisión de tres procedimientos de extracción lipídica

En este estudio se realizó el análisis de lípidos mediante ^{1}H-RMN comparando tres procedimientos de extracción lipídica diferentes. Se cuantificaron las diferentes clases lipídicas incluidas en la *tabla suplementaria 3* mediante la deconvolución de las señales de los espectros y posterior normalización de las áreas a unidades de concentración (véase *anexo III*). Con el objetivo de determinar el procedimiento más preciso de extracción se calcularon la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) de cada variable lipídica.

El primer procedimiento de extracción lipídica utilizado fue el manual. Los resultados obtenidos para el mismo se incluyen en la *tabla 6*. Tal y como puede observarse, los coeficientes de variación obtenidos para cada especie lipídica son muy bajos (comprendidos entre un 0,66% y un 5,77%). Sin embargo, para el caso de la lisofosfocolina (LPC, en inglés) se alcanza un valor de 18,52% en el *pool 3*. Este efecto es probablemente consecuencia de un error de deconvolución. La señal de la LPC aparece a 3,201 ppm en el espectro, entre la señal de la esfingomielina (SM, en inglés) y de la fosfatidilcolina (PC, en inglés) que aparecen a 3,192 ppm y 3,208 ppm respectivamente (véase *figura 5*). Un estudio previo [24] llevado a cabo por la Universidad Rovira i Virgili demostró que se producía un desplazamiento de la señal de la LPC, alejándose ésta de la señal de la PC, cuando se incrementaba la presencia de agua en la

muestra. Dado que en la reconstitución de las muestras se empleó D_2O, pequeñas diferencias en el pipeteo durante dicho proceso pudieron producir variaciones en el desplazamiento de la señal de LPC (la cual es muy sensible a este efecto). Como consecuencia, la señal correspondiente a alguna alícuota podría estar ligeramente desplazada con respecto a las del resto de las alícuotas (a pesar de haber sido alineadas) y por tanto el área (y así la deconvolución) de la señal desplazada se vería afectada, lo que introduciría variación. Dicha hipótesis explicaría el elevado CV observado para la LPC.

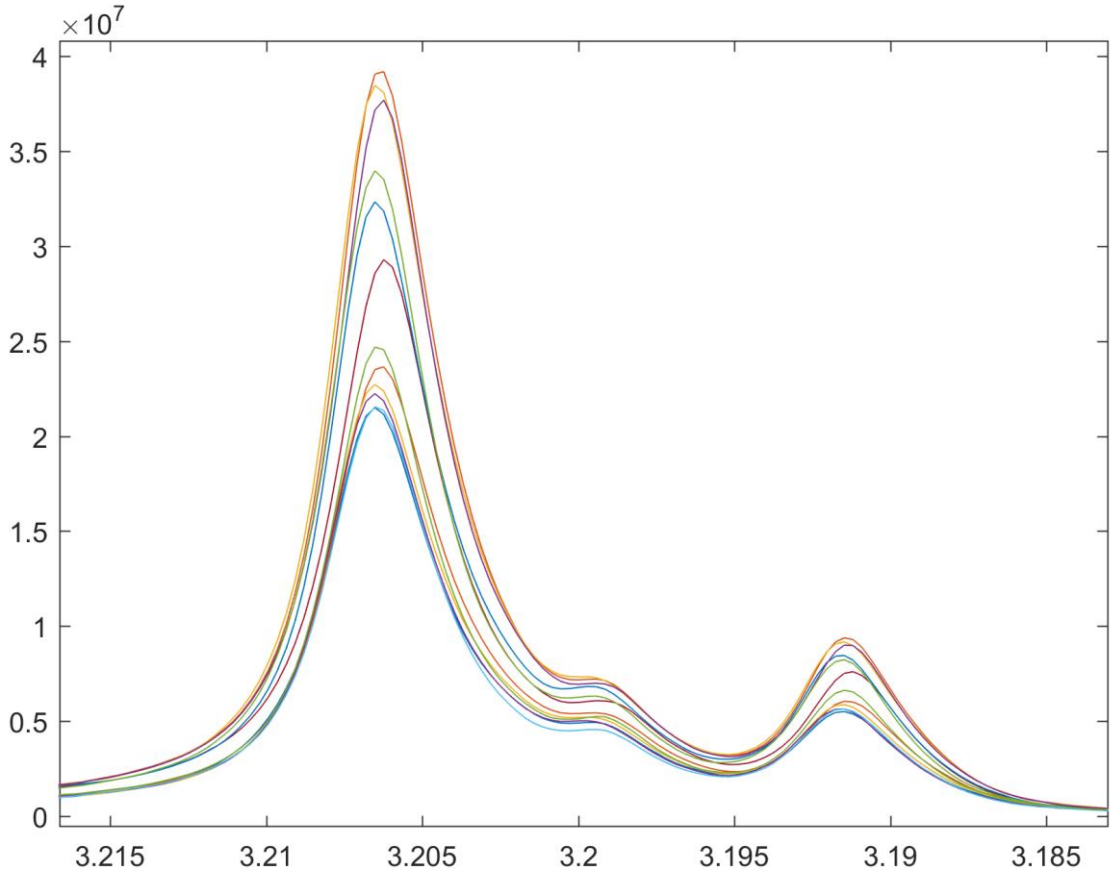


Figura 5. Región del espectro de RMN en la que se encuentran las señales de PC, LPC y SM. En orden de izquierda a derecha las señales son las correspondientes a PC, LPC y SM. Figura generada mediante el *software LipSpin*.

Tabla 6. Resultados obtenidos para las extracciones manuales. Se incluyen la concentración media (en mmol/l), la desviación estándar y el coeficiente de variación (en %) obtenidos para cada una de las especies lipídicas. Abreviaciones: Coeficiente de variación (CV), Colesterol esterificado (CE), Colesterol libre (CL), Triglicéridos (TG), Fosfoglicéridos (PG, en inglés), Fosfatidilcolina (PC, en inglés), Esfingomielina (SM, en inglés) y Lisofosfocolina (LPC, en inglés).

		Manual		
		Media (mmol/l)	**Desviación estándar**	**CV (%)**
Pool 1	**CE**	2.60	0.03	1.24
	CL	1.56	0.03	2.06
	Linoleico	1.68	0.08	4.57
	TG	0.91	0.05	5.66
	PG	2.12	0.05	2.13
	PC	1.85	0.06	3.06
	SM	0.47	0.01	2.83
	LPC	0.47	0.01	3.13
Pool 2	**CE**	3.51	0.02	0.60
	CL	1.82	0.02	1.16
	Linoleico	2.01	0.09	4.65
	TG	1.66	0.10	5.77
	PG	2.27	0.07	3.00
	PC	2.15	0.02	0.99
	SM	0.52	0.01	1.70
	LPC	0.36	0.01	3.54
Pool 3	**CE**	4.06	0.09	2.10
	CL	2.20	0.09	3.87
	Linoleico	2.48	0.04	1.76
	TG	2.40	0.05	2.04
	PG	2.81	0.02	0.54
	PC	2.58	0.08	3.05
	SM	0.56	0.01	2.53
	LPC	0.37	0.07	18.52

En la *tabla 7* se muestran los resultados obtenidos para las extracciones realizadas con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo*. Tal y como puede observarse los CV obtenidos para este procedimiento son superiores a los observados en las extracciones manuales, siendo la LPC la que presenta un mayor CV. La principal explicación es la variabilidad introducida durante el aspirado de fase orgánica, ya que se observó que la aguja del robot bajaba una distancia ligeramente superior a la deseada aspirando una pequeña parte de interfase. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de optimizar el protocolo de extracción diseñado para el robot, reduciendo la distancia de bajado de la aguja para evitar así la aspiración de interfase. Dicha excesiva recuperación de fase orgánica se ve también evidenciada en una mayor concentración de glicerofosfolípidos y esfingolípidos, los cuales por

polaridad ocupan la posición más cercana a la interfase. Al igual que en las extracciones manuales, la LPC vuelve a presentar un CV muy superior al resto de las especies lipídicas analizadas. La explicación a este hecho es la misma que la dada previamente.

Tabla 7. Resultados obtenidos para las extracciones con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo.* Se incluyen la concentración media (en mmol/l), la desviación estándar y el coeficiente de variación (en %) obtenidos para cada una de las especies lipídicas. Abreviaciones: Coeficiente de variación (CV), Colesterol esterificado (CE), Colesterol libre (CL), Triglicéridos (TG), Fosfoglicéridos (PG, en inglés), Fosfatidilcolina (PC, en inglés), Esfingomielina (SM, en inglés) y Lisofosfocolina (LPC, en inglés).

		Robot		
		Media (mmol/l)	**Desviación estándar**	**CV (%)**
Pool 1	**CE**	2.35	0.08	3.19
	CL	1.81	0.08	4.16
	Linoleico	1.81	0.18	9.87
	TG	0.85	0.08	9.78
	PG	2.70	0.06	2.24
	PC	2.40	0.08	3.28
	SM	0.55	0.04	7.76
	LPC	0.53	0.12	23.23
Pool 2	**CE**	3.15	0.17	5.25
	CL	2.18	0.17	7.59
	Linoleico	2.11	0.14	6.82
	TG	1.56	0.18	11.29
	PG	2.90	0.12	4.01
	PC	2.68	0.17	6.39
	SM	0.62	0.05	7.38
	LPC	0.42	0.05	12.08
Pool 3	**CE**	3.53	0.29	8.15
	CL	2.73	0.29	10.54
	Linoleico	2.63	0.19	7.16
	TG	2.25	0.18	8.14
	PG	3.44	0.08	2.40
	PC	2.61	0.63	24.01
	SM	0.67	0.03	4.98
	LPC	0.93	0.57	61.22

Por último, en la *tabla 8* se muestran los resultados obtenidos para las extracciones realizadas con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo*, partiendo de suero liofilizado y resuspendido en 100 µl de tampón fosfato 50 mM (véase *apartado 3.1.5*). Tal y como puede observarse, los CV obtenidos se aproximan más a los observados para el método manual. Esto es debido a que se redujo la distancia de bajado de la aguja y en este caso sólo aspiró interfase durante la tercera ronda de extracción, reduciendo así la variabilidad observada. De hecho,

para algunas especies lipídicas el CV de variación obtenido por este procedimiento es incluso inferior que el obtenido tras una extracción manual (véase *tabla 8*). Una vez más, se observan concentraciones superiores (a las obtenidas por el procedimiento manual) y similares (a las obtenidas mediante la extracción con el robot) en lo que a glicerofosfolípidos y esfingolípidos se refiere. Este hecho pone de manifiesto que se consigue una mayor recuperación de este grupo lipídico mediante el uso del robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* que con el procedimiento manual.

Tabla 8. Resultados obtenidos para las extracciones con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* de muestras previamente liofilizadas. Se incluyen la concentración media (en mmol/l), la desviación estándar y el coeficiente de variación (en %) obtenidos para cada una de las especies lipídicas. Se destacan en rojo aquellos CV que son inferiores a los obtenidos para las mismas especies lipídicas mediante el procedimiento de extracción manual. Abreviaciones: Coeficiente de variación (CV), Colesterol esterificado (CE), Colesterol libre (CL), Triglicéridos (TG), Fosfoglicéridos (PG, en inglés), Fosfatidilcolina (PC, en inglés), Esfingomielina (SM, en inglés) y Lisofosfocolina (LPC, en inglés).

		Robot + Liofilización		
		Media (mmol/l)	**Desviación estándar**	**CV (%)**
Pool 1	**CE**	2.28	0.05	2.03
	CL	1.88	0.05	2.47
	Linoleico	1.89	0.09	4.54
	TG	0.81	0.09	10.64
	PG	2.99	0.05	1.52
	PC	2.72	0.06	2.14
	SM	0.62	0.01	1.98
	LPC	0.62	0.01	1.79
Pool 2	**CE**	2.90	0.16	5.64
	CL	2.43	0.16	6.74
	Linoleico	2.29	0.17	7.46
	TG	1.51	0.11	7.15
	PG	3.40	0.07	1.93
	PC	3.05	0.04	1.22
	SM	0.71	0.02	2.28
	LPC	0.60	0.05	7.55
Pool 3	**CE**	3.41	0.10	2.90
	CL	2.85	0.10	3.47
	Linoleico	2.70	0.08	2.87
	TG	2.25	0.08	3.50
	PG	3.76	0.16	4.26
	PC	3.38	0.14	4.06
	SM	0.72	0.03	4.54
	LPC	0.56	0.03	4.84

Sin embargo, mediante este último procedimiento se observan intensidades muy inferiores en los espectros de RMN (véase *figura 6*). Este hecho es probablemente debido a la saturación de la fase orgánica al ser, todo el material seco resultante de la liofilización, reconstituido en únicamente 100 µl de tampón fosfato 50 mM. A pesar de que este efecto es corregible mediante la normalización por la concentración de colesterol externa, se demuestra que la liofilización previa de las muestras de suero no reporta ninguna ventaja durante el proceso de extracción lipídica.

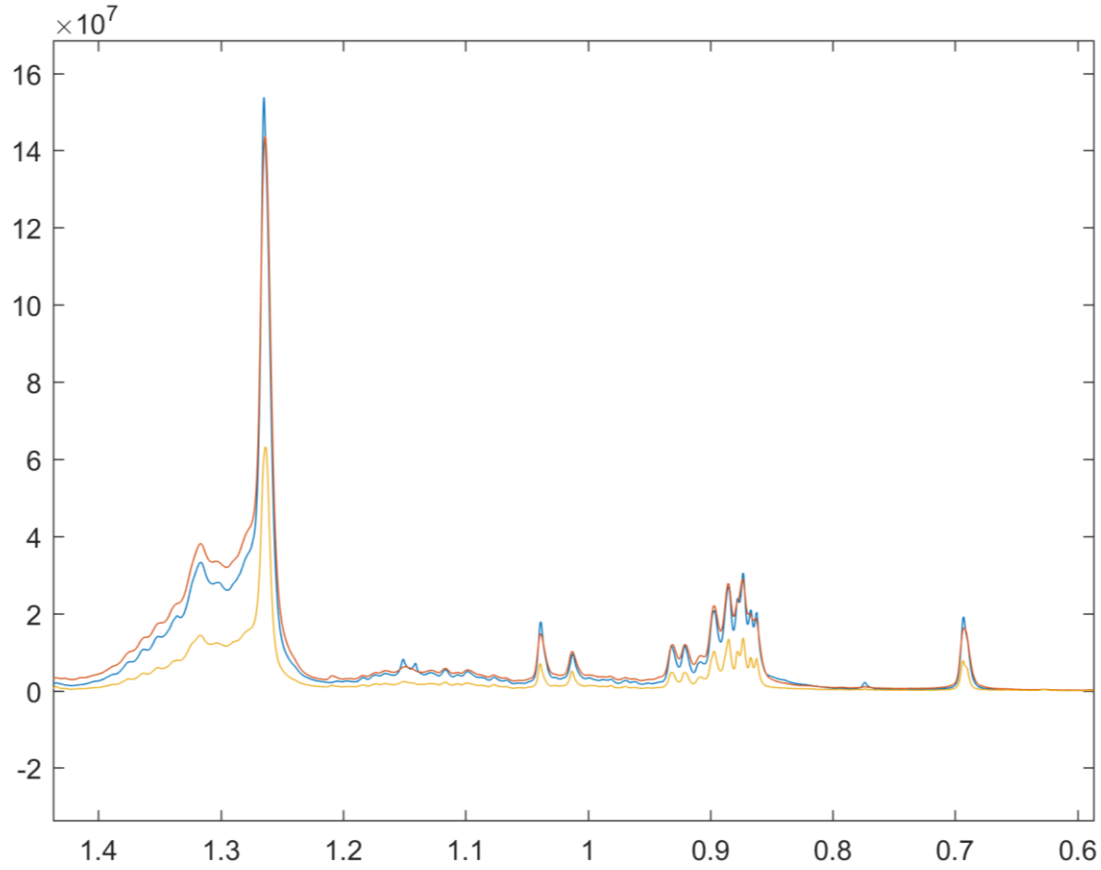


Figura 6. Región de los espectros de RMN obtenidos para la alícuota 1 del *pool 1*. En la imagen se encuentran superpuestas las señales obtenidas para la alícuota 1 del *pool 1* extraída por los tres procedimientos desarrollados en el texto. El color azul hace referencia a la alícuota extraída por el procedimiento manual, el rojo a la extraída mediante el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* y la amarilla a la extraída de la misma manera pero habiendo sido liofilizada previamente. Figura generada mediante el *software LipSpin*.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que el método manual es el más preciso para llevar a cabo las extracciones lipídicas. Por este motivo, fue éste el procedimiento utilizado en las extracciones llevadas a cabo para las pruebas de estabilidad.

4.2 Evaluación de la estabilidad lipídica a diferentes temperaturas

Una vez determinado el procedimiento de extracción más adecuado, se procedió a la evaluación de la estabilidad de las diversas especies lipídicas tras ser mantenidas a 5°C, -20°C y -80°C durante 1 día, 1 semana y 2 meses.

Sin embargo, debido a que se contaminó el solvente de reconstitución utilizado para el análisis de las muestras almacenadas durante 2 meses, estos espectros no pudieron procesarse y por tanto no se dispone de los resultados obtenidos para dicha condición. A la hora de llevar a cabo el análisis de las muestras se observó que el reactivo estaba fuertemente contaminado con EtAc (véase *figura 7*). La hipótesis más probable respecto al origen de la contaminación es el empleo de material de vidrio contaminado con EtAc para la preparación del solvente de reconstitución. Dado que la RMN es muy sensible a los contaminantes, se observaba una señal intensa de estos solventes en el espectro que solapaban con las señales de lípidos impidiendo su cuantificación.

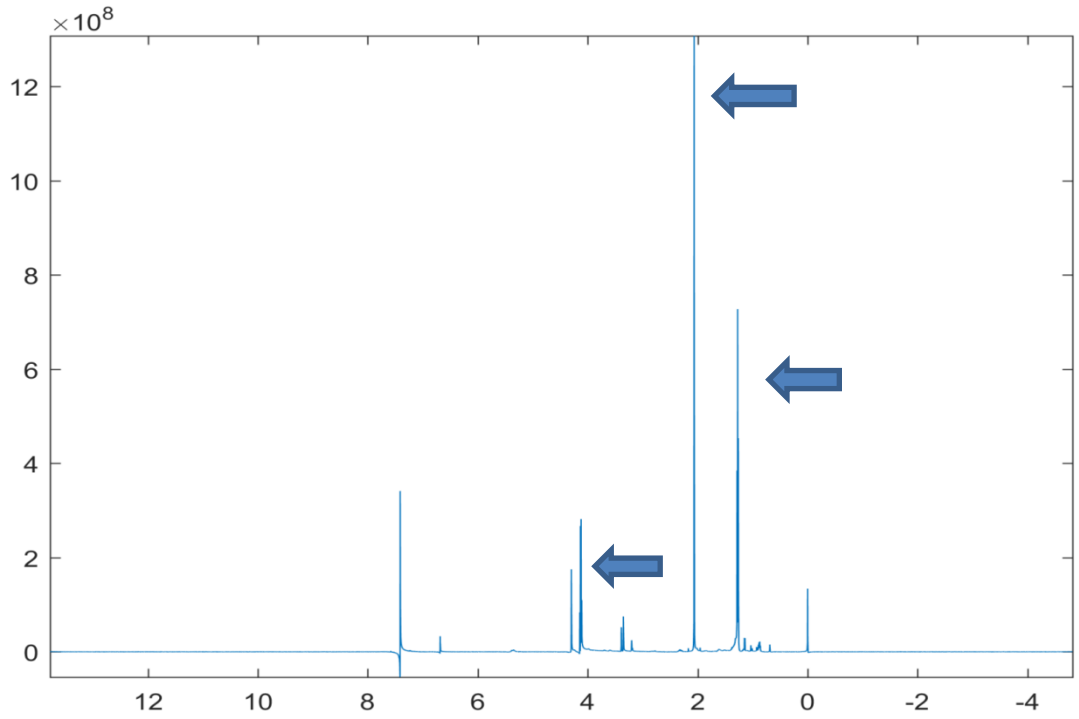


Figura 7. Espectro representativo de las muestras almacenadas durante dos meses. En el espectro pueden observarse señales muy intensas que se corresponden con las propias del acetato de etilo. Dichas señales se encuentran señaladas con flechas azules. Figura generada mediante el *software LipSpin*.

Los extractos lipídicos conservados a 5°C, -20°C y -80°C se analizaron a diferentes tiempos: 1 día (experimentos 3, 6 y 9), 1 semana (experimentos 4, 7 y 10) y 2 meses (experimentos 5, 8 y 11). Sin embargo, tal y como se ha comentado previamente, los espectros obtenidos para los experimentos 5, 8 y 11 no pudieron analizarse. Además, el *shimming* falló para los experimentos 4 y 7 (véase *figura 8*). El *shimming* ajusta la homogeneidad del campo magnético generado por la bovina, eliminando así las señales resultantes de campos magnéticos adicionales y no homogéneos. Por tanto, muestras diferentes requerirán un ajuste previo del *shimming*. En este caso, la adquisición de los espectros se llevó a cabo de forma automatizada al usar un robot *SampleJet* acoplado al espectrómetro (véase *figura suplementaria 3*). Debido a la diversidad de las muestras presentes en el *SampleJet*, es probable que el *shimming* que se programó para el espectrómetro no fuera el adecuado para los extractos lipídicos (ya que estos eran las únicas muestras de esta naturaleza). Como consecuencia, solo se podrá analizar (para esta condición) la estabilidad presentada tras un día de almacenamiento.

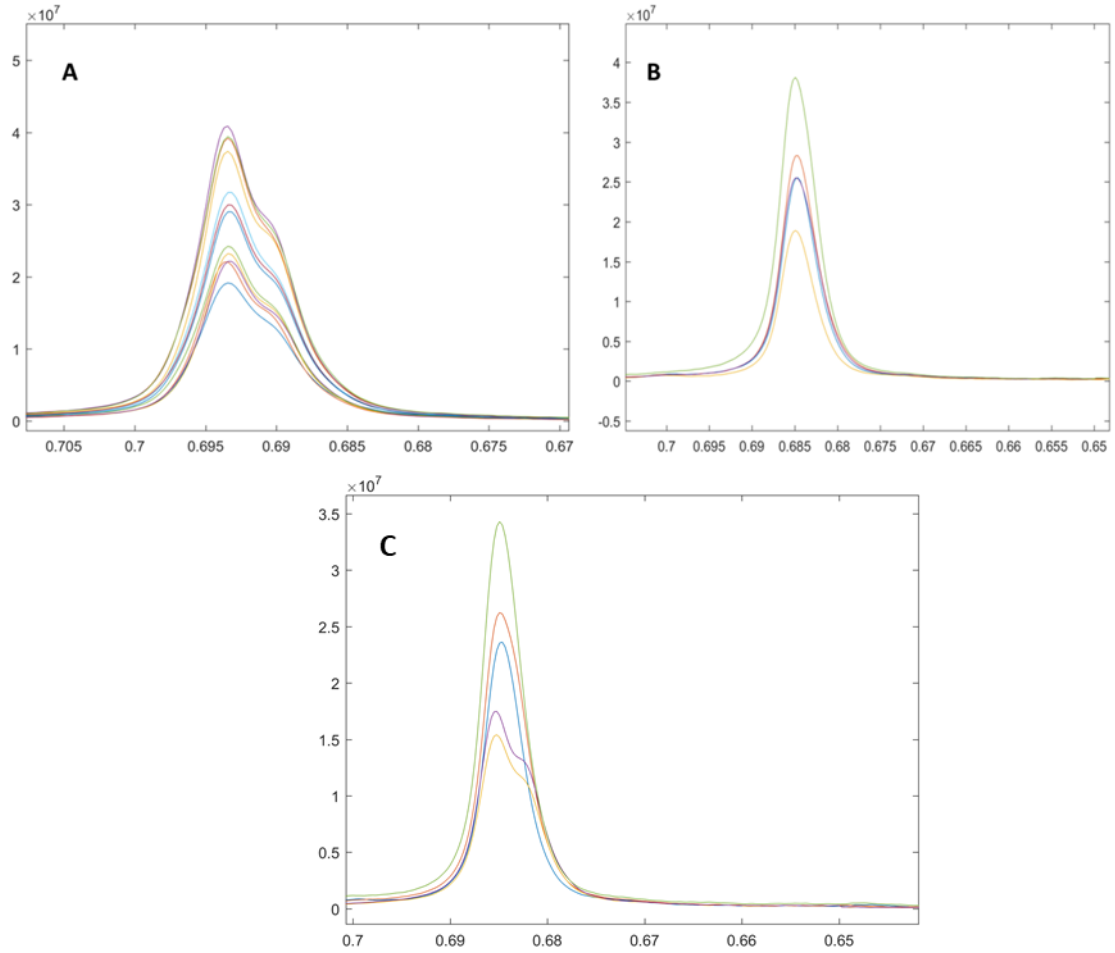


Figura 8. Error en el *shimming* observado para la señal del colesterol. A) Señal del colesterol C_{18}-H_3 formada por sus dos singletes característicos. **B)** Señal del colesterol C_{18}-H_3 obtenida en el experimento 4 tras un error en el *shimming*. Como consecuencia de este error, se observa un único pico con una anchura superior. **C)** Señal del colesterol C_{18}-H_3 obtenida en el experimento 7 tras un error en el *shimming*. En este caso puede observarse como solo fue correcto para los individuos 3 y 4. Figura generada mediante el *software LipSpin*.

En la *figura 9* se muestran los resultados obtenidos para las especies lipídicas mantenidas a 5°C. Por otro lado, en las *figuras 10* y *11* se incluyen los resultados referentes a las especies lipídicas almacenadas a -20°C y -80°C, respectivamente. A continuación, los resultados obtenidos se comentarán de manera colectiva en vez de realizar un análisis individual para cada condición. La principal razón de esta manera de proceder es el hecho de haber obtenido resultados muy inesperados.

Este estudio se planteó con el objetivo de confirmar la estabilidad de las muestras lipídicas tras su almacenamiento a las temperaturas de estudio. Por tanto, se esperaba obtener resultados que reflejaran dicha estabilidad. Los resultados deberían reflejar que las concentraciones de las diversas especies lipídicas se mantuvieran estables a las diferentes temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, en un estudio reciente [17] se observó un incremento en la concentración de LPC de muestras de plasma almacenadas a temperatura ambiente. Este incremento es consecuencia de la degradación de los fosfolípidos presentes en las muestras. Por el contrario, otro estudio [25] mostraba la situación opuesta (una reducción de su concentración) para el caso de la LPC de muestras de plasma almacenadas a -80°C. Dicha

degradación se atribuye a la excesiva sensibilidad de la lisofosfocolina, ya que el grupo polar colina es susceptible a la hidrólisis.

Sin embargo, tras la observación de las *figuras 8, 9* y *10*, se puede concluir que la estabilidad esperada no se aprecia en los resultados obtenidos. De hecho, lo que es realmente sorprendente es que los resultados tampoco muestran el efecto contrario (un proceso de degradación lipídica), sino que en la mayoría de los casos el efecto observado cambia para cada individuo y para cada especie lipídica, pero se mantiene (en su gran mayoría) para cada condición de temperatura. Es decir, los individuos presentan el mismo comportamiento para cada especie lipídica en las diferentes condiciones de temperatura, pero este comportamiento no coincide entre los diversos individuos. La explicación de la obtención de estos resultados podrían ser los posibles errores experimentales cometidos durante la extracción y/o reconstitución de los muestras. Por el contrario, el hecho de que el mismo comportamiento pueda observarse para la mayoría de los individuos y especies lipídicas tras su almacenamiento a diferentes temperaturas reduce la posibilidad de que los comportamientos observados se deban a únicamente al error experimental. El individuo 1 es el mejor ejemplo de lo comentado, ya que presenta una reducción de la concentración tras 1 día de almacenamiento a cada una de las temperaturas para cada especie lipídica. La única excepción es la SM la cual mantiene su concentración tras el almacenamiento durante 1 día a 5°C, pero sufre una reducción similar tras ser mantenida (la muestra) durante el mismo tiempo a las otras dos temperaturas de estudio.

De esta manera, parece evidenciarse que aunque el error experimental ha podido contribuir a la obtención de resultados tan inesperados, no es el único factor que a tener en cuenta ya que es incapaz de explicarlos resultados en su totalidad. La propia sensibilidad de los lípidos a diversos factores (como la temperatura y la exposición a la luz, los cuales favorecen la degradación lipídica) puede también haber influido de manera significativa en la obtención de comportamientos tan variables en los resultados. El carácter acumulativo de estos errores parece ser el principal responsable de la obtención de los resultados recogidos en las *figuras 9, 10* y *11*.

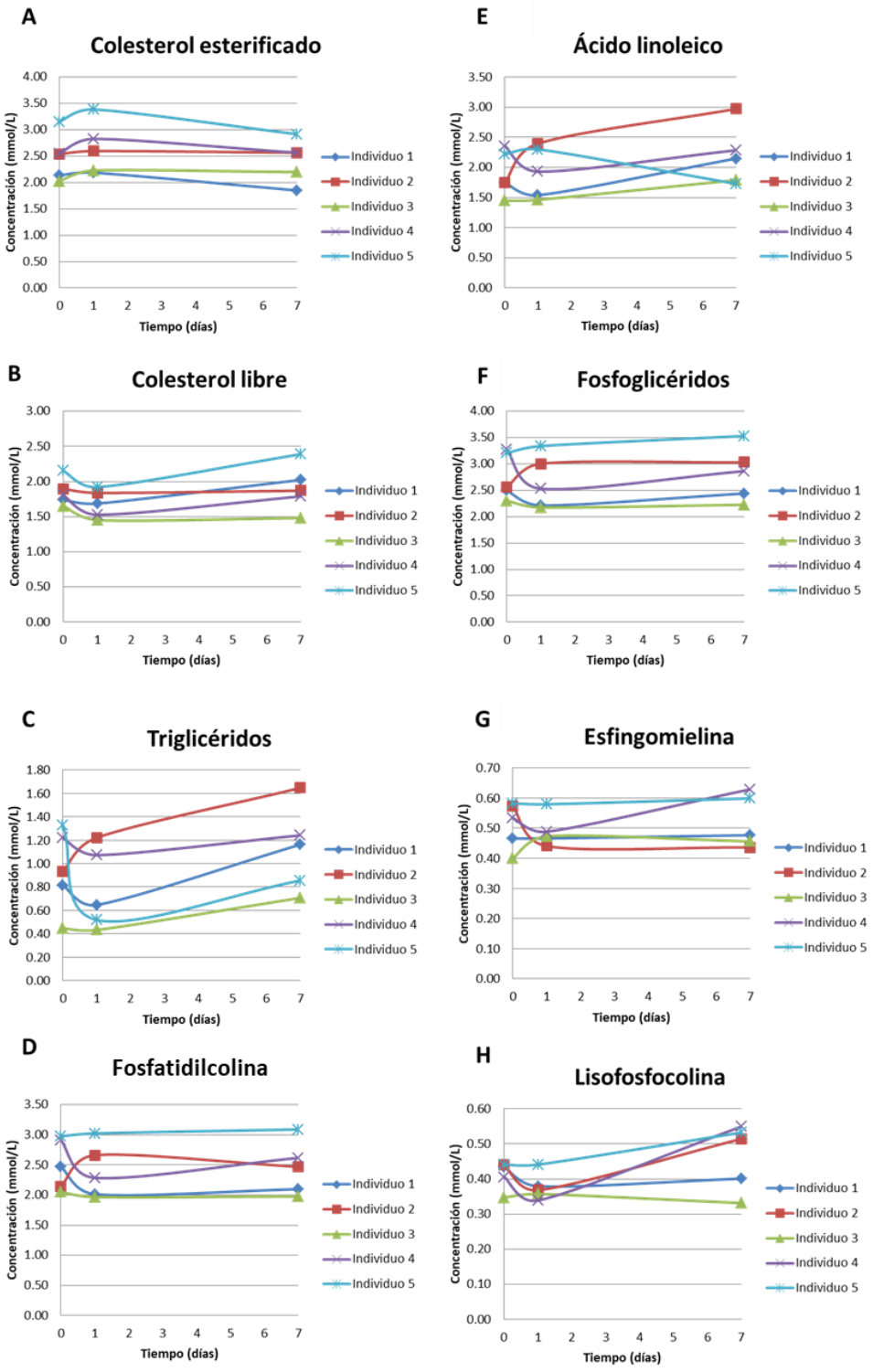


Figura 9. Resultados de estabilidad obtenidos para cada especie lipídica almacenada a 5°C. En cada gráfico se representa la concentración (en mmol/l) respecto del tiempo (en días). Dado que no se pudieron obtener los resultados de las muestras analizadas a los 2 meses, solo se incluyen los resultados obtenidos para las extracciones de referencia (0 días), las extracciones llevadas a cabo tras 1 día de almacenamiento y las extracciones realizadas habiendo transcurrido 7 días desde su obtención. Las especies lipídicas incluidas en esta figura son: **A)** Colesterol esterificado, **B)** Colesterol libre, **C)** Triglicéridos, **D)** Fosfatidilcolina, **E)** Ácido linoleico, **F)** Fosfoglicéridos, **G)** Esfingomielina y **H)** Lisofofosfatidilcolina.

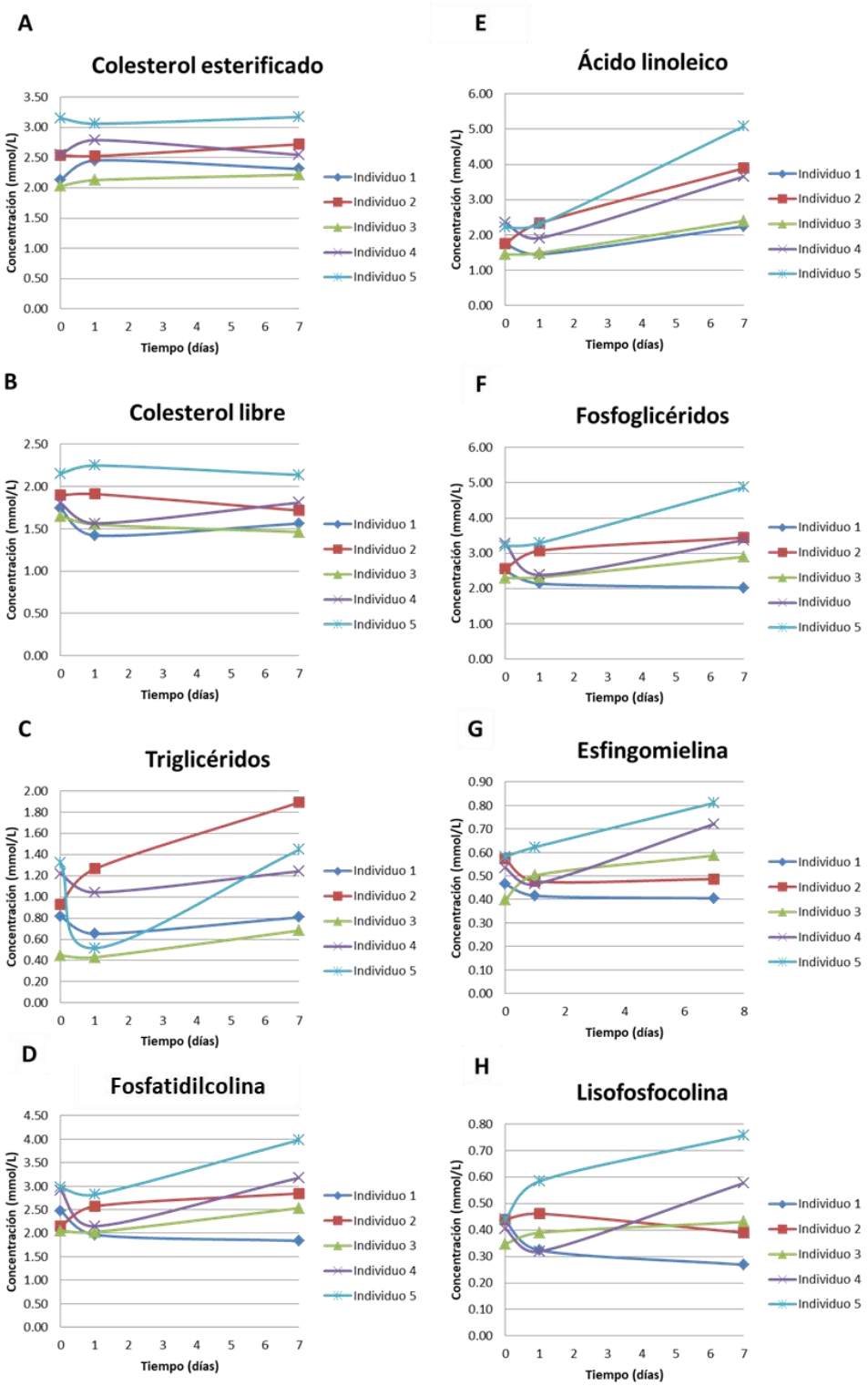


Figura 10. Resultados de estabilidad obtenidos para cada especie lipídica almacenada a -20°C. En cada gráfico se representa la concentración (en mmol/l) respecto del tiempo (en días). Dado que no se pudieron obtener los resultados de las muestras analizadas a los 2 meses, solo se incluyen los resultados obtenidos para las extracciones de referencia (0 días), las extracciones llevadas a cabo tras 1 día de almacenamiento y las extracciones realizadas habiendo transcurrido 7 días desde su obtención. Las especies lipídicas incluidas en esta figura son: **A)** Colesterol esterificado, **B)** Colesterol libre, **C)** Triglicéridos, **D)** Fosfatidilcolina, **E)** Ácido linoleico, **F)** Fosfoglicéridos, **G)** Esfingomielina y **H)** Lisofofosfatidilcolina.

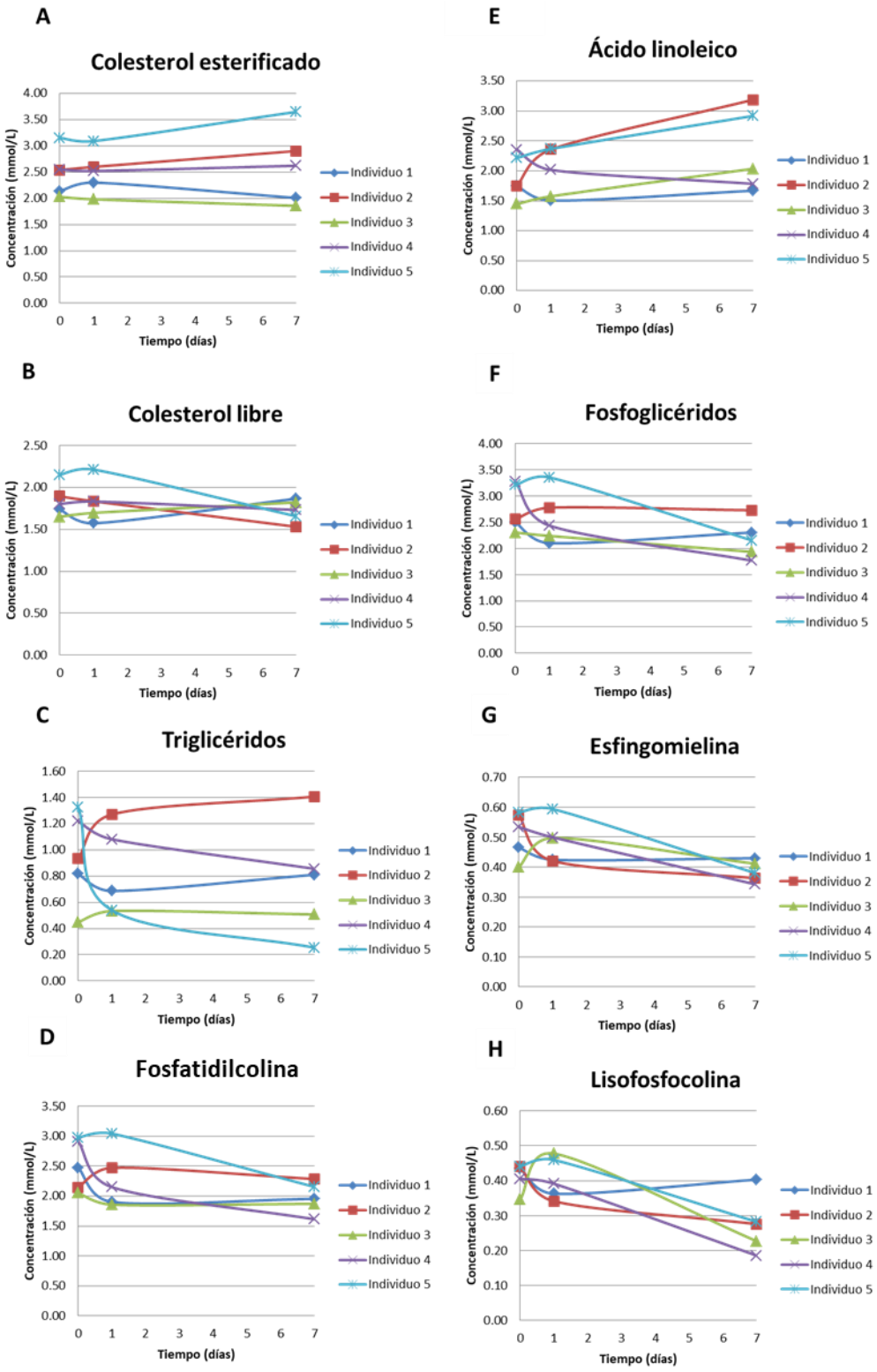


Figura 11. Resultados de estabilidad obtenidos para cada especie lipídica almacenada a -80°C. En cada gráfico se representa la concentración (en mmol/l) respecto del tiempo (en días). Dado que no se pudieron obtener los resultados de las muestras analizadas a los 2 meses, solo se incluyen los resultados obtenidos para las extracciones de referencia (0 días), las extracciones llevadas a cabo tras 1 día de almacenamiento y las extracciones realizadas habiendo transcurrido 7 días desde su obtención. Las especies lipídicas incluidas en esta figura son: **A)** Colesterol esterificado, **B)** Colesterol libre, **C)** Triglicéridos, **D)** Fosfatidilcolina, **E)** Ácido linoleico, **F)** Fosfoglicéridos, **G)** Esfingomielina y **H)** Lisofofosfatidilcolina.

5. Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo consistía en la validación de un protocolo de análisis lipidómico mediante RMN. Para ello, se han valorado tanto la precisión del método de extracción lipídica a seguir como la estabilidad de los diferentes grupos lipídicos al ser almacenados durante diferentes tiempos a tres temperaturas de estudio.

Tras la realización de este estudio se ha podido confirmar que el procedimiento más preciso para realizar una extracción lipídica mediante el método BUME continúa siendo el manual. Tal y como muestran los resultados obtenidos (véase *apartado 4.1*) los CV más bajos son los calculados para el procedimiento manual, siendo además estos valores relativamente bajos. Sin embargo, la LPC presenta valores superiores para el CV. Esta situación es probablemente debida a su sensibilidad a la presencia de D_2O en la muestra, lo que puede producir errores de deconvolución y por tanto introducir variabilidad en los resultados. Por el contrario, las extracciones llevadas a cabo con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* llevan asociados CV muy superiores a los obtenidos al realizar las extracciones de manera manual. Este hecho, es debido a una excesiva distancia de bajado de la aguja de dicho robot, lo que provocó la aspiración de interfase y por tanto un incremento en la variabilidad observada. A pesar de que para ciertos grupos lipídicos (glicerofosfolípidos y esfingolípidos) los CV obtenidos mediante la extracción llevada a cabo con el robot (tras haber liofilizado previamente las muestras) son inferiores o prácticamente iguales a los obtenidos mediante el procedimiento manual, se obtienen intensidades muy reducidas mediante este método. Este hecho es probablemente debido a la saturación de la fase orgánica, a consecuencia de llevar a cabo la extracción del doble de volumen de muestra y por tanto del doble de moléculas lipídicas. A pesar de que este inconveniente puede ser subsanado mediante la normalización con la concentración total del colesterol, pone de manifiesto que la liofilización previa de la muestra no supone ninguna ventaja en la extracción. Por otro lado, las extracciones con robot han demostrado recuperar una mayor cantidad de glicerofosfolípidos y esfingolípidos que las extracciones manuales. Esto es probablemente debido a una mayor recuperación de fase orgánica por parte del robot en comparación con el método manual.

En lo referente a la evaluación la estabilidad, los resultados obtenidos no reflejan el comportamiento estable esperado tras su almacenamiento a diferentes temperaturas durante diferentes tiempos. Sin embargo, tampoco evidencian la presencia de degradación lipídica. Los posibles errores experimentales cometidos, así como la variabilidad intrínseca que presentan los lípidos pueden ser los responsables de la obtención de resultados tan variables.

6. Limitaciones y perspectivas de futuro

Existen ciertas limitaciones asociadas a todo estudio lipidómico que han de ser tenidas en cuenta. La primera de ellas es la elevada diversidad estructural propia de los lípidos, no siendo por tanto posible el uso de unos reactivos o de un método que sea ideal para todas las especies lipídicas. Además, los reactivos utilizados poseen un carácter muy volátil. A consecuencia de esta situación, las proporciones iniciales de los solventes utilizados pueden

variar en un espacio de tiempo relativamente corto. Dichos reactivos son también levemente corrosivos en su mayoría y por tanto, al entrar en contacto con materiales de plástico (*eppendorfs* o puntas de micropipeta), podrían dar origen a pequeñas impurezas en los extractos a analizar.

Adicionalmente, se han producido ciertos inconvenientes que han dificultado la realización de este estudio concreto y que deberán ser superadas en futuros estudios. En primer lugar, no se dispuso de suficiente material biológico para realizar las pruebas de estabilidad. Como consecuencia solo pudieron utilizarse un total de 1 o 2 alícuotas por cada experimento. A pesar de la elevada sensibilidad y reproducibilidad de la RMN, este número de alícuotas por condición es insuficiente y por tanto su deberían incrementarse hasta un total de 4 o 5 en próximas pruebas. En segundo lugar, los experimentos relativos al estudio de la estabilidad de los lípidos (almacenados a diferentes temperaturas durante diferentes tiempos) deberían repetirse teniendo una mayor disponibilidad del espectrómetro, para evitar así errores asociados a un mal *shimming*. En tercer lugar, los voluntarios de los cuales se obtuvieron las muestras sanguíneas eran en su mayoría jóvenes y delgados. Por tanto, presentaban perfiles lipídicos similares. Este hecho resulta perjudicial, ya que sería de gran interés disponer de muestras que abarcasen un amplio rango de lípidos para realizar el estudio de estabilidad. Por último, al haber realizado las extracciones lipídicas de manera manual, el error humano ha de ser tenido en cuenta.

En un futuro, es necesaria la optimización del protocolo de extracción con el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* para la automatización completa del procedimiento de análisis lipidómico. La RMN es una técnica de alto rendimiento y por tanto requiere que la preparación de la muestra sea compatible con este carácter de alto rendimiento. Es por este motivo por el que la mayor prioridad es conseguir que el proceso de extracción llevado a cabo con robot sea tan o más preciso que el realizado de manera manual. En caso de disponer del tiempo suficiente, sería de gran interés la introducción de tiempos intermedios (1 mes) y/o superiores (1 año) en el estudio de estabilidad. Por último, el análisis del impacto de varios ciclos de congelación y descongelación sobre las muestras lipídicas también debería analizarse para conseguir una validación absoluta del protocolo de análisis lipidómico descrito en este trabajo.

7. Autoevaluación

Mi estancia en prácticas me ha resultado muy útil además de interesante. Me refiero a ella como útil, ya que me ha permitido poner en práctica diversos conocimientos teóricos adquiridos en distintas materias a lo largo del grado, como son: la resonancia magnética nuclear (en química orgánica), la estructura y composición de lípidos y lipoproteínas (en biología y bioquímica de los alimentos), el mecanismo de acción de las lipoproteínas (en bioquímica), su relevancia en las enfermedades cardiovasculares (en patología molecular) y el análisis de datos metabolómicos (en biología molecular de sistemas). Por tanto, además de complementar los conocimientos teóricos que tenía acerca de la lipidómica, estas prácticas me han permitido trabajar en primera persona en el COS, pudiendo así familiarizarme con la forma

de trabajar en el campo de las ómicas. A lo largo de estos meses he podido también familiarizarme con el manejo de dispositivos a los que no había tenido acceso en las prácticas del grado, como son: el manipulador de muestras *Gilson*, el dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo* y el espectrómetro de RMN *Bruker Avance III 600*.

Con la ayuda de mi tutora profesional y del resto de los integrantes de la empresa, diseñé el proceso experimental seguido para llevar a cabo la validación y optimización del protocolo de extracción de lípidos BUME. Esta actividad me ha resultado muy útil ya que me ha permitido diseñar un protocolo experimental, una actividad que en la universidad no se lleva a cabo.

Al realizar el análisis de resultados he aprendido a interpretar espectros de RMN y correlacionarlos con concentraciones de analitos (en este caso diferentes especies lipidícas). A partir de los resultados obtenidos, he realizado un estudio estadístico que me ha permitido poner en práctica conceptos habituales en los artículos de investigación lo que me permitirá una mejor comprensión de los artículos consultados para realizar futuros proyectos.

En definitiva, considero que mi estancia en prácticas ha sido fundamental para completar mi formación teórica con una parte práctica, en la cual he podido aplicar conceptos una gran cantidad de conocimientos teóricos adquiridos durante el grado. Además, el tiempo que he pasado en prácticas me ha permitido conocer de primera mano el funcionamiento del trabajo de laboratorio (de ciencias ómicas en este caso) y del trabajo en una empresa del sector biotecnológico.

Bibliografía

[1] D. Nelson *et al., Lípidos*. *Principios de Bioquímica*. 6ª Edición. Barcelona: Ediciones Omega; 2014, pp. 343 - 367.

[2] E. Fahy *et al.*, "*A Comprehensive Classification System for Lipids*", Jorunal of Lipid Research. 2005, 46: pp. 839 - 861.

[3] E. Fahy *et al.*, "*Update of the LIPID MAPS Comprehensive Classification System for Lipids*", Journal of Lipid Research. 2005, 50: pp. 9 - 14.

[4] K. Schmelzer *et al.*, "*The Lipid Maps Initiative in Lipidomics*", Methods in Methodology. 2007, 432: pp. 171 - 183.

[5] G. Liebisch *et al.*, "*Shorthand Notation for Lipid Structures Derived from Mass Spectrometry*", Journal of Lipid Research. 2013, 54: pp. 1523 - 1530.

[6] A. Triebl *et al.*, "*Lipidomics: Prospects from a Technological Perspective*", Molecular of Cell Biology of Lipids. 2017, 1862: pp. 740 - 746.

[7] O. Quehenberger *et al.*, "*Lipidomics Reveals a Remarkable Diversity of Lipids in Human Plasma*", Journal of Lipid Research. 2010, 51: pp. 3299–3305.

[8] J. Folch *et al.*, "*A Simple Method for the Isolation and Purification of total Lipids from Animal Tissues*", Journal of Biological Chemistry. 1953, 226: pp. 497 - 509.

[9] E. Bligh *et al.*, "*A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification*", Canadian Journal of Biochemistry and Phisiology. 1959, 37: pp. 911 - 917.

[10] M. Cruz *et al.,* "*Improved Butanol – Methanol (BUME) Method by Replacing Acetic Acid for Lipid Extraction of Biological Samples*," *Lipids*. 2016, 51: pp. 887–896.

[11] V. Matyash *et al.*, "*Lipid Extraction by Methyl-Tert-Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics*", Journal of Lipid Research. 2008, 49: pp. 1137–1146.

[12] R. Zárate *et al.*, "*Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures*", Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008, 56: pp. 4297–4303.

[13] L. Löfgren *et al.*, "*The BUME Method : a Novel Automated Chloroform-Free 96-Well Total Lipid Extraction Method for Blood Plasma*", Journal of Lipid Research. 2012, 53: pp. 1690 - 1700.

[14] D. Marion *et al.*, "*An Introduction to Biological NMR Spectroscopy*", Molecular and Cellular Proteomics. 2013, 12: pp. 3006 - 3025.

[15] G. Fernández *et al.*, "*Resonancia Magnéntica Nuclear*." [Online]. Disponible en: http://www.quimicaorganica.org/resonancia-magnetica-nuclear/796-rmn-resonancia-magnetica-nuclear.html. [Accessed: 16-May-2018].

[16] S. There *et al.*, "*What is Lipidomics ?*", European Journal of Lipid Science and Technology. 2003, 105: pp. 481–482.

[17] T. Hyötyläinen *et al.*, "*Optimizing the Lipidomics Workflow for Clinical Studies - Practical Considerations*", Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2015, 407: pp. 4973 - 4993.

[18] K. Jurowski *et al.*, "*Analytical Techniques in Lipidomics : State of the Art*", Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2017, 47: pp. 1 - 82.

[19] P. Khandelwal *et al.*, "*H NMR-Based Lipidomics of Rodent Fur: Species-Specific Lipid Profiles and SCD1 Inhibitor-Related Dermal Toxicity*", Journal of Lipid Research. 2014, 55: pp. 1366–1374.

[20] J. Li *et al.*, "*Applications of Nuclear Magnetic Resonance in Lipid Analyses: An Emerging Powerfull Tool for Lipidomics Studies*", Progress in Lipid Research. 2017, 68: pp. 37 - 56.

[21] M. Gil *et al.*, "*LipSpin: A New Bioinformatics Tool for Quantitative 1 H NMR Lipid Profiling*", Analytical Chemistry. 2018, 90: 2031 - 2040.

[22] B. S. Barbosa *et al.*, "*Qualitative and Quantitative NMR Approaches in Blood Serum Lipidomics*", Investigations of Early Nutrition Effects on Long-Term-Health. 2018. 1735: pp. 365–379.

[23] R. Mallol *et al.*, "*Liposcale : A Novel Advanced Lipoprotein Test Based on 2D Diffusion-Ordered H NMR Spectroscopy*", Journal of Lipid Research. 2015, 56: pp. 737–746.

[24] R. Mallol *et al.*, "*Development and Evaluation of a Novel Advanced Lipoprotein Test Based on 2D Diffusion-Ordered 1H NMR Spectroscopy*," Doctoral Thesis. 2015.

[25] M. Haid *et al.*, "*Long-Term Stability of Human Plasma Metabolites During Storage at*

-80° C", Journal of Proteome Research 2017, 17: pp. 203 - 211.

[26] R. Schmidt, "*SampleJet*l"Users Manual 2010.

Anexo I

Figuras suplementarias

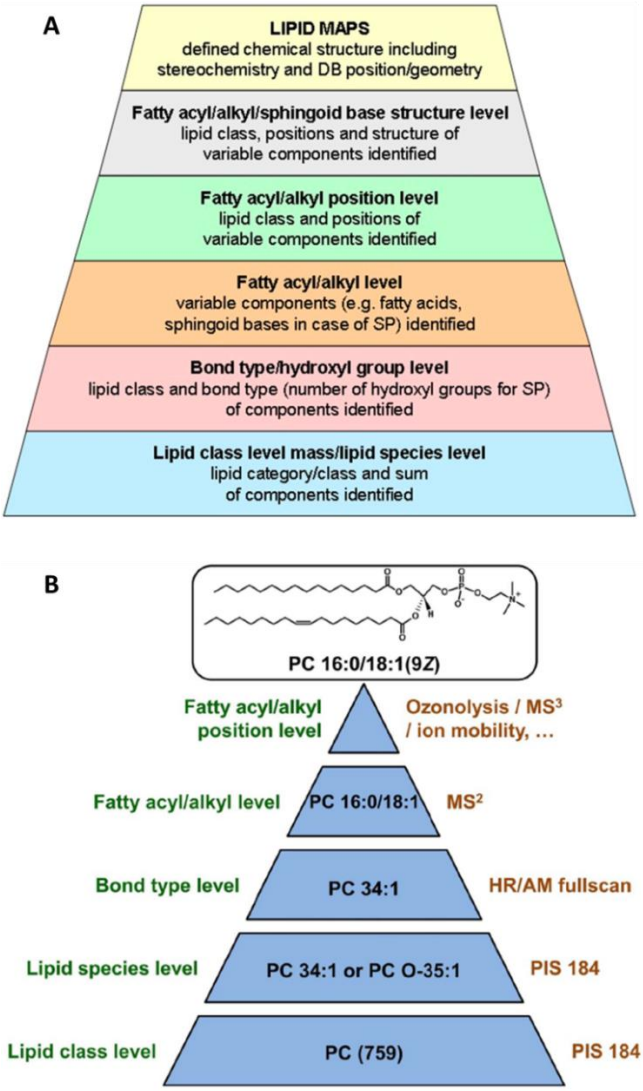


Figura suplementaria 1. Niveles adicionales de clasificación lipídica. Su empleo está oficialmente aceptado por LIPID MAPS, ya que incorporan los diferentes niveles de información estructural proporcionados por MS. **A)** El nivel con menor resolución hace referencia a la categoría lipídica que incluye la suma de los componentes del lípido o la masa nominal detectada, por tanto se proporciona información acerca del número total de átomos de carbono y de dobles enlaces. El siguiente nivel es el que determina los tipos de enlaces existentes entre los componentes lipídicos variables y el esqueleto lipídico. Cuando el equipo de MS es capaz de determinar cuáles son dichos componentes variables se puede aplicar la notación acilo/alquilo graso (ya que habitualmente estos componentes son ácidos grasos). Por último, cuando el equipo posee resolución suficiente para analizar la posición de estos componentes (cuarto nivel) y los detalles estructurales de los mismos (quinto nivel), puede utilizarse el Sistema Comprensible de Clasificación Lipídica disponible en LIPID MAPS. **B)** Ejemplificación de los diferentes niveles de identificación lipídica para el 1-palmitoil1,2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina. Abreviaciones: Esfingolípidos (SP, en inglés), Dobles enlaces (DB, por sus iniciales en inglés), Fosfatidilcolina (PC, en inglés), Escáner de Producto Iónico (PIS, por sus iniciales en inglés), Masa Precisa de Elevada Resolución (HR/AM, por sus iniciales en inglés), Espectrómetro de Masa en Tándem (MS^2). Figura obtenida de [6], [5].

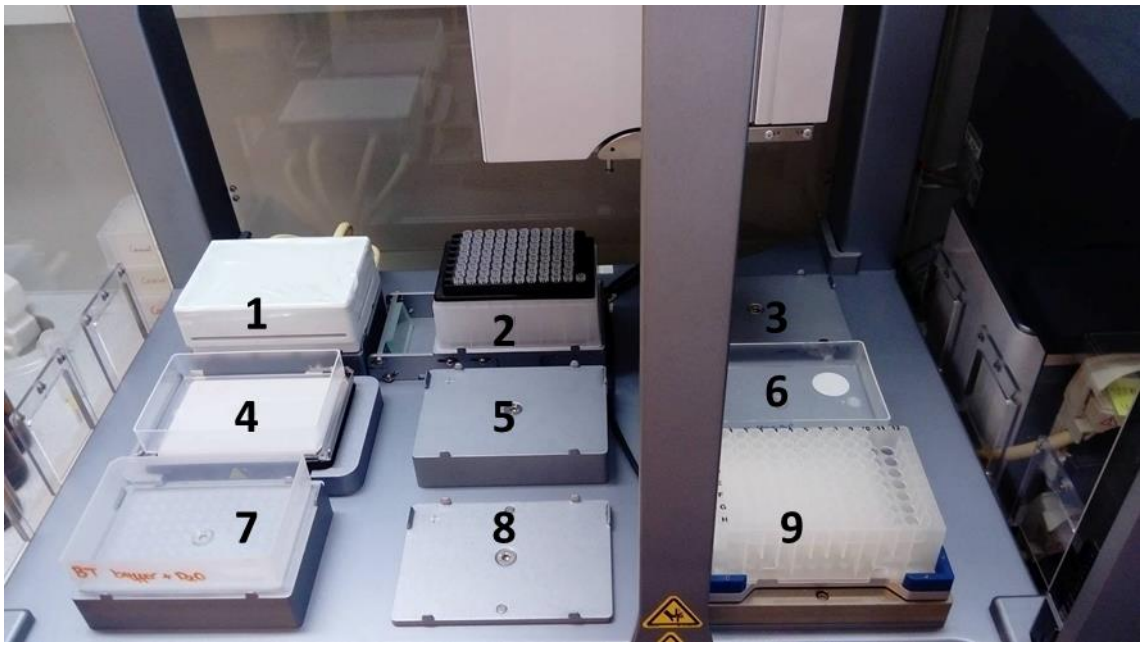


Figura suplementaria 2. Posiciones de los diferentes elementos a colocar para llevar a cabo la extracción lipídica mediante el robot dispensador de líquidos *Aligent Velocity 11 Bravo*. A continuación se enumeran las posiciones (indicadas en la imagen) y el reactivo o material que se coloca cada una: (2) D_2O, (3) BUME, (4) DIPE-EtAc, (4) Tubos de vidrio para la recolección de la fase orgánica, (6) Puntas para recoger el disolvente, (7) Puntas para recoger el suero, (9) *Eppendorfs* que incluyen el suero. Debido a que la imagen se obtuvo cuando el robot estaba siendo empleado para un protocolo de extracción diferente al tratado en este trabajo, los elementos que aparecen en ella ocupan posiciones diferentes.

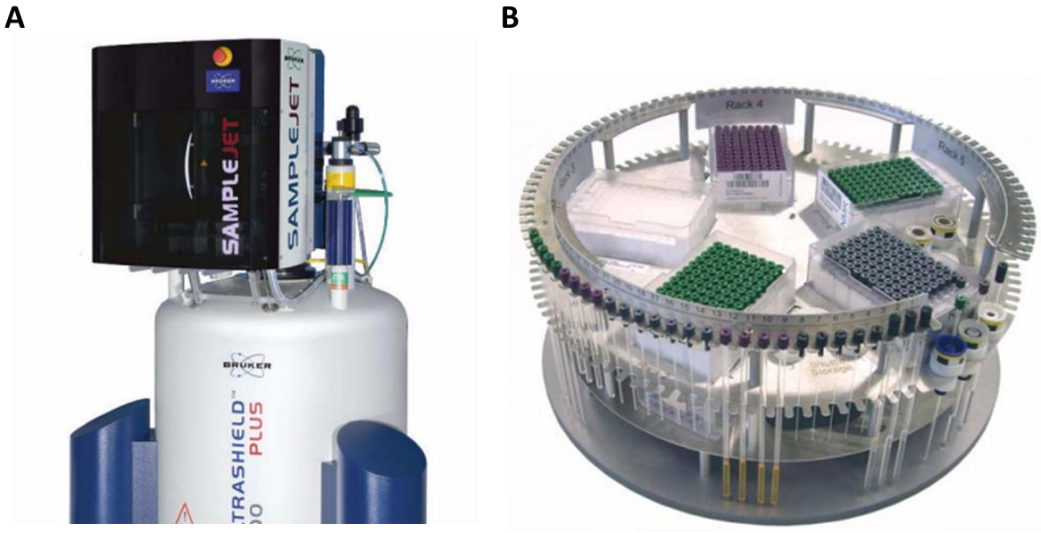


Figura suplementaria 3. Robot *SampleJet* acoplado a espectrómetro de RMN. El acoplamiento del robot *SampleJet* al espectrómetro de RMN permite automatizar el análisis de las muestras, ya que es el robot quien introduce cada muestra en el espectrómetro (evitando así la introducción manual). **A)** Visión extrerna de un robot *SampleJet* acoplado a un espectrómetro de RMN. **B)** Parte interna del robot *SampleJet*. El robot tiene capacidad para varios racks, los cuales pueden tener muestras de distinta naturaleza y que por tanto requerirán un *shiming* diferente. Figura obtenida de [26].

Anexo II

Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Resultados del test *Liposcale* para los tres *pools* preparados en la determinación del procedimiento de extracción lipídica. El *pool 1* corresponde al de baja concentración de lípidos (menor de 100 mg/dl para el colesterol y de 130 mg/dl en para los TG), el *pool 2* corresponde al de concentración lipídica intermedia (entre 100 mg/dl y 130 mg/dl para el colesterol y entre 130 mg/dl y 150 mg/dl para los TG) y el *pool 3* corresponde a una elevada concentración lipídica (superior a 130 mg/dl para el colesterol y a 150 mg/dl para los TG). El test proporciona las concentraciones de colesterol y triglicéridos (en mg/dl), el número de partículas lipoproteicas, su diámetro y otros parámetros adicionales (la concentración de partículas diferentes a HDL, el ratio entre el número total de partículas y de partículas HDL y el ratio entre las partículas LDL y HDL). Abreviaciones: Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus iniciales en inglés), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus iniciales en inglés), Lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus iniciales en inglés), Lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus iniciales en inglés), Triglicéridos (TG, en inglés), Partículas (P), Diámetro (Z).

		Pool 1	Pool 2	Pool 3
Colesterol (mg/dL)	**VLDL-C**	10.47	21.00	39.09
	IDL-C	5.99	11.79	18.58
	LDL-C	84.87	121.64	136.49
	HDL-C	58.67	50.44	46.45
Triglicéridos (mg/dL)	**VLDL-TG**	49.41	85.38	130.06
	IDL-TG	7.69	11.62	16.14
	LDL-TG	9.32	16.50	26.11
	HDL-TG	15.81	17.69	25.60
Número de partículas	**VLDL-P (nmol/L)**	34.50	62.29	99.99
	Large VLDL-P (nmol/L)	1.04	1.38	2.04
	Medium VLDL-P (nmol/L)	4.20	7.10	10.67
	Small VLDL-P (nmol/L)	29.26	53.81	87.28
	LDL-P (nmol/L)	605.46	894.02	1054.33
	Large LDL-P (nmol/L)	97.36	132.86	150.46
	Medium LDL-P (nmol/L)	168.95	271.95	339.28
	Small LDL-P (nmol/L)	339.14	489.21	564.59
	HDL-P (µmol/L)	30.46	27.45	27.85
	Large HDL-P (µmol/L)	0.25	0.32	0.38
	Medium HDL-P (µmol/L)	10.44	9.71	10.79
	Small HDL-P (µmol/L)	19.77	17.43	16.68
Diámetro de partículas	**VLDL-Z (nm)**	42.39	42.16	42.06
	LDL-Z (nm)	21.04	21.03	21.04
	HDL-Z (nm)	8.24	8.27	8.32
Otros parámetros	**Non-HDL-P (nmol/L)**	609.49	928.87	1126.47
	Total-P/HDL-P	21.01	34.84	41.45
	LDL-P/HDL-P	19.87	32.57	37.86

Tabla suplementaria 2. Voluntarios sometidos a la extracción de sangre. De cada uno de los individuos se especifica el género, la edad, el peso, la altura y el índice de masa corporal. Abreviaciones: Índice de masa corporal (IMC).

Individuo	Género	Edad	Peso (kg)	Altura (m)	IMC
1	Mujer	22	71	1.72	24,00
2	Hombre	22	72	1.81	21,98
3	Mujer	23	57	1.67	20,44
4	Mujer	32	57	1.65	20,94
5	Mujer	38	50	1.58	20,03

Tabla suplementaria 3. Listado de lípidos analizados. La tabla incluye los lípidos analizados para cada estudio clasificados en base al Sistema Comprensible de Clasificación Lipídica y el desplazamiento químico de las señales escogidas en cada caso. Abreviaciones: Partes por millón (ppm).

Categoría	Clase	Subclase	Lípidos analizados	Señal escogida (ppm)
Lípidos de esterol	Esteroles	Colesterol y derivados	Colesterol libre	0.694
			Colesterol esterificado	0.691
Acilo graso	Ácidos grasos y conjugados	Ácidos grasos no saturados	Ácido linoleico	5.350
Glicerofosfo-lípidos	Glicerofosfo-gliceroles	Diacilglicerofosfo-gliceroles	Fosfoglicéridos	5.288
	Glicerofosfofo-colinas	Monoacilglicero-fosfatidilcolinas	Lisofosfocolinas	3.201
		Diacilglicerol-fosfatidilcolinas	Fosfatidilcolinas	3.208
Glicerolípidos	Triacilgliceroles	Triacilgliceroles	Triglicéridos	5.237
Esfingolípidos	Fosfoesfingo-lípidos	Fosfatidilcolinas de ceramida	Esfingomielina	3.192

Anexo III

Normalización de áreas a unidades de concentración

En primer lugar, es necesario calcular la concentración total de colesterol presente en la muestra. Para ello, se realiza la suma de los valores de concentración de colesterol obtenidos mediante el test *LipoScale* (véase *tabla suplementaria 1* y *ecuación 1*).

$$(1)\quad [\text{Colesterol}]\left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}}\right) = [\text{LDL} - \text{C}] + [\text{HDL} - \text{C}] + [\text{IDL} - \text{C}] + [\text{VLDL} - \text{C}]$$

Para el caso del *pool 1* preparado para la determinación del procedimiento más preciso de extracción lipídica el cálculo a realizar es el siguiente:

$$[\text{Colesterol}]\left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}}\right) = 84{,}87 + 58{,}67 + 5{,}99 + 10{,}47 = 159{,}99\ \text{mg/dl}$$

A continuación, es necesario determinar un factor de conversión (FC) que permita transformar los valores obtenidos mediante el test *LipoScale* (en mg/dl) a unidades de concentración que reflejen el número de partículas (mmol/l), ya que las áreas de las señales de RMN son proporcionales al número de partículas presentes en la muestra. El cálculo del factor se muestra en la *ecuación 2*. Dicho factor permitirá calcular la concentración de colesterol de manera bioquímica.

$$(2)\ \text{FC} = \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}}\right) \text{x}\ \frac{1\ \text{g}}{10^3\text{mg}}\ \text{x}\ \frac{1\ \text{mol}}{386{,}65\ \text{g}}\ \text{x}\ \frac{10^3\text{mmol}}{1\ \text{mol}}\ \text{x}\ \frac{10\ \text{dl}}{1\ \text{l}} = \frac{5}{193{,}33} \approx \frac{5{,}2}{200}\ \text{mmol/l}$$

A modo de ejemplo, se aplica dicho factor al resultado obtenido para el *pool 1*:

$$[\text{C}]\text{bioquímica} = 159{,}99\frac{\text{mg}}{\text{dl}}\ \text{x}\frac{5{,}2}{200}\ \frac{\text{mmol}}{\text{l}} = 4{,}16\ \text{mmol/l}$$

En tercer lugar, se suman las áreas de las señales del colesterol libre y esterificado (véase *ecuación 3*). De esta manera se obtiene el área total de colesterol observada en el espectro de RMN.

$$(3)\quad \text{C total RMN} = \text{Área colesterol libre} + \text{Área colesterol esterificado}$$

Una vez más, se ejemplifica a continuación el cálculo a realizar con el *pool 1*:

$$\text{C total RMN} = 1{,}13\ \text{x}\ 10^8\ + 7{,}01\ \text{x}\ 10^7 = 1{,}83\ \text{x}\ 10^8$$

Por último se determina el factor de corrección que permitirá la deconvolución de las señales (véase *ecuación 4*).

$$(4)\quad \text{Factor de corrección} = \frac{[\text{C}]\text{bioquímica}}{\text{C total RMN}}$$

Para el caso de la primera alícuota extraída manualmente del *pool 1*, el resultado es el siguiente:

$$\text{Factor de corrección} = \frac{4{,}16\ \text{mmol/l}}{1{,}83\ \text{x}\ 10^{8}} = 2{,}27\ \text{x}\ 10^{-8}\ \text{mmol/l}$$

Por tanto, el área de cada señal obtenida para cada alícuota y especie lipídica se multiplica por este factor, obteniéndose así su concentración en mmol/l (véase *ecuación 5*).

$$(5)\quad [\text{Especie lipídica}]\text{Alícuota} = \text{Área alícuota x Factor de corrección}$$

Este cálculo se ejemplifica a continuación para los TG con la primera alícuota extraída manualmente.

$$[\text{TG}]\ \text{Alícuota}\ 1 = (4{,}06\ \text{x}\ 10^{7})\text{x}\ (2{,}27\ \text{x}\ 10^{-8}) = 0{,}92\ \text{mmol/l}$$