CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

Marcadores de peroxidación lipídica asociados al consumo de PUFAs ω-3 en estudios de alteración metabólica inducida por la dieta

Gabriel Dasilva Alonso

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E TECNOLOXÍA QUÍMICA

Santiago de Compostela

2017

DECLARACIÓN DO AUTOR DA TESE

Marcadores de peroxidación lipídica asociados al consumo de PUFAs ω-3 en estudios de alteración metabólica inducida por la dieta

D. Gabriel Dasilva Alonso

Presento miña tese, seguindo o procedemento adecuado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) No seu caso, na tese se fai referencia as colaboracións que tivo este traballo.
3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide ca versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio de outros autores nin de traballos presentados por min para a obtención de outros títulos.

En Santiago de Compostela, a 15 de decembro de 2017

Asdo. D. Gabriel Dasilva Alonso

AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES / TITOR DA TESE

Marcadores de peroxidación lipídica asociados al consumo de PUFAs ω-3 en estudios de alteración metabólica inducida por la dieta

Os directores:

Dña. María Isabel Medina Méndez, Profesora de Investigación no Instituto de Investigacións Mariñas de Vigo (CSIC), e

D. Rafael Cela Torrijos, Catedrático do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela

O titor:

D. Isaac Rodríguez Pereiro, Profesor Titular do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela

Informan:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por **D. Gabriel Dasilva Alonso**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, a 15 de decembro de 2017

Asdo. Dra. María Isabel Medina Méndez Asdo. Dr. Rafael Cela Torrijos Asdo. Dr. Isaac Rodríguez Pereiro

Dña. María Isabel Medina Méndez, Profesora de Investigación no Instituto de Investigacións Mariñas de Vigo (CSIC) e D. Rafael Cela Torrijos, Catedrático do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela, como directores da tese titulada: "**Marcadores de peroxidación lipídica asociados al consumo de PUFAs ω-3 en estudios de alteración metabólica inducida por la dieta**",

Declaran:

Que a tese presentada por D. Gabriel Dasilva Alonso, é idónea para ser presentada, dacordo co artigo 41 do Regulamento de Estudos de Doutorado, pola modalidade de compendio de ARTIGOS, nos que o doutorando tivo participación no peso da investigación e a súa contribución foi decisiva para levar a cabo este traballo.

E que está en coñecemento dos coautores, tanto doutores coma non doutores, participantes nos artigos, que ningún dos traballos reunidos nesta tese será presentado por ningún deles noutra tese doutoral, ou que firman baixo a súa responsabilidade.

En Santiago de Compostela, a 15 de decembro de 2017.

Asdo. Dra. María Isabel Medina Méndez

Asdo. Dr. Rafael Cela Torrijos

Presentación

El trabajo de investigación que se presenta en esta memoria se ha desarrollado en el grupo de Química de Productos Marinos del Instituto de Investigaciones Marinas (IIM) de Vigo, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y en el Instituto de Investigación y Análisis Alimentario de la Universidad de Santiago de Compostela.

Ha sido financiado por el siguiente proyecto: "Mecanismos de acción de ácidos grasos poliinsaturados de origen marino en el síndrome metabólico y sinergismo con polifenoles e iminociclitoles", concedido por la CICYT (AGL2009-12374-C03-01)

Para la realización de la presente tesis, D. Gabriel Dasilva Alonso ha sido beneficiario de una beca-contrato del programa de Junta de Ampliación de Estudios (JAE) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), así como de una beca para estancias en el extranjero de la Axencia Galega de Innovación (GAIN).

Los resultados obtenidos de este trabajo han dado lugar hasta la fecha de su presentación a 5 publicaciones científicas aceptadas y publicadas, y a 6 comunicaciones orales y 7 comunicaciones póster en congresos.

Publicaciones aceptadas y publicadas:

- ✓ **Dasilva G**., Pazos M., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *Lipidomic analysis of polyunsaturated fatty acids and their oxygenated metabolites in plasma by solid-phase extraction followed by LC-MS*. Anal. Bioanal. Chem., 406:12, 2014, 2827-2839, DOI: 10.1007/s00216-014-7701-3
- ✓ **Dasilva G.**, Pazos M., García-Egido E., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *Healthy effect of different proportions of marine ω-3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation.* J. Nutrit. Biochem., 26 (2015), 1385-1392, DOI: org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.007
- ✓ **Dasilva G**., Pazos M., García-Egido E., Pérez-Jiménez J., Lluís Torres J., Giralt M., Nogués M.R., Medina I., *Lipidomics to analyze the influence of diets with different EPA:DHA ratios in the progression of Metabolic Syndrome using SHROB rats as a model.* Food Chem., 205 (2016), 196-203, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.03.020
- ✓ **Dasilva G.**, Pazos M., García-Egido E., Gallardo J.M., Ramos-Romero S., Lluís Torres J., Romeu M., Nogués M.R., Medina I., *A lipidomic study on the regulation of inflammation and oxidative stress targeted by Marine ω-3 PUFA and Polyphenols in high- fat high-sucrose diets.* J. Nutrit. Biochem., 43 (2017), 53-67, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.02.007
- ✓ **Dasilva G.**, Boller M., Medina I., Storch J., *Relative levels of dietary EPA and DHA impact gastric oxidation and essential fatty acid uptake.* J. Nutrit. Biochem., (2017), DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.11.007

Comunicaciones orales a congresos:

- ✓ **Dasilva G**., Pazos M., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *A novel lipidomic platform to determinate lipid mediators associated to the healthy effect of marine lipids in Metabolic Syndrome.* EuroFedLipid (Montpellier. 2014)
- ✓ **Dasilva G.**, Pazos M., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *Role of Fish Oils in Nutritional Quality: Study of lipid biactive oxygenated mediators*. WEFTA (Bilbao. 2014)
- ✓ L. Méndez, M. Pazos, E. García-Egido, **Dasilva G**., JM Gallardo, JL Torres, J. Pérez-Jiménez, MR Nogués, N. Taltavull, I. Medina. *Correct design of Omega 3 enriched functional food: optimized amounts of DHA and EPA for improving metabolic health*. WEFTA (Bilbao) 2014
- ✓ **Dasilva G.**, Secci G., Parisi G., Medina I., *Formation of lipid mediators in farmed rainbow trout under stress conditions*. EuroFedLipid (Firenze. 2015)
- ✓ L. Méndez, M. Pazos, **G. Dasilva**, JM Gallardo, J Torres, MR Nogués, I Medina. *Liver metabolism as target to understand the functional effect of EPA and DHA: regulation of protein pathways involved*. WEFTA (Split) 2016
- ✓ **Dasilva G.**, Salomé L., Méndez L, Muñoz S, R. Nogués, N. Taltavul, S. Ramos, J.L. Torres and I. Medina. *Targeting adipose tissue as a key of lipid mediator modulation in pre-diabetic state: a lipidomic study*. IBCL (Zurich) 2017

Comunicaciones póster a congresos:

- ✓ **Dasilva G.**, Pazos M., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *Optimization of the methodology (SPE-LC-MS/MS) to analyze biomarkers of oxidative stress in plasma.* II Meeting of Young Researchers, Universidade de Santiago de Compostela (Santiago. 2014)
- ✓ Méndez L., **Dasilva G.**, Carrera M., Pazos M., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *Redox proteomics and metabolomics to understand the healthy effect of omega-3 fish lipids*. HUPO (Madrid. 2014)
- ✓ L. Méndez, M. Pazos, E. García-Egido, **G. Dasilva**, J.M. Gallardo J.L. Torres J. Pérez-Jiménez, E. Molinar-Toribio, M.R. Nogués, N. Taltavull, M. Giralt, M. Romeu, I. Medina. *A novel approach for understanding the impact of ω-3 PUFA in metabolic health: nutritional role of the ratio EPA:DHA*. EuroFedLipid (Montpellier. 2014)
- ✓ **Dasilva G.**, Méndez L., Muñoz S., Pazos M., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *Lipidomics and proteomics to understand the health benefits of marine fish oil enriched diets*. Workshop in Lipidomics (Aveiro. 2015)
- ✓ **Dasilva G.**, Pazos M., García-Egido E., Méndez L., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., *An insight into the correct design of healthy marine oils: lipidomics to determine the role of EPA:DHA ratios in Inflammation and Oxidative Stress*. EuroFedLipid (Firenze. 2015)

- ✓ **Dasilva G.**, Pazos M., García-Egido E., Gallardo J.M., Ramos-Romero S., Lluís Torres J., Romeu M., Nogués M.R., Medina I., *Omega 3 PUFA combined with Grape Procyanidins induce Lipids profile and Lipid Mediator remodelling depending on the dietary background: Modulation of Desaturases, Cyclooxygenases and Glutation Peroxidase.* European Workshop in Lipid mediators (Frankfurt. 2016)
- ✓ Medina I, **Dasilva G.**, García-Egido E., Pérez-Jiménez J., Lluís Torres J., Girault M., Nogués M.R., Gallardo J.M., *Production of lipid mediators modulated by fish oils with different proportions of EPA and DHA: Resolution of inflammation associated to metabolic diseases*. GERLI (Toulouse. 2016)

Además, se han llevado a cabo actividades de divulgación científica en centros de enseñanza primaria financiadas con los proyectos Exper-i-ciencia 2014, 2015, 2016, y 2017 del CSIC; y se han realizado colaboraciones con grupos del Instituto de Química Avanzada de Barcelona, de la Universidad Rovira i Virgili de Catalunya, y de la Universidad de Florencia que han dado lugar a 2 publicaciones científicas aceptadas y publicadas, 1 enviada, 1 review, y 1 artículo de divulgación.

- ✓ Secci G., Parisi G., **Dasilva G**., Medina I., *Stress during slaughter increases lipid metabolites and decreases oxidative stability of farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during frozen storage.* Food Chem., 190, 2015, 5-11, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.051
- ✓ Secci G., Parisi G., **Dasilva G**., Medina I., *The more humanely a fish is killed, the better it tastes*. News Science Magazine. http://news.sciencemag.org/. 10 December 2015. Science DOI: 10.1126/science.aad7558.
- ✓ Ramos-Romero S., Molinar-Toribio E., Pérez-Jiménez J., Taltavull N., **Dasilva G.**, Romeu M., Medina I., Lluís Torres J., *Combined action of omega-3 polyunsaturated fatty acids and grape proanthocyanidins on a rat model of diet-induced metabolic alterations.* Food&Function, (2016), DOI: 10.1039/C6FO00679E
- ✓ Méndez L, **Dasilva G.**, Taltavull N., Roméu M., Medina I. *Marine lipids on cardiovascular diseases and other chronic diseases induced by diet: an insight provided by Proteomics & Lipidomics.* Marine Drugs 2017, 15, 258; doi:10.3390/md15080258
- ✓ Ramos-Romero S., Hereu M., Atienza L., Casas J., Taltavull N., Romeu M., Amézqueta S., **Dasilva G**., Medina I., Torres J., *Functional effect of the iminosugar D-fagomine on rats with diet-induced prediabetes*. J Nutrit Biochem (ENVIADO)

A Ledi

Agradecementos

Unha tese comézase, ao igual que dixo Rosalía, sen saber ben cara onde se vai. Recordo os primeiros meses facendo xeles con Lore e Luci, lendo todo tipo de papers, cosendo a preguntas a Manu... Estaba totalmente perdido! Pero unha tese só se acaba, se un ten ganas de querer facer ese camiño, e sobre todo, grazas ao traballo, apoio, acompañamento, consellos, axuda, sorrisos... de outra moita xente que vai contigo día a día!

Estas liñas son, sen dúbida algunha, as máis importantes deste traballo. Moito máis que tódolos resultados obtidos, traballos publicados, congresos,... ou toda a formación adquirida nestes anos. As experiencias e a vida compartida coas persoas que formaron parte desta etapa son o maior premio que podo recibir por esta tese. Considérome un gran afortunado, e por iso dou gracias a Deus e a todos vós que me axudastes a chegar ata aquí. Gracias.

Se as teses se poden adicar, esta vai para a persoa que máis me sufriu, aguantou o estrés dalgúns momentos, cansancio, máis me apoiou e animou, acompañoume en todo momento. Gracias Ledi!

Non quero deixar pasar a ocasión de dar tamén as gracias a todas as persoas alleas ao traballo, pero que saben que "algo fago cos omega 3". Elas acompáñanme, guíanme, e axúdanme cada día a ser mellor persoa, e polo tanto mellor "investigador". Ós meus irmáns, os s1, os meus pais e sogros, a miña familia, ós amigos, o equipo de vida de Garrapiñadas, ós nenos de Vigo e os "rapaces" de Mondoñedo,... e tanta outra xente que deixa pegada no meu camiño. Gracias.

Pasaron uns cantos anos xa. E din que o tempo pasa voando, sobre todo cando se desfruta del. Creo que o mellor síntoma de que un está a gusto, é cando vai contento e con ganas ao traballo, a pesar de madrugar ou facer máis de 100 km. E cando toca despedirse á fin dunha etapa, resulta verdadeiramente difícil facelo! Quizás foi o destino, ou a casualidade, pero tiven a sorte de facer a tese nun gran grupo de investigación, e sobre todo cun gran grupo humano. Non creo que consiga nomear nestas liñas a todas as persoas ás que debo dar as gracias. Seguro que alguén se me queda no tinteiro... Edu, Cris, Rodri, Cruz, Paula, Mónica, Luci, Manu, Marcos, Jesús, Carlos, Chus, Lore, Pili, Silvia, Salomé, Roberta, Giulia, Montse, Rober, Alberto, Federica, Simone, Evelise, Marina, Gallardo, Santi, Isabel,... E tamén ao grupo de bioquímica cos que non só compartimos espazo, senón que formamos unha pequeniña familia: Amaya, Patri, Ana, María, Ledi, Fran, Marta, Helena, Begoña, Anxela, Alice, Carla, Tatiana, Graciela, Carmen, Ricardo,... Gracias a todos por acollerme e integrarme dende o primeiro día, pola vosa axuda no traballo, por ese ambiente especial de compañeirismo, e por todo o cariño que recibín!

Agradecementos

Quero agradecer a Isabel e Gallardo que houbesen confiado en min para esta tarefa. En especial a Isabel, que como directora axudoume a madurar cientificamente, a ser crítico, a ampliar a mirada, e a coñecer un pouco máis este mundo da investigación que eu descoñecía por completo. E sobre todo soubo guiarme deixándome a liberdade de equivocarme, de aprender dun xeito autónomo, de propoñer ideas... Gracias pola actitude sempre positiva e de ánimo, polo diálogo, a confianza, por compartir inquietudes, pola cercanía... Tamén a Rafa e a Isaac, primeiro por haberse acordado de min e haberme proposto para esta tese. Gracias pola vosa dirección, axuda para poñer a punto a metodoloxía cando máis perdido estaba, e pola vosa dispoñibilidade sempre que acudín a vós. Gracias a Gallardo e a Santi polo seu apoio, interese, e colaboración.

Ademais de compañeiros de traballo, lévome un bo feixe de amigos. Toda esta etapa estivo chea de moitos momentos que a converteron nalgo especial. Non todo foi traballo. As sentadas de 8h no Leticia, as tardes de tapeo, a praia, os talleres de coiro e os aquelarres, os cafés matinais arreglando o mundo (ou impugnando preguntas de opos...), os multicumpleanos, as pachangas en Balaídos, o grupo de volei, as vellas glorias do padel... Estou convencido que todo o bo conseguido na investigación e no traballo destes anos, se debe en gran medida ao bo clima e ao ambiente vivido! Creo que cando estas feliz e agusto coas persoas coas que pasas gran parte do teu tempo, traballas con outra motivación e ganas.

Gracias en especial a Amaya, polo cariño, a amizade e tantos momentos xuntos. A Marcos e a súa risa que nos alegra a todos dende primeira hora. A Patri pola alegría e o bo corazón (nótase que ibas... sorte pa Bruno que non foi así). A Lore por tódolos seus consellos e axuda. Fernando, Miguel, Elsi e todo o grupo de fútbol. O meu compañeiro de raqueta Sergio, e por deixarse perder a Jesús e Bruno. Salo, Chus, Silvia, Lore, Giulia, Manu, Edu, Luci, ...cos que compartín máis directamente o traballo, resultados, e tamén risas e moitas conversas...sodes unha parte moi importante desta tese. E a outras moitas persoas que se me veñen á cabeza, pero convertería estes párrafos nalgo demasiado “cursi”... Gracias.

I really thank to my flat mates! They made Vigo to be my second home. Wilson (my big brother), Attila, Giulia and Roberta, I have been very fortunate to have shared this part of my life with you.

I also want to thank all lab crew I met in USA. In special, I thank Judith very much for having accepted me there. She also was a great help to achieve all goals we had proposed. Thank’s to be so kind and friendly. I also thank Sarala, Yinzhou, Heli, Angela, Rem, Anna, and Trey to be my family there. And specially Joni, from the heaven I’m sure you continue smiling. Thank’s so much.

Gracias tamén a todo o equipo de Rafa e Isaac da USC. A Jorge e a Edgar por haberme axudado a manexar os equipos en todas esas mini estancias en Santiago. Als grups de

Agradecementos

l'IQAC de Barcelona i de la Universitat Rovira i Virgili de Reus, gràcies per la col·laboració i tot el treball compartit.

O agradecemento tamén vai para todo o persoal do Instituto de Investigacións Mariñas, outros grupos de investigación, a xente da limpeza, taller, administración, vixiantes. E en especial a Bárbara e Manuel, polo gran traballo que realizan para o benestar de todo o centro, e ademais polo cariño e alegría que poñen ao facelo, a pesar de sufrir condicións laborais indignas durante moito tempo.

Agradezo tamén ao CSIC polo financiamento da beca e os contratos que desfrutei durante esta tese, á Axencia Galega de Innovación pola beca para a estadía en USA, á USC polo programa de doutoramento, e ao proxecto concedido pola CICYT (AGL2009-12374-C03-01) que financiou a meirande parte dos traballos realizados.

Moitas gracias.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

“Dende aquí vexo un camiño
que non sei adonde vai;
polo mismo que n’o sei
quixerao poder andar”
(Rosalía de Castro)

Resumen
El objetivo del presente trabajo es caracterizar los derivados de la oxidación enzimática y no enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, PUFAs ω-3 y ω-6, producidos tras el consumo de los productos de la pesca o aceites de pescado empleados como suplementos nutricionales, y relacionar el perfil de estos mediadores lipídicos con la potencial prevención del desarrollo de la inflamación, estrés oxidativo y otras posibles alteraciones asociadas a la dieta en modelos animales de desórdenes metabólicos. Para realizar este trabajo se utiliza la infraestructura de un proyecto coordinado vigente en el que se emplea un modelo animal de ratas Wistar normales (WYR, no hipertensas y heterozigotas para el gen del receptor de la leptina) y ratas Koletsky (SHROB, hipertensas y homocigotas), alimentadas con dietas enriquecidas con diferentes proporciones de los principales PUFAs de origen marino, EPA y DHA. Además, se estudian los posibles efectos sinérgicos de combinar estos PUFAs ω-3 con antioxidantes naturales en un contexto dietario sano y uno alto en grasa y azúcares. Para el análisis de los mediadores lipídicos se desarrolla una metodología basada en la extracción en fase sólida y cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas.

Resumo
O obxectivo do presente traballo é caracterizar os produtos de oxidación enzimática e non-enzimática dos ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, PUFAs ω-3 y ω-6, producidos tra-lo consumo de produtos da pesca ou aceites de pescado empregados como suplementos nutricionais, e relacionar o perfil destes mediadores lipídicos con medidas de inflamación, estrés oxidativo e outros parámetros biomédicos dependentes da dieta en modelos animais de desordes metabólicos. Para realizar este traballo utilízase a infraestrutura dun proxecto coordinado vixente no que se utiliza un modelo animal de ratas Wistar normais (WYR, non hipertensas e heterozigotas para o xen do receptor da leptina) e ratas Koletsky (SHROB, hipertensas e homozigotas), alimentadas con dietas enriquecidas con diferentes proporcións dos principais PUFA de orixe mariño, EPA e DHA. Ademáis, estúdianse os posibles efectos sinérxicos de combinar estes PUFAs ω-3 con antioxidantes naturais nun contexto dietario sano e outro alto en graxa e azucres. Para a análise dos mediadores lipídicos desarróllase unha metodoloxía baseada na extracción en fase sólida e cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas.

Summary
The aim of this work is to characterize the enzimatic and non-enzimatic oxidation products of long chain polyunsaturated fatty acids, ω-3 and ω-6 PUFAs, produced by fish or marine oils supplements consumption, and correlate levels of lipid mediators with inflammation, oxidative stress, and biomedical parameters in animal models of metabolic disorders. To achieve this goal, an animal model of normal Wistar rats (WYR not hypertensive and heterozygous for the gene of the leptin receptor) and Koletsky rats (SHROB, homozygous hypertensive) fed with different proportions of marine EPA and DHA will be used. Then, the sinergistic effect of combining ω-3 PUFAs and polyphenols in a standard and high-fat high sucrose diet will be evaluated. An analytical platform based on SPE and LC-MS will be developed to determine lipid mediators.

ÍNDICE

Símbolos y abreviaturas

I. Resumen.....1

II. Justificación y objetivos.....9

III. Introducción.....13

1. LOS LÍPIDOS.....15
   1.1. Clasificación.....15
   1.2. Digestión, absorción y transporte.....15
   1.3. Funciones biológicas.....16
   1.4. Ácidos grasos.....17
      1.4.1. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).....18
         1.4.1.1. Nomenclatura.....18
         1.4.1.2. Estructura y propiedades físico-químicas.....19
         1.4.1.3. Biosíntesis.....19
         1.4.1.4. Oxidación.....20

2. CONSUMO DE PUFAs ω-3 Y SALUD.....22
   2.1. La dieta humana y las alteraciones metabólicas.....22
   2.2. Desbalance de los PUFAs ω-6/ω-3 en la dieta.....24
      2.2.1. Función biológica de los PUFAs ω-6 y ω-3 en relación a los desórdenes metabólicos.....25
   2.3. Importancia del consumo de PUFAs ω-3 de origen marino.....32
   2.4. Efectos sinérgicos de la combinación de PUFAs ω-3 en la dieta con polifenoles.....34

3. MEDIADORES LIPÍDICOS DERIVADOS DE LOS PUFAs ω-3 y ω-6.....36
   3.1. Clasificación.....36
   3.2. Rutas metabólicas de síntesis.....42
   3.3. Bioactividad de las diferentes familias de mediadores lipídicos.....48
      3.3.1. La inflamación.....48
      3.3.2. Prostanoides.....49
      3.3.3. Isoprostanos.....51
      3.3.4. Leucotrienos.....51
      3.3.5. Oxo-derivados.....52
      3.3.6. Lipoxinas.....52
      3.3.7. Hidróxidos e hidroperóxidos.....53
      3.3.8. Epóxidos y dihidróxidos.....53
      3.3.9. Resolvinas, protectinas y maresinas.....53
   3.4. Estado del arte del estudio de los mediadores lipídicos.....55
      3.4.1. Los mediadores lipídicos en relación con diferentes enfermedades inflamatorias y desórdenes metabólicos.....59

3.4.2. Mediadores lipídicos y aplicaciones farmacológicas.....62
3.4.3. Los mediadores lipídicos en la investigación nutricional.....63

4. METODOLOGÍA.....69
4.1. Lipidómica.....69
4.1.1. Introducción: la Lipidómica en el conjunto de técnicas *ómicas*…….69
4.1.2. Lipidómica aplicada al análisis de mediadores lipídicos…..…70
4.1.2.1. Principales técnicas de preparación de muestra.....70
A. Extracción Líquido-Líquido…….....…..71
B. Extracción en Fase Sólida.....71
✓ SPE para la extracción de mediadores lipídicos.....72
4.1.2.2. Principales métodos de determinación.....77
A. Inmunoensayo enzimático (ELISA)….....77
B. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.....77
C. Cromatografía Líquida.....78
D. Cromatografía Líquida-Espectrometría de masas.....79
4.1.2.3. Fundamentos de la LC para el análisis de mediadores lipídicos..81
A. Tipo de columna….....81
B. Fase móvil y gradiente.....82
C. Otros parámetros.....83
4.1.2.4. Fundamentos de la MS para el análisis de mediadores lipídicos.....85
A. Sistemas de ionización de muestra….....85
✓ Ionización por electrospray (ESI)…….....81
✓ Ionización química a presión atmosférica (APCI)..…87
✓ Fotoionización a presión atmosférica (APPI)….....88
B. Analizadores de masas….....88
✓ Cuadrupolos (Q)….....…….89
✓ Trampas de Iones…….....…..89
✓ Analizadores de Tiempo de Vuelo (TOF)….....90
C. Modos de adquisición: *full scan vs* MS/MS.....92
4.1.2.5. Desafíos actuales de la LC-MS aplicada al estudio de los mediadores lipídicos….....94
4.2. Modelos *in vitro* utilizados en el estudio de la digestión gastrointestinal y la absorción lipídica.....96
4.2.1. Tracto gastrointestinal TIM-1.....96
4.2.2. Línea celular Caco-2.....98
4.2.3. Uso de modelos gastrointestinales y cultivos celulares para el estudio de la oxidación y absorción de lípidos…….....…….99
4.3. Modelos animales utilizados en esta tesis para el estudio del efecto saludable ejercido por una dieta rica en PUFAs ω-3…….....……101
A. Modelos genéticos….....102
B. Modelos dietarios.....102

IV. Resultados y discusión.....105

1. Capítulo I: Lipidomic analysis of polyunsaturated fatty acids and their oxygenated metabolites in plasma by solid-phase extraction followed by LC-MS…….....107
   1.1. Abstract
   1.2. Introduction
   1.3. Experimental
      1.3.1. Standards, solvents and sorbents
      1.3.2. Samples and sample preparation
      1.3.3. Apparatus
      1.3.4. LC-MS/MS conditions
      1.3.5. QqQ system
      1.3.6. LIT system
   1.4. Results and discussion
      1.4.1. Optimization of LC-ESI-MS/MS conditions
      1.4.2. Detection method validation
      1.4.3. Optimization of solid-phase extraction (SPE)
         1.4.3.1. Breakthrough and elution solvent volume, washing conditions and extraction sorbent
         1.4.3.2. Effect of sample pH, organic modifiers addition and temperature
      1.4.4. Repeatability, SPE-LC-MS recoveries and matrix effects
      1.4.5. Application to plasma analysis
   1.5. Conclusions
   1.6. References

2. Capítulo II: Healthy effect of different proportions of marine ω-3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation.....123
   2.1. Abstract
   2.2. Introduction
   2.3. Materials and Methods
      2.3.1. Animals and diets
      2.3.2. Fatty acid analysis of the oil supplements
      2.3.3. Plasma and erythrocyte sampling for FA analysis
      2.3.4. Extraction and analysis of plasma TFA and FFA
      2.3.5. Extraction and analysis of FA from erythrocyte membranes (EMs)
      2.3.6. FAD indexes measurement
      2.3.7. SPE for lipid metabolites isolation from plasma samples
      2.3.8. Analysis of lipid metabolites by LC-ESI-MS/MS
      2.3.9. Statistical analysis
   2.4. Results
      2.4.1. Effect of dietary interventions on plasma FFA profile, and FA incorporation into tissues: ratio ω-6/ω-3
      2.4.2. Effect of dietary interventions on FAD activity

2.4.3. Determination of lipid mediators in plasma depending on the ingested amount of ARA, EPA and DHA
2.5. Discussion
2.6. Conclusion
2.7. References

3. Capítulo III: Lipidomics to analyze the influence of diets with different EPA:DHA ratios in the progression of Metabolic Syndrome using SHROB rats as a model...133
3.1. Abstract
3.2. Introduction
3.3. Materials and Methods
3.3.1. Animals and diets
3.3.2. Fatty acid analysis of the oil supplements
3.3.3. Plasma and erythrocyte sampling for FA analysis
3.3.4. Extraction and analysis of plasma TFA and FFA
3.3.5. Extraction and analysis of FA from erythrocyte membranes
3.3.6. Fatty acid desaturase indexes measurement
3.3.7. SPE for lipid metabolites isolation from plasma samples
3.3.8. Analysis of lipid metabolites by LC-ESI-MS/MS
3.3.9. Statistical analysis
3.4. Results
3.4.1. Effect on plasma FFA profile, FA incorporation into tissues, and ω-6/ω-3 ratios
3.4.2. Effect on FAD activity
3.4.3. Formation of plasma lipid mediators depending on the ingested amount of ARA, EPA and DHA
3.4.4. Dietary interventions effect on general biochemical parameters
3.5. Discussion
3.6. References

4. Capítulo IV: Relative levels of dietary EPA and DHA impact gastric oxidation and essential fatty acid uptake.....143
4.1. Abstract
4.2. Introduction
4.3. Materials and Methods
4.3.1. Chemicals
4.3.2. TIM-1 experiments
4.3.2.1. Preparation of EPA:DHA 'meals'
4.3.2.2. Fatty acid analysis of the oil supplements
4.3.2.3. TIM-1 in vitro digestion
4.3.2.4. Determination FA oxidation in the stomach and intestinal bioaccessible lipids
4.3.3. Caco-2 cells experiments
4.3.3.1. Cell culture

4.3.3.2. Assimilation of oxidized and non-oxidized PUFAs by Caco-2 cells
4.3.3.3. Metabolism of oxidized and non-oxidized PUFAs in Caco-2 cells
4.3.4. Statistical analysis
4.4. Results
4.4.1. TIM-1 experiments
4.4.1.1. FA oxidation during TIM-1 stomach digestion as a function of the dietary EPA:DHA ratio.
4.4.1.2. Bioaccessibility of FA digestive products in simulated small intestine depends on the dietary EPA:DHA ratio.
4.4.2. Caco-2 cell experiments
4.4.2.1. Influence of PUFA oxidation by gastric conditions on the uptake and metabolism of EPA and DHA by Caco-2 cells
4.4.2.2. Influence of PUFA oxidation by gastric conditions and EPA:DHA ratios on the uptake and metabolism of EPA and DHA by Caco-2 cells
4.5. Discussion
4.6. References

5. Capítulo V: A lipidomic study on the regulation of inflammation and oxidative stress targeted by marine ω-3 PUFA and polyphenols in HFHS diets.....165
5.1. Abstract
5.2. Introduction
5.3. Materials and Methods
5.3.1. Animals and diets
5.3.2. Sample processing
5.3.3. Total fatty acids analysis in liver, plasma, adipose tissue, erythrocytes, and circulating FFA analysis in plasma
5.3.4. Fatty acid desaturase (FAD) indexes
5.3.5. Lipid peroxidation, CRP and TNFα levels in liver, protein carbonylation, ORAC and antioxidant enzymes in plasma
5.3.6. Analysis of lipid metabolites by SPE-LC-ESI-MS/MS
5.3.7. Statistics
5.4. Results
5.4.1. Effect of fish oils and polyphenol supplements on the Standard diet
5.4.1.1. Fatty acids profile in tissues and plasma
5.4.1.1.1. TFA incorporation into liver
5.4.1.1.2. TFA profile in plasma
5.4.1.1.3. TFA incorporation into erythrocyte membranes
5.4.1.1.4. TFA accumulation in adipose tissue
5.4.1.1.5. Circulating FFAs profile in plasma
5.4.1.2. FADs indexes
5.4.1.3. Eicosanoid and docosanoids levels
5.4.1.4. Oxidative stress parameters

5.4.2. Effect of fish oils and polyphenol supplements on the HFHS diet
5.4.2.1. Fatty acids profile in tissues and plasma
5.4.2.1.1. TFA incorporation into liver
5.4.2.1.2. TFA profile in plasma
5.4.2.1.3. TFA incorporation into erythrocyte membranes
5.4.2.1.4. TFA accumulation in adipose tissue
5.4.2.1.5. Circulating FFAs profile in plasma
5.4.2.2. FADs indexes
5.4.2.3. Eicosanoid and docosanoids levels
5.4.2.4. Oxidative stress parameters
5.5. Discussion
5.5.1. Fish oils influence
5.5.2. Polyphenols influence
5.6. Conclusion
5.7. References

6. Capítulo VI: Non-targeted LC-MS/MS assay for screening over 100 lipid mediators from ARA, EPA, and DHA in biological samples based on mass spectra fragmentations.....183
6.1. Abstract
6.2. Introduction
6.3. Experimental section
6.3.1. Chemicals
6.3.2. Plasma and adipose tissue samples
6.3.3. SPE
6.3.4. LC-MS/MS
6.3.5. Method validation: linearity, calibration curves, repeatability, reproducibility, LOD, LOQ, recovery experiments, and matrix effect
6.3.6. Samples analysis and validation
6.4. Results and discussion
6.4.1. SPE-LC-MS/MS validation
6.4.2. Fragmentation patterns through the analysis of mass spectra of lipid mediators
6.4.2.1. Monohydroxides
6.4.2.2. Hydroperoxides
6.4.2.3. Prostaglandins
6.4.2.4. Resolvins, Protectins, and Maresins
6.4.2.5. Leukotrienes, Lipoxins, and dihydroxides
6.4.2.6. Epoxy and oxo-derivates
6.4.2.7. Thromboxanes
6.4.3. Tentative identifications in samples and validation
6.5. Conclusions
6.6. References

V. Discusión integradora.....217

VI. Conclusiones.....235

VII. Bibliografía.....239

Anexos.....267

Anexo I: Material suplementario del capítulo I.....267
Anexo I: Material suplementario del capítulo II.....270
Anexo I: Material suplementario del capítulo III.....273
Anexo I: Material suplementario del capítulo IV.....276
Anexo I: Material suplementario del capítulo V.....277
Anexo I: Material suplementario del capítulo VI.....280

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Símbolos y abreviaturas

AKT: enzima quinasa B
ALA: ácido linolénico
APCI: ionización química a presión atmosférica
APPI: fotoionización a presión atmosférica
ARA: ácido araquidónico
BHT: hidroxitolueno butílico
cAMP: adenosín monofosfato cíclico
CID: disociación inducida por colisión
COX: ciclooxigenasa
CRP: proteina C reactiva
CVD: enfermedades cardiovasculares
CyP450: citocromo monooxigenasa
DC: corriente continua
DGLA: ácido dihomo-γ-linolénico
DHA: ácido docosahexanoico
DHO: dehidrogenasa
DPA: ácido docosopentanoico
ELISA: inmunoensayo enzimático
EPA: ácido eicosapentanoico
ESI: ionización por electrospray
FA: ácido graso
FFA: ácido graso libre
GC: cromatografía de gases
GPX: glutationa peroxidasa
HDL: lipoproteína de alta densidad
IBD: enfermedad inflamatoria de Bowel
IL: interleuquina
LA: ácido linoleico
LC: cromatografía líquida
LDL: lipoproteína de baja densidad
LIT: trampa lineal de iones
LLE: extracción líquido-líquido
LOD: límite de detección
LOQ: límite de cuantificación
LOX: lipooxigenasa
MetS: síndrome metabólico
MS: espectrometría de masas
MS/MS: espectr. de masas en tándem
m/z: relación masa/carga
MUFA: ácido graso monoinsaturado
NCI: ionización química negativa
NFkB: factor nuclear kappa B
NMR: resonancia magnética nuclear
NSAID: droga antiinflamatoria no esteroidea
OMS: organización mundial de la salud
ORAC: capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno
PI2: prostaciclina 2
PKA: enzima quinasa A
PLA_2: fosfolipasa A_2
PPAR: factor de transposición nuclear
PUFA: ácido graso poliinsaturado
QqQ: triple cuadrupolo
REDOX: reducción-oxidación
ROS: especies reactivas de oxígeno
RF: radiofrecuencia
SD: desviación estándar
sEH: epóxido hidrolasa soluble
SFA: ácido graso saturado
SOD: superóxido dismutasa
SPE: extracción en fase sólida
TC: colesterol total
TG: triglicéridos
TFA: ácidos grasos totales
TFFα: factor de necrosis tumoral
TOF: analizador de tiempo de vuelo
UV: ultravioleta

I. RESUMEN

Summary

The evolution of the human diet towards an increase in the intake of saturated fats and trans fats, PUFAs ω-6 and refined sugars, and a decrease of the amount of PUFAs ω-3, vitamins, minerals and natural antioxidants is one of the main causes of the emergence of new pathologies and metabolic disorders such as cardiovascular diseases, obesity, diabetes, and so on. Most of these alterations are associated with the appearance and development of inflammatory processes and oxidative stress. On the other hand, an increase in the consumption of diets rich in fish products has been suggested to reduce the risk of suffering cardiovascular diseases, diabetes, Alzheimer's, metabolic syndrome and others derived from inflammatory processes and oxidative stress.

Different components present of fish and fishery products have been suggested as responsible to the healthy benefits of fish enriched diets. Especially ω-3 PUFA, EPA and DHA. Interest in ω-3 fatty acids begins in the 70s and 80s when low mortality associated to cardiovascular disease was observed in Eskimo populations having fundamentally a fish diet.As consequence, a high demand of marine PUFA enriched foodstuffs has been occurred during the last years. Then the number of works trying to clarify the nutritional and beneficial role of marine ω-3 PUFA has exponentially grown during the last decades. One of the main objectives of nutritional research is to understand the complex relationship between nutrition, metabolism and health. However, the mechanisms underlying action of these fatty acids have not yet been fully determined. Additionally, the the optimal doses and proportions of EPA and DHA that maximize such beneficial effects have not been properly stablished.

In this context, the research carried out in this thesis has tried to go deeper in the possible mechanisms by which the intake of ω-3 PUFAs and other components of the diet can regulate inflammatory processes and oxidative stress related to different metabolic disorders. The focus of the work has been the lipid modulation occurred after fish oil comsumption in terms of: the effects on the lipid composition of tissues and organs, the production of lipid mediators derived from the metabolism of marine PUFA, the regulation of enzymes related to the synthesis and oxidation of fatty acids, and the bioavailabily of of marine PUFAs in the digestive tract. For these studies, animal models supplemented with fish oils and a TIM simulator of digestion and intestinal absorption have been employed. Additonally, Quantitative Lipidomics Platforms based on mass spectrometry were developed for the accurate analysis of lipid mediators and fatty acids. Finally, Lipidomics data were correlated with Proteomics Data and different biomedical parameters in the same animal models through other studies carried out in the group, in order to obtain the widest view of the metabolic processes regulated by diet and healthy effects of marine PUFAs consumption.

Lipid mediators, metabolites derived from PUFA oxidation, have been the main object of study in this research. Lipid mediators derived from the enzymatic and non-enzymatic oxidation of PUFAs (ARA, EPA and DHA), eicosanoids and

docosahexanoids, are a complex family of biomolecules that regulate inflammatory processes, gene expression, immune system, lipid metabolism, and so on. They include the families of prostaglandins, leukotrienes, thromboxanes, hydroxides, hydroperoxides, resolvins, protectins, lipoxins, etc. The scientific community has done huge progress revealing the mechanisms and routes regulated by the different families of these compounds. Some of them have been well established as biomarkers of inflammation. They have been investigated in the pharmacological field, nutrition as well, considering their therapeutic application. Many EPA and DHA hydroxy derivatives are related to the regulation of vascular tone, atherosclerosis, Alzheimer's, different types of cancer, and so on. Recent studies are linking new identified compounds derived from EPA and DHA as resolvins and protectins, with a powerful ability to resolve inflammation. However, little is known about the potentiality of diet to modulate the synthesis of these compounds and thus its influence on inflammatory processes, oxidative stress and then, metabolic disorders.

The study of lipid mediators is complex for several reasons. From the methodological point of view, the influence of the duration of nutritional interventions, administered doses, age of individuals, genetic and other factors, on their production has not yet been known. From the point of view of the bioactivity of the compounds and the understanding of the mechanisms that are being regulated in the context of a particular diet, the analysis of a small group of these compounds may hinder a clear and detailed understanding of the mechanisms and complex regulatory networks involved in inflammatory processes. It is necessary to obtain an image as wide as possible of all the families of compounds involved in a particular route. The different groups of compounds frecuently present, functional contrasting and interrelated activities. In addition, competitive relations are established for the same enzymes, affecting the balance between the production of pro-inflammatory compounds and compounds that may resolve inflammation.

From the analytical point of view, there are some limitations and major challenges related to the joint determination of a large number of molecules belonging to different families in a unic analysis. Among them: the low standardization of sampling methods; interferences in the analysis due to the sample matrix; instability and easy degradation of the compounds; low LODs of highly relevant families such as resolvins and protectins that make difficult their determination *in vivo*; and the simultaneous analysis of isomeric compounds chemically similar and difficult to resolve by chromatography, and very difficult to correctly identify by mass spectrometry.

The workflow followed in this research is summarized below. We began by developing the analytical methodology for the analysis of lipid mediators in plasma samples. The analytical platform developed was based on a solid phase extraction process followed by LC-ESI-MS in MRM mode. Firstly, the detection parameters were optimized in two types of different mass analyzers, a triple quadrupole (QqQ) and a linear ion trap (LIT) for 23 metabolites studied and representatives of the main metabolic pathways of EPA,

DHA and ARA. We argued the advantages of using a LIT to reduce the risk of false positives in this particular case study. Subsequently, the chromatographic separation and solid phase extraction conditions were optimized using different adsorbents, and the methodology was validated by commercial standards. Among the main difficulties to obtain quantitative recoveries was the instability of the compounds, their different solubility, impurities of the reagents, false positives in the identifications, coelution of isobaric forms with identical fragments.

The validated methodology was subsequently applied to study the production of these compounds in interventional studies supplemented with fish oils with variable EPA and DHA contents. Two different animal models, a healthy model (Wistar Kyoto rats) and a genetically obese and hypertensive model (Kolestky rats), were used. The influence of supplements on the synthesis of plasma lipid mediators, the activity of the desaturase enzymes, and the modulation of the lipid profile of FFA and TFA in plasma and erythrocytes were studied. These data were correlated with the effects observed in other studies of the group related to protein oxidation and revealing the biometric and clinical parameters associated to metabolic alterations in the same animals.

The results suggested that an equilibrate EPA:DHA ratio of 1:1 in fish oil leads to helpful inflammatory and oxidative stress response. This positive response is even maintained in a genetic context of obesity and hypertension.. The contribution of EPA and DHA leads to a significant substitution of ARA in erythrocyte membranes and in general, in all tissues. Results suggested that fish oils produced a replacement of ω-6 by ω-3 PUFAs in membranes and tissues, and consequently they improved inflammatory and oxidative stress parameters: favored the activity of 12/15- lipoxygenases on ω-3 PUFAs, enhanced glutathione peroxidases activity, modulated proinflammatory lipid mediators synthesis through the cyclooxygenase (COX) pathways and down-regulated the synthesis de novo of ARA leaded by Δ5 desaturase.

Diets with a higher content of unsaturation characterized by higher concentrations of DHA induced a higher lipid and protein peroxidation than those supplemented with EPA:DHA 1:1. They also produced major oxidation than diets having higher concentrations of EPA than DHA. Therefore, to clarify the role of unsaturation in the in vivo peroxidation observed in the first animal experiments, we studied the oxidative stability during the digestive process of the different proportions of EPA:DHA. Results were correlated with subsequent intestinal absorption and fatty acid metabolism. Several studies have shown that the stomach can act as a bioreactor promoting the peroxidation of unsaturated lipids. In addition, a previous study carried out between our group and the group of Prof. Judith Storch in Rutgers University (USA) showed that the increase of the lipid oxidation of the PUFAs produced a reduction of the uptake by intestinal Caco-2 cells.

To perform these studies, two *in vitro* models were used: a dynamic model of the gastrointestinal tract using the TIM-1 equipment, and a cell culture using Caco-2 lines

representing the human intestinal epithelium. The experiments were designed to determine the relationship between the PUFA type and the EPA:DHA ratio of the fish oil supplement, with the degree of oxidation suffered during digestion. Then, the potential effect on the uptake and metabolism in intestinal cells was determined. The results showed that the 1:1 EPA:DHA ratio was the least oxidized and the one that presented a higher percentage of absorption during gastrointestinal digestion. Therefore, the greater anti-inflammatory and antioxidant effectiveness observed for the 1:1 EPA:DHA diet compared to the other proportions of these fatty acids may be associated, in part, with a greater stability and bioavailability during the digestive process.

Due to the susceptibility of oxidation that EPA and DHA showed *in vivo*, the study continued incorporating compounds in the diet that could stabilize ω-3 PUFAs. In relation to this, the possible synergistic effect of the combined intake of a diet supplemented with fish oil (1:1 EPA:DHA) with antioxidants (grape polyphenols) was addressed. The use of dietary antioxidants is a common strategy to protect lipids from oxidation. Previous studies carried out in our group demonstrated the effectiveness of grape seed polyphenols for preventing the peroxidation of fish oils in the digestive tract and facilitating their intestinal absorption.

Once again, a double experiment was performed with two animal models, a healthy model and a model of metabolic disorders induced by a high fat high sucrose diet. The previous genetically diseased model with SHORB rats was replaced by a model of diet induced metabolic disorders, thus avoiding genetically controlled alterations that can not be reversed with nutritional interventions. Additionally, this new model based on a diet rich in fat and sugars, allows going deeper on theinfluence of the dietary background (standard or high-fat high-sucrose) in the efficacy and mechanisms regulated by fish oils.

In agreement with the previous results, a general anti-inflammatory and antioxidant effect was observed in both animal models supplemented by marine PUFAs. The functionality of this supplement proved to be independent of the two caloric backgrouds studied. When polyphenols were included in the diet, in concordance with expectations, an antioxidant effect was observed in both dietary backgrouds. However, its ability to regulate inflammation was significantly affected by the presence or absence of the high fat and sugar content. In the standard dietary group, the polyphenols lowered the parameters of oxidative stress and inflammation, resulting in a synergistic effect when combined with ω-3 PUFAs. In the high fat high sucrose diet, polyphenols were not effective for reducing inflammation parameters and even increasing some of them. The proposed mechanisms for the bioactivity of ω-3 PUFAs were related to phenomena of enzymatic competition, the dilution of the proportion of PUFAs ω-6 by increasing the intake of ω-3 PUFAs, and the activation of the endogenous antioxidant and anti-inflammatory system in many cases by the lipid mediators themselves. On the other hand, the polyphenols act at the level of detoxification of ROS, modulating the activity

of the antioxidant enzymes. Regarding the different bioactivity, one of the possible mechanisms may be that other components of the diet influence the bioavailability, absorption and metabolism of the polyphenols; thus, affecting their functionality.

Finally, the last chapter addressed the improvement of the analysis methodology to increase the range of metabolites and tissues studied, in order to get a wider picture of the compouns formed, mechanisms and modulated routes. An initial screening method was used to obtain qualitative information for a higher number of lipid mediators as possible, so that the quantitative analysis could be focused on the target metabolites of each tissue. This methodological improvement is currently being applied to plasma samples of adipose tissue for a screening of more than 100 lipid mediators in the projects that are being carried out in the group, with new animal experiments and different diets.

In conclusion, considering analytical results, this research work has contributed to set advanced instrumental procedures for lipid mediators based on SPE coupled to MS aimed to determinate a high number of lipid mediators in different types of biological samples. Complex methodologies have been developed and an innovative method of analysis has been proposed which may be useful for optimizing resources and efficiency in the future research.

In addition, the results of the different nutritional interventions performed showed that this work has contributed to the recent field of study of lipid mediators: the modulation of the profile of the different metabolite families associated with the diet. The influence of the combination of ω-3 PUFAs and polyphenols on the metabolic pathways of lipid mediators has been characterized for the first time. The work done has contributed to understanding the mechanisms involved in the health effects of marine ω-3 PUFAs on inflammation, oxidative stress and metabolic disorders. Additionally, it provides information about the right design of fish oils and marine supplements considering the proportions between EPA and DHA

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido al creciente aumento de los desórdenes y enfermedades metabólicas inducidas por la dieta en las sociedades occidentalizadas, el ámbito de la investigación nutricional se sitúa en una de las principales líneas de trabajo de las últimas décadas. Su principal objetivo es el de elucidar la compleja relación existente entre nutrición, metabolismo y salud. El objetivo fundamental de este trabajo ha sido investigar los posibles mecanismos por los que la ingesta de PUFAs ω-3 de origen marino, EPA y DHA, ejercen su papel beneficioso en multitud de procesos inflamatorios y de estrés oxidativo relacionados con enfermedades de tipo cardiovascular, síndrome metabólico, diabetes, Alzheimer, etc.

El trabajo se ha centrado principalmente en la respuesta inflamatoria regulada por los mediadores lipídicos derivados de la oxidación enzimática y no enzimática de los PUFAs ω-3 EPA y DHA, y ω-6 ARA en diferentes contextos metabólicos. Se ha estudiado también la regulación de las enzimas relacionadas con la síntesis de los ácidos grasos, la modulación del perfil lipídico en diferentes tejidos y su relación con la producción de mediadores lipídicos, la influencia de la estabilidad oxidativa de los PUFAs en el tracto digestivo y su posterior biodisponibilidad, el efecto sinérgico de la combinación de PUFAs de origen marino y polifenoles respecto a la respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo, y la influencia de otros componentes de la dieta como grasas y azúcares en dichos procesos.

Objetivos:

1. Identificar mediadores lipídicos derivados de la oxidación enzimática y no enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados ω-3 EPA y DHA, y ω-6 ARA como biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo relacionados con diferentes desórdenes metabólicos. Estudiar las principales rutas metabólicas de los mediadores lipídicos derivados de estos ácidos grasos y desarrollar las metodologías lipidómicas para su análisis cualitativo y cuantitativo en diferentes tejidos y plasma. Optimizar y validar las diferentes etapas de la Extracción en Fase Sólida y la Cromatografía Líquida acoplada a la Espectrometría de Masas para su determinación.

2. Aplicar las técnicas de Lipidómica desarrolladas en el objetivo 1 para buscar, analizar y cuantificar los mediadores lipídicos en diferentes estudios nutricionales en modelos animales. Relacionar los resultados con la regulación de la respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo, el perfil lipídico modulado por la dieta, la regulación enzimática, y diferentes parámetros proteómicos, biométricos y clínicos medidos en los mismos animales que configuran una visión global de la influencia de la dieta sobre las enfermedades metabólicas.

    2.1. Estudiar la influencia de la proporción en la dieta entre los PUFAs ω-3, EPA y DHA, en relación a la respuesta inflamatoria, de estrés oxidativo y los

desórdenes metabólicos, utilizando para ello dos modelos animales suplementados con proporciones variables EPA:DHA: un modelo sano (ratas Wistar Kyoto) y un modelo genéticamente obeso e hipertenso (ratas Kolestky).

2.2. Estudiar la posible sinergia entre un suplemento de EPA y DHA con polifenoles de uva en la regulación de los mismos procesos mencionados anteriormente, utilizando un modelo animal sano y un modelo con una dieta alta en grasa y azúcares. Relacionar la bioactividad de los PUFAs y polifenoles con el contexto dietario.

2.3. Establecer posibles mecanismos que justifiquen los resultados observados en los estudios nutricionales relacionando los mediadores lipídicos derivados del EPA, DHA y ARA con el sistema antioxidante endógeno y la resolución/promoción de los procesos inflamatorios.

3. Analizar la oxidación de los PUFAs ω-3, EPA y DHA, asociada al proceso digestivo y posterior influencia sobre la absorción intestinal, mediante técnicas *in vitro* para simular el tracto digestivo (simulador TIM-1) y cultivos celulares de monocapas Caco-2 que reproduzcan las condiciones de absorción y transporte en el intestino. Relacionar los resultados de estabilidad oxidativa de los diferentes suplementos con su biodisponibilidad y bioactividad en los modelos nutricionales estudiados en el objetivo 2.1.

4. Desarrollar una metodología de análisis no dirigido basada en la información estructural de los compuestos y la interpretación de espectros experimentales de MS/MS, para el *screening* del mayor número de mediadores lipídicos de todas las familias de compuestos en muestras biológicas.

III. INTRODUCCIÓN

1. LOS LÍPIDOS

Hasta el momento no existe una definición satisfactoria de los lípidos, al constituir estos un grupo de sustancias muy heterogéneo tanto en su estructura como en sus propiedades físico-químicas. Tradicionalmente, los lípidos se han considerado como todos aquellos compuestos formados por ácidos grasos. Sin embargo, dicha definición resulta insuficiente para incluir en la misma a los esteroides, ceras, terpenos, etc. Otras definiciones se basan exclusivamente en su liposolubilidad. Sin embargo, se trata de definiciones controvertidas, ya que algunos ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) son solubles en agua. Fahy et al. (1) propusieron una nueva definición más exhaustiva que considera los lípidos como pequeñas moléculas hidrófobas que pueden originarse completa o parcialmente a través de condensaciones de tioésteres o unidades de isopreno.

1.1. Clasificación

Dada la gran controversia en la definición, son muchas las clasificaciones que se pueden hacer de las diferentes familias de lípidos. El sistema de clasificación más sencillo es el que los agrupa por la presencia (saponificables) o ausencia (insaponificables) de ácidos grasos en la molécula (Fig. 1). Los acilglicéridos están formados por la esterificación de una (monoglicéridos), dos (diglicéridos) o tres (triglicéridos) moléculas de ácidos grasos con una molécula de glicerina. Las ceras son ésteres de un ácido graso con un alcohol. Los fosfolípidos y glucolípidos son acilglicéridos que sustituyen un ácido graso por una molécula de ácido ortofosfórico o un monosacárido, respectivamente. En la familia de los terpenos se encuentran alcoholes (mentol, limoneno, etc), vitaminas (A, E, etc), o pigmentos vegetales. Los esteroides comprenden los esteroles (colesterol, vit. D) y algunas hormonas (testosterona, cortisona, etc) (2).

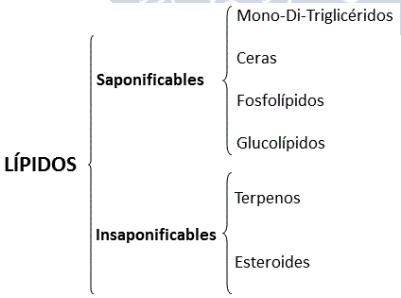


Fig.1: Clasificación de las diferentes familias de lípidos según la presencia (saponificables) o ausencia (insaponificables) de ácidos grasos

1.2. Digestión, absorción y transporte

El proceso digestivo de la grasa (esquema en Fig. 2) comienza en el estómago con la hidrólisis de los triglicéridos y fosfolípidos en sus correspondientes ácidos grasos y acilglicéridos, inducida por la lipasa gástrica. Esta hidrólisis se completa más tarde por la acción de la lipasa pancreática en el duodeno, la primera parte del intestino delgado.

Las lipasas actúan preferentemente en una interfase lípido-agua por lo que los triglicéridos y demás lípidos son previamente emulsificados gracias a las sales biliares secretadas en el duodeno. Los ésteres de colesterol se hidrolizan también a colesterol y ácidos grasos libres.

Los productos de la hidrólisis son absorbidos en el intestino por difusión. Los ácidos grasos de cadena corta (menos hidrofóbicos) se incorporan en el flujo sanguíneo y en el ciclo de la β-oxidación mientras que los ácidos grasos de cadena larga y monoglicéridos (más hidrofóbicos) se convierten nuevamente a triglicéridos en los enterocitos (células intestinales). El colesterol tambié se convierten en sus respectivos ésteres. Estos lípidos sintetizados *de novo* en los enterocitos se combinan con proteínas para formar quilomicrones, lipoproteínas que estabilizan los lípidos en estructuras hidrosolubles que permiten su transporte en el torrente sanguíneo. Finalmente, los quilomicrones son hidrolizados por lipasas, y parte de estos ácidos grasos y glicerol liberados son absorbidos en las células donde serán utilizados como reserva energética, incorporados en procesos metabólicos, desempeñarán una función estructural, etc (3).

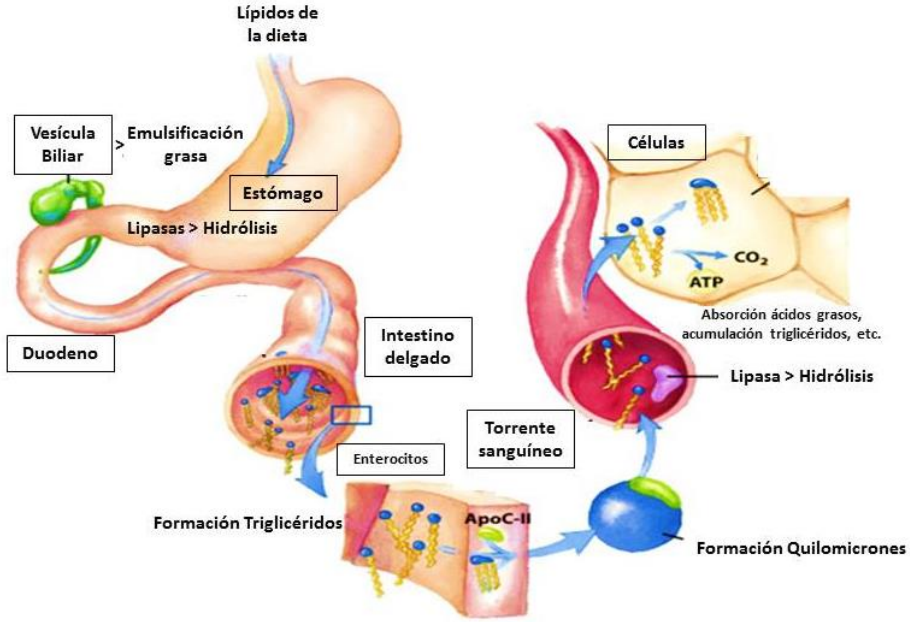


Fig. 2: Esquema de la digestión, absorción y transporte de lípidos. Adaptado de Lehninger, *Principios de Bioquímica* (4).

1.3. Funciones biológicas

Entre las principales funciones de los lípidos (4), indispensables para el desarrollo de muchos procesos biológicos, pueden destacarse:

- ✓ Almacenamiento energético, desempeñada principalmente por los triglicéridos acumulados en los adipocitos y hepatocitos.

- ✓ Función estructural y de transporte. Los lípidos conforman la mayor parte de las membranas celulares (**Fig. 3**) para aislarlas del exterior y permitir el paso selectivo de compuestos. También regulan el transporte de electrones en las mitocondrias.
- ✓ Impermeabilización de los distintos tejidos vegetales al aislarlos del agua por parte de las ceras.
- ✓ Actividad hormonal de los esteroides suprarrenales y hormonas sexuales.
- ✓ Mediación química en procesos inflamatorios, inmunológicos, de diferenciación celular y rutas metabólicas a través de los mediadores lipídicos derivados de la oxidación enzimática y no enzimática de los PUFAs ω-3 y ω-6. Los medidaores lipídicos que desempeñan esta función biológica son el objeto de estudio de esta tesis. En el apartado 3 de la introducción se desarrollan más en detalle las funciones específicas de cada una de las familias de mediadores lipídicos.

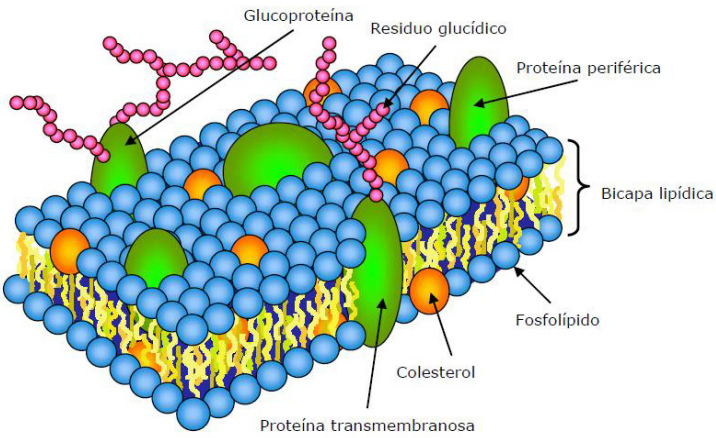


Fig. 3: Estructura de una membrana celular de origen animal

1.4. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son moléculas formadas por una larga cadena lineal hidrocarbonada con un grupo carboxílico en uno de los extremos. Pueden clasificarse en dos grandes bloques: saturados e insaturados. Los ácidos grasos saturados o SFA (*saturated fatty acids*) no poseen dobles enlaces en su cadena carbonada, tienden a formar estructuras extendidas y son sólidos a temperatura ambiente, excepto los de cadena muy corta que son volátiles. Los ácidos grasos insaturados se caracterizan por tener uno (MUFA, *monounsaturated fatty acids*) o más (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*) dobles enlaces en su cadena. Cuantas más insaturaciones, menor punto de fusión, por lo que, en general, son líquidos a temperatura ambiente.

1.4.1. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

1.4.1.1. Nomenclatura

El modo oficial de nombrar estos compuestos recomendado por la IUPAC atiende al número de átomos de carbono y el número y posición de dobles enlaces respecto al grupo carboxilo. También se identifica la configuración de los dobles enlaces, la posición de cadenas ramificadas y los heteroátomos como se muestra en los ejemplos de la **Tab. 1**. Pese a que la nomenclatura de la IUPAC es muy precisa y técnicamente clara, los nombres son demasiado largos por lo que se suele optar por los nombres comunes de los ácidos grasos o los sistemas ω o Δ de nomenclatura.

Nombre común	Nombre sistemático IUPAC	Abreviaturas ω y común
Ácido linoleico	ácido Z9,Z12-octadecadienoico	18:2 ω-6, LA
Ácido γ-linolénico	ácido Z6,Z9,Z12-octadecatrienoico	18:3 ω-6, GLA
Ácido dihomo-γ-linolénico	ácido Z8,Z11,Z14-eicosatrienoico	20:3 ω-6, DGLA
Ácido araquidónico	ácido Z5,Z8,Z11,Z14-eicosatetraenoico	20:4 ω-6, ARA
Ácido docosatetraenoico	ácido Z7,Z10,Z13,Z16-docosatetraenoico	22:4 ω-6
Ácido α-linolénico	ácido Z9,Z12,Z15-octadecatrienoico	18:3 ω-3, ALA
Ácido estearidónico	ácido Z6,Z9,Z12,Z15-octadecatetraenoico	18:4 ω-3, SDA
Ácido eicosapentaenoico	ácido Z5,Z8,Z11,Z14,Z17-eicosapentaenoico	20:5 ω-3, EPA
Ácido docosapentaenoico	ácido Z7,Z10,Z13,Z16,Z19-docosapentaenoico	22:5 ω-3, DPA
Ácido docosahexaenoico	ácido Z4,Z7,Z10,Z13,Z16,Z19-docosahexaenoico	22:6 ω-3, DHA

Tab. 1: Diferentes nomenclaturas de los principales PUFAs ω-3 y ω-6: nomenclatura común, IUPAC, sistema ω, abreviatura común.

El sistema ω indica la posición que ocupa el último doble enlace respecto al extremo -CH_3. Este carbono se llama carbono ω (5). Por ejemplo, el DHA (**Fig. 4**) pertenece a la serie ω-3. El sistema Δ se basa en el número de átomos de C interpuestos entre el grupo carboxilo y el primer doble enlace. En el ejemplo de la **Fig. 4,** el DHA es un Δ-4. Además, estas nomenclaturas abreviadas indican el número de átomos de carbono y de dobles enlaces totales. Así, el ácido 22:6 quiere decir que tiene 22 carbonos y 6 dobles enlaces. En la **Tab. 1** aparecen enumerados los PUFAs más importantes de las series ω-3 y ω-6 y las diferentes nomenclaturas que reciben.

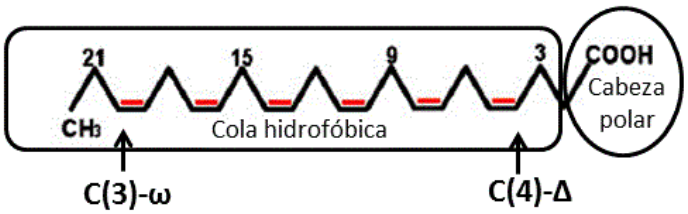


Fig. 4: Estructura química y sistemas de nomenclatura ω y Δ del ácido graso DHA.

1.4.1.2. Estructura y propiedades físico-químicas

Los PUFAs, al igual que los MUFAs y SFAs son moléculas anfipáticas, es decir, tienen una región apolar hidrófoba (cadena hidrocarbonada) que repele el agua y una región polar hidrófila (extremo carboxílico) que interactúa con el agua (**Fig. 4**). Cuanto más larga es la cadena, menor es su solubilidad en agua ya que aumenta la región hidrófoba de la molécula. En un disolvente polar se agrupan formando micelas: estructuras de microgotas en las que las colas apolares se orientan hacia el interior de la gota aislándose del disolvente, y las cabezas polares están en contacto con el disolvente y se solvatan.

Son compuestos poco volátiles, líquidos a temperatura ambiente y con pKa alrededor de 4,5 - 4,7 unidades, por lo que son moderadamente ácidos debido al grupo carboxilo. Los metabolitos derivados de su oxidación presentan modificaciones en la cadena carbonada como grupos hidróxido, hidroperóxido, epóxido, etc que les confieren un carácter más polar que el ácido graso del que provienen. El coeficiente de partición en octanol-auga (Kow) indica su carácter lipofílico, cuanto más elevado sea más apolares son los compuestos y menos solubles en agua. En general, los PUFAs presentan valores de Kow comprendidos entre 6,5 y 7.

1.4.1.3. Biosíntesis

En la biosíntesis de los PUFAs se diferencian dos acontecimientos: la síntesis *de novo* y a continuación, diversas modificaciones de estos productos sintetizados (6). La síntesis *de novo* de ácidos grasos ocurre en plantas y animales a partir del acetil-CoA que, a través de diversas reacciones enzimáticas da lugar a ácidos grasos de cadena corta con número par de átomos de carbono. El ácido palmítico (16:0), con 16 carbonos es el ácido graso más largo que se forma por síntesis *de novo* en la mayoría de organismos vertebrados. Ciertos organismos son capaces de sintetizar ácidos grasos de cadena impar partiendo de propionil-CoA.

Una vez formado el ácido palmítico, a través de procesos de elongación y desaturación se forman una gran variedad de ácidos grasos de cadenas más largas e insaturadas indispensables para numerosas funciones vitales. En la **Fig. 5** se esquematiza la ruta biosintética de los principales ácidos grasos de cadena larga a partir de la formación de ácido palmítico. El proceso de elongación ocurre en el retículo endoplasmático o en las mitocondrias, a través de un proceso inverso a la β-oxidación por el cual las enzimas elongasas añaden unidades de 2 átomos de carbono al ácido palmítico u otros ácidos grasos incorporados en la dieta. La desaturación ocurre en el retículo endoplasmático y permite introducir dobles enlaces mediante la acción de las desaturasas. En cuanto a la longitud de la cadena, el caso más extremo quizás sea el de las ceras vegetales, cuyos ácidos grasos alcanzan entre 24 y 28 átomos de C (7).

En casi todos los vertebrados, los procesos de elongación y desaturación son limitados, pues no existen tantos tipos de enzimas desaturasas. Por lo tanto, algunos ácidos grasos son denominados esenciales ya que no se pueden sintetizar y es necesaria su ingesta por la dieta. En la Fig. 5 se esquematiza la ruta biosintética que siguen los ácidos grasos esenciales. Un ejemplo son los ácidos LA y ALA que resultan ser esenciales por sí mismos y además sirven como sustrato para sintetizar los restantes PUFAs de las series ω-6 y ω-3 respectivamente (8).

No obstante, algunos de estos PUFAs ω-6 y ω-3 formados a partir del LA o ALA, se consideran también esenciales ya que la eficacia de su biosíntesis es muy limitada y necesitan ser ingeridos. Por ejemplo, el ALA sigue preferentemente la ruta de la β-oxidación o excreción en vez de elongarse a EPA y DHA (9,10). La principal fuente de EPA y DHA, es por lo tanto una dieta rica en organismos marinos o productos derivados. El productor primario de EPA y DHA son las algas. Los peces y demás organismos marinos los incorporan posteriormente en el resto de la cadena trófica.

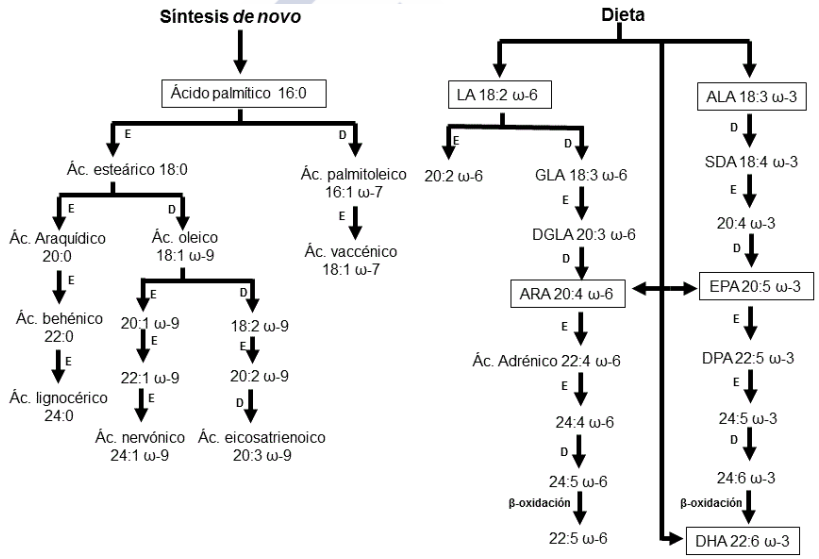


Fig. 5: Ruta biosintética de los ácidos grasos en vertebrados mediante procesos enzimáticos de elongación (E) y desaturación (D) a partir de la síntesis *de novo* del ácido palmítico y la ingesta de los ácidos esenciales LA, ALA, ARA, EPA, y DHA (11).

1.4.1.4. Oxidación

La oxidación de los PUFAs es un proceso complejo en el cual se produce la reacción entre las grasas insaturadas con el oxígeno molecular y por el cual se forman peróxidos y otros derivados. Ocurre mediante un mecanismo de tipo radicalario que consta de tres etapas bien diferenciadas: iniciación, propagación y terminación (12,13):

- En la etapa de **iniciación** se forman radicales libres ($R^{\cdot}$) por la rotura homolítica del enlace C-H o bien por la abstracción de un átomo de hidrógeno (14). El alto

grado de insaturación de los PUFAs los hace especialmente susceptibles de sufrir este tipo de oxidación debido a la menor energía de enlace de los hidrógenos alílicos y bis-alílicos junto con la estabilización por resonancia del radical formando dienos conjugados (15).

- **Propagación**. Los radicales formados reaccionan con el oxígeno dando lugar a radicales peróxido ($ROO^{\cdot}$) que se transforman inmediatamente en hidroperóxidos (ROOH) por la abstracción de un hidrógeno de otro ácido graso, provocando la aparición de un nuevo radical y propagando así la reacción en cadena.
- **Terminación**. Los radicales se combinan entre sí para dar productos no radicalarios que no pueden formar parte de las reacciones de propagación y se produce la finalización de la reacción en cadena.

La oxidación directa de los PUFAs por el oxígeno molecular en estado triplete ($^3O_2$) sin haber formado primero un radical ($R^{\cdot}$) no es favorable cinéticamente, está prohibida por el principio de conservación de *spin*. La multiplicidad de los ácidos grasos en su estado de menor de energía es singlete, por lo que no puede reaccionar con el $^3O_2$, sinó que necesita que el oxígeno esté en su estado singlete ($^1O_2$) (16). Por lo tanto, para que este proceso de oxidación tenga lugar es necesario que aparezcan los primeros radicales libres que catalizan la reacción. Según el modo de iniciarse la reacción se pueden distinguir dos tipos de procesos: de autooxidación y enzimáticos:

- Los iniciadores de los procesos de **autooxidación** pueden ser especies reactivas de oxígeno, iones metálicos, sustancias fotosensibles, la temperatura, microorganismos, etc (17).
- La **oxidación enzimática** se inicia por medio de enzimas. Se trata de un proceso de especial interés ya que da lugar a una compleja red de compuestos bioactivos implicados en múltiples rutas metabólicas *in vivo* y mediadores de la respuesta inmune e inflamatoria.

Entre los compuestos de oxidación producidos por vía enzimática se encuentran los eicosanoides y docosanoides. Estos mediadores lipídicos son derivados de los PUFAs ω-3 y ω-6. Los principales grupos de enzimas implicados en este proceso son las lipooxigenasas (LOX), las ciclooxigenasas (COX), la citocromo P450 monooxigenasa (CyP450), las enzimas microsomiales, las peroxidasas y las dioxigenasas. Las LOX y COX son un tipo de dioxigenasas que introducen de forma estereoselectiva una molécula de oxígeno en una posición bisalílica del PUFA, formando así hidroperóxidos específicos (17) que derivan en hidróxidos, epóxidos, isoprostanos, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, etc (18,19). Estas enzimas superan la barrera cinética de la reacción con el oxígeno molecular convirtiendo el $^3O_2$ en $^1O_2$.

2. CONSUMO DE PUFAs ω-3 Y SALUD

2.1. La dieta humana y las alteraciones metabólicas

Es importante observar la evolución de la dieta humana, especialmente desde la Revolución Industrial, para entender la aparición de nuevas enfermedades en las sociedades occidentalizadas (20). El avance de la tecnología ha permitido la introducción de alimentos procesados en la dieta y ha afectado al tipo y cantidad de grasa en la dieta, así como a la ingesta de vitaminas C y E (21). En los últimos 100 años, se ha producido un incremento del consumo de las grasas saturadas, PUFAs ω-6, grasas *trans* debido a la introducción del proceso de hidrogenación para solidificar aceites, y un aumento del consumo de la cantidad de azúcares procesados. Paralelamente, se ha producido una disminución en el consumo de la cantidad de PUFAs ω-3, vitaminas y otros compuestos bioactivos (22).

Estos cambios drásticos en la dieta, junto con el estilo de vida sedentario de los países occidentalizados son la principal causa de diferentes patologías y desórdenes metabólicos que provocan enfermedades crónicas como: enfermedades cardiovasculares (CVD), obesidad, sobrepeso, hipertensión, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, osteoporosis, osteopenia, o cáncer (20). Se estima que el 20-30 % de la población adulta en estos países sufre Síndrome Metabólico (MetS) (23). El MetS se define como un conjunto de factores de riesgo para padecer CVD y diabetes (24). Entre estos factores se encuentran la dislipidemia (descenso de los niveles de HDL y aumento de LDL y triglicéridos), hiperglicemia, hipertensión, resistencia a la insulina y obesidad (25). Las alteraciones que definen el MetS y las enfermedades derivadas están muy relacionadas con los procesos inflamatorios y el aumento del estrés oxidativo (26,27).

Según el informe de *Eurostat* de mayo de 2016, las dos primeras causas de muerte en Europa son las CVD y el cáncer, muy por encima de la tercera causa de muerte que son las enfermedades respiratorias. Las principales afecciones cardiovasculares son la cardiopatía isquémica, hipertensión, colesterol, diabetes y enfermedades cerebrovasculares. La media en Europa fue de 132 muertes/100000 habitantes debidas a CVD en el año 2013, siendo de 350/100000 en países como Hungría o Eslovaquia, y menor de 100/100000 en España, Portugal o Grecia. Los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2012 coinciden en que las principales causas de muerte en el mundo para los países ricos son las CVD y el cáncer, mientras que en los países empobrecidos la principal causa de muerte son las enfermedades infecciosas.

Por lo tanto, el estudio de los componentes de la dieta y su relación con el avance de las enfermedades crónicas y desórdenes metabólicos constituyen un campo de gran interés para la comunidad científica. Prueba de ello es el número de publicaciones encontradas en esta área, usando como referencia la base de datos de *Scopus* (www.scopus.com), que han experimentado un aumento exponencial desde el año 1990 (**Fig. 6**). Del número total de publicaciones, alrededor de 226000 en base a los criterios de búsqueda (**Fig. 6**),

el 74%, son artículos de investigación y el 14% son revisiones, el restante de trabajos son capítulos de libro, notas, conferencias, etc. En relación a los campos de estudio, el 80% de las publicaciones pertenecen al ámbito de la medicina, el 26% a la bioquímica, y el resto se enmarcan en los campos de la química, inmunología, ingeniería, etc.

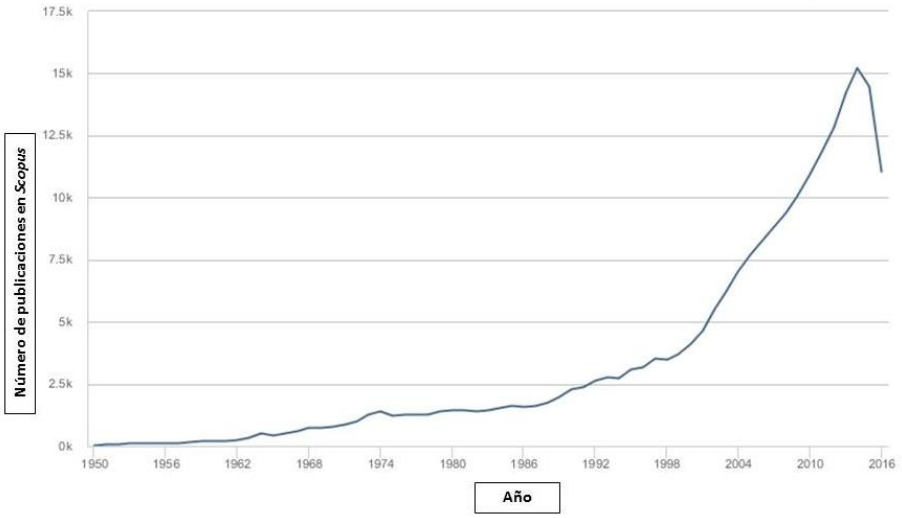


Fig. 6: Evolución del número total de publicaciones en nutrición y desórdenes metabólicos desde el año 1950. Los datos se obtuvieron de la base de datos de Scopus mediante el criterio de búsqueda "TITLE-ABS-KEY (*nutrition OR diet*) AND TITLE-ABS-KEY (*"metabolic disorder" OR obesity OR "metabolic syndrome" OR diabetes OR "cardiovascular disease" OR cholesterol OR atherosclerosis*)" y refinando la búsqueda para las publicaciones donde los parámetros aparecen al menos en el título, resumen, o palabras clave.

Dos de los mecanismos más estudiados por su implicación en la aparición y desarrollo de estas patologías son el estrés oxidativo (28) y los procesos inflamatorios (26) asociados al consumo de dietas altas en grasas saturadas, con desbalance en la proporción de PUFAs ω-6/ω-3, etc. Los datos obtenidos a través de *Scopus* acerca del número total de publicaciones relacionadas con la nutrición y el estrés oxidativo o la inflamación, demuestran que el número de trabajos ha crecido exponencialmente desde los años 1999-2000, con un total de 28000 en inflamación y 22000 en estrés oxidativo, en su mayoría en el campo de la medicina (80%) y bioquímica (30-40%). Alrededor del 70% son artículos de investigación y el 20% son revisiones. Los criterios de búsqueda han sido "TITLE-ABS-KEY (*nutrition OR diet AND "oxidative stress"*)" y "TITLE-ABS-KEY (*nutrition OR diet AND inflammation*)".

En general, se puede afirmar que las alteraciones metabólicas se caracterizan por un nivel de inflamación crónica por debajo del umbral de dolor, y por un aumento en la concentración de biomarcadores de inflamación (29). Asímismo, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) asociadas al estrés oxidativo, desencadenan procesos inflamatorios y desórdenes metabólicos (26,27).

Numerosos estudios relacionan las dietas ricas en grasa con el desarrollo de obesidad, CVD, diabetes y otras alteraciones metabólicas en humanos (30–33) y también en modelos animales (34–36). Por lo tanto, estas dietas con altos contenidos de grasa y azúcar se han establecido como modelos dietarios para promover y estudiar procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, y en consecuencia provocar alteraciones metabólicas (37,38). Zhang et al. (39) observaron cómo el consumo de altas cantidades de grasa genera la sobreproducción de ROS y mediadores lipídicos pro-inflamatorios como la PGE_2 en la corteza cerebral. Matsuzawa et al. (40) y Kalra et al. (41) relacionaron una alimentación alta en grasa con la sobreproducción de ROS en el tejido adiposo y en el hígado, lo que desencadena obesidad y resistencia a la insulina.

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la ingesta de grasa debe tener en cuenta no sólo la cantidad sinó también el tipo de grasa. Los diferentes tipos de ácidos grasos están implicados en multitud de procesos vitales; son componentes estructurales de las membranas, precursores de moléculas bioactivas como los eicosanoides y docosanoides, reguladores de actividades enzimáticas, expresión génica, etc.

El balance entre PUFAs ω-6 y ω-3 se ha desviado drásticamente en los últimos años hacia un aumento de los derivados ω-6 (22). Este cambio en la composición de ácidos grasos ha ido en paralelo con un incremento significativo de las enfermedades metabólicas (42). En este contexto, las dietas ricas en productos pesqueros se han asociado a una disminución del riesgo cardiovascular relacionado con la presencia de PUFAs ω-3. En los epígrafes siguientes se aborda con mayor profundidad la importancia del ratio ω-6/ω-3 en la dieta y el consumo de PUFAs ω-3 de origen marino, en relación con los procesos inflamatorios en los desórdenes metabólicos.

Finalmente, el consumo de ácidos grasos *trans* en sí mismos conlleva efectos perjudiciales sobre la salud (43), además de interferir en los procesos de desaturación y elongación contribuyendo al desbalance de PUFAs ω-6/ω-3 (44). Renata et al. (45) publicaron una revisión de trabajos en los que se evalúan los efectos adversos del consumo de ácidos grasos *trans* en relación al MetS, enfermedades coronarias y diabetes. Entre los mecanismos de acción, numerosos autores señalan que su ingesta desencadena procesos inflamatorios, disfunción endotelial, aumenta el índice de adiposidad y la resistencia a la insulina (45).

2.2. Desbalance de los PUFAs ω-6/ω-3 en la dieta

Debido en parte a las nuevas tecnologías alimentarias, la comida rápida y los sistemas de producción animal intensivos, en los últimos años los niveles de PUFAs ω-6 en la dieta han aumentado mientras que los PUFAs ω-3 han disminuido dando lugar a un aumento del ratio ω-6/ω-3 desde el 1:1 de nuestros ancestros paleolíticos hasta un 20:1 en las sociedades más occidentalizadas (22). El cambio en la alimentación de los animales productores de carne, lácteos y huevos es una de las causas. Se han sustituido los forrajes salvages por plantas de cultivo y piensos en los que la concentración de

ácidos grasos ω-3 como el ALA es hasta 8 veces menor (46). También el pescado criado en acuicultura puede contener menos proporción de ω-3 en sus lípidos que el pescado salvaje debido a la inclusión los piensos de origen vegetal que se usan en su alimentación (47,48).

El desbalance en la dieta hacia una mayor proporción de PUFAs ω-6 ha sido relacionado con el desarrollo de obesidad (49–51), enfermedades cardiovasculares (52), síndrome metabólico (53), resistencia a la insulina (54,55), y la prevalencia de procesos inflamatorios relacionados con arterosclerosis (56), artritis reumatoide y asma (22) en estudios en humanos y animales. Por otra parte, el aumento de los niveles de PUFAs ω-3 en la dieta con el consiguiente descenso del ratio ω-6/ω-3, ha sido asociado con una disminución de los procesos inflamatorios y de estrés oxidativo asociados a estas enfermedades y desórdenes metabólicos (57–60). Cabe destacar el importante papel que parecen desempeñar los ácidos grasos ω-3, EPA y DHA, en la prevención y tratamiento de la inflamación, CVD, obesidad, diabetes tipo-2, etc (26,61,62).

Sin embargo, algunos estudios contradictorios muestran que no existe una relación directa entre valores elevados de la relación ω-6/ω-3 y las enfermedades metabólicas. Por ejemplo, Mozaffarian et al. (63) realizaron un estudio epidemiológico con datos de pacientes por más de 12 años y observaron un efecto beneficioso del consumo de PUFAs ω-3 sobre las enfermedades coronarias, pero no encontraron ningún tipo de correlación entre estos desórdenes y el consumo de PUFAs ω-6. Otro estudio epidemiológico realizado por Laaksonen et al. (64) indicaba que no existía un incremento de la muerte por infarto al ingerir cantidades elevadas de ácido linoleico (ω-6).

Por lo tanto, es necesario seguir profundizando en los mecanismos implicados en el desarrollo de estas enfermedades y la dieta, tanto su composición lipídica como los posibles efectos sinérgicos de la combinación con otros nutrientes. Entre los posibles mecanismos, numerosos estudios sugieren funciones divergentes entre los PUFAs ω-6 y ω-3 respecto a la adipogénesis (65), homeostasis lipídica (66,67), o el desarrollo de procesos inflamatorios (68). A continuación se detallan las principales funciones biológicas de los PUFAs ω-6 y ω-3 en relación a los desórdenes metabólicos.

2.2.1. Función biológica de los PUFAs ω-6 y ω-3 en relación a los desórdenes metabólicos

La modulación del ratio ω-6/ω-3 en la dieta influye en el perfil lipídico circulante y por lo tanto, en el perfil de ácidos grasos incorporados en las membranas celulares y tejidos. Estos PUFAs esenciales ω-3 y ω-6, al igual que los demás lípidos, son responsables de la función estructural, de almacenamiento energético, etc (descrito en el apartado 1.3). Pero además, realizan importantes funciones biológicas relacionadas con la regulación de procesos inflamatorios, la expresión génica, el sistema inmune, el metabolismo

lipídico, etc. Muchas de estas funciones están directa o indirectamente relacionadas con el desarrollo y evolución de diferentes desórdenes metabólicos.

Uno de los principales mecanismos implicados en su bioactividad es la síntesis de mediadores lipídicos. Debido al alto grado de insaturación, los PUFAs ω-3 y ω-6 son susceptibles de sufrir procesos de oxidación enzimática y no enzimática dando lugar a una red de metabolitos que participan en procesos de señalización celular, metabolismo, regulan procesos inflamatorios, etc (69). El estudio de los mediadores lipídicos y los mecanismos en los que participan resulta de gran interés en multitud de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios. En el epígrafe 3 de la introducción se abordan en detalle las diferentes familias de mediadores lipídicos y su bioactividad.

A continuación se describen algunas de las funciones de los PUFAs ω-3 y ω-6 y los mecanismos descritos que regulan dichas bioactividades. Muchas de ellas están interrelacionadas o son etapas diferentes de un mismo mecanismo de acción:

- Modificación de la composición y propiedades de las membranas

Los ácidos grasos de cadena larga forman parte de los fosfolípidos de membrana. El tipo y cantidad de PUFAs de la dieta altera el contenido de los mismos en las membranas (70). El enriquecimiento en PUFAs ω-3 de origen marino como el EPA y DHA incrementa significativamente su fluidez y flexibilidad ya que contienen más dobles enlaces que los PUFAs ω-6 como el LA o el ARA. El aumento en el número de insaturaciones hace a las moléculas más flexibles por la mayor capacidad de cambio de conformación (71). La modificación de las propiedades físicas de las membranas afecta a la actividad de las proteínas de membrana tales como receptores específicos o canales de transporte. Por lo tanto, afecta a los mecanismos de transducción de señales intracelulares y la expresión génica, modifica la respuesta inmune e inflamatoria, etc (71,72).

Además, el incremento de PUFAs ω-3 y ω-6 en las membranas influye en el patrón de mediadores lipídicos producidos. Por la acción de la fosfolipasa A2 (PLA_2), los fosfolípidos de membrana liberan los ácidos grasos de sus cadenas (73). Estos PUFAs son posteriormente metabolizados por las enzimas LOX, COX, y CyP450 en el citosol de las células para producir diferentes familias de mediadores lipídicos (74).

Los PUFAs también modifican la composición de los microdominios de membrana. Estos microdominios son estructuras rígidas y empaquetadas formadas por moléculas de colesterol y esfingolípidos, y en algunos casos contienen también proteínas (75). Regulan el transporte de colesterol, las señales de transducción y la endocitosis formando vesículas (76). Algunos autores han descrito que al incorporarse los PUFAs ω-3 a estos microdominios, se reduce el contenido en colesterol, esfingomielina y proteínas produciéndose una modulación de las rutas de señalización celular (77).

El DHA es uno de los componentes fundamentales del tejido adiposo cerebral representando un 25% de su composición. Posee importantes funciones relacionadas con el desarrollo neuronal y la construcción de las membranas de las neuronas, del tejido nervioso y del músculo activo contribuyendo a su protección y posible retardo de enfermedades degenerativas como el Alzhéimer (78,79).

- Regulación de procesos inflamatorios

Una de las principales funciones de los PUFAs ω-3 y ω-6 está relacionada con la regulación de los procesos inflamatorios y en consecuencia, con el desarrollo de múltiples desórdenes metabólicos (74). El análisis del ratio ω-6/ω-3 en plasma y tejidos está considerado como uno de los marcadores de inflamación más selectivos. Su aumento se relaciona con una mayor inflamación sistémica (29).

Uno de los mecanismos por el que los PUFAs regulan la inflamación es a través de la producción de mediadores lipídicos, responsables, por ejemplo, de la síntesis de citoquiinas. Las citoquiinas son una familia de glucoproteínas implicadas en el proceso inflamatorio y en la regulación del sistema inmunitario: responsables de la comunicación intercelular, la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento celular, secreción de inmunoglobulinas, etc. La respuesta inflamatoria es beneficiosa cuando las citoquiinas se producen en cantidad adecuada pero fatal si se producen en exceso (80,81).

Muchos de los derivados del metabolismo de los PUFAs ω-6, en especial del ARA, están considerados compuestos pro-inflamatorios asociados al progreso de desórdenes como la hipercolesterolemia, diabetes, o la obesidad (26,61,82). Derivados del ARA como las prostaglandinas y tromboxanos serie 2, y leucotrienos serie 4 están asociados a la sobreproducción de citoquiinas y por lo tanto a la inducción de la inflamación (83).

Por otra parte, los derivados de los PUFAs ω-3 tienen propiedades anti-inflamatorias o ejercen un papel inflamatorio menor que los correspondientes ω-6 (79,84). Debido a la competencia ejercida por las mismas enzimas en las rutas de síntesis, un aumento de los PUFAs ω-3 produce un descenso de la inflamación por la inhibición de la síntesis de los correspondientes derivados pro-inflamatorios ω-6. Lazic et al. (85) estudiaron el efecto sobre los metabolitos de la 12/15LOX relacionados con la inflamación, resistencia a la insulina y esteatosis en dos dietas altas en grasa y diferentes proporciones de PUFAs ω-6 y ω-3. Observaron que una dieta 11:1 ω-6/ω-3 producía mayores niveles de inflamación y esteatosis que una 3:1 ω-6/ω-3, y lo correlacionaron con un descenso de los metabolitos ω-6 de la 12/15LOX debido a la competencia ejercida entre sustratos.

Derivados del EPA y DHA como las resolvinas y protectinas están asociados a la resolución directa de la inflamación (78,86–88). Por lo tanto, se ha propuesto a los

mediadores lipídicos de los PUFAs ω-3 como uno de los mecanismos más eficientes para detener la inflamación (89).

Finalmente, los PUFAs ω-3 y ω-6 también modulan la inflamación a través de la regulación de factores de transcripción celular. Los PUFAs ω-3 inhiben el factor nuclear Kappa B (NFkB) (83). Este factor es responsable de la producción de citoquinas inflamatorias como la TNFα, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 y una variedad de compuestos implicados en los procesos inflamatorios como quimoquinas (IL-8, MIP-1α), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM), o enzimas responsables de la síntesis de eicosanoides proinflamatorios como la COX (90).

- Regulación del metabolismo lipídico

Otra función biológica importante de los PUFAs ω-3 y ω-6 es la incidencia sobre la adipogénesis, los niveles de triglicéridos y de colesterol, y por lo tanto, sobre la salud cardiovascular. Hennig et al. (91) relacionaron un aumento de los PUFAs ω-6 con el acúmulo de triglicéridos. Birch et al. (92) y Massiera et al. (93) observaron que un aumento de la dosis de PUFAs ω-6 en el período prenatal, puede estar relacionado con el aumento de la obesidad temprana debido a un aumento del tejido adiposo blanco y acúmulo de triglicéridos. Asimismo, numerosos trabajos observaron una disminución de los niveles de triglicéridos debida a los PUFAs ω-3 (62,94–99).

Mediadores lipídicos como las prostaglandinas y leucotrienos del ARA participan de una manera importante en el proceso de diferenciación de los adipocitos (100). Pisani et al. (101) investigaron el papel de la PGE_2 y PGF_2 derivadas del ARA en la inhibición de la formación del tejido adiposo pardo, en favor de la formación del tejido adiposo blanco que acumula más triglicéridos. Estas prostaglandinas activan la señalización celular del PI2 (prostaciclin I2), un receptor asociado a la proteína G de membrana, el cual cambia su conformación y desencadena la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). Al aumentar la concentración de esta molécula se incrementa la actividad de la enzima quinasa A (PKA) que, entre otras funciones, regula el metabolismo de los lípidos (102).

Este efecto sobre la adipogénesis puede ser inhibido al aumentar la dosis de PUFAs ω-3 en la dieta que bloquean parcialmente las rutas de formación de PGE_2 y PGF_2 al competir por la COX-2, y por tanto, inhiben la actividad de la PKA (103). Además, los PUFAs ω-3 son ligandos naturales del factor de transcripción celular PPARγ, presente fundamentalmente en el tejido adiposo y macrófagos. Su activación resulta en la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y catabolismo de triglicéridos (104) con lo que disminuye el acúmulo de grasa (105). El descenso en el acúmulo de grasa al incorporar PUFAs ω-3 en la dieta (106–108) ha sido asociado también a un descenso en el tamaño (109) y número (108) de los adipocitos, así como a la disminución de la concentración de la proteína SREBP-1c, responsable de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (110). Por lo tanto, los PUFAs ω-3 promueven un

cambio en el metabolismo hacia la oxidación de los ácidos grasos y no hacia la síntesis y almacenamiento. De ahí que los PUFAs ω-3 sean buenos candidatos para el tratamiento dietético de la hiperlipidemia y otros trastornos metabólicos (111).

El efecto de la ingesta de PUFAs ω-3 de origen marino sobre los niveles de lipoproteínas y colesterol resultan controvertidos. Numerosos autores han observado una disminución clara del LDL (112–116), HDL (112–114), y colesterol total (117) debida a los PUFAs ω-3, sin embargo otras investigaciones han constatado un aumento de LDL (94,118), HDL (94,97,98,118), y colesterol total (118,119), o un efecto neutro sobre ambas lipoproteínas y colesterol total (95,120). Factores de riesgo para las CVD como el incremento de colesterol surgen como resultado de una predisposición genética y de un contexto medioambiental promotor de los mismos. Por lo tanto, determinadas condiciones individuales conllevan a que los efectos de los PUFAs procedentes de la dieta no sean iguales en todos los sujetos (121).

Entre los mecanismos implicados en la regulación de los niveles de colesterol, López-Huertas et al. (115) sugieren que la sustitución de los SFAs por PUFAs en la dieta disminuye los niveles de colesterol, y apuntan a la combinación de nutrientes y la dosis de PUFAs para explicar las diferencias observadas en los ensayos publicados. La unión de los PUFAs como ligandos del receptor nuclear HNF-4α inhibe su actividad, por el contrario los SFAs la estimulan (122). Este factor de transcripción controla la expresión de genes relacionados con el metabolismo de las lipoproteínas (123).

Sampath et al. (110) sugieren que la ingesta de PUFAs ω-3 activa factores como el PPARα, ya comentado anteriormente, el cual entre otras funciones, podría incrementar los niveles de HDL. Otros autores han señalado un descenso del contenido de colesterol en las membranas al incorporarse los PUFAs ω-3 a los microdominios de las mismas (77).

- Influencia sobre parámetros cardiovasculares

La influencia de los PUFAs ω-3 en la salud cardiovascular no se restringe sólo a los niveles de colesterol y triglicéridos. Otros parámetros de riesgo cardiovascular son los procesos inflamatorios de ateroesclerosis, diabetes, alteraciones inmunológicas debidas a infecciones o a procesos autoinmunes, hipertensión, elevados niveles de lípidos circulantes, etc (45,121). A este respecto, Barre et al. (124) realizaron una revisión de trabajos en los que se relaciona la ingesta de PUFAs ω-3 con la disminución del MetS y las enfermedades derivadas como la diabetes o el infarto de miocardio. Existen evidencias de este efecto saludable asociado a los ácidos grasos EPA y DHA, aunque no del mismo modo para el ALA. Entre los mecanismos propuestos, la ingesta de EPA y DHA reduce la agregación plaquetaria y, en consecuencia, la presión arterial. También influye en el control de la glucosa y los procesos inflamatorios como ya se ha explicado anteriormente. Numerosas prostaglandinas y tromboxanos derivados del ARA, como el TXA_2, son potentes agregantes plaquetarios y vasoconstrictores, mientras que el TXA_3

derivado del EPA es muy poco agregante o la PGI_3 derivada del EPA es antiagregante (125). Otros autores también han encontrado efectos destacables en la reducción de la presión sanguínea y la agregación debida a los PUFAs ω-3 (126). En el apartado 3 de la Introducción se explican con más detalle los mecanismos de regulación del tono vascular mediados por estos metabolitos.

De Luis et al. (97) describieron un efecto beneficioso de los PUFAs ω-3 en pacientes diabéticos e hipertrigliceridémicos, observado en una disminución del nivel de triglicéridos y marcadores de inflamación como la proteína C reactiva o las citoquinas inflamatorias TNFα y IL-6. Sin embargo, muchos autores coinciden en el desconocimiento de la mayor parte de los mecanismos implicados en los efectos sobre los parámetros cardiovasculares (99,127).

Finalmente, los PUFAs ω-6 como el ARA dificultan, en general, la señalización celular mediada por la enzima quinasa B (AKT) y el receptor PI3. Esta ruta estimula los receptores de insulina, una hormona secretada por el páncreas que regula la utilización de la glucosa (128). Por lo tanto, pueden promover la resistencia a la insulina y, en última consecuencia, la diabetes (54,129). Por el contrario, EPA y DHA activan la ruta PI3-AKT en parte mediada por la activación de PPARγ (130).

- Regulación de la expresión génica

Los factores de trascripción nucleares son una familia de receptores activados por ligandos que controlan la expresión de diversos genes implicados en procesos metabólicos y en la respuesta inflamatoria (131). Los PUFAs pueden actuar como ligandos directamente sobre estos factores o influír indirectamente a través de la activación/inhibición de otras rutas de señalización celular. El mecanismo por el que los PUFAs influyen sobre el metabolismo y la inflamación no está totalmente aclarado. En los apartados anteriores se han descrito algunos de los efectos de los PUFAs sobre los factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios y el metabolismo. Se retoman en este apartado de forma breve junto con otros factores modulados por los PUFAs.

El factor nuclear NFkB induce la producción de moléculas inflamatorias como las citoquinas, quimoquinas, moléculas de adhesión, y enzimas (90). Los PUFAs ω-3 actúan como ligandos inhibiendo la actividad de este factor (80,81,83). Hudert et al. (132) observaron una reducción significativa del factor NFkB, el factor de necrosis tumoral TFFα y la IL-1β en un modelo animal de colitis con una mutación que estimula la desaturación de los ácidos grasos para producir PUFAs ω-3 endógenos. Simultáneamente se producen compuestos anti-inflamatorios como las resolvinas. Gravaghi et al. (133) también correlacionaron un efecto anti-inflamatorio de los PUFAs ω-3 al reducir los niveles de TFFα, varias interleuquinas, y eicosanoides derivados de la actividad de la COX sobre el ARA como la PGE_2.

Los factores nucleares PPAR, como el PPARα y PPARγ, estimulan la expresión de los genes responsables del transporte y oxidación de los lípidos aumentando la oxidación microsomal, peroxisomal y mitocondrial de los ácidos grasos, el catabolismo de los triglicéridos, y podrían aumentar los niveles de HDL (110). Además, entre otras funciones, estos factores activan la ruta PI3-AKT involucrada en el metabolismo de la glucosa (130). Los PUFAs ω-3 son ligandos naturales de los factores PPAR resultando en una activación del mismo. González et al. (134) analizaron el efecto de la ingesta de PUFAs ω-3 en un modelo animal de obesidad y resistencia a la insulina. Observaron una estimulación del factor PPARγ y mayor expresión de los genes relacionados con el transporte de la glucosa y los receptores de insulina. Además, los niveles de mediadores lipídicos pro-inflamatorios disminuyeron y también la esteatosis hepática. Por otra parte, Wang et al. (128) relacionaron a los PUFAs ω-6 como el ARA con la inhibición de la ruta metabólica del PI3-AKT, activada por PPARγ, y relacionada con los receptores de insulina.

Las SREBPs y ChREBPs son proteínas que se unen al elemento regulador del esterol y al elemento de respuesta a carbohidratos, respectivamente (135). Estas proteínas funcionan como factores de transcripción y regulan la expresión de genes implicados en la síntesis de lípidos y el metabolismo de la glucosa (136). Los PUFAs ω-3 y ω-6 disminuyen la abundancia de SREBP-1c, responsable de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos; igualmente inhiben la actividad de la ChREBP que induce la transcripción de genes glicolíticos (110,137–139).

Otros factores regulados por los PUFAs ω-3 son el LXR, el HNF-4α y el FXR. El LXR es un activador de la proteína SREBP-1c, y los PUFAs ω-3 inhiben este factor con el consiguiente efecto sobre el metabolismo lipídico (140). Tambien actúan como ligandos específicos e inhiben la actividad del factor HNF-4α (122), que controla parte del metabolismo de las lipoproteínas, la síntesis de ácidos biliares y el metabolismo del hierro (123). Por el contrario, los PUFAs ω-3 estimulan el factor FXR, el cual inhibe la SREBP-1c y la expresión de enzimas implicadas en el acúmulo de triglicéridos (141).

Los PUFAs también se han asociado a una represión de la transcripción del gen de la leptina. La leptina es una hormona producida principalmente en los adipocitos que se libera cuando la cantidad de grasa almacenada en ellos aumenta más allá del punto de equilibrio. Una vez liberada informa al hipotálamo para inhibir el apetito, aumenta el metabolismo basal, disminuye la lipogénesis y aumenta la lipolisis. La sustitución de los SFA por los PUFA en la dieta provoca una disminución en los niveles plasmáticos de leptina que se ha correlacionado con una menor adiposidad (142). Un trabajo llevado a cabo en 186 hombres enfermos de MetS confirmó que los niveles de leptina en sangre disminuían después de una intervención dietaria con una reducción significativa en la ingesta de grasa (143).

2.3. Importancia del consumo de PUFAs ω-3 de origen marino

Como se ha señalado, los cambios en la dieta hacia un incremento de las grasas saturadas y *trans*, y un mayor ratio de PUFAs ω-6/ω-3 están correlacionados con el aumento de las enfermedades metabólicas y procesos inflamatorios en los países occidentalizados. La "nutrición antiinflamatoria" busca por lo tanto reducir en la dieta aquellos componentes que desencadenan respuestas inflamatorias como los PUFAs ω-6, grasas saturadas o los carbohidratos refinados, y aumentar la cantidad de PUFAs ω-3 y antioxidantes que activan mecanismos endógenos para resolver la inflamación y sus consecuencias (26). Aunque los mecanismos de acción todavía no se conocen completamente, como se ha señalado anteriormente, existen evidencias de que la ingesta de PUFAs ω-3 de origen marino, fundamentalmente EPA y DHA, resulta beneficiosa para prevenir/paliar los procesos inflamatorios y las enfermedades metabólicas (89).

Es preciso ingerir los ácidos grasos de cadena larga ω-3, EPA y DHA, y también el ω-6 ARA, ya que se consideran ácidos grasos esenciales. Aunque existen rutas biosintéticas en los humanos y en otros animales que los producen mediante elongaciones y desaturaciones del ALA (ω-3) y LA (ω-6), estas rutas son poco eficientes y no proporcionan los niveles requeridos para el organismo (9,10). Los productores naturales de los PUFAs ω-3, EPA y DHA, son las algas marinas, y también se encuentran en el pescado y otros derivados de productos marinos.

Además de ser la fuente primaria de los PUFAs ω-3, EPA y DHA, el pescado es generalmente bajo en grasas saturadas, carbohidratos y colesterol, con la excepción de pocas especies. Aporta no sólo proteínas de alto valor, sino también una amplia gama de micronutrientes esenciales como diversas vitaminas (D, A y B) y minerales (calcio, yodo, zinc, hierro y selenio).

Los PUFAs ω-3 pueden estar presentes en los alimentos funcionales y los productos nutracéuticos. Los alimentos funcionales son aquellos que forman parte de la dieta normal, bien sean naturales o modificados mediante la biotecnología, que contienen elementos bioactivos de los cuales se ha demostrado que afectan beneficiosamente a una o más funciones específicas del cuerpo más allá de sus efectos nutricionales (144,145). Algunos ejemplos de alimentos funcinales son el pescado, la soja, el té, o alimentos enriquecidos en ω-3 como la leche, yogures, etc. No son alimentos funcionales las píldoras, cápsulas, etc. Estos últimos se conocen como nutracéuticos, porque combinan el término nutrición y farmacéutico. Se trata de productos aislados de fuentes alimentarias y que se venden en una forma médica. Son productos nutracéuticos las píldoras de condroitín sulfato, cápsulas de aceite de pescado, extractos de hierbas, multivitaminas, etc (146).

El interés por la inclusión en la dieta de EPA y DHA surgió a raíz de una serie de estudios pioneros efectuados en la población esquimal *inuit* durante las décadas de los 60 y 70 que mostraron una menor incidencia de patologías cardiovasculares en este

pueblo debido a la alta ingesta de pescado en la dieta (147,148). Más adelante, se descubrieron relaciones similares en otras poblaciones de diversas regiones del mundo, particularmente en Islandia y los nativos americanos de Alaska (149–152).

Otros estudios han correlacionado la ingesta de PUFAs ω-3 de origen marino y pescado con efectos beneficiosos sobre las enfermedades coronarias (63). Buckley et al. (153) realizaron una revisión de trabajos en animales y humanos que muestran cómo el consumo de EPA y DHA puede ejercer un efecto protector contra la obesidad. Otros muchos autores han descrito los efectos beneficiosos de EPA y DHA en los procesos inflamatorios, de estrés oxidativo, desórdenes metabólicos, CVD, diabetes, cáncer, enfermedades del sistema inmune como el lupus y la enfermedad de Crohn, esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer, etc (26,57–62).

Debido a los beneficios de las dietas ricas en PUFAs de origen marino, diferentes organismos internacionales de la salud han hecho recomendaciones respecto al consumo de estos productos (115) (ver **Tab. 2**). Sin embargo, dada la escasez de datos respecto a la composición en EPA y DHA de las dietas, no existe todavía una recomendación respecto al ratio óptimo EPA/DHA. Los valores sugeridos por los diferentes organismos se corresponden al consumo conjunto de ambos ácidos grasos (154).

El informe de la AHA para adultos sanos establece el consumo en 2 porciones de pescado a la semana. Una porción de 125 g de pescado graso o azul (8-15% de grasa) como la caballa, sardina o atún y una porción de pescado magro (< 2% de grasa) como el bacalao, merluza o faneca aportan aproximadamente 3 g de EPA y DHA a la semana. Los informes más recientes de la EFSA y la FAO de 2010 coinciden en los valores recomendados. En ambos casos se recomienda un consumo mínimo de EPA y DHA de 0.25 g/día aunque reconocieron que no existían evidencias suficientes para establecer una ingesta mínima en adultos, excepto en el caso de las mujeres embarazadas y lactantes para las que se estableció un consumo mínimo de DHA de 0.2 g/día. El informe de la FAO establece un consumo máximo de 2 g/día de EPA y DHA en base a evidencias experimentales de un aumento de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo cuando se alcanzan dichos valores máximos. Sin embargo, también reconocen que niveles de hasta 3 g/día de EPA y DHA redujeron factores de riesgo cardiovascular sin provocar efectos adversos.

Año	Organismo	Población	Recomendación	Ref
2010	EFSA (*European Food Safety Authority*)	Adultos	PUFAs ω-6 (LA) 4% de E/día PUFAs ω-3 (ALA) 0,5% de E/día > 1,7 g/día PUFAs ω-3 (EPA+DHA) 0,25 g/día	(155)
2010	FAO (*Food and Agriculture Organization of UN*)	Adultos	PUFAs ω-6 2,5-9% de E/día PUFAs ω-3 (ALA) >0,5% de E/día PUFAs ω-3 (EPA+DHA) 0,25-2 g/día	(156)
2003	WHO (*World Health Organization*)	Adultos	PUFAs ω-6 5-8% de E/día PUFAs ω-3 1-2% de E/día	(157)
2002	AHA (*American Heart Association*)	Adultos[1] Adultos[2] Adultos[3]	Comer pescado 2 veces/semana EPA+DHA > 1 g/día EPA+DHA > 2-4 g/día	(158)
1999	BNF (*British Nutrition Foundation*)	Adultos	PUFAs ω-6 (LA) 1% de E/día > 2,8 g/día PUFAs ω-3 (EPA+DHA) 0,2% de E/día > 0,56 g/día	(159)

Tab. 2: Recomendaciones para el consumo de PUFAs realizadas por diferentes organismos internacionales. E/día (energía total diaria). [1]Adultos sin CVD, [2]con CVD, [3]con triglicéridos elevados.

2.4. Efectos sinérgicos de la combinación de PUFAs ω-3 en la dieta con polifenoles

Además de los beneficios descritos para los PUFAs ω-3, es importante señalar que un aumento de la cantidad de PUFAs en la dieta puede aumentar los niveles de peroxidación lipídica, desregulando la homeostasis redox y aumentando los parámetros de estrés oxidativo (160,161). Esto se debe a la mayor susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación al aumentar el número de insaturaciones en su cadena carbonada (162). Sin embargo, los resultados de estrés oxidativo tras el consumo de PUFAs son contradictorios ya que las condiciones experimentales varían: la cantidad ingerida de PUFAs, la forma de incluirlos en la dieta, otros componentes presentes en la dieta, etc. Diferentes trabajos han encontrado un incremento de los marcadores de estrés oxidativo (163,164) y otros un descenso (165,166) con dietas ricas en PUFAs.

En relación a ello, el uso de antioxidantes en la dieta es una estrategia común para proteger a los lípidos de la oxidación (167,168). Los polifenoles son los antioxidantes mayoritarios presentes en la dieta humana (169). Se encuentran fundamentalmente en las frutas y productos vegetales. En concreto, los flavonoides de las uvas y el vino han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Entre las funciones biológicas que les han sido atribuídas destacan: su habilidad para eliminar radicales libres y quelar metales (170); la regulación de factores de transcripción y expresión de citoquinas asociadas a la inflamación (26); disminución de los niveles de la proteína C reactiva (37), la enzima PLA_2 (38), y enzimas antioxidantes como la glutationa peroxidasa (171); regulación de la ruta de la glucosa (172); descenso del nivel de triglicéridos, LDL, y ácidos grasos libres en plasma (173); inhibición de la

síntesis *de novo* de ácidos grasos (38); regulación de la síntesis de eicosanoides inflamatorios (174); regulación de procesos de arteroesclerosis e hipertensión (175), etc.

Diversos estudios epidemiológicos han asociado el consumo de polifenoles con la reducción del riesgo de padecer diferentes enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, Alzheimer, o Parkinson (176–178). Incluso en una población como la francesa, con una dieta rica en grasas saturadas, la baja prevalencia de enfermedades cardiovasculares se ha atribuído al efecto de los polifenoles del vino tinto también consumido en la región (179). Sin embargo, los beneficios potenciales de la combinación de PUFAs ω-3 y polifenoles no han sido muy estudiados. Estudios *in vitro* han señalado que los polifenoles protegen a los ácidos grasos de la oxidación gastrointestinal, y este efecto se ha correlacionado con un aumento de la biodisponibilidad de los PUFAs para la absorción intestinal (180). Sekhon et al. (181) también observaron un efecto antiinflamatorio aditivo al combinar ambos suplementos.

Por lo tanto, resulta de gran interés investigar el efecto sinérgico de combinar EPA y DHA con polifenoles en relación con los desórdenes metabólicos. Existen multitud de trabajos en los que se relaciona la síntesis de mediadores lipídicos con la respuesta inflamatoria (74,79,84,86,87), señalización celular y modulación génica (26), metabolismo lipídico, enfermedades metabólicas (26,61,82), etc. Sin embargo, son relativamente pocos los trabajos que estudian el perfil de mediadores lipídicos generados por una dieta rica en EPA y DHA y no se han encontrado trabajos en los que se estudie directamente el perfil generado de estos metabolitos al combinar los PUFAs de origen marino con polifenoles.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. MEDIADORES LIPÍDICOS DERIVADOS DE LOS PUFAs ω-3 y ω-6

Los ácidos grasos ω-3 y ω-6 son los precursores biosintéticos de una amplia familia de mediadores lipídicos: compuestos bioactivos estrechamente relacionados con procesos inflamatorios como son los eicosanoides y docosanoides. Los derivados de la oxidación de los PUFAs de 20 carbonos ARA, EPA y DGLA, se los conoce como eicosanoides (74) mientras que los derivados del DHA y DPA (22 carbonos) se los conoce como docosanoides (182). Los mediadores lipídicos son fruto de la acción de las LOX, COX, CyP450 y posterior mediación de peroxidasas, dehidrogenasas, hidrolasas, transferasas, etc. Algunos derivados como los isoprostanos e isolevuglandinas son producidos a través de rutas no-enzimáticas (183).

Numerosos estudios apuntan que los mediadores lipídicos regulan multitud de procesos inflamatorios, rutas de señalización celular, procesos metabólicos, etc. Sin embargo, en muchos casos no está totalmente aclarado el papel que desempeñan estos metabolitos en diversas enfermedades. Por lo tanto, en este epígrafe se realiza una introducción general para entender cómo son las moléculas y sus rutas de síntesis. A continuación se explican las principales funciones biológicas descritas, y se realiza una revisión del estado del arte para estos compuestos en relación con los procesos inflamatorios, las enfermedades metabólicas y la influencia de la dieta en el perfil de mediadores lipídicos.

3.1. Clasificación

Se clasifican en función de la oxidación sufrida por el ácido graso de partida en diferentes familias o grupos: monohidróxidos, dihidróxidos, trihidróxidos, hidroperóxidos, etc. En la **Fig. 7** se muestran algunas de las estructuras químicas representativas de cada familia.

En las **Tab. 3-5** se presenta una clasificación de las diferentes familias de mediadores lipídicos del EPA, DHA y ARA. No existe un consenso respecto a la nomenclatura y las siglas para representar a cada familia. Por lo tanto, las siglas y nomenclatura usadas son las más habituales encontradas en bibliografía (125). En algunos casos, los metabolitos que provienen de uno u otro ácido graso se diferencian porque sus siglas son diferentes: monohidróxidos del EPA (HEPE), del DHA (HDoHE), del ARA (HETE). En otros casos, las siglas son idénticas y es necesario asignar un número de serie que identifique el ácido graso de procedencia. Por ejemplo, las prostaglandinas, tromboxanos e isoprostanos derivados del EPA se les asigna el número de serie 3, mientras que las prostaglandinas, tromboxanos e isoprostanos derivados del ARA se les asigna el número de serie 2.

Dentro de cada familia de compuestos existen variedad de isómeros. En las **Tab. 3-5** se muestran los principales isómeros conocidos dentro de cada familia, con su nomenclatura específica y propiedades fisicoquímicas. En el caso de los isómeros hidróxidos e hidroperóxidos, se diferencian indicando la posición del grupo hidroxilo o

hidroperóxido en la molécula. Otros compuestos como las prostaglandinas, se diferencian mediante letras (A, B, C, etc).

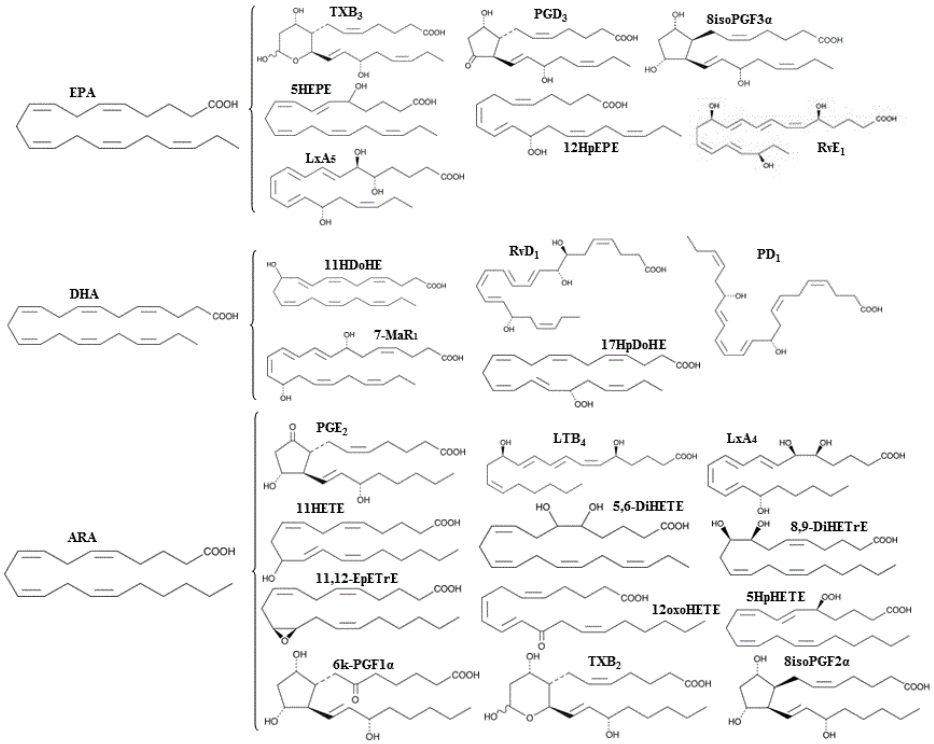


Fig. 7: Estrutura química de algunos de los isómeros de las diferentes familias de eicosanoides y docosanoides derivados de los ácidos grasos EPA, DHA y ARA.

Mediadores lipídicos del EPA					
Familia	**Nomenclatura**	**Isómeros**	**PM**	**FM**	**pKa 25ºC**
Monohidróxidos	HEPE	5HEPE	318	C20 H30 O3	4.67±0.10
		8HEPE			4.75±0.10
		9HEPE			4.73±0.10
		11HEPE			4.75±0.10
		12HEPE			
		15HEPE			
		18HEPE			
Dihidróxidos	DiHETE	5,6DiHETE	336	C20 H32 O4	4.68±0.10
		5,12DiHETE			
		5,15DiHETE			4.67±0.10
		8,15DiHETE			4.75±0.10
		14,15DiHETE			
		17,18DiHETE			
Leucotrienos	LT-5	LTA5	316	C20 H28 O3	
		LTB5	334	C20 H30 O4	
		LTC5	623	C30 H45 N3 O9 S	
		LTD5	494	C25 H38 N2 O6 S	
		LTE5	437	C23 H35 N O5 S	
Trihidróxidos (Lipoxinas)	Lx-5	LXA5	350	C20 H30 O5	4.67±0.10
Hidroperóxidos	HpEPE	5HpEPE	334	C20 H30 O4	4.75±0.10
		8HpEPE			
		9HpEPE			
		11HpEPE			
		12HpEPE			
		15HpEPE			
		18HpEPE			
Epóxidos	EEQ (EpETE)	8,9EEQ	318	C20 H30 O3	4.75±0.10
		11,12EEQ			
		14,15EEQ			
		17,18EEQ			
Tromboxanos	TX-3	TXA3	350	C20 H30 O5	4.76±0.10
		TXB3	368	C20 H32 O6	4.78±0.10
Prostaglandinas	PG-3	PGA3	332	C20 H28 O4	4.75±0.10
		PGB3			4.74±0.10
		PGD3	350	C20 H30 O5	4.75±0.10
		PGE3			
		PGI3			
		PGH3			
		PGF3α	352	C20 H32 O5	4.76±0.10
Isoprostanos	IsoP-3	8isoPGF3α	352	C20 H32 O5	4.76±0.10
		5isoPGF3α			
		11isoPGF3α			
		12isoPGF3α			
		15isoPGF3α			
		18isoPGF3α			
Resolvinas	RvE	RvE1	350	C20 H30 O5	4.66±0.10
		RvE3	334	C20 H30 O4	
		RvE2	334	C20 H30 O4	4.67±0.10

Tab. 3: Clasificación de las diferentes familias de mediadores lipídicos derivados del EPA: nomenclatura, isómeros, peso molecular (PM), fórmula molecular (FM), y valores calculados de pKa a 25º C mediante el *Software V11.02-1994-2012 Laboratorios ACD.* Datos obtenidos de la base de datos de *Sci-finder y LipidMaps*.

Mediadores lipídicos del DHA					
Familia	**Nomenclatura**	**Isómeros**	**PM**	**FM**	**pKa 25ºC**
Monohidróxidos	HDoHE	4HDoHE	344	C22 H32 O3	4.57±0.10
		7HDoHE			4.58±0.10
		8HDoHE			4.53±0.10
		10HDoHE			4.58±0.10
		11HDoHE			4.57±0.10
		13HDoHE			4.58±0.10
		14HDoHE			
		16HDoHE			
		17HDoHE			
		20HDoHE			
Dihidróxidos	DiHDPA	10,11DiHDPA	362	C22 H34 O4	4.58±0.10
		14,21DiHDPA			
		19,20DiHDPA			
Hidroperóxidos	HpDoHE	4HpDoHE	360	C22 H32 O4	4.58±0.10
		7HpDoHE			
		8HpDoHE			
		10HpDoHE			
		11HpDoHE			
		13HpDoHE			
		14HpDoHE			
		16HpDoHE			
		17HpDoHE			
		20HpDoHE			
Epóxidos	EDP (EpDPA)	7,8EDP	344	C22 H32 O3	4.58±0.10
		10,11EDP			
		13,14EDP			
		16,17EDP			
		19,20EDP			
Resolvinas	RvD	RvD1	376	C22 H32 O5	4.58±0.10
		RvD2			
		RvD3			
		RvD4			
Neuroprotectinas	PD	PD1	360	C22 H32 O4	4.58±0.10
Maresinas	MaR	MaR2 (13,14DiHDPA)	360	C22 H32 O4	4.57±0.10
		7-MaR1			4.58±0.10

Tab. 4: Clasificación de las diferentes familias de mediadores lipídicos derivados del DHA: nomenclatura, isómeros, peso molecular (PM), fórmula molecular (FM), y valores calculados de pKa a 25º C mediante el *Software V11.02-1994-2012 Laboratorios ACD.* Datos obtenidos de la base de datos de *Sci-finder y LipidMaps*.

Mediadores lipídicos del ARA					
Familia	**Nomenclatura**	**Isómeros**	**PM**	**FM**	**pKa 25ºC**
Monohidróxidos	HETE	3HETE	320	C20 H32 O3	
		5HETE			4.67±0.10
		8HETE			4.75±0.10
		9HETE			4.73±0.10
		11HETE			4.75±0.10
		12HETE			
		15HETE			
		18HETE			
		19HETE			
		20HETE			
Dihidróxidos	DiHET (DiHETrE)	5,6DiHET	338	C20 H34 O4	4.68±0.10
		8,9DiHET			4.75±0.10
		11,12DiHET			
		14,15DiHET			
Leucotrienos	LT-4	LTA4	318	C20 H30 O3	4.66±0.10
		LTB4	336	C20 H32 O4	4.66±0.10
		LTC4	625	C30 H47 N3 O9 S	2.21±0.10
		LTD4	496	C25 H40 N2 O6 S	3.03±0.11
		LTE4	439	C23 H37 N O5 S	2.05±0.10
Trihidróxidos (lipoxinas)	Lx-4	LXA4	352	C20 H32 O5	4.67±0.10
		LXB4			
Hidroperóxidos	HpETE	5HpETE	336	C20 H32 O4	4.66±0.10
		8HpETE			4.75±0.10
		9HpETE			
		11HpETE			
		12HpETE			
		15HpETE			
		19HpETE			
		20HpETE			

(Continúa)

Mediadores lipídicos del ARA					
Familia	**Nomenclatura**	**Isómeros**	**PM**	**FM**	**pKa 25ºC**
Epóxidos	EET (EpETrE)	5,6EET	320	C20 H32 O3	4.76±0.10
		8,9EET			
		11,12EET			4.75±0.10
		14,15EET			
Ceto-derivados	oxo-ETE	5oxoETE	318	C20 H30 O3	4.59±0.10
		8oxoETE			4.75±0.10
		9oxoETE			
		11oxoETE			
		12oxoETE			
		15oxoETE			
		19oxoETE			
		20oxoETE			
Tromboxanos	TX-2	TXA2	352	C20 H32 O5	4.76±0.10
		TXB2	370	C20 H34 O6	
Prostaglandinas	PG-2	PGA2	334	C20 H30 O4	4.75±0.10
		PGB2			4.74±0.10
		PGJ2			4.75±0.10
		PGD2	352	C20 H32 O5	4.76±0.10
		PGE2			
		PGI2			
		PGH2			
		PGF2α	354	C20 H34 O5	
		PGG2	368	C20 H32 O6	
Ceto-PG	k-PG	15k-PGE2	350	C20 H30 O5	4.75±0.10
		15K-PGF2α	352	C20 H32 O5	4.76±0.10
		6k-PGF1α	370	C20 H34 O6	4.69±0.10
Isoprostanos	IsoP-2	8isoPGJ2	334	C20 H30 O4	4.75±0.10
		8isoPGA2			
		8isoPGE2	352	C20 H32 O5	
		8isoPGD2			4.76±0.10
		8isoPGF2α	354	C20 H34 O5	
		5isoPGF2α			
		12isoPGF2α			
		15isoPGF2α			

Tab. 5: Clasificación de las diferentes familias de mediadores lipídicos derivados del ARA: nomenclatura, isómeros, peso molecular (PM), fórmula molecular (FM), y valores calculados de pKa a 25º C mediante el *Software V11.02-1994-2012 Laboratorios ACD.* Datos obtenidos de la base de datos de *Sci-finder y LipidMaps*.

3.2. Rutas metabólicas de síntesis

Los ácidos grasos EPA, DHA y ARA ingeridos por la dieta, y en menor medida sintetizados *de novo* a partir de LA y ALA, son los sustratos para la síntesis de los mediadores lipídicos más estudiados, aunque también se producen mediadores de los ácidos ALA, LA, y DGLA. Una vez absorbidos en el epitelio intestinal son transportados en los quilomicrones hasta el hígado y desde ahí hacia el resto de tejidos para ser acumulados en forma de triglicéridos, obtener energía o formar parte de las membranas celulares.

El primer paso para la síntesis de los mediadores lipídicos es la liberación de los PUFAs de la membrana que forman parte en la bicapa fosfolipídica (**Fig. 8**). Para ello es necesaria la acción de las PLA_2 (184). Se trata de un grupo estructuralmente diverso de enzimas que hidrolizan los ácidos grasos que forman parte de los glicerofosfolípidos dando lugar a ácidos grasos libres en el citosol de las células. Existen varios tipos de PLA_2: celulares, secretoras, y activadoras de factores plaquetarios. Las PLA_2 celulares se activan e hidrolizan los ácidos grasos debido a determinados estímulos extracelulares que todavía se desconocen, o bien por medio de quinasas intracelulares que las fosforilan y producen una translocación en la membrana y su activación (185).

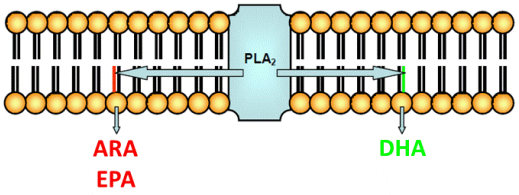


Fig. 8: Acción de la fosfolipasa A_2 sobre los fosfolípidos de membrana para liberar los PUFAs ω-3 y ω-6

Una vez liberados en el citosol de las células, los PUFAs son oxidados a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos. A través de la acción de las enzimas LOXs, COXs y CyP450 se sintetizan la mayoría de los mediadores lipídicos de la familia de las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, hidroperóxidos, hidróxidos, epóxidos, ceto-derivados, levuglandinas, etc (183). Mediante rutas no enzimáticas se forman los isoprostanos, isolevuglandinas e hidróxidos (186–188) como se ha mencionado previamente. Una vez producidos, estos mediadores lipídicos actúan como mediadores locales en procesos de señalización celular, atraviesan las membranas celulares para actuar en procesos inflamatorios, inmunológicos, etc (189).

Las enzimas COX-1 y COX-2 realizan una actividad ciclooxigenasa y peroxidasa, catalizando la ciclación oxidativa de los 5 carbonos centrales de los PUFAs de 20 carbonos como el EPA, el ARA o el DGLA y dando lugar a las prostaglandinas H (PGH) (190). Aunque no es exclusivamente así, la isoforma COX-1 es expresada en casi todas las células para las funciones fisiológicas habituales, y la COX-2 actúa fundamentalmente en los lugares en donde se produce una inflamación (191). Las PGH son convertidas posteriormente en prostaglandinas, prostaciclinas, y tromboxanos a

través de sintasas e isomerasas específicas como la prostagladina D sintasa (192), E sintasa (193), F sintasa (194), I sintasa (195), y tromboxano sintasa (196). Además, las enzimas COX también producen hidroperóxidos e hidróxidos específicos a partir de los PUFAs de 18 y 22 carbonos como el LA y el DHA (197–199).

Otra ruta mediada por las COXs es la síntesis de los isómeros R de los hidróxidos 18, 17 y 15 del EPA, DHA y ARA respectivamente, que son precursores de la ruta de formación de resolvinas y lipoxinas antiinflamatorias (200,201). En la **Fig. 9** se muestra un ejemplo de la síntesis de las resolvinas E_1 y E_2 derivadas del EPA. En las células endoteliales se produce la acetilación del sitio activo de la COX por medio de la aspirina. Esta enzima acetilada media la oxidación estereoselectiva del EPA a 18R-HEPE. Aunque en menor proporción, la CyP450 también regula la síntesis de 18R-HEPE. Cuando existe un proceso de inflamación, se produce la activación de la 5LOX que transforma el 18R-HEPE en los metabolitos antiinflamatorios RvE_1 y RvE_2 (88).

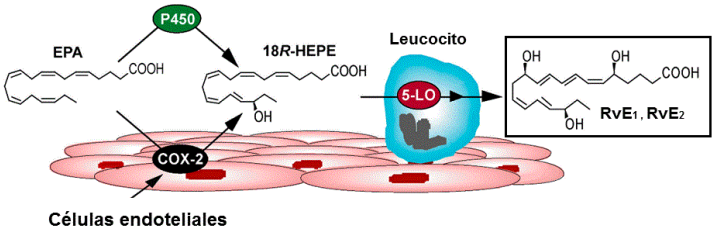


Fig. 9: Síntesis detallada de las RvE_1 y RvE_2. Adaptada de Sun et al (78).

Las enzimas LOXs catalizan la inserción estereoselectiva del oxígeno molecular en los PUFAs para formar hidroperóxidos, los cuales son posteriormente reducidos a hidróxidos por la enzima glutationa peroxidasa (GPX). Existen diferentes isoformas de estas enzimas que regulan la formación de los isómeros posicionales según el carbono en el que se inserta el oxígeno como la 5LOX, 8LOX, 12LOX o 15LOX (202). Los hidróxidos del EPA, DHA y ARA pueden formar polihidróxidos por medio de más lipooxidaciones dando lugar a las lipoxinas, resolvinas, y protectinas (203).

Después de la formación del 5-hidroperóxido, la isoforma 5LOX de los leucocitos regula la epoxidación a los leucotrienos ω-6 LTA_4 y ω-3 LTB_5. Posteriormente el LTA_4 se hidroliza en el carbono 12 para dar la serie B (204) o se conjuga con glutationa en el carbono 6 para dar la serie C (205). La 15LOX regula también de un modo similar la formación de los leucotrienos del EPA.

A través de la 5LOX se produce el 5HpETE, el cual es posteriormente oxidado por medio de una dehidrogenasa (DHO) para dar el 5oxoETE en los leucocitos y las plaquetas (206). La DHO necesita grandes cantidades de $NADP^+$, que es producido durante procesos de estrés oxidativo y apoptosis en los leucocitos (207). El 5oxoETE resulta de gran interés por su actividad proinflamatoria.

La familia de las monooxigenasas CyP450 catalizan la hidroxilación y/o epoxidación de los PUFAs dando lugar a metabolitos anti y proinflamatorios (208). Las CyP450 producen hidróxidos en posiciones únicas como por ejemplo el 20HETE derivado del ARA, con propiedades proinflamatorias (209). Además, las isoformas de las CyP450 regulan la epoxidación de EPA, DHA, LA y ARA para dar lugar a los derivados epoxi de los que se han descrito propiedades antiinflamatorias (210). Estos epóxidos, son posteriormente transformados en dihidróxidos (metabolitos proinflamatorios) por medio de las enzimas epóxido hidrolasa solubles (sEH) (211,212).

Finalmente, el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno pueden originar la oxidación no enzimática de los PUFAs catalizada por radicales libres, dando lugar a la formación de diferentes familias de isoprostanos e hidróxidos (213–216). A diferencia de las rutas de oxidación enzimáticas, la falta de estereoselectividad resulta en una mezcla racémica de isómeros. En primer lugar se producen radicales peroxilo por la autoxidación en diferentes posiciones del ácido graso a través de radicales libres. Estos radicales pueden dar lugar a hidroperóxidos o seguir un proceso de endociclación. Finalmente, se produce una reducción no selectiva que da lugar a varios regioisómeros, cada uno de los cuales forma diferentes diastereoisómeros. Un ejemplo es la formación de los isoprostanos-F_2 del ARA (**Fig. 10**) (25) y F_3 del EPA (**Fig. 11**) (82). Estos compuestos han sido correlacionados con el estrés oxidativo y diferentes daños en tejidos (217–220). Las prostaglandinas del EPA y ARA son moléculas estructuralmente equivalentes a los isoprostanos, pero producidas por vía enzimática.

En las **Fig. 12-13** se esquematizan las principales rutas biosintéticas por las que se forman los mediadores lipídicos derivados del EPA, DHA, ALA, ARA, LA, y DGLA. (12,18,82,183,186,188,221). Además de las enzimas LOX, COX, y CyP450, otras enzimas que intervienen en las rutas son: D (desaturasas), E (elongasas), CyPh (citocromo hidrolasa), CyPe (citocromo epoxigenasa), GPX, GPT (glutationa transferasa), DHO, GGT (γ-glutamil transferasa), CN2 (dipeptidasa), PGH (hidroperoxidasa), PGsy (prostaglandina sintasa), y TXsy (tromboxano sintasa), sEH (epóxido hidrolasa).

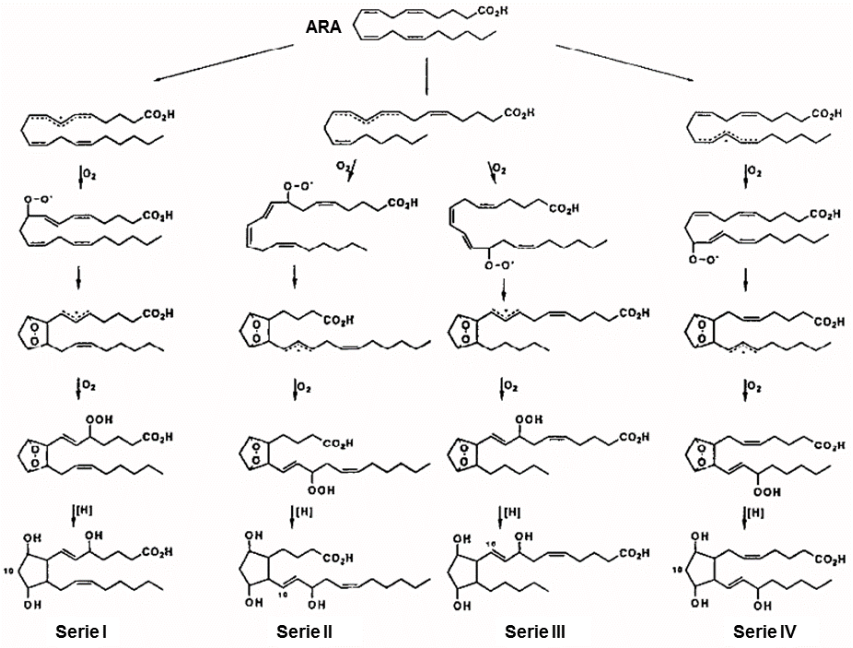


Fig. 10: Síntesis no enzimática de los isoprostanos F_2 derivados del ARA (25)

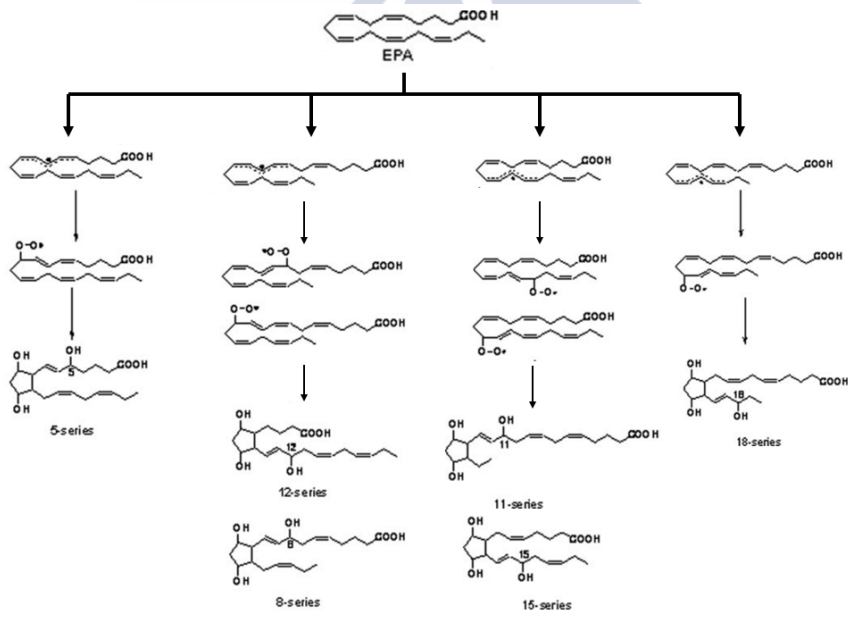


Fig. 11: Síntesis no enzimática de los isoprostanos F_3 derivados del EPA (82)

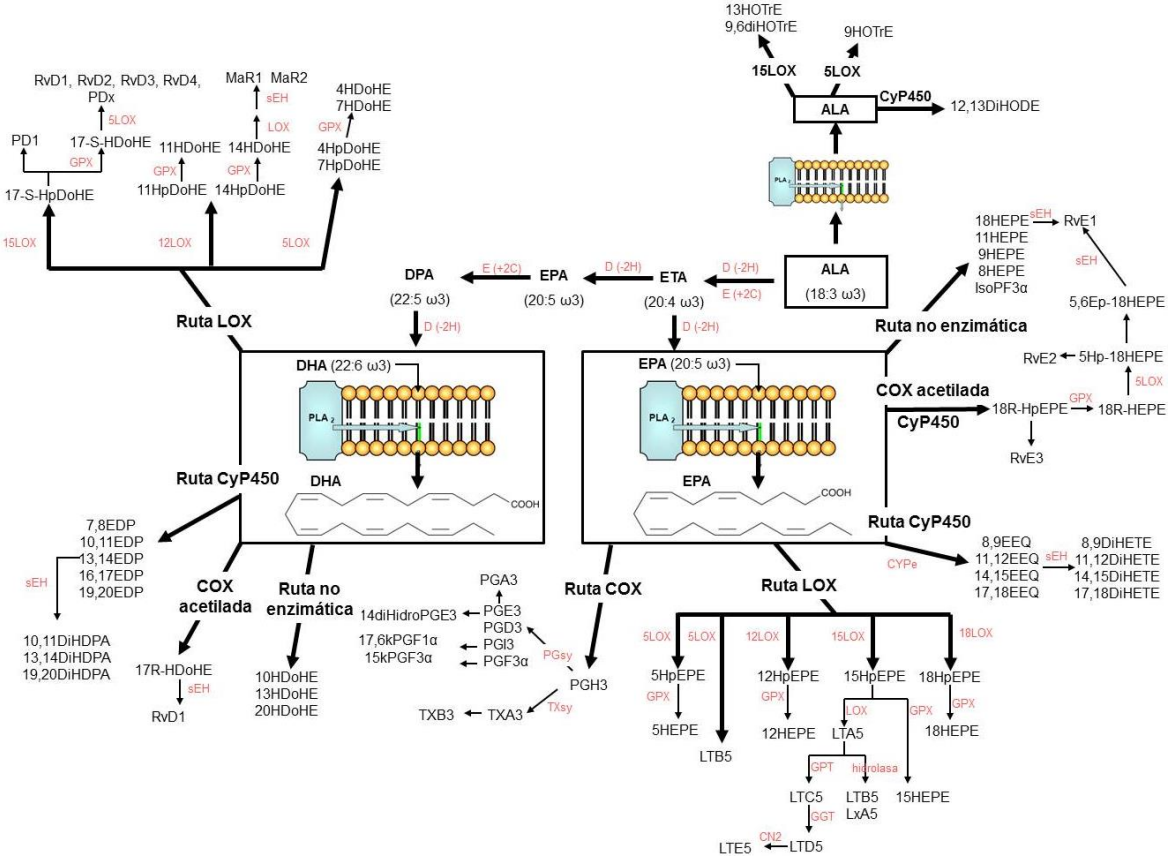


Fig. 12: Rutas biosintéticas de los mediadores lipídicos derivados del EPA, DHA, y ALA

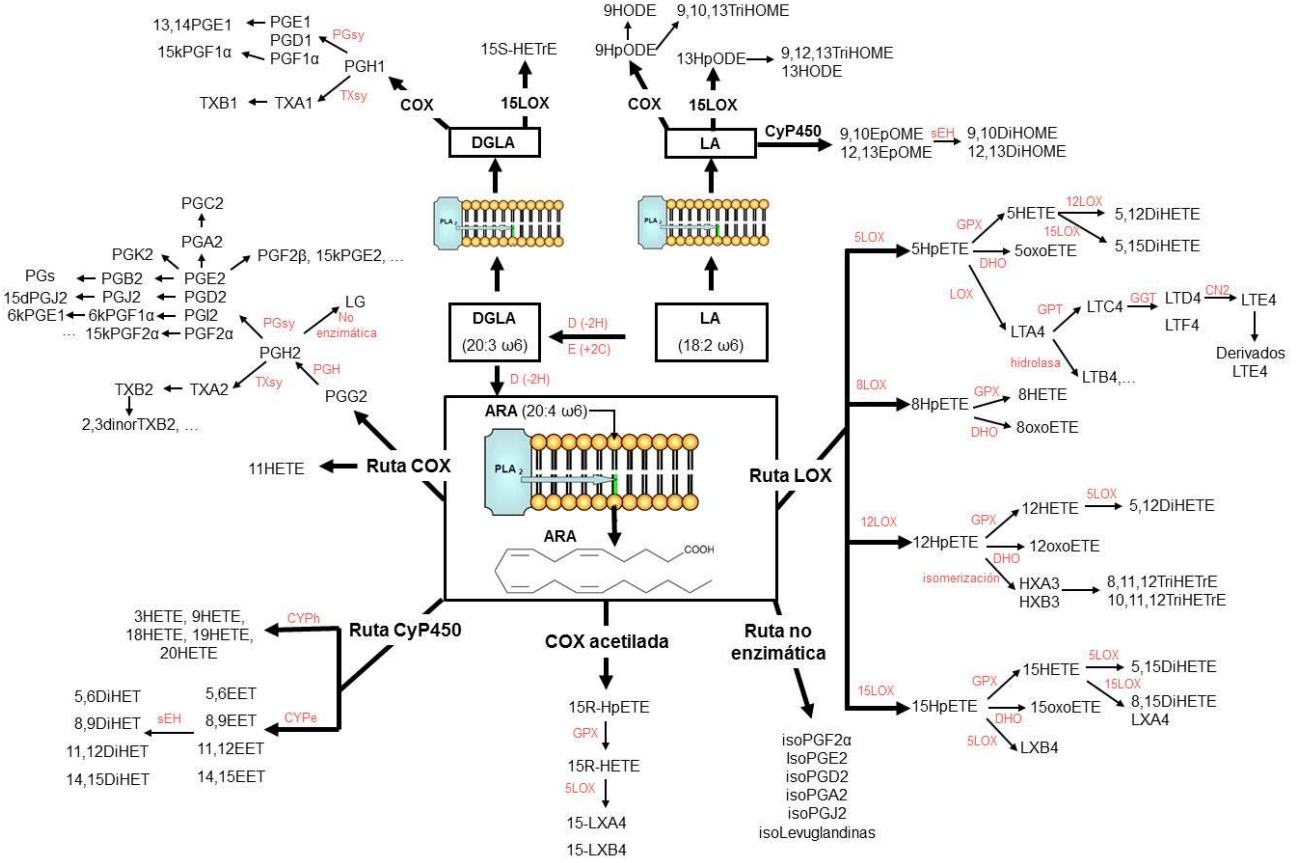


Fig. 13: Rutas biosintéticas de los mediadores lipídicos derivados del ARA, LA y DGLA.

3.3. Bioactividad de las diferentes familias de mediadores lipídicos

Los lípidos en general, se consideran simplemente constituyentes de las membranas y fuentes de energía para el organismo. Sin embargo, numerosos estudios apuntan a los lípidos, y en especial a los mediadores lipídicos, como potentes metabolitos que regulan la respuesta celular a través de su interacción con receptores específicos y la regulación de procesos inflamatorios (222). De esta forma, realizan importantes funciones en el desarrollo/prevención de diferentes enfermedades metabólicas, infecciosas, inmunológicas, cáncer, etc.

En el apartado 2 de la introducción se han descrito las principales funciones biológicas que desempeñan los PUFAs ω-3 y ω-6 en relación a los desórdenes metabólicos y los mecanismos implicados en su respuesta. Entre estos mecanismos destaca el papel que ejercen los mediadores lipídicos. Se trata de productos biológicos muy activos que ejercen una potente acción local de forma transitoria (189). Su modo de actuar no está completamente caracterizado, aunque resultan esenciales para el mantenimiento del organismo en multitud de procesos inflamatorios y rutas de señalización celular. A continuación se realiza una revisión de la bioactividad descrita para las diferentes familias de estos compuestos.

3.3.1. La inflamación

Antes de empezar, es necesario entender el mecanismo implicado en la aparición y desarrollo de la inflamación. Ésta es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos por cualquier agresor de naturaleza biológica, química, física, mecánica, o genética. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. Persigue un triple objetivo: para eliminar los agentes causantes del daño, reparar los tejidos, y establecer una memoria para ejercer una respuesta más rápida y eficaz ante futuras infecciones (29).

Consiste en una respuesta compleja y coordinada que implica un número elevado de cambios a nivel molecular, celular y fisiológico. Comienza con la movilización de las células inmunológicas (macrófagos, linfocitos, fibroblastos, etc) en el tejido dañado, las cuales comienzan un proceso de señalización celular para reclutar células inflamatorias como los leucocitos. Estos leucocitos activados segregan diferentes tipos de mediadores químicos en el lugar de la inflamación con el fin de eliminar o matar los agentes extraños. Entre los mediadores producidos se encuentran eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, etc) y citoquinas proinflamatorias, ROS, NO, proteasas, etc dependiendo de los estímulos recibidos, el estadío y lugar de la inflamación, el tipo de célula, etc (223). Una respuesta inflamatoria normal continúa con la activación de mecanismos de resolución de la inflamación y recuperación de la homeostasis inicial mediante la secreción de citoquinas y mediadores lipídicos antiinflamatorios, activación de

macrófagos que eliminan el exceso de leucocitos vía apoptosis (224) o devolviéndolos al sistema linfático (225).

Sin embargo, si alguna parte del proceso descrito falla, la inflamación se prolonga y puede convertirse en crónica. Los productos de las células inflamatorias dejan de ser beneficiosos y pueden dañar las biomoléculas, células y tejidos cercanos. Además, este proceso también genera mediadores celulares que activan la expresión de enzimas relacionadas con el progreso y mantenimiento de la inflamación (226). Este estado crónico de inflamación induce la pérdida de funciones de las barreras celulares, proliferación anormal de células, toxicidad, etc que contribuye al desencadenamiento de enfermedades crónicas y degenerativas como la artritis reumatoide (227), arteriosclerosis (228), infarto de miocardio (229), Alzhéimer, Parkinson (230), bronquitis, enfisema, asma, glomerulonefritis, isquemia reperfusión, enfermedades cardiovasculares (27,231), o cáncer (232), entre otras enfermedades con un alto grado de inflamación.

En definitiva, la respuesta inflamatoria consiste en un balance entre la generación de mediadores proinflamatorios para luchar contra los agentes extraños, y mediadores antiinflamatorios para resolver la inflamación y evitar el desarrollo de patologías crónicas. Los mediadores lipídicos ω-3 y ω-6 son sintetizados a nivel de nanomoles en situaciones de estrés, y funcionan como activadores/inhibidores de la respuesta inflamatoria actuando como mensajeros celulares, alterando el metabolismo hormonal, factores de transcripción génica, etc, resultando en una respuesta proinflamatoria o ayudando a la resolución de la misma (26).

3.3.2. Prostanoides

Los prostanoides son un conjunto de mediadores lipídicos conocidos como prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs) producidos por medio de la ruta de las COX a partir de los PUFAs de 20 carbonos EPA, ARA y DGLA. Fueron identificados por primera vez en semen humano en los años 30, de ahí el nombre de prostanoides (233). Hoy en día, estos metabolitos han sido identificados en la mayoría de tejidos y células y han sido relacionados con multitud de procesos fisiológicos y patológicos de los sistemas circulatorio, renal, gastrointestinal o reproductivo. Ejercen su actividad biológica por medio de la unión a receptores específicos de las membranas celulares. En concreto, existen 9 tipos diferentes de receptores de las PGs y TXs que pertenecen a la familia de receptores acoplados a la proteína G de membrana (234).

En general, los derivados del ARA se consideran sustancias con potente actividad inflamatoria, y han sido relacionados con enfermedades como la artritis, psoriasis, diabetis, CVD, desórdenes reproductivos, etc (235). De hecho, la importancia clínica de estos metabolitos reside en el bloqueo de sus rutas biosintéticas mediante fármacos antiinflamatorios como los NSAIDs (*non-esteroideal anti-inflammatory drugs*). Un ejemplo es la aspirina, cuya acción antiinflamatoria y analgésica se debe a la reacción

entre el ácido acetilsalicílico con el extremo hidroxilo de la COX, inhibiendo la formación de PGH_2 y el resto de PGs (125). Es por eso que, los prostanoides están considerados como marcadores por excelencia de inflamación (236). Además, se trata de moléculas relativamente estables que pueden ser detectadas esterificadas en los tejidos celulares así como en modo libre en los fluídos biológicos (plasma, orina, bilis o incluso en el jugo gástrico) (214).

La PGE_2, PGF_2, y PGI_2 derivadas del ARA son compuestos predominantemente proinflamatorios. Poseen actividad vasodilatadora (237), fomentan la formación de edemas, aumentan la permeabilidad vascular (238) y la fiebre (239), y producen la acumulación de triglicéridos (101). Uno de los mecanismos de actuación de estas PGs es la activación de la ruta del complejo cAMP al unirse a receptores de la proteína G de membrana. Esto hace que aumente la expresión de citoquinas inflamatorias (240) y que se regule el metabolismo lipídico. También disminuyen la capacidad de los leucocitos para fagocitar microorganismos (241). Se han encontrado en pacientes enfermos con el Síndrome de Dolor Regional Complejo, un trastorno del sistema nervioso provocado por serias inflamaciones y que produce dolor aguda y crónica (242). Otros estudios han referenciado niveles elevados de estos prostanoides en hipercolesterolemia (243), cirrosis hepática (244), síndrome de Crest (245), reperfusión miocárdica (246), diabetis tipo-2 (247), o cáncer (248). Otros prostanoides como el TXB_2 del ARA han sido correlacionados con diabetes, hipertensión, obesidad y arteriosclerosis (249). Todas ellas son enfermedades asociadas con un componente importante de inflamación.

Sin embargo, otras prostaglandinas como la PGD_2 del ARA poseen propiedades antiinflamatorias al deshidratarse no enzimáticamente hacia los derivados PGJ_2, 15d-PGJ_2, etc (250). Por ejemplo, se unen al receptor PPARγ disminuyendo la síntesis de citoquinas (251), inhiben la activación de NFkB (252), o estimulan la resolución de la inflamación por los leucocitos (253).

Además, los prostanoides juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular. Este equilibrio depende de un estrecho balance entre la producción de metabolitos vasodilatadores y antiagregantes como la PGI_2 del ARA o $PGF_{1\alpha}$ del DGLA, y protrombóticos como el TXA_2 (254,255). El TXA_2 se produce en las plaquetas y es un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor, mientras que la PGI_2 se origina en el endotelio vascular y ayuda a prevenir la formación de coágulos por acúmulo de plaquetas en las paredes de las arterias (125). Durn et al realizaron un interesante estudio para ver la influencia de estos prostanoides en la actividad contractil del miometrio en el momento del parto. El TXA_2 y la $PGF_{2\alpha}$ tienen una función contractil mientras que la PGI_2 y la PGD_2 actúan como relajantes musculares. Una de las aplicaciones derivadas es la inducción del parto por infusión intravenosa o intravaginal de $PGF_{2\alpha}$ (256).

Por otra parte, los derivados ω-3, del EPA, son generalmente menos potentes que los derivados ω-6 del ARA. A grandes rasgos, puede establecerse que algunas familias de

eicosanoides ω-6 tienen un potencial biológico de inducción de respuesta inflamatoria unas 10 veces superior a los correspondientes derivados ω-3, cumpliendo, por tanto, un papel patogénico importante (125). Este es el caso, por ejemplo, de la PGI_2 y PGI_3 y del TXA_2 y TXA_3 en donde la serie-2 se refiere a los derivados del ARA y la serie-3 a los derivados del EPA. Se trata de compuestos muy similares que se producen por la misma ruta biosintética a través de COX y por competencia directa entre los ácidos grasos como sustrato de estas enzimas. El TXA_3 es muy poco vasoconstrictor y la PGI_3 tiene menor acción antiagregante que los correspondientes derivados del ARA (125).

3.3.3. Isoprostanos

Los isoprostanos (isoPs) son moléculas similares a las prostaglandinas pero producidos vía no enzimática. El $8isoPGF_{2\alpha}$ (derivado del ARA) es uno de los más abundantes y también más estudiados. Exhibe unha potente actividad vasoconstrictora y estimula la mitogénesis en el músculo liso al igual que su análogo, la prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ (25,257,258). Sin embargo, otros isoprostanos también abundantes como el $8isoPGE_2$ exhiben un efecto vasoconstrictor al contrario que su análogo PGE_2 que es vasodilatador. Este hecho evidencia la importancia de la orientación espacial de las cadenas laterales ya que determinan su interacción con los receptores celulares (214). Los isoprostanos derivados del EPA poseen también propiedades inflamatorias pero menos potentes que los correspondientes ω-6 (82).

3.3.4. Leucotrienos

Los leucotrienos (LTs) son una familia de mediadores lipídicos producidos por las isoformas 5LOX y 15LOX a partir del ARA y EPA en las células inflamatorias como leucocitos, macrófagos y mastocitos (204). Su bioactividad es principalmente proinflamatoria y se debe a la unión con receptores específicos situados en la parte externa de la membrana plasmática de las células inflamatorias (259). Una vez unidos, se envía una señal a través del complejo G de membrana que provoca el aumento de iones calcio en el citoplasma y se bloquea el complejo cAMP. Al disminuír la concentración de este complejo cAMP se regulan diferentes actividades celulares como la vasoconstricción, producción de NO (260), activación de la NADPH (261), o contribuyen a la inflamación y fibrosis pulmonar (262).

Patológicamente, los LTs contribuyen a variedad de enfermedades alérgicas e inflamatorias como la artritis reumatoide, inflamación del intestino, psoriasis, rinitis alérgica, asma, o cáncer (263). Es por ello que una de las terapias para este tipo de enfermedades como puede ser el asma, son los fármacos inhibidores de la actividad de la 5LOX para bloquear los potentes LTs del ARA (264). En relación a la salud cardiovascular, la sobreproducción de LTs ha sido relacionada con el aumento de infartos en humanos (265).

Uno de los leucotrienos más estudiados es el LTB_4 derivado del ARA que ha sido relacionado con la proliferación del cáncer de próstata (266) o con el crecimiento de melanomas inducido por procesos inflamatorios (267). Este compuesto actúa también como mediador químico para movilizar y activar las células inmunológicas en el inicio de la respuesta inflamatoria (268) y activa el receptor nuclear PPARα (269). Otro mediador pro-inflamatorio derivado del ARA es el LTD_4 que se ha encontrado sobreexpresado en varios tumores hepáticos, en enfermos crónicos de hepatitis B (270), y se ha descrito como mediador en diferentes respuestas alérgicas junto a los LT de las series C y E (271).

Al igual que ocurre con las PGs, los LTs producidos a partir del EPA son mucho menos inflamatorios que los derivados del ARA. La actividad del LTB_5 del EPA es considerada entre 10 y 30 veces menos agregante que el correspondiente derivado del ARA reduciendo así los riesgos trombóticos (272). Además, su capacidad para movilizar y activar las células inmunológicas en el inicio de la respuesta inflamatoria entre 10 y 100 veces menor que el derivado LTB_4 (273). Su menor actividad está asociada a una menor movilización de los iones calcio en los leucocitos y menor activación de la interleuquina IL-1 (274). Se ha encontrado que una dieta rica en EPA desvía la ruta de síntesis de la LOX hacia los LTs derivados de éste PUFA en vez de los ω-6 del ARA (275).

3.3.5. Oxo-derivados

Se trata de una familia de eicosanoides poco estudiada. Recientemente se ha descrito la actividad del 5oxoETE producido en los leucocitos vía 5LOX a partir del ARA. Actúa a través de la unión con un receptor específico expresado en los leucocitos del pulmón, riñones, hígado y bazo (276,277). Activa diferentes señales celulares como la ruta PI3-AKT (278), la producción de citoquiinas y el factor TNFα, o la síntesis de PLA_2 que induce la síntesis de otros mediadores lipídicos proinflamatorios (279).

3.3.6. Lipoxinas

Las lipoxinas (LXs) son derivados trihidróxido sintetizados fundamentalmente a partir del ARA por medio de la 5LOX, 15LOX y mediante el proceso de acetilación de la COX con aspirina. A diferencia de la mayoría de los mediadores ω-6, las LXs tienen propiedades antiinflamatorias, antitumorgénicas, y son claves en la resolución de la inflamación (280). Entre sus mecanismos de acción destaca la competencia por las mismas enzimas que regulan la síntesis de los LTs proinflamatorios (281), y la competencia con el LTD_4 por ligarse al receptor CysLT1 que induce respuestas inflamatorias (282). Además, las LXs activan el receptor ALX que tiene una gran selectividad hacia LXA_4 y no por LXB_4, LTB_4, o PGE_2. Esta activación conlleva la inhibición de NADPH oxidasa y por tanto de la producción de aniones superóxido y ROS en las plaquetas (283), inhibición de IL-8 (284), TNFα (285), o la molécula de adhesión ICAM-1 en células cancerígenas en el cerebro (286).

Por lo tanto, su uso a nivel farmacológico ha resultado ser beneficioso en modelos de inflamación de diferentes enfermedades como fibrosis (287), periodontitis (288), asma (289), colitis (290), o contra infecciones microbianas como la tuberculosis (291,292).

3.3.7. Hidróxidos e hidroperóxidos

Los hidróxidos e hidroperóxidos son producidos por diferentes rutas mediadas por LOXs, COXs y CyP450. Han sido descritos como mensajeros secundarios que pueden estar envueltos en la regulación del sistema circulatorio (presión y flujo), las enfermedades cardiovasculares (293), procesos depresivos (294), arteriosclerosis (84), lesiones de la córnea, anxiogénesis, o cáncer (188). Se consideran marcadores de peroxidación lipídica y estrés oxidativo por su grado de insaturación (295).

Uno de los cánceres más comunes es el de próstata, y su relación con la producción de eicosanoides ha sido demostrada. Metabolitos derivados del ARA como la PGE_2 o el 5HETE están implicados en la hiperproliferación de las células tumorales de este tipo de cáncer (296). El 12HETE y 20HETE también juegan un papel crítico la metástasis incluyendo la vasculación, angiogénesis, etc (297). Mediante cultivos celulares cancerígenos, Vang et al demostraron que el derivado del EPA 15HEPE inhibe la formación de los derivados descritos para el ARA y consecuentemente, atenúa el crecimiento de las células cancerígenas (298). Otros hidroxi-derivados como el 8 y 12HETE han sido estudiados por su capacidad de regular el tono vascular (293), o el 16HETE por su capacidad de inhibir la formación de TXs y la consiguiente disminución de la agregación plaquetaria (299).

3.3.8. Epóxidos y dihidróxidos

La CyP450 cataliza la formación de epóxidos a partir del EPA, DHA y ARA. Estos epóxidos son transformados en dioles debido a un proceso de hidratación mediado por las enzimas sEH. Los epóxidos son metabolitos con propiedades antiinflamatorias mientras que los dihidróxidos son moléculas proinflamatorias (300). El uso de sustancias inhibidoras de las sEH parece ser, por tanto, una herramienta poderosa para el tratamiento de la inflamación (301). La actividad de los epóxidos parece activar el factor PPARγ (302) e inhibe TNFα y NFkB. Disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias, expresión de COX y prostaglandinas como la PGE_2, y moléculas de adhesión como la ICAM-1 y la VCAM-1, con lo que se reduce la adhesión de los leucocitos a las paredes vasculares (303) y se ejerce una actividad antitrombótica (304).

3.3.9. Resolvinas, protectinas y maresinas

La importancia de los PUFAs ω-3 en la reducción de la inflamación y los desórdenes asociados no se debe exclusivamente a la inhibición por competencia de la síntesis de los mediadores proinflamatorios derivados de los PUFAs ω-6. Existen una serie de metabolitos derivados del EPA y DHA con poder de resolución de la inflamación y

retorno de los tejidos a la homeostasis inicial (188). Fueron descubiertos en los últimos años por Serhan et al (305), y su propio nombre refleja la actividad de resolución de la inflamación y protección de los sistemas celulares: resolvinas (Rv, *resolution phase interaction products*), protectinas y maresinas (PD y MaR, *macrophage mediator in resolving inflammation*).

Estos mediadores locales actúan a través de la unión con receptores específicos que inhiben/promueven la regulación de factores celulares específicos que participan en la transcripción de los genes involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune (78,87). Por ejemplo, la RvE_1 se une a un receptor de la proteína G de membrana inhibiendo la actividad de NFkB y estimulando TNFα (88), actúa como antagonista del LTB_4 uniéndose a su mismo receptor (306), estimula la actividad de los macrófagos para inhibir el acúmulo de leucocitos (307), etc. De un modo similar actúan las PDs derivadas del DHA (308). Las maresinas son compuestos descubiertos recientemente y aún no se conocen del todo sus mecanismos de síntesis y bioactividad. Sin embargo, la MaR_1 ha sido relacionada con la estimulación de la actividad fagocítica de los macrófagos al igual que las Rv y PDs (309).

Estudios recientes muestran la efectividad antiinflamatoria de las Rv y PDs en enfermedades cardiovasculares (61), artritis (310), colitis (311), asma (312), actividad citotóxica contra las células del neuroblastoma infantil (313), inhibición de los factores de crecimiento en cáncer de próstata (314) y melanoma (315), e incluso actividad protectora contra enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (86,88).

Está demostrado que con la edad disminuyen las interacciones sinápticas entre las neuronas, lo que lleva a la disminución de la densidad neuronal, volumen y funciones del hipocampo. Un factor que contribuye a esta neurodegradación es el estrés oxidativo-inflamatorio en las células neuronales, responsable de la activación de las enzimas caspasas, proteínas que median en el proceso de apoptosis celular. Con la edad aumenta la hidrólisis de la esfingomielina de la membrana celular que recubre las neuronas, factor que conlleva a cambios en la cadena respiratoria de las mitocondrias y a la sobreproducción de ROS que promueven la activación de las caspasas. El aumento de la proporción de DHA formando parte de las esfingomielinas y sus derivados antiinflamatorios como las protectinas, produce una reducción de la actividad de las esfingomielinasas, y por consecuencia, una menor activación de las caspasas (79).

En definitiva, existe una gran variedad de familias de mediadores lipídicos producidos a través de diferentes rutas biosintéticas. Cada uno de ellos puede regular una o varias funciones metabólicas relacionadas con la respuesta inflamatoria, lo que se traduce en una respuesta compleja y coordinada. En la **Fig. 14** se esquematizan algunos de los principales mecanismos regulados por los mediadores lipídicos derivados del EPA, DHA y ARA, como son la activación/inhibición de receptores y factores de transcripción, síntesis de citoquinas, fenómenos de competencia entre sustratos por las mismas enzimas, etc.

3.4. Estado del arte del estudio de los mediadores lipídicos

Dada la importancia de estos compuestos, en los últimos años se ha realizado un esfuerzo notable en su estudio. En este sentido, la base de datos de *Scopus* aporta los siguientes datos en relación al volumen y la evolución de los trabajos en los que se estudian los mediadores lipídicos en campos de investigación y trabajo como pueden ser: (1) diferentes enfermedades caracterizadas por un alto grado de inflamación en su desarrollo y/o aparición; (2) enfermedades inflamatorias como son las alteraciones metabólicas y patologías crónicas (MetS, diabetes, CVD, etc); (3) intervenciones nutricionales con PUFAs ω-3 relacionadas con desórdenes metabólicos donde el componente nutricional juega un papel clave en su etiología; (4) y en investigación nutricional relacionada con enfermedades metabólicas en la que se combina el uso de PUFAs ω-3 con otros compuestos con actividad funcional como pueden ser los de carácter antioxidante representados por los polifenoles.

Para realizar este trabajo documentativo, la búsqueda se ha extendido al título, resumen, o palabras clave de las publicaciones. Debido a la gran variedad de mediadores lipídicos y la falta de consenso en su nomenclatura, se han incluído los nombres y siglas más comunes para abarcar la mayor parte de los trabajos relacionados con estos metabolitos. En *Scopus*: TITLE-ABS-KEY (*oxylipin OR eicosanoid OR docosanoid OR resolvin OR protectin OR maresin OR HEPE OR leukotriene OR lipoxin OR EEQ OR EpETE OR thromboxane OR prostaglandin OR isoprostane OR HDoHE OR EDP OR EpDPA OR HETE OR DiHET OR DiHETE OR EET OR EpETrE*). Para acotar la búsqueda a los 4 criterios indicados anteriormente, se ha combinado con otras búsquedas mediante la opción de búsqueda avanzada. En la **Fig. 15** se muestra la evolución del número total de publicaciones por años según los criterios de búsqueda 1-4.

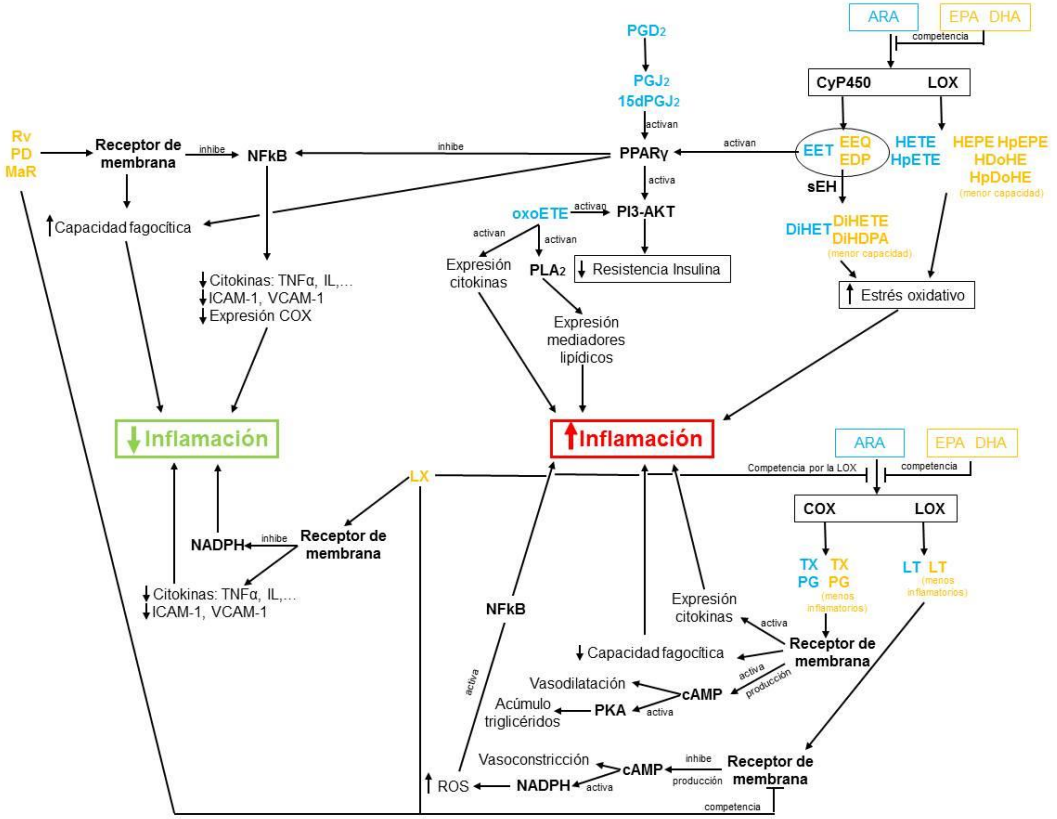


Fig. 14: Regulación de la respuesta inflamatoria mediada por los eicosanoides y docosanoides derivados de los PUFAs ω-3 y ω-6 EPA, DHA y ARA.

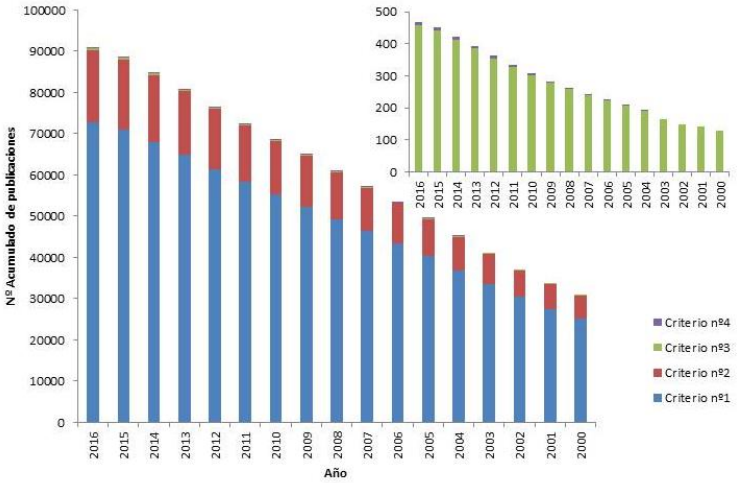


Fig. 15: Evolución del número total de publicaciones acumulado por años desde el 2000 en las que estudian los mediadores lipídicos en relación a enfermedades inflamatorias (Criterio nº 1), alteraciones metabólicas (Criterio nº 2), investigación nutricional con PUFAs ω-3 en un contexto de desorden metabólico (Criterio nº 3), e investigación nutricional con PUFAs ω-3 y polifenoles en un contexto de desorden metabólico (Criterio nº 4). Búsqueda realizada con *Scopus*.

Para obtener los trabajos relacionados con el criterio nº 1 se ha añadido la búsqueda AND TITLE-ABS-KEY (*inflammation OR "metabolic disorder" OR obesity OR "metabolic syndrome" OR diabetes OR "cardiovascular disease" OR cholesterol OR atherosclerosis OR asthma OR "cystic fibrosis" OR cancer OR "liver disease" OR "respiratory disease" OR "renal disease" OR alzheimer OR cirrhosis OR "Crest syndrome" OR "ischemia reperfusion" OR allergy OR arthritis OR "bowel disease" OR psoriasis OR cholitis*), encontrándose un total de 72858 publicaciones desde al año 1960, de las cuales el 68% son artículos de investigación y el 21% son revisiones, el restante de trabajos son capítulos de libro, notas, conferencias, etc. Del total de publicaciones, el 68% pertenecen al ámbito de la medicina, el 31% a la bioquímica, el 20% a farmacia, y el resto se enmarcan en los campos de la química, inmunología, ingeniería, etc.

De un modo similar se ha realizado la búsqueda para obtener los trabajos que cumplen el criterio nº 2. En este caso se ha añadido la búsqueda AND TITLE-ABS-KEY (*"metabolic disorder" OR obesity OR "metabolic syndrome" OR diabetes OR "cardiovascular disease" OR cholesterol OR atherosclerosis*) encontrándose 17448 publicaciones desde 1966. Los porcentajes de tipo de artículos y áreas de investigación son similares a los encontrados en el criterio nº 1. Para obtener las publicaciones del criterio nº 3, se ha añadido a la búsqueda nº 2 los criterios AND TITLE-ABS-KEY (*nutrition OR diet*) y AND TITLE-ABS-KEY (*EPA OR DHA OR "omega-3 fatty acid"*) obteniéndose 459 trabajos desde 1982, de los cuales el 57% son artículos de investigación y el 30% son revisiones, en las áreas de medicina (73%), bioquímica (34%), biología (19%), farmacia (11%), etc. Finalmente, se ha añadido la búsqueda

AND TITLE-ABS-KEY (*polyphenol OR proantocyanidin*) a los parámetros de búsqueda nº 3 para obtener los trabajos que cumplen con el criterio nº 4, encontrando solamente 9 revisiones y 1 conferencia relacionadas con la combinación de PUFAs ω-3 y polifenoles en la investigación de enfermedades metabólicas.

Como conclusión de estas búsquedas realizadas, parece evidente la participación de los mediadores lipídicos en los procesos de señalización celular que regulan la respuesta inflamatoria. Su estudio en diferentes patologías derivadas de procesos inflamatorios ha experimentado un gran auge. Se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos y rutas reguladas por las diferentes familias de eicosanoides y docosanoides, algunos de ellos se han establecido como biomarcadores de inflamación en diferentes enfermedades, se investiga su aplicación terapéutica, o el uso de fármacos inhibidores/potenciadores de las rutas biosintéticas de determinados mediadores lipídicos en aplicaciones clínicas. Este auge en el número de trabajos e interés por el estudio de los mediadores lipídicos se debe en gran medida al desarrollo experimentado en las últimas décadas de las técnicas de cromatografía líquida y detección por espectrometría de masas.

Sin embargo, el establecimiento de biomarcadores de diagnóstico temprano de las enfermedades inflamatorias no ha sido resuelto todavía. Existen limitaciones instrumentales relacionadas con la estandarización de los métodos de muestreo, el uso de diferentes matrices, la selectividad en el análisis de isómeros, etc. Además, los mecanismos que regulan estos compuestos están interrelacionados e implican en muchas ocasiones la actividad paralela de diferentes familias. Aunque son muchos los trabajos que estudian el perfil de mediadores lipídicos producidos en diferentes contextos, el análisis de un grupo reducido de ellos no permite conocer con claridad los mecanismos y las complejas redes reguladoras implicadas en dichas enfermedades (316). Por ejemplo, una misma enzima puede regular al mismo tiempo la formación de compuestos que promueven y compuestos que resuelven la inflamación.

Por lo tanto, es necesario avanzar en el desarrollo de nuevas plataformas metodológicas que permitan el análisis robusto y preciso del mayor número de compuestos y familias de mediadores lipídicos, para obtener así una imagen lo más amplia posible de las rutas metabólicas moduladas. Resulta fundamental conocer todas sus implicaciones en los procesos de regulación celular y respuesta inflamatoria para poder establecer los efectos saludables de la inhibición o potenciación de las rutas de síntesis de los mediadores lipídicos.

La aplicación de las técnicas Lipidómicas al análisis de mediadores lipídicos en investigación nutricional es muy escasa. El papel de las dietas ricas en PUFAs ω-3 en la modulación del perfil de eicosanoides y docosanoiodes relacionado con el desarrollo/prevención de enfermedades metabólicas representa solamente el 2.6% del total de trabajos de Lipidómica aplicada a enfermedades metabólicas (base de datos de *Scopus*). Considerando el papel de pescado y aceites de pescado en el aporte de EPA y

DHA, puede deducirse la importancia que podría tener el consumo de productos pesqueros en la modulación de las rutas de síntesis de estos compuestos. A pesar del bajo porcentaje que representa el estudio de los mediadores lipídicos en la investigación nutricional, ésta es una subdisciplina de la Lipidómica en crecimiento desde la primera publicación en el año 1982 hasta las más de 450 publicaciones actuales.

Finalmente, no se han encontrado trabajos de investigación en los que se establezca el perfil de mediadores lipídicos asociado al consumo conjunto de PUFAs ω-3 en combinación con otros compuestos bioactivos en contextos de enfermedad metabólica. Existen solamente algunas revisiones del potencial antiinflamatorio de los polifenoles, las rutas metabólicas de mediadores lipídicos que modulan, etc (317,318). Por lo tanto, se trata de un área de investigación todavía por explorar, para poder establecer la posible sinergia en relación a la síntesis de estos compuestos bioactivos y la regulación de los procesos inflamatorios.

3.4.1. Los mediadores lipídicos en relación con diferentes enfermedades inflamatorias y desórdenes metabólicos

A continuación se realiza una recopilación de las principales aplicaciones clínicas relacionadas con procesos inflamatorios en las que se investiga el papel de los mediadores lipídicos. En la **Fig. 16** se muestra un resumen de las principales funciones clínicas relacionadas con estos compuestos.

En relación con las enfermedades respiratorias crónicas, compuestos como el LTB_4 y los prostanoides derivados del ARA se consideran potenciales biomarcadores para su diagnóstico, establecimiento de niveles de severidad, o como herramienta para monitorear la eficacia de diferentes tratamientos. Además, otras familias como los isoprostanos, lipoxinas, HETEs DiHETs, EETs, oxoETEs, etc han sido analizados también en aire exhalado, plasma, orina, fluidos broncoalveolares y saliva en trabajos relacionados con la asbestosis (319,320), diferentes grados de asma (321–325), y obstrucción pulmonar en humanos (326).

Numerosos trabajos han medido los niveles de diferentes familias de mediadores lipídicos en plasma y orina de enfermos de diabetes tipo 2 encontrando un aumento de eicosanoides proinflamatorios como IsoPs, HETEs, EETs, DiHETs, o PGs mientras que los isoprostanos F_2 fueron inversamente correlacionados con la enfermedad (247,249,327–329). Schwartzman et al. (330) analizaron el humor vítreo de pacientes de diabetes con retinopatía. Estos autores correlacionaron la enfermedad con el aumento de la actividad LOX hacia la producción de 5HETE y citoquinas proinflamatorias, y descenso de 15HETE y de los epóxidos antiinflamatorios EET. Interesantemente, observaron la presencia de Rv y PDs del DHA en algunos de los pacientes sanos, aunque no especifican los metabolitos concretos. La detección de Rv y PDs in vivo es todavía hoy uno de los retos de la Lipidómica de mediadores lipídicos. Schwartrzman et al. hipotetizaron que la enfermedad provoca un descenso de DHA en la retina y como

consecuencia, provoca también la desaparición de los mediadores antiinflamatorios. Por lo tanto, se sugiere que la ingesta de DHA puede resultar beneficiosa para mantener el nivel del ácido graso en la retina de los enfermos.

Solamente se ha encontrado un trabajo relacionado con la diabetes tipo 1, en el que se mide un único eicosanoide (LTE_4) en orina de 34 pacientes y se relaciona la enfermedad con el aumento de este metabolito (331).

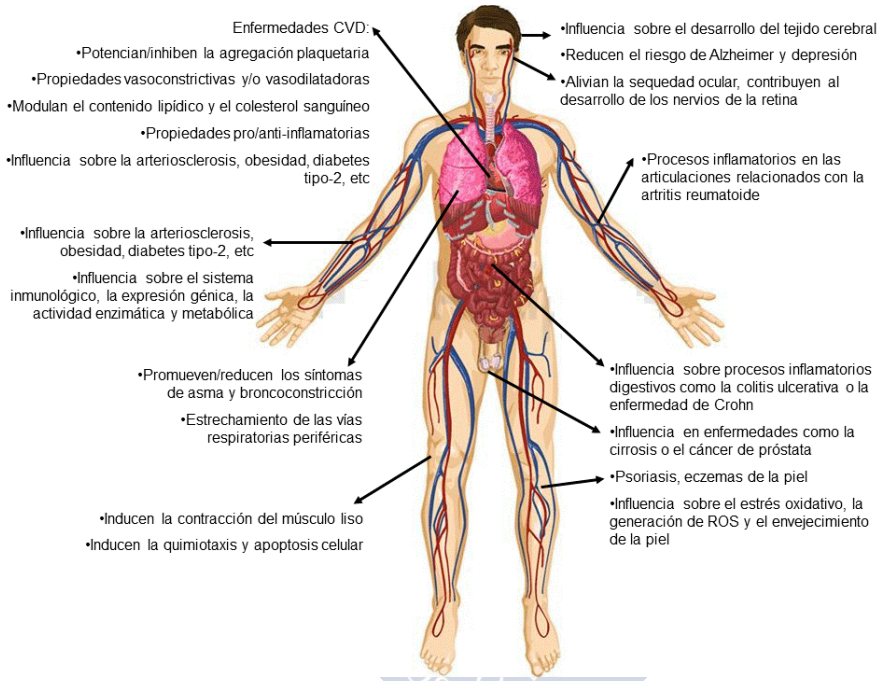


Fig. 16: Principales funciones conocidas sobre la salud humana que desempeñan las familias de eicosanoides y docosanoides derivados de los ácidos grasos ω-3 y ω-6.

Los mediadores lipídicos se han relacionado con diversos tipos de cáncer como el de pulmón (248), colon (332), hígado (270), ovarios (333,334), pecho (335–337), y próstata (266,296,338). También se han estudiado en líneas celulares cancerígenas (339,340). Se han encontrado niveles elevados de LTs, HETEs y PGs, especialmente la PGE_2, LTB_4, 5HETE, 12HETE y 20HETE. Por el contrario, Gleissman et al. (341) encontraron un descenso de Rv y PDs y su precursor 17HDoHE en líneas celulares de neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso. Las Rv y PDs también han sido descritas por su papel inhibidor de los factores de crecimiento en cáncer de próstata (314) y melanoma (315).

Los estudios realizados para determinar el perfil de eicosanoides y docosanoides en enfermedades hepáticas son escasos. Se han encontrado elevados marcadores de estrés oxidativo como los HODEs derivados del LA en plasma de pacientes con

esteatohepatitis no alcohólica (342). También se han correlacionado los niveles de HODEs e IsoPs en plasma y eritrocitos con los niveles encontrados en hígado (343). Aunques son necesarios más estudios, los datos revelan que el perfil de eicosanoides en plasma refleja las condiciones del tejido, consecuentemente el plasma podría ser una matriz diana para establecer biomarcadores en vez de recurrir a biopsias u operaciones más complejas directamente en los órganos.

En relación a la salud cardiovascular, muchos de los mediadores lipídicos han sido descritos por su capacidad de regular el tono vascular (vasodilatadores, trombóticos, antitrombóticos, etc). La arteroesclerosis es una enfermedad inflamatoria relacionada con el tono vascular, caracterizada por un endurecimiento de las arterias, estrechamiento debido a la formación de placas, y aumento de la presión sanguínea que está presente en la mayor parte de las CVD (61). Ha sido correlacionada con el metabolismo lipídico y el perfil de PUFAs, por ejemplo con el aumento de ARA y descenso de EPA y DHA. La formación de placas está acompañada habitualmente de otros factores de riesgo del MetS como la hipertensión, dislipidemia o hiperglicemia. Sin embargo, no son muchos los trabajos que estudian el perfil de mediadores lipídicos en el desarrollo de esta enfermedad coronaria. Mallat et al. (344) y Waddington et al. (84) encontraron niveles elevados de HETEs en extractos de placa de arteroesclerosis, y en otros trabajos también se relacionaron los HETEs y HODEs en plasma con esta enfermedad (345–347). Estos estudios apuntan al ratio entre EET:DiHET como un marcador de inflamación, aumentando esta al catalizarse la transformación de los epóxidos en los correspondientes dihidróxidos.

Los prostanoides derivados del ARA, con elevada capacidad proinflamatoria, han sido muy estudiados en relación a las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, se han relacionado con la hipercolesterolemia (243), reperfusión miocárdica (246), aumento de la hipertensión, obesidad, y arteriosclerosis (249). La sobreproducción de LTs ha sido relacionada con el aumento del riesgo de sufrir infartos (265). Hidróxidos e hidroperóxidos presentan actividad de regulación de la presión y flujo circulatorio, por lo que se han estudiado también en relación a las enfermedades cardiovasculares (293). Por el contrario, las Rv y PDs demostraron efectividad antiinflamatoria beneficiosa en la salud cardiovascular (61).

En enfermedades como la obesidad, no está del todo claro el papel que desempeña la inflamación en el desarrollo de la patología, y su estudio ha surgido recientemente. Referente a los niveles de leucocitos, han sido descritos niveles moderados en sangre en individuos obesos, sin embargo se han observado niveles elevados en el tejido adiposo (348). Por lo tanto, este tejido puede ser una diana para estudiar la inflamación y los mediadores lipídicos en obesidad.

En muchos otros casos, como la artritis reumatoide, asma, o colitis, la inflamación juega un papel central en el desarrollo y evolución de la dolencia. Los individuos con estas enfermedades presentan un aumento de leucocitos en las zonas afectadas, tienen niveles

elevados de marcadores de inflamación, eicosanoides proinflamatorios, etc. Por ejemplo, la expresión de PGE_2 y el LTB_4 aumenta en enfermos de artritis (349) y de inflamación intestinal (263,350), y se cree que actúan como señalizadores químicos contribuyendo a la movilización e infiltración de los leucocitos en el tejido dañado. Por otra parte, existen estudios en los que se evalúa la efectividad antiinflamatoria de las Rv y PDs en enfermos de artritis o colitis (310,311).

Finalmente, otras aplicaciones clínicas en las que se han estudiado los mediadores lipídicos por su influencia en la inflamación que provoca y/o promueve la enfermedad son, por ejemplo, las enfermedades alérgicas como la psoriasis (235) y la rinitis (263), relacionadas con una sobreproducción de prostanoides proinflamatorios y leucotrienos. Los prostanoides han sido relacionados también con el desarrollo de patologías como el Síndrome de Dolor Regional Complejo (242), desórdenes reproductivos (235), o síndrome de Crest (245). Enfermedades neurovasculares como la isquemia se caracterizan por un aumento de la inflamación y de los niveles de hidróxidos como el 20HETE y el 12HETE (351,352).

El papel de los hidróxidos ha sido estudiado también en otras patologías como depresión (294), lesiones de la córnea, o anxiogénesis (188). Estudios recientes investigan el papel antiinflamatorio de algunos mediadores lipídicos como las Rv y PDs en enfermedades neurodegenerativas tipo Alzheimer y Parkinson (86,88), o las lipoxinas en fibrosis (287), periodontitis (288), colitis (290), o tuberculosis (291,292).

3.4.2. Mediadores lipídicos y aplicaciones farmacológicas

Además de su estudio como biomarcadores en diferentes procesos inflamatorios, existe un número cada vez mayor de trabajos en los que se investiga el efecto de diferentes fármacos en la inhibición de las rutas enzimáticas de síntesis de los mediadores proinflamatorios. Existen también trabajos en los que se investiga el uso directo de algunos de estos metabolitos como fármacos. Muchos de los avances recientes en la farmacología antiinflamatoria se basan en el hallazgo de nuevos compuestos capaces de influir en la señalización celular, activar o inhibir factores de transcripción, bloquear rutas biosintéticas inflamatorias, etc.

Los fármacos antiinflamatorios clásicos como los NSAIDs se caracterizan por inhibir la actividad las enzimas COX y LOX que regulan la síntesis de eicosanoides con potente actividad inflamatoria. La aspirina y los corticosteroides son NSAIDs que limitan la producción de prostanoides y leucotrienos inhibiendo la formación de PGH_2 y sus derivados, o bloqueando la liberación de ARA de las membranas, etc (125). Sin embargo, las elevadas dosis requeridas generan efectos secundarios asociados a su toxicidad (26). Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para tratar la inflamación presenta grandes desafíos y resulta de un elevado interés para la comunidad científica.

Una enzima diana para estudiar el efecto antiinflamatorio de nuevos fármacos es la sEH que regula la transformación de los metabolitos epóxido (antiinflamtorios) en dihidróxidos (proinflamatorios) (300). Recientemente, Harris et al. (353) estudiaron el efecto de un inhibidor de la sEH derivado de la urea, TPPU, en ratones con inflamación y fibrosis hepática. Observaron cómo la suplementación con PUFAs ω-3 (60% DHA – 10% EPA) no era eficaz en reducir los niveles de fibrosis e inflamación, mientras que la combinación de PUFAs ω-3 con TPPU si. Lo que indica un efecto beneficioso en la inhibición de esta ruta de síntesis y la producción de los epóxidos ω-3.

De un modo similar, Schmelzer et al. (301) también demostraron el efecto antiinflamatorio de los inhibidores de la sEH derivados de la urea. En un estudio realizado en ratones en los que se indujo un estado de inflamación sistémica mediante lipopolisacáridos, el uso de estos fármacos provocó un aumento de los niveles de EETs, reducción de la concentración de NO y la producción de citoquinas y mediadores lipídicos proinflamatorios. Además, aumentaron los niveles de lipoxinas como la LXA_4 altamente relacionada con la resolución de la inflamación. Otros trabajos revisados por Morisseau et al. (208) correlacionaron el uso de inhibidores de la sEH con efectos analgésicos sobre el dolor inflamatorio, el dolor neuropático, arritmias, hipertrofias cardíacas, efectividad en la reducción de los efectos de la arterioesclerosis e isquemia reperfusión, normalización de los niveles glucémicos alterados y el riesgo de diabetes, etc.

Los clásicos NSAIDs bloquean la actividad de las COXs y LOXs, por lo tanto reducen la síntesis de eicosanoides proinflamatorios pero también inhiben la síntesis de compuestos que resuelven la inflamación. Como alternativa, el uso de sustancias inhibidoras de las sEH parece ser una herramienta igualmente poderosa para el tratamiento de la inflamación sistémica aguda, y su uso combinado con NSAIDs produce efectos sinérgicos (354). Inhiben la síntesis de dihidróxidos involucrados en la señalización celular y la activación del NFkB, con lo que disminuye la síntesis de derivados proinflamatorios de la COX, citoquinas, moléculas de adhesión, etc. Pero además, esta inhibición está acompañada de la producción de mediadores con elevado poder resolutivo, con lo que parecen actuar sobre diferentes niveles de la respuesta inflamatoria. Finalmente, estos fármacos reducen los efectos secundarios asociados a los NSAIDs como la hipertensión y la agregación plaquetaria (208).

Además de la ruta de la sEH, otra de las enzimas más estudiadas en este ámbito es la 5LOX. Esta enzima es responsable de la síntesis de la familia de los LTs. Los LTs contribuyen en numerosas patologías inflamatorias como la rinitis alérgica, asma, artritis reumatoide, IBD (*inflammatory bowel disease*), psoriasis, cáncer, CVD, etc (263,265). Por lo tanto, se han realizado numerosos esfuerzos en desarrollar inhibidores seguros y eficientes para la 5LOX. Uno de los más utilizados es el “zileuton”. Israel et al. (264) demostraron la efectividad de este fármaco para bloquear la síntesis de leucotrienos del ARA en el tratamiento de asma. Sin embargo, entre las principales limitaciones clínicas de estos inhibidores se encuentra su elevada toxicidad hepática y

escasa eficiencia *in vivo* debido al estrés oxidativo acumulado en los tejidos inflamados (355). Además, los leucotrienos resultan esenciales en la defensa inflamatoria contra microorganismos. Estudios en animales bloqueando la codificación de la 5LOX han constatado un aumento de la mortalidad por infecciones (356).

Otros fármacos relacionados con la inhibición de la producción de ciertos mediadores lipídicos son los antipsicóticos. Himmerich et al. (357) estudiaron el mecanismo de actuación de diferentes sustancias antipsicóticas en relación con la síntesis de los tromboxanos TXA_2 y TXB_2. La producción de serotonina y dopamina juega un papel muy importante en la fisiopatología de la esquizofrenia. Se cree que los compuestos antipsicóticos inhiben la activación del receptor de membrana que inicia la síntesis de los tromboxanos que regulan la producción de estas hormonas. En este trabajo, observaron la reducción de los niveles de TXA_2 y TXB_2 en pacientes tratados con diferentes fármacos antipsicóticos. Además, los efectos secundarios de estos fármacos como la agregación plaquetaria o la vasoconstricción se asocian a su actuación sobre la producción de estos mediadores lipídicos.

Finalmente, los mediadores lipídicos también son sintetizados y administrados como fármacos para el tratamiento de procesos inflamatorios. Destaca el uso de las lipoxinas, resolvinas, protectinas y epóxidos. Konkel et al. (358) demostraron el potencial anti-inflamatorio en un modelo animal de infarto de miocardio al administrar 17,18-EEQ sintético. Ringholz et al. (359) observaron en modelos celulares y animales de fibrosis pulmonar, que el tratamiento con RvD_1 reduce significativamente la secreción de IL-8 y aumenta la capacidad fagocítica de los macrófagos, con lo que mejora el estado sistémico de inflamación asociado a la enfermedad. El uso farmacológico de análogos de la LXA_4 ha resultado ser beneficioso en diferentes modelos de inflamación (288,290).

3.4.3. Los mediadores lipídicos en la investigación nutricional

Desde los primeros estudios en las poblaciones esquimales, numerosos trabajos han confirmado efectos beneficiosos sobre la salud debido al consumo de pescado y aceites de pescado, ricos en PUFAs ω-3 como el EPA y DHA. Sin embargo, poco se conoce todavía sobre el efecto de una intervención nutricional con PUFAs ω-3 sobre la producción de los mediadores lipídicos y la influencia en los procesos inflamatorios y desórdenes metabólicos. Se cree que una "nutrición antiinflamatoria" puede interactuar con las mismas dianas y rutas metabólicas que las drogas antiinflamatorias como los NSAIDs sin provocar sus efectos secundarios.

A nivel mecanístico, existen evidencias sustanciales de que el aumento del contenido de EPA y DHA en las membranas y el descenso de ARA, resulta en un cambio en el patrón de producción de mediadores lipídicos hacia las series ω-3 menos inflamatorias o incluso antiinflamatorias (360). Estudios realizados en líneas de leucocitos humanos demuestran una disminución de los niveles de los prostanoides y leucotrienos de la serie

2 del ARA al enriquecer sus membranas en EPA y DHA en (361–364). Además, se observó en estas líneas celulares una disminución de la respuesta química hacia los metabolitos proinflamatorios, y una menor generación de interleuquinas, TNFα, etc.

Diferentes estudios nutricionales llevados a cabo en humanos y animales mostraron la eficacia terapéutica del consumo de EPA y DHA en las enfermedades inflamatorias al disminuír niveles de eicosanoides proinflamatorios derivados del ARA como, por ejemplo, la PGE_2 (365–367). Otros eicosanoides con potente actividad proinflamatoria como el TXA_2 y el LTB_4 también son menos producidos al consumir EPA y DHA en enfermos de artritis reumatoide (368) y en enfermos con inflamación intestinal crónica (369).

Algunos ejemplos de intervenciones nutricionales en individuos sanos muestran también el efecto antiinflamatorio de una dieta enriquecida con EPA y DHA. Caughey et al. (370) limitaron el consumo de pescado y fármacos NSAIDs para evaluar el efecto del consumo de un suplemento aceite de pescado (EPA:DHA 3:2) sobre diferentes parámetros inflamatorios. Observaron un descenso de la IL-1, TNFα y los eicosanoides proinflamatorios PGE_2 y TXB_2 después de 4 semanas con una dosis muy elevada de 9 g/día. Este descenso se correlacionaba con un incremento significativo de EPA y DHA en la composición de los monocitos en sangre. Trebble et al. (371) observaron también una disminución de interleuquinas y PGE_2, así como una mayor proliferación de leucocitos en sangre, después de 12 semanas de un estudio nutricional con individuos sanos tomando una dosis de hasta 2 g/día de EPA y DHA. Este efecto antiinflamatorio del suplemento de EPA y DHA no se vió modificado al combinar antioxidantes en la dieta como el tocoferol, vitamina A y ácido ascórbico.

En estos trabajos, el número de metabolitos analizados se reduce a los principales prostanoides y leucotrienos ω-6. Con la mejora de los métodos de análisis y el conocimiento cada vez mayor de las diferentes familias de mediadores lipídicos así como de las funciones biológicas que modulan, los trabajos más recientes abarcan el estudio de un perfil más amplio de metabolitos que pueden ser modulados por la dieta. Brahmbhatt et al. (60), determinaron el efecto protector frente a la inflamación intestinal en ratas alimentadas con un suplemento de EPA y DHA. Observaron cómo la intervención nutricional conseguía modular marcadores específicos de inflamación y estrés oxidativo como el 17,18EET, TXB_3, $8isoPGF_{3\alpha}$, PGE_2, LTB_4, PGD_2, Trioxilin A_3 y B_3 hacia una situación más antiinflamatoria y antioxidante. McDaniel et al. (59) sugieren que la ingesta de EPA y DHA puede modular el perfil de mediadores lipídicos y los niveles de leucocitos, creando un ambiente más reparador y antiinflamatorio en los fluídos producidos en las heridas. Entre los compuestos analizados se encuentran el 15-HETE, TXB_2, 5-HEPE, 12-HEPE, 15-HEPE, PGD_3, PGE_3, TXB_3, 18-HEPE, etc.

La influencia de la dieta en el perfil de los mediadores epóxido e hidróxido del ARA, EPA y DHA ha sido evaluado por Arnold et al. (372) en ratas alimentadas con una dieta rica en PUFAs ω-6 y una dieta rica en EPA:DHA. Estos autores observaron cómo la

dieta ω-3 modula el perfil de PUFAs en diferentes tejidos hacia una mayor proporción de EPA y DHA y menor ARA. En consecuencia, la competencia de sustratos por la CyP450 produce un aumento de los EEQ y EDP derivados del EPA y DHA y un descenso de EET del ARA. También la producción de hidróxidos se ve modulada hacia un aumento de los derivados 20HEPE y 22HDoHE ω-3, mientras que disminuye el 20HETE ω-6. Westphal et al. (373) correlacionaron este cambio en el perfil de los productos de la CyP450 con una mejora de la salud cardiovascular.

El elevado potencial antiinflamatorio de las Rv, PDs, y lipoxinas ha hecho que, desde su reciente descubrimiento, estos metabolitos sean el objetivo de numerosas investigaciones ya que representan una oportunidad farmacológica para revertir procesos inflamatorios a situaciones de normalidad. Debido a su baja concentración y a que se trata de compuestos sintetizados en momentos concretos del proceso inflamatorio, su detección *in vivo* es un gran desafío. Recientemente, se han detectado en la leche materna niveles hasta 100 veces superiores a los niveles de plasma para la LXA_4 y la RvD_1, y 10 veces superiores para la RvE_1 (374). Se cree que desempeñan una función importante en el desarrollo inmunológico de los bebés, y por eso, los bebés lactantes sufren menos enfermedades inflamatorias que los que no los son. Sin embargo, todavía se necesitan más estudios para determinar los niveles de estos metabolitos en otras matrices en individuos sanos y en diferentes patologías inflamatorias. Además, el efecto de una dieta rica en los precursores EPA y DHA en su biosíntesis resulta de gran interés debido a sus posibles beneficios, y puede ofrecer información acerca de los mecanismos implicados en los beneficios de las dietas ricas en PUFAs ω-3.

Intervenciones nutricionales con EPA y DHA en ratones modificados para desarrollar colitis e inflamación crónica en el intestino han encontrado un aumento en la síntesis de resolvinas y protectinas (132). Mas et al. (375) identificaron por primera vez en 2012, los precursores 18HEPE y 17HDoHE, y sus derivados RvD_1, RvD_2, PD_x, y PD_1 en plasma humano de 20 voluntarios sanos después de una intervención nutricional con EPA y DHA durante 3 semanas. La dosis del suplemento administrado consistía en 1.4 g de EPA y 1 g de DHA diarios. Mediante el análisis por SPE-LC-MS/MS detectaron los precursores por encima del LOD (3 pg en columna) y en menor concentración las resolvinas, y por debajo del LOD las protectinas que no pudieron ser cuantificadas. Interesantemente, las concentraciones encontradas están en el rango descrito para el cual estos metabolitos presentan bioactividad en modelos animales y modelos *in vitro* (375).

No sólo los suplementos de EPA y DHA, también otros ingredientes funcionales han sido descritos por su capacidad de modular el perfil de mediadores lipídicos. González-Peña et al. (376) en un trabajo recientemente publicado, observaron una modulación del perfil de mediadores lipídicos en plasma e hígado hacia una situación menos inflamatoria y mejora vascular debido al consumo de cebolla en ratas con colesterolemia inducida por la dieta. La intervención redujo la formación de PGs en el hígado y aumenta la producción de lipoxinas ω-3, lo que sugiere la activación de mecanismos de resolución de la inflamación. Los compuestos fenólicos de la cebolla y

el ajo han sido relacionados con una actividad antiinflamatoria modulando la actividad de la COX-1 y la LOX (377), e inhibiendo la cascada de formación de eicosanoides proinflamatorios del ARA (378).

La relación entre la duración de los tratamientos y el efecto beneficioso sobre la respuesta inflamatoria, no es un factor estandarizado todavía. Otros factores como la dosis administrada o la edad de los individuos parecen tener más peso. También el tipo de desorden metabólico o factores genéticos pueden influir en la efectividad de la ingesta de PUFAs ω-3. Diferentes intervenciones nutricionales que van desde las 14 semanas hasta los 3 años en enfermos de artritis reumatoide han mostrado una reducción de mediadores proinflamatorios (368,379,380). En otras dolencias como la inflamación intestinal también se observó este descenso en humanos después de 12 meses de tratamiento con EPA (4-5 g/día) (369) o 2 meses con 2 g/día EPA (381), o en ratones después de 3 semanas (60). En el líquido producido en las heridas los niveles de metabolitos inflamatorios disminuyeron después de 28 días de suplemento con EPA y DHA (59).

Rees et al. (382) evaluaron el efecto de la ingesta de EPA durante 12 semanas sobre el sistema inmune en hombres sanos analizando, entre otros parámetros, la PGE_2. Observaron una dependencia de los resultados con la dosis suministrada (1.3, 2.7, o 4 g/día) y con la edad de los individuos. El aumento de la dosis de EPA en la dieta produjo un aumento en la incorporación de este ácido graso a los fosfolípidos de membrana de los monocitos analizados en sangre. Además, la incorporación fue mayor en los individuos de más edad. El aumento en la proporción de EPA se correlacinó con un descenso en la producción de la PGE_2. Resultados similares fueron obtenidos en mujeres sanas mediante una dosis de 2.4g/día durante 12 semanas. Se observó una disminución de los niveles de PGE_2, IL-6, IL-1, TNFα y nuevamente este efecto fue más significativo al aumentar la edad de los individuos (383).

Según la revisión realizada por Massaro et al. (61) en 2008, la dosis mínima para conseguir efectos antiinflamatorios como la modulación de la actividad de las COXs, producción de citoquinas, factores de transcripción, o producción de mediadores bioactivos como las Rv y PDs, es de 3g/día o superior de EPA y DHA. Calder et al. (348) en 2015 establecieron la dosis mínima para ver efectos antiinflamatorios en 2g/día de EPA y DHA.

Por lo tanto, parece evidente que la síntesis de los mediadores lipídicos puede ser modificada en respuesta a estímulos nutricionales. Sin embargo, la modulación de la respuesta inflamatoria no siempre se correlaciona con beneficios observables para la salud en otros parámetros de la enfermedad estudiada. Por ejemplo, la mayoría de los ensayos nutricionales con enfermos de artritis reumatoide sometidos a meta-análisis muestran beneficios clínicos con significancia estadística robusta. Sin embargo, en otras afecciones inflamatorias como la IBD o asma, los efectos antiinflamatorios observados y los beneficios medidos sobre la mucosa intestinal, histología, descenso en el uso de

corticoides, mejora de la función pulmonar, etc son inconsistentes, por lo que los resultados del meta-análisis concluyen que no existe evidencia de la eficacia de la ingesta de PUFAs ω-3 en estas dolencias, a pesar de la mejora inflamatoria (348). Por lo tanto, es necesario profundizar más en los mecanismos de acción de los mediadores lipídicos y conocer sus efectos en otros contextos metabólicos menos estudiados para poder optimizar estrategias nutricionales terapéuticas efectivas, así como disponer de robustas y sensibles metodologías de análisis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. METODOLOGÍA

Este epígrafe está dedicado a la Metodología empleada para el desarrollo de esta tesis doctoral. Se han puesto a punto técnicas de tratamiento de muestra y determinación analítica en el ámbito de la Lipidómica con el objetivo de estudiar los mediadores lipídicos en modelos animales de alteraciones metabólicas. Además, para el estudio de la absorción intestinal de ácidos grasos se utilizan modelos *in vitro:* el digestor gastrointestinal TIM-1 y las líneas celulares Caco-2.

Se describe brevemente el fundamento de las técnicas, así como los modelos animales y dietas utilizadas. Además, se realiza una revisión bibliográfica acerca de las diferentes técnicas y metodologías utilizadas a lo largo de la historia para el análisis de mediadores lipídicos. Se presenta un análisis detallado de los trabajos realizados en Lipidómica mediante SPE-LC-MS, destacando las ventajas e inconvenientes de los diferentes modos de trabajo, equipos utilizados, etc. Finalmente se plantean los nuevos retos y dificultades que aborda la Lipidómica de mediadores lipídicos, y se realiza una revisión bibliográfica de los principales trabajos de oxidación gastrointestinal y absorción de lípidos mediante modelos *in vitro*.

4.1. Lipidómica

4.1.1. Introducción: la Lipidómica en el conjunto de técnicas *ómicas*

Las disciplinas conocidas como *ómicas* son la Genómica, la Proteómica, la Transcriptómica y la Metabolómica (**Fig. 17**). Todas ellas han experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas gracias a los avances tecnológicos y las nuevas técnicas de determinación e identificación. La Genómica estudia la secuenciación del ADN de los seres vivos. La Transcriptómica analiza el ARN presente en una célula, tejido u organismo e informa sobre qué genes se están expresando. La Proteómica estudia el perfil proteico resultado de la expresión génica, y también las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas por múltiples causas. Y finalmente, la Metabolómica se ocupa del estudio de todas las moléculas de bajo peso molecular: intermediarios del metabolismo, hormonas, moléculas de señalización, y metabolitos secundarios. Las técnicas *ómicas*, además de ayudar a entender la complejidad de los procesos celulares y las respuestas fisiológicas de los organismos a su entorno, también se utilizan para la búsqueda de marcadores de determinadas enfermedades, el desarrollo de mejores tratamientos, etc.

La Lipidómica es , una sub-disciplina de la Metabolómica definida como el estudio a larga escala y la caracterización detallada de los metabolitos lipídicos, sus interacciones, y la influencia en los sistemas biológicos (384). Uno de los objetivos de la Lipidómica es relacionar las composiciones lipídicas de los sistemas biológicos con sus funciones biológicas en cuanto a la expresión de los genes y el metabolismo. La estrategia subyacente en la lipidómica supone el aislamiento de las muestras biológicas, y la extracción, fraccionamiento y caracterización de las diferentes familias de lípidos.

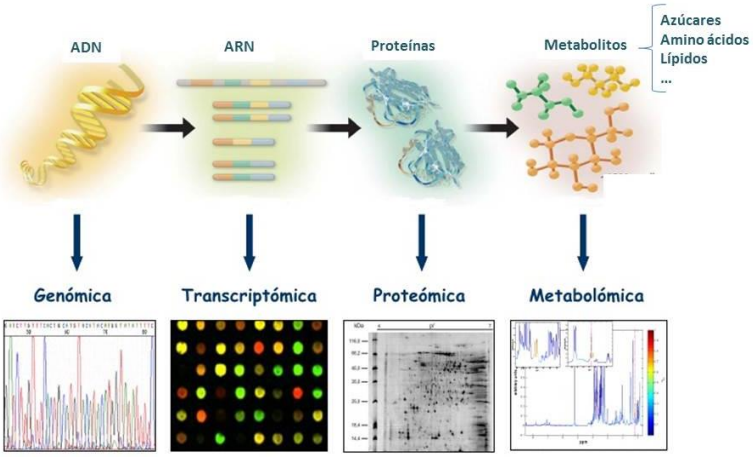


Fig. 17: Las disciplinas *ómicas*: genómica, transcriptómica, proteómica, y metabolómica.

El desarrollo que ha experimentado la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en los últimos años ha supuesto un gran avance en la Lipidómica aplicada al estudio de los mediadores lipídicos, conocidos como eicosanoides y docosanoides derivados de los principales PUFAs ω-3 y ω-6. Como se ha descrito anteriormente, estos mediadores lipídicos constituyen una amplia familia de compuestos bioactivos con estructuras y propiedades físico-químicas muy similares. Además, los bajos niveles fisiológicos de concentración *in vivo* y la presencia de un elevado número de isómeros hacen que su identificación y cuantificación sea todo un desafío desde el punto de vista analítico (385). Es por ello que la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, debido a su elevada selectividad y sensibilidad, ha sido adoptada como la técnica por excelencia para la determinación de estos compuestos (386).

4.1.2. Lipidómica aplicada al análisis de mediadores lipídicos

4.1.2.1. Principales técnicas de preparación de muestra

En la inmensa mayoría de los procedimientos analíticos es preciso "preparar" la muestra previamente a la determinación de los compuestos buscados. Esto consiste en extraer los analitos de la matriz, eliminar las posibles interferencias y disolver los compuestos en un medio compatible con la técnica de determinación. Además, cuando se trata de elementos traza o en concentraciones muy bajas como es el caso de los mediadores lipídicos, esta etapa previa permite concentrarlos mejorando la sensibilidad global del método. Sin embargo, entre las principales dificultades de esta etapa destacan el alto riesgo de cometer errores y el aumento del tiempo global de análisis (387). Las técnicas de preparación de muestra más utilizadas para la extracción de mediadores lipídicos de diferentes matrices son la Extracción Líquido-Líquido (LLE) y la Extracción en Fase Sólida (SPE).

Previo a la extracción, las etapas de recolección y almacenamiento de la muestra son críticas para el correcto análisis de los mediadores lipídicos. Los procesos de oxidación mediada por radicales libres pueden ocurrir en cuestión de segundos a temperatura ambiente, dando lugar a la formación de mediadores lipídicos diferentes a los de la muestra original. Consecuentemente todo el proceso de recolección debe hacerse en frío, y las muestras deben ser almacenadas a – 80º C hasta su análisis (388). Además, la actividad residual de las enzimas sobre los ácidos grasos en muestras de plasma, puede modificar asimismo el perfil de eicosanoides y docosanoides. Este problema puede ser minimizado añadiendo AEDT en el momento de la colección, un anticoagulante que secuestra los iones calcio e inhibe la actividad de la fosfolipasa A_2 (PLA_2). Como se ha descrito anteriormente, la PLA_2 es la primera enzima que actúa liberando los ácidos grasos de las membranas que posteriormente son metabolizados por LOX, COX, y CyP dando lugar a los mediadores lipídicos (389).

A. Extracción Líquido-Líquido

La LLE es una de las técnicas tradicionalmente empleadas para la extracción y/o preconcentración de lípidos. Uno de los protocolos más usados consiste en el uso de cloroformo-metanol propuesto por Bligh and Dyer (390). Sin embargo, otras extracciones alternativas al uso de cloroformo han sido propuestas para mediadores lipídicos usando éter (391), acetona-cloroformo (392), hexano-isopropanol (393), o mezclas de acetato de etilo-etanol y acetato de etilo-hexano para diversos tejidos y fluídos biológicos (394). La LLE ha sido validada para la extracción de mediadores lipídicos de muestras biológicas tales como orina (395,396), tejido cerebral (392,397), o cultivos celulares (391,394).

B. Extracción en Fase Sólida

La SPE es el método más utilizado para la extracción y concentración de mediadores lipídicos debido a su mayor selectividad y capacidad de concentración de los analitos, y menor manipulación de muestra y gasto de disolventes. Además, ambas metodologías, LLE y SPE, pueden ser combinadas para maximizar la purificación de muestras especialmente complejas y reducir así problemas de efecto matriz en el análisis posterior por LC-MS (235,328,398–400).

El fundamento de la técnica consiste en la retención selectiva de los analitos de interés de una matriz acuosa para posteriormente eluirlos con un disolvente compatible con el procedimiento de detección. Se utiliza como etapa previa de concentración, elimina interferencias de la matriz, fracciona los analitos e incluso los puede derivatizar (401,402). Las principales etapas en la realización de una SPE son el pretratamiento de la muestra, acondicionamento del adsorbente, paso de muestra, lavado, secado y elución selectiva de los analitos (**Fig. 18**).

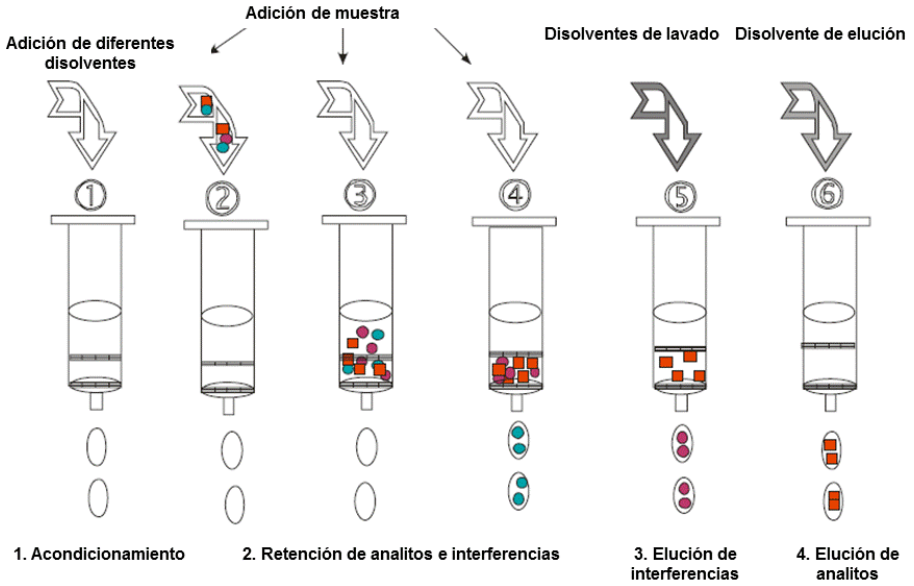


Fig. 18: Etapas en la realización de una SPE (403)

Los dispositivos más usados de SPE para la extracción de mediadores lipídicos son los cartuchos que tienen empacado en el extremo, un adsorbente selectivo. Estos adsorbentes están hechos a base de sílice enlazada (235,249,404) o copolímeros de estireno-divinilbenceno (255,405,406). La matriz de la muestra tiene que estar en forma líquida (puede ser necesaria una extracción preliminar a un disolvente selectivo). Ésta pasa a través de la fase estacionaria que, generalmente, tiene mayor afinidad por los analitos, los cuales quedan retenidos mediante interacciones de Van der Waals e interacciones dipolo-dipolo por un mecanismo de fase reversa.

- ✓ **SPE para la extracción de mediadores lipídicos**

Los eicosanoides y docosanoides son compuestos presentes en muy bajas concentraciones en los tejidos y fluidos biológicos. Por lo tanto, la preparación de muestra es crucial para la obtención de buenos resultados. Dado que muchos de los mediadores lipídicos son inestables a temperatura ambiente, todo el **proceso de pretratamiento** y extracción debe realizarse en frío siempre que sea posible. El uso de antioxidantes como BHT (*butylated hydroxytoluene*) puede minimizar reacciones no-enzimáticas de oxidación de los compuestos (407).

Un factor importante a tener en cuenta es el **tipo de matriz** a analizar. Previo a la SPE, es necesario realizar un pre-tratamiento de la muestra para solubilizar los mediadores lipídicos en un disolvente selectivo y eliminar tensioactivos, proteínas, sales, etc. La etapa previa a la SPE difiere si tratamos muestras líquidas como plasma u orina, o muestras sólidas como hígado, cerebro, riñón, tejido adiposo, etc. Las muestras líquidas

se incuban en una disolución metanólica y posteriormente se centrifugan para precipitar restos proteicos. El sobrenadante se puede acidificar y añadir a los cartuchos de SPE. Las muestras de tejido tienen una mayor probabilidad de provocar supresión iónica por efecto matriz y pueden contaminar el sistema de detección. Por lo tanto, la cantidad de muestra no debe exceder los 200 mg (74). Previo a la centrifugación, estas muestras son homogeneizadas en solución metanólica mediante métodos físicos como un mortero (74), ultra-turrax (408), o extracción asistida por ultrasonidos (407,409).

Durante el **acondicionamiento** de los cartuchos, el pH puede desempeñar un papel importante. Los disolventes más usados para adsorbentes de base de sílice son el agua y un disolvente orgánico como metanol (188,235,249,406,410). Su función es la de solvatar y desempacar las cadenas hidrofóbicas mediante el disolvente orgánico, e hidratar los grupos silanol mediante el agua para mejorar las interacciones con los analitos. En medios relativamente ácidos, se consigue un mayor grado de protonación de los grupos silanol, por lo que aumenta la capacidad retentiva de los analitos más polares.

Los mediadores lipídicos son compuestos con polaridad moderada, por lo que las aplicaciones encontradas en bibliografía, o bien utilizan pH neutro (188,235,249,406,410) o bien utilizan pH entre 4 y 5 con la adición de ácido fórmico (255,405,411). En ambos casos se obtienen porcentajes de recuperación similares. Sin embargo, es importante tener en cuenta el pH en función del adsorbente seleccionado. Los cartuchos convencionales de sílice, C-18, tienen un rango de pH de trabajo menor que los adsorbentes poliméricos. Es por ello que los trabajos encontrados que utilizan cartuchos C-18, realizan en su mayoría la extracción en condiciones de neutralidad (188,235,249,404), mientras que los realizados con cartuchos poliméricos realizan la extracción a pH neutros (406) y ácidos (405,411).

Para poder realizar una SPE reproducible y efectiva se debe seleccionar un **adsorbente** adecuado en función de las características físico-químicas de los compuestos (polaridad, carga, cadenas carbonadas, grupos funcionales, estabilidad, etc) y la matriz en la que se encuentran (acuosa, orgánica, fuerza iónica, pH, etc). Es importante tener en cuenta el grado de retención del adsorbente pero también su selectividad, para conseguir una retención fuerte de los analitos de interés y bajos factores de retención para las interferencias.

La extracción de eicosanoides y docosanoides se realiza por fase reversa, por lo tanto las fases estacionarias más utilizadas son los adsorbentes de sílice C-18 y los polímeros de poliestireno-divinilbenceno. Entre las principales ventajas de estos últimos frente a los de sílice destacan: (a) su elevada reproducibilidad, (b) su capacidad de aislar analitos con un mayor rango de polaridades, y (c) su mayor capacidad de retención para compuestos más polares, como algunos mediadores lipídicos, debido al gran número de grupos aromáticos que establecen interacciones dipolo-dipolo con los compuestos.

Sin embargo, no siempre es positivo aumentar la fuerza de retención de la SPE ya que puede ir en detrimento de la selectividad. El aumento de componentes de la matriz coeluyendo con los analitos de interés, es un factor de riesgo para la supresión iónica en la fuente de ionización del detector de masas (efecto matriz), y por lo tanto, puede disminuir la sensibilidad del método. Como se muestra en la **Tab. 6**, no existen grandes diferencias respecto a la recuperación global del método para los mismos grupos de mediadores lipídicos usando diferentes adsorbentes como son los de sílice C-18, o poliméricos Oasis HLB y Strata X.

Una etapa importante en la optimización del proceso de extracción, es el análisis de la **capacidad de carga** de los cartuchos y el **volumen de rotura** de los mismos. Esto es, la cantidad de muestra que se puede concentrar sin que eluya ninguno de los compuestos. Además, el uso de uno o varios disolventes de **lavado**, no selectivos para los compuestos de interés pero que sirven para eluír otros elementos interferentes, puede ayudar a purificar los extratos y reducir el posterior efecto matriz. Generalmente se utiliza agua bajo las mismas condiciones de pH para evitar la elución prematura de los analitos, y algún disolvente orgánico. Referente al disolvente de **elución**, se debe usar el eluyente más selectivo, optimizando el volumen necesario para la elución total de los compuestos.

Finalmente, los **extratos** obtenidos son evaporados y redisueltos en un disolvente compatible con la técnica de detección y en un volumen conocido para poder cuantificar los compuestos. Este proceso suele realizarse a través de una fina corriente de nitrógeno o mediante concentradores a vacío. Se trata de una etapa importante en la recuperación global de los analitos más inestables (316). En algunos trabajos, con el objetivo de prevenir la degradación durante la evaporación se ha propuesto la adición de pequeños volúmenes de un disolvente orgánico con elevado punto de ebullición como el glicerol (410,412). Otros trabajos han desarrollado aplicaciones de SPE en línea con LC-MS como técnica de detección (413–415).

Compuestos	Adsorbente	Acondicionamento	Matriz	Lavado cartuchos	Elución	%Rec.	Ref.
PGE1, PGE2, 8isoPGF2α	C18 (100mg/1mL)	Cl_2CH_2:MeOH(1:1) + MeOH30%	Orina	MeOH 30%	Cl_2CH_2:MeOH (1:1)	80-84%	(404)
HEPE, HETE, HODE, LTB4, RvD1, RvE1, PD1	C18 (500mg/6mL)	MeOH + Agua	Cerebro, hígado, plasma	MeOH 15%, Agua, Hexano	Metanoato metílico	76-122%	(188)
PGD1, PGE1 PGF1α, PGB2, PGD2, PGE2 PGF2α, PGD3, PGE3, PGF3α TXB2, TXB3 etc	C18 (500mg/6mL)	MeOH + Agua	Cerebro, hígado, plasma	MeOH15%, Agua, Hexano	Metanoato metílico	83-116%	(235)
PG, TX, HETE, HEPE, LT, EET, HDoHE, Rv, PD	C18 (100mg/1mL)	MeOH + Agua	Cultivo celular	Agua, Hexano	MeOH		(416)
IsoP, PG	Strata X (100mg/3mL)	MeOH + Agua	Orina		MeOH 80% (HAc 1%)	80-100%	(417)
PG	Oasis HLB (60mg/1mL)	MeOH, Agua, ACN	Orina	ACN 5%	ACN		(418)
PG, EET, DiHETE, HETE	Oasis HLB (60mg/1mL)	MeOH, Agua, Acetona, Hexano	Cerebro	MeOH 10%, Agua	ACN	67-117%	(409)
PGF2α, PGF1α, TXB2 PGE, PGF	Strata X (100mg/3mL)	MeOH:FA 98:2+Agua	Orina	Agua, MeOH 25%, ACN	MeOH	93-107%	(255)
PGF2α, PGF1α, TXB2 PGE, PGF	C18 (200mg/6mL)	MeOH:FA 98:2+Agua	Orina	Agua, MeOH 5%, Hexano	Acetato de Etilo	59-67%	(255)
122 eicosanoides diferentes familias	Strata X (60mg)	MeOH, Agua	Plasma	MeOH 10%	MeOH		(419)
PGF2α, PGF1α, TXB2 PGE, PGF	Oasis HLB (200mg/6mL)	MeOH:FA 98:2+Agua	Orina	HCl 0.1M, MeOH 5%, Hexano	MeOH	60-71%	(255)

(continúa)

Compuestos	Adsorbente	Acondicionamento	Matriz	Lavado cartuchos	Elución	%Rec.	Ref.
PG, TX, HETEs, LT, etc	Intercambio iónico	MeOH + Agua	Células	MeOH 10%	MeOH	25-100%	(410)
PG, TX	Strata X (500mg/6mL)	MeOH, Agua	Plasma, cultivos celulares	Agua, MeOH 15%, hexano	Formiato de Metilo		(74)
8isoPGF2α	Oasis HLB (30mg)	MeOH + Agua	Orina	HCl 0.1M, MeOH 5%, Hexano	MeOH	86%	(406)
PGF2α, TXB2	C18 (200mg/6mL)	MeOH + Agua	Orina	Agua, MeOH 5%, Hexano	Acetato de Etilo		(249)
PGF2α	Strata X (100mg/3mL)	MeOH:FA 98:2+Agua	Orina	Agua, MeOH 25%, ACN	MeOH		(411)
Eicosanoides ω6	Oasis HLB (60mg/1mL)	AcEt, MeOH, Agua:MeOH 95:5	Plasma	Agua:MeOH95:5 + 0.1%Acético	MeOH + AcEt	88-127%	(405)
EETs	Oasis HLB	MeOH + Agua	Arterias		Acetonitrilo		(408)
DiHETE, HETE, EET, HpETE, LT, LX, PG, TX	Oasis HLB (60mg/3mL)	MeOH + Agua	Plasma		Acetato de Etilo	45-84%	(221)
PG, TX, HETE, EET, HDoHE, PD, DiHETE, LX, HETrE, LT	C18 ODS (500mg)	MeOH + Agua	Tejido córnea	Agua, Hexano	MeOH		(420)
DiHETE, HETE, EET, oxoETE, LX, PG, TX	Oasis HLB	MeOH, Agua, Acetato de Etilo	Plasma	MeOH 5% (0.1%HAc)	Acetato de Etilo	88-127%	(405)
158 Eicosanoides y docosanoids del ARA, EPA, DHA, DGLA y otros	Strata X (100mg/3mL)	MeOH + Agua	Plasma	MeOH 10%	MeOH	54-112%	(421)

Tab. 6: Recopilación bibliográfica de los principales adsorbentes utilizados, condiciones de acondicionamiento, lavado, y elución de los cartuchos de SPE para la extracción de mediadores lipídicos de diferentes matrices líquidas y sólidas. Se muestran los porcentajes de recuperación global obtenidos bajo estas condiciones.

4.1.2.2. Principales métodos de determinación

A. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Las técnicas de inmunoensayo utilizan enzimas como anticuerpos selectivos para la cuantificación de los analitos (antígenos). Fueron las primeras técnicas utilizadas en el ámbito de la Lipidómica para determinar y cuantificar eicosanoides (243,422,423). Sin embargo, estas técnicas requieren el uso de anticuerpos específicos para cada compuesto y solamente cuantifican uno de cada vez por lo que resultan ser métodos costosos e ineficientes. Inicialmente, los análisis *in vivo* estaban dirigidos solamente a unos pocos eicosanoides de los cuales existían anticuerpos específicos como la PGE_2 y el LTB_4, con el inconveniente de obviar la información de otros potentes mediadores lipídicos de la inflamación producidos en esas mismas rutas metabólicas.

Es el caso del trabajo realizado por Blaho et al. (424) en el que determinaron la contribución de la enzima COX-2 en la regulación de la respuesta inflamatoria en un modelo animal de ratón con artritis inducida. Para el estudio de la actividad enzimática midieron dos de sus principales metabolitios, las prostaglandinas PGE_2 y PGJ_2, usando para ello kits comerciales de ELISA. Observaron una correlación directa entre la actividad enzimática y la resolución de la inflamación. Sin embargo, además de estas prostaglandinas, otros muchos mediadores lipídicos están implicados en el proceso inflamatorio y no pueden ser detectados mediante tests de inmunoensayo. La determinación de marcadores de estrés oxidativo en orina como los isoprostanos ha sido realizada en el pasado mediante ELISA (425,426). Sin embargo, una limitación de esta técnica es la dificultad para producir anticuerpos específicos capaces de discriminar entre diferentes isómeros.

B. Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (GC-MS)

Mediante la GC-MS se superaron las limitaciones de las técnicas de inmunoensayo y se pudo realizar el análisis simultáneo de múltiples compuestos. Varios trabajos han utilizado la GC-MS para la determinación de la familia de los isoprostanos, prostaglandinas y tromboxanos, y mediadores lipídicos no enzimáticos derivados del ARA (427,428). Gopaul et al. (247) analizaron 8iso-PGF_2 en individuos sanos y enfermos de diabetes no insulino-dependientes. Para ello, derivatizaron las muestras de plasma formando pentafluorobencil-ésteres y trimetilsilil-éteres de los derivados lipídicos para su posterior análisis por GC-MS con ionización química negativa (NCI). De un modo similar, Nourooz et al (429,430) en pacientes de diabetes y Walter et al. (257) en fumadores, analizaron isoprostanos de la serie F derivados del ARA en plasma y orina.

Además de la familia de los F_2 isoprostanos, otros autores analizaron mediante GC-NCI-MS los monohidróxidos (HETEs), dihidróxidos (DiHETEs), y epóxidos (EETs) derivados del ARA formando previamente los correspondientes pentafluorobencil y trimetilsilil derivados. Además de los fluidos biológicos, Wiswedel et al. (431)

estudiaron los HETEs y F_2 isoprostanos en tejido cerebral de ratón como indicadores de daño oxidativo y disfunción mitocondrial. Nithipatikom et al. (187) determinaron varios mediadores lipídicos de la familia de los HETEs, DiHETEs, y EETs relacionados con la regulación del tono vascular en estudios de daño miocárdico de isquemia-reperfusión.

Entre las principales ventajas de la técnica destaca la gran selectividad y sensibilidad (0,05 ppb) (257). Sin embargo, el principal problema es que los mediadores lipídicos son compuestos muy poco volátiles para poder ser determinados mediante GC, por lo tanto. la muestra necesita ser derivatizada. La derivatización no es siempre posible e igual de efectiva para todas las familias de compuestos. Además, muchos de los mediadores lipídicos son térmicamente inestables y la derivatización induce cambios en su estructura.

C. Cromatografía Líquida (LC)

Debido a las limitaciones de la GC, la técnica de análisis más comúnmente utilizada para los mediadores lipídicos es la LC, que reduce el pretratamiento de muestra, y es compatible con estos metabolitos que son relativamente solubles en las fases móviles más comunes (316). Aunque la mayoría de los trabajos utilizan LC acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), existen algunos estudios en los que se acopla la LC a la detección espectroscópica de UV o fluorescencia.

Honda et al. (408) determinaron los epóxidos derivados del ARA en tejidos mediante LC-fluorescencia. Para ello, derivatizaron los extratos obtenidos mediante SPE con una hidrazida que reacciona con los grupos carboxilo de los eicosanoides para formar derivados fluorescentes que absorben/emiten a 365/447 nm. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos que utilizan LC con detección espectroscópica, esta técnica no constituye por sí sola el método de análisis. En algunos casos se utiliza para realizar un primer fraccionamiento de la muestra y se requiere una identificación posterior de los analitos mediante GC-MS, LC-MS, NMR (resonancia magnética nuclear), etc.

Yue et al. (409) analizaron diferentes familias de eicosanoides en tejido cerebral mediante LC-fluorescencia. Para ello derivatizaron las muestras con un compuesto sulfonato y midieron la fluorescencia a 260/396 nm. Para una correcta identificación de los analitos y validación del método fluorimétrico utilizaron LC-MS. Waddington et al (84) combinaron la separación por LC-UV y posterior derivatización y análisis por GC-MS de placas lipídicas en pacientes enfermos de arteriosclerosis, encontrando diferentes hidróxidos de la familia de los HETEs del ARA. Aunque estos hidróxidos pueden ser detectados por la absorbancia de sus dienos y trienos conjugados a 235 y 270 nm respectivamente, la sensibilidad y selectividad del análisis fue muy inferior a la espectrometría de masas. Consecuentemente la cuantificación de las fracciones eluídas del HPLC la realizan mediante GC-MS.

De un modo similar Serhan et al. (87) combinaron la separación y detección mediante LC-UV con la posterior cuantificación y determinación estructural de las protectinas derivadas del DHA por GC-MS, LC-MS, y NMR. También Gladovic et al. (432) utilizaron LC-UV para determinar hidróxidos e hidroperóxidos derivados de la oxidación del ácido linoleico, pero su identificación la llevaron a cabo mediante espectroscopía de NMR.

D. Cromatografía Líquida – Espectrometría de Masas (LC-MS)

Se trata del acoplamiento con la LC más utilizado y más ventajoso para el análisis de mediadores lipídicos, ya que combina las ventajas descritas para la LC con la elevada selectividad y sensibilidad de la detección por MS. En la **Tab. 7** se resumen las principales técnicas de extracción y determinación usadas para el análisis de mediadores lipídicos en diferentes matrices de muestra. Por ser la LC-MS la principal técnica analítica en la Lipidómica aplicada a mediadores lipídicos, se describe con más detalle el fundamento, etapas, características, y aplicaciones encontradas para el análisis de los mediadores lipídicos.

Compuestos	Matriz	Técnica de extracción	Técnicas de determinación	Ref.
8isoPGF2α, 11hidro-TXB2	Orina	SPE	Inmunoensayo	(243)
8isoPGF2α	Fluidos pericardíacos		Inmunoensayo	(422)
PGE_2	Tejidos y fluídos	ELL/SPE	Inmunoensayo	(423)
PGE_2, PGJ_2	Tejidos	Fraccionamiento HPLC	Inmunoensayo	(424)
8isoPGF2α, 11hidro-TXB2	Orina	SPE + TLC	Inmunoensayo	(425)
8isoPGF2α	Cultivos celulares	SPE	Inmunoensayo	(433)
20-HETE	Plasma	SPE + derivatización	GC-NCI-MS	(187)
15 y 11 HETE	Placas arteriosclerosis	ELL + HPLC/UV	GC-MS	(84)
HETE, isoP	Mitocondrias	SPE + derivatización	GC-NCI-MS	(431)
8isoPGF2α, 5transPGF2α, PGF2α, PGF2β	Orina, plasma	ELL + derivatización	GC-NCI-MS	(257)
8isoPGF2α	Plasma	Derivatización	GC-NCI-MS	(247)
IsoP	Orina	ELL + TLC	GC-NCI-MS	(429)
IsoP	Plasma	SPE + derivatización	GC-NCI-MS	(430)
PG, TX, LT, IsoP	Orina	SPE + derivatización	GC-NCI-MS	(427)
PG, TX, IsoP	Cultivos celulares	SPE + derivatización	GC-MS	(428)
PD	Cultivos celulares	LC-UV + SPE	LC-LIT GC-MS NMR	(87)

(continúa)

Compuestos	Matriz	Técnica de extracción	Técnicas de determinación	Ref.
HETE, HpETE	Protozoos	Extracción Sólido Líquido	LC-APCI(+)-Q	(434)
HETE, PG, isoP	Células intestinales	ELL	LC-APCI(-)-QqQ	(391)
F_2-IsoP	Plasma, orina	Online-SPE	LC-APCI(-)-QqQ	(414)
LTB4	Aire exhalado		LC-ESI(-)-QqQ LC-ESI(+)-QqQ LC-APCI-QqQ	(435)
90 eicosanoides ω-6	Cultivos celulares	SPE	LC-ESI(-)-QqLIT LC-APCI(-)-QqLIT	(410)
PGE1, PGE2, 8isoPGF2α	Orina	SPE	LC-ESI(+)-QqQ	(404)
PG, LT, TX, LX, HETE, etc	Aire exhalado	ELL	LC-ESI(-)-QqQ LC-ESI(+)-QqQ	(436)
HEPE, Rv, PD, PG, TX	Plasma, hígado, cerebro	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(188,235)
PGF2α, PGF1α, TXB2, PGE, PGF	Orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(255)
8isoPGF2α	Orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(406)
8isoPGF2α, TXB2	Orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(249)
PGF2α	Orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(411)
PG, TX, LT, HETE, diHETE, EpETE	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(221)
PG, TX, LT, HODE, HETE	Mucosa colon	ELL	LC-ESI(-)-QqQ	(332)
IsoP	Plasma, orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(437)
6 HETE, IsoP, HODE	Plasma	ELL	LC-ESI(-)-QqQ	(345)
PG, TX	Tejidos	ELL	LC-ESI(-)-QqQ	(438)
TX, PG, LT, LX, HETE, HEPE, RV, HDoHE	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(439)
PG, IsoP; TX, LT, HETE	Orina	ELL	LC-ESI(-)-QqQ	(395)
PG	Tejidos	ELL	LC-ESI(-)-QqQ	(335)
PG	Orina	Derivatización + Online-SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(440)
PG, TX, isoP	Cultivos celulares	ELL	LC-ESI(-)-QqQ	(394)
IsoP, PG	Orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(417)
PG, TX, HETE, HEPE, LT, EET, HDoHE, Rv, PD	Cultivos celulares	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(416)
PG	Orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(418)
122 eicosanoides	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(419)
PG, TX	Plasma, cultivos celulares	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(74)
104 eicosanoides	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(221)
DHET, EET, HETE, LX, oxoETE, PG, TX	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(405)
PG, TX, HETE, EET, HDoHE, PD, DiHETE, LX, HETrE, LT	Tejido de córnea	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(420)
HETE, EET, PG	Orina	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(338)

(continúa)

Compuestos	Matriz	Técnica de extracción	Técnicas de determinación	Ref.
HETE	Cultivos celulares	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(441)
HEPE, Rv, PD, PG, TX, HETE, HODE, EET, LT, Lx, HDoHE, DiHETrE	Plasma, hígado, adiposo, intestino	ELL SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(407)
HETE, EET, oxoETE, PG	Tejidos	ELL SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(328)
PG, Rv, Lx, TX, LT, PD, HEPE, HETE, EET	Cultivos celulares	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(442)
HETE, PG	Plasma, células	SPE	LC-ESI(-)-QqQ	(443)
HETE, HODE, PG, EET, oxoETE	Plasma, orina	ELL	LC-ESI(-)-QqQ	(444)
PG, TX, isoP, HETE	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqLIT	(445)
101 eicosanoides	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqLIT	(413)
Eicosanoides ω-6	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqLIT	(19)
158 Eicosanoides y docosanoids del ARA, EPA, DHA, DGLA y otros	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QqLIT	(421)
100 eicosanoides	Cultivos celulares	SPE	LC-ESI(-)-LITOrbitrap LC-ESI(-)-QqLIT	(386)
LT, PG	Estándares		LC-ESI(-)-LIT LC-ESI(-)-QTOF	(446)
FFA	Plasma	ELL	LC-ESI(-)-QTOF	(447)
HODE, EpETE, HETE, LT, TX, PG, isoP	Plasma, cultivos celulares	ELL	LC-ESI(-)-QTOF	(448)
MaR1, PD1	Cultivos celulares	SPE	LC-ESI(-)-QTOF	(433)
EET	Plasma	SPE	LC-ESI(-)-QTOF	(449)
EET	Arterias renales	SPE + derivatización	LC-fluorescencia	(408)
PG, EET, DiHETE, HETE	Cerebro	SPE + derivatización	LC-fluorescencia + LC-ESI(+)QqQ	(409)

Tab. 7: Resumen bibliográfico de las principales técnicas de extracción y determinación aplicadas para el análisis de eicosanoides y docosanoides en diferentes matrices.

4.1.2.3. Fundamentos de la LC para el análisis de mediadores lipídicos

Esta es la técnica más usada para la separación de eicosanoides y docosanoides ya que es adecuada para compuestos en un amplio rango de polaridad. Generalmente se utiliza acoplada a la espectrometría de masas conformando así una técnica muy sensible y selectiva.

A. Tipo de columna

Según el tipo de columna utilizada se clasifican las técnicas en LC de fase reversa, de fase normal, de intercambio iónico, cromatografía iónica o cromatografía de par iónico (450). Para la separación cromatográfica de eicosanoides y docosanoides se usan

normalmente columnas de retención en fase reversa (404,434,451), aunque ciertas aplicaciones utilizan columnas quirales para la separación específica de algunos isómeros (391,410).

Es el caso de Lee et al. (391) que desarrollaron una metodología para separar varios estereoisómeros R/S de los hidróxidos y prostaglandinas derivados del LA y ARA, mediante una columna quiral y detección por APCI-MS, en un estudio mecanístico de la selectividad de las enzimas lipooxigenasa. También Deems et al. (410) analizaron más de 60 eicosanoides mediante LC-MS combinando cromatografía en fase reversa para la mayoría de los compuestos y cromatografía quiral para separar pares específicos de estereoisómeros que no son posibles de separar en fase reversa.

B. Fase móvil y gradiente

Referente a los disolventes más utilizados para la separación cromatográfica de eicosanoides y docosanoides, algunos autores han propuesto el uso de MeOH:agua como fase móvil, añadiendo ácido fórmico (404) o acetato amónico como aditivos (87). Otros usan como fase orgánica acetonitrilo con aditivo de ácido fórmico (409,445,451) o acético (235,421,443). A priori, parece contraproducente usar un aditivo ácido cuando la técnica se acopla con ESI en modo negativo. Aunque las cargas positivas son desfavorables para la ionización, se utilizan para mejorar la separación cromatográfica ya que ayudan a activar los grupos silanol de las columnas amentando así las interacciones de Van der Waals que establecen con los compuestos (183).

Además de la elección de los disolventes de la fase móvil, es importante optimizar un gradiente de concentraciones entre ellos para conseguir una buena resolución de los picos cromatográficos. Existen aplicaciones en LC en las que la separación de los compuestos se consigue mediante una elución isocrática. Es el caso del trabajo realizado por Yu et al. (394) que determinaron seis mediadores lipídicos de la familia de las prostaglandinas, isoprostanos y tromboxanos con una elución isocrática de ACN:agua. Otros trabajos que utilizan eluciones isocráticas son los realizados por Patil et al. (420) o Guo et al. (441).

Sin embargo, debido a la necesidad de una resolución elevada, pocas aplicaciones utilizan eluciones isocráticas como método de análisis, más bien constituyen una etapa previa de fraccionamiento de la muestra, para su posterior análisis. Serhan et al (87) utilizaron una elución isocrática para hacer un fraccionamiento de compuestos de la familia de las protectinas. Posteriormente llevaron a cabo una SPE de las fracciones y detección por GC-MS.

La mayor parte de los trabajos con mediadores lipídicos buscan determinar un número elevado de compuestos pertenencientes a diferentes grupos o familias. Su separación resulta compleja debido al elevado número de isómeros y polaridades similares. Por lo tanto, la optimización del gradiente cromatográfico es una etapa clave en su

determinación. En función del tipo de columna, la fase móvil y el número y familias de compuestos que se desean analizar, existen multitud de perfiles de gradiente posibles. Existen trabajos en los que separan simplemente dos mediadores lipídicos (249), o métodos validados para más de 90 (410) o 150 compuestos (421).

Masoodi et al. publicaron la separación de 20 mediadores lipídicos de la familia de los leucotrienos, resolvinas, protectinas, e hidróxidos en la misma inyección (188). Posteriormente con otro método cromatográfico, analizaron 27 derivados de las prostaglandinas y tromboxanos (235). También Medina et al. (255) identificaron prostaglandinas y tromboxanos en una sola elución, y Kortz et al. (445) incluyeron además el análisis de la familia de los hidróxidos junto con prostaglandinas, tromboxanos e isoprostanos.

El aumento del número de compuestos de diferentes familias hace más compleja su separación y la obtención de un gradiente optimizado para todos ellos. En un trabajo reciente, Wang et al. (421) propusieron un método de análisis de LC-MS para 158 mediadores lipídicos con 26 estándares deuterados en menos de 5 minutos. Determinan 88 derivados del ARA, 22 del DHA, 17 del EPA, 13 del DGLA, y 18 de otros ácidos grasos. Aplican el método a muestras de plasma obteniendo límites de detección alrededor de los 10 pg.

No sólo el número de compuestos incluídos en el método es un factor limitante para la separación cromatográfica. Existen grupos de isómeros con idéntico patrón de fragmentación, por lo que únicamente una buena resolución cromatográfica permite identificarlos. Es el caso de numerosas prostaglandinas como la PGE_1 y PGD_1, PGE_2 y PGD_2, PGE_3 y PGD_3, $PGF_{2\alpha}$ y 8iso$PGF_{2\alpha}$, etc (183). Masoodi et al. (235) lograron separar varios de estos pares de isómeros. Sin embargo, el isoprostano 8iso-PGE_2 coeluye con la PGE_2 bajo esas condiciones y no pueden ser identificados cuando ambos están presentes. Wang et al. (421) consiguieron separar cromatográficamente la PGE_2 y la PGD_2 mediante el procedimiento citado previamente.

C. Otros parámetros

Además de la elección de la fase estacionaria y la fase móvil, es importante tener en cuenta las dimensiones y características de las columnas ya que pueden influír y mejorar la resolución de los picos. Cuanta mayor longitud tenga la columna, mayor número de platos teóricos tendrá y por tanto mayor resolución, aunque por otra parte, esto produce un aumento de los tiempos de retención y ensanchamiento de los picos cromatográficos.

Cuanto menor diámetro interno de la columna, mayor resolución, aunque se debe tener en cuenta que esto produce un aumento de la presión en el cromatógrafo y por tanto, los flujos de fase móvil deben ser menores. Los equipos de HPLC tienen intervalos de flujo en los que proporcionan volúmenes exactos y reproducibles que es necesario tener en cuenta previamente a la elección de la columna. En la **Tab. 8** se resumen las

características de las columnas más usadas para el análisis de mediadores lipídicos, así como la composición de las fases móviles utilizadas.

Columna			Composición de la fase móvil		Ref.
Relleno	**Dimensiones**	**Tamaño de partícula**	**Disolvente A**	**Disolvente B**	
C18 Luna	2.1x100mm	3 µm	Agua:MeOH:FA 99:1:0,1	Agua:MeOH:FA 1:99:0,1	(404)
C18 Luna	2x150mm	5 µm	MeOH:Agua:AA 65:35:0.01		(87)
C18 Zorbax	2,1x150mm	5 µm	Agua:FA 99,9:0,1	ACN	(451)
C18 Luna	2x150mm	5 µm	Agua:MeOH:HAc 80:20:0,02	Auga:ACN:HAc 55:45:0,02	(188)
C18 Luna	2x150mm	5 µm	Agua:ACN:HAc 55:45:0,02	Agua:ACN:HAc 10:90:0,02	(235)
C18 Varian	4.6x250mm	5 µm	ACN:Auga		(434)
C18 BEH Waters	2,1x50mm	1.7 µm	Agua:ACN:Hac 60:40:0,1		(394)
Quiral	4.6x250mm	5 µm	Hexano	EtOH:hexano 70:30	(391)
C18 Kinetex	3x50mm	2.6 µm	Agua:HAc 0,1%	MeOH	(440)
C18	2,1x250mm	5 µm	Agua:ACN:FA 63:37:0,02	ACN:IsoP 50:50	(410)
Quiral	4.6x250mm	5 µm	Hexano:EtOH:Auga:FA 96:4:0,08:0,02	EtOH	(410)
C18 Zorbax	2,1x50mm	1.8 µm	Agua:Hac 0,01%	MeOH: Hac 0,01%	(255)
C18 Hydro-RP	2x250mm	4 µm	Agua:FA 0.1%	MeOH:ACN:FA 50:50:0.1%	(417)
C18 Luna	2x150mm	3 µm	MeOH:ACN:AA 85:5:10	MeOH:ACN:AA 10:5:85	(416)
C18 Hydro-RP	2x75mm	4 µm	Agua:FA 0.1%	ACN:FA 0.1%	(418)
C18 Kinetex	2,1x150mm	1.7 µm	Agua:ACN:HAc 70:30:0,1	IsoP:ACN:HAc 50:50:0,02	(419)
C18 Kinetex	2,1x100mm	2.6 µm	Agua:ACN:HAc 55:45:0,02	Agua:ACN:HAc 10:90:0,02	(74)
C18 Luna	2x150mm	5 µm	Agua:ACN:HAc 55:45:0,02	Agua:ACN:HAc 10:90:0,02	(74)
C18 Waters	2,1x50mm	1.7 µm	NH_4OH 0.15%	MeOH:ACN:NH_4OH 5:95:0.15	(406)
C18Hypersil	2,1x100mm	3 µm	MeOH:NH_4Ac 2.5mM 3:97	MeOH:ACN 3:97	(249)

(continúa)

Columna			Composición de la fase móvil		Ref.
Relleno	**Dimensiones**	**Tamaño de partícula**	**Disolvente A**	**Disolvente B**	
C18 Symmetry	4.6x250mm	5 µm	Agua:FA 99,5:0,5	ACN:FA 99,5:0,5	(409)
C18 MAX-RP	2x250mm	3 µm	MeOH:AA 80:20		(441)
C18 Zorbax	2,1x50mm	3.5 µm	Agua:FA 0,1%	ACN	(439)
C18 Luna	2x150mm	5 µm	Agua:MeOH:AA 35:65:0,03		(420)
C18 Kromasil	2x250mm		Agua:HAc 0.005%	ACN:HAc 0.005%	(338)
C18 Ascentis	2x150mm	2.7 µm	Agua:HAc 0.1%	ACN:IsoP 90:10	(221)
C18 Pursuit	2x150mm	5 µm	Agua:HAc 0.1%	ACN:MeOH 84:16 (HAc 0.1%)	(405)
C18 BEH Waters	2,1x100mm	1.7 µm	Agua:ACN:Hac 40:60:0,02	ACN:IsoP 50:50	(421)
C18 Wakosil	4,6x150mm	5 µm	Agua	MeOH	(408)
C18 Synergi Hydro-RP	2x250mm	4 µm	Agua:HAc 0.01%	MeOH:HAc 0.01%	(411)

Tab. 8: Recopilación bibliográfica de las dimensiones, tamaño de partícula y relleno de las principales columnas usadas para el análisis de eicosanoides y docosanoides, así como la descripción de la composición de disolventes y modificadores de la fase móvil (FA, ácido fórmico; AA, acetato amónico; HAc, ácido acético; IsoP, isopropanol).

4.1.2.4. Fundamentos de la MS para el análisis de mediadores lipídicos

La Espectrometría de Masas es una de las herramientas de detección analíticas de mayor aplicación debido a su elevada sensibilidad y, sobre todo, selectividad. Además, proporciona información acerca de la composición elemental de la muestra, la estrutura de las moléculas, la composición cuantitativa y las relaciones isotópicas de los átomos. Se fundamenta en la producción de iones gaseosos que se diferencian por su relación masa/carga (m/z) midiendo su intensidad. Los tres elementos fundamentales de un espectrómetro de masas son:

- El sistema de ionización
- El analizador de masas
- El detector y el modo de adquisición de datos

A continuación se describe brevemente el fundamento de cada una de las etapas de la técnica aplicadas al análisis de mediadores lipídicos.

A. Sistemas de ionización de muestra

Este primer módulo del espectrómetro de masas se puede considerar una interfase que conecta la salida de la columna de LC con el analizador de masas. Para que un compuesto en disolución pueda ser analizado por MS es necesario que se convierta en

un ión desolvatado en fase gaseosa. Esto se logra mediante diferentes sistemas de ionización. Los principales son aquellos que operan a presión atmosférica ya que compatibilizan con éxito las condiciones de presión atmosférica a salida de columna con las condiciones de alto vacío en el analizador de masas. Los más usados son:

- ✓ **Ionización por electrospray (ESI)**

En el caso concreto de los mediadores lipídicos, muchos de ellos son compuestos relativamente inestables, por lo que el mismo proceso de ionización puede ser causa de descomposición y pérdida de su estructura química. El desarrollo de la ionización por electrospray para acoplar la LC con la MS ha supuesto un gran avance para la determinación de los mediadores lipídicos. Se trata de un método de ionización suave que permite generar iones cargados positiva o negativamente sin que se descompongan los analitos.

Brevemente, el eluyente que sale de la columna cromatográfica es nebulizado en la cámara de ESI que trabaja a presión atmosférica. El flujo de fase móvil pasa por una aguja de nebulización metálica o un capilar de sílice en el que se aplica un fuerte campo electrostático, y junto con la presencia de un gas de secado inerte (N_2) a elevada temperatura, se forma un aerosol de finas gotas cargadas. El campo provoca la disociación de las moléculas de analito mientras que el gas caliente hace que se evapore el disolvente de esas gotas y la carga se concentra. Al aumentar la concentración aumenta la repulsión entre las cargas. Cuando las fuerzas de repulsión superan a las de cohesión, los iones son atraídos hacia el orificio del capilar del analizador. En este proceso de disminución del radio de las gotas, llega un momento en el que la fuerza del campo eléctrico de las microgotas cargadas alcanza un punto crítico en el que la tensión superficial no es capaz de manter la carga (límite de Rayleigh), por lo que se produce una *explosión culómbica* y la gota se rompe en gotas más pequeñas. El proceso se repite hasta que solo existen moléculas de analito cargadas en fase gas (452). Esta secuencia de nebulización e ionización se esquematiza en la Fig. 19.

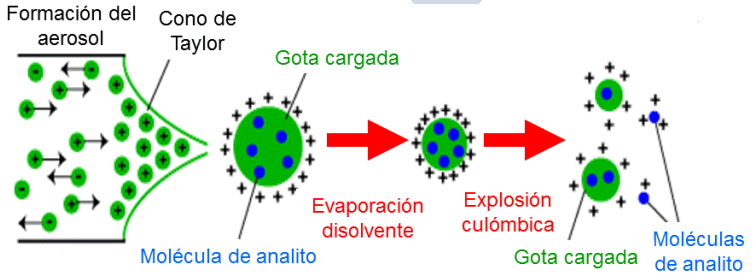


Fig. 19: Esquema de la ionización mediante ESI.

La ionización se puede realizar en modo positivo o negativo, según se obtengan iones cargados positiva o negativamente. En general, la ionización de las biomoléculas orgánicas se produce en modo positivo, ya que así aumenta la eficencia de ionización y

por tanto, la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, los mediadores lipídicos son ácidos carboxílicos que ven favorecida su ionización en modo negativo. Para poder ionizarlos en modo positivo es necesario protonar el grupo carboxílico mediante un proceso de derivatización, lo que aumenta la complejidad del tratamiento de muestra y puede provocar cambios en el perfil inicial de mediadores lipídicos por oxidación de los grupos más inestables.

Pocos autores utilizan únicamente la ionización en modo positivo para el análisis de mediadores lipídicos, como es el caso de Kretscher et al. (404) que determinaron marcadores de estrés oxidativo de la familia de las prostaglandinas en orina, o Yue et al. (409) que analizaron PGs, EETs, DiHETEs, y HETEs derivados del ARA en muestras de tejido cerebral. En ambos trabajos derivatizaron los grupos carboxílicos de los eicosanoides. Montuschi et al. (435) compararon la sensibilidad en el análisis de LTB_4 mediante ionización positiva y negativa, encontrando la mejor sensibilidad para el modo negativo. Sanak et al. (436) analizaron un grupo de 20 mediadores lipídicos mediante ionización negativa para los hidróxidos, lipoxinas, prostaglandinas y LTB_4, e ionización positiva para varios leucotrienos (LTD_4, LTC_4, y LTE_4). La ionización en modo positivo puede ser útil cuando se pretende analizar un conjunto de mediadores lipídicos y otras biomoléculas orgánicas que ionizan preferentemente en positivo, o cuando previamente a la detección por MS se derivatiza la muestra para otro tipo de análisis.

Como se ha indicado previamente, el modo de ionización más utilizado es el negativo ya que no requiere derivatización alguna de la muestra. Algunos ejemplos son el trabajo de Balvers et al. (407), en el que determinaron 61 metabolitos en plasma y otros tejidos, entre los que se encuentran endocanabinoides analizados por un método cromatográfico en modo positivo y eicosanoides con otro método en modo negativo. Masoodi et al (188,235) en múltiples trabajos, determinaron todo un amplio rango de derivados del ARA, EPA y DHA en muestras de hígado, cerebro y plasma mediante SPE-LC-ESI-MS con ionización en modo negativo. Otros autores han usado ionización negativa en diferentes matrices de muestra como cultivos celulares (410) u orina (255).

- ✓ **Ionización química a presión atmosférica (APCI)**

En la APCI, el eluyente que proviene de la columna se dispersa en un vaporizador a elevada temperatura y el disolvente, más volátil, se transforma en gas. Este gas se ioniza gracias a descargas de electrones que provienen de una aguja corona. Los iones del disolvente reaccionan químicamente con las moléculas de analito y le transfieren la carga.

✓ Fotoionización a presión atmosférica (APPI)

La APPI consta de un vaporizador para convertir el eluyente líquido en gas pero después, a diferencia de la APCI, una lámpara de descarga genera fotones que ionizan los analitos sin ionizar el disolvente.

Ambos modos de ionización no son muy utilizados en aplicaciones relacionadas con los mediadores lipídicos ya que se trata de procesos más fuertes de ionización que pueden degradar los analitos, y generalmente requieren de una etapa previa de derivatización de la muestra.

Algunos ejemplos son el trabajo de Santiago-Vázquez et al. (434), en el que determinaron hidróxidos del ARA mediante APCI en modo positivo previa derivatización en sus correspondientes metil-ésteres. Lee et al. (391) aumentaron la sensibilidad de la técnica formando los pentafluorobenzil ésteres de los mediadores lipídicos. Con esta derivatización analizan hidróxidos, prostaglandinas e isoprostanos mediante APCI en modo negativo. Una de las ventajas que proponen al usar la APCI es que el mismo proceso de metilación estabiliza los metabolitos y previene su degradación por procesos oxidativos.

Con el objetivo de analizar LTB_4 mediante LC-MS, Montuschi et al. (435) compararon el uso de APCI y ESI en modos positivo y negativo, encontrando la mejor sensibilidad para ESI (-). Otros trabajos combinan el uso de cromatografía en fase reversa acoplada a ESI para la mayoría de los mediadores lipídicos, con cromatografía quiral acoplada a APCI para la identificación de compuestos quirales (410).

B. Analizadores de masas

El analizador es la parte esencial del espectrómetro de masas en donde tiene lugar la separación de los iones producidos en la fuente de ionización, en función de su relación m/z. Esta relación m/z está relacionada con la masa molecular de las sustancias teniendo en cuenta la pérdida/ganancia de masa según su ionización (negativa/positiva). Existe una gran variedad de analizadores según el principio físico responsable de la selección y aislamiento de los iones (**Tab. 9**). La precisión y exactitud de las medidas dependen del tipo de analizador. Todos ellos tienen en común la manipulación de campos eléctricos y/o magnéticos para aislar los iones (453).

Tipos de analizadores		Principio físico responsable de la separación
Sectores	Sector magnético (B)	Momento magnético
	Sector eléctrico (E)	Energía cinética
Cuadrupolos (Q)		m/z: estabilidad de la trayectoria
Tiempo de vuelo (TOF)		Energía cinética
Atrapamiento de iones	Trampa iónica (IT)	m/z: frecuencia de resonancia
	Resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier (FT-ICR)	m/z: frecuencia de resonancia ciclotrónica
	Orbitrap	m/z: frecuencia de resonancia

Tab. 9: Tipos de analizadores de masas

Los analizadores más usados en el análisis de mediadores lipídicos son:

- ✓ **Cuadrupolos (Q)**

El analizador de tipo Q (Fig. 20) está formado por cuatro cilindros paralelos a los que se les aplica corriente continua (DC). De este modo, dos de ellos adquieren potenciales positivos y dos negativos. Además de la DC, se les aplica también un potencial de radiofrecuencia (RF), de modo que cuando llegan los iones al cuadrupolo, la combinación de los potenciales de RF y DC permite que determinadas relaciones m/z queden retenidas y otras se pierdan chocando contra los tubos. De este modo se filtran y seleccionan los iones que llegarán al detector. Una de las principales limitaciones es que solo puede filtrar masas en el rango de 0 a 4000 m/z.

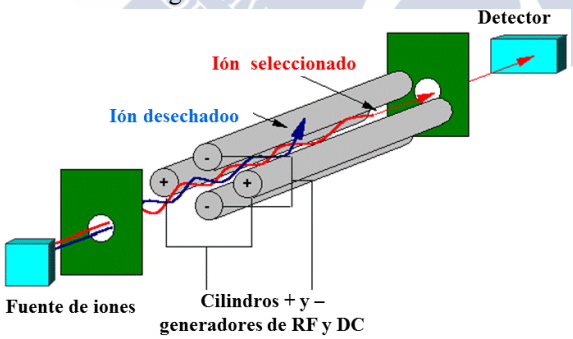


Fig. 20: Esquema general de un analizador tipo Cuadrupolo.

- ✓ **Trampas de Iones**

La Trampa Lineal de Iones (LIT) (Fig. 21) ha sido diseñada al mismo tiempo que el Q y por la misma persona, Wolfgang Paul, Premio Nóbel de física en 1989. La física de base es muy parecida. Los iones son atrapados mediante campos de RF y DC dentro de un electrodo hiperbólico que los mantiene en órbita según su m/z. Posteriormente, se expulsan selectivamente aplicando corrientes de RF variables hasta valores de resonancia de los iones. Otro analizador de última generación tipo trampa iónica es el Orbitrap. Funciona por atrapamiento radial de iones sobre un electrodo central a modo

de huso. Existe un electrodo externo que envuelve al electrodo en forma de huso y entre ambos forman un campo electrostático que hace oscilar a los iones alrededor del electrodo central. La ventaja de este tipo de trampas es la obtención de una mayor resolución de masas.

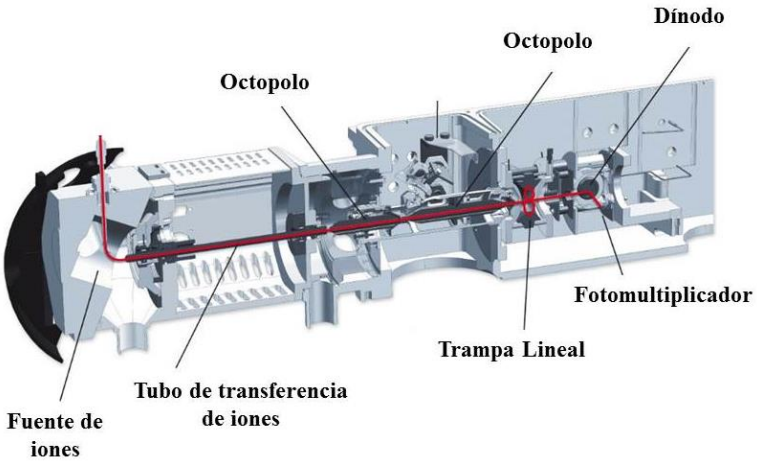


Fig. 21: Esquema general de un analizador tipo Trampa de Iones.

✓ **Analizadores de Tiempo de Vuelo (TOF)**

El analizador tipo TOF (Fig. 22) se basa en la medida del tiempo que tardan los iones, acelerados por un campo eléctrico con la misma energía, en alcanzar el electrodo colector dentro de un tubo de alto vacío. El tiempo dependerá de su masa, carga y energía cinética. Al igual que el Orbitrap, se trata también de un detector de elevada resolución de masas.

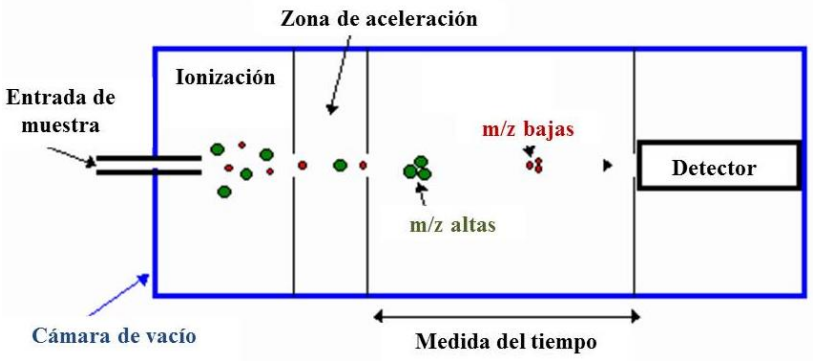


Fig. 22: Esquema general de un analizador tipo Tiempo de Vuelo.

La elección de uno u otro modelo de analizador dependerá del tipo y número de compuestos a analizar, así como de la sensibilidad y exactitud requerida. Los diferentes analizadores descritos se diferencian principalmente por: (a) la resolución de masas, es decir, el grado de exactitud en la detección de la relación m/z, y (b) la rapidez de análisis y la capacidad de registrar un mayor número de fragmentaciones, es decir, la

cantidad de información estructural de los analitos que pueden obtener manteniendo una buena sensibilidad.

El principal tipo de analizador utilizado en el análisis de los mediadores lipídicos es el de tipo Q (188,235,255,391,404,410,434,444). Otros analizadores utilizados en diversas aplicaciones con mediadores lipídicos son las LIT (19,421,445) y los analizadores TOF (433,447,448). En general, los equipos actuales de espectrometría de masas combinan en su arquitetura dos o más analizadores para conseguir separaciones más rápidas, selectivas, y precisas de los iones para aumentar la sensibilidad y exactitud en las medidas. Las combinaciones más comunes para el análisis de mediadores lipídicos son el QqQ (444,454), QqTOF (433,447–449), y QqLIT (19,421,445).

Los analizadores tipo TOF y Orbitrap son instrumentos de gran resolución de masas. Detectan pequeños cambios en el peso molecular de los compuestos que muchas veces permiten identificar isómeros u otros compuestos mal resueltos cromatográficamente. La gran velocidad de detección en modo *full scan* (explicado en el siguiente epígrafe) les proporciona, además, una elevada sensibilidad. Algunos trabajos con mediadores lipídicos en los que utilizan analizadores TOF de alta resolución son los realizados por Gdula et al. (433) que determinaron los isómeros PD_1 y MaR_1 con la misma relación m/z 359, Ferreiro-Vera et al. (449) que utilizaron la alta resolución para identificar los epoxi-isómeros (EET) derivados del ARA, o Montserrat et al. (448) que analizaron compuestos de las familias: HODE, EpETE, HETE, LT, TX, PG, e isoP. Massodi et al. (386) utilizaron un Orbitrap para identificar más de 100 eicosanoides en base a su ión molecular.

Aunque los analizadores de alta resolución también producen información acerca de la fragmentación de los compuestos (espectrometría de masas en tándem MS/MS o MS^n), su sensibilidad en este modo de adquisición es menor que los analizadores tipo QqQ más veloces. Por lo tanto, el espectrómetro usado tradicionalmente en MS/MS es el QqQ a pesar de la menor resolución de masas. Multitud de trabajos para la identificación y cuantificación de mediadores lipídicos utilizan QqQ, analizando al mismo tiempo desde unos pocos compuestos (406,411,414,435), hasta más de 100 analitos (221,419).

Sin embargo, la sensibilidad del QqQ en modo de adquisición *full scan* es mucho menor que la obtenida por otros equipos de masas. El instrumento híbrido QqLIT que reemplaza un cuadrupolo por una trampa lineal, es capaz de adquirir con gran sensibilidad tanto en MS/MS como en *full scan* (455). Aunque menos utilizado todavía que el QqQ, varios trabajos en los que se analizan a la vez más de 100 compuestos, utilizan equipos tipo LIT por su gran velocidad en la adquisición y además permiten registrar el espectro completo de masas fragmentadas sin perder sensibilidad. Algunos ejemplos son los 101 eicosanoides detectados por Kortz et al. (413), 158 eicosanoides y docosanoides incluídos en el método propuesto por Wang et al. (421), o los 100

eicosanoides identificados mediante un Orbitrap y confirmados con los espectros de MS/MS obtenidos con un LIT por Masoodi et al. (386).

C. Modos de adquisición: *full scan vs* MS/MS

Los analizadores de masas descritos pueden trabajar principalmente en dos modos de adquisición: (1) registrando directamente la relación m/z de los iones que proceden de la fuente de ionización, (2) aislando determinados iones y fragmentándolos para posteriormente registrar esos fragmentos. El primer modo de trabajo se conoce como *full scan* o barrido completo. Se trata de un método poco selectivo y poco sensible comparado con MS/MS, ya que registra fundamentalmente el ión molecular (la ionización ESI es muy débil y produce muy pocos fragmentos intensos) de los compuestos en el tiempo que son separados cromatográficamente. Las aplicaciones para mediadores lipídicos en *full scan* son escasas ya que para su identificación, además de conocer el ión molecular, generalmente es necesario disponer de información estructural de su espectro de masas.

Por lo tanto, el modo habitual de trabajo para la identificación y cuantificación de los mediadores lipídicos es el segundo, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS o MS^n). En un primer momento, el analizador aisla los iones moleculares de los analitos de interés separados cromatográficamente. Posteriormente son fragmentados mediante la aplicación de unas energías de colisión específicas que darán lugar a los espectros de masas característicos de cada compuesto. Finalmente, el analizador registra uno o varios de los fragmentos producidos.

La espectrometría de masas MS/MS puede realizarse de un modo dirigido o no dirigido. El modo de análisis dirigido recibe el nombre de *MRM (multiple reaction monitoring)*, en el que el analizador registra solamente algunos de los fragmentos producidos, aquellos que son característicos y/o más intensos para cada compuesto. En el modo de análisis no dirigido, el analizador aplica un barrido de frecuencias para registrar todos los iones derivados de la fragmentación. En la **Fig 23** se representa un esquema estándar del modo de trabajo de MS/MS. Una ventaja de los analizadores tipo LIT sobre los Q es que permiten realizar masas en tándem múltiple (MS^n). Una vez aislado y fragmentado el ión molecular, pueden repetir el proceso *n* veces fragmentando de nuevo los iones producidos.

Una de las principales ventajas de trabajar en *MRM* es el incremento enorme de la velocidad de adquisición. Es decir, el equipo dedica todo el tiempo a registrar solamente los pares iónicos (ión precursor > fragmento característico) para cada analito, con lo que aumenta el número de iones que puede registrar y por lo tanto, la sensibilidad. En algunas aplicaciones, la fragmentación constituye la "huella datilar" del compuesto, es decir, los fragmentos producidos son característicos de un compuesto concreto, lo que permite diferenciarlo de los demás. Consecuentemente, combinando una buena separación cromatográfica y selección de los fragmentos característicos se pueden

identificar con gran precisión la mayor parte de los mediadores lipídicos descritos hasta el momento.

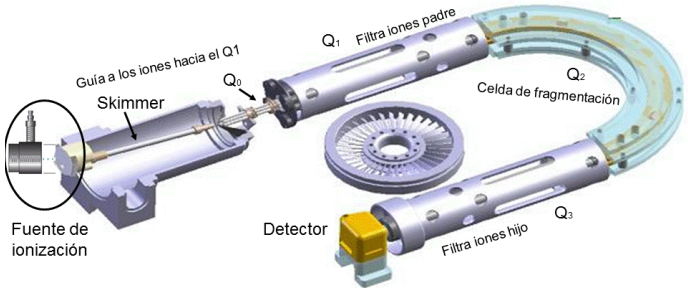


Fig. 23: Espectrómetro de masas tipo QqQ. Modo de adquisición MS/MS: Q_1 (selecciona iones según m/z), Q_2 (celda de colisión, fragmenta los iones), Q_3 (selecciona el/los fragmentos de interés)

Una de las principales limitaciones de trabajar en *MRM* para determinar mediadores lipídicos, es el gran número de isómeros estructurales con propiedades físico-químicas similares que producen fragmentos comunes entre sí y no siempre resultan fáciles de separar cromatográficamente (386). Asimismo, al aumentar el número de compuestos a analizar en el mismo método, y por tanto el número de transiciones, disminuye la sensibilidad del mismo. Son muchas las aplicaciones que utilizan *MRM* para el análisis cualitativo y cuantitativo de eicosanoides y docosanoides en variedad de matrices biológicas (187,328,399,436). Por ejemplo, Cavalca et al. (249) determinaron 2 mediadores lipídicos, Kretschemer et al. (404) 3 prostaglandinas, Medina et al. (255) identificaron 5 compuestos, Masoodi et al. (188) separaron 20 derivados de los leucotrienos, resolvinas, protectinas, e hidróxidos, y 27 prostaglandinas y tromboxanos con otro método (235). En trabajos recientes, se desarrollaron métodos de análisis en *MRM* para más de 90 (410), 100 (413), o 150 compuestos (421) con los equipos más modernos de QqLIT, y más de 100 mediadores lipídicos (221) con QqQ como se ha señalado anteriormente.

El análisis no dirigido aporta mucha más información estructural de los compuestos al registrar todos los fragmentos producidos y no simplemente aquellos más intensos. A pesar de la menor sensibilidad que proporciona un análisis en *MRM*, dicha información puede resultar clave en la identificación de muchos isómeros mal resueltos. Otra ventaja de este modo de trabajo es la posibilidad de identificar compuestos presentes en las muestras que no habían sido incluídos previamente en la lista de transiciones de *MRM,* y sin la necesidad de patrones comerciales. Masoodi et al. (386) desarrollaron y validaron un método para el análisis de unos 100 mediadores lipídicos combinando un *screening* inicial en *full scan* y MS/MS no dirigido mediante un LIT-Orbitrap de alta resolución, y un QqLIT para la validación de las identificaciones por *MRM*. Agruparon los compuestos por su ión molecular de alta resolución en 12 grupos, los separaron cromatográficamente y registraron el espectro completo de MS/MS. En base al estudio de las fragmentaciones producidas y los tiempos de retención, propusieron una

identificación de compuestos que posteriormente validan mediante patrones comerciales por *MRM.*

4.1.2.5. Desafíos actuales de la LC-MS aplicada al estudio de los mediadores lipídicos

En los últimos años, el número de aplicaciones para la detección y cuantificación de los mediadores lipídicos mediante LC-MS ha aumentado exponencialmente, especialmente debido al desarrollo de nuevos espectrómetros con mayor sensibilidad, resolución y capacidad de adquisición de datos (316). Lo que ha permitido implementar metodologías para el análisis de matrices biológicas complejas, cuantificando simultáneamente un número cada vez mayor de mediadores lipídicos en un solo proceso analítico.

Los métodos publicados abarcan desde la identificación de unos pocos mediadores lipídicos (249,404,406,414) al análisis de más de 100 compuestos a la vez (221,413,419,421). La ventaja de disminuír el número de compuestos a determinar es la facilidad del tratamiento de la información, la mayor sensibilidad de los métodos en *MRM* y la mayor precisión en la identificación de los mediadores lipídicos. Sin embargo, en numerosas aplicaciones biológicas resulta de gran interés obtener una imagen global de los mediadores presentes para comprender mejor las rutas metabólicas y la compleja regulación de los procesos inflamatorios y de estrés oxidativo en los que están envueltos estos compuestos.

A pesar de los grandes avances tecnológicos y de los nuevos equipos de masas, el análisis de los mediadores lipídicos todavía entraña ciertas **dificultades**:

- La etapa de tratamiento de muestra.

Como se ha comentado anteriormente, la optimización del tratamiento de muestra resulta crucial para minimizar la degradación de los analitos, la generación de nuevos compuestos diferentes a la matriz original, o evitar las pérdidas por adhesión a los viales, evaporación, etc (456).

- Los límites de detección

Aunque han sido identificados en experimentos *in vitro,* la baja concentración en la que se encuentran determinados mediadores de gran interés en procesos inflamatorios como las resolvinas y protectinas dificulta su identificación en muestras biológicas.

- La elevada inestabilidad y fácil degradación de algunos metabolitos

- Efecto matriz

Es necesario evaluar y medir el posible efecto adverso que la matriz de la muestra puede ejercer sobre la señal detectada en el equipo (417). El efecto matriz consiste en el aumento o disminución de la señal instrumental para un analito debido a la presencia de

otros compuestos que coeluyen con él, procedentes de los modificadores de la fase móvil o de la propia matriz de muestra (457,458). Produce un error sistemático debido a la interferencia que provoca en el proceso de ionización de los analitos. Estos compuestos de la matriz pueden tener mayor facilidad para ionizarse, dificultando por lo tanto la ionización de los analitos de interés y provocando un descenso de la señal. Por otra parte, también puede haber interferencias que potencien la ionización de los analitos respecto a condiciones estándar sin la matriz.

Además de este efecto sobre la eficacia de la ionización, los compuestos interferentes también pueden producir fragmentos fantasma o aumentar la intensidad de fragmentos específicos. Si el efecto matriz no se puede eliminar mediante un mejor tratamiento de la muestra (optimización SPE) o variando las condiciones cromatográficas (inyección de pequeños volúmenes, lavado de la aguja de inyección, etc) (74), la alternativa es cuantificar mediante el método de adiciones estándar. Este método consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito estándar a la propia muestra problema para la construcción de la recta de calibrado de adiciones estándar que se usará para extrapolar la concentración de analito en la muestra.

- Presencia de isómeros

La elevada similaridad química de los mediadores lipídicos y el gran número de isómeros presentes en las muestras, hacen que los métodos cromatográficos convencionales no siempre consigan separar los analitos de interés. Además, existen grupos de isómeros con idéntico patrón de fragmentación, por lo que su identificación resulta compleja sin una buena resolución cromatográfica (ejemplo **Fig. 24**).

Por lo tanto, algunos autores recurren a separaciones cromatográficas quirales para determinar separadamente los enantiómeros R y S de hidróxidos e hidroperóxidos (58,459,460), epoxi-enantiómeros (461,462), o los estereoisómeros prostaglandinas/isoprostanos (397). Sin embargo, se trata de aplicaciones enfocadas al análisis de unos pocos analitos, y no son métodos de amplio rango de aplicabilidad (183). Otras limitaciones de la cromatografía quiral son el elevado tiempo de equilibrado de las columnas y de elución de los analitos, la menor sensibilidad, y el escaso desarrollo de columnas quirales con menores tamaños de partícula (316).

El uso de columnas con menores tamaños de partícula (< 2µm) es posible gracias al desarrollo de equipos cromatográficos que operan a presiones mayores (463–465). Al disminuir el tamaño de partícula, los picos son más estrechos, lo que provoca, no sólo una mayor resolución (separación de compuestos críticos), sinó también un descenso de los límites de detección y en los tiempos de análisis, que incluso pueden llegar a ser menores de 5-10 minutos (466). Por lo tanto, el uso de columnas cada vez más empacadas y menores flujos cromatográficos, combinado con la espectrometría de masas, puede reducir los falsos positivos en la identificación de los mediadores lipídicos debidos a compuestos que coeluyen e interferencias de isómeros mal resueltos (395,467).

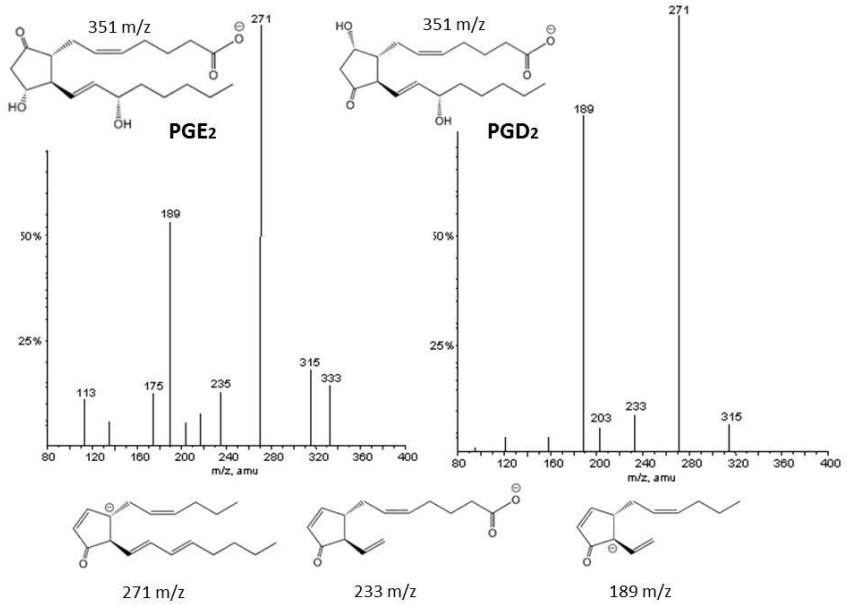


Fig. 24: Espectros de masas de los isómeros PGE_2 y PGD_2 obtenidos mediante LC-MS/MS (www.lipidmaps.org). Estos compuestos tienen el mismo ión precursor (351 m/z) y los mismos iones producto principal (271 y 189 m/z) ya que solamente difieren en la posición del grupo cetona e hidroxilo en el anillo. Por lo tanto, las características de MS son casi idénticas y solamente una buena resolución cromatográfica permite identificarlos por separado (235).

Además, el uso de equipos de masas de alta resolución permite discriminar compuestos interferentes con masas similares, y el análisis en modo no dirigido en vez de *MRM,* permite verificar la identificación de isómeros gracias a la información completa del espectro de masas (386). Una limitación de los equipos de alta resolución de masas como el Orbitrap son los mayores límites de detección en comparación con los equipos de QqQ tradicionalmente usados. Una alternativa más sensible para la adquisición en modo no dirigido, a pesar de la menor resolución de masas, son los equipos híbridos QqLIT (410,413).

Entre los principales **desafíos actuales** de la lipidómica aplicada a los mediadores lipídicos se encuentran:

- Resolver los problemas de tratamiento de muestra, límites de detección, inestabilidad, efecto matriz e identificación de isómeros descritos anteriormente.
- El análisis riguroso de nuevos compuestos bioactivos como son, por ejemplo, los mediadores anti-inflamatorios lipoxinas, resolvinas, protectinas o maresinas que han sido descubiertos en la última década y de los que se desconoce todavía su completa caracterización bioquímica (468–471), o la identificación de los

nuevos eicosanoides derivados de plantas con actividades antimicrobianas (472), etc.

- La propuesta de nuevos biomarcadores y métodos de análisis robustos basados en LC-MS que formen parte del análisis rutinario en laboratorios clínicos (218,219,473).

- La aplicación conjunta de la lipidómica y las otras técnicas *ómicas*, para generar un mayor conocimiento de cómo los sistemas biológicos y los diferentes polimorfismos genéticos influyen en la absorción, transporte, biosíntesis y metabolismo de los mediadores lipídicos (337,474–477). Y en consecuencia, poder relacionar con más precisión el papel de estos compuestosen su conjunto con la salud (478), la eficacia de dietas ricas en ω-3 (479), avanzar en el posible diseño de medicamentos personalizados, etc.

4.2. Modelos *in vitro* utilizados en el estudio de la digestión gastrointestinal y la absorción lipídica

En este epígrafe se explica el fundamento y metodología empleada para el seguimiento de la oxidación y absorción de PUFAs durante la digestión, mediante el modelo de digestión gastrointestinal TIM-1 y los cultivos celulares Caco-2. Además, se ha realizado una breve recopilación bibliográfica de otros trabajos en los que se utilizan estos modelos para el estudio de la oxidación y absorción gastrointestinal de lípidos.

4.2.1. Tracto gastrointestinal TIM-1

Muchos de los experimentos que simulan la digestion *in vitro* utilizan modelos estáticos y monocompartimentales. Una de las principales limitaciones de estos modelos es la poca representatividad de los continuos cambios y gradientes de pH, temperatura y electrolitos que ocurren durante la digestión humana. Una alternativa que supera estas limitaciones es el modelo dinámico TIM-1. Se trata de un equipo que reproduce el tracto digestivo, proporcionando una visión rápida de la solubilidad, liberación y biodisponibilidad para la absorción de los nutrientes y fármacos en el tracto intestinal (480).

Está formado por cuatro compartimentos sucesivos que simulan el estómago y los tres sectores del intestino delgado humano: duodeno, yelluno e ileo. Los principales parámetros de la digestión como son, el pH estomacal e intestinal, la temperatura, los movimientos peristálticos que permiten el paso de los alimentos, y los diferentes jugos gástricos, biliares y pancreáticos son controlados por un software que mimetiza y reproduce casi con exactitud las condiciones gastrointestinales humanas. Su configuración permite el acceso a la muestra en cada uno de sus compartimentos. Además, consta de dos sistemas de filtración de membranas semipermeables de 0.05 μm, situados en el yelluno e ileo que permiten el paso de las sustancias digeridas y

bioaccesibles lo que simula la absorción intestinal con relativa precisión (481). En la Fig. 25 se muestra un esquema del modelo TIM-1 utilizado en este trabajo.

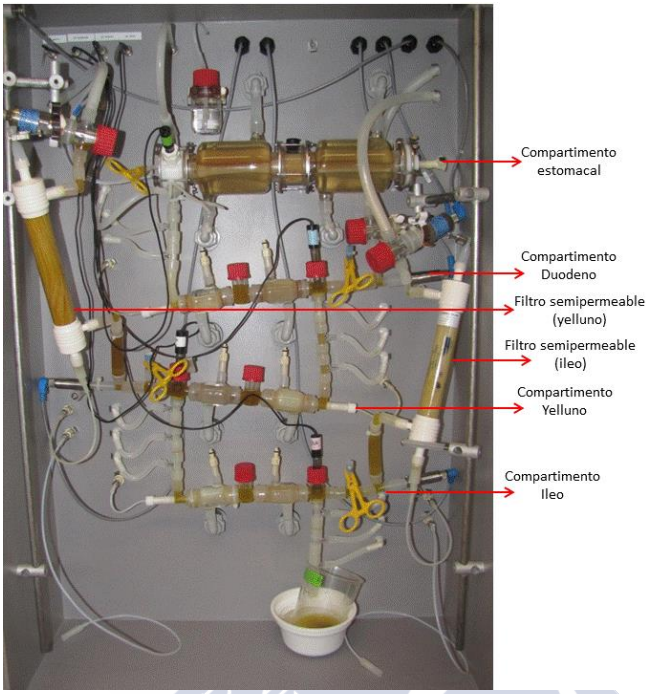


Fig. 25: Esquema del modelo dinámico de tracto gastrointestinal TIM-1

4.2.2. Línea celular Caco-2

Los enterocitos, células epiteliales del intestino, constituyen el principal lugar de absorción de nutrientes en el cuerpo humano. Por lo tanto, uno de los mejores modelos para simular satisfactoriamente la barrera biológica de la mucosa intestinal es el uso de cultivos celulares *in vitro* con una línea de células Caco-2. Se trata de células procedentes de un adenocarcinoma de colon humano que una vez cultivadas, se diferencian y reproducen espontáneamente las funciones de enterocitos maduros, incluyendo la formación de una monocapa con intersecciones estrechas y microvellosidades en su parte apical, y segregando lipoproteínas que intermedian la absorción de nutritientes (482).

El transporte y las propiedades metabólicas de las células pueden variar dependiendo de la densidad con la que fueron sembradas, la cercanía a la etapa de confluencia de las mismas, el episodio de diferenciación celular en el que se encuentran, la presencia o ausencia de nutrientes esenciales y/o factores de crecimiento, etc. Para los estudios de asimilación de nutritientes y su metabolismo se pueden usar compuestos marcados

isotópicamente que se separan mediante cromatografía en capa fina y se cuantifican mediante espectrómetros de conteo de radiactividad y técnicas de revelado (483).

4.2.3. Uso de modelos gastrointestinales y cultivos celulares para el estudio de la oxidación y absorción de lípidos

En los últimos años, el interés por evaluar la oxidación de los lípidos durante el tracto digestivo ha ido en aumento, en especial aquella sufrida por los PUFAs ω-3 de origen marino. Debido a su mayor grado de insaturación, son más susceptibles de oxidarse (484–486). El propio proceso digestivo ha sido definido como un biorreactor para la oxidación de biomoléculas debido a las condiciones de temperatura, pH (484), presencia de catalizadores como hemoglobina e iones hierro (487), etc. En relación a la oxidación lipídica inducida por el propio proceso digestive, Tirosh et al. (488) encontraron un aumento de los productos finales de oxidación de los PUFAs ω-3 de aceite de oliva y pescado después de 180 min de digestión. Otros trabajos también han confirmado un aumento de la oxidación lipídica de los PUFAs de origen marino durante la digestión (489–493).

La mayoría de estos trabajos utilizan modelos gastrointestinales *in vitro* estáticos, es decir, basados en la formación de emulsiones y simulación de los jugos gástricos, pH, enzimas, etc (488–490,492,493). Tullberg et al. (490) compararon la capacidad oxidativa de los principales fluídos gástricos (porcino y humano) utilizados en este tipo de ensayos *in vitro*. Kristinova et al. (493) investigaron también el papel del jugo gástrico humano en la oxidación de los lípidos marinos. Domguia et al. (492) analizaron la importancia de las emulsiones formadas en el modelo gástrico para la inducción de oxidación.

Estos modelos estáticos son relativamente sencillos de usar, pero no son del todo realistas ya que no tienen en cuenta la adición gradual de enzimas o el vaciado de las diferentes partes del sistema digestivo conforme avanza la digestión. Estos cambios en el factor de concentración de ciertos productos y enzimas influyen también en su actividad. Los modelos dinámicos como el TIM-1 representan una figura más completa del modelo digestivo. Algunos trabajos referentes a la oxidación de lípidos han sido realizados usando estos modelos dinámicos (180,491,494). Maestre et al. (180) analizaron el efecto antioxidante de combinar extratos de polifenoles con dietas de pescado, durante la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* con el digestor TIM-1. Recientemente, Larsson et al. (491,495) utilizaron el modelo TIM-1 para estudiar la formación de aldehídos como el MDA, HHE, y HNE, durante la digestión gastrointestinal de aceites de hígado de bacalao en presencia de prooxidantes. Estos compuestos son productos finales de la oxidación de variedad de moléculas orgánicas y en especial de los PUFAs y pueden interactuar con el ADN y las proteínas generando diversidad de disfunciones y daños (496,497). Demostraron que el propio proceso digestivo promueve la oxidación lipídica dando lugar a la formación de estos aldehídos.

A pesar de las pocas aplicaciones encontradas en las que se usan modelos dinámicos para el estudio de la oxidación lipídica durante la digestión, el digestor TIM-1 ha sido ampliamente validado como modelo de digestión humana *in vitro* por numerosos estudios microbiológicos (51,498–500), farmacéuticos (501–504) y nutricionales (481,505–508).

Entre las principales ventajas de los modelos dinámicos frente a los estáticos destacan el ahorro de tiempo y dinero y el mayor grado de representatividad en los ensayos de solubilidad, estabilidad, perfiles de liberación, disponibilidad o absorción de diferentes sustancias. Sin embargo, una de las principales limitaciones es que no incluyen un modelo celular que reproduzca con más precisión la absorción activa de nutrientes. Es por ello que, resulta de gran interés combinar los modelos de digestor gastrointestinal con líneas celulares Caco-2 para estudiar los procesos de oxidación y posterior absorción durante la digestión humana. Existen trabajos que combinan los modelos TIM-1 con cultivos Caco-2 para estudios de biodisponibilidad de nutrientes, como es el caso de Deat et al. (505), que investigaron la estabilidad digestiva y la absorción intestinal de carotenoides y vitamina E, ya que sus efectos beneficiosos pueden depender en gran medida de su biodisponibilidad.

Las lineas celulares Caco-2 han sido utilizadas como modelos fisiológicos para multitud de estudios de absorción y metabolismo de nutrientes y fármacos (509,510). Por ejemplo, Antonella et al. (511) estudiaron la absorción celular, el efecto antitóxico y la sensibilidad antitumoral de incubar células Caco-2 con aceites ricos en EPA y DHA y el fármaco 5-fluororacil. Pettersen et al. (512) analizaron el estrés oxidativo provocado al incubar diferentes líneas celulares con DHA en un estudio de terapia anticáncer. Del mismo modo, estos modelos *in vitro* de los enterocitos humanos han sido aplicados a estudios de biodisponibilidad y absorción de lípidos y ácidos grasos. Beguin et al (513) estudiaron la incorporación, procesado y metabolismo de los PUFAs en dos modelos de líneas celulares intestinales: Caco-2 y T84.

Numerosos trabajos han investigado el papel de los diferentes tipos de ácidos grasos en la dieta en la formación de micelas y quilomicrones, y su influencia en la absorción de otros compuestos como carotenoides (514–517). Chitchumroonchokchai et al. (518), mediante un modelo de digestión *in vitro* y cultivos celulares Caco-2, observaron como un mayor grado de insaturación de la cadena lipídica de los ácidos grasos aumenta el grado de micelización y el transporte transepitelial. Luchoomun et al. (519) estudiaron el papel del ácido oleico en la formación de triglicéridos y fosfolípidos y su influencia en el transporte y absorción. Jackson et al. (520) analizaron la influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta en la formación de las lipoproteínas que median los procesos de absorción de lípidos.

Aunque menos estudiado, algunos autores han investigado el efecto de la oxidación de los lípidos sobre la absorción intestinal. Penumetcha et al. (521) no encontraron

diferencias entre la absorción celular de ácido linoleico oxidado y no oxidado; sin embargo, Maestre et al. (180) demostraron un descenso significativo en la asimilación de DHA por células Caco-2 cuando éste había sido previamente oxidado mediante lipooxidasas. Awada et al. (522) evaluaron la absorción de los productos finales de la oxidación lipídica, HNE y HHE, en células Caco-2. Muller et al. (523) investigaron cómo la oxidación de los ácidos grasos puede perturbar el metabolism lipídico y su absorción.

Otros trabajos están orientados a evaluar la citotoxicidad de los productos de oxidación lipídica y la consequente viabilidad de las células, encontrando efectos beneficiosos en la adición de polifenoles (524,525). Recientemente, Incani et al. (526) observaron los daños celulares producidos por un exceso de oxidación lipídica y aumento de ROS, MDA, hidroperóxidos, etc.

4.3. Modelos animales utilizados en esta tesis para el estudio del efecto saludable ejercido por una dieta rica en PUFAs ω-3

Los modelos animales (ratas) utilizados en este trabajo, se han desarrollado para estudiar el posible efecto beneficioso de una dieta rica en PUFAs ω-3 en un contexto genético o dietario capaz de inducir alteraciones metabólicas relacionadas con procesos inflamatorios, de estrés oxidativo, y enfermedades crónicas como la obesidad o la diabetes tipo-2.

El empleo de modelos animales para la investigación en el campo de la nutrición permite ejercer un control preciso de la dieta y de otros factores claves como la actividad física, minimizando la variabilidad de los resultados y permitiendo realizar comparaciones entre los datos obtenidos en diferentes laboratorios. Otra ventaja importante es que permiten la realización de técnicas invasivas como estudios histológicos prácticamente imposibles de realizar en humanos. Sin embargo, una de las principales limitaciones de usar modelos animales es que pueden existir diferencias en los mecanismos genéticos, metabólicos, respuesta a drogas, etc que hacen que no siempre se puedan transferir los resultados en animales al ser humano (527).

A. Modelos genéticos

Los modelos genéticos de roedores más comúnmente empleados en el estudio de patologías como la obesidad, la diabetes tipo 2 o el síndrome metabólico pueden subdividirse a su vez en dos grupos principales, según tengan la ruta de la leptina funcional o no (528). La leptina es una hormona que controla la ingesta de alimentos e incrementa el gasto de energía actuando sobre el hipotálamo (529). Uno de los modelos usados en este trabajo es el de ratas SHROB (genéticamente obeso, espontáneamente hipertenso), también conocidas como ratas Koletsky con una mutación en el receptor de la leptina. Se trata de un modelo de obesidad genética, con hipertensión espontánea, sin hiperglicemia, y con otras alteraciones fenotípicas como la hiperinsulinea, la hiperlipidemia y la nefropatía. Por ello, las ratas SHROB se emplean como un modelo de síndrome metabólico (530).

Numerosos autores han utilizado los modelos genéticos animales en estudios famacológicos para evaluar los efectos beneficiosos de fármacos sobre alteraciones metabólicas (531–535). También existen estudios nutricionales en ratas SHROB, en los que se evalúa el efecto de la dieta sobre diferentes alteraciones metabólicas (536–538). Sin embargo, son pocos los trabajos realizados en modelos animales con alteraciones metabólicas en los que se analizan mediadores lipídicos.

Mendizábal et al.(539) buscaron por primera vez la relación entre la disfunción de los adipocitos en un contexto de obesidad (mediante un modelo SHROB) y la secreción de compuestos pro-inflamatorios como las prostaglandinas en el tejido adiposo perivascular. En otro trabajo, aunque no se analizan directamente mediadores lipídicos, utilizaron ratas SHROB como modelo de alteraciones cardiometabólicas para evaluar el efecto terapéutico de la inhibición de la enzima epóxido-hidrolasa, responsable de la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como los dihidróxidos derivados de los PUFAs ω-6 (540).

B. Modelos dietarios

El uso de modelos genéticos es una estrategia efectiva que normalmente consigue fenotipos de enfermedad más severos y que no son del todo representativos de la enfermedad humana asociada a la dieta. Otra alternativa empleada, es el uso de modelos de enfermedad inducidos por la dieta, aunque esto conlleva una mayor variabilidad en los resultados.

Entre las principales dietas modelo para inducir desórdenes metabólicos destacan las dietas altas en grasa y/o carbohidratos refinados. El alto contenido en grasa constituye un modelo robusto de obesidad, pero su influencia sobre otros parámetros de síndrome metabólica (tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina, triglicéridos) es mucho más variable. El uso de altas cantidades de carbohidratos refinados induce de manera efectiva la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia, por lo que son modelos

útiles para el estudio de la diabetes, aunque no sean eficaces para inducir obesidad. Por lo tanto, la combinación de ambos suplementos permite la indución de un mayor número de alteraciones y constituye un buen modelo de síndrome metabólico.

Los modelos animales basados en dietas ricas en grasa y azúcares, son ampliamente utilizados para promover y estudiar procesos inflamatorios y desórdenes metabólicos (37–39,175,541–543). Por ejemplo, Baiges et al. (38) utilizaron una dieta alta en grasa durante 13 semanas para producir un modelo de lipogénesis en el hígado, y así poder estudiar en él el efecto beneficioso de los ponifenoles de la uva. Zhang et al. (39) investigaron el efecto de una dieta alta en grasa durante 20 semanas sobre el estrés oxidativo y la inflamación y las consecuencias en desórdenes cognitivos. Aguilera et al. (542) obtuvieron un modelo de síndrome metabólico mediante una intervención dietaria durante 21 semanas con una dieta rica en grasa y azúcar. Posteriormente analizaron el efecto beneficioso de suministrar un aceite de pescado durante 6 semanas, sobre la presión arterial, triglicéridos, colesterol, etc. Lombardo et al. (543) consiguieron un modelo de dislipidemia, resistencia a la insulina y adiposidad mediante una alimentación con dietas altas en azúcar, que posteriormente trataron con dietas ricas en aceites de origen marino.

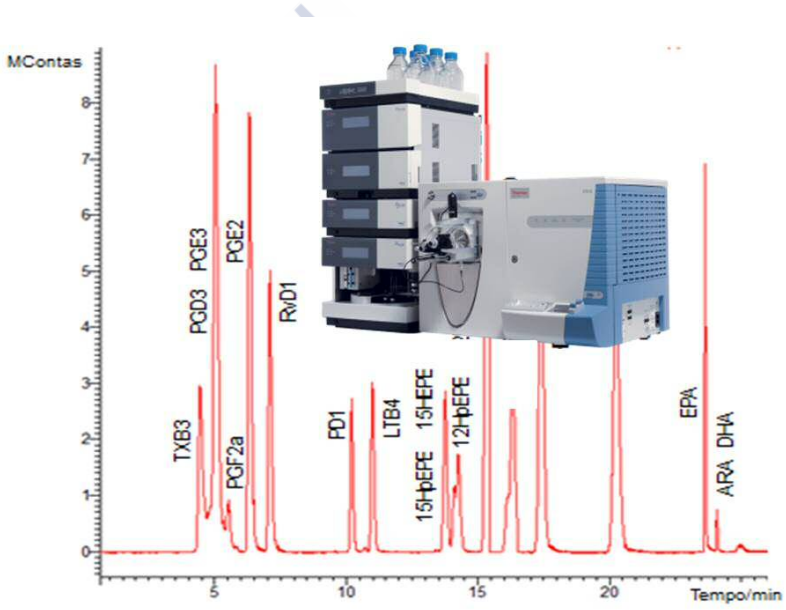
En muchos de los trabajos sobre inflamación y desórdenes metabólicos, el análisis de los mediadores lipídicos es una herramienta fundamental para en el estudio de los mecanismos asociados a la promoción/resolución de la inflamación (26,89). En el trabajo de Zhang et al. (39), analizaron el biomarcador PGE_2 para determinar el nivel de inflamación producido por la dieta alta en grasa en la corteza cerebral. Sears et al. (544), en un modelo de inflamación del tejido adiposo y de resistencia a la insulina obtenido con una dieta alta en grasa, estudiaron el papel regulador de la inflamación de las enzimas lipooxigenasa 12 y 15. Estas enzimas median en la síntesis de numerosos eicosanoides.

En otros trabajos, el análisis de los eicosanoides y docosanoides y su efecto sobre la inflamación está asociado a la intervención dietaria mediante dietas ricas en aceites marinos (26,58,60,407). Es el caso de Neilson et al. (58) que evaluaron la producción de eicosanoides asociada a una dieta rica en PUFAs ω-3 como alternativa al uso de drogas anti-inflamatorias, o Brahmbhatt et al. (60) que asociaron el efecto protector de una dieta rica en EPA y DHA sobre la inflamación intestinal, a la mayor producción de eicosanoides ω-3 en detrimento de las rutas complementarias ω-6.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I:

Lipidomic analysis of polyunsaturated fatty acids and their oxygenated metabolites in plasma by solid-phase extraction followed by LC-MS

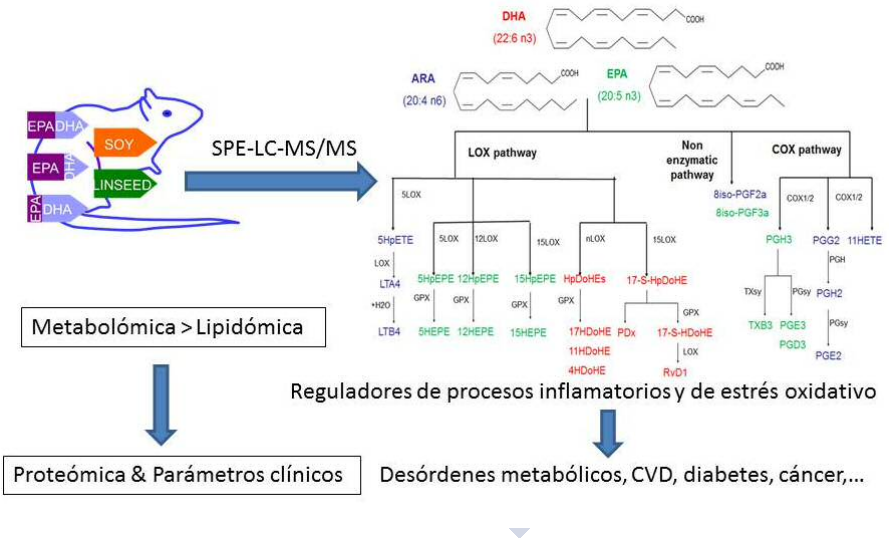


https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618987

Dasilva G., Pazos M., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., Anal. Bioanal. Chem., 406:12, 2014, 2827-2839, DOI: 10.1007/s00216-014-7701-3

CAPÍTULO II:

Healthy effect of different proportions of marine ω-3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation.



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320676

Dasilva G., Pazos M., García-Egido E., Gallardo J.M., Rodríguez I., Cela R., Medina I., J. Nutrit. Biochem., 26 (2015), 1385-1392, DOI: org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.007

CAPÍTULO III:

Lipidomics to analyze the influence of diets with different EPA:DHA ratios in the progression of Metabolic Syndrome using SHROB rats as a model

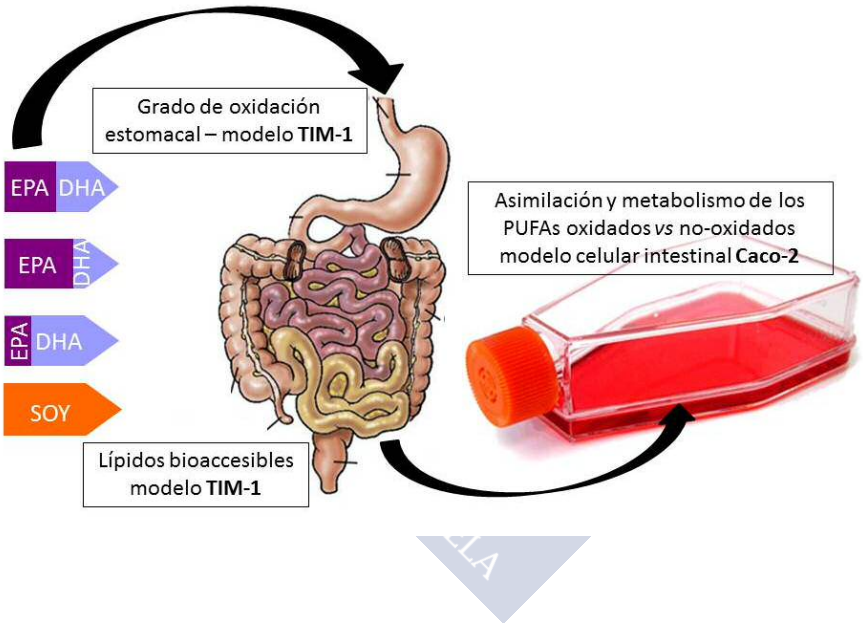
USC
DE SANTIAGO
COMPOSTELA

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006231

Dasilva G., Pazos M., García-Egido E., Pérez-Jiménez J., Lluís Torres J., Giralt M., Nogués M.R., Medina I., Food Chem., 205 (2016), 196-203, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.03.020

CAPÍTULO IV:

Relative levels of dietary EPA and DHA impact gastric oxidation and essential fatty acid uptake

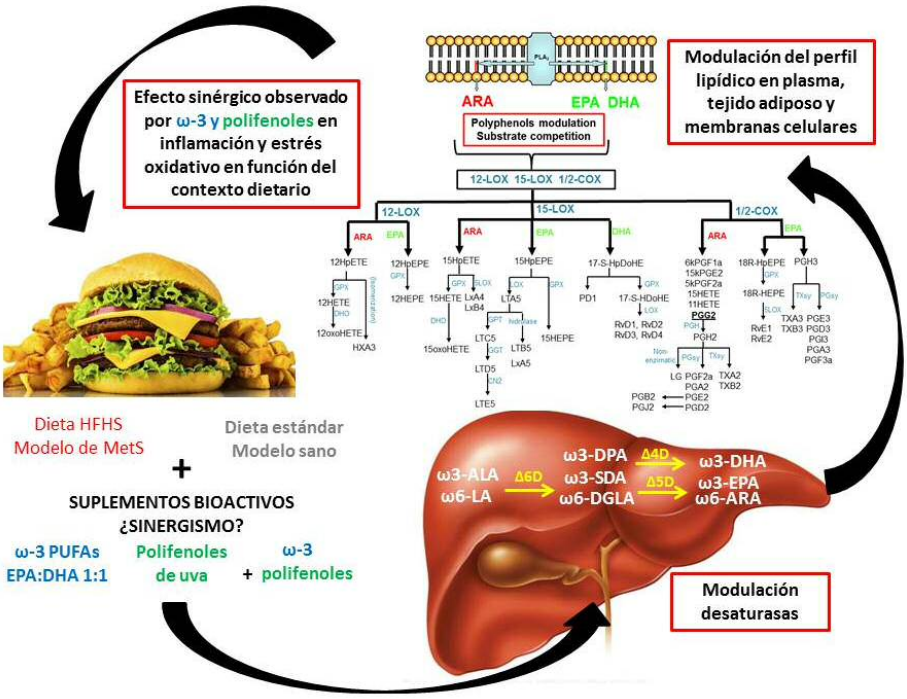


http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316305204

Dasilva G., Boller M., Medina I., Storch J., *Relative levels of dietary EPA and DHA impact gastric oxidation and essential fatty acid uptake.* J. Nutrit. Biochem., (2017), DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.11.007

CAPÍTULO V:

A lipidomic study on the regulation of inflammation and oxidative stress targeted by Marine ω-3 PUFA and Polyphenols in high- fat high-sucrose diets

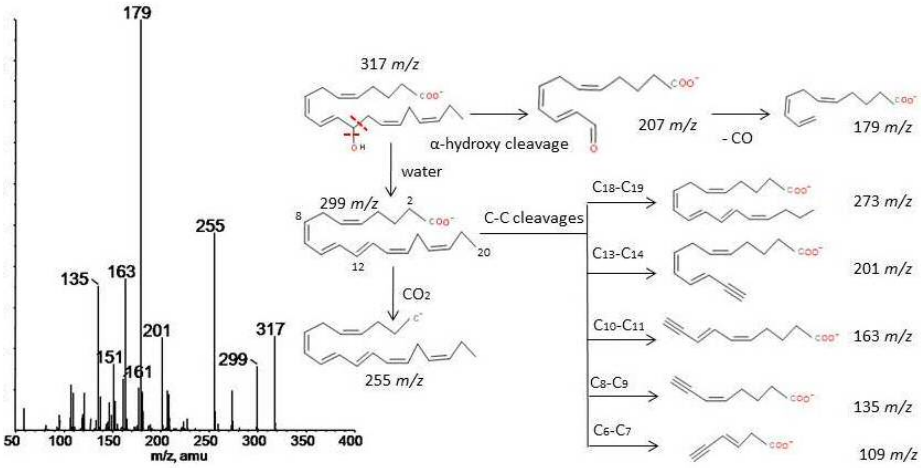


http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316303059?_rdoc=1&_fmt=high&_origin=gateway&_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb

Dasilva G., Pazos M., García-Egido E., Gallardo J.M., Ramos-Romero S., Lluís Torres J., Romeu M., Nogués M.R., Medina I., J. Nutrit. Biochem., 43 (2017), 53-67, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.02.007

CAPÍTULO VI:

Non-targeted LC-MS/MS assay for screening over 100 lipid mediators from ARA, EPA, and DHA in biological samples based on mass spectra fragmentations



Non-targeted LC-MS/MS assay for screening over 100 lipid mediators from ARA, EPA, and DHA in biological samples based on mass spectra fragmentations

Authors

Gabriel Dasilva[ab*], Silvia Muñoz[a], Salomé Lois[a], Isabel Medina[a]

[a] *Instituto de Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIM-CSIC), E-36208 Vigo, Galicia, Spain.* [b]*Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology and Research Institute for Food Analysis (I.I.A.A.), University of Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain.* [*]Corresponding author. Instituto de Investigaciones marinas, c/Eduardo Cabello 6, 36208, Vigo, SpainTel. +34986231930; fax: +34986292762. E-mail address: gabrieldasilvaalonso@gmail.com (Gabriel Dasilva)

Abstract

It is presented a data-dependent assay to simultaneously screen for over 100 bioactive compounds in biological samples, using a single MS/MS analysis. The assay's targeted application range was the main families of lipid mediators produced from ω-6 ARA and ω-3 EPA and DHA fatty acids. Many of these metabolites have been associated with metabolic disorders, inflammatory, immune and oxidative stress processes. The identification of these compounds is a challenge due to the low concentration range in samples, influence of the matrix on ionization efficiency, the elevated number of isomers with similar physicochemical properties, and the low stability of some groups. LC-MS/MS operated in MRM mode (targeted analysis) is the current analytical strategy for the identification and quantitation of these compounds. It has shown to be highly sensitive and selective; meanwhile it requires costly analytical standards and it is limited to the analysis of pre-selected target metabolites. Then, other isomeric compounds or different lipid mediators not included in the MRM list cannot be identified in samples. We present here a non-targeted strategy of MS/MS for the screening of biological samples to tentatively identify a very large number of compounds (>100) in a single 24 min run, without the need of using analytical standards and a pre-defined list of targeted compounds. The implemented analytical strategy consisted of a three-step procedure. (1) Extraction of compounds by SPE followed by LC-MS/MS analysis in plasma and adipose tissue operating in Total Ion Scan Mode. The methodology was validated for a group of 65 metabolites using standards. SPE recoveries ranged from 29-134% and matrix effect from 10-580%. LOD and LOQ ranged from 0,01 to 17,65 ng/mL and 0,03 to 58,84 ng/mL respectively, similarly than MRM analysis. (2) An extensive study of the mass spectra of a wide range of compounds was done in order to stablish a fragmentation pattern that allows us to identify peaks in samples. Based on the mass spectra obtained and the proposed fragmentation pattern for each family of compounds, 30 lipid mediators were tentatively identified in plasma and 35 in adipose tissue. (3) Finally the hypothetical identification

of compounds was validated by using reference standards. Around 85-90% of proposed identifications were correctly assigned and only 4-3 compounds were failed in adipose and plasma, respectively. Therefore, the use of Total Ion Scan together with the study of fragmentation patterns is a potent analytical tool to study the complete profile of lipid mediators in biological samples and not reducing the analysis to a specific group of compounds.

Abbreviations

ARA (arachidonic acid), DHA (docosahexaenoic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), LA (linoleic acid), DGLA (dihomo-γ-linolenic acid), ALA (linolenic acid), MRM (multiple reaction monitoring), SPE (solid phase extraction), PUFA (polyunsaturated fatty acid), LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry), MRM (multiple reaction monitoring), LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation).

1. Introduction

Lipid mediators have drawn much attention in clinical studies due to they are a family of molecules that play a key role in the progression of inflammation and metabolic disorders [1]. They exhibit a large number of physiological effects in almost every organ system through highly coordinated active processes including cellular signaling and transcription factors regulation, modulation of metabolic pathways, inflammation resolution, and so on [2]. The production these bioactive compounds is mediated by cyclooxygenases, lipoxygenases, cytochrome P450 monooxygenases, and non-enzymatic pathways [3] from the main ω-6 and ω-3 PUFAs as it is shown in Fig. 1. A very large number of isomeric compounds from different families can be produced. Specific examples include the family of prostaglandins, isoprostanes, thromboxanes, and leukotrienes which have been described as pro-inflammatory substances [1,4]. The most studied derived from ARA are PGE_2, $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, TXA_2 and $8isoPGF_{2\alpha}$, which have been associated with the chronic inflammatory stage of hypercholesterolemia, liver cirrhosis, myocardial reperfusion, type-2 diabetes, obesity, atherosclerosis, cancer, and CVD [5–8]. On the other hand, the corresponding metabolites produced from EPA and DHA have been suggested as less harmful compounds than the ω-6 ones [9,10]. Other families have been described as anti-inflammatory molecules like lipoxins [11], epoxides [12], and the recently discovered resolvins, protectins, and maresins [13]. These anti-inflammatory lipid mediators were associated with the resolution of inflammation in CVD [6], arthritis [14], asthma [15], cancer [16,17], or Alzheimer [18,19].

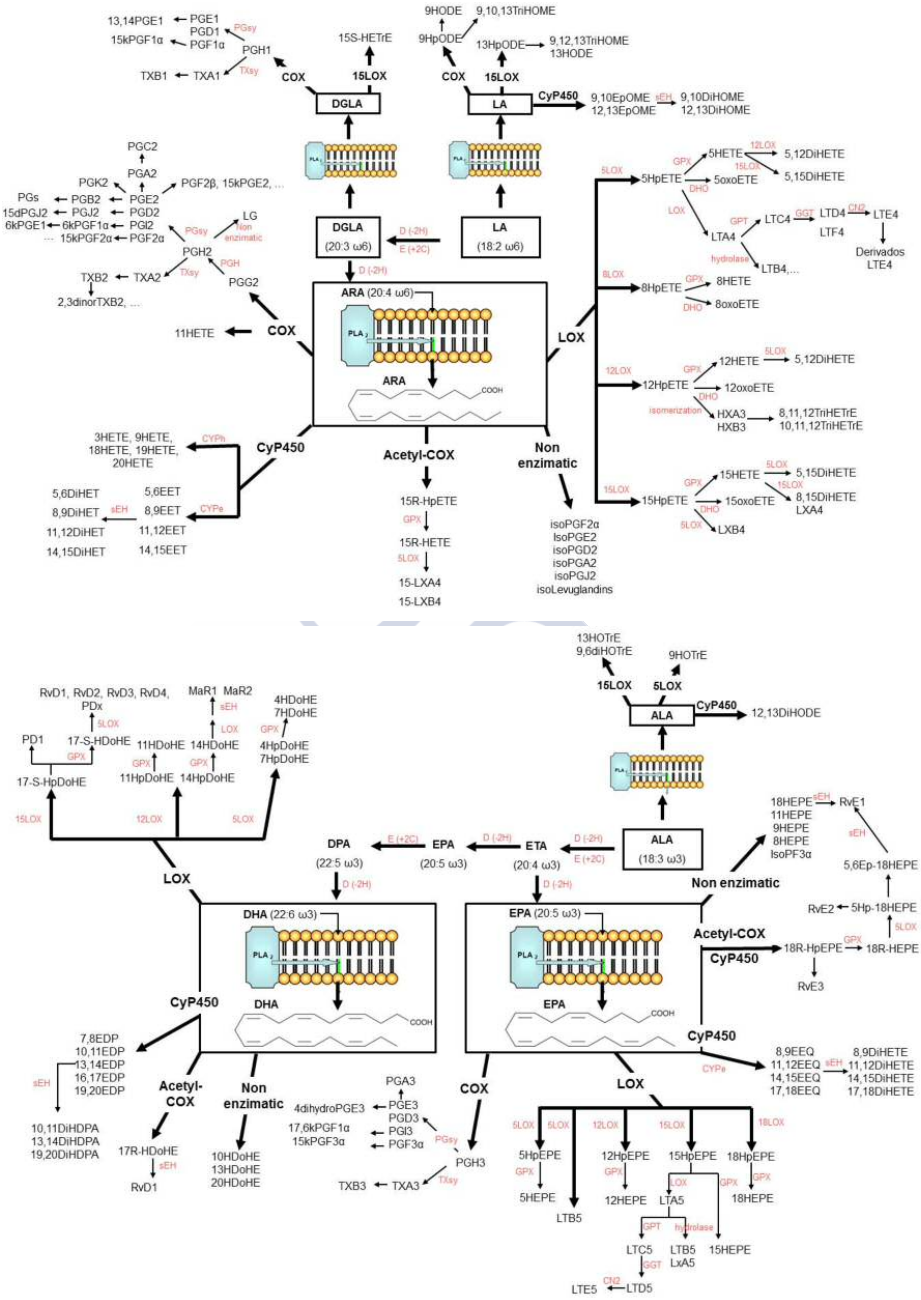


Fig. 1: Cascade of formation of lipid mediators from ω-6 LA, DGLA, and ARA and ω-3 ALA, EPA, and DHA.

The simultaneous analysis of the different families is a challenging task, mainly because of their low physiological levels, matrix effect, the low stability of many compounds [20], and the large number of isomers with similar physicochemical properties and mass

spectra that hinder their chromatography resolution and MS/MS identification [21]. Therefore, a highly sensitive and selective analytical procedure is essential to comprehensively study this class of lipids. Mass spectrometry has played a central role in quantitative assays for most of lipid mediators but also in their structural elucidation. While a great deal about the decomposition behavior of ω-6 metabolites is known, much about ω-3 remains to be understood. For many years, GC-MS was the method of choice [22]; nevertheless, the widespread LC-MS coupled with high-sensitivity ESI has provided a new approach for quantification, minimizing sample preparation requirements and particularly avoiding derivatization reactions [23]. Commonly, LC-MS/MS procedures follow the targeted strategy of MRM analysis. Published methods range from the analysis of few compounds [24,25] to more than one hundred in the same run [26–28]. Although these assays are sensitive and selective and cover a large number of metabolites, the main limitations regard to the trade-off between the decrease of sensitivity with the increase of the number of monitored compounds. In addition, MRM is limited to the analysis of a specific group of targeted compounds that operator must pre-define prior to the analysis. Therefore, the method is not suitable for a screening of the whole family of lipid mediators in biological samples unless a big number of expensive analytical standards are used to stablish the MS/MS transitions list.

Non-targeted LC-MS/MS strategies register the full mass spectra for each group of compounds with the same parent mass. Then, this method increases the information for structural elucidation of metabolites, and may be crucial for the identification of co-eluting isomers. Moreover, this procedure allows the hypothetical identification of many lipid mediators based on the study of fragmentation patterns without the need of pre-selecting a group of compounds that may or may not be presented in samples. Masoodi et al. [21] developed and validated an analytical methodology for the screening of lipid mediators combining the high mass resolution power of an Orbitrap, the study of MS/MS transitions, and sensibility of a linear ion trap for validation.

The aim of this research was to develop a sensitive and selective non-targeted MS/MS method that allows the simultaneous screening of more than 100 lipid mediators in a single run. Firstly, extraction from plasma and adipose tissue was carried out by SPE and the procedure was validated for most of the different families of lipid mediators. 65 analytical standards of the representative metabolites were used for recovery experiments. Secondly, a large number of mass spectra from the main ω-6 and ω-3 lipid mediators were studied and discussed, and MS/MS fragmentation patterns for the identification of each compound were suggested. Then, a 24 min LC-MS/MS method operating in Total Ion Scan Mode was optimized including the parent mass of the main families of compounds. Chromatographic gradient and mass spectrometry parameters were set for the representative group of 65 analytical standards. Finally, biological samples were analyzed and unknown peaks were tentatively identified matching specific MS/MS transitions with fragmentation patterns previously discussed. Identifications were further validated by using analytical standards. The proposed method innovatively incorporates an extensive study of the fragmentation patterns of

many lipid mediators from different families, and the use of non-targeted MS/MS strategies for the screening of biological samples without the limitation to analyze a reduced group of compounds.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

Thromboxane B_3 (TXB_3), prostaglandin D_3 (PGD_3), prostaglandin E_3 (PGE_3), prostaglandin D_2 (PGD_2), prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin B_2 (PGB_2), prostaglandin J_2 (PGJ_2), resolvin D_1 (RvD_1), resolvin D_2 (RvD_2), maresin R_1 (MaR_1), protectin D_x (PD_x, 10(S),17(S)-dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid), leukotriene B_4 (LTB_4), leukotriene C_4 (LTC_4), isoprostane $F_{2\alpha}$ ($8isoPGF_{2\alpha}$), isoprostane $F_{3\alpha}$ ($8isoPGF_{3\alpha}$), 15HpEPE (15(S)-hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-eicosapentaenoic acid), 12HpEPE (12(S)-hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid), 15HpETE (15(S)-hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid), 12HpETE (±12-hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid), 5HpETE (5(S)-hydroperoxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid), 17HpDoHE (17(S)-hydroperoxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid), 18HEPE (±18-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid), 15HEPE (±15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-eicosapentaenoic acid), 12HEPE (±12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid), 11HEPE (±11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid), 5HEPE (±5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid), 17-18DiHETE (±17,18-dihydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid), 17-18EpETE (±17,18-epoxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid), 11-12EpETE (±11,12-epoxy-5Z,8Z,14Z,17Z-eicosatetraenoic acid), 14-15EpETE (±14,15-epoxy-5Z,8Z,11Z,17Z-eicosatetraenoic acid), 8-9EpETE (±8,9-epoxy-5Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoic acid), 20HETE (±20-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid), 15HETE (±15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid), 12HETE (±12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid), 11HETE (±11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraenoic acid), 5HETE (±5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid), 14-15DiHETE (±14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z,17Z-eicosatetraenoic acid), 5-15DiHETE (5(S),15(S)-dihydroxy-6E,8Z,10Z,13E-eicosatetraenoic acid), 5-6DiHETE (±5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoic acid), 11-12DiHETrE (±11,12-dihydroxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic acid), 11-12EpETrE (±11,12-epoxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic acid), 8-9DiHETrE (±8,9-dihydroxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid), 8-9EpETrE (±8,9-epoxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid), 14-15DiHETrE (±14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic acid), 14-15EpETrE (±14,15-epoxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic acid), 5-6DiHETrE (±5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid), 5-6EpETrE (±5,6-epoxy-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid), 17HDoHE (±17-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid), 14HDoHE (14(S)-hydroxy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-docosahexaenoic acid), 11HDoHE (±11-hydroxy-4Z,7Z,9E,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid), 4HDoHE (±4-hydroxy-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-

docosahexaenoic acid), 19-20DiHDPA (±19,20-dihydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoic acid), 19-20EDP (±19,20-epoxy-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoic acid), 7(S)-17(S)dihydroxy-8E,10Z,13Z,15E,19Z-docosapentaenoic acid), 10-11EDP (±10,11-epoxy-4Z,7Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoic acid), 16-17EDP (±16,17-epoxy-4Z,7Z,10Z,13Z,19Z-docosapentaenoic acid), 7-8EDP (±7,8-epoxy-4Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoic acid), 13-14EDP (±13,14-epoxy-4Z,7Z,10Z,16Z,19Z-docosapentaenoic acid), 15oxoETE (15-oxo-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid), 12oxoETE (12-oxo-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid), 5oxoETE (5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid), 12HETE-d_8 (12(S)-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d_8 acid), EPA (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid), DHA (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid), and ARA (5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid) were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). The suppliers stated purities higher than 96% for all standards. Methanol and Water, Optima LC-MS grade, were purchased from Fisher Scientific (New Jersey, USA); methyl formate was purchased from Sigma Aldrich (Poole, UK); n-hexane was provided by Merk (Darmstadt, Germany) and ethanol, formic acid and hydrochloric acid were from AnalR Normapur (Fontenai, France). SPE cartridges (Oasis-HLB, 60 mg, 3 mL) were supplied by Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Plasma and adipose tissue samples

Blood from rats from a previous experiment was collected and processed as described [29]. Total abdominal fat, corresponding to the sum of epididymal, perirenal and mesenteric depots was excised, washed with 0.9% NaCl solution, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen upon sacrifice.

2.3. SPE

Lipid mediators from plasma samples were extracted following a modified SPE method previously described [30]. Briefly, a solution of cold methanol: water (30:70, v/v) was used to extract metabolites from 200 µL of spiked plasma with internal standard 12-HETE-d8. After centrifugation, remaining solution was loaded into conditioned Oasis-HLB cartridges (60mg, 3mL, Waters, MA-USA) with 5 mL methanol (0.5% BHT) and 5 mL water in succession. Then, cartridges were washed with 5 mL cold water, 5 mL cold methanol: water (15:75, v/v), and 2.5 mL cold hexane in succession. After sorbent dryness, compounds were eluted with 2 mL of cold methyl formate (0.1% BHT). Extracts were evaporated to dryness in a speed-Vacuum system and the residue was dissolved in 30 µL cold ethanol and stored at -80 ºC prior to LC-MS/MS analysis.

Metabolites from adipose tissue were extracted using a modified method of a published protocol [31]. 150 mg freeze-tissue were cut, spiked with internal standard 12-HETE-d8 and extracted by adding 1 mL cold-methanol (0.5% BHT) and sonication for 1min under 0.6 sec cycle and 100% of amplitude (Labsonic sonifier from Sartorius-

Germany). Samples were incubated on ice for 10 min and then centrifuged at 800 g for 10 min, at 4 ºC, to remove potential proteins that may cause interference. Supernatant was transferred to a clean amber glass vial and pellet was subjected to a second extraction in methanol and sonication as described. Both supernatants were collected together and final pellet was washed with 500 µL cold methanol: water (30:70, v/v) twice. The pooled fractions were diluted with 4.6 mL of cold water to a final solution of methanol: water (30:70, v/v). Then, samples were loaded to SPE cartridges following the same procedure as plasma samples.

2.4. LC-MS/MS

Chromatographic separation was carried out on a Dionex UltiMate 3000 Series (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) that includes a binary pump, a degasser system and a thermostated autosampler. Compounds were separated on a C18-Symmetry column, 150×2.1 mm, 3.5 µm (Waters, Milford, MA, USA) protected with a 4×2mm C18 guard cartridge provided by Phenomenex (Torrance, CA, USA). A binary eluent system of water (A) and methanol (B), both with 0.02% (v/v) of formic acid, was used as mobile phase. The gradient was: 0-1 min (60% B), 2-12 min (80% B), 13-18 min (100% B), and 19-24 min (60% B). The flow rate was set to 0.2 mL/min, the column effluent was directly introduced in the ESI interface without splitting, and injection volume was set to 10 µL. The column was maintained at room temperature and extracts were kept at 4 ºC in the autosampler. Mass spectrometry analyses were carried out on a linear ion trap LTQ Velos Pro (Thermo Fisher). Operating conditions of the ESI source were negative ion mode with a sheath gas flow rate of 40 units, spray voltage of 5.5 kV, capillary temperature of 300 ºC and S-lens radio-frequency level of 60%. Nitrogen was used as nebulizing and drying gas and helium was the collision gas. Instrument control and data acquisition were done with Xcalibur software. Compounds were divided into 22 groups according to the *m/z* of their parent ion. Acquisition was set as full scan mode ranged from 90 to 400 *m/z* units with the 22 parent masses in a single segment during the whole run. Collision energies for each *m/z* are summarized in Tab. 1 and they were set as a compromise among the most common used in other works and optimized collision energies for 65 analytical standards used for validation purposes.

Parent mass (*m/z*)	Collision Energy (V)	Family of lipid mediators	Some examples
301	25	PUFAs-ω3	EPA
303	30	PUFAs-ω6	ARA
317	28	HEPEs	5HEPE, 8HEPE, 12HEPE
		EpETEs	17-18EpETE
		oxoETEs	12oxoETE, 5oxoETE
		LTs	LTA4
319	30	HETEs	9HETE, 11HETE, 15HETE
		EpETrEs	11-12EpETrE, 14-15EpETrE
326	27	internal stand	12HETE-d8
327	27	PUFA-ω3	DHA
331	30	PGs	PGA3, PGB3
333 & 315	27	HpEPEs	5HpEPE, 12HpEPE
333	27	Rvs	RvE2
		PGs	PGJ2, PGB2
335 & 317	30	HpETEs	11HpETE, 12HpETE
335	30	DiHETEs	5-12DiHETE, 17-18DiHETE
337	30	DiHETrEs	11-12DiHETrE, 8-9DiHETrE
343	28	EDPs	10-11EDP
		HDoHEs	4HDoHE, 17HDoHE, 20HDoHE
349	30	PGs, k-PGs	PGD3, PGE3, 15k-PGE2
		Rvs	RvE1
		LXs	LXA5
351	28	PGs, k-PGs	PGE2, PGF3α, 15k-PGF2α
		TXs	TXA2
		LXs	LXA4, LXB4
353	30	PGs, k-PGs	PGF2α, 15-k-PGF1α
359 & 341	26	HpDoHEs	4HpDoHE, 17HpDoHE
359	26	PDs	PDx
		MaRs	7-MaR1
361	28	DiHDPAs	19-20DiHDPA
367	20	PGs, k-PGs	PGG2, 6-k-PGE1
		TXs	TXB3
369	30	TXs	TXB2
		k-PGs	6-k-PGF1α
375	27	Rvs	RvD1, RvD2
624	26	LTs	LTC4

Tab. 1: MS/MS conditions of the Total Ion Scan Mode method developed. More than 100 compounds were classified in 22 groups according to the *m/z* of their parent ions in negative ESI. Compromise collision energies used for each *m/z* are shown. The families of lipid mediators studied in each parent mass of the method are indicated as well as some examples of metabolites.

2.5. Method validation: linearity, calibration curves, repeatability, reproducibility, LOD, LOQ, recovery experiments, and matrix effect.

Eight batches of calibration solutions were used to determine the dynamic linear range of response for each of the 65 analytical standards in the range between 1 and 1000 ng/mL. With the exception of ARA, EPA and DHA whose concentration in biological samples is higher; and thus, linearity were evaluated in the range between 0.1 and 50 µg/mL. The calibration curves were calculated using least-squares linear regression. The internal standard (12HETE-d_8) was included in all calibration solutions at 500 ng/mL. The reproducibility (inter-day) and repeatability (intra-day) of the instrument was evaluated at three levels of concentration (n=4) for each compound: 1, 50, and 1000 ng/mL; and 0.1, 10, 50 µg/mL for PUFAs. LODs and LOQs were estimated by using signal-to-noise (S/N) ratios of 3 and 10, respectively. In Tab. 2 are summarized the retention times, MS/MS transitions selected for quantification purposes, linearity measured by R^2, repeatability, reproducibility, LODs, and LOQs of these 65 analytical standards.

Sample recoveries were determined comparing spiked plasma and adipose tissue samples with analytical standards at the same level of concentration. Different recovery experiments were performed depending on the moment when compounds were spiked. The percentage of global recovery was evaluated comparing samples spiked from the beginning with standards, the percentage of SPE recovery was determined comparing samples spiked from the beginning with samples spiked after the SPE step, and matrix effect was evaluated comparing values of samples spiked after the SPE extraction with analytical standards. Experiments were done in triplicate and the repeatability of the entire method was expressed as percentage of relative standard deviation (%RSD). Results are shown in Tab. 3.

2.6. Samples analysis and validation

Plasma and adipose tissue were subjected to SPE-LC-MS/MS and compounds were tentatively identified according to the parent mass and the comparison between the mass spectra obtained and the fragmentation pattern studied. Then, other samples were spiked before extraction with a pool of 65 standards described in the chemical section. Spiked samples were analyzed under the same LC-MS/MS conditions than non-spiked ones, and hypothetical identifications were validated. Results are shown in Tab. 4.

Compound	Retention time (min)	MS/MS quantification	Linearity (R^2)	Repeatability (%RSD)			Reproducibility (%RSD)			LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
				1	50	1000	1	50	1000		
15HEPE	11,96	317>247	0,9996	1	1	3	11	1	3	0,37	1,24
18HEPE	11,55	317>259	0,9999	7	1	1	7	2	3	0,18	0,58
12HEPE	12,62	317>208	1	3	3	3	6	3	7	0,01	0,03
5HEPE	14,17	317>115	0,9999	3	0	2	7	2	8	0,37	1,25
11HEPE	12,13	317>195	0,9995	8	0	1	11	1	6	0,13	0,43
11HETE	15,32	319>167	0,9968	4	4	8	18	8	9	0,06	0,21
5HETE	15,96	319>115	0,9807	13	9	2	14	7	2	0,07	0,24
12HETE	15,48	319>179	0,9991	4	3	7	7	7	8	0,03	0,11
15HETE	14,83	319>219	0,9962	12	2	4	11	10	4	0,07	0,25
20HETE	13,69	319>245	0,9988	4	2	2	11	4	4	0,53	1,76
4HDoHE	16,08	343>281	0,9997	2	10	9	14	8	9	0,04	0,15
17HDoHE	15,19	343>245	0,9998	5	3	2	10	4	5	0,29	0,96
14HDoHE	15,43	343>205	0,9907	3	6	5	6	10	8	0,10	0,33
11HDoHE	15,67	343>149	0,9985	10	6	6	9	8	5	0,07	0,25
15OxoETE	13,69	317>113	0,9999	13	3	1	13	8	2	1,58	5,27
12OxoETE	14,83	317>153	0,9944		3	3		71	27	1,21	4,03
5OxoETE	15,95	317>203	0,9974	7	9	5	14	8	4	0,11	0,38
15HpEPE	11,93	333/315>271	0,9986		2	2		14	3	0,59	1,95
12HpEPE	12,42	333/315>271	0,9996	10	1	1	10	23	9	0,29	0,95
12HpETE	15,39	335/317>153	0,9998	15	0	3	15	29	3	0,50	1,65
5HpETE	15,86	335/317>155	0,962		13	7		16	9	6,48	21,59
15HpETE	14,83	335/317>113	0,9991		3	1		9	1	17,65	58,84
17HpDoHE	15,12	359/341>297	0,9998	13	1	3	11	5	3	1,05	3,51
14,15-DiHETE	8,58	335>207	0,9998	9	1	1	12	1	1	0,53	1,78
5,15-DiHETE	7,93	335>235	0,9983	10	0	5	15	17	8	0,18	0,61
5,6-DiHETE	10,56	335>145	0,9994	1	3	2	1	9	5	0,95	3,16
11,12-DiHETrE	10,68	337>167	0,9988	3	1	3	8	3	2	0,05	0,16
8,9-DiHETrE	11,66	337>185	0,9999	5	2	1	7	4	8	0,17	0,55
14,15-DiHETrE	10,03	337>207	0,9989	7	2	4	19	3	4	0,12	0,39
5,6-DiHETrE	13,87	337>145	0,9988	5	3	2	7	4	3	0,10	0,35
19,20-DiHDPA	10,6	361>273	0,9996	5	0	1	9	4	4	0,17	0,55
17,18-DiHETE	8,5	335>247	0,9989	2	3	2	13	6	4	0,46	1,54
7,17-hydroxiDPA	8,22	361>263	1	14	2	3	14	11	9	0,43	1,45
11,12-EpETrE	16,12	319>179	0,989	13	9	11	11	7	9	0,17	0,58
8,9-EpETrE	16,2	319>155	0,9516	12	12	11	23	20	9	0,13	0,42
14,15-EpETrE	15,8	319>219	0,992	11	15	7	11	13	6	0,26	0,87
5,6-EpETrE	16,28	319>191	0,995	15	12	5	15	65	29	0,41	1,38
17,18-EpETE	13,85	317>259	0,9999	2	1	6	11	8	9	0,19	0,63
11,12-EpETE	15,07	317>179	0,9969	4	3	7	9	6	6	0,24	0,81
14,15-EpETE	14,83	317>207	0,9987	6	2	4	15	12	11	0,27	0,91
8,9-EpETE	15,32	317>155	0,9998	19	3	6	13	5	5	0,50	1,67
19,20-EDP	15,84	343>241	0,9945	11	5	6	18	10	14	0,30	0,99
10,11-EDP	16,08	343>153	0,9976	2	6	8	10	19	12	0,14	0,45
16,17-EDP	16	343>233	0,9487	11	7	3	16	5	7	0,24	0,79
7,8-EDP	16,24	343>141	0,9918	7	6	7	24	20	11	0,30	0,99
13,14-EDP	16	343>193	0,9934	14	14	12	15	13	22	0,21	0,69
LTB4	8,5	335>195	0,9993	4	3	4	17	17	11	0,08	0,27
LTC4	9,05	624>272	0,9984	10	3	6	11	5	5	0,20	0,67
PGB2	6,62	333>175	0,9999	13	2	1	12	7	9	0,26	0,86
PGJ2	6,62	333>175	0,9975	22	3	4	22	11	8	0,75	2,51
PGE2	5,64	351>251	0,9997		4	3		4	2	3,88	12,95
PGD2	5,64	351>251	0,9979		7	2	2	5	2	4,33	14,45
PGD3	5,14	349>313	0,9985	1	1	2	1	1	2	0,10	0,30
PGE3	5,14	349>313	0,9985	1	1	2	1	1	2	0,10	0,30
8isoPGF3α	4,97	351>253	0,996	7	4	3	14	14	16	0,22	0,73
8isoPGF2α	5,47	353>299	0,9936	8	3	2	8	3	2	0,06	0,20
MaR-1	8,09	359>177	0,9998	5	2	5	9	4	4	0,21	0,71
PDx	7,67	359>153	0,9984	3	1	3	3	3	4	0,05	0,16
TXB3	5,05	367>195	0,9981	1	3	2	10	4	2	0,06	0,21
RvD1	6	375>141	0,9958	1	1	2	1	1	2	0,02	0,07
RvD2	5,56	375>141	0,9988	4	2	2	9	7	3	0,12	0,39
12HETE-d8	15,43	326>183		5	6	4	5	6	4	0,002	0,006
ARA	17,34	303>259	0,9677	7	6	12	7	11	11	1,96	6,53
EPA	16,92	301>257	0,9923	13	15	8	11	16	12	0,28	0,93
DHA	17,27	327>283	0,9925	10	13	11	7	10	15	0,18	0,59

Tab. 2: Retention times, MS/MS quantification transitions (*m/z*), linearity by least-squares linear regression (1 to 1000 ng/mL except for PUFAs: 0.1 to 50 µg/mL), intra-day repeatability (n=4) and inter-day reproducibility (n=4) of LC-MS assay at three concentration levels (1-50-1000 ng/mL except for PUFAs: 0.1-10-50 µg/mL), LOD, and LOQ of the 65 analytical standards.

Compound	%RSD (n=3)		%Global Recovery		%SPE Recovery		%Matrix Effect	
	Plasma	Adipose	Plasma	Adipose	Plasma	Adipose	Plasma	Adipose
15HEPE	9	9	91	87	102	88	88	99
18HEPE	7	6	85	81	107	95	80	85
12HEPE	10	6	84	94	103	94	82	100
5HEPE	8	7	84	64	107	90	79	71
11HEPE	2	6	93	86	115	94	81	92
11HETE	18	3	75	91	93	96	73	95
5HETE	15	11	144	155	113	115	199	122
12HETE	3	6	91	67	97	109	86	58
15HETE	5	12	86	81	101	108	85	75
20HETE	9	9	95	92	107	101	89	91
4HDoHE	7	5	489	442	101	97	494	580
17HDoHE	2	9	84	78	111	78	76	101
14HDoHE	9	10	85	66	101	95	84	70
11HDoHE	8	0	81	81	108	91	75	84
15OxoETE	7	8	87	54	104	92	84	59
12OxoETE	3	14	94	52	107	80	90	65
5OxoETE	15	6	379	294	101	72	344	409
15HpEPE	2	9	17	22	87	89	10	25
12HpEPE	0	6	7	18	29	60	25	33
12HpETE	4	21	27	28	92	90	26	30
5HpETE	16	11	53	71	64	105	83	67
15HpETE	0	23	37	44	57	71	66	67
17HpDoHE	3	12	24	19	86	94	14	21
14,15-DiHETE	7	10	95	90	92	93	103	97
5,15-DiHETE	4	8	92	86	99	94	94	92
5,6-DiHETE	12	8	61	95	75	96	82	99
11,12-DiHETrE	3	12	69	35	82	41	83	83
8,9-DiHETrE	7	18	82	36	92	42	90	84
14,15-DiHETrE	2	7	59	35	91	40	64	85
5,6-DiHETrE	6	10	83	34	93	42	88	80
19,20-DiHDPA	1	15	78	37	91	41	85	87
17,18-DiHETE	1	52	87	59	99	63	88	89
7,17-hydroxiDPA	1	27	74	33	89	42	82	79
11,12-EpETrE	1	19	447	142	107	45	397	341
8,9-EpETrE	3	30	334	121	107	45	309	266
14,15-EpETrE	9	29	179	41	114	38	143	145
5,6-EpETrE	7	20	228	104	103	38	211	276
17,18-EpETE	2	22	86	35	100	50	84	72
11,12-EpETE	3	13	78	37	102	45	76	80
14,15-EpETE	0	16	70	36	100	44	70	81
8,9-EpETE	0	21	69	34	101	47	69	69
19,20-EDP	4	10	185	51	134	45	129	110
10,11-EDP	21	30	394	159	105	46	396	346
16,17-EDP	2	17	469	194	111	53	404	333
7,8-EDP	10	8	238	114	108	50	228	237
13,14-EDP	1	19	471	191	109	50	433	336
LTB4	8	7	82	52	98	96	78	54
LTC4			0	0	0	0	60	65
PGB2	2	6	97	68	115	93	85	73
PGJ2	5	9	81	67	97	88	83	76
PGE2	8	8	81	82	101	90	80	91
PGD2	7	67	128	46	109	94	118	51
PGD3/PGE3	10	n.e.	94	n.e.	94	n.e.	100	n.e.
8isoPGF3α	14	11	45	33	50	43	103	79
8isoPGF2α	8	n.e.	86	n.e.	85	n.e.	102	n.e.
MaR-1	3	1	108	73	124	111	87	60
PDx	12	5	97	75	102	103	96	74
TXB3	7	11	48	36	61	55	78	68
RvD1	12	n.e.	85	n.e.	75	n.e.	89	n.e.
RvD2	10	9	63	56	98	86	64	65
12HETE-d8	15	6	73	60	91	94	76	64
ARA	4	n.e.	100	n.e.	111	n.e.	90	n.e.
EPA	6	n.e.	98	n.e.	106	n.e.	93	n.e.
DHA	3	n.e.	88	n.e.	123	n.e.	71	n.e.

Tab. 3: Repeatability of the SPE-LC-MS assay, Global Recovery (SPE-LC-MS), extraction recovery (SPE), and matrix effect (LC-MS) for spiked plasma and adipose tissue samples (n=3). n.e. (non-evaluated)

Parent ion *m/z*	Identified compounds in adipose tissue		Identified compounds in plasma		Specific transitions *m/z*
	Screening analysis (hypothetic identification)	Validation with standards (confirmation/rejection)	Screening analysis (hypothetic identification)	Validation with standards (confirmation/rejection)	(most intense-non specific)
317	18HEPE	confirmation	18HEPE	confirmation	287, 259
	15HEPE	confirmation	15HEPE	confirmation	247, 219
	12HEPE	confirmation	12HEPE	confirmation	207, 179
	11HEPE	confirmation	11HEPE	confirmation	195, 167
	9HEPE				167, 139
	5HEPE	confirmation	5HEPE	confirmation	115, 87
	12oxoETE	confirmation	12oxoETE	confirmation	207, 179, (153)
	15oxoETE	rejection			247, 219, (113)
	5oxoETE	rejection	5oxoETE	rejection	115, 87, (203)
319			20HETE	confirmation	317, 289, (245)
	15HETE	confirmation	15HETE	confirmation	247, 219
	12HETE	confirmation	12HETE	confirmation	207, 179
	11HETE	confirmation	11HETE	confirmation	195, 167
	5HETE	rejection	5HETE	rejection	115, 87
	5-6EpETrE	confirmation	5-6EpETrE	confirmation	115, 87
	11-12EpETrE	confirmation			207, 179, 167
	14-15EpETrE	confirmation	14-15EpETrE	confirmation	249, 221, 207
343	20HDoHE		20HDoHE		313, 285, (187)
	17HDoHE	confirmation	17HDoHE	confirmation	273, 245
	16HDoHE				261, 233
	14HDoHE	confirmation	14HDoHE	confirmation	233, 205
	13HDoHE		13HDoHE		221, 193
	11HDoHE	confirmation			193, 165, (149)
			10HDoHE		181, 153
	8HDoHE				153, 125, (189), (109)
	4HDoHE	confirmation	4HDoHE	confirmation	115, 101, 73
359-341		17HpDoHE		17HpDoHE	297
335	8-15DiHETE				265, 155
	14-15DiHETE	confirmation	14-15DiHETE	confirmation	265, 219, 247, 207
	5-12DiHETE=LTB4	rejection	5-12DiHETE=LTB4	rejection	195, 129
	11-18DiHETE		11-18DiHETE		289, 165, 193
	5-6DiHETE	confirmation	5-6DiHETE	confirmation	115, (145)
	11-12DiHETE		11-12DiHETE		234, 222, 193, 165
333-315			12HpEPE	confirmation	207, 227, 179
351	PGE2-PGD2	confirmation	PGE2-PGD2	confirmation	251
303	ARA	confirmation	ARA	confirmation	259
301	EPA	confirmation	EPA	confirmation	257
327	DHA	confirmation	DHA	confirmation	283
337	14-15DiHETrE	confirmation			207, 129

Tab. 4: Compounds tentatively identified in adipose tissue and plasma, validation with standards, and specific transitions used for our hypothetical identification.

3. Results and discussion

3.1. SPE-LC-MS/MS validation

The methodology applied for the extraction and analysis of lipid mediators, SPE-LC-MS/MS, was validated by using 65 reference standards from the main groups of compounds. Results are summarized in Tab. 2. The linear dynamic range of response was observed between 1 ng/mL and 1000 ng/mL for each compound. R^2 values were higher than 0,99 for most compounds. LOD and LOQ ranged between 0,01 to 17,65 ng/mL and 0,03 to 58,84 ng/mL, respectively. The instrumental intra-day repeatability and inter-day reproducibility response at low, middle and high concentration ranges for each metabolite (n=4) showed acceptable precision below 15 %RSD for almost all compounds in any concentration level.

Finally, Tab. 3 shows the repeatability of the entire optimized method, the global recovery, SPE recovery, and matrix effects for spiked samples. The %RSD obtained in the different set of recovery experiments ranged between 0,01-21 in plasma and 0,4-67 in adipose tissue, and they were slightly higher than instrumental %RSD. Thus, the precision of the entire protocol is mainly controlled by the sample extraction rather than by the mass analyzer. Global recoveries ranged between 7-489% in plasma and 18-442% in adipose tissue, and recoveries of the SPE step were around 100±15% for most of the compounds in plasma and lower in adipose (ranged between 40-115%). The main parameter that affected the global recovery of the method was the matrix effect. In plasma samples it ranged between 10-494% and in adipose tissue between 21-580%. There might be multiple reasons for the loss/gain of signal in the mass spectrometer. The main cause is the ion suppression or the enhance of the $[M-H]^-$ precursor ions of analytes in the ESI source due to co-eluting substances from the matrix.

3.2. Fragmentation patterns through the analysis of mass spectra of lipid mediators

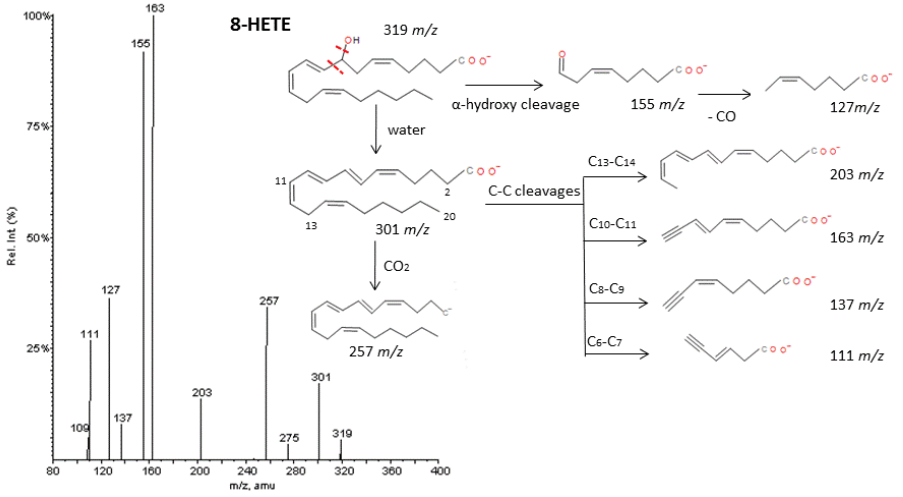
It is presented an extensive study of database MS/MS spectra of over 100 compounds from the main families of ARA, EPA and DHA lipid mediators. Most of MS/MS spectra and/or stereochemical structure of compounds were obtained from the database of *lipidmaps*. Specific cleavages in the molecules that depend on the location of functional groups allowed differentiating between isomers of the same family. Similarly, compounds with different structure but the same *m/z* of the parent ion showed different patterns of fragmentation. However, for some metabolites it is difficult to find one intense and specific transition that leads to unambiguous identifications. Then, considering several fragments from spectra could be more appropriate to distinguish many of the studied compounds.

In the next paragraphs, fragmentation patterns for the different families of lipid mediators are discussed, and specific cleavages aimed to identify the different chemical isomers were suggested. Most of the collision-induced decompositions suggested have been also discussed by previous published works. Specially, those compounds derived

from the metabolism of ARA [32]. However, to the best of our knowledge, fragmentations of some studied compounds have been innovatively proposed in this work. In addition to the study of mass spectra, it is also pointed the main difficulties in the identification of some isomers, common false positive identifications, and so on.

3.2.1. Monohydroxides

It was observed a common fragmentation pattern between monohydroxides of ARA (HETEs), EPA (HEPEs), and DHA (HDoHEs) that was independent from the number of carbons of the precursor PUFA. MS/MS spectra showed common intense product ions that involved the cleavage of the hydroxyl group (-18 *m/z* units, loss of H_2O) and further loss of 44 *m/z* units (CO_2) [33]. Murphy et al. [32] have suggested that ARA hydroxides produced a sort of carbon-carbon cleavages with retention of the charge in the carboxyl group and unsaturation of the carbon chain stabilized by resonance due to the high unsaturation of the molecules. These cleavages gave rise to several common product ions between all isomers. The specific transitions that allowed differentiating these HETEs were originated from the cleavage of a carbon-carbon bond adjacent to the hydroxyl group (α-hydroxy cleavage) at the allylic position with a transfer of a proton to the unsaturated site [34]. We have suggested the same behavior for EPA and DHA hydroxides based on the analyzed spectra due to similarities in chemical structures with ARA hydroxides. The *m/z* of the resulting aldehyde and/or ketone depended on the position of the hydroxyl group and thus, it allowed unambiguous determination of the regioisomers. The aldehyde also produced a specific fragment by a concomitant loss of 28 *m/z* units (loss of CO). In the Fig. 2 are explained in detail the fragmentation pattern of 8HETE, 12HEPE, and 17HDoHE as an example of hydroxides from each group. Similar patterns were found for the other studied regioisomers whose spectra were available at *lipidmaps*. A total of eight HETEs, seven HEPEs, and ten HDoHEs were analyzed and fragmentations are shown in Supp. Mat. 1.



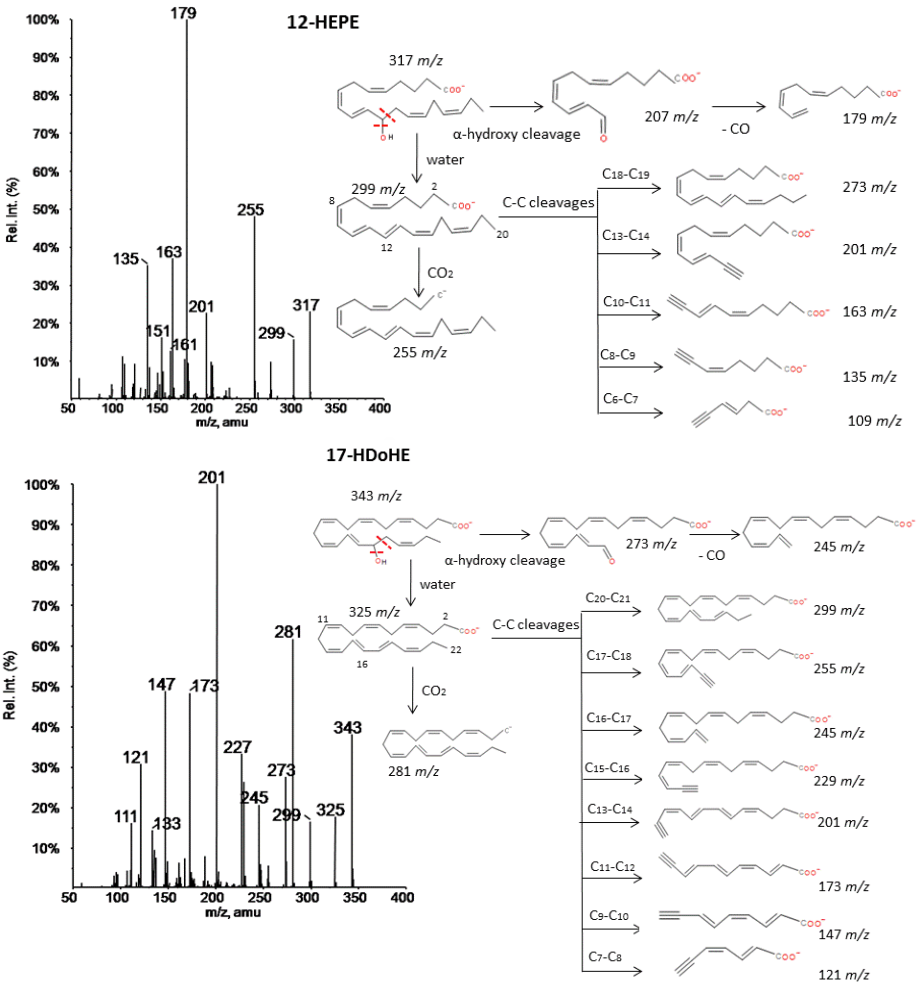
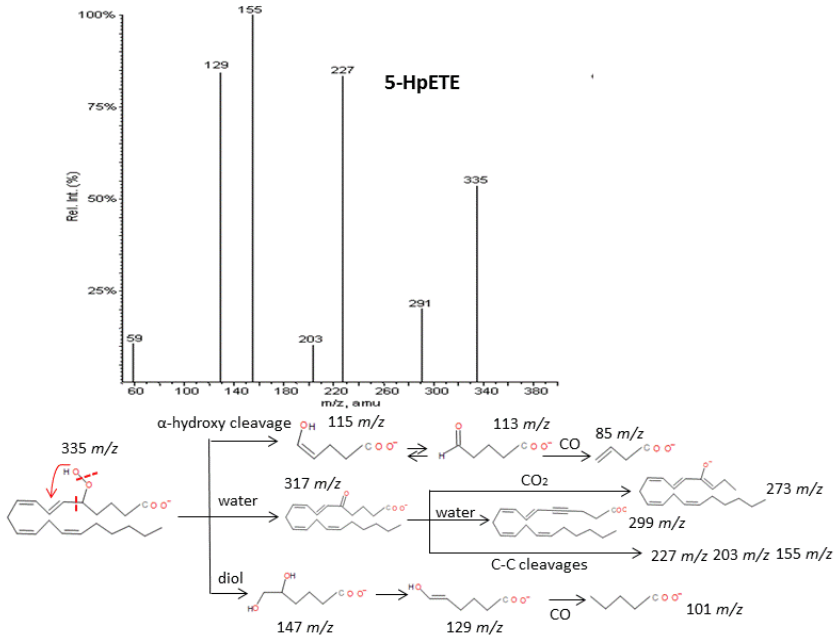


Fig. 2: Fragmentation pattern suggested for ARA, EPA, and DHA hydroxides, common cleavages and specific transitions for 8HETE, 12HEPE, and 17HDoHE. Product ion spectra at 319 *m/z* for 8HETE, 317 *m/z* for 12HEPE, and 343 *m/z* for 17HDoHE were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

3.2.2. Hydroperoxides

Just go forward our findings: a common pattern of fragmentation was suggested according to the studied spectra of HpETEs, HpEPEs and HpDoHEs (Fig. 3 and Supp. Mat. 2) based on the highly reactivity of the functional group with nearby double bonds. The characteristic fragmentation suggested was very similar to the analogous hydroxides and independent from the number of carbons of the precursor PUFA. For regioisomers without spectra available in database, specific fragments were hypothesized based on the stechiometric structure (Tab. 5). The loss of 2 molecules of H_2O, CO_2, and carbon-carbon bond cuts produced a sort of common fragments between isomers. The location of the hydroperoxy group in the chain determined the formation

of characteristic fragments that allowed differentiating the isomers of each PUFA. As for corresponding hydroxides, the α-hydroxy cleavage of carbon-carbon bond resulted into an aldehyde with characteristic *m/z* and further loss of CO. Generally, most intense fragments were produced by the α-hydroxy cleavage with stabilization of the hydroperoxyl group in a diol structure, and then the loss of H_2O and formation of an enol stabilized by resonance. A total of seven hydroperoxide spectra were studied and specific fragments were suggested for other seventeen isomers.



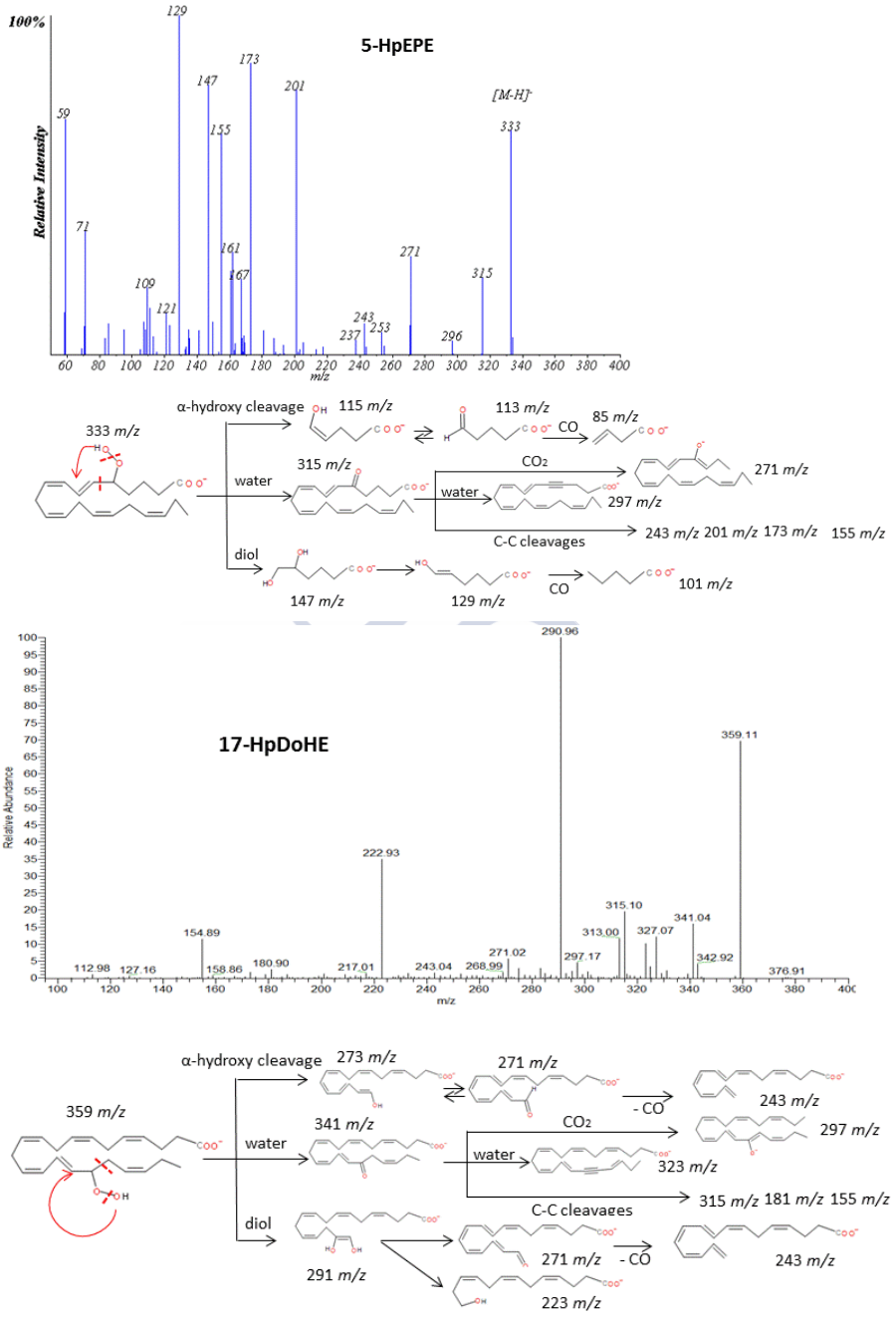


Fig. 3: Fragmentation pattern suggested for ARA, EPA, and DHA hydroperoxides, common cleavages and specific transitions for 5HpETE, 5HpEPE, and 17HpDoHE. Product ion spectra at 335 *m/z* for 5HpETE, 333 *m/z* for 15HpEPE, and 359 *m/z* for 17HpDoHE were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

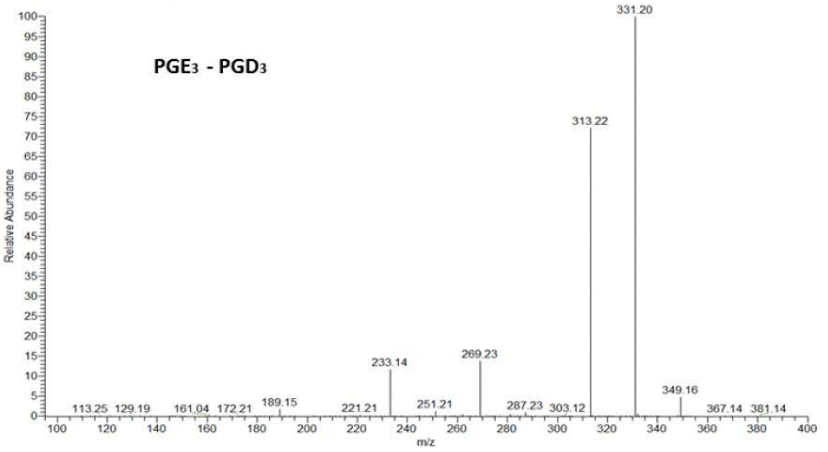
Parent mass *m/z*	Family	Isomers	Specific fragments from α-hydroxy cleavage *m/z*	Specific fragments from diol *m/z*
359	HpDoHE	4HpDoHE	101, 99, 71	121, 101, 73
		7HpDoHE	141, 139, 111	161, 141, 113
		8HpDoHE	153, 151, 123	173, 153, 125
		10HpDoHE	181, 179, 151	201, 181, 153
		13HpDoHE	221, 219, 191	241, 221, 193
		14HpDoHE	233, 231, 203	253, 233, 205
		16HpDoHE	261, 259, 231	281, 261, 233
		20HpDoHE	313, 311, 283	333, 313, 285
333	HpEPE	8HpEPE	155, 153, 125	175, 155, 127
		9HpEPE	167, 165, 137	187, 167, 139
		11HpEPE	195, 193, 165	213, 193, 165
		18HpEPE	287, 285, 257	307, 287, 259
335	HpHETE	8HpETE	155, 153, 125	175, 155, 127
		9HpETE	167, 165, 137	187, 167, 139
		11HpETE	195, 193, 165	213, 193, 165
		19HpETE	303, 301, 273	321, 301, 273
		20HpETE	317, 315, 287	335, 315, 287

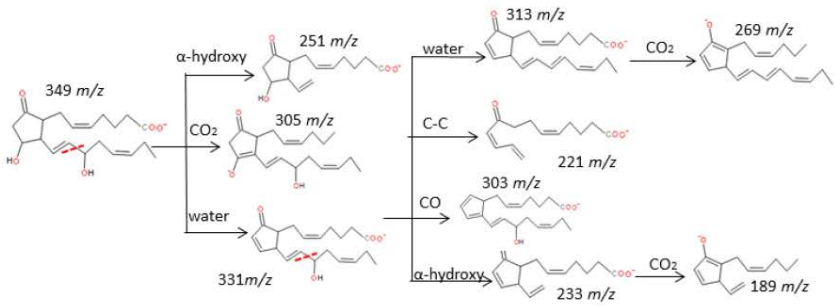
Tab. 5: Hypothesized specific fragments produced from different isomers of ARA, EPA and DHA hydroperoxides based on the chain position of –OOH group.

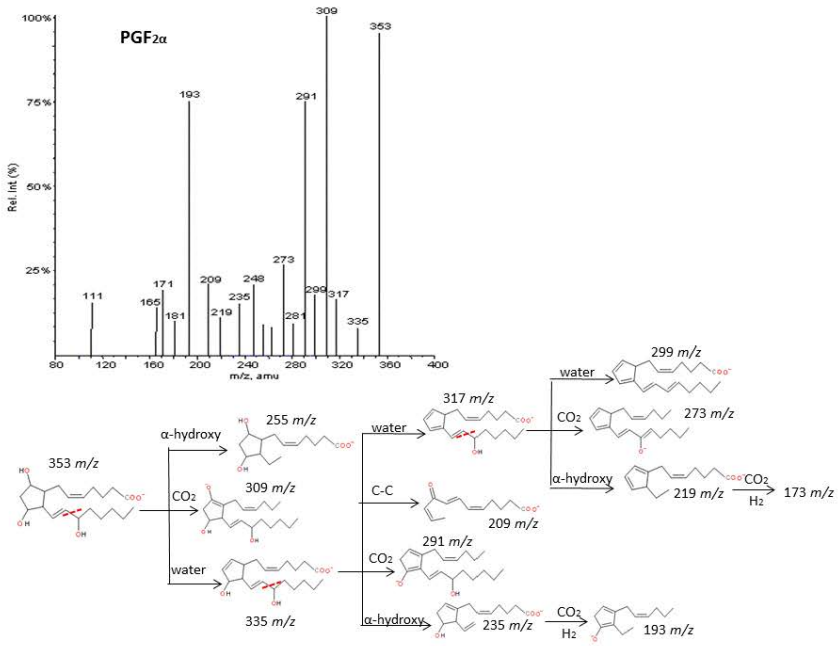
3.2.3. Prostaglandins

The analysis of 12 spectra from series of prostaglandin type-2 from ARA, and type-3 from EPA revealed similar behavior in decomposition pathways. Non-specific cleavages that allowed distinguishing isomers were found depending on the stereochemical structure of molecules that generally consists of a cyclopentane ring and two side chains with carboxylic and hydroxy groups respectively. Intense product ions resulted from the subsequent losses up to three molecules of H_2O and losses of CO_2 from intermediate ions that were produced by the cleavage of the carboxylic group and stabilization of the charge by resonance in the hydroxyl with nearby double bonds. The carbon-carbon cut in the vinylic position of the C-15 hydroxyl produced a neutral hexenal compound by a proton transfer and several characteristic fragments with additional losses of H_2O, CO_2, and transferred of protons. An intermediate carbanion produced by the α-hydroxy cleavage may produce the rupture of the ring and stabilization by conjugate dienes of the corresponding fragment. Others have also studied the fragmentation of prostaglandins family [34–36].

It is possible to unambiguously differentiate up to six groups of prostaglandins based on the parent mass *m/z*: 367, 353, 351, 349, 333, and 331. However, only a good chromatographic resolution of the peaks between isomers with the same *m/z* may lead to their differentiation due to their fragmentations are virtually identical. Fig. 4 and Supp. Mat. 3 graphically explain same examples of prostaglandin fragmentation patterns.


PGE3 - PGD3
Relative Abundance
m/z
331.20
313.22
269.23
233.14
349.16
113.25
129.19
161.04
172.21
189.15
221.21
251.21
287.23
303.12
367.14
381.14


349 m/z
α-hydroxy
251 m/z
CO2
305 m/z
water
331m/z
water
313 m/z
CO2
269 m/z
C-C
221 m/z
CO
303 m/z
α-hydroxy
233 m/z
CO2
189 m/z


PGF2α
Rel.Int.(%)
m/z, amu
309
353
193
291
273
111
171
165
209
248
235
219
181
299
317
281
335
353 m/z
α-hydroxy
255 m/z
CO2
309 m/z
water
335 m/z
water
317 m/z
C-C
209 m/z
CO2
291 m/z
α-hydroxy
235 m/z
CO2
H2
193 m/z
water
299 m/z
CO2
273 m/z
α-hydroxy
219 m/z
CO2
H2
173 m/z

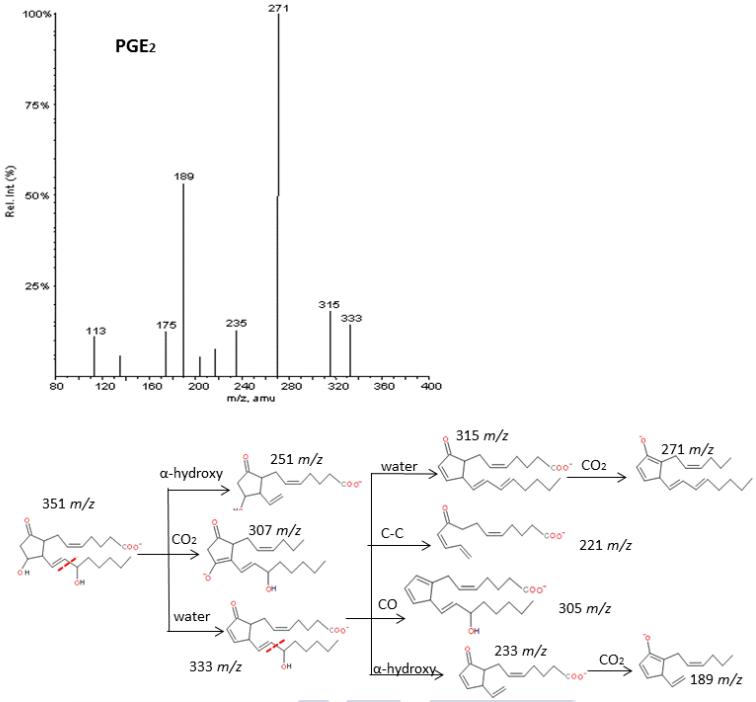
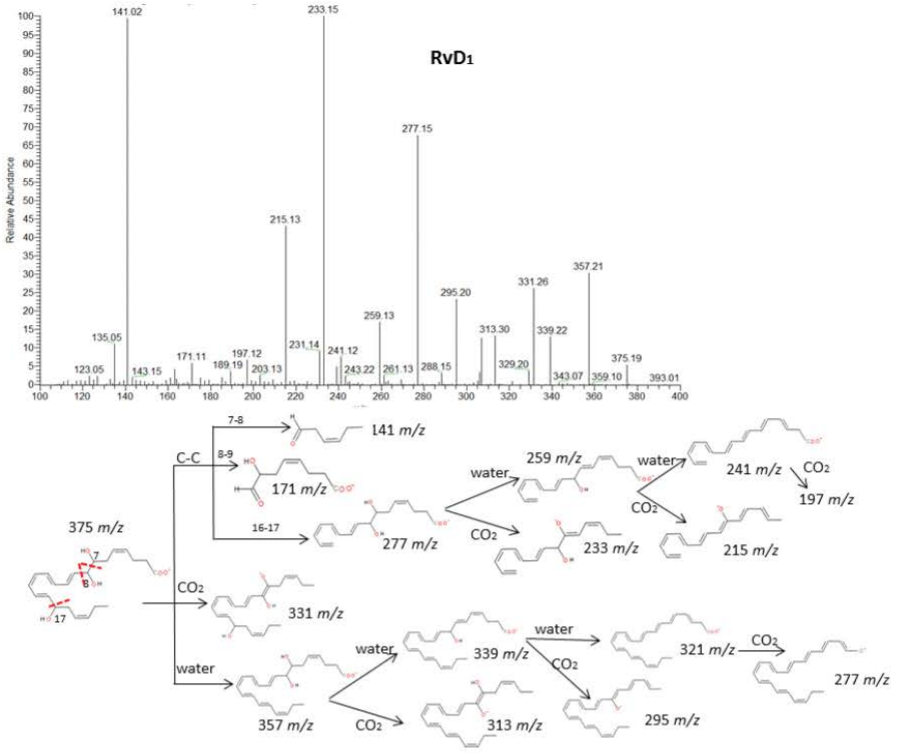
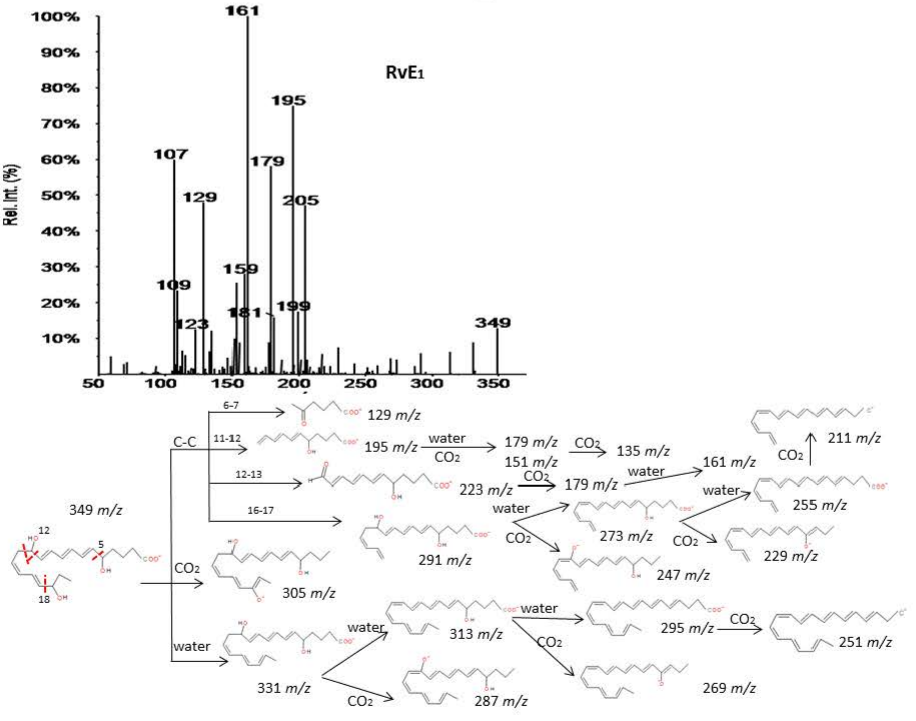


Fig. 4: Fragmentation pattern suggested for PGE_3, PGD_3, $PGF_{2\alpha}$, and PGE_2. Product ion spectra at 349 *m/z*, 353 *m/z*, and 351 *m/z* were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage. An identical spectrum was found for PGE_3 and PGD_3.

3.2.4. Resolvins, Protectins, and Maresins

Recent experiments have uncovered that EPA and DHA serve as precursors for the production of potent bioactive mediators, coined resolvins, protectins and maresins [37]. The fragmentations of RvD_1, RvE_1, and PD_1 have been described in detail in Fig. 5. Common fragments were produced due to the higher unsaturation of the molecules and the number of hydroxy functional groups (up to 3) that gave rise to many losses of H_2O and CO_2. Specifically, the α-cleavage of hydroxyl determined several characteristic fragments as suggested by Serhan et al. [38]. Generally, the carbon-carbon bound was cut in the vinylic position when the hydroxyl was more proximal to the end of the carbon chain; however, it was cut in allylic when proximal to the carboxylic group given an aldehyde ion. Further losses of H_2O and CO_2 were produced from intermediate fragments too. Nevertheless, due to the novelty of these molecules, all isomers have not been widely characterized and spectra were not available, then we have suggested possible fragments for identification of series-D and E resolvins, and MaR-1 based on the chemical structure and a similar behavior in decomposition pathways between isomers (Supp. Mat. 4). The fragmentation proposed for MaR-1 was in agreement with the mass characterization of *in vitro* studies done by Dalli et al. [39].


RvD1
Relative Abundance
141.02
233.15
277.15
215.13
357.21
331.26
295.20
259.13
313.30
339.22
135.05
231.14
241.12
197.12
171.11
375.19
123.05
143.15
189.19
203.13
243.22
261.13
288.15
329.20
343.07
359.10
393.01
375 m/z
7-8
141 m/z
C-C
8-9
171 m/z
16-17
277 m/z
water
259 m/z
CO2
233 m/z
water
241 m/z
CO2
197 m/z
CO2
215 m/z
CO2
331 m/z
water
357 m/z
water
339 m/z
CO2
313 m/z
water
321 m/z
CO2
277 m/z
CO2
295 m/z


RvE1
Rel. Int. (%)
161
195
107
179
129
205
159
109
181
199
123
349
349 m/z
6-7
129 m/z
C-C
11-12
195 m/z
water
CO2
179 m/z
CO2
135 m/z
151 m/z
12-13
223 m/z
CO2
179 m/z
water
161 m/z
CO2
211 m/z
water
255 m/z
16-17
water
CO2
273 m/z
CO2
229 m/z
291 m/z
247 m/z
CO2
305 m/z
water
313 m/z
water
295 m/z
CO2
251 m/z
water
331 m/z
CO2
287 m/z
CO2
269 m/z

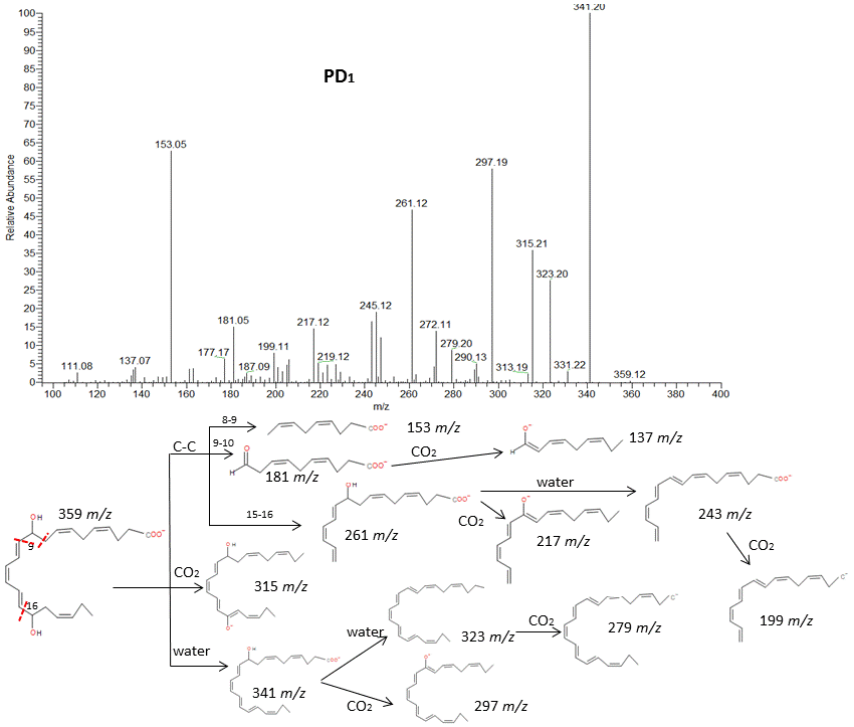


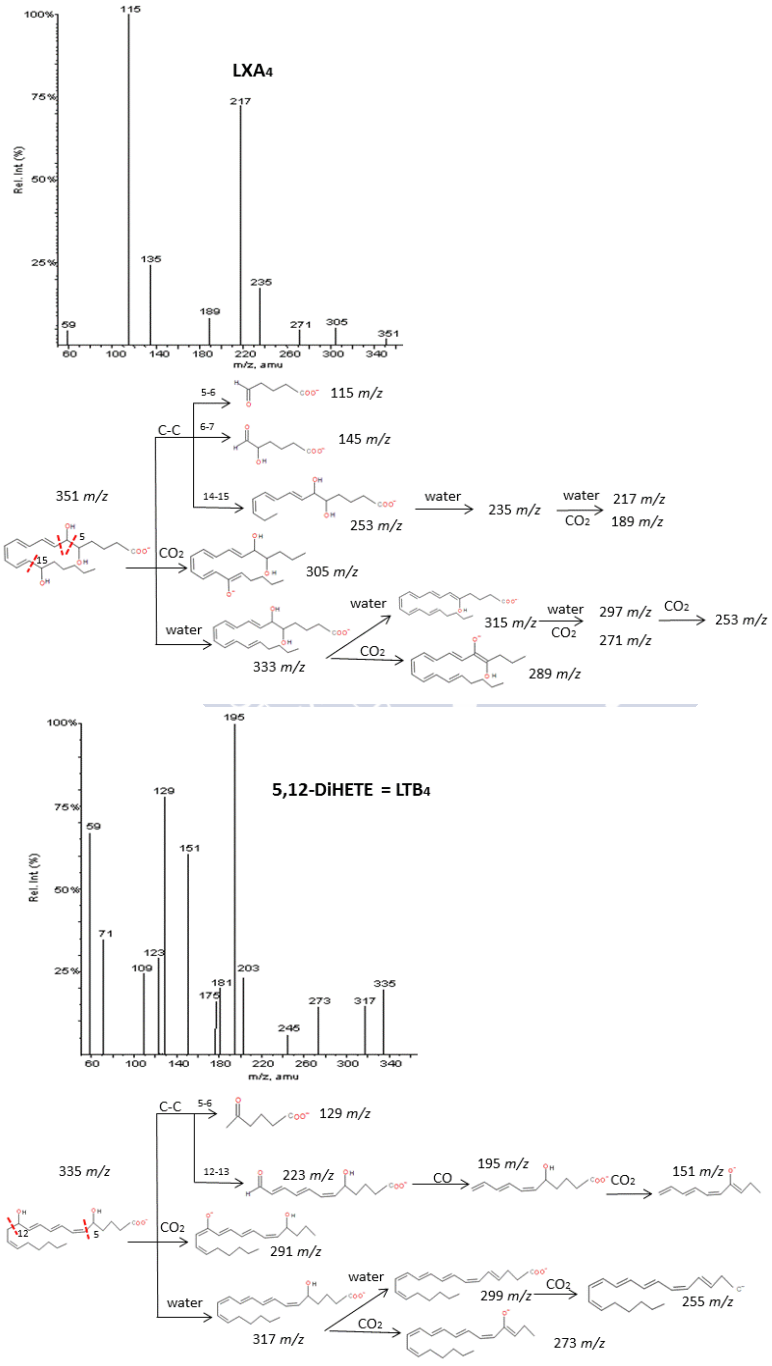
Fig. 5: Fragmentation pattern suggested for RvD_1, RvE_1, and PD_1. Product ion spectra at 375 *m/z*, 349 *m/z*, and 359 *m/z* were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

3.2.5. Leukotrienes, Lipoxins, and dihydroxides

Another thirteen di-tri-hydroxy-eicosanoids derived from ARA and EPA have been studied and classified into 4 groups: LTs, LXs, DiHETEs, and DiHETrEs. It was observed a common fragmentation pattern as described for resolvins and protectins that produced common ions between isomers (losses of H_2O and CO_2). MS/MS spectra showed specific transitions depending on the location of hydroxy groups that were originated from α-hydroxy cleavages of adjacent carbon-carbon bonds and concomitant losses of H_2O, CO_2, and CO. It was observed the same trend as for RVs and PDs, the carbon-carbon cuts generally occurred in the vinylic position of the hydroxyl located close to the terminal of the chain. On the contrary, the α-hydroxy cleavages proximal to the carboxylic group usually occurred in the allylic position. Results were in agreement with MS/MS fragmentation pathways suggested by Murphy et al. [32] and Wheelan et al. [40].

Detailed presentations of decomposition pathways are shown in Fig. 6 and Supp. Mat. 5. The unambiguous identification of poly-hydroxy compounds resulted difficult due to they may produce common fragments as other eicosanoids with the same parent mass ion. That is the case of DiHETEs and HpHETEs (335 *m/z*), LXA_4-B_4 and some TXs and PGs (351 *m/z*), LXA_5 and RvEs and some PGs (351 *m/z*). It is also important to notice

that DiHETEs may produce similar fragmentation patterns than derived HEPEs after the initial loss of H_2O. However, the different parent mass allowed distinguishing without doubts these two groups of similar eicosanoids.



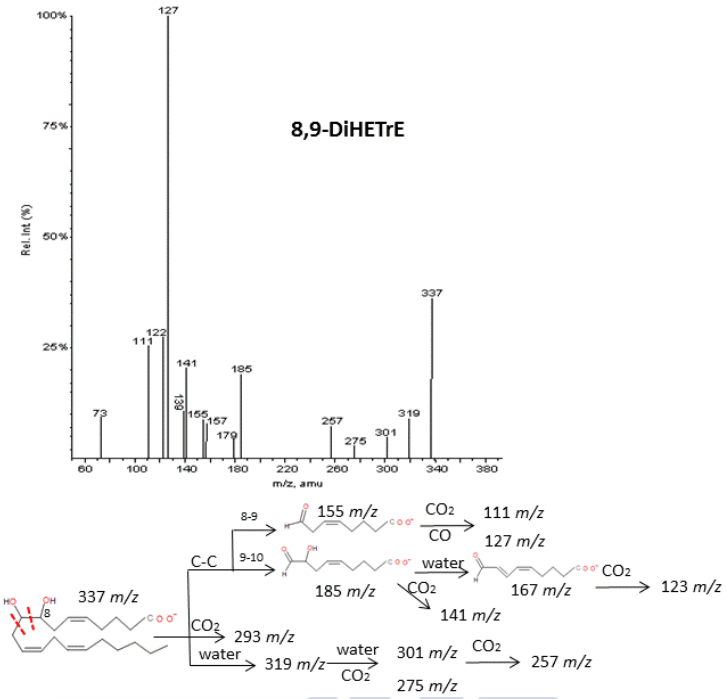


Fig. 6: Fragmentation pattern suggested for LxA_4, LTB_4, and 8,9-DiHETrE. Product ion spectra at 351 *m/z*, 335 *m/z*, and 337 *m/z* were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

3.2.6. Epoxy and oxo-derivates

As described by Murphy et al. [32], epoxy derivates of ARA (EpETrEs) showed very close fragmentation patterns as HETEs, and keto derivates of ARA showed similar fragmentations as HEPEs. In the case of EpETrEs, the spectra generally resulted in a mixture of the two spectra from HETEs with functional groups in the same locations as the epoxy group (Fig. 7 and Supp. Mat. 6). Distinguishing some isomers from both isobaric groups, EpETrEs and HETEs, may be challenging if they are not chromatographically resolved due to they have the same parent mass *m/z* and share most of intense transitions. However, the epoxy LTA_4 with one more unsaturation in the chain could be easily differentiated from HETEs and EpETrEs due to the lower *m/z* of the parent ion. The identification of some compounds from oxoETEs and HEPEs may result even more complicated without good chromatography resolution due to they have the same parent mass and produce exactly the same MS/MS transitions. In the Fig. 8 are explained the main cleavages from ARA oxoETEs. Powell et al. [41] and MacMillan et al. [42] also studied fragmentations from some oxo-derivates of ARA. In a similar manner, the MS/MS spectra of several keto-PGs showed the same fragments than the corresponding PGs (Fig. 9 and Supp. Mat. 7). However, the different parent mass allowed the unambiguous identification between both.

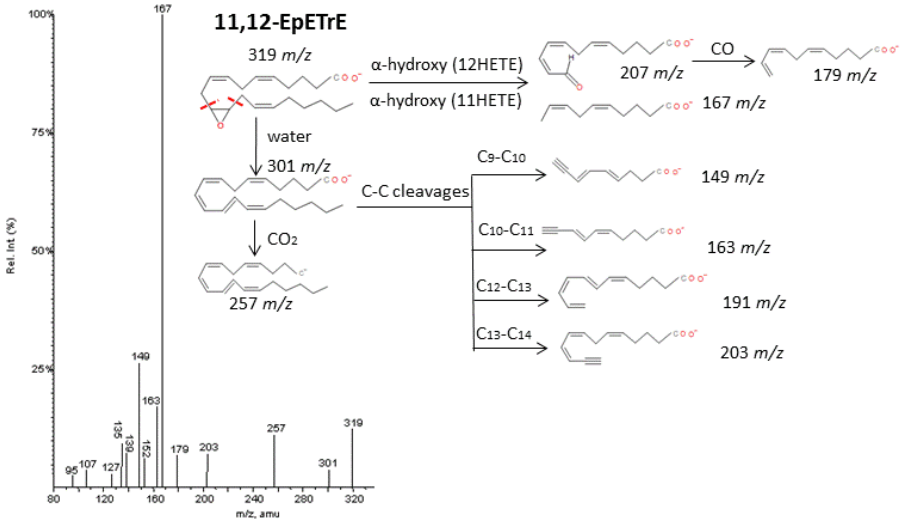
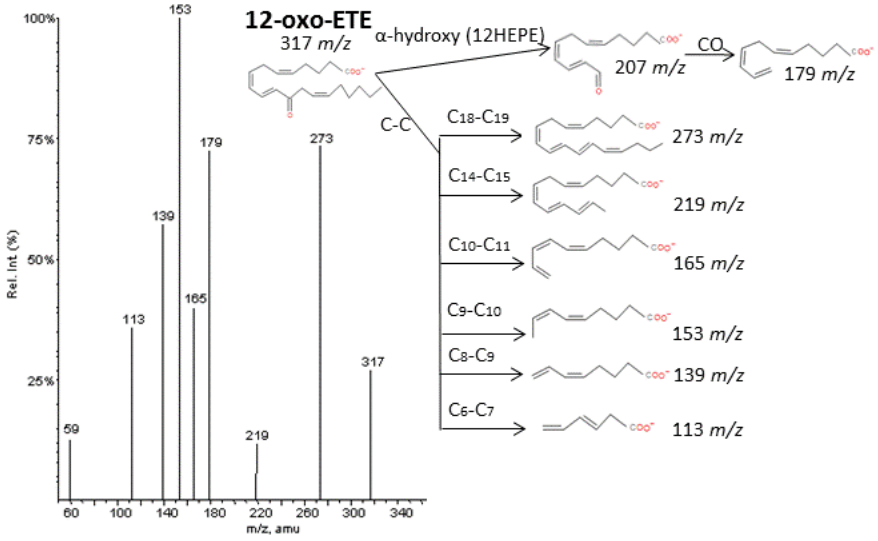


Fig. 7: Fragmentation pattern suggested for 11,12-EpETrE. The product ion spectrum at 319 m/z was obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.



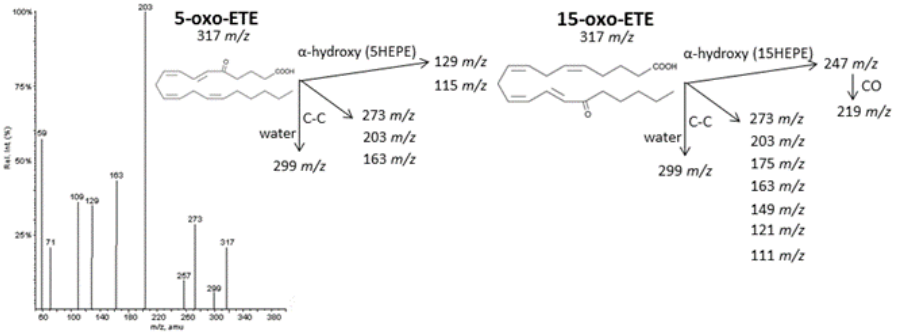


Fig. 8: Fragmentation pattern suggested for oxoETEs (product ion spectra at 317 *m/z* obtained from *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI). MS/MS spectrum was not found for 15oxoETE; thus, potential fragments for identification were suggested based on lipid structure.

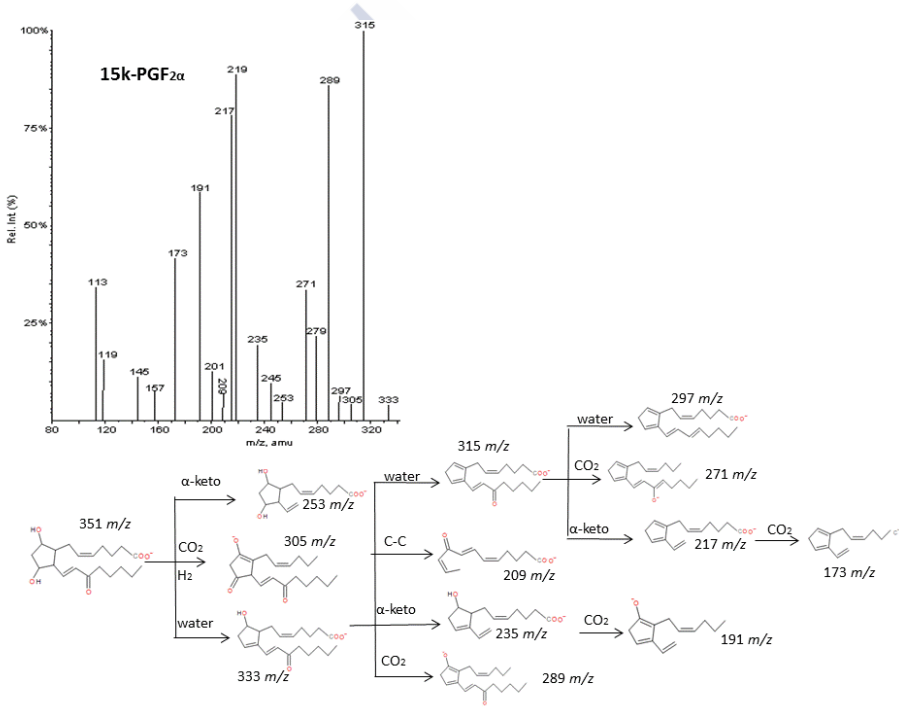


Fig. 9: Fragmentation pattern suggested for 15k-$PGF_{2\alpha}$. The product ion spectrum at 351 *m/z* was obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

3.2.7. Thromboxanes

Finally, the group of thromboxanes from ARA (series 2) and EPA (series 3) showed common losses of subsequent H_2O molecules and CO_2. Thromboxanes are eicosanoids structurally characterized by a six-member ring fused between C-8 and C-12 of the fatty acid. Margalit et al. [43] suggested that the characteristic rupture of the ring becomes more interesting for identification of these compounds. This rupture produces an unstable diol

structure that easily loses a H_2O molecule and derived to a more stable aldehyde [44]. In Fig. 10 and Supp. Mat. 8 are shown the spectra and fragmentation patterns of TXB_3 and TXB_2, and characteristic cleavages were suggested for TXA_2 which spectrum was not available.

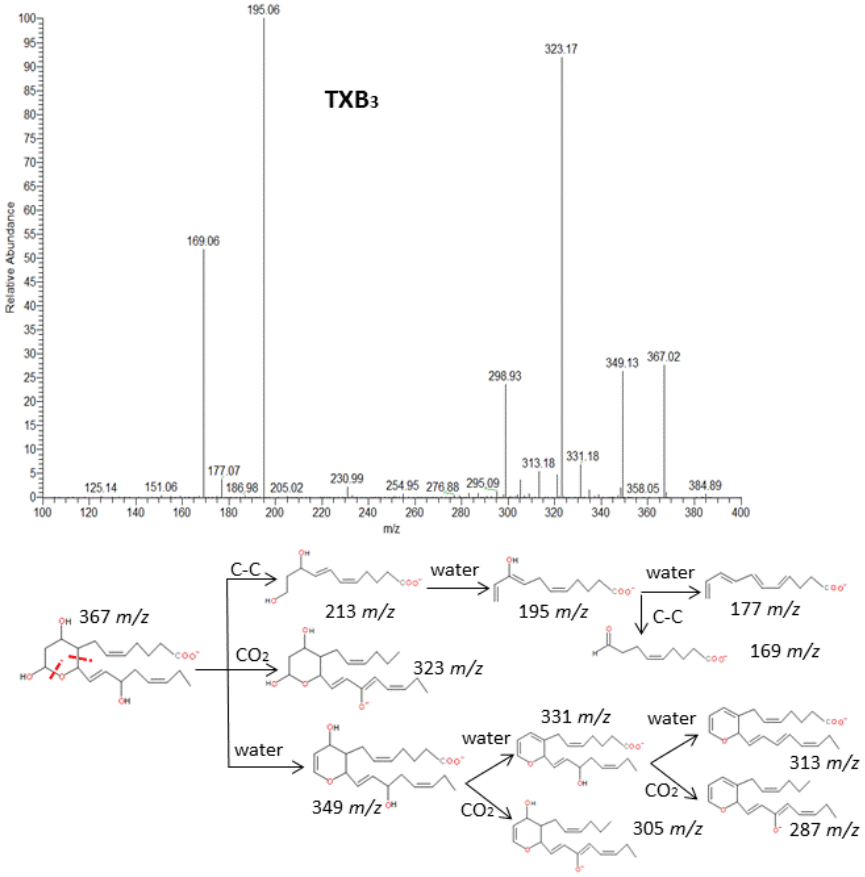


Fig. 10: Fragmentation pattern suggested for TXB_3. The product ion spectrum at 367 *m/z* was obtained from *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI.

3.3. Tentative identifications in samples and validation

Once the extraction and determination procedures were validated, and fragmentation patterns were studied, we tentatively identify lipid mediators in plasma and adipose tissue samples. Firstly, samples were analyzed and compounds were searched according to the *m/z* of parent ion and specific fragmentations suggested. For the highly unstable hydroperoxides, the ionization process provoked the loss of H_2O in source; then, the parent ion minus 18 *m/z* was also considered as parent ion. As it was pointed before, the large number of isomers makes difficult to stablish a single transition for every compound that leads to unambiguous identifications. A total of 35 compounds in adipose tissue and 30 in plasma were identified.

The identification was validated by using a set of standards. Up to 27 hypothetical identifications were validated in adipose and 25 in plasma. Results showed a confirmation rate of our hypothesis of 85 and 88% in adipose and plasma, respectively (4 and 3 proposed identifications failed, respectively).

Specifically, the presence of 9 isomers in adipose tissue and 7 in plasma from the family of HEPEs, and oxoETEs was suggested based on the screening analysis of 317 *m/z*. Specific and common cleavages have been found for these compounds according to the rules described above. In addition, it was observed an increase in the retention time of hydroxides when the position of hydroxyl is more proximal to the carboxylic group. This fact may be explained by a decrease in the polarity of the molecule. However, there were exceptions to this rule between 11 and 12 HEPE, 11 and 12 HETE, and 13 and 14 HDoHE in agreement with Massey et al. [1]. We tentatively identified 18 HEPE, 15 HEPE, 12HEPE, 11HEPE, 5HEPE, and 12oxoETE in both samples and their presence was confirmed by using commercial standards. Additionally, 9HEPE was suggested in adipose tissue although it was not validated. The isomers 5oxoETE in both samples and 15oxoETE in adipose were suggested. However, validation experiments showed non-coincidence of retention times between standards and hypothetical peaks.

Similarly, the presence of 15HETE, 12HETE, 11HETE, and 14-15EpETE in both samples was suggested based on the screening analysis of 319 *m/z*. 11-12EpETE was only suggested in adipose and 20HETE in plasma. In addition, one peak was found in both samples leading to theoretical identification of 5-6EpETE or 5HETE. They cannot be unambiguously identified without retention time information due to similarities in mass spectra and specific transitions. The use of 5HETE standard confirmed the non-presence of this compound in samples. Additionally, it was observed that epoxy and hydroxy isomers with coincidence positions of functional groups did not co-elute under our LC conditions, therefore the peak attributed either to 5HETE or 5-6EpETE was tentatively identified and then validated as the epoxy isomer.

Special attention was required for hydroperoxides from DHA (HpDoHE) (*m/z* 359), EPA (HpEPE) (*m/z* 333), and ARA (HpETE) (*m/z* 335). These compounds were found with higher sensitivity using as parent mass filter the ratios *m/z* 341, *m/z* 315, and *m/z* 317 respectively. Even with the low-energy ionization used, hydroperoxides may lose a H_2O molecule in the ESI source due to the low stability of the hydroperoxy group. Therefore, specific transitions for these compounds were searched along the chromatogram using both “parent mass” ratios. We could not hypothesize the presence of HpDoHEs and HpETEs based on common and specific transitions. However, the use of commercial 17HpDoHE showed its presence in both samples although it had not been previously hypothesized. The presence of 12HpEPE was suggested and further validated in plasma.

Regarding to DHA hydroxides, the analysis of 343 *m/z* showed a hypothetical identification of 8 isomers in adipose tissue and 6 ones in plasma based on specific transitions. Standards validation confirmed 4 hydroxides in adipose and 3 in plasma. No false identifications were done in this group. In the same way, 335 *m/z* ratio was analyzed searching for DiHETEs from ARA. Six isomers were tentatively found in adipose and five in plasma from which two were confirmed and one rejected by standards. Then, the presence of PGE_2/PGD_2, ARA, EPA, and DHA was suggested in both samples analyzing 351, 303, 301, and 327*m/z* parent mass respectively; and hypothesis were confirmed. Finally, 14-15DiHETrE was hypothesized in adipose based on 337 *m/z* screening and it was validated.

Results for tentative identifications and validations are summarized in Tab. 4, as well as information about specific transitions. Other seven *m/z* ratios were also studied but none compound was suggested (624, 375, 369, 367, 353, 349, and 331).

4. Conclusions

An extensive study of fragmentation patterns provided fingerprints to comprehensively elucidate and identify lipid mediators in biological samples obtained by SPE-LC-MS/MS analysis. It has been suitable for the identification of over 100 bioactive ω-6 and ω-3 metabolites. The screening of adipose and plasma samples achieved a percentage of success in predictions over 85-88%. The screening overcame the issue of pre-selecting target metabolites before the study and focusing the analysis of samples only towards this pre-defined list.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (AGL2013-49079-C2-1,2-R). The Consejo Superior de Investigaciones Científicas, the University of Santiago de Compostela, and MINECO are gratefully acknowledged for the doctoral fellowship to Gabriel Dasilva and FPI contract to Silvia Muñoz.

References

(1) Massey, K. A.; Nicolaou, A. *Free Radic. Bio. Med.* **2013**, *59*, 45–55.
(2) Calder, P. C. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83* (6), S1505–1519S.
(3) Frankel, E. N. *Lipid Oxidation*; The Oily Press LTD: West Ferry, Dundee, Scotland, 1998.
(4) Gao, L.; Yin, H. Y.; Milne, G. L.; Porter, N. A.; Morrow, J. D. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (20), 14092–14099.
(5) Ferreiro-Vera, C.; Maria Mata-Granados, J.; Priego-Capote, F.; Manuel Quesada-Gomez, J.; Dolores Luque de Castro, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (3), 1093–1103.
(6) Massaro, M.; Scoditti, E.; Carluccio, M. A.; De Caterina, R. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2008**, *79* (3–5), 109–115.

(7) Sears, B.; Ricordi, C. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2012**, *16* (9), 1137–1154.
(8) Greene, E. R.; Huang, S.; Serhan, C. N.; Panigrahy, D. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2011**, *96* (1–4), 27–36.
(9) Waddington, E.; Sienuarine, K.; Puddey, I.; Croft, K. *Anal. Biochem.* **2001**, *292* (2), 234–244.
(10) Kelly, L.; Grehan, B.; Della Chiesa, A.; O'Mara, S. M.; Downer, E.; Sahyoun, G.; Massey, K. A.; Nicolaou, A.; Lynch, M. A. *Neurobiol. Aging* **2011**, *32* (12), 2318–2333.
(11) Serhan, C. N.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. Sci.* **1984**, *81* (17), 5335–5339.
(12) Norwood, S.; Liao, J.; Hammock, B. D.; Yang, G.-Y. *Am J Transl Res* **2010**, *2* (4), 447–457.
(13) Masoodi, M.; Mir, A. A.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N.; Nicolaou, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22* (2), 75–83.
(14) Lima□Garcia, J. F.; Dutra, R. C.; Da Silva, K.; Motta, E. M.; Campos, M. M.; Calixto, J. B. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164* (2), 278–293.
(15) Levy, B. D.; Bonnans, C.; Silverman, E. S.; Palmer, L. J.; Marigowda, G.; Israel, E. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, *172* (7), 824–830.
(16) Narayanan, N. K.; Narayanan, B. A.; Reddy, B. S. *Int. J. Oncol.* **2005**, *26* (3), 785–792.
(17) Chiu, L. C. M.; Tong, K. F.; Ooi, V. E. C. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, S293–S297.
(18) Arita, M.; Bianchini, F.; Aliberti, J.; Sher, A.; Chiang, N.; Hong, S.; Yang, R.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N. *J. Exp. Med.* **2005**, *201* (5), 713–722.
(19) Lee, C. H. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35* (1), 3–7.
(20) Min, L.; Li, Y.; Yu, B.; Huwei, L. *Anal. Chem.* **2014**, *86 (1)*, 161–175.
(21) Masoodi, M.; Eiden, M.; Koulman, A.; Spaner, D.; Volmer, D. A. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (19), 8176–8185.
(22) Nourooz-Zadeh, J.; Gopaul, N. K.; Barrow, S.; Mallet, A. I.; Anggard, E. E. *J. Chromatogr. B-Biomedical Appl.* **1995**, *667* (2), 199–208.
(23) Maskrey, B. H.; O'Donnell, V. B. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1055–1059.
(24) Mao, J. T.; Nie, W.-X.; Tsu, I.-H.; Jin, Y.-S.; Rao, J. Y.; Lu, Q.-Y.; Zhang, Z.-F.; Go, V. L. W.; Serio, K. J. *Cancer Prev. Res.* **2010**, *3* (9), 1132–1140.
(25) Cavalca, V.; Minardi, F.; Scurati, S.; Guidugli, F.; Squellerio, I.; Veglia, F.; Dainese, L.; Guarino, A.; Tremoli, E.; Caruso, D. *Anal. Biochem.* **2010**, *397* (2), 168–174.
(26) Kortz, L.; Dorow, J.; Becker, S.; Thiery, J.; Ceglarek, U. *Fast liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma*; 2013; Vol. 927.
(27) Strassburg, K.; Huijbrechts, A. M. L.; Kortekaas, K. A.; Lindeman, J. H.; Pedersen, T. L.; Dane, A.; Berger, R.; Brenkman, A.; Hankemeier, T.; van Duynhoven, J.; Kalkhoven, E.; Newman, J. W.; Vreeken, R. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404* (5), 1413–1426.
(28) Wang, Y.; Armando, A. M.; Quehenberger, O.; Yan, C.; Dennis, E. A. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1359*, 60–69.
(29) Dasilva, G.; Pazos, M.; García-Egido, E.; Gallardo, J. M.; Rodríguez, I.; Cela, R.; Medina, I. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26* (11), 1385–1392.
(30) Dasilva, G.; Pazos, M.; Gallardo, J. M.; Rodrí-guez, I.; Cela, R.; Medina, I. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (12), 2827–2839.
(31) Balvers, M. G. J.; Verhoeckx, K. C. M.; Meijerink, J.; Bijlsma, S.; Rubingh, C.

M.; Wortelboer, H. M.; Witkamp, R. F. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *13* (2), 204–214.
(32) Murphy, R. C.; Barkley, R. M.; Berry, K. Z.; Hankin, J.; Harrison, K.; Johnson, C.; Krank, J.; McAnoy, A.; Uhlson, C.; Zarini, S. *Anal. Biochem.* **2005**, *346* (1), 1–42.
(33) Kerwin, J. L.; Torvik, J. J. *Anal. Biochem.* **1996**, *237* (1), 56–64.
(34) Lee, S. H.; Williams, M. V; DuBois, R. N.; Blair, I. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17* (19), 2168–2176.
(35) Yang, P. Y.; Felix, E.; Madden, T.; Fischer, S. M.; Newman, R. A. *Anal. Biochem.* **2002**, *308* (1), 168–177.
(36) Hankin, J. A.; Wheelan, P.; Murphy, R. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *340* (2), 317–330.
(37) Serhan, C. N.; Clish, C. B.; Brannon, J.; Colgan, S. P.; Chiang, N.; Gronert, K. *J. Exp. Med.* **2000**, *192* (8), 1197–1204.
(38) Serhan, C. N.; Lu, Y.; Hong, S.; Yang, R. *Methods Enzymol.* **2007**, *432*, 275–317.
(39) Dalli, J.; Zhu, M.; Vlasenko, N. A.; Deng, B.; Haeggstrom, J. Z.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N. *Faseb J.* **2013**, *27* (7), 2573–2583.
(40) Wheelan, P.; Zirrolli, J. A.; Murphy, R. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7* (2), 140–149.
(41) Powell, W. S.; Boismenu, D.; Khanapure, S. P.; Rokach, J. *Anal. Biochem.* **2001**, *295* (2), 262–266.
(42) MacMillan, D. K.; Murphy, R. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6* (12), 1190–1201.
(43) Margalit, A.; Duffin, K. L.; Isakson, P. C. *Anal. Biochem.* **1996**, *235* (1), 73–81.
(44) Cheng, C. F.; Gross, M. L. *Mass Spectrom. Rev.* **2000**, *19* (6), 398–420.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

La evolución de la dieta humana hacia un incremento de la ingesta de grasas saturadas y grasas *trans*, PUFAs ω-6 y azúcares refinados, y la disminución de la cantidad de PUFAs ω-3, vitaminas, minerales y antioxidantes naturales es una de las principales causas de la aparición de nuevas patologías y desórdenes metabólicos como las enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, etc. La mayor parte de estas alteraciones implican la aparición y desarrollo de procesos inflamatorios y de estrés oxidativo. Es por ello que el número de trabajos relacionados con la investigación nutricional ha crecido exponencialmente en las últimas décadas. Uno de los principales objetivos de la investigación nutricional es comprender la compleja relación existente entre nutrición, metabolismo y salud.

En este contexto, la investigación llevada a cabo en esta tesis ha buscado comprender algunos de los mecanismos por los que la ingesta de PUFAs ω-3 y otros componentes de la dieta, regulan los procesos inflamatorios y de estrés oxidativo relacionados con diferentes desórdenes metabólicos. Entre los mecanimos estudiados destacan el papel de los componentes de la dieta en la síntesis de mediadores lipídicos, regulación enzimática, modulación del perfil lipídico en diferentes tejidos, o la influencia de la estabilidad oxidativa de los PUFAs en el tracto digestivo y su posterior biodisponibilidad. Para ello, se han desarrollado y aplicado metodologías de Lipidómica cuantitativa basadas en la espectrometría de masas, y se han realizado experimentos *in vitro* para simular la digestión y absorción intestinal, entre otras técnicas. Los datos procedentes de la Lipidómica se han correlacionado con otros resultados realizados en el grupo sobre Proteómica y sobre diferentes parámetros biomédicos en los mismos modelos animales, para obtener así una visión lo más amplia posible de los procesos metabólicos regulados por la dieta y los efectos saludables del consumo de PUFAs ω-3 de origen marino.

La parte central de este trabajo ha consistido en el estudio de los mediadores lípídicos derivados de los PUFAs ω-3 y ω-6, para investigar la modulación del perfil de estos metabolitos a través de la dieta. Se trata de biomoléculas que se asocian a la regulación de procesos inflamatorios, la expresión génica, el sistema inmune, el metabolismo lipídico, etc. La comunidad científica ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos y las rutas reguladas por diferentes familias de estos compuestos, algunos de ellos se han establecido como biomarcadores de inflamación, se investigan en el ámbito farmacológico y desde el punto de vista de su aplicación terapéutica, etc. Sin embargo, poco se conoce todavía sobre la potencialidad de la dieta para modular la síntesis de estos compuestos e influír así en los procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, y como consecuencia, en los desórdenes metabólicos.

Su estudio resulta complejo por diversos motivos. Desde el punto de vista metodológico, no está estandarizada todavía la influencia en los resultados de la duración de las intervenciones nutricionales, dosis administradas, edad de los individuos, factores genéticos, etc. Desde el punto de vista de la bioactividad de los

compuestos y comprensión de los mecanismos que se están regulando en el entorno de una determinada dieta, el análisis de un grupo reducido de compuestos puede dificultar la comprensión clara y detallada de los mecanismos y las complejas redes metabólicas implicadas en los procesos inflamatorios. Es necesario obtener una imagen lo más amplia posible de todos los grupos de compuestos implicados en una determinada ruta. Las diferentes familias presentan, en numerosas ocasiones, actividades funcionales contrapuestas e interrelacionadas. Además, se establecen relaciones de competencia por las mismas enzimas con lo que la activación de una ruta metabólica puede tener efectos antagónicos y promover al mismo tiempo el desarrollo de la inflamación y favorecer la resolución de la misma.

Además, desde el punto de vista analítico existen ciertas limitaciones y grandes desafíos relacionados con la determinación conjunta de un número elevado de compuestos pertenecientes a diversas familias en el mismo análisis. Destacan la escasa estandarización de los métodos de muestreo, las interferencias en el análisis debidas a la matriz de muestra, la inestabilidad y fácil degradación de los compuestos, los bajos LOD de familias de gran relevancia como las resolvinas y protectinas que dificultan su determinación *in vivo*, o el análisis conjunto de familias de isómeros químicamente muy similares, y difíciles de resolver cromatográficamente e identificar inequívocamente por espectrometría de masas.

El flujo de trabajo seguido en esta tesis se resume en la **Fig. 26**. Brevemente, se ha comenzado por el desarrollo de la metodología analítica para el análisis de los mediadores lipídicos en muestras de plasma. La metodología validada se aplica posteriormente al estudio de la producción de estos compuestos en trabajos de intervención de entornos dietéticos suplementados con aceites de pescado con contenidos variables de EPA y DHA. Para ello se emplearon dos modelos animales diferentes, un modelo sano (ratas Wistar Kyoto) y un modelo genéticamente obeso e hipertenso (ratas Kolestky). Los resultados sugirieron que una proporción equitativa EPA:DHA 1:1 en el aceite de pescado produce una respuesta más favorable desde el punto de vista inflamatorioy de estrés oxidativo. Las dietas con un contenido mayor de insaturación caracterizadas por mayores concentraciones de DHA indujeron una mayor peroxidación lipídica y proteica que aquellas con suplementados balanceados EPA:DHA o con mayores concentraciones de EPA. Por lo tanto, para esclarecer el papel de la insaturación en estos resultados, se estudió la estabilidad oxidativa durante el proceso digestivo de las diferentes dietas utilizadas y se correlacionó con la posterior absorción intestinal y metabolismo de los ácidos grasos. Los resultados obtenidos demostraron que la proporción EPA:DHA 1:1 resultó la menos oxidada y la que presentó un mayor porcentaje de absorción durante la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, la mayor efectividad antiinflamatoria y antioxidante observada para la dieta EPA:DHA 1:1 respecto a las otras proporciones de estos ácidos grasos, puede estar asociada, en parte, a una mayor estabilidad y biodisponibilidad durante el proceso digestivo.

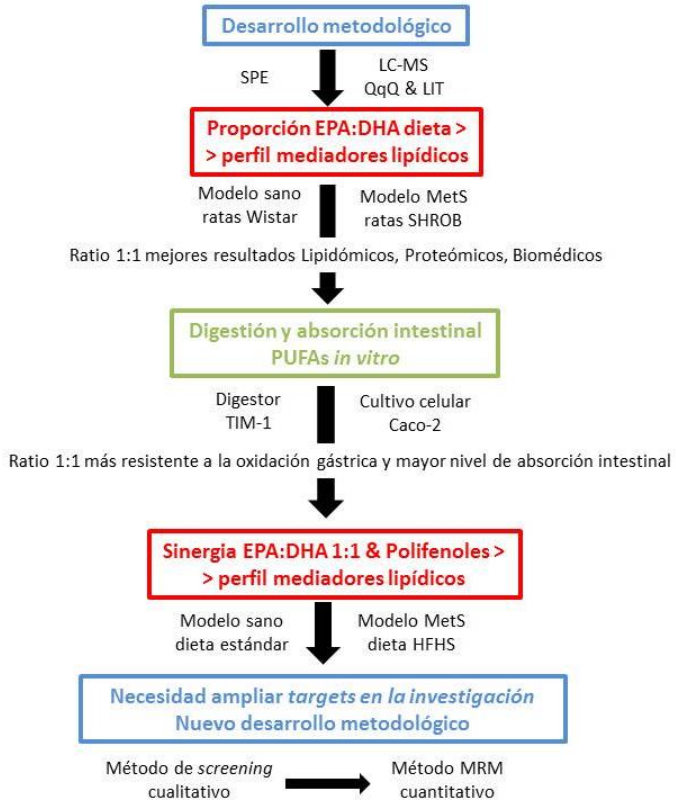


Fig. 26: Flujo de trabajo seguido en los 6 capítulos de esta tesis

Dado que la estabilidad oxidativa se incrementa en presencia de compuestos antioxidantes, se abordó el siguiente objetivo planteando elposible efecto sinérgico de la ingesta conjunta de una dieta suplementada con aceite de pescado (EPA:DHA 1:1) con antioxidantes (polifenoles de uva). De nuevo se realiza un doble experimento con dos modelos animales, un modelo sano y un modelo de desórdenes metabólicos inducidos por una dieta alta en grasa y azúcares. Se sustituye el modelo genéticamente enfermo por un modelo de desórdenes metabólicos inducidos por la dieta, evitando así las alteraciones controladas por la genética que no pueden ser revertidas con la intervención nutricional. Además, con este nuevo modelo basado en una dieta rica en grasa y azúcares, no sólo se estudia el efecto de los suplementos sobre los procesos inflamatorios y los desórdenes metabólicos, sinó que también se investigan las sinergias y la influencia del contexto dietario (estándar o alto en grasa y azúcar) en la eficacia y los mecanismos regulados por dichos suplementos.

Finalmente, en el último capítulo se abordó la mejora de la metodología de análisis para aumentar el rango de metabolitos y tejidos estudiados, estableciendo así, con más claridad, los mecanismos y rutas moduladas. Se planteó un método de *screening* inicial de la muestra para obtener información cualitativa del mayor número de compuestos

posibles, y así poder dirigir el análisis cuantitativo a los metabolitos diana de cada tejido. Esta mejora metodológica se ha aplicado en muestras de plasma y tejido adiposo para un *screening* de más de 100 metabolitos en los proyectos que se están llevando a cabo en el grupo, con nuevos experimentos animales y dietas diferentes.

A continuación se hace una recopilación más detallada de los diferentes objetivos parciales planteados en cada uno de los capítulos. Se resumen los principales resultados obtenidos y la discusión integral de los datos.

El estudio de los mediadores lipídicos ha sido un objetivo de trabajo novedoso en las líneas de investigación del grupo en cuyo seno se ha desarrollado esta tesis. Por lo tanto, el primer gran esfuerzo de este trabajo fue el estudio detallado de las diferentes familias de estos metabolitos que pueden aparecer in vivo, las rutas metabóicas implicadas en su biosíntesis o degradación, la bioactividad asociada a las diversas moléculas, conjuntamente a los estudios encaminados a conocer la estructura y propiedades fisicoquímicas de las diferentes familias de compuestos, para posteriormente desarrollar la metodología analítica adecuada para su determinación cuantitativa.

Por todo ello, en el **capítulo I** se describe el proceso de desarrollo, optimización y validación de la plataforma analítica desarrollada que se basa en la extracción en fase sólida (SPE) seguida del análisis por LC-ESI-MS en modo dirigido, MRM. Esta metodología se aplicó posteriormente en los capítulos II, III, y V.

El primer paso consistió en la optimización de los parámetros que afectan a la técnica de detección. En este trabajo se compararon dos tipos de analizadores de masas diferentes, un QqQ y una LIT (Linear Ion Trap), ambos trabajando en modo dirigido MRM (Multiple Reaction Monitoring). En este primer trabajo, se seleccionaron como *target* un grupo de 23 compuestos derivados de los PUFAs ω-6 ARA, y ω-3 EPA y DHA, representativos por su papel como reguladores de los procesos inflamatorios, de estrés oxidativo y desórdenes metabólicos. En el modo de trabajo MRM se predefinen en el método las transiciones específicas y los tiempos de retención en los que se busca cada analito. Uno a uno se fijaron los voltajes de colisión óptimos para cada compuesto de modo que se obtienen los fragmentos característicos para poder identificarlos. Posteriormente, se optimizó la separación cromatográfica del conjunto de compuestos a analizar. Debido a la presencia de varios isómeros estructurales, no fue posible la resolución de todos los picos, pero las transiciones selectivas de MS/MS permitieron identificar a todos los analitos excepto el par PGE_3/PGD_3 que coeluye y fragmenta exactamente igual, incluso realizando un MS^3 en la LIT se obtuvieron los mismos fragmentos de fragmentos.

Se procedió a la validación de la metodología en ambos equipos mediante patrones comerciales y no se observaron grandes diferencias respecto a rango lineal de respuesta, LOD, LOQ, repetibilidad, etc. Sin embargo, al analizar muestras complejas en las que existen otros compuestos diferentes a los incluídos en el método, la LIT ofreció una

ventaja competitiva en la identificación de los compuestos sin la necesidad de un desarrollo mayor de la cromatografía. La LIT permite obtener el espectro total de fragmentación sin perder sensibilidad en vez de un único fragmento selectivo como es el caso del QqQ. Se detectaron 4 posibles falsas identificaciones hechas bajo la base del tiempo de retención y una sóla transición de MS usando el QqQ. Al analizar el espectro de masas obtenido con la LIT se observó una mezcla de espectros pertenecientes a diferentes isómeros que coeluyen y producen fragmentos comunes a los usados para las identificaciones de nuestro método.

Una vez puesto a punto el método de determinación, se procedió a optimizar las etapas de extracción y tratamiento de muestras de plasma . Se utilizaron y compararon dos tipos de adsorbentes de SPE, los clásicos adsorbentes de base de sílica C-18 y los adsorbentes poliméricos Oasis-HLB. Experimentos preliminares demostraron que, para la mayor parte de los metabolitos, los cartuchos poliméricos ofrecían mejores porcentajes de recuperación. Compuestos como los hidroperóxidos incluídos en el método no habían sido analizados mediante este tipo de adsorbentes con anterioridad y para los cuales se obtuvieron recuperaciones cuantitativas en torno al 100%. Además, se evaluaron otros factores determinantes para la obtención de buenos factores de recuperación como son el volumen y tipo de disolvente de elución, volumen de rotura y de lavado de los cartuchos, temperatura, pH, pretratamiento de la muestra, etc.

Una de las etapas más importantes en la obtención de recuperaciones cuantitativas en la SPE, es el porcentaje de metanol utilizado en el pretratamiento de las muestras de plasma anterior a la adición a los cartuchos. El amplio rango de polaridades de los compuestos incluídos en el método dificultó la obtención de un porcentaje óptimo para todos. La solución de compromiso se alcanzó con el 30% de fase orgánica que logró conseguir una solubilización casi del 100% para los compuestos menos lipofílicos. Además, la utilización de porcentajes mayores de metanol producía una elución significativa de los compuestos con lo que disminuía su recuperación final. Por otra parte, la temperatura resultó ser un parámetro crítico para la recuperación cuantitativa de los compuestos más inestables como los hidroperóxidos, por lo que todo el proceso se realizó a 4º C en una cámara fría. Posteriormente, recogido en el Capítulo VI de esta memoria, se procedió a reoptimizar esta parte del proceso mediante la adición de un antioxidante a la muestra con lo que se evitaron las condiciones de trabajo en el interior de una sala a 4º C. La inestabilidad de los compuestos es una de las mayores dificultades para su análisis y conservación de las muestras.

La evaporación y reconstitución de los extractos para inyectar en el espectrómetro también es una etapa importante que puede acarrear errores y degradación de los compuestos. La metodología inicial se optimizó mediante la evaporación bajo N_2 y trasvase en frío de los volúmenes de extracto a los viales de inyección. Finalmente, el lavado de los tubos de centrifugación con un volumen de metanol al 30% resultó ser significativo para la recuperación de parte de los metabolitos que permanecían

adheridos al *pellet* o al tubo de extracción. Un ejemplo más de la complejidad del proceso entero de extracción.

Con los procedimientos de extracción y determinación optimizados, se procedió a la validación global del método mediante la adición de patrones estándar a muestras de plasma con el objetivo de evaluar las recuperaciones globales, incluída la SPE, y el efecto matriz. Debido a la gran diferencia de concentración entre los mediadores lipídicos y sus precursores los ácidos grasos: ARA, EPA y DHA, los estudios de recuperación se realizron por separado ya que se detectaron interferencias significativas debidas a las impurezas de los patrones comerciales de ARA, EPA y DHA. Al ser añadidos en concentraciones de varios órdenes de magnitud superiores, las impurezas (mediadores lipídicos coincidentes con nuestros analitos) están al nivel de los demás compuestos dando lugar a recuperaciones superiores al 100% en varios casos. Los resultados obtenidos demostraron que el efecto matriz es el principal responsable de las pérdidas globales de recuperación. Además, este efecto es significativo para cuatro de los compuestos analizados en el QqQ y no en la LIT, por lo que se apunta a diferencias en la configuración de las fuentes de ionización como una posible causa. Los porcentajes de recuperación de la etapa de SPE rondaron el 100% para todos los compuestos.

En conclusión, la puesta a punto de esta metodología resultó ser un desafío en el que se superaron dificultades relativas a la diferente solubilidad de los compuestos, problemas de inestabilidad de los mismos, impurezas de los reactivos, falsos positivos en las identificaciones, coelución de formas isobáricas con fragmentaciones idénticas, etc. El protocolo para la extracción de plasma permitió el análisis cuantitativo, sensible y robusto de 20 mediadores lipídicos y 3 PUFAs en un mismo análisis de 30 minutos, con la excepción de una pareja de isómeros no resuelta individualmente. Como se ha indicado anteriormente, el Capítulo VI de eta memoria muestra una ampliación y mejora de esta metodología, abordando un mayor número de compuestos y validando la metodología para el análisis de los mediadores lipídicos en tejido adiposo.

En los **capítulos II y III** se aplicó la metodología desarrollada para estudiar el perfil de mediadores lipídicos modulado por la suplementación de aceites de pescado con diferente contenido en EPA y DHA en dos modelos animales: un modelo sano (ratas Wistar) y un modelo genético de desórdenes metabólicos (ratas Kolestky). El objetivo perseguido fue determinar la influencia de la proporción de los PUFAs ω-3 de origen marino en la dieta, EPA y DHA, sobre diferentes parámetros relacionados con la salud cardiovascular y los desórdenes metabólicos. Se estudió la influencia de los suplementos sobre la síntesis de mediadores lipídicos en plasma, la actividad de las enzimas desaturasas, y la modulación del perfil lipídico de FFA y TFA en plasma y eritrocitos. Estos datos se correlacionaron con los efectos observados en otros trabajos del grupo sobre la oxidación proteica y parámetros biométricos y clínicos de los mismos animales asociados a alteraciones metabólicas. Se utilizó una dieta standard base y

como controles suplementos de aceite de soja, rico en PUFAs ω-6 (LA) y suplementos de aceite de lino, rico en PUFAs ω-3 de cadena media (ALA).

Los beneficios sobre la salud de la ingesta de los PUFAs de origen marino han sido ampliamente estudiados, sin embargo, poco se sabe acerca de la influencia específica de cada PUFA o la proporción ideal entre ellos que potencia sus beneficios. Asimismo, los beneficios de la ingesta de PUFAs ω-3 ha sido recientemente cuestionada debido a los últimos resultados de los ensayos clínicos en los que no se encontraron evidencias del papel protector sobre las enfermedades cardiovasculares (545).

Son pocos los trabajos que relacionan la ingesta de estos PUFAs con la modulación de la cascada de síntesis de los mediadores lipídicos. Como ya se ha descrito en la introducción, los mediadores lipídicos son de gran interés ya que regulan numerosos procesos inflamatorios y de señalización celular que a su vez se relacionan con desórdenes metabólicos y otras enfermedades relacionadas con la dieta como la diabetes tipo 2 o las enfermedades cardiovasculares.

Los resultados obtenidos en estos capítulos de la memoria, mostraron que las dietas suplementadas con 1:1 y 2:1 EPA:DHA fueron las más efectivas para reducir los niveles de mediadores lipídicos inflamatorios ω-3 y ω-6 en comparación con las dietas suplementadas con 1:2 EPA:DHA, y las dietas enriquecidas en los PUFAs vegetales ω-6 LA y ω-3 ALA. Destaca la significativa reducción de los niveles de los derivados ω-6, PGE_2 y 11HETE, debida a la ingesta de los suplementos 1:1 y 2:1. Estos compuestos se han descrito como potentes mediadores inflamatorios en un elevado número de trabajos científicos. Entre los posibles mecanismos que podrían explicar estos resultados, se ha propuesto la competencia de los sustratos EPA y DHA por las mismas enzimas COXs que regulan la síntesis de estos compuestos a partir del ARA. El aporte de EPA y DHA conduce a una substitución significativa del ácido ARA en las membranas de los eritrocitos y en general, en todos los tejidos. La acción de COXs sobre estos ácidos grasos desplaza la producción de los mismos hacia los metabolitos derivados mayoritariamente de EPA, conduciendo a una situación de menor concentración de metabolitos proinflamatorios derivados del ARA. La afinidad de las enzimas por estos tres PUFAs es menor en el caso del DHA debido a la mayor longitud de su cadena carbonada y mayor impedimento estérico por el sitio activo de las enzimas. Por lo tanto, las dietas con mayor proporción de DHA parecen ser menos efectivas en la competencia con el ARA, lo que explica los niveles elevados de los derivados metabólicos proinflamatorios del ARA. Por el contrario, al aumentar la proporción de EPA en la dieta, los niveles de PGE_2 y 11HETE se reducen significativamente. La dieta de lino, rica en ALA, produce niveles similares a los de la dieta de soja y 1:2 EPA:DHA ya que la tasa de conversión de ALA en EPA es muy baja *in vivo* y no se produce una competencia real por el sitio activo de las COXs.

Los niveles encontrados de los derivados hidroperóxido, fueron superiores en las dietas de soja, lino y 1:2 EPA:DHA. Los parámetros biomédicos medidos en las mismas ratas

mostraron valores significativamente inferiores respecto de la actividad de la enzima GPX, y de la capacidad antioxidante en plasma (ORAC) en estos grupos de dieta. La enzima GPX detoxifica radicales libres que dan lugar a la formación de hidroperóxidos, y el índice ORAC mide la concentración de ROS en plasma. Por lo tanto, parece que estos 3 grupos de dieta tienen una menor capacidad detoxificadora de ROS que los grupos alimentados con los suplementos 1:1 y 2:1 EPA:DHA. Consequentemente, se observa una mayor producción de mediadores lipídicos de la familia de los hidroperóxidos.

Las dietas ricas en PUFAs de origen marino, EPA y DHA, han sido descritas por su capacidad de activar el sistema antioxidante endógeno (454). En concordancia con esta observación, los resultados de carbonilación proteica indicaron un menor estrés oxidativo en los grupos alimentados con el suplemento 1:1 EPA:DHA y también con el suplemento 2:1 EPA:DHA. Además, se observó en estos dos grupos una mayor actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT. Esta mayor capacidad antioxidante explica la menor producción de hidroperóxidos en las dietas 1:1 y 2:1, y como consecuencia se tiene menos sustrato para las enzimas LOXs que dan lugar a los mediadores 12HEPE, 15HEPE y 17HDoHE. Estos datos se correlacionan con los mayores niveles de los precursores, EPA y DHA, obtenidos en plasma, ya que están menos oxidados y metabolizados en sus mediadores lipídicos. Es decir, el sistema antioxidante previene la oxidación de los PUFAs y por lo tanto la producción de los derivados lipídicos en las dietas ricas en PUFAs de origen marino. Sin embargo, al aumentar la proporción de DHA, la capacidad antioxidante disminuye, aumenta la formación de hidroperóxidos, sustrato de las LOXs, y por lo tanto se producen niveles similares de los mediadores lipídicos que en las dietas de soja y lino. Parece que el mayor grado de insaturación que presenta la molécula de DHA la hace más susceptible de oxidarse que la molécula de EPA, con lo que disminuye la capacidad antioxidante de las dietas con mayor proporción de DHA.

Las dietas 1:1 y 2:1 EPA:DHA mostraron una menor actividad de las enzimas LOXs y COXs responsables de la producción de múltiples familias de mediadores lipídicos, entre los que destacan los derivados proinflamatorios del ARA. Por lo tanto, estas dietas produjeron un perfil de mediadores lipídicos más antiinflamatorio que las dietas con mayor proporción de DHA y las dietas vegetales de soja y lino. Esta capacidad antiinflamatoria fue correlacionada con una menor actividad de las enzimas desaturasas hacia la síntesis de ARA, y mayor actividad de las desaturasas de la ruta de síntesis de EPA y DHA. En consecuencia, el ratio ω6/ω3, indicador de inflamación, disminuyó tanto en plasma como en las membranas de los eritrocitos debido a las dietas enriquecidas en PUFAs ω-3 de origen marino. Sin embargo, la dieta de lino, fuente de PUFAs ω-3, resultó no ser efectiva en la producción endógena de EPA y tampoco en la incorporación de ALA a las membranas de los eritrocitos, lo que resultó en mayores ratios ω6/ω3 y una menor capacidad antiinflamatoria también observada en la producción de mediadores lipídicos proinflamatorios.

Finalmente, la capacidad antioxidante y antiinflamatoria descrita para las dietas de EPA y DHA, especialmente con las proporciones 1:1 y 2:1, también se correlacionó con un descenso en el marcador de inflamación CRP, y el descenso generalizado de otros parámetros bioquímicos relacionados con los desórdenes metabólicos como son los niveles de ácidos grasos totales, triglicéridos, colesterol total, LDL, y hemoglobina glicosilada en plasma.

En conclusión, las dietas ricas en PUFAs de origen marino produjeron una mejora en los parámetros de inflamación y estrés oxidativo que se mantiene incluso en un contexto genético de obesidad e hipertensión. Los resultados mostraron que la proporción de EPA y DHA en la dieta, y la proporción de PUFAs ω-6 y ω-3, influye significativamente en la modulación de las rutas enzimáticas de síntesis de los mediadores lipídicos inflamatorios. Afecta al sistema antioxidante endógeno y a la respuesta inflamatoria, y en consecuencia, puede influir en el desarrollo de los desórdenes metabólicos, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, etc. Además, la sustitución de EPA y DHA por PUFAs ω-3 de cadena media y origen vegetal como el ALA no conduce a los mismos beneficios metabólicos.

En base a la diferente susceptibilidad que parecen mostrar los suplementos con diferentes concentraciones de EPA y DHA de cara a la peroxidación *in vivo*, el objetivo siguiente de la memoria fue el estudio de la diferente estabilidad oxidativa de los PUFA ω-3 de origen marino durante la digestión gastrointestinal. Varias investigaciones han demostrado que el estómago puede actuar como un bioreactor promoviendo la peroxidación de los lípidos insaturados. Además, en un trabajo previo realizado en nuestro grupo y el grupo de la profesora Judith Storch (180), se observó como el aumento de la oxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados disminuye la absorción por parte de células intestinales tipo Caco-2.

Con este objetivo se planteó el trabajo recogido en el **capítulo IV**. Este trabajo se realizó mediante una estancia en el grupo de la profesora Judith Storch del departamento de Food Science de la Rutgers University de New Jersey. Para poder realizar los estudios, se utilizaron dos modelos *in vitro*: un modelo dinámico del tracto gastrointestinal mediante el equipo TIM-1, y un cultivo celular con la línea Caco-2 que representa las condiciones del epitelio intestinal humano. El modelo TIM-1 simula los procesos fisiológicos que ocurren entre el estómago y el intestino delgado, los movimientos gástricos, el vaciado de los jugos gástricos, las condiciones de pH, temperatura, etc. Además, mediante un sistema de filtros discrimina la absorción de las partículas bioaccesibles en el intestino delgado en base al tamaño molecular. Este modelo es un buen modelo digestivo pero no representa fielmente las condiciones de absorción intestinal. El estudio, por tanto, se complementó con la utilización del modelo de células Caco-2 para estudiar la absorción de los lípidos una vez sometidos a las condiciones de digestión estomacal.

Los experimentos se diseñaron con el objetivo de determinar la relación entre el tipo de PUFA y el ratio EPA:DHA del suplemento de aceite de pescado, con el grado de oxidación sufrido durante la digestión y posterior absorción y metabolismo en las células intestinales. Referente a los estudios de digestión gastrointestinal, se evaluó el grado de peroxidación lipidíca sufrida (en base a la formación de dienos conjugados) por las dietas suplementadas con aceites de pescado, 1:1, 1:2, 2:1 EPA:DHA, y aceites de soja utilizadas en los capítulos II y III. Para ello las muestras consistentes en la dieta estandar suplementada con los aceites se sometieron al ensayo TIM: se tomaron muestras durante las 2 horas y media de digestión de los dializados del estómago para controlar el grado de oxidación producida. Asimismo, se analizaron temporalmente muestras del ileum y jejunum para medir la cantidad de lípidos absorbidos por los filtros del equipo en una aproximación que representa el grado de bioaccesibilidad en el intestino delgado. Para llevar a cabo los experimentos de absorción intestinal con el modelo de células Caco, una vez llegadas las células a los estadíos de confluencia y una vez analizada la formación de las microvellosidades del epitelio intestinal, las células se sembraron y cultivaron con medios de cultivo en los cuales se añadieron los ácidos grasos o aceites a ensayar: EPA, DHA, o 3 mezclas EPA:DHA con diferentes proporciones de los dos PUFAs. Se realizaron los experimentos con los medios de cultivo sin oxidar y los medios sometidos a oxidación bajo condiciones estomacales de pH y temperatura. Para poder seguir la absorción y posterior metabolismo de los PUFAs de interés, se utilizaron isótopos radiactivos de EPA y DHA. La absorción celular se midió por conteo de la concentración de los elementos radiactivos del contenido intracelular. Para estudiar el metabolismo lipídico, un extracto del contenido intracelular se extrajo mediante una separación de Bligh and Dyer y se cromatografiaron en capa fina las diferentes familias de lípidos, cuantificando el nivel de radiactividad con un medidor de imagen.

Los resultados mostraron una correlación inversa entre la extensión de la oxidación lipídica durante la digestión gástrica y la cantidad de lípidos bioaccesibles en las membranas “intestinales” del TIM-1. La dieta con el ratio 1:1 EPA:DHA mostró ser más resistente a la oxidación durante la digestión en comparación con las dietas 1:2 y 2:1 EPA:DHA. Y consequentemente, el nivel de lípidos bioaccesibles en la dieta 1:1 fue mayor. Además, de acuerdo con la concentración de sustrato oxidable, la dieta de soja rica en LA resultó ser menos oxidada que las otras tres dietas de EPA y DHA. Estos datos sugirieron que al aumentar el nivel de insaturación de los ácidos grasos (LA < EPA < DHA) aumenta la inestabilidad oxidativa como ya se había planteado en los capítulos II y III. Sin embargo, aunque sin diferencias significativas, la combinación 1:1 EPA:DHA produjo menores niveles de dienos conjugados que la combinación con mayor cantidad de EPA (mezcla 2:1 EPA:DHA). Por lo tanto, parece que no sólo el nivel de insaturación del PUFA, sinó también la combinación entre ellos puede influír en la estabilidad oxidativa de la dieta.

En concordancia con lo observado en los filtros del TIM-1, los estudios de absorción intestinal en las células Caco-2 mostraron una reducción significativa de la absorción

cuando los PUFAs del medio de cultivo se habían oxidado previamente. Entre los posibles mecanismos que expliquen este hecho, destaca el cambio de polaridad de las moléculas al oxidarse y daño que los productos de peroxidación lipídica puedan hacer sobre la estructura e integridad de las membranas celulares, pudiendo afectar a mecanismos de transporte celular, permeabilidad, etc. Además, esta pérdida de absorción al oxidarse el medio de cultivo fue más acusada al crecer las células con DHA que con EPA, y la comparativa entre las diferentes mezclas mostró una menor bioaccesibilidad para el ratio 1:2 EPA:DHA. Nuevamente, la menor pérdida de absorción se alcanzó con el ratio 1:1 y no con el 2:1 EPA:DHA. Parece confirmarse que el aumento de DHA en la dieta es más susceptible de sufrir oxidación, y consequentemente, se reduce el nivel de absorción, y además, la combinación 1:1 EPA:DHA resultó ser más efectiva en la reducción del daño oxidativo a las células que la mezcla con mayor proporción de EPA. Por lo tanto, de este trabajo se puede concluir que la proporción 1:1 EPA:DHA es la más estable durante la digestión, y también la más absorbida. Este resultado podría contribuir a explicar la diferente modulación del metabolismo de los mediadores lipídicos y demás parámetros de inflamación y estrés oxidativo estudiados en los capítulos II y III.

Finalmente, cuando se compararon las mezclas EPA:DHA de control con mezclas oxidadas, los resultados mostraron que el proceso de oxidación afectó también al metabolismo de los ácidos grasos. Los cambios siguieron tendencias similares a las observadas para EPA y DHA individuales: la oxidación disminuyó la incorporación en TG, DG y FFA de EPA, e incrementó la incorporación de EPA y DHA en PL. En contraste con las mezclas 1:2 y 2:1, las incubaciones de la relación 1: 1 no oxidada y oxidada mostraron perfiles de metabolitos similares con la excepción de los porcentajes de FFA. Es decir, al cultivar las células con las mezclas 1:2 y 2:1 EPA:DHA, las más inestables al pasar por el proceso digestivo, se modificó parcialmente el metabolismo celular de los PUFAs. Se apreciaron diferencias en la composición de los quilomicrones entre las dietas oxidadas y no-oxidadas, es decir, la transformación de los PUFAs en triglicéridos y/o fosfolípidos. Es posible que, debido a la oxidación, existe una menor disponibildiad de EPA y DHA puesto que la fracción oxidada no consigue atravesar la barrera intestinal, y por tanto, lo que hay se utiliza, de forma preferente, para sintetizar los fosfolípidos de membrana y lo que queda (que es menor que en los suplementos NO oxidados) para TG, DG y FA. Lo que puede influír en su posterior distribución a los tejidos y funcionalidad que desempeñarán estos PUFAs, afectando también a la síntesis de mediadores lipídicos y demás parámetros.

Todos los experimentos y resultados hasta aquí descritos apuntan a que una proporción EPA:DHA balanceada 1:1 ofrece los mejores efectos a nivel de la modulación de las rutas de síntesis de los mediadores lipídicos, en conjunto con los datos de estabilidad gastrointestinal de las mezclas EPA:DHA, y por tanto, sitúa a los individuos en las condiciones más favorables desde el punto de vista de la inflamación y el estrés oxidativo.

Dada la susceptibilidad que EPA y DHA parecen tener también *in vivo*, y por tanto, de cara a controlar esta oxidación, el estudio continuó incorporando compuestos que puediesen estabilizar los PUFA ω-3 En relación a esto, el uso de antioxidantes en la dieta es una estrategia común para proteger a los lípidos de la oxidación. Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación demostraron la efectividad de los polifenoles de la uva previniendo la peroxidación de los aceites de pescado en el tracto digestivo y facilitando su absorción intestinal. Por ello, el objetivo del trabajo planteado en el **capítulo V** pretendió evaluar el posible efecto sinérgico del consumo conjunto de PUFAs ω-3 de origen marino y antioxidantes, sobre los parámetros lipidómicos estudiados en los dos modelos anteriores, centrando el estudio en los mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria inducida por dietas altas en grasa y sacarosa.

Para ello se utilizó un modelo animal de desórdenes metabólicos inducidos por el consumo de una dieta alta en grasa y azúcares (siglas en inglés HFHS), utilizando como control un modelo sano alimentado con una dieta estándar. Este modelo utilizado como modelo para estudiar el papel de los suplementos en la prevención del desorden metabólico, presenta menos alteraciones metabólicas que el modelo genético SHROB usado en el capítulo III, evitando desórdenes genéticos que no pueden ser revertidos con la intervención nutricional. Ambos modelos animales se dividieron en 4 subgrupos en función del suplemento añadido a la dieta estándar/HFHS. Un suplemento control en el que se utilizó soja para compensar el aporte calórico de los otros suplementos, un suplemento de EPA:DHA en proporción 1:1, un suplemento de un extracto de polifenoles de uva, y un suplemento combinado de la mezcla EPA:DHA y el extracto de polifenoles.

El trabajo analizó la incorporación de los ácidos grasos PUFA ω-3 en el plasma y eritrocitos, así como en el hígado y tejido adiposo. De esta manera se obtuvo una figura más completa de la influencia de la dieta en la distribución y perfiles lipídicos en los principales tejidos, índices de actividad desaturasa, biomarcadores que se han asociado a inflamación y obesidad como la presencia de ácidos grasos del tipo de 16:1 ω-7 o 18:1ω-9. Se estudió la formación de mediadores lipídicos en plasma y el nivel de oxidación lipídica en el hígado, y los datos se correlacionaron con otros parámetros clínicos de inflamación y estrés oxidativo realizados en el grupo.

En concordancia con los capítulos II y III, el suplemento de PUFAs de origen marino produjo un efecto general antiinflamatorio y antioxidante en ambos modelos animales. La funcionalidad de este suplemento demostró ser independiente de los dos contextos calóricos estudiados. A continuación se describe cómo el suplemento de EPA y DHA mejoró los parámetros del perfil lipídico y mediadores lipídicos hacia una situación antiinflamatoria, en consonancia con los datos clínicos del índice CRP y TNFα, menores en los grupos alimentados con este suplemento. En relación con el estrés oxidativo, la formación de dienos conjugados en el hígado no se vió afectada por el aumento de sustrato oxidable debido a la inclusión de ácidos grasos insaturados en la

dieta. Además, los parámetros medidos de actividad enzimática antioxidante y carbonilación proteica mostraron una activación del sistema antioxidante con el suplemento de ω-3.

Al incluír EPA y DHA en la dieta, los diferentes tejidos, membranas celulares, y fracciones de PUFAs circulantes se enriquecieron en estos ácidos grasos. Además, no sólo aumentó la proporción de PUFAs ω-3, sinó que en este trabajo se observó una competencia de sustratos por la desaturasa D5 en el hígado que regula a la vez la síntesis *de novo* de EPA y ARA, provocando una disminución de la cantidad de ARA en el hígado. Este efecto observado en el hígado se transmitió a la fracción de lípidos circulantes y se vió reflejada en los lípidos acumulados en el tejido adiposo. Se observó también que la síntesis de los fosfolípidos de membrana estaba afectada por la competencia de sustratos por las mismas enzimas, dando lugar a un aumento de la proporción de EPA y DHA y disminución de ARA en los grupos alimentados con el aceite de pescado. Como consecuencia, los ratios ω6/ω3 en plasma, membranas y tejidos, considerados marcadores de inflamación, disminuyeron tras el aporte de EPA y DHA en la dieta en ambos contextos calóricos.

Es resaltable, que los grupos alimentados con EPA y DHA redujeron la acumulación de ácido oleico en el tejido adiposo, e incluso modularon la actividad de la desaturasa SCD-18 hacia una menor actividad en la formación de este ácido graso asociado con procesos inflamatorios, de obesidad, hipertrigliceridemia, y riesgo de desarrollar resistencia a la insulina.

Los suplementos de EPA y DHA afectaron a la producción de mediadores lipídicos de un modo similar en ambos contextos dietarios. Al aumentar la proporción de EPA y DHA respecto ARA en las membranas, por un fenómeno de competencia de sustratos por la fosfolipasa A_2, se libera mayor cantidad de EPA y DHA al citosol de las células en donde son transformados por las COXs, LOXs, CyP, y otras enzimas. Por lo tanto, se observó un descenso de los metabolitos proinflamatorios derivados del ARA y un aumento de los derivados ω-3 menos inflamatorios. Interesantemente, los grupos sin aporte de EPA y DHA en la dieta, mostraron una incorporación mayor de DHA en las membranas de los eritrocitos. En consecuencia, los derivados de la 15LOX del DHA se encontraron más concentrados que los derivados del EPA. Sin embargo, al incluír el suplemento en la dieta, la incorporación de EPA y DHA en las membranas se hizo más similar y se observó un incremento mayor en la producción del derivado de la 15LOX del EPA, mostrando una preferencia de sustrato por el ácido graso con menor impedimento estérico como ya se había apuntado en los capítulos II y III. Finalmente, los suplementos de PUFAs ω-3 aumentaron la producción de 17HDoHE, precursor de los potentes derivados antiinflamatorios: resolvinas, protectinas y maresinas.

Al incluír los polifenoles en la dieta, en concordancia con lo esperado se observó un efecto antioxidante en ambos contextos calóricos en la mayor parte de los parámetros descritos anteriormente. Sin embargo, su capacidad de regular la respuesta inflamatoria

se vió afectada por la presencia o no, de un elevado contenido en grasa y azúcares. En el grupo de dieta estándar, los polifenoles actuaron bajando los parámetros de estrés oxidativo e inflamación, dando lugar a un efecto sinérgico para alguno de ellos al combinarse con los PUFAs de origen marino. En el grupo HFHS, los polifenoles no fueron tan efectivos en reducir los parámetros de inflamación e incluso provocaron el aumento de algunos de ellos.

Los suplementos de polifenoles mostraron una tendencia a disminuír la actividad de las desaturasas hacia la síntesis de ARA, EPA, y DHA, aunque este efecto no se vió reflejado en una influencia en el perfil de ácidos grasos en los diferentes tejidos, y tampoco en los ratios ω6/ω3. Por lo tanto, al no afectarse los ratios en las membranas no se espera un perfil diferente de mediadores lipídicos por fenómenos de competencia enzimática como con los producidos por los suplementos de EPA y DHA. Sin embargo, se observó una disminución general de la síntesis de mediadores lipídicos en la dieta estándar, posiblemente porque los polifenoles limitan la actividad de la fosfolipasa A_2 que libera los PUFAs de los fosfolípidos de membrana, o las enzimas LOXs y COXs. Asimismo, en el contexto HFHS los polifenoles no disminuyeron la actividad de estas enzimas y aumentaron significativamente la producción de los derivados proinflamatorios ω-6 de la COX. Esta situación menos favorable desde el punto de vista inflamatorio producida por la presencia de polifenoles en un contexto HFHS, también se observó en otros parámetros como los índices CRP y TNFα, o el aumento de FFA en plasma.

En conclusión, los suplementos de EPA y DHA mostraron un efecto beneficioso en cuanto a la prevención del desarrollo de desórdenes metabólicos ya que disminuyeron los factores relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo. Los mecanismos propuestos se relacionaron con fenómenos de competencia enzimática, la dilución de la proporción de PUFAs ω-6 al aumentar la ingesta de PUFAs ω-3, y la activación del sistema endógeno antioxidante y antiinflamatorio, regulado en muchas ocasiones por los propios mediadores lipídicos. Por otra parte, la inclusión de polifenoles en la dieta produjo un efecto antioxidante y sinérgico con los PUFAs ω-3. Actúan a nivel de detoxificación de ROS, modulando la actividad de las enzimas antioxidantes, etc. En relación con la respuesta inflamatoria, la inclusión de polifenoles en la dieta produjo efectos diferentes según el contexto dietario en el que fueron incluidos. En un contexto estándar promovieron una respuesta antiinflamatoria sinérgica con el suplemento de PUFAs ω-3. Sin embargo, en un contexto HFHS los polifenoles fueron menos efectivos en la reducción de la inflamación e incluso promovieron la activación de ciertas rutas. Uno de los mecanimos propuestos para esta diferente bioactividad, es la influencia de otros componentes de la dieta en su biodisponibilidad, absorción y metabolismo afectando por tanto a su funcionalidad (se metabolizan de forma diferente en el tracto intestinal debido a un cambio en la microbiota originado por la dieta HFHS).

Los resultados obtenidos de los mediadores lipídicos en los capítulos anteriores ofrecen una visión parcial del efecto que los suplementos ejercen sobre las rutas metabólicas.

Existen otras rutas de creciente interés para la comunidad científica como las reguladas por las enzimas sEH o las 5LOX, de las cuales no se han incluído suficientes metabolitos en el método desarrollado en el capítulo I. Además, se observaron numerosos picos sin identificar con transiciones similares a otros mediadores lipídicos de la bibliografía en los cromatogramas estudiados de las muestras. Por lo tanto, se hizo patente la necesidad de perfeccionar la metodología de análisis para ampliar el rango de búsqueda de compuestos así como para optimizar la extracción en otros tejidos menos estudiados.

El **capítulo VI** fue un trabajo de mejora analítica para el análisis de mediadores lipídicos. El principal objetivo del trabajo fue conseguir la interpretación de los espectros tipo de las diferentes familias de mediadores para obtener patrones de fragmentación característicos que permitiesen la identificación y detección de los diferentes compuestos. Para ello, se realizó una propuesta de análisis no dirigido en base al estudio de los espectros de masas obteniendo un *screening* de las muestras para más de 100 metabolitos. La mayor ventaja respecto a un análisis dirigido en MRM es la no limitación al análisis de una lista de compuestos predefinida que se pueden hallar o no en las muestras. Desde el punto de vista cuantitativo se amplió el número de compuestos a analizar a 65, casi tres veces más que en el método anterior. Asimismo, se mejoraron algunos aspectos de la extracción en plasma, se acortó la cromatografía, y se desarrolló y validó la metodología de análisis para tejido adiposo.

Son pocos los trabajos encontrados que utilizan una metodología de análisis no dirigida. El elevado número de isómeros y familias con los mismo iones moleculares, dificulta el estudio y obtención de patrones de fragmentación inequívocos para cada compuesto. En el presente estudio, se registraron los espectros de masas de más de 100 compuestos, muchos de ellos isómeros. La localización del grupo funcional en las diferentes familias de isómeros permitió observar, en muchos casos, una o varias roturas de masas específicas para poder identificar dichos metabolitos. Compuestos de diferentes familias pero con el mismo ión molecular, generalmente, mostraron diferentes patrones de fragmentación. Aunque en algunas ocasiones, la mala resolución cromatográfica de estos compuestos produjo contaminaciones de unos picos en otros. Para algunos compuestos, no fue posible encontrar una transición que sea específica y que se produzca con la suficiente intensidad, por lo tanto, el uso de varias transiciones puede ayudar en su identificación. Es posible encontrar estudios de interpretación de los espectros de masas para muchos de los derivados ω-6 del ARA, siendo muy escasas las que estudian los espectros de los derivados ω-3 del EPA y DHA.

Se han utilizado 65 estándares comerciales para poner a punto las condiciones de determinación y extracción. Al igual que en el capítulo I, se validó la linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, LOD, y LOQ del método de análisis usando para ello las transiciones de masas más selectivas y sensibles. Una vez puesto a punto el método de determinación en base a los patrones de fragmentación de masas, se modificaron algunas condiciones relativas a la extracción de estos 65 compuestos en plasma

partiendo del protocolo del capítulo I. Destaca la inclusión de BHT, un antioxidante que ha permitido obtener recuperaciones cuantitativas sin la necesidad de trabajar en una cámara fría a 4 ºC. Además, se acortó la etapa de elución de muestra, realizándola sobre viales de cromatografía y concentrando los extractos a vacío en un *Speed-vac.* Se analizaron los porcentajes de recuperación global del método, de la etapa de SPE, y el efecto matriz de las muestras. La recuperación correspondiente a la SPE mostró valores cercanos al 100% para todos los compuestos, al igual que en el método desarrollado en el capítulo I. Para un grupo de compuestos que eluyen al final del cromatograma, el efecto matriz supuso una amplificación de la señal de hasta el 500%. Se realizaron diferentes pruebas de lavado de los cartuchos de SPE, extracción de muestra con hexano, diclorometano, etc. Sin embargo, no se han conseguido eliminar las interferencias que provocan dicho efecto matriz por ahora.

El método se aplicó al análisis de mediadores lipídicos en tejido adiposo. Para la extracción de los metabolitos del tejido adiposo se evaluaron cada una de las partes del proceso hasta obtener las condiciones finales recogidas en este capítulo. A diferencia del plasma, el pretratamiento de la muestra necesita una extracción con el 100% de disolvente orgánico ya que el 30% optimizado para plasma no ofrecía recuperaciones cuantitativas. Se añadieron dos ciclos de sonicación y centrifugación para favorecer la extracción de los metabolitos lipídicos a la fase orgánica. Se probaron diferentes condiciones de intensidad y amplitud de las ondas de ultrasonido. También se optimizó el número de repeticiones, obteniendo con 2 ciclos el 100% de recuperación de los compuestos en esta fase. Las etapas correspondientes a la SPE se evaluaron encontrando las mismas condiciones que para la extracción en muestras de plasma. Finalmente, se analizaron los porcentajes de recuperación global del método, de la etapa de SPE, y el efecto matriz de las muestras. Las recuperaciones en la etapa de la SPE fueron menores que en plasma, y los efectos matriz observados fueron del mismo orden que en plasma.

Una vez validada la extracción y análisis de este grupo de mediadores lipídicos, se analizaron muestras de plasma y tejido adiposo, correspondientes a ratas Wistar Kyoto para realizar un *screening* e identificar posibles compuestos en base al estudio hecho sobre los patrones de fragmentación. Se utilizaron muestras con adición de los patrones disponibles para validar las identificaciones, alcanzando un 85-90% de acierto en las predicciones. Alguna de las dificultades encontradas fue la rotura inesperada de los iones moleculares de los hidroperóxidos en la propia fuente de ionización, lo que supuso incluir nuevos iones padre en el método de *Total Ion Scan* para poder analizar con suficiente sensibilidad estos analitos.

Esta mejora metodológica se está aplicando en los proyectos que se están llevando a cabo actualmente en el grupo. El estudio de los patrones de fragmentación permitió orientar la búsqueda de analitos en cada muestra para obtener la información más precisa y efectiva en función del tejido. La cuantificación de un número mayor de metabolitos en estas muestras ofrece una visión más amplia y compleja de las rutas metabólicas moduladas nutricionalmente.

VI. CONCLUSIONES

Conclusions

1. We developed a robust and sensitive Lipidomic platform based on solid phase extraction and liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the simultaneous quantification in blood plasma of 23 eicosanoids and docosanoids overcoming issues associated to the wide range of polarity, low concentration and stability of metabolites, false positive identifications, and so on. Two mass detectors were tested and compared, a LIT and a QqQ.

2. The analytical platform was applied to identify lipid mediators in different animal models in order to correlate the influence of the diet and marine oils supplements rich in ω-3 PUFAs, EPA and DHA with the up/down regulation of lipid mediators pathways and the progression of inflammation, oxidative stress and metabolic disorders.

3. This research evidenced that in addition to an adequate dietary proportion between ω-6 and ω-3 PUFA, the proportion between marine ω-3 type lipids is also important and its intake could contribute towards the prevention of chronic inflammation and oxidative stress processes that have been correlated with metabolic disorders in health animal models (Wistar rats). In detail, our results evidenced that 1:1 and 2:1 EPA:DHA supplements were the most effective treatments to reduce inflammation and oxidative stress when compared with 1:2 EPA:DHA, linseed and soybean ones according to the lipid mediators profile, FAD activities, and ω-6/ω-3 ratios in plasma and membranes, in agreement with previous results on Proteomics and clinical parameters.

4. Animals developing metabolic syndrome from a spontaneous mutation (Koletsky rats) also showed an improvement on inflammation and clinical parameters, a decrease of strong pro-inflammatory eicosanoids synthesis, an activation or preservation of the antioxidant endogenous defenses, and a shift towards greater anti-inflammatory profiles associated to FA composition, when fed with 1:1 and 2:1 EPA/DHA marine oils.

5. An *in vitro* model of the gastrointestinal digestive tract and cultured small intestine enterocytes were used to delve into the potential mechanisms underlying the health effects of marine lipids. Results showed that balanced 1:1 EPA:DHA ratio produces the lowest PUFA oxidation level during the gastric digestion and subsequently, the highest level of bioaccessible products and cell assimilation efficiency compared with other ratios. These findings highlighted the importance of dietary design for improving PUFA stability during gastrointestinal digestion and bioavailability, in order to potentiate their further health benefits.

6. Next goal was to combine ω-3 PUFAs in the specific proportion 1:1 EPA:DHA with natural antioxidants like polyphenols in order to study possible antiinflammatory and antioxidant synergic effects. The influence of both supplements on the metabolic pathways of lipid mediators had not been characterized yet. A dietary

animal model of metabolic disorders was established by a high-fat high-sucrose diet. Our final outcomes evidenced again the effectiveness of fish oils to enhance the antiinflammatory and antioxidant response regardless the composition of the diet. However, polyphenols bioactivity resulted to be tentatively influenced by the fat and sugar content of the diet. In a standard diet they modulated the response towards anti-inflammatory and anti-oxidant, and the combination with fish oils exerted an interesting cooperative influence. In the high caloric diet, the efficacy of polyphenols to reduce inflammation was lower and some pro-inflammatory pathways of lipid mediators were found even up-regulated.

7. Finally, an innovative method for the analysis of lipid mediators in biological samples like plasma and adipose tissue was proposed. It was based on the extensive study of fragmentation patterns that provided fingerprints to comprehensively elucidate and identify over 100 bioactive metabolites by a previous screening of the samples. Then, specific targets can be quantified by MRM analysis. The number of different families studied increased considerably compared with the previous method; which will provide greater information about regulated pathways and mechanims of action of the different supplements in further dietary interventions.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, et al. A comprehensive classification system for lipids. J Lipid Res. 2005;46:839–61.
2. Gunstone FD. Fatty acid and lipid chemistry. 1996. xi + 252pp. p.
3. Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. Chapter 18: Lipidic metabolism I: fatty acids, triacylglycerols and lipoproteins. In: Capella I, editor. Biochemistry. Oregon: Addison Wesley; 2003.
4. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principios de Bioquímica. Barcelona: Omega; 2001.
5. Rawn JD. Bioquímica. Madrid: Interamericana- McGraw-Hill; 1989.
6. Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC. Fatty-Acid Synthesis and its Regulation. Annu Rev Biochem. 1983;52:537–79.
7. Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. Lipid biochemistry. An introduction. Oxford: Blackwell Science; 2002.
8. Sprecher H. The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2002;67:79–83.
9. Fu Z, Sinclair AJ. Novel pathway of metabolism of alpha-linolenic acid in the guinea pig. Pediatr Res. 2000;47:414–7.
10. Stark AH, Crawford MA, Reifen R. Update on alpha-linolenic acid. Nutr Rev. 2008;66:326–32.
11. Calder PC. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cytokine Production in Health and Disease. Ann Nutr Metab. 1997;41:203–34.
12. Kamal-Eldin A, Yanishlieva N V. N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations. Eur J Lipid Sci Technol. 2002;104:825–36.
13. Spiteller G, Kern W, Spiteller P. Investigation of aldehydic lipid peroxidation products by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr a. 1999;843:29–98.
14. Halliwell B, Gutteridge MC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University press; 1985.
15. Erickson MC. Lipid oxidation of muscle foods. In: Akoh, Min DB, editors. Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology. New York: Marcel Deker; 2002. p. 365–411.
16. Allen JC, Hamilton RJ. Rancidity in Foods. New York: Chapman and Hall; 1994.
17. Frankel EN. Lipid Oxidation. West Ferry, Dundee, Scotland: The Oily Press LTD; 1998.
18. Yin H, Brooks JD, Gao L, Porter NA, Morrow JD. Identification of novel autoxidation products of the omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid in vitro and in vivo. J Biol Chem. 2007;282:29890–901.
19. Guichardant M, Chen P, Liu M, Calzada C, Colas R, Véricel E, Lagarde M. Functional lipidomics of oxidized products from polyunsaturated fatty acids. Spec issue to LipidomicNet ENOR Jt Work Anal Funct oxysterols other Regul lipotoxic Mol lipid species LipidomicNet-ENOR Jt Work [Internet]. 2011;164:544–8. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000930841100065X
20. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2005;81:341–54.
21. Jew S, AbuMweis SS, Jones PJH. Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. J Med Food. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2009;12:925–34.
22. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Exp Biol Med. SAGE Publications; 2008;233:674–88.
23. Grundy SM. Metabolic Syndrome Pandemic. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. 2008;28:629 LP-636. Available from: http://atvb.ahajournals.org/content/28/4/629.abstract
24. Hutcheson R, Rocic P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. Exp Diabetes Res. Hindawi Publishing Corporation; 2012;2012.
25. Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ. The F2-Isoprostane, 8-Epi-Prostaglandin-F2-Alpha, a Potent Agonist of the Vascular Thromboxane Endoperoxide Receptor, is a Platelet Thromboxane Endoperoxide Receptor Antagonist. Prostaglandins. 1992;44:155–63.
26. Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012;16:1137–54.
27. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011;96:27–36.
28. Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: the

oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis. Elsevier; 2010;20:72–7.
29. Sears B. The Anti-inflammation Zone. New York: Regan Books; 2005.
30. Vidon C, Boucher P, Cachefo A, Peroni O, Diraison F, Beylot M. Effects of isoenergetic high-carbohydrate compared with high-fat diets on human cholesterol synthesis and expression of key regulatory genes of cholesterol metabolism. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2001;73:878–84.
31. Arora RC, Agarwal N, Arora S, Garg RK, Gupta G. High fat and cholesterol diet induced changes in plasma cholesterol and lipoprotein in healthy human volunteers. J Assoc Physicians India. 1987;35:774–5.
32. Sacks FM, Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. Am J Med. 2002;113:13–24.
33. Freedman JE. High-fat diets and cardiovascular disease: are nutritional supplements useful? J Am Coll Cardiol. Am Coll Cardio Found; 2003;41:1750–2.
34. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity. Wiley Online Library; 2007;15:798–808.
35. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutierrez J, Brandan E, Leiva A, Sobrevia L, Conget P. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. PLoS One. Public Library of Science; 2013;8:e60931.
36. Attorri L, Di Biase A, Di Benedetto R, Rigato P, Di Virgilio A, Salvati S. Micronutrient-enriched rapeseed oils reduce cardiovascular disease risk factors in rats fed a high-fat diet. Atherosclerosis. 2010;213:422–8.
37. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado J, Arola L, et al. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. J Nutr Biochem. 2009;20:210–8.
38. Baiges I, Palmfeldt J, Blade C, Gregersen N, Arola L. Lipogenesis Is Decreased by Grape Seed Proanthocyanidins According to Liver Proteomics of Rats Fed a High Fat Diet. Mol Cell Proteomics. 2010;9:1499–513.
39. Zhang XC, Dong F, Ren J, Driscoll MJ, Culver B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. Exp Neurol. 2005;191:318–25.
40. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet–induced insulin resistance and obesity. Metabolism. Elsevier; 2008;57:1071–7.
41. Kalra EK. Nutraceutical-definition and introduction. AAPS PharmSci. Springer; 2003;5:27–8.
42. Kris-Etherton PM. AHA science advisory: monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. J Nutr. Am Soc Nutrition; 1999;129:2280–4.
43. Turner BL, Thompson AL. Beyond the Paleolithic prescription: incorporating diversity and flexibility in the study of human diet evolution. Nutr Rev. The Oxford University Press; 2013;71:501–10.
44. Sies H. Oxidative stress: impact in redox biology and medicine. Arch Med Biomed Res. International Association of Medical and Biomedical Researchers; 2015;2:146–50.
45. Micha R, Mozaffarian D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. Nat Rev Endocrinol. 2009;5:335–44.
46. Simopoulos AP, Norman HA, Gillaspy JE. Purslane in human nutrition and its potential for world agriculture. Plants in human nutrition. Karger Publishers; 1995. p. 47–74.
47. van Vliet T, Katan MB. Lower ratio of n-3 to n-6 fatty acids in cultured than in wild fish. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 1990;51:1–2.
48. Jackson A, Chamberlain A. Los Omega-3 más saludables EPA y DHA se encuentran principalmente en el aceite y la harina de pescado [Internet]. Available from: http://www.iffo.net
49. Birch EE, Hoffman DR, Castaneda YS, Fawcett SL, Birch DG, Uauy RD. A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age. Am J Clin Nutr [Internet]. 2002 [cited 2016 Dec 15];75:570–80. Available from: http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/75/3/570
50. Guesnet P, Pugo-Gunsam P, Maurage C, Pinault M, Giraudeau B, Alessandri J-M, Durand G, Antoine J-M, Couet C. Blood lipid concentrations of docosahexaenoic and arachidonic acids at birth determine their relative postnatal changes in term infants fed breast milk or formula. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 1999;70:292–8.
51. Roussel C, Cordonnier C, Galia W, Le Goff O, Thévenot J, Chalancon S, Alric M, Thevenot-Sergentet D, Leriche F, Van de Wiele T. Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions. Pediatr

Res. Springer Nature; 2016;
52. Kromhout D, de Goede J. Update on cardiometabolic health effects of ω-3 fatty acids. Curr Opin Lipidol. LWW; 2014;25:85–90.
53. Simopoulos AP. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. Nutrients. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2013;5:2901–23.
54. Phillips CM, Goumidi L, Bertrais S, Field MR, Ordovas JM, Cupples LA, Defoort C, Lovegrove JA, Drevon CA, Blaak EE. Leptin receptor polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to augment risk of insulin resistance and metabolic syndrome in adults. J Nutr. Am Soc Nutrition; 2010;140:238–44.
55. Nuernberg K, Breier BH, Jayasinghe SN, Bergmann H, Thompson N, Nuernberg G, Dannenberger D, Schneider F, Renne U, Langhammer M. Metabolic responses to high-fat diets rich in n-3 or n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in mice selected for either high body weight or leanness explain different health outcomes. Nutr Metab (Lond). BioMed Central; 2011;8:1.
56. Donahue SMA, Rifas-Shiman SL, Gold DR, Jouni ZE, Gillman MW, Oken E. Prenatal fatty acid status and child adiposity at age 3 y: results from a US pregnancy cohort. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2011;93:780–8.
57. Pérez-Martinez P, Pérez-Jimenez F, López-Miranda J. n-3 PUFA and lipotoxicity. Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Biol Lipids. 2010;1801:362–6.
58. Neilson AP, Djuric Z, Ren J, Hong YH, Sen A, Lager C, Jiang Y, Reuven S, Smith WL, Brenner DE. Effect of cyclooxygenase genotype and dietary fish oil on colonic eicosanoids in mice. J Nutr Biochem. 2012;23:966–76.
59. McDaniel JC, Massey K, Nicolaou A. Fish oil supplementation alters levels of lipid mediators of inflammation in microenvironment of acute human wounds. Wound Repair Regen. 2011;19:189–200.
60. Brahmbhatt V, Oliveira M, Briand M, Perrisseau G, Schmid VB, Destaillats F, Pace-Asciak C, Benyacoub J, Bosco N. Protective effects of dietary EPA and DHA on ischemia-reperfusion-induced intestinal stress. J Nutr Biochem. 2013;24:104–11.
61. Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R. Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2008;79:109–15.
62. Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. Mol Cell Biochem. 2004;263:217–25.
63. Mozaffarian D, Bryson CL, Lemaitre RN, Burke GL, Siscovick DS. Fish Intake and Risk of Incident Heart Failure. J Am Coll Cardiol. 2005;45:2015–21.
64. Laaksonen DE, Nyyssönen K, Niskanen L, Rissanen TH, Salonen JT. Prediction of cardiovascular mortality in middle-aged men by dietary and serum linoleic and polyunsaturated fatty acids. Arch Intern Med. American Medical Association; 2005;165:193–9.
65. Amri EZ, Ailhaud G, Grimaldi PA. Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. J Lipid Res. ASBMB; 1994;35:930–7.
66. Clarke SD, Turini M, Jump D. Polyunsaturated fatty acids regulate lipogenic and peroxisomal gene expression by independent mechanisms. Prostaglandins, Leukot Essent Fat acids. Elsevier; 1997;57:65–9.
67. Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. J Lipid Res. ASBMB; 1994;35:1076–84.
68. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2000;71:343s–348s.
69. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat Rev Immunol. 2008;8:349–61.
70. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. Nutrients. Molecular Diversity Preservation International; 2010;2:355–74.
71. Carrillo-Tripp M, Feller SE. Evidence for a mechanism by which omega-3 polyunsaturated lipids may affect membrane protein function. Biochemistry. 2005;44:10164–9.
72. Ehringer W, Belcher D, Wassall SR, Stillwell W. A comparison of the effects of linolenic (18: 3Ω3) and docosahexaenoic (22: 6Ω3) acids on phospholipid bilayers. Chem Phys Lipids. Elsevier; 1990;54:79–88.
73. Calder PC. n− 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2006;83:S1505–1519S.
74. Massey KA, Nicolaou A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. Free Radic Bio Med. 2013;59:45–55.

75. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu Rev Cell Dev Biol. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1998;14:111–36.
76. Liu J, Oh P, Horner T, Rogers RA, Schnitzer JE. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. J Biol Chem. ASBMB; 1997;272:7211–22.
77. Shaikh SR. Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. J Nutr Biochem. Elsevier; 2012;23:101–5.
78. Sun Y-P, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, Colgan SP, Petasis NA, Serhan CN. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer - Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. J Biol Chem. 2007;282:9323–34.
79. Kelly L, Grehan B, Della Chiesa A, O'Mara SM, Downer E, Sahyoun G, Massey KA, Nicolaou A, Lynch MA. The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. Neurobiol Aging. 2011;32:2318–33.
80. Calviello G, Su H-M, Weylandt KH, Fasano E, Serini S, Cittadini A. Experimental evidence of omega-3 polyunsaturated fatty acid modulation of inflammatory cytokines and bioactive lipid mediators: their potential role in inflammatory, neurodegenerative, and neoplastic diseases. Biomed Res Int. 2013;2013:1–13.
81. Kang JX, Weylandt KH. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. Subcell Biochem. 2008;49:133–43.
82. Gao L, Yin HY, Milne GL, Porter NA, Morrow JD. Formation of F-ring isoprostane-like compounds (F-3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid. J Biol Chem. 2006;281:14092–9.
83. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n− 3 and n− 6 fatty acids. Prog Lipid Res. Elsevier; 2008;47:147–55.
84. Waddington E, Sienuarine K, Puddey I, Croft K. Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 2001;292:234–44.
85. Lazic M, Inzaugarat ME, Povero D, Zhao IC, Chen M, Nalbandian M, Miller YI, Cherñavsky AC, Feldstein AE, Sears DD. Reduced dietary omega-6 to omega-3 fatty acid ratio and 12/15-lipoxygenase deficiency are protective against chronic high fat diet-induced steatohepatitis. PLoS One. Public Library of Science; 2014;9:e107658.
86. Lee CH. Resolvins as New Fascinating Drug Candidates for Inflammatory Diseases. Arch Pharm Res. 2012;35:3–7.
87. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP, Petasis NA. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: Assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. J Immunol. 2006;176:1848–59.
88. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. J Exp Med. 2005;201:713–22.
89. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. Mol Nutr Food Res. 2012;56:1073–80.
90. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-κB puzzle. Cell. Elsevier; 2002;109:S81–96.
91. Hennig B, Watkins BA. Linoleic acid and linolenic acid: effect on permeability properties of cultured endothelial cell monolayers. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 1989;49:301–5.
92. Birch EE, Hoffman DR, Castaneda YS, Fawcett SL, Birch DG, Uauy RD. A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age. Am J Clin Nutr. 2002;75:570–80.
93. Massiera F, Barbry P, Guesnet P, Joly A, Luquet S, Moreilhon-Brest C, Mohsen-Kanson T, Amri E-Z, Ailhaud G. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. J Lipid Res. ASBMB; 2010;51:2352–61.
94. Jacobson TA. Role of n-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2008;87:1981S–1990S.
95. Thusgaard M, Christensen JH, Morn B, Andersen TS, Vige R, Arildsen H, Schmidt EB, Nielsen H. Effect of fish oil (n-3 polyunsaturated fatty acids) on plasma lipids, lipoproteins and inflammatory markers in HIV-infected patients treated with antiretroviral therapy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Scand J Infect Dis. 2009;41:760–6.
96. Egert S, Kannenberg F, Somoza V, Erbersdobler HE, Wahrburg U. Dietary alpha-Linolenic Acid, EPA, and DHA Have Differential Effects on LDL Fatty Acid Composition but Similar Effects on Serum Lipid Profiles in Normolipidemic Humans. J Nutr. 2009;139:861–8.

97. De Luis DA, Conde R, Aller R, Izaola O, Gonzalez Sagrado M, Perez Castrillon JL, Duenas A, Romero E. Effect of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertriglyceridemia: an open study. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2009;13:51–5.
98. Gunnarsdottir I, Tomasson H, Kiely M, Martinez JA, Bandarra NM, Morais MG, Thorsdottir I. Inclusion of fish or fish oil in weight-loss diets for young adults: effects on blood lipids. Int J Obes. 2008;32:1105–12.
99. Zuliani G, Galvani M, Leitersdorf E, Volpato S, Cavalieri M, Fellin R. The Role of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) in the Treatment of Dyslipidemias. Curr Pharm Des. 2009;15:4087–93.
100. Gaillard D, Negrel R, Lagarde M, Ailhaud G. Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. Biochem J. Portland Press Limited; 1989;257:389–97.
101. Pisani DF, Amri E-Z, Ailhaud G. Disequilibrium of polyunsaturated fatty acids status and its dual effect in modulating adipose tissue development and functions. Oilseeds Fats, Crop Lipids. EDP Sciences; 2015;22.
102. Lawler OA, Miggin SM, Kinsella BT. Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to Gs-, to Gi-, and to Gq-coupled effector signaling. J Biol Chem. ASBMB; 2001;276:33596–607.
103. Massaro M, Habib A, Lubrano L, Del Turco S, Lazzerini G, Bourcier T, Weksler BB, De Caterina R. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP (H) oxidase and PKCε inhibition. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 2006;103:15184–9.
104. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Expression. Nutr Rev [Internet]. 2014;62:333–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00058.x
105. Baillie RA, Takada R, Nakamura M, Clarke SD. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. Prostaglandins, Leukot Essent Fat acids. Elsevier; 1999;60:351–6.
106. Pérez-Matute P, Pérez-Echarri N, Martínez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-α. Br J Nutr. Cambridge Univ Press; 2007;97:389–98.
107. Hassanali Z, Ametaj BN, Field CJ, Proctor SD, Vine DF. Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR: LA-cp rat. Diabetes, Obes Metab. Wiley Online Library; 2010;12:139–47.
108. Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T, Flachs P, Sponarova J, Vecka M, Tvrzicka E, Bryhn M, Kopecky J. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. Lipids. Springer; 2004;39:1177–85.
109. Belzung F, Raclot T, Groscolas R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. Am J Physiol Integr Comp Physiol. Am Physiological Soc; 1993;264:R1111–8.
110. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Expression. Nutr Rev. 2014;62:333–9.
111. Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. Curr Opin Lipidol. 2008;19:242–7.
112. Bloedon LT, Balikai S, Chittams J, Cunnane SC, Berlin JA, Rader DJ, Szapary PO. Flaxseed and cardiovascular risk factors: Results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. J Am Coll Nutr. 2008;27:65–74.
113. Vijaimohan K, Jainu M, Sabitha KE, Subramaniyam S, Anandhan C, Devi CSS. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. Life Sci. 2006;79:448–54.
114. Guixiang Z, Etherton TD, Martin KR, West SG, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. J Nutr. 2004;134:2991–7.
115. Lopez-Huertas E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. Pharmacol Res. 2010;61:200–7.
116. Magdeldin S, Elewa Y, Ikeda T, Ikei J, Zhang Y, Xu B, Nameta M, Fujinaka H, Yoshida Y, Yaoita E, et al. Dietary supplementation with arachidonic acid but not eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids alter lipids metabolism in C57BL/6J mice. Gen Physiol Biophys. 2009;28:266–75.
117. Bassett CMC, Rodriguez-Leyva D, Pierce GN. Experimental and clinical research findings on the

cardiovascular benefits of consuming flaxseed. Appl Physiol Nutr Metab Appl Nutr Metab. 2009;34:965–74.
118. Makhoul Z, Kristal AR, Gulati R, Luick B, Bersamin A, Boyer B, Mohatt G V. Associations of very high intakes of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids with biomarkers of chronic disease risk among Yup'ik Eskimos. Am J Clin Nutr. 2010;91:777–85.
119. Lindqvist HM, Sandberg A-S, Fagerberg B, Hulthe J. Plasma phospholipid EPA and DHA in relation to atherosclerosis in 61-year-old men. Atherosclerosis. 2009;205:574–8.
120. Kaul N, Kreml R, Austria JA, Richard MN, Edel AL, Dibrov E, Hirono S, Zettler ME, Pierce GN. A comparison of fish oil, flaxseed oil and hempseed oil supplementation on selected parameters of cardiovascular health in healthy volunteers. J Am Coll Nutr. 2008;27:51–8.
121. Allayee H, Roth N, Hodis HN. Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Implications for Nutrigenetics. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2009;2:140–8.
122. Hertz R, Magenheim J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4α. Nature. Nature Publishing Group; 1998;392:512–6.
123. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. Am J Cardiol. Elsevier; 2006;98:27–33.
124. Barre DE. The role of consumption of alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in human metabolic syndrome and type 2 diabetes--a mini-review. J Oleo Sci. 2007;56:319–25.
125. Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. Chapter 19: Lipidic metabolism II: membrane lipids, steroids, isoprenoids and eicosanoids. In: Capella I, editor. Biochemistry. Oregon: Adison Wesley; 2003.
126. Sioen I, Hacquebard M, Hick G, Maindiaux V, Larondelle Y, Carpentier YA, De Henauw S. Effect of ALA-Enriched Food Supply on Cardiovascular Risk Factors in Males. Lipids. 2009;44:603–11.
127. Wang S, Wu D, Matthan NR, Lamon-Fava S, Lecker JL, Lichtenstein AH. Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. Atherosclerosis. 2009;204:147–55.
128. Wang G. Singularity analysis of the AKT signaling pathway reveals connections between cancer and metabolic diseases. Phys Biol. IOP Publishing; 2010;7:46015.
129. Cheng L, Yu Y, Zhang Q, Szabo A, Wang H, Huang X-F. Arachidonic acid impairs hypothalamic leptin signaling and hepatic energy homeostasis in mice. Mol Cell Endocrinol. Elsevier; 2015;412:12–8.
130. Simopoulos AP. The impact of the bellagio report on healthy agriculture, healthy nutrition, healthy people: Scientific and policy aspects and the international network of centers for genetics, nutrition and fitness for health. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2014;7.
131. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science (80-). American Association for the Advancement of Science; 2001;294:1866–70.
132. Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, Serhan CN, Kang JX. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 2006;103:11276–81.
133. Gravaghi C, La Perle KMD, Ogrodwski P, Kang JX, Quimby F, Lipkin M, Lamprecht SA. Cox-2 expression, PGE2 and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice. J Nutr Biochem. 2011;22:360–5.
134. González-Périz A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by ω-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J. FASEB; 2009;23:1946–57.
135. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. Biochimie. Elsevier; 2005;87:81–6.
136. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. Am Soc Clin Investig; 2002;109:1125–31.
137. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences; 2004;101:7281–6.
138. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annu Rev Nutr. 2005;25:317–40.

139. Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. Curr Opin Lipidol. 2002;13:155–64.
140. Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf DJ, Jump DB. The role of liver X receptor-α in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. J Biol Chem. ASBMB; 2003;278:40736–43.
141. Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X receptor a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Am Heart Assoc; 2005;25:2020–30.
142. Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. J Biol Chem. 2000;275:30749–52.
143. Reseland JE, Anderssen SA, Solvoll K, Hjermann I, Urdal P, Holme I, Drevon CA. Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. Am J Clin Nutr. 2001;73:240–5.
144. Diplock AT, Charuleux J-L, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. Br J Nutr. Cambridge Univ Press; 1998;80:S77–112.
145. Salminen S, Bouley C, Boutron M-C, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau M-C, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr. Cambridge Univ Press; 1998;80:S147–71.
146. Brower V. Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? Nat Biotechnol. 1998;16:728–32.
147. Bang HO, Dyerberg J, Hjorne N. Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos. Acta Med Scand. 1976;200:69–73.
148. Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. Plasma-Lipid and Lipoprotein Pattern in Greenlandic West-Coast Eskimos. Nutr Rev. 1986;44:143–6.
149. He K. Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease-Eat Fish or Take Fish Oil Supplement? Prog Cardiovasc Dis. 2009;52:95–114.
150. Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Acta Med Scand. Wiley Online Library; 1980;208:401–6.
151. Adler AI, Boyko EJ, Schraer CD, Murphy NJ. Lower prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes associated with daily seal oil or salmon consumption among Alaska Natives. Diabetes Care. Am Diabetes Assoc; 1994;17:1498–501.
152. Schraer CD, Risica PM, Ebbesson SO, Go OT, Howard B V, Mayer AM. Low fasting insulin levels in Eskimos compared to American Indians: are Eskimos less insulin resistant? Int J Circumpolar Health. 1999;58:272–80.
153. Buckley JD, Howe PRC. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. Obes Rev. Wiley Online Library; 2009;10:648–59.
154. Harris WS, Mozaffarian D, Lefevre M, Toner CD, Colombo J, Cunnane SC, Holden JM, Klurfeld DM, Morris MC, Whelan J. Towards Establishing Dietary Reference Intakes for Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids. J Nutr. 2009;139:804S–819S.
155. Authority EFS. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsatureated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. EFSA J. 2010;8:1461–566.
156. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO Food Nutr Pap. Italy; 2010;91:1–166.
157. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century–the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol. Wiley Online Library; 2003;31:3–24.
158. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, Committee N. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation. Am Heart Assoc; 2002;106:2747–57.
159. Foundation BBN. n-3 Fatty acids and health [Internet]. 1999. Available from: https://www.nutrition.org.uk/publications/briefingpapers/n-3-fatty-acids-and-health.html
160. Liu JK, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. J Appl Physiol. 2000;89:21–8.
161. Malaguti M, Baldini M, Angeloni C, Biagi P, Hrelia S. High-protein-PUFA supplementation, red blood cell membranes, and plasma antioxidant activity in volleyball athletes. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2008;18:301–12.
162. Di Nunzio M, Valli V, Bordoni A. Pro- and anti-oxidant effects of polyunsaturated fatty acid supplementation in HepG2 cells. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2011;85:121–7.
163. Harats D, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Schwartz R, Berry EM, Stein O, Stein Y. Fish

oil ingestion in smokers and nonsmokers enhances peroxidation of plasma lipoproteins. Atherosclerosis. Elsevier; 1991;90:127–39.
164. Meydani M, Natiello F, Goldin B, Free N, Woods M, Schaefer E, Blumberg JB, Gorbach SL. Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. J Nutr. 1991;121:484–91.
165. Suzukawa M, Abbey M, Howe PR, Nestel PJ. Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages. J Lipid Res. ASBMB; 1995;36:473–84.
166. Geppert J, Kraft V, Demmelmair H, Koletzko B. Microalgal docosahexaenoic acid decreases plasma triacylglycerol in normolipidaemic vegetarians: a randomised trial. Br J Nutr. Cambridge Univ Press; 2006;95:779–86.
167. Gorelik S, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. The stomach as a "Bioreactor": When red meat meets red wine. J Agric Food Chem. 2008;56:5002–7.
168. Pazos M, Lois S, Torres JL, Medina I. Inhibition of hemoglobin- and iron-promoted oxidation in fish microsomes by natural phenolics. J Agric Food Chem. 2006;54:4417–23.
169. Macheix J-J, Fleuriet A. Fruit phenolics. CRC press; 1990.
170. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev. The Oxford University Press; 1998;56:317–33.
171. Puiggros F, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, Arola L, Salvado MJ. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. J Agric Food Chem. 2005;53:6080–6.
172. Montagut G, Blade C, Blay M, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Josepa Salvado M, Arola L, Pinent M, Ardevol A. Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance. J Nutr Biochem. 2010;21:961–7.
173. Del Bas JM, Fernandez-Larrea J, Blay M, Ardevol A, Salvado MJ, Arola L, Blade C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. Faseb J. 2005;19:479–+.
174. Yeyi G, Lambert JD. Modulation of metabolic syndrome-related inflammation by cocoa. Mol Nutr Food Res. 2013;57:948–61.
175. Yeyi G, Shan Y, Lambert JD. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. Eur J Nutr. 2014;53:149–58.
176. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr. Taylor & Francis; 2005;45:287–306.
177. Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R. Nutraceuticals and Prevention of Atherosclerosis: Focus on ω-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Mediterranean Diet Polyphenols. Cardiovasc Ther. Wiley Online Library; 2010;28:e13–9.
178. Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Biological activities of polyphenols from grapes. Int J Mol Sci. Molecular Diversity Preservation International; 2010;11:622–46.
179. Renaud S de, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet. Elsevier; 1992;339:1523–6.
180. Maestre R, Douglass JD, Kodukula S, Medina I, Storch J. Alterations in the Intestinal Assimilation of Oxidized PUFAs Are Ameliorated by a Polyphenol-Rich Grape Seed Extract in an In Vitro Model and Caco-2 Cells. J Nutr. 2013;143:295–301.
181. Sekhon-Loodu S, Catalli A, Kulka M, Wang Y, Shahidi F, Rupasinghe HPV. Apple flavonols and n-3 polyunsaturated fatty acid-rich fish oil lowers blood C-reactive protein in rats with hypercholesterolemia and acute inflammation. Nutr Res. 2014;34:535–43.
182. Chen Y, Wang J, Nie R, Zhou S. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: The new hope of atherosclerotic diseases. Med Hypotheses. 2008;71:237–40.
183. Astarita G, Kendall AC, Dennis EA, Nicolaou A. Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids. Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Biol Lipids. 2015;1851:456–68.
184. Dennis EA. Phospholipase A2 in eicosanoid generation. Am J Respir Crit Care Med. Am Thoracic Soc; 2000;161:S32–5.
185. Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. J Biol Chem. ASBMB; 1997;272:16709–12.
186. Massey KA, Nicolaou A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. Biochem Soc Trans. 2011;39:1240–6.
187. Nithipatikom K, DiCamelli RF, Kohler S, Gumina RJ, Falck JR, Campbell WB, Gross GJ. Determination of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in coronary venous plasma during ischemia and reperfusion in dogs. Anal Biochem. 2001;292:115–24.

188. Masoodi M, Mir AA, Petasis NA, Serhan CN, Nicolaou A. Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2008;22:75–83.
189. Hammond VJ, O'Donnell VB. Esterified eicosanoids: Generation, characterization and function. Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet]. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273611004408
190. Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 1973;70:899–903.
191. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LBA, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. FASEB; 1998;12:1063–73.
192. Shimizu T, Yamamoto S, Hayaishi O. [11] Purification of PGH-PGD isomerase from rat brain. Methods Enzymol. Elsevier; 1982;86:73–7.
193. Tanaka Y, Ward SL, Smith WL. Immunochemical and kinetic evidence for two different prostaglandin H-prostaglandin E isomerases in sheep vesicular gland microsomes. J Biol Chem. ASBMB; 1987;262:1374–81.
194. Hayashi H, Fujii Y, Watanabe K, Urade Y, Hayaishi O. Enzymatic conversion of prostaglandin H2 to prostaglandin F2 alpha by aldehyde reductase from human liver: comparison to the prostaglandin F synthetase from bovine lung. J Biol Chem. ASBMB; 1989;264:1036–40.
195. DeWitt DL, Smith WL. Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. Evidence that the enzyme is a hemoprotein. J Biol Chem. ASBMB; 1983;258:3285–93.
196. Ullrich V, Haurand M. Thromboxane synthase as a cytochrome P450 enzyme. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res. 1983;11:105.
197. Lagarde M, Liu M, Véricel E, Calzada C, Chen P, Driss F, Guichardant M. Docosahexaenoic acid, protectin synthesis: relevance against atherothrombogenesis. Proc Nutr Soc [Internet]. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2014;73:186–9. Available from: https://www.cambridge.org/core/article/div-class-title-docosahexaenoic-acid-protectin-synthesis-relevance-against-atherothrombogenesis-div/D62768A5327B795B3BF98CB2E1469955
198. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac R-L. Resolvins. J Exp Med [Internet]. 2002 [cited 2016 Dec 29];196:1025–37. Available from: http://jem.rupress.org/content/196/8/1025
199. Engels F, Willems H, Nijkamp FP. Cyclooxygenase-catalyzed formation of 9-hydroxylinoleic acid by guinea pig alveolar macrophages under non-stimulated conditions. FEBS Lett [Internet]. 1986 [cited 2016 Dec 29];209:249–53. Available from: http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2886%2981121-8
200. Sharma NP, Dong L, Yuan C, Noon KR, Smith WL. Asymmetric Acetylation of the Cyclooxygenase-2 Homodimer by Aspirin and Its Effects on the Oxygenation of Arachidonic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Acids. Mol Pharmacol [Internet]. 2010;77:979 LP-986. Available from: http://molpharm.aspetjournals.org/content/77/6/979.abstract
201. Norris PC, Gosselin D, Reichart D, Glass CK, Dennis EA. Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2014;111:12746–51. Available from: http://www.pnas.org/content/111/35/12746.abstract
202. Brash AR, Schneider C, Hamberg M. Applications of Stereospecifically-Labeled Fatty Acids in Oxygenase and Desaturase Biochemistry. Lipids [Internet]. 2012;47:101–16. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11745-011-3612-7
203. Serhan CN, Dalli J, Colas RA, Winkler JW, Chiang N. Protectins and maresins: new pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Biol Lipids. Elsevier; 2015;1851:397–413.
204. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. Science (80-). 2001;294:1871–5.
205. Buczynski MW, Dumlao DS, Dennis EA. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. J Lipid Res. ASBMB; 2009;50:1015–38.
206. Powell WS, Gravelle F, Gravel S. Metabolism of 5 (S)-hydroxy-6, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid and other 5 (S)-hydroxyeicosanoids by a specific dehydrogenase in human polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem. ASBMB; 1992;267:19233–41.
207. Graham FD, Erlemann K-R, Gravel S, Rokach J, Powell WS. Oxidative stress-induced changes in pyridine nucleotides and chemoattractant 5-lipoxygenase products in aging neutrophils. Free Radic Biol Med. Elsevier; 2009;47:62–71.
208. Morisseau C, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on

human health. Annu Rev Pharmacol Toxicol. NIH Public Access; 2013;53:37.
209. Harder DR, Campbell WB, Roman RJ. Role of Cytochrome P-450 Enzymes and Metabolites of Arachidonic Acid in the Control of Vascular Tone. J Vasc Res [Internet]. 1995;32:79–92. Available from: http://www.karger.com/DOI/10.1159/000159080
210. Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. J Lipid Res. 2009;50.
211. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. J Biol Chem. ASBMB; 2001;276:36059–62.
212. Capdevila JH, Falck JR. Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002;68:325–44.
213. de La Torre A, Lee YY, Oger C, Sangild PT, Durand T, Lee JC-Y, Galano J-M. Synthesis, discovery, and quantitation of dihomo-isofurans: biomarkers for in vivo adrenic acid peroxidation. Angew Chem Int Ed Engl [Internet]. 2014 [cited 2016 Dec 29];53:6249–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24839059
214. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes - Current knowledge and directions for future research. Biochem Pharmacol. 1996;51:1–9.
215. Smith WL, Murphy RC. Oxidized lipids formed non-enzymatically by reactive oxygen species. J Biol Chem. ASBMB; 2008;283:15513–4.
216. Zemski Berry KA, Murphy RC. Free radical oxidation of plasmalogen glycerophosphocholine containing esterified docosahexaenoic acid: structure determination by mass spectrometry. Antioxid Redox Signal. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA; 2005;7:157–69.
217. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med. 2000;28:505–13.
218. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. Faseb J. 2004;18:1791–800.
219. Sbardella E, Greco A, Stromillo ML, Prosperini L, Puopolo M, Cefaro LA, Pantano P, De Stefano N, Minghetti L, Pozzilli C. Isoprostanes in clinically isolated syndrome and early multiple sclerosis as biomarkers of tissue damage and predictors of clinical course. Mult Scler J. Sage Publications; 2012;1352458512457721.
220. Cracowski J-L, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. Trends Pharmacol Sci. 2002;23:360–6.
221. Strassburg K, Huijbrechts AML, Kortekaas KA, Lindeman JH, Pedersen TL, Dane A, Berger R, Brenkman A, Hankemeier T, van Duynhoven J, et al. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. Anal Bioanal Chem. 2012;404:1413–26.
222. Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. Prog Lipid Res. Elsevier; 2011;50:35–51.
223. Min-Hsiung P, Ching-Shu L, Chi-Tang H. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. Food Funct. 2010;1:15–31.
224. Gilroy DW, Colville-Nash PR, McMaster S, Sawatzky DA, Willoughby DA, Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxyΔ12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. FASEB J. FASEB; 2003;17:2269–71.
225. Bellingan GJ, Caldwell H, Howie SE, Dransfield I, Haslett C. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. J Immunol. Am Assoc Immnol; 1996;157:2577–85.
226. Calder PC, Albers R, Antoine J-M, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. Br J Nutr. Cambridge Univ Press; 2009;101:1–45.
227. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. J Dent Res. SAGE Publications; 2003;82:82–90.
228. Libby. P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 2002;105:1135.
229. Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GGL, Possati G, Gaudino M. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. Eur J cardio-thoracic Surg. Oxford University Press; 2004;25:304–11.
230. Koistinaho M, Koistinaho J. Interactions between Alzheimer's disease and cerebral ischemia—focus on inflammation. Brain Res Rev. Elsevier; 2005;48:240–50.
231. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2002;2:787–95.

232. Karin M, Greten FR. NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group; 2005;5:749–59.
233. Von Euler US. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). J Physiol. Wiley-Blackwell; 1936;88:213.
234. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. J Exp Med. Rockefeller Univ Press; 2001;193:255–62.
235. Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006;20:3023–9.
236. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. Nutr Rev. 1999;57:104–13.
237. Kaley G, Hintze TH, Panzenbeck M, Messina EJ. Role of prostaglandins in microcirculatory function. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res. 1985;13:27.
238. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol Ther. Elsevier; 2004;103:147–66.
239. Lazarus M, Yoshida K, Coppari R, Bass CE, Mochizuki T, Lowell BB, Saper CB. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. Nat Neurosci. Nature Publishing Group; 2007;10:1131–3.
240. Aronoff DM, Carstens JK, Chen G-H, Toews GB, Peters-Golden M. Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis. J Interf cytokine Res. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA; 2006;26:827–33.
241. Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. J Immunol. Am Assoc Immnol; 2004;173:559–65.
242. Birklein F. Complex regional pain syndrome. J Neurol. 2005;252:131–8.
243. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, Cipollone F, Bon GB, Ciabattoni G, Patrono C. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F-2 alpha is increased in hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:3230–5.
244. Pratico D, Iuliano L, Basili S, Ferro D, Camastra C, Cordova C, FitzGerald GA, Violi F. Enhanced lipid peroxidation in hepatic cirrhosis. J Investig Med. 1998;46:51–7.
245. Stein CM, Tanner SB, Awad JA, Roberts LJ, Morrow JD. Evidence of free radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. Arthritis Rheum. 1996;39:1146–50.
246. Delanty N, Reilly MP, Pratico D, Lawson JA, McCarthy JF, Wood AE, Ohnishi ST, Fitzgerald DJ, FitzGerald GA. 8-Epi PGF(2 alpha) generation during coronary reperfusion - A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. Circulation. 1997;95:2492–9.
247. Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-Epi-Pgf(2-Alpha) Levels are Elevated in Individuals with Non-Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. FEBS Lett. 1995;368:225–9.
248. Starczewski M, Voigtmann R, Peskar BA, Peskar BM. Plasma levels of 15-keto-13, 14-dihydro-prostaglandin E 2 in patients with bronchogenic carcinoma. Prostaglandins, Leukot Med. Elsevier; 1984;13:249–58.
249. Cavalca V, Minardi F, Scurati S, Guidugli F, Squellerio I, Veglia F, Dainese L, Guarino A, Tremoli E, Caruso D. Simultaneous quantification of 8-iso-prostaglandin-F-2 alpha and 11-dehydro thromboxane B-2 in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Biochem. 2010;397:168–74.
250. Diab A, Deng C, Smith JD, Hussain RZ, Phanavanh B, Lovett-Racke AE, Drew PD, Racke MK. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Agonist 15-Deoxy-Δ12, 1412, 14-Prostaglandin J2 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol. Am Assoc Immnol; 2002;168:2508–15.
251. Khan MM. Regulation of IL-4 and IL-5 secretion by histamine and PGE2. Immunobiology of Proteins and Peptides VIII. Springer; 1995. p. 35–42.
252. Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina E, Pérez-Sala D. 15-Deoxy-Δ12, 14-prostaglandin J2Inhibition of NF-κB-DNA Binding through Covalent Modification of the p50 Subunit. J Biol Chem. ASBMB; 2001;276:35530–6.
253. Trivedi SG, Newson J, Rajakariar R, Jacques TS, Hannon R, Kanaoka Y, Eguchi N, Colville-Nash P, Gilroy DW. Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of

delayed type hypersensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences; 2006;103:5179–84.
254. FitzGerald GA. COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. Nat Rev Drug Discov. Nature Publishing Group; 2003;2:879–90.
255. Medina S, Dominguez-Perles R, Gil JI, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Martinez-Sanz JM, Gil-Izquierdo A. A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. Rapid Commun Mass Spectrom. 2012;26:1249–57.
256. Durn JH, Marshall KM, Farrar D, O'Donovan P, Scally AJ, Woodward DF, Nicolaou A. Lipidomic analysis reveals prostanoid profiles in human term pregnant myometrium. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2010;82:21–6.
257. Walter MF, Blumberg JB, Dolnikowski GG, Handelman GJ. Streamlined F-2-isoprostane analysis in plasma and urine with high-performance liquid chromatography and gas chromatography/mass spectroscopy. Anal Biochem. 2000;280:73–9.
258. Kinsella BT, OMahony DJ, Fitzgerald GA. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins G(q) and G(11) in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F-2 alpha. J Pharmacol Exp Ther. 1997;281:957–64.
259. Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. J Immunol. Am Assoc Immnol; 2004;173:1503–10.
260. Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. Infect Immun. Am Soc Microbiol; 2002;70:4247–53.
261. Ballinger MN, Hubbard LLN, McMillan TR, Toews GB, Peters-Golden M, Paine R, Moore BB. Paradoxical role of alveolar macrophage-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary host defense post-bone marrow transplantation. Am J Physiol Cell Mol Physiol. Am Physiological Soc; 2008;295:L114–22.
262. Beller TC, Friend DS, Maekawa A, Lam BK, Austen KF, Kanaoka Y. Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences; 2004;101:3047–52.
263. Werz O, Steinhilber D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors—lessons from cellular enzyme regulation. Biochem Pharmacol. Elsevier; 2005;70:327–33.
264. Israel E, Rubin P, Kemp JP, Grossman J, Pierson W, Siegel SC, Tinkelman D, Murray JJ, Busse W, Segal AT. The effect of inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in mild-to-moderate asthma. Ann Intern Med. Am Coll Physicians; 1993;119:1059–66.
265. Helgadottir A, Manolescu A, Helgason A, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Gretarsdottir S, Magnusson KP, Gudmundsson G, Hicks A. A variant of the gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. Nat Genet. Nature Publishing Group; 2006;38:68–74.
266. Larre S, Tran N, Fan C, Hamadeh H, Champigneulles J, Azzouzi R, Cussenot O, Mangin P, Olivier JL. PGE2 and LTB4 tissue levels in benign and cancerous prostates. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2008;87:14–9.
267. Lacerda Bachi AL, Kyung Kim FJ, Nonogaki S, Whitaker Carneiro CR, Lopes JD, Jasiulionis MG, Correa M. Leukotriene B4 Creates a Favorable Microenvironment for Murine Melanoma Growth. Mol Cancer Res. 2009;7:1417–24.
268. Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes Effects of ionophore A23187. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 1979;76:2148–52.
269. Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. Mol Endocrinol. Endocrine Society; 1997;11:779–91.
270. Zhou Y, Guo D, Li H, Jie S. Circulating LTD4 in patients with hepatocellular carcinoma. Tumor Biol. 2011;32:139–44.
271. Lewis RA, Austen KF, Drazen JM, Clark DA, Marfat A, Corey EJ. Slow reacting substances of anaphylaxis: identification of leukotrienes C-1 and D from human and rat sources. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 1980;77:3710–4.
272. Terano T, Salmon JA, Moncada S. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B 5. Prostaglandins. Elsevier; 1984;27:217–32.
273. Goldman DW, Pickett WC, Goetzl EJ. Human neutrophil chemotactic and degranulating

activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid. Biochem Biophys Res Commun. Elsevier; 1983;117:282–8.
274. Tatsuno I, Saito H, Chang K-J, Tamura Y, Yoshida S. Comparison of the effect between leukotriene B4 and leukotriene B5 on the induction of interleukin 1-like activity and calcium mobilizing activity in human blood monocytes. Agents Actions. Springer; 1990;29:324–7.
275. Strasser T, Fischer S, Weber PC. Leukotriene B5 is formed in human neutrophils after dietary supplementation with icosapentaenoic acid. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 1985;82:1540–3.
276. Powell WS, Rokach J. The eosinophil chemoattractant 5-oxo-ETE and the OXE receptor. Prog Lipid Res. 2013;52:651–65.
277. Brink CB, Harvey BH, Bodenstein J, Venter DP, Oliver DW. Recent advances in drug action and therapeutics: Relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology. Br J Clin Pharmacol. Wiley Online Library; 2004;57:373–87.
278. Hosoi T, Sugikawa E, Chikada A, Koguchi Y, Ohnuki T. TG1019/OXE, a Gα i/o-protein-coupled receptor, mediates 5-oxo-eicosatetraenoic acid-induced chemotaxis. Biochem Biophys Res Commun. Elsevier; 2005;334:987–95.
279. O'Flaherty JT, Kuroki M, Nixon AB, Wijkander J, Yee E, Lee SL, Smitherman PK, Wykle RL, Daniel LW. 5-Oxo-eicosatetraenoate is a broadly active, eosinophil-selective stimulus for human granulocytes. J Immunol. Am Assoc Immnol; 1996;157:336–42.
280. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins - Novel Series of Biologically-Active Compounds Formed from Arachidonic-Acid in Human-Leukocytes. Proc Natl Acad Sci United States Am Sci. 1984;81:5335–9.
281. Serhan CN. Lipoxin Biosynthesis and its Impact in Inflammatory and Vascular Events. Biochim Biophys Acta-Lipids Lipid Metab. 1994;1212:1–25.
282. Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. J Exp Med. Rockefeller Univ Press; 1994;180:253–60.
283. Levy BD, Petasis NA, Serhan CN. Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. Nature. Nature Publishing Group; 1997;389:985–90.
284. József L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-κB and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 2002;99:13266–71.
285. Pouliot M, Serhan CN. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor-α-initiated neutrophil responses and trafficking: novel regulators of a cytokine—chemokine axis relevant to periodontal diseases. J Periodontal Res. Wiley Online Library; 1999;34:370–3.
286. Decker Y, McBean G, Godson C. Lipoxin A(4) inhibits IL-1 beta-induced IL-8 and ICAM-1 expression in 1321N1 human astrocytoma cells. Am J Physiol Physiol. 2009;296:C1420–7.
287. Karp CL, Flick LM, Yang R, Uddin J, Petasis NA. Cystic fibrosis and lipoxins. Prostaglandins, Leukot Essent Fat acids. Elsevier; 2005;73:263–70.
288. Pouliot M, Clish CB, Petasis NA, Van Dyke TE, Serhan CN. Lipoxin A4 analogues inhibit leukocyte recruitment to Porphyromonas gingivalis: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. Biochemistry. ACS Publications; 2000;39:4761–8.
289. Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, Palmer LJ, Marigowda G, Israel E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. Am J Respir Crit Care Med. Am Thoracic Soc; 2005;172:824–30.
290. Schottelius AJ, Giesen C, Asadullah K, Fierro IM, Colgan SP, Bauman J, Guilford W, Perez HD, Parkinson JF. An aspirin-triggered lipoxin A4 stable analog displays a unique topical anti-inflammatory profile. J Immunol. Am Assoc Immnol; 2002;169:7063–70.
291. Aliberti J, Hieny S, e Sousa CR, Serhan CN, Sher A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. Nat Immunol. Nature Publishing Group; 2002;3:76–82.
292. Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, Aliberti J. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase–dependent lipoxin production. J Clin Invest. Am Soc Clin Investig; 2005;115:1601–6.
293. Ziboh VA. Special issue - Essential fatty acids/prostanoids/lipoxygenase-derived monohydroxy fatty acids in skin health and disease - Foreword. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2000;63:1–2.
294. Feinmark SJ, Begum R, Tsvetkov E, Goussakov I, Funk CD, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression at hippocampal CA3-CA1 synapses. J Neurosci. 2003;23:11427–35.
295. Liu W, Yin H, Akazawa YO, Yoshida Y, Niki E, Porter NA. Ex Vivo Oxidation in Tissue and

Plasma Assays of Hydroxyoctadecadienoates: Z,E/E,E Stereoisomer Ratios. Chem Res Toxicol. 2010;23:986–95.
296. Ghosh J, Myers CE. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: Critical role of 5-lipoxygenase. Biochem Biophys Res Commun. 1997;235:418–23.
297. HONN K V, TANG DG, GAO X, BUTOVICH IA, LIU B, TIMAR J, HAGMANN W. 12-Lipoxygenases and 12(s)-Hete - Role in Cancer Metastasis. Cancer metastasis Rev. 1994;13:365–96.
298. Vang K, Ziboh VA. 15-lipoxygenase metabolites of gamma-linolenic acid/eicosapentaenoic acid suppress growth and arachidonic acid metabolism in human prostatic adenocarcinoma cells: Possible implications of dietary fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2005;72:363–72.
299. Hill E, Fitzpatrick F, Murphy RC. Biological activity and metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in the human platelet. Br J Pharmacol. Wiley Online Library; 1992;106:267–74.
300. Norwood S, Liao J, Hammock BD, Yang G-Y. Epoxyeicosatrienoic acids and soluble epoxide hydrolase: potential therapeutic targets for inflammation and its induced carcinogenesis. Am J Transl Res. 2010;2:447–57.
301. Schmelzer KR, Kubala L, Newman JW, Kim I-H, Eiserich JP, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences; 2005;102:9772–7.
302. Liu Y, Zhang Y, Schmelzer K, Lee T-S, Fang X, Zhu Y, Spector AA, Gill S, Morisseau C, Hammock BD. The antiinflammatory effect of laminar flow: the role of PPARγ, epoxyeicosatrienoic acids, and soluble epoxide hydrolase. Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences; 2005;102:16747–52.
303. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. Science (80-). American Association for the Advancement of Science; 1999;285:1276–9.
304. Briggs WH, Xiao H, Parkin KL, Shen C, Goldman IL. Differential inhibition of human platelet aggregation by selected Allium thiosulfinates. J Agric Food Chem. ACS Publications; 2000;48:5731–5.
305. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. J Exp Med. 2000;192:1197–204.
306. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. J Immunol. Am Assoc Immnol; 2007;178:3912–7.
307. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. Nature. Nature Publishing Group; 2007;447:869–74.
308. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee C-H, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. Proc Natl Acad Sci. National Acad Sciences; 2010;107:1660–5.
309. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF, Spite M. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. J Exp Med. Rockefeller Univ Press; 2009;206:15–23.
310. Lima-Garcia JF, Dutra RC, Da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. Br J Pharmacol. Wiley Online Library; 2011;164:278–93.
311. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences; 2005;102:7671–6.
312. Rogerio AP, Haworth O, Croze R, Oh SF, Uddin M, Carlo T, Pfeffer MA, Priluck R, Serhan CN, Levy BD. Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 promote resolution of allergic airways responses. J Immunol. Am Assoc Immnol; 2012;189:1983–91.
313. Gleissman H, Johnsen JI, Kogner P. Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? Exp Cell Res. 2010;316:1365–73.
314. Narayanan NK, Narayanan BA, Reddy BS. A combination of docosahexaenoic acid and celecoxib prevents prostate cancer cell growth in vitro and is associated with modulation of nuclear factor-kappa B, and steroid hormone receptors. Int J Oncol. 2005;26:785–92.

315. Chiu LCM, Tong KF, Ooi VEC. Cytostatic and cytotoxic effects of cyclooxygenase inhibitors and their synergy with docosahexaenoic acid on the growth of human skin melanoma A-375 cells. Biomed Pharmacother. 2005;59:S293–7.
316. Kortz L, Dorow J, Ceglarek U. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of eicosanoids and related lipids in human biological matrices: A review. J Chromatogr B-Analytical Technol Biomed Life Sci. 2014;964:1–11.
317. Sears B. Anti-inflammatory Diets. J Am Coll Nutr. Taylor & Francis; 2015;34:14–21.
318. Ricordi C, Garcia-Contreras M, Farnetti S. Diet and Inflammation: Possible Effects on Immunity, Chronic Diseases, and Life Span. J Am Coll Nutr. Taylor & Francis; 2015;34:10–3.
319. Pelclova D, Fenclova Z, Vlckova S, Lebedova J, Syslova K, Pecha O, Belacek J, Navratil T, Kuzma M, Kacer P. Leukotrienes B4, C4, D4 and E4 in the exhaled breath condensate (EBC), blood and urine in patients with pneumoconiosis. Ind Health. 独立行政法人 労働安全衛生総合研究所; 2012;50:299–306.
320. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Klusáčková P, Fenclová Z, Lebedová J, Pelclová D. Determination of 8-iso-prostaglandin F2α in exhaled breath condensate using combination of immunoseparation and LC–ESI-MS/MS. J Chromatogr B. 2008;867:8–14.
321. Glowacka E, Jedynak-Wasowicz U, Sanak M, Lis G. Exhaled eicosanoid profiles in children with atopic asthma and healthy controls. Pediatr Pulmonol [Internet]. 2013 [cited 2017 Jan 6];48:324–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782807
322. Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM, Gielicz A, Mowinckel P, Lødrup Carlsen KC, Carlsen K-H, Szczeklik A. Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. J Allergy Clin Immunol [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2017 Jan 6];126:859–867.e9. Available from: http://www.jacionline.org/article/S0091674910011218/fulltext
323. Nording ML, Yang J, Hegedus CM, Bhushan A, Kenyon NJ, Davis CE, Hammock BD. Endogenous levels of five fatty acid metabolites in exhaled breath condensate to monitor asthma by high-performance liquid chromatography: electrospray tandem mass spectrometry. IEEE Sens J. IEEE; 2010;10:123–30.
324. Lundstrom SL, D'Alexandri FL, Nithipatikom K, Haeggstrom JZ, Wheelock AM, Wheelock CE. HPLC/MS/MS-based approaches for detection and quantification of eicosanoids. Methods Mol Biol. 2009;579:161–87.
325. Daham K, Song W-L, Lawson JA, Kupczyk M, Gülich A, Dahlén S-E, FitzGerald GA, Dahlén B. Effects of celecoxib on major prostaglandins in asthma. Clin Exp Allergy [Internet]. 2011 [cited 2017 Jan 6];41:36–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880055
326. Szczeklik W, Sanak M, Mastalerz L, Sokołowska BM, Gielicz A, Soja J, Kumik J, Musiał J, Szczeklik A. 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid (12-HETE): a biomarker of Churg-Strauss syndrome. Clin Exp Allergy [Internet]. 2012 [cited 2017 Jan 6];42:513–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417211
327. Unterwurzacher I, Koal T, Bonn GK, Weinberger KM, Ramsay SL. Rapid sample preparation and simultaneous quantitation of prostaglandins and lipoxygenase derived fatty acid metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry from small sample volumes. Clin Chem Lab Med. 2008;46:1589–97.
328. Issan Y, Hochhauser E, Guo A, Gotlinger KH, Kornowski R, Leshem-Lev D, Lev E, Porat E, Snir E, Thompson CI, et al. Elevated level of pro-inflammatory eicosanoids and EPC dysfunction in diabetic patients with cardiac ischemia. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2013;100:15–21.
329. Il'yasova D, Spasojevic I, Base K, Zhang H, Wang F, Young SP, Millington DS, D'Agostino RB, Wagenknecht LE. Urinary F2-isoprostanes as a biomarker of reduced risk of type 2 diabetes. Diabetes Care. Am Diabetes Assoc; 2012;35:173–4.
330. Schwartzman ML, Iserovich P, Gotlinger K, Bellner L, Dunn MW, Sartore M, Pertile MG, Leonardi A, Sathe S, Beaton A. Profile of lipid and protein autacoids in diabetic vitreous correlates with the progression of diabetic retinopathy. Diabetes. Am Diabetes Assoc; 2010;59:1780–8.
331. Hardy G, Boizel R, Bessard J, Cracowski J-L, Bessard G, Halimi S, Stanke-Labesque F. Urinary leukotriene E4 excretion is increased in type 1 diabetic patients: A quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2005;78:291–9.
332. Mal M, Koh PK, Cheah PY, Chan ECY. Ultra-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry targeted profiling of arachidonic acid and eicosanoids in human colorectal cancer. Rapid Commun Mass Spectrom [Internet]. 2011 [cited 2016 Nov 13];25:755–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21337637
333. Freedman RS, Wang E, Voiculescu S, Patenia R, Bassett RL, Deavers M, Marincola FM, Yang P, Newman RA. Comparative analysis of peritoneum and tumor eicosanoids and pathways in

advanced ovarian cancer. Clin Cancer Res. AACR; 2007;13:5736–44.
334. Alexanian A, Miller B, Roman RJ, Sorokin A. 20-HETE-producing enzymes are up-regulated in human cancers. Cancer Genomics-Proteomics. International Institute of Anticancer Research; 2012;9:163–9.
335. O'Flaherty JT, Wooten RE, Samuel MP, Thomas MJ, Levine EA, Case LD, Akman SA, Edwards IJ. Fatty Acid Metabolites in Rapidly Proliferating Breast Cancer. PLoS One. 2013;8.
336. Pender-Cudlip MC, Krag KJ, Martini D, Yu J, Guidi A, Skinner SS, Zhang Y, Qu X, He C, Xu Y, et al. Delta-6-desaturase activity and arachidonic acid synthesis are increased in human breast cancer tissue. Cancer Sci [Internet]. 2013 [cited 2017 Jan 6];104:760–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414387
337. Morris PG, Zhou XK, Milne GL, Goldstein D, Hawks LC, Dang CT, Modi S, Fornier MN, Hudis CA, Dannenberg AJ. Increased levels of urinary PGE-M, a biomarker of inflammation, occur in association with obesity, aging, and lung metastases in patients with breast cancer. Cancer Prev Res. AACR; 2013;6:428–36.
338. Nithipatikom K, Isbell MA, See WA, Campbell WB. Elevated 12- and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in urine of patients with prostatic diseases. Cancer Lett. 2006;233:219–25.
339. Kempen EC, Yang P, Felix E, Madden T, Newman RA. Simultaneous Quantification of Arachidonic Acid Metabolites in Cultured Tumor Cells Using High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Anal Biochem. Academic Press; 2001;297:183–90.
340. Pender-Cudlip MC, Krag KJ, Martini D, Yu J, Guidi A, Skinner SS, Zhang Y, Qu X, He C, Xu Y, et al. Delta-6-desaturase activity and arachidonic acid synthesis are increased in human breast cancer tissue. Cancer Sci. 2013;104:760–4.
341. Gleissman H, Yang R, Martinod K, Lindskog M, Serhan CN, Johnsen JI, Kogner P. Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates. FASEB J. FASEB; 2010;24:906–15.
342. Feldstein AE, Lopez R, Tamimi TA-R, Yerian L, Chung Y-M, Berk M, Zhang R, McIntyre TM, Hazen SL. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. J Lipid Res [Internet]. 2010;51:3046–54. Available from: http://www.jlr.org/content/51/10/3046.abstract
343. Yoshida J. Microfluidic devices and microflow systems. Flash Chem Fast Org Synth Microsystems. Wiley Online Library; 2008;105–35.
344. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Lesèche G, Tedgui A, Maclouf J, Murphy RC. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. J Clin Invest [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 1999 [cited 2017 Jan 6];103:421–7. Available from: http://www.jci.org/articles/view/3985#.WG7_xESHDKQ.mendeley
345. Shishehbor MH, Zhang R, Medina H, Brennan M-L, Brennan DM, Ellis SG, Topol EJ, Hazen SL. Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease. Free Radic Biol Med. 2006;41:1678–83.
346. Theken KN, Schuck RN, Edin ML, Tran B, Ellis K, Bass A, Lih FB, Tomer KB, Poloyac SM, Wu MC, et al. Evaluation of cytochrome P450-derived eicosanoids in humans with stable atherosclerotic cardiovascular disease. Atherosclerosis [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2017 Jan 6];222:530–6. Available from: http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021915012002080/fulltext
347. Schuck RN, Theken KN, Edin ML, Caughey M, Bass A, Ellis K, Tran B, Steele S, Simmons BP, Lih FB, et al. Cytochrome P450-derived eicosanoids and vascular dysfunction in coronary artery disease patients. Atherosclerosis [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2017 Jan 6];227:442–8. Available from: http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021915013000968/fulltext
348. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2015;1851:469–84.
349. Sperling RI. Eicosanoids in rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 1995;21:741–58.
350. Sharon P, Stenson WF. Enhanced Synthesis of Leukotriene B4 by Colonic Mucosa in Inflammatory Bowel. Gastroenterology. 1984;86:453–60.
351. Poloyac SM, Reynolds RB, Yonas H, Kerr ME. Identification and quantification of the hydroxyeicosatetraenoic acids, 20-HETE and 12-HETE, in the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. J Neurosci Methods. 2005;144:257–63.
352. Crago EA, Thampatty BP, Sherwood PR, Kuo C-WJ, Bender C, Balzer J, Horowitz M, Poloyac SM. Cerebrospinal Fluid 20-HETE Is Associated With Delayed Cerebral Ischemia and Poor

Outcomes After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Stroke [Internet]. 2011;42:1872 LP-1877. Available from: http://stroke.ahajournals.org/content/42/7/1872.abstract
353. Harris TR, Kodani S, Yang J, Imai DM, Hammock BD. An ω-3-enriched diet alone does not attenuate CCl4-induced hepatic fibrosis. J Nutr Biochem. 2016;38:93–101.
354. Goswami SK, Inceoglu B, Yang J, Wan D, Kodani SD, da Silva CAT, Morisseau C, Hammock BD. Omeprazole increases the efficacy of a soluble epoxide hydrolase inhibitor in a PGE 2 induced pain model. Toxicol Appl Pharmacol. Elsevier; 2015;289:419–27.
355. Roos J, Grösch S, Werz O, Schröder P, Ziegler S, Fulda S, Paulus P, Urbschat A, Kühn B, Maucher I. Regulation of tumorigenic Wnt signaling by cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and their pharmacological inhibitors: A basis for novel drugs targeting cancer cells? Pharmacol Ther. Elsevier; 2016;157:43–64.
356. Medeiros AI, Sá-Nunes A, Turato WM, Secatto A, Frantz FG, Sorgi CA, Serezani CH, Deepe GS, Faccioli LH. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. J Immunol. Am Assoc Immnol; 2008;181:8544–51.
357. Himmerich H, Schmidt L, Becker S, Kortz L, Schonherr J, Mergl R, Bauer K, Sack U, J Sheldrick A, Thiery J. Impact of clozapine, N-desmethylclozapine and chlorpromazine on thromboxane production in vitro. Med Chem (Los Angeles). Bentham Science Publishers; 2012;8:1032–8.
358. Konkel A, Fischer R, Schunck W-H. Omega-3 epoxyeicosanoids - from bench to bedside. 6 European Workshop on Lipid Mediators; 2016.
359. F.C. R, G. H, A. S, V. U. Resolvin D1 reduces Il-8 secretion, improves alveolar macrophage activity, restores airway surface liquid height and normalizes nasal potential difference in cystic fibrosis. 6 European Workshop on Lipid Mediators; 2016.
360. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholme P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. Lipids. Springer; 2000;35:763–8.
361. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese III J, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. N Engl J Med. Mass Medical Soc; 1985;312:1217–24.
362. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JWM, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC. The effect of dietary supplementation with n—3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. N Engl J Med. Mass Medical Soc; 1989;320:265–71.
363. Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation; 1993;91:651.
364. Von Schacky C, Kiefl R, Jendraschak E, Kaminski WE. n-3 fatty acids and cysteinyl-leukotriene formation in humans in vitro, ex vivo, and in vivo. J Lab Clin Med. MOSBY-YEAR BOOK INC; 1993;121:302.
365. Peterson LD, Jeffery NM, Thies F, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. Lipids. Springer; 1998;33:171–80.
366. Chapkin RS, Akoh CC, Miller CC. Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis. J Lipid Res. ASBMB; 1991;32:1205–13.
367. Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. Cell Immunol. Elsevier; 1995;163:120–8.
368. Cleland LG, Caughey GE, James MJ, Proudman SM. Reduction of cardiovascular risk factors with longterm fish oil treatment in early rheumatoid arthritis. J Rheumatol. The Journal of Rheumatology; 2006;33:1973–9.
369. Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, Belluzzi A, Everitt SJ, Holmes GK, Malkinson C, Shaheen MZ, Willars JE. Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. Gut. BMJ Publishing Group Ltd and British Society of Gastroenterology; 1992;33:922–8.
370. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 1996;63:116–22.
371. Trebble TM, Wootton SA, Miles EA, Mullee M, Arden NK, Ballinger AB, Stroud MA, Burdge GC, Calder PC. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation:

response to antioxidant cosupplementation. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2003;78:376–82.
372. Arnold C, Markovic M, Blossey K, Wallukat G, Fischer R, Dechend R, Konkel A, von Schacky C, Luft FC, Muller DN. Arachidonic acid-metabolizing cytochrome P450 enzymes are targets of ω-3 fatty acids. J Biol Chem. ASBMB; 2010;285:32720–33.
373. Westphal C, Konkel A, Schunck W-H. CYP-eicosanoids—A new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease? Prostaglandins Other Lipid Mediat. Elsevier; 2011;96:99–108.
374. Weiss GA, Troxler H, Klinke G, Rogler D, Braegger C, Hersberger M. High levels of anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators lipoxins and resolvins and declining docosahexaenoic acid levels in human milk during the first month of lactation. Lipids Health Dis. BioMed Central; 2013;12:1.
375. Mas E, Croft KD, Zahra P, Barden A, Mori TA. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. Clin Chem. Am Assoc Clin Chem; 2012;58:1476–84.
376. González-Peña D, Checa A, de Ancos B, Wheelock CE, Sánchez-Moreno C. New insights into the effects of onion consumption on lipid mediators using a diet-induced model of hypercholesterolemia. Redox Biol. 2017;11:205–12.
377. Simin N, Orcic D, Cetojevic-Simin D, Mimica-Dukic N, Anackov G, Beara I, Mitic-Culafic D, Bozin B. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (Allium flavum L. subsp. flavum, Alliaceae). LWT-Food Sci Technol. Elsevier; 2013;54:139–46.
378. Ali M, Thomson M, Afzal M. Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids. Elsevier; 2000;62:55–73.
379. Kremer JM, Jubiz W, Michaelk ANN, Rynes RI, Bartholomew LEEE, Bigaouette J, Timchalk M, Beeler D, Lininger L. Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis: a double-blinded, controlled, crossover study. Ann Intern Med. Am Coll Physicians; 1987;106:497–503.
380. Cleland LG, French JK, Betts WH, Murphy GA, Elliott MJ. Clinical and biochemical effects of dietary fish oil supplements in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1988;15:1471–5.
381. Shimizu T, Fujii T, Suzuki R, Igarashi J, Ohtsuka Y, Nagata S, Yamashiro Y. Effects of highly purified eicosapentaenoic acid on erythrocyte fatty acid composition and leukocyte and colonic mucosa leukotriene B4 production in children with ulcerative colitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr. LWW; 2003;37:581–5.
382. Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KWJ, Calder PC. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2006;83:331–42.
383. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. J Nutr. 1991;121:547–55.
384. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:594–610.
385. Min L, Li Y, Yu B, Huwei L. Analytical Methods in Lipidomics and their Applications . Anal Chem. 2014;86 (1):161–75.
386. Masoodi M, Eiden M, Koulman A, Spaner D, Volmer DA. Comprehensive Lipidomics Analysis of Bioactive Lipids in Complex Regulatory Networks. Anal Chem. 2010;82:8176–85.
387. Novakova L, Vlckova H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. Anal Chim Acta. 2009;656:8–35.
388. Metherel AH, Aristizabal Henao JJ, Stark KD. EPA and DHA levels in whole blood decrease more rapidly when stored at -20 C as compared with room temperature, 4 and -75 C. Lipids. 2013;48:1079–91.
389. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, et al. The human serum metabolome. PLoS One. 2011;6.
390. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. Can J Biochem Physiol. 1959;37:911–7.
391. Lee SH, Williams M V, DuBois RN, Blair IA. Targeted lipidomics using electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17:2168–76.
392. Golovko MY, Murphy EJ. An improved LC-MS/MS procedure for brain prostanoid analysis using brain fixation with head-focused microwave irradiation and liquid-liquid extraction. J Lipid Res. 2008;49:893–902.
393. Saunders RD, Horrocks LA. Simultaneous extraction and preparation for high-performance liquid chromatography of prostaglandins and phospholipids. Anal Biochem. Academic Press;

1984;143:71–5.
394. Yu R, Zhao G, Christman JW, Xiao L, van Breemen RB. Method Development and Validation for Ultra-High Pressure Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Determination of Multiple Prostanoids in Biological Samples. J AOAC Int [Internet]. 2013;96:67–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3723117/
395. Sterz K, Scherer G, Ecker J. A simple and robust UPLC-SRM/MS method to quantify urinary eicosanoids. J Lipid Res [Internet]. 2012;53:1026–36. Available from: http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.D023739%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22338011%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3329380
396. Brose SA, Baker AG, Golovko MY. A fast one-step extraction and UPLC-MS/MS analysis for E2/D 2 series prostaglandins and isoprostanes. Lipids. 2013;48:411–9.
397. Brose SA, Thuen BT, Golovko MY. LC/MS/MS method for analysis of E-2 series prostaglandins and isoprostanes. J Lipid Res. 2011;52:850–9.
398. Powell WS. Precolumn extraction and reversed-phase high-pressure liquid chromatography of prostaglandins and leukotrienes. Anal Biochem. 1987;164:117–31.
399. Takabatake M, Hishinuma T, Suzuki N, Chiba S, Tsukamoto H, Nakamura H, Saga T, Tomioka Y, Kurose A, Sawai T, et al. Simultaneous quantification of prostaglandins in human synovial cell-cultured medium using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids [Internet]. 2002;67:51–6. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327802903819
400. Rago B, Fu C. Development of a high-throughput ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to profile 18 eicosanoids as exploratory biomarkers for atherosclerotic diseases. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2013;936:25–32.
401. Cela R, Lorenzo A. R, Casais MC. Técnicas de Separación en Química Analítica. Madrid: Síntesis; 2002.
402. Augusto F, Carasek E, Costa Silva RG, Rivellino SR, Batista AD, Martendal E. New sorbents for extraction and microextraction techniques. J Chromatogr a. 2010;1217:2533–42.
403. Nigel JKS. Solid-Phase Extraction. Principles, Techniques, and Applications. Nigel JKS, editor. New York: Marcel Dekker; 2000.
404. Kretschmer A, Giera M, Wijtmans M, de Vries L, Lingeman H, Irth H, Niessen WMA. Derivatization of carboxylic acids with 4-APEBA for detection by positive-ion LC-ESI–MS(/MS) applied for the analysis of prostanoids and NSAID in urine. Enhanc Anal BY Anal Deriv [Internet]. 2011;879:1393–401. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023210007312
405. Yang J, Schmelzer K, Georgi K, Hammock BD. Quantitative Profiling Method for Oxylipin Metabolome by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Anal Chem. 2009;81:8085–93.
406. Zhang H, Il'yasova D, Sztaray J, Young SP, Wang F, Millington DS. Quantification of the oxidative damage biomarker 2,3-dinor-8-isoprostaglandin-F-2 alpha in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Biochem. 2010;399:302–4.
407. Balvers MGJ, Verhoeckx KCM, Meijerink J, Bijlsma S, Rubingh CM, Wortelboer HM, Witkamp RF. Time-dependent effect of in vivo inflammation on eicosanoid and endocannabinoid levels in plasma, liver, ileum and adipose tissue in C57BL/6 mice fed a fish-oil diet. Int Immunopharmacol. 2012;13:204–14.
408. Honda H, Shibusawa Y, Taniguchi J, Matsuda H, Kondo M, Kumasaka K, Miwa T, Notoya Y, Shindo H. Rapid and simple determination of epoxyeicosatrienoic acids in rabbit renal artery by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. Vascul Pharmacol. 2005;42:163–9.
409. Yue H, Strauss KI, Borenstein MR, Barbe MF, Rossi LJ, Jansen SA. Determination of bioactive eicosanoids in brain tissue by a sensitive reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection. J Chromatogr B. 2004;803:267–77.
410. Deems R, Buczynski MW, Bowers-Gentry R, Harkewicz R, Dennis EA. Detection and quantitation of eicosanoids via high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. Brown HA, editor. Methods Enzymol. 2007;432:59–82.
411. Taylor AW, Bruno RS, Traber MG. Women and smokers have elevated urinary F(2)-isoprostane metabolites: A novel extraction and LC-MS methodology. Lipids. 2008;43:925–36.
412. Yang J, Schmelzer K, Georgi K, Hammock BD. Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal Chem. 2009;81:8085–93.
413. Kortz L, Dorow J, Becker S, Thiery J, Ceglarek U. Fast liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human

plasma. Journal of Chromatography B. 2013.
414. Haschke M, Zhang YL, Kahle C, Klawitter J, Korecka M, Shaw LM, Christians U. HPLC–Atmospheric Pressure Chemical Ionization MS/MS for Quantification of 15-F_{2t}-Isoprostane in Human Urine and Plasma. Clin Chem [Internet]. 2007;53:489 LP-497. Available from: http://clinchem.aaccjnls.org/content/53/3/489.abstract
415. Rinne S, Ramstad Kleiveland C, Kassem M, Lea T, Lundanes E, Greibrokk T. Fast and simple online sample preparation coupled with capillary LC-MS/MS for determination of prostaglandins in cell culture supernatants. J Sep Sci [Internet]. 2007 [cited 2016 Nov 27];30:1860–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17638370
416. Maddipati KR, Zhou S-L. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011;94:59–72.
417. Prasain JK, Arabshahi A, Taub PR, Sweeney S, Moore R, Sharer JD, Barnes S. Simultaneous quantification of F2-isoprostanes and prostaglandins in human urine by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. J Chromatogr B. 2013;913:161–8.
418. Neale JR, Dean BJ. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric quantification of the dehydration product of tetranor PGE-M, the major urinary metabolite of prostaglandin E2 in human urine. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2008;871:72–7.
419. Song J, Liu X, Wu J, Meehan MJ, Blevitt JM, Dorrestein PC, Milla ME. A highly efficient, high-throughput lipidomics platform for the quantitative detection of eicosanoids in human whole blood. Anal Biochem. 2013;433:181–8.
420. Patil K, Bellner L, Cullaro G, Gotlinger KH, Dunn MW, Schwartzman ML. Heme oxygenase-1 induction attenuates corneal inflammation and accelerates wound healing after epithelial injury. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:3379–86.
421. Wang Y, Armando AM, Quehenberger O, Yan C, Dennis EA. Comprehensive ultra-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric analysis of eicosanoid metabolites in human samples. J Chromatogr A. 2014;1359:60–9.
422. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F-2 alpha in pericardial fluid of patients with heart failure - A potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. Circulation. 1998;97:1536–9.
423. Stenson WF. Measurement of prostaglandins and other eicosanoids. Curr Protoc Immunol [Internet]. 2001;Chapter 7:Unit 7.33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432845
424. Blaho VA, Mitchell WJ, Brown CR. Arthritis develops but fails to resolve during inhibition of cyclooxygenase 2 in a murine model of Lyme disease. Arthritis Rheum [Internet]. University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA.; 2008;58:1485–95. Available from: http://europepmc.org/abstract/MED/18438879
425. Wang Z, Ciabattoni G, Créminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, Maclouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. J Pharmacol Exp Ther [Internet]. 1995;275:94 LP-100. Available from: http://jpet.aspetjournals.org/content/275/1/94.abstract
426. Sasaki DM, Yuan Y, Gikas K, Kanai K, Taber D, Morrow DJ, Roberts LJ, Callewaert DM. Enzyme Immunoassays for 15-F2t Isoprostane-M, an Urinary Biomarker for Oxidant Stress BT - Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury, 5. In: Honn K V, Marnett LJ, Nigam S, Dennis E, Serhan C, editors. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 537–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-0193-0_82
427. Tsikas D. Application of gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998;717:201–45.
428. Tsukamoto H, Hishinuma T, Mikkaichi T, Nakamura H, Yamazaki T, Tomioka Y, Mizugaki M. Simultaneous quantification of prostaglandins, isoprostane and thromboxane in cell-cultured medium using gas chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr B. 2002;774:205–14.
429. Nourooz-Zadeh J. Key issues in F-2-isoprostane analysis. Biochem Soc Trans. 2008;36:1060–5.
430. Nourooz-Zadeh J, Gopaul NK, Barrow S, Mallet AI, Anggard EE. Analysis of F-2-Isoprostanes as Indicators of Nonenzymatic Lipid-Peroxidation In-Vivo by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry - Development of a Solid-Phase Extraction Procedure. J Chromatogr B-Biomedical Appl. 1995;667:199–208.
431. Wiswedel I, Hirsch D, Nourooz-Zadeh J, Flechsig A, Luck-Lambrecht A, Augustin W. Analysis of monohydroxyeicosatetraenoic acids and F(2)-isoprostanes as markers of lipid peroxidation in

rat brain mitochondria. Free Radic Res. 2002;36:1–11.
432. Gladovic N, ZupancicKralj L, Plavec J. Determination of primary oxidation products of linoleic acid and triacylglycerols. J Chromatogr a. 1997;767:63–8.
433. Gdula-Argasińska J, Czepiel J, Woźniakiewicz A, Wojtoń K, Grzywacz A, Woźniakiewicz M, Jurczyszyn A, Perucki W, Librowski T. N-3 Fatty acids as resolvents of inflammation in the A549 cells. Pharmacol Reports. 2015;67:610–5.
434. Santiago-Vazquez LZ, Mydlarz LD, Pavlovich JG, Jacobs RS. Identification of hydroxy fatty acids by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectroscopy in Euglena gracilis. J Chromatogr B-Analytical Technol Biomed Life Sci. 2004;803:233–6.
435. Montuschi P, Martello S, Felli M, Mondino C, Chiarotti M. Ion trap liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of leukotriene B4 in exhaled breath condensate. Rapid Commun Mass Spectrom [Internet]. 2004 [cited 2016 Nov 13];18:2723–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15499663
436. Sanak M, Gielicz A, Nagraba K, Kaszuba M, Kumik J, Szczeklik A. Targeted eicosanoids lipidomics of exhaled breath condensate in healthy subjects. J Chromatogr B. 2010;878:1796–800.
437. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Najmanová V, Fenclová Z, Vlčková Š, Lebedová J, Pelclová D. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. J Chromatogr B. 2009;877:2477–86.
438. Copland IB, Reynaud D, Pace-Asciak C, Post M. Mechanotransduction of stretch-induced prostanoid release by fetal lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2006;291:L487-95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603590
439. Gomolka B, Siegert E, Blossey K, Schunck W-H, Rothe M, Weylandt KH. Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011;94:81–7.
440. Zhang Y, Zhang G, Clarke PA, Huang JTJ, Takahashi E, Muirhead D, Steenwyk RC, Lin Z. Simultaneous and high-throughput quantitation of urinary tetranor PGDM and tetranor PGEM by online SPE-LC–MS/MS as inflammatory biomarkers. J Mass Spectrom [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 2011;46:705–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/jms.1941
441. Guo AM, Liu X, Al-Wahab Z, Maddippati KR, Ali-Fehmi R, Scicli AG, Munkarah AR. Role of 12-lipoxygenase in regulation of ovarian cancer cell proliferation and survival. Cancer Chemother Pharmacol. 2011;68:1273–83.
442. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta J-P, Rousset P, Chene G, Guigne C, Terce F, Vanner S, Vergnolle N, et al. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. J Chromatogr B-Analytical Technol Biomed Life Sci. 2013;932:123–33.
443. Ferreiro-Vera C, Maria Mata-Granados J, Priego-Capote F, Manuel Quesada-Gomez J, Dolores Luque de Castro M. Automated targeting analysis of eicosanoid inflammation biomarkers in human serum and in the exometabolome of stem cells by SPE-LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem. 2011;399:1093–103.
444. Levison BS, Zhang R, Wang Z, Fu X, DiDonato JA, Hazen SL. Quantification of fatty acid oxidation products using online high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Methods Lipid Oxid [Internet]. 2013;59:2–13. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584913000956
445. Kortz L, Geyer R, Ludwig U, Planert M, Bruegel M, Leichtle A, Fiedler GM, Thiery J, Ceglarek U. Simultaneous eicosanoid profiling and identification by liquid chromatography and hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for metabolomic studies in human plasma. Lab Lab Med. 2009;33:341–8.
446. Dickinson JS, Murphy RC. Mass spectrometric analysis of leukotriene A(4) and other chemically reactive metabolites of arachidonic acid. J Am Soc Mass Spectrom. 2002;13:1227–34.
447. Li M, Feng B, Liang Y, Zhang W, Bai Y, Tang W, Wang T, Liu H. Lipid profiling of human plasma from peritoneal dialysis patients using an improved 2D (NP/RP) LC-QToF MS method. Anal Bioanal Chem. 2013;405:6629–38.
448. Montserrat Ruiz, Mariona Jové, Agatha Schlüter, Carlos Casasnovas, Francesc Villarroya, Cristina Guilera, Alba Naudí, Reinald Pamplona, Ramón Gimeno Martinez, Stéphane Fourcade MP-O and AP. Altered glycolipid and glycerophospholipid signaling drive inflammatory cascades in adrenomyeloneuropathy. Hum Mol Genet. 2015;24:6861–76.
449. Ferreiro-Vera C, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Integrated identification/confirmatory and targeted analysis of epoxyeicosatrienosic acids in human serum by LC–TOF MS and automated on-line SPE–LC–QqQ MS/MS. Talanta [Internet]. 2013;106:440–7. Available from:

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013000283
450. Meyer VR. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Chichester: John Wiley; 2004.
451. Levandi T, Pussa T, Vaher M, Toomik P, Kaljurand M. Oxidation products of free polyunsaturated fatty acids in wheat varieties. Eur J Lipid Sci Technol. 2009;111:715–22.
452. Pramanik BN, Ganguly AK, Gross ML. Applied Electrospray Mass Spectrometry. New York: Marcel Dekker; 2002.
453. Chapman JR. Protein and peptide analysis by mass spectrometry. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1996.
454. Méndez L, Pazos M, Gallardo JM, Torres JL, Pérez-Jiménez J, Nogués R, Romeu M, Medina I. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine ω3 PUFAs. Free Radic Biol Med [Internet]. 2013;55:8–20. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912018047
455. Rousu T, Herttuainen J, Tolonen A. Comparison of triple quadrupole, hybrid linear ion trap triple quadrupole, time-of-flight and LTQ-Orbitrap mass spectrometers in drug discovery phase metabolite screening and identification in vitro - amitriptyline and verapamil as model compounds. Rapid Commun Mass Spectrom. 2010;24:939–57.
456. Westcott, J.Y.; Sala A. The Eicosanoids. Curtis-Prior P, editor. Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd.; 2004.
457. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. Clin Biochem. Elsevier; 2005;38:328–34.
458. Niessen WMA, Manini P, Andreoli R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. Mass Spectrom Rev. Wiley Online Library; 2006;25:881–99.
459. Schneider C, Yu Z, Boeglin WE, Zheng Y, Brash AR. Enantiomeric Separation of Hydroxy and Hydroperoxy Eicosanoids by Chiral Column Chromatography. Methods in Enzymology. 2007. p. 145–57.
460. Suzuki N, Hishinuma T, Saga T, Sato J, Toyota T, Goto J, Mizugaki M. Determination of urinary 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with column-switching technique: sex difference in healthy volunteers and patients with diabetes mellitus. J Chromatogr B. 2003;783:383–9.
461. Mesaros C, Lee SH, Blair IA. Analysis of epoxyeicosatrienoic acids by chiral liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using [13C]-analog internal standards. Rapid Commun Mass Spectrom [Internet]. 2010 [cited 2016 Nov 27];24:3237–47. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3348553&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
462. Kiss L, Bier J, Röder Y, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Direct and simultaneous profiling of epoxyeicosatrienoic acid enantiomers by capillary tandem column chiral-phase liquid chromatography with dual online photodiode array and tandem mass spectrometric detection. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2008;392:717–26. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2308-1
463. Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. J Chromatogr B. 2005;825:134–43.
464. Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, Smith BW, Wilson ID, Castro-Perez JM, Nicholson JK. UPLC/MS(E); a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. Rapid Commun Mass Spectrom [Internet]. 2006 [cited 2016 Nov 27];20:1989–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16755610
465. Swartz ME. UPLC™: An Introduction and Review. J Liq Chromatogr Relat Technol [Internet]. Taylor & Francis; 2005;28:1253–63. Available from: http://dx.doi.org/10.1081/JLC-200053046
466. Martín-Venegas R, Casillas R, Jáuregui O, Moreno JJ. Rapid simultaneous analysis of cyclooxygenase, lipoxygenase and cytochrome P-450 metabolites of arachidonic and linoleic acids using high performance liquid chromatography/mass spectrometry in tandem mode. J Pharm Biomed Anal. 2011;56:976–82.
467. Shaik JSB, Miller TM, Graham SH, Manole MD, Poloyac SM. Rapid and simultaneous quantitation of prostanoids by UPLC–MS/MS in rat brain. J Chromatogr B. 2014;945:207–16.
468. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. Nature [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2014;510:92–101. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature13479

469. Deng B, Wang C-W, Arnardottir HH, Li Y, Cheng C-YC, Dalli J, Serhan CN. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2014 [cited 2016 Dec 6];9:e102362. Available from: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102362
470. Balas L, Guichardant M, Durand T, Lagarde M. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. Biochimie. 2014;99:1–7.
471. Chen P, Fenet B, Michaud S, Tomczyk N, Véricel E, Lagarde M, Guichardant M. Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. FEBS Lett [Internet]. 2009 [cited 2016 Dec 6];583:3478–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818771
472. Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé M-T, Rosahl S. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. Plant Physiol. Am Soc Plant Biol; 2005;139:1902–13.
473. Laiakis EC, Strassburg K, Bogumil R, Lai S, Vreeken RJ, Hankemeier T, Langridge J, Plumb RS, Fornace AJ, Astarita G. Metabolic Phenotyping Reveals a Lipid Mediator Response to Ionizing Radiation. J Proteome Res [Internet]. American Chemical Society; 2014;13:4143–54. Available from: http://dx.doi.org/10.1021/pr5005295
474. Fontaine-Bisson B, Wolever TMS, Chiasson J-L, Rabasa-Lhoret R, Maheux P, Josse RG, Leiter LA, Rodger NW, Ryan EA, Connelly PW. Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor-α modify the association between dietary polyunsaturated fatty acids and fasting HDL-cholesterol and apo AI concentrations. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2007;86:768–74.
475. Quinn JF, Raman R, Thomas RG, Yurko-Mauro K, Nelson EB, Van Dyck C, Galvin JE, Emond J, Jack CR, Weiner M. Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. Jama. American Medical Association; 2010;304:1903–11.
476. Thifault E, Cormier H, Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Paradis A-M, Garneau V, Ouellette C, Lemieux S, Couture P, Vohl M-C. Effects of Age, Sex, Body Mass Index and APOE Genotype on Cardiovascular Biomarker Response to an n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation. J Nutrigenet Nutrigenomics [Internet]. 2013;6:73–82. Available from: http://www.karger.com/DOI/10.1159/000350744
477. Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh ELK, Silver DL. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. Nature [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2014;509:503–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature13241
478. Hyötyläinen T, Orešič M. Systems biology strategies to study lipidomes in health and disease. Prog Lipid Res. 2014;55:43–60.
479. Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC, Talmud P, Wright JW, Murphy MC, Griffin BA, Williams CM. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Am Heart Assoc; 2000;20:1990–7.
480. Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huisintveld JHJ. A Multicompartmental Dynamic Computer-Controlled Model Simulating the Stomach and Small-Intestine. Atla-Alternatives to Lab Anim. 1995;23:197–209.
481. Ribnicky DM, Roopchand DE, Oren A, Grace M, Poulev A, Lila MA, Havenaar R, Raskin I. Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1). Food Chem. 2014;142:349–57.
482. Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simonassmann P, Haffen K, Fogh J, et al. Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human-Colon Carcinoma Cell-Line Caco-2 in Culture. Biol Cell. 1983;47:323–30.
483. Trotter PJ, Storch J. Fatty-Acid Uptake and Metabolism in a Human Intestinal-Cell Line (Caco-2) - Comparison of Apical and Basolateral Incubation. J Lipid Res. 1991;32:293–304.
484. Kanner J, Lapidot T. The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. Free Radic Biol Med. 2001;31:1388–95.
485. Gorelik S, Lapidot T, Shaham I, Granit R, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: Health implications. J Agric Food Chem. 2005;53:3397–402.
486. Lapidot T, Granit R, Kanner J. Lipid peroxidation by “free” iron ions and myoglobin as affected by dietary antioxidants in simulated gastric fluids. J Agric Food Chem. 2005;53:3383–90.
487. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? Free Radic Res. Taylor & Francis; 2000;33:819–30.
488. Tirosh O, Shpaizer A, Kanner J. Lipid peroxidation in a stomach medium is affected by dietary

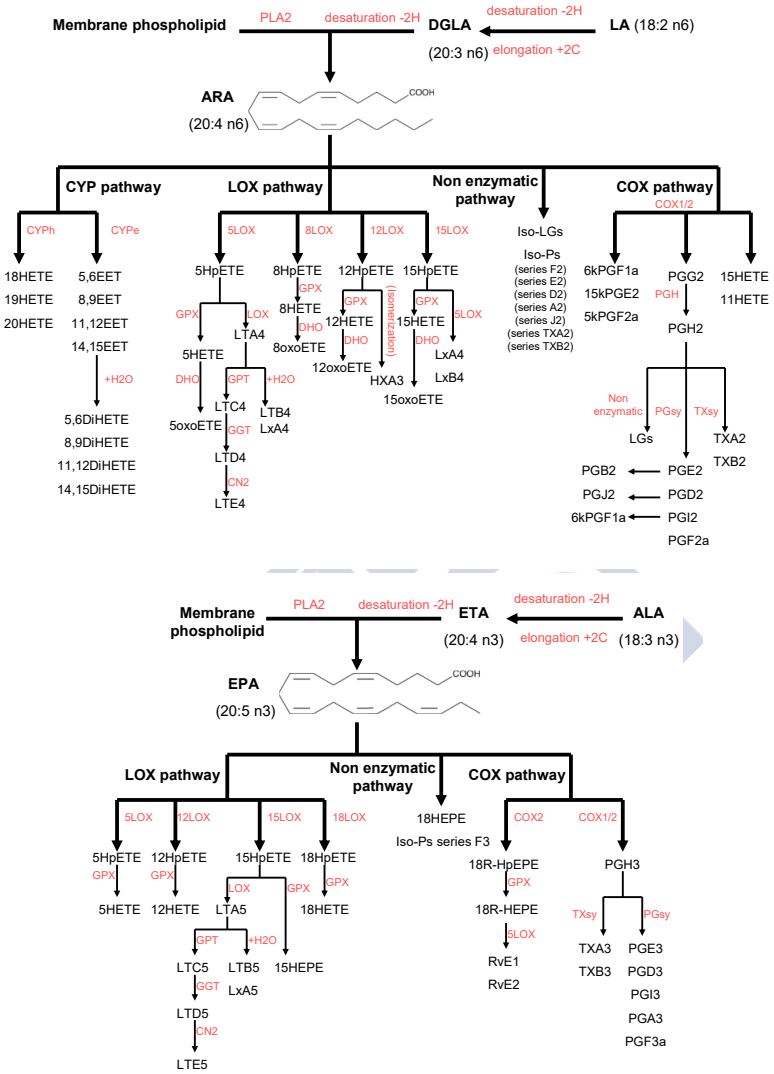
oils (olive/fish) and antioxidants: the Mediterranean versus western diet. J Agric Food Chem. ACS Publications; 2015;63:7016–23.
489. Larsson K, Cavonius L, Alminger M, Undeland I. Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal in vitro digestion. J Agric Food Chem. ACS Publications; 2012;60:7556–64.
490. Tullberg C, Larsson K, Carlsson N-G, Comi I, Scheers N, Vegarud G, Undeland I. Formation of reactive aldehydes (MDA, HHE, HNE) during the digestion of cod liver oil: comparison of human and porcine in vitro digestion models. Food Funct. Royal Society of Chemistry; 2016;7:1401–12.
491. Larsson K, Harrysson H, Havenaar R, Alminger M, Undeland I. Formation of malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in fish and fish oil during dynamic gastrointestinal in vitro digestion. Food Funct. Royal Society of Chemistry; 2016;7:1176–87.
492. Kenmogne-Domguia HB, Moisan S, Viau M, Genot C, Meynier A. The initial characteristics of marine oil emulsions and the composition of the media inflect lipid oxidation during in vitro gastrointestinal digestion. Food Chem. Elsevier; 2014;152:146–54.
493. Kristinova V, Storrø I, Rustad T. Influence of human gastric juice on oxidation of marine lipids–in vitro study. Food Chem. Elsevier; 2013;141:3859–71.
494. Larsson K, Tullberg C, Alminger M, Havenaar R, Undeland I. Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-hexenal are formed during dynamic gastrointestinal in vitro digestion of cod liver oils. Food Funct [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2016;7:3458–67. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C6FO00635C
495. Larsson K, Tullberg C, Alminger M, Havenaar R, Undeland I. Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-hexenal are formed during dynamic gastrointestinal in vitro digestion of cod liver oils. Food Funct. The Royal Society of Chemistry; 2016;7:3458–67.
496. Guichardant M, Bacot S, Moliere P, Lagarde M. Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2006;75:179–82.
497. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis. Elsevier; 2005;15:316–28.
498. Uriot O, Galia W, Awussi AA, Perrin C, Denis S, Chalancon S, Lorson E, Poirson C, Junjua M, Le Roux Y. Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium Streptococcus thermophilus and the metabolic activities induced in the simulated human gut. Food Microbiol. Elsevier; 2016;53:18–29.
499. Lafond M, Bouza B, Eyrichine S, Rouffineau F, Saulnier L, Giardina T, Bonnin E, Preynat A. In vitro gastrointestinal digestion study of two wheat cultivars and evaluation of xylanase supplementation. J Anim Sci Biotechnol. BioMed Central; 2015;6:1.
500. Miszczycha SD, Thévenot J, Denis S, Callon C, Livrelli V, Alric M, Montel M-C, Blanquet-Diot S, Thevenot-Sergentet D. Survival of Escherichia coli O26: H11 exceeds that of Escherichia coli O157: H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. Int J Food Microbiol. Elsevier; 2014;172:40–8.
501. Lyng E, Havenaar R, Shastri P, Hetsco L, Vick A, Sagartz J. Increased bioavailability of celecoxib under fed versus fasted conditions is determined by postprandial bile secretion as demonstrated in a dynamic gastrointestinal model. Drug Dev Ind Pharm. Taylor & Francis; 2016;42:1334–9.
502. Dickinson PA, Rmaileh RA, Ashworth L, Barker RA, Burke WM, Patterson CM, Stainforth N, Yasin M. An investigation into the utility of a multi-compartmental, dynamic, system of the upper gastrointestinal tract to support formulation development and establish bioequivalence of poorly soluble drugs. AAPS J. Springer; 2012;14:196–205.
503. Barker R, Abrahamsson B, Kruusmägi M. Application and validation of an advanced gastrointestinal in vitro model for the evaluation of drug product performance in pharmaceutical development. J Pharm Sci. Wiley Online Library; 2014;103:3704–12.
504. Tenjarla S, Romasanta V, Zeijdner E, Villa R, Moro L. Release of 5-aminosalicylate from an MMX mesalamine tablet during transit through a simulated gastrointestinal tract system. Adv Ther. Springer; 2007;24:826–40.
505. Deat E, Blanquet-Diot S, Jarrige J-F, Denis S, Beyssac E, Alric M. Combining the Dynamic TNO-Gastrointestinal Tract System with a Caco-2 Cell Culture Model: Application to the Assessment of Lycopene and alpha-Tocopherol Bioavailability from a Whole Food. J Agric Food Chem. 2009;57:11314–20.
506. Benmoussa A, Lee CHC, Laffont B, Savard P, Laugier J, Boilard E, Gilbert C, Fliss I, Provost P.

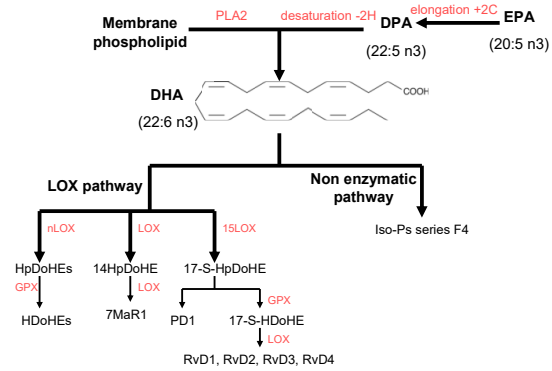
Commercial dairy cow milk microRNAs resist digestion under simulated gastrointestinal tract conditions. J Nutr. Am Soc Nutrition; 2016;146:2206–15.
507. Lafond M, Bouza B, Eyrichine S, Bonnin E, Crost EH, Geraert P-A, Giardina T, Ajandouz EH. An integrative in vitro approach to analyse digestion of wheat polysaccharides and the effect of enzyme supplementation. Br J Nutr. Cambridge Univ Press; 2011;106:264–73.
508. Verwei M, Arkbåge K, Havenaar R, van den Berg H, Witthöft C, Schaafsma G. Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. J Nutr. Am Soc Nutrition; 2003;133:2377–83.
509. Ho SP, Storch J. Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. Am J Physiol Physiol. 2001;281:C1106–17.
510. Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1997;14:221–86.
511. Rosa A, Scano P, Atzeri A, Deiana M, Falchi AM. Potential anti-tumor effects of Mugil cephalus processed roe extracts on colon cancer cells. Food Chem Toxicol. Elsevier; 2013;60:471–8.
512. Pettersen K, Monsen VT, Pettersen CHH, Overland HB, Pettersen G, Samdal H, Tesfahun AN, Lundemo AG, Bjørkøy G, Schønberg SA. DHA-induced stress response in human colon cancer cells–Focus on oxidative stress and autophagy. Free Radic Biol Med. Elsevier; 2016;90:158–72.
513. Beguin P, Schneider A-C, Mignolet E, Schneider Y-J, Larondelle Y. Polyunsaturated fatty acid metabolism in enterocyte models: T84 cell line vs. Caco-2 cell line. Vitr Cell Dev Biol. Springer; 2014;50:111–20.
514. Lakshminarayana R, Baskaran V. Influence of olive oil on the bioavailability of carotenoids. Eur J Lipid Sci Technol [Internet]. 2013 [cited 2016 Dec 8];n/a-n/a. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201200254
515. Baskaran V, Sugawara T, Nagao A. Phospholipids affect the intestinal absorption of carotenoids in mice. Lipids. Springer; 2003;38:705–11.
516. Lakshminarayana R, Raju M, Krishnakantha TP, Baskaran V. Lutein and zeaxanthin in leafy greens and their bioavailability: olive oil influences the absorption of dietary lutein and its accumulation in adult rats. J Agric Food Chem. ACS Publications; 2007;55:6395–400.
517. Gleize B, Tourniaire F, Depezay L, Bott R, Nowicki M, Albino L, Lairon D, Kesse-Guyot E, Galan P, Hercberg S. Effect of type of TAG fatty acids on lutein and zeaxanthin bioavailability. Br J Nutr. Cambridge Univ Press; 2013;110:1–10.
518. Chitchumroonchokchai C, Schwartz SJ, Failla ML. Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. J Nutr. Am Soc Nutrition; 2004;134:2280–6.
519. Luchoomun J, Hussain MM. Assembly and Secretion of Chylomicrons by Differentiated Caco-2 Cells NASCENT TRIGLYCERIDES AND PREFORMED PHOSPHOLIPIDS ARE PREFERENTIALLY USED FOR LIPOPROTEIN ASSEMBLY. J Biol Chem. ASBMB; 1999;274:19565–72.
520. Jackson KG, Wolstencroft EJ, Bateman PA, Yaqoob P, Williams CM. Greater enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with apolipoproteins E and C-III after meals rich in saturated fatty acids than after meals rich in unsaturated fatty acids. Am J Clin Nutr. Am Soc Nutrition; 2005;81:25–34.
521. Meera P, Khan N, Sampath P. Dietary oxidized fatty acids: an atherogenic risk? J Lipid Res. 2000;41:1473–80.
522. Awada M, Soulage CO, Meynier A, Debard C, Plaisancié P, Benoit B, Picard G, Loizon E, Chauvin M-A, Estienne M, et al. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. J Lipid Res [Internet]. 2012;53:2069–80. Available from: http://www.jlr.org/content/53/10/2069.abstract
523. MüLLER C, Friedrichs B, Wingler K, Brigelius-Flohé R. Perturbation of lipid metabolism by linoleic acid hydroperoxide in CaCo-2 cells. Biol Chem. 2002;383:637–48.
524. Alghazeer R, Gao H, Howell NK. Cytotoxicity of oxidised lipids in cultured colonal human intestinal cancer cells (caco-2 cells). Toxicol Lett. Elsevier; 2008;180:202–11.
525. Giovannini C, Scazzocchio B, Matarrese P, Varì R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Casciani S, Dessì MR, Straface E, Malorni W. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. J Nutr Biochem. Elsevier; 2008;19:118–28.
526. Incani A, Serra G, Atzeri A, Melis MP, Serreli G, Bandino G, Sedda P, Campus M, Tuberoso CIG, Deiana M. Extra virgin olive oil phenolic extracts counteract the pro-oxidant effect of dietary oxidized lipids in human intestinal cells. Food Chem Toxicol. Elsevier; 2016;90:171–80.

527. Vandamme TF. Rodent models for human diseases. Eur J Pharmacol [Internet]. 2015;759:84–9. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299915002630
528. Fellmann L, Nascimento AR, Tibiriça E, Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. Pharmacol Ther. Elsevier; 2013;137:331–40.
529. Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford MLJ. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. Nature. Nature Publishing Group; 1997;390:521–5.
530. Xu C, Arinze IJ, Johnson J, Tuy TT, Bone F, Ernsberger P, Massillon D. Metabolic dysregulation in the SHROB rat reflects abnonnal expression of transcription factors and enzymes that regulate carbohydrate metabolism. J Nutr Biochem. 2008;19:305–12.
531. Chen B, Moore A, Escobedo LVS, Koletsky MS, Hou D, Koletsky RJ, Ernsberger P. Sitagliptin lowers glucagon and improves glucose tolerance in prediabetic obese SHROB rats. Exp Biol Med. SAGE Publications; 2011;236:309–14.
532. Ernsberger P, Johnson JL, Rosenthal T, Mirelman D, Koletsky RJ. Therapeutic actions of allylmercaptocaptopril and captopril in a rat model of metabolic syndrome. Am J Hypertens. Elsevier; 2007;20:866–74.
533. Ernsberger P, Koletsky RJ, Collins LA, Bedol D. Sympathetic nervous system in salt-sensitive and obese hypertension: amelioration of multiple abnormalities by a central sympatholytic agent. Cardiovasc drugs Ther. Springer; 1996;10:275–82.
534. Khan MAH, Neckář J, Cummens B, Wahl GM, Imig JD. Azilsartan decreases renal and cardiovascular injury in the spontaneously hypertensive obese rat. Cardiovasc Drugs Ther. Springer; 2014;28:313–22.
535. Sun Z, Ernsberger P. Marked insulin resistance in obese spontaneously hypertensive rat adipocytes is ameliorated by in vivo but not in vitro treatment with moxonidine. J Pharmacol Exp Ther. ASPET; 2007;320:845–52.
536. Mendez L, Pazos M, Giralt M, Nogues MR, Perez-Jimenez J, Torres JL, Gallardo JM, Medina I. Targets of protein carbonylation in spontaneously hypertensive obese Koletsky rats and healthy Wistar counterparts: A potential role on metabolic disorders. J Proteomics. 2014;106:246–59.
537. Núria T, Mònica M-C, Laura L, Montserrat J, Àngels F, Eunice M-T, Josep Lluís T, Manuel P, Isabel M, Nogués MR. Eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio improves histological alterations in obese rats with metabolic syndrome. Lipids Health Dis. 2014;13.
538. Molinar-Toribio E, Pérez-Jimenez J, Ramos-Romero S, Romeu M, Giralt M, Taltavull N, Munoz-Cortes M, Jauregui O, Mendez L, Medina I, et al. Effect of n-3 PUFA supplementation at different EPA:DHA ratios on the spontaneously hypertensive obese rat model of the metabolic syndrome. Br J Nutr. 2015;113:878–87.
539. Mendizábal Y, Llorens S, Nava E. Vasoactive effects of prostaglandins from the perivascular fat of mesenteric resistance arteries in WKY and SHROB rats. Life Sci. Elsevier; 2013;93:1023–32.
540. Imig JD, Walsh KA, Khan MAH, Nagasawa T, Cherian-Shaw M, Shaw SM, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition and peroxisome proliferator activated receptor γ agonist improve vascular function and decrease renal injury in hypertensive obese rats. Exp Biol Med. SAGE Publications; 2012;237:1402–12.
541. Aoun M, Michel F, Fouret G, Schlernitzauer A, Ollendorff V, Wrutniak-Cabello C, Cristol J-P, Carbonneau M-A, Coudray C, Feillet-Coudray C. A grape polyphenol extract modulates muscle membrane fatty acid composition and lipid metabolism in high-fat-high-sucrose diet-fed rats. Br J Nutr. 2011;106:491–501.
542. Aguilera AA, Diaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RMO. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. J Nutr Biochem. 2004;15:350–7.
543. Lombardo YB, Hein G, Chicco A. Metabolic syndrome: Effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. Lipids. 2007;42:427–37.
544. Sears DD, Miles PD, Chapman J, Ofrecio JM, Almazan F, Thapar D, Miller YI. 12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. PLoS One. Public Library of Science; 2009;4:e7250.
545. Harris WS. Are n-3 fatty acids still cardioprotective? Curr Opin Clin Nutr Metab Care. LWW; 2013;16:141–9.
546. Murphy RC, Barkley RM, Berry KZ, Hankin J, Harrison K, Johnson C, Krank J, McAnoy A, Uhlson C, Zarini S. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. Anal Biochem. 2005;346:1–42.

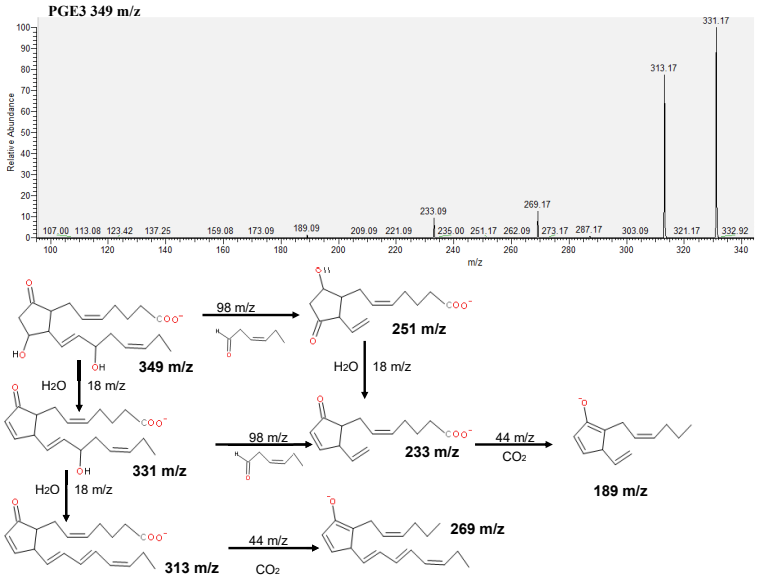
ANEXO I: Material suplementario del Capítulo I

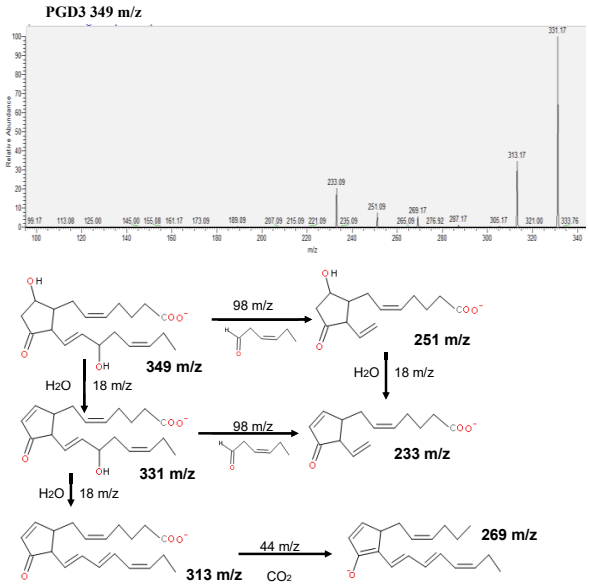
Capítulo 1 - S1: Cascade of formation to ARA, EPA and DHA oxidized derived compounds from COX, LOX, CYP450 enzyme activities and autoxidation



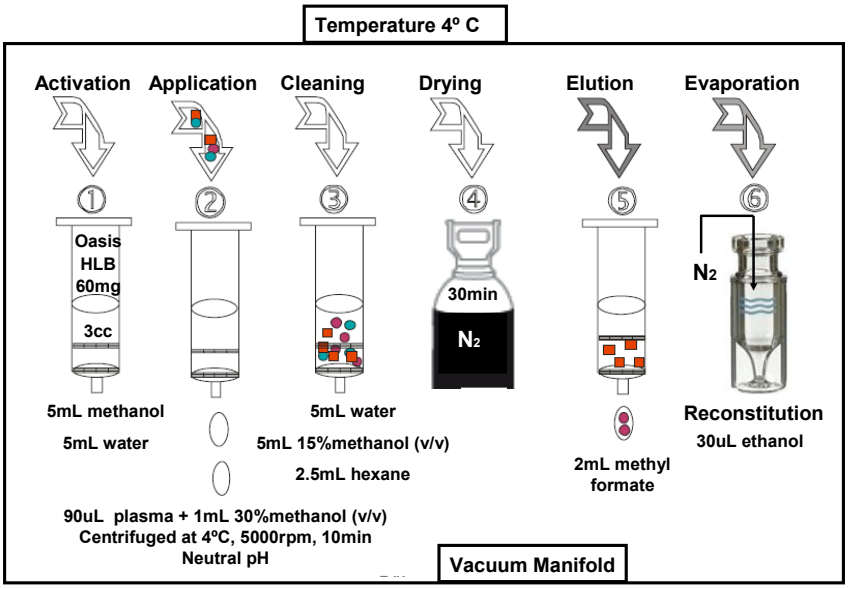


Capítulo 1 - S2: Individual mass spectrum and a possible explanation of the fragmentation patterns for PDG_3 and PGE_3 isomers





Capítulo 1 - S3: Optimized SPE methodology for plasma samples containing lipid mediator derivatives.



ANEXO II: Material suplementario del Capítulo II

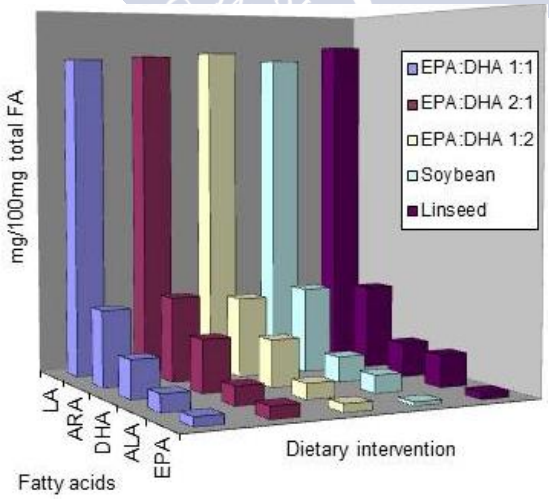
Capítulo 2 - S1: Fatty acid composition of soybean oil, linseed oil and fish oil mixtures (EPA:DHA 1:1, 2:1 and 1:2) supplemented to Wistar rats. Results are expressed as a percentage of total fatty acids (mg/100mg of Total FA). Weekly dose of EPA, DHA, ALA, ARA and LA expressed as mg/kg rat. Values are shown as means ± SD. 16:0 (palmitic acid), 16:1 ω7 (palmitoleic acid, PA), 18:0 (stearic acid), 18:1 ω9 (oleic acid, OA), 18:1 ω7 (vaccenic acid), 18:2 ω6 (LA), 18:3 ω3 (ALA), 20:3 ω6 (DGLA), 20:4 ω6 (ARA), 20:5 ω3 (EPA), 22:5 ω3 (DPA), 22:6 ω3 (DHA).

	RATIO 1:1 (EPA:DHA)		**RATIO 2:1 (EPA:DHA)**		**RATIO 1:2 (EPA:DHA)**		**SOYBEAN**		**LINSEED**	
FATTY ACID	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*
16:0 (palmitic)	10.15	0.2	9.09	0.03	10.98	0.1	17.78	0.1	5.73	0.03
16:1 ω7 (PA)	4.99	0.04	4.57	0.02	5.39	0.03	0.90	0.03	0.11	0.01
18:0 (stearic)	2.94	0.03	2.95	0	2.97	0.01	2.07	0.01	4.75	0.02
18:1 ω9 (OA)	6.41	0.06	6.18	0	6.61	0.04	18.75	0.03	21.37	0.06
18:1 ω7 (vaccenic)	1.91	0.03	1.93	0.02	1.95	0.02	1.52	0.02	1.11	0.01
18:2 ω6 (LA)	0.65	0.01	0.61	0	0.65	0.02	47.55	0.01	16.76	0.03
20:0	0.32	0.01	0.39	0.01	0.20	0	0.00	0	0.00	0
18:3 ω3 (ALA)	0.36	0.01	0.32	0	0.33	0.02	4.00	0.04	50.02	0.1
20:1 ω9	0.98	0.03	1.39	0.01	0.63	0.02	1.43	0.09	n.d.	n.d.
18:4 ω3	1.51	0.02	1.56	0.02	1.64	0	0.15	0	n.d.	n.d.
20:2 ω6	0.21	0	0.28	0.01	0.17	0.01	0.20	0.05	n.d.	n.d.
20:3 ω6 (DGLA)	0.22	0.01	0.27	0.01	0.15	0	0.00	0	n.d.	n.d.
20:4 ω6 (ARA)	1.68	0.04	1.98	0.03	1.16	0.02	0.40	0.02	n.d.	n.d.
22:1 ω11	1.14	0.01	1.58	0.02	0.45	0.01	1.08	0	n.d.	n.d.
22:1 ω9	0.28	0.03	0.37	0.03	0.19	0.02	0.25	0.02	n.d.	n.d.
20:4 ω3	1.02	0.02	1.31	0.02	0.75	0.01	0.20	0.03	n.d.	n.d.
20:5 ω3 (EPA)	25.09	0.1	32.43	0.06	17.33	0.03	0.70	0.02	n.d.	n.d.
24:1 ω9	0.38	0	0.55	0.02	0.25	0.01	0.28	0.05	n.d.	n.d.
22:5 ω3 (DPA)	4.30	0.05	5.24	0.02	2.60	0.1	0.26	0.01	n.d.	n.d.
22:6 ω3 (DHA)	25.70	0.2	17.98	0.03	34.85	0.1	1.15	0.03	n.d.	n.d.
Total ω3 PUFA	57.97	0.07	58.84	0.03	57.51	0.05	6.47	0.02	50.02	0.1
Total ω6 PUFA	2.76	0.01	3.14	0.01	2.14	0.01	48.15	0.02	16.76	0.03
Total SFA	18.52	0.2	17.05	0.02	19.68	0.1	21.17	0.1	10.63	0.06
Total MUFA	17.22	0.1	17.14	0.07	17.43	0.1	24.21	0.1	22.59	0.06
Total PUFA	64.26	0.3	65.81	0.08	62.90	0.2	54.62	0.03	66.78	0.1
weekly dose of EPA	159.30		205.84		110.03		4.45			
weekly dose of DHA	163.12		114.15		221.24		7.31			
weekly dose of ARA	10.65		12.55		7.37		2.54			
weekly dose of ALA	2.29		2.06		2.09		25.39		317.56	
weekly dose of LA	4.13		3.88		4.15		301.86		106.39	

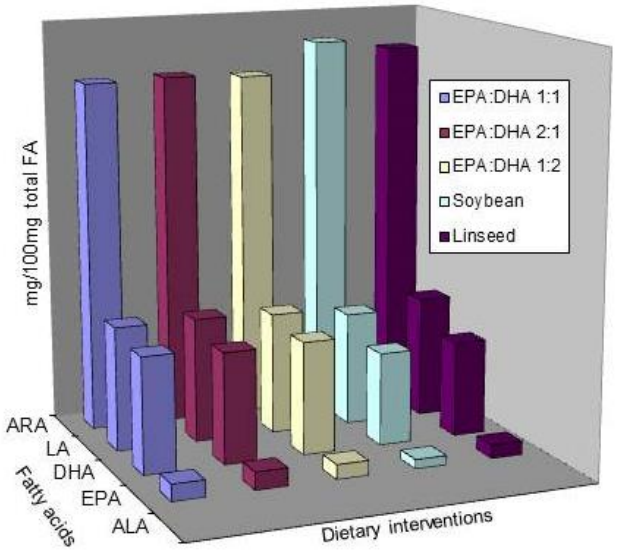
Capítulo 2 – S2: Retention times, collision energies and MS/MS transitions for ESI-LC-LIT/MS/MS

Compound	Retention Time (min)	LIT parameters	
		Collision energy (eV)	Quantification transition (*m/z*)
8iso-PGF$_{3\alpha}$	6.79	30	351>253
TXB$_3$	6.97	19	367>195
PGD$_3$/PGE$_3$	7.67	19	349>313
8iso-PGF$_{2\alpha}$	8.28	28	353>299
PGE$_2$	9.09	20	351>315
RvD$_1$	9.80	25	375>141
PD$_x$	12.89	30	359>153
LTB$_4$	13.79	27	335>195
15HpEPE	17.36	20	333>315
12HpEPE	17.80	25	333>315
15HEPE	17.92	27	317>219
12HEPE	18.72	27	317>179
5HEPE	20.47	25	317>255
17HpDoHE	21.90	26	359>341
17HDoHE	21.94	27	343>245
11HETE	22.09	30	319>167
12HETEd$_8$	22.66	30	325>307
11HDoHE	23.20	27	343>149
4HDoHE	23.64	27	343>281
EPA	24.43	27	301>257
DHA	24.93	30	327>283
ARA	25.10	30	303>259

Capítulo 2 – S3: Comparison of the plasma FFA profile from Wistar rats supplemented with different fish oils diets (EPA:DHA 1:1, 2:1 and 1:2), linseed oil or soybean oil. Results are expressed as percentage of total fatty acids (mg/100mg)



Capítulo 2 – S4: Comparison of the FA erythrocyte membrane profile from Wistar rats supplemented with different fish oils diets (EPA:DHA 1:1, 2:1 and 1:2), linseed oil or soybean oil. Results are expressed as percentage of total fatty acids (mg/100mg)



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO III: Material suplementario del Capítulo III

Capítulo 3 - S1: Fatty acid composition of soybean, linseed and fish oil mixtures (EPA/DHA 1:1, 2:1 and 1:2) supplemented to SHROB rats. FA were methylated and analysed by GC-FID. Results are expressed as percentage of total fatty acids (mg/100mg of Total FA). Weekly dose of EPA, DHA, ALA, ARA and LA expressed as mg/kg rat. Values are shown as means ± SD.

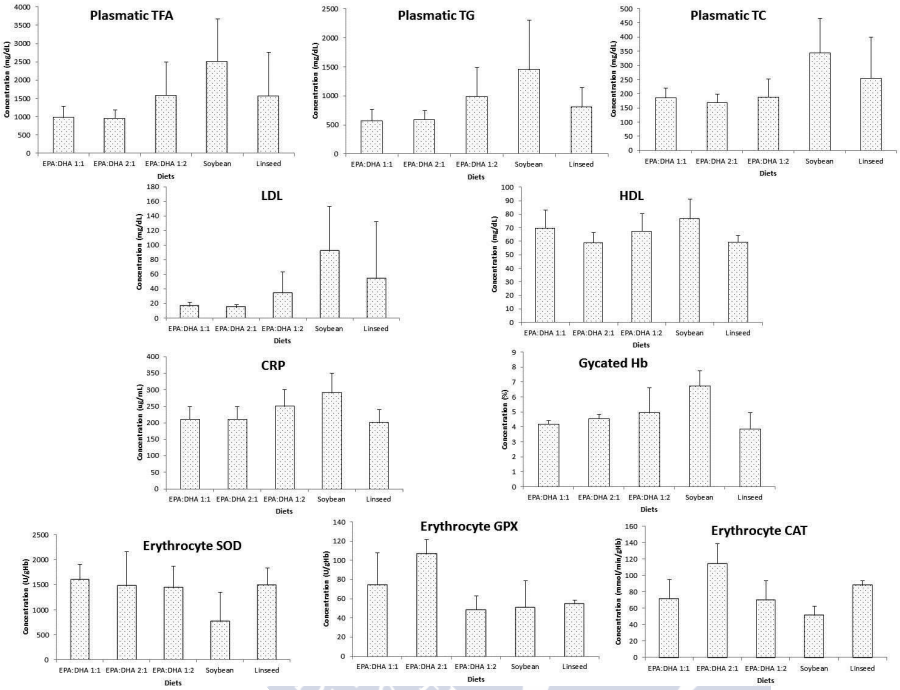
	RATIO 1:1 (EPA:DHA)		**RATIO 2:1 (EPA:DHA)**		**RATIO 1:2 (EPA:DHA)**		**SOYBEAN**		**LINSEED**	
FATTY ACID	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*	*MEAN*	*SD*
14:0	4.37	0.05	3.97	0.01	4.73	0.02	0.96	0.02	0.06	0.01
16:0	10.15	0.16	9.09	0.03	10.98	0.13	17.78	0.10	5.73	0.03
16:1 ω7 (PA)	4.99	0.04	4.57	0.02	5.39	0.03	0.90	0.03	0.11	0.01
18:0	2.94	0.03	2.95	0.00	2.97	0.01	2.07	0.01	4.75	0.02
18:1 ω9 (OA)	6.41	0.06	6.18	0.00	6.61	0.04	18.75	0.03	21.37	0.06
18:1 ω7	1.91	0.03	1.93	0.02	1.95	0.02	1.52	0.02	1.11	0.01
18:2 ω6 (LA)	0.65	0.01	0.61	0.00	0.65	0.02	47.55	0.01	16.76	0.03
20:0	0.32	0.01	0.39	0.01	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18:3 ω3 (ALA)	0.36	0.01	0.32	0.00	0.33	0.02	4.00	0.04	50.02	0.10
20:1 ω9	0.98	0.03	1.39	0.01	0.63	0.02	1.43	0.09	n.d.	n.d.
18:4 ω3	1.51	0.02	1.56	0.02	1.64	0.00	0.15	0.00	n.d.	n.d.
20:2 ω6	0.21	0.00	0.28	0.01	0.17	0.01	0.20	0.05	n.d.	n.d.
20:3 ω6	0.22	0.01	0.27	0.01	0.15	0.00	0.00	0.00	n.d.	n.d.
20:4 ω6 (ARA)	1.68	0.04	1.98	0.03	1.16	0.02	0.40	0.02	n.d.	n.d.
22:1 ω11	1.14	0.01	1.58	0.02	0.45	0.01	1.08	0.00	n.d.	n.d.
22:1 ω9	0.28	0.03	0.37	0.03	0.19	0.02	0.25	0.02	n.d.	n.d.
20:4 ω3	1.02	0.02	1.31	0.02	0.75	0.01	0.20	0.03	n.d.	n.d.
20:5 ω3 (EPA)	25.09	0.10	32.43	0.06	17.33	0.03	0.70	0.02	n.d.	n.d.
24:1 ω9	0.38	0.00	0.55	0.02	0.25	0.01	0.28	0.05	n.d.	n.d.
22:5 ω3 (DPA)	4.30	0.05	5.24	0.02	2.60	0.12	0.26	0.01	n.d.	n.d.
22:6 ω3 (DHA)	25.70	0.21	17.98	0.03	34.85	0.10	1.15	0.03	n.d.	n.d.
Total ω3 PUFA	57.97	0.07	58.84	0.03	57.51	0.05	6.47	0.02	50.02	0.10
Total ω6 PUFA	2.76	0.01	3.14	0.01	2.14	0.01	48.15	0.02	16.76	0.03
Total SFA	18.52	0.22	17.05	0.02	19.68	0.12	21.17	0.10	10.63	0.06
Total MUFA	17.22	0.12	17.14	0.07	17.43	0.11	24.21	0.11	22.59	0.06
Total PUFA	64.26	0.33	65.81	0.08	62.90	0.24	54.62	0.03	66.78	0.11
weekly dose of EPA	159.30 mg/kg rat		205.84 mg/kg rat		110.03 mg/kg rat		4.45 mg/kg rat			
weekly dose of DHA	163.12 mg/kg rat		114.15 mg/kg rat		221.24 mg/kg rat		7.31 mg/kg rat			
weekly dose of ARA	10.65 mg/kg rat		12.55 mg/kg rat		7.37 mg/kg rat		2.54 mg/kg rat			
weekly dose of ALA	2.29 mg/kg rat		2.06 mg/kg rat		2.09 mg/kg rat		25.39 mg/kg rat		317.56 mg/kg rat	
weekly dose of LA	4.13 mg/kg rat		3.88 mg/kg rat		4.15 mg/kg rat		301.86 mg/kg rat		106.39 mg/kg rat	

Capítulo 3 – S2: Retention times, collision energies and MS/MS transitions for ESI-LC-LIT/MS/MS

Compound	Retention Time (min)	LIT parameters	
		Collision energy (eV)	Quantification transition (*m/z*)
8iso-PGF$_{3\alpha}$	6.79	30	351>253
TXB$_3$	6.97	19	367>195
PGD$_3$/PGE$_3$	7.67	19	349>313
8iso-PGF$_{2\alpha}$	8.28	28	353>299
PGE$_2$	9.09	20	351>315
RvD$_1$	9.80	25	375>141
PD$_x$	12.89	30	359>153
LTB$_4$	13.79	27	335>195
15HpEPE	17.36	20	333>315
12HpEPE	17.80	25	333>315
15HEPE	17.92	27	317>219
12HEPE	18.72	27	317>179
5HEPE	20.47	25	317>255
17HpDoHE	21.90	26	359>341
17HDoHE	21.94	27	343>245
11HETE	22.09	30	319>167
12HETEd$_8$	22.66	30	325>307
11HDoHE	23.20	27	343>149
4HDoHE	23.64	27	343>281
EPA	24.43	27	301>257
DHA	24.93	30	327>283
ARA	25.10	30	303>259

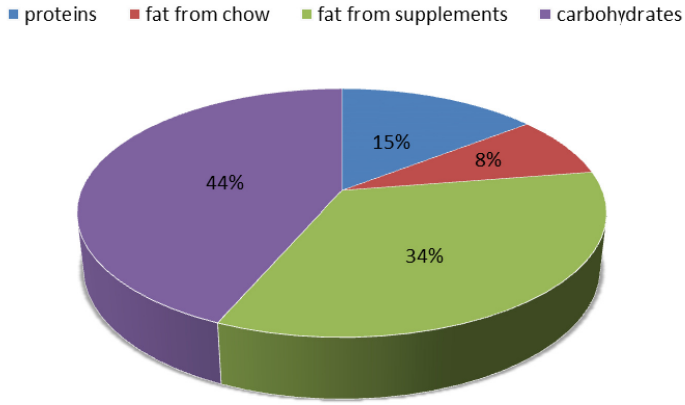
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Capítulo 3 – S3: Biochemical parameters related with MetS from supplemented SHROB groups with EPA/DHA 1:1, 2:1 and 1:2; linseed and soybean oil. Data from previous work (538).



ANEXO IV: Material suplementario del Capítulo IV

Capítulo 4 - S1: Percentage of caloric contribution from fat, proteins and carbohydrates of all experimental diets: chow with oil supplements (1:1, 2:1, 1:2 EPA:DHA, or soybean oil).



Capítulo 4 – S2: Oxidized (1 mL) and non-oxidized (15 mL) uptake media preparation conditions. Oxidized media were further incubated with 40 µL HCl 1N during 2.5h at 37 ºC, and then 200 µL of $NaHCO_3$ and 13760 µL of taurocholate/PBS were added. Final concentration of uptake solutions is 30 µM, pH = 7.4, and 0.5% v/v EtOH.

Uptake media	Labeled FA 0.1mCi/mL 55mCi/mmol (µL)		Non-labeled FA 35.6 mM (µL)		EtOH (µL)	10 mM taurocholate/PBS for Non-oxidized FA uptake media (µL)	10 mM taurocholate/PBS for oxidized FA uptake media (µL)
	EPA*	DHA*	EPA	DHA			
EPA*	12.4		12		50.6	14925	925
DHA*		12.4		12	50.6	14925	925
1:1EPA*:DHA	6.2		6	6.3	56.5	14925	925
1:1EPA:DHA*		6.2	6.3	6	56.5	14925	925
2:1EPA*:DHA	8.3		8	4.2	54.5	14925	925
2:1EPA:DHA*		4.1	8.4	4	58.5	14925	925
1:2EPA*:DHA	4.1		4	8.4	58.5	14925	925
1:2EPA:DHA*		8.3	4.2	8	54.5	14925	925

ANEXO V: Material suplementario del Capítulo V

Capítulo 5 - S1: Diet composition and experimental design. ST (standard diet), HFHS (high-fat high-sucrose diet), C (control group); ω-3 (fish oils group); GSP (proanthocyanidins group); ω3&GSP (fish oils and proanthocyanidins group). [a]Standard flour (Tekland Global 2014). [b]High fat-high sucrose flour (TD 08811). [c]Grape seed proanthocyanidin extract. [d]27% from sucrose.

Dietary groups	ST-C	ST- ω3	ST-GSP	ST-ω3&GSP	HFHS-C	HFHS-ω3	HFHS-GSP	HFHS-ω3&GSP
Diet composition								
Flour (g)	1000[a]	1000[a]	1000[a]	1000[a]	1000[b]	1000[b]	1000[b]	1000[b]
Porcine gelatine (g)	25	25	25	25	25	25	25	25
Soybean lecithin (g)	6	6	6	6	22	22	22	22
Polyphenol extract[c] (mg)	-	-	880	880	-	-	1090	1090
Oil (mL)	19 mL soybean	19 mL EPA:DHA 1:1	19 mL soybean	19 mL EPA:DHA 1:1	24 mL soybean	24 mL EPA:DHA 1:1	24 mL soybean	24 mL EPA:DHA 1:1
Macronutrients (% weight)								
Protein	16.4	16.4	16.4	16.4	21.7	21.7	21.7	21.7
Fat	6.2	6.2	6.2	6.2	24.1	24.1	24.1	24.1
Carbohydrates	46.6	46.6	46.5	46.5	45.0	45.0	44.9	44.9
Macronutrients (% caloric value)								
Protein	21,3	21.3	21.3	21.3	17,9	17.9	17.9	17.9
Fat	18,2	18.2	18.2	18.2	44,9	44.9	44.9	44.9
Carbohydrates	60,5	60.5	60.5	60.5	37,2[d]	37.2[d]	37.2[d]	37.2[d]
Total energy density (kcal/g)	3.1	3.1	3.1	3.1	4.8	4.8	4.8	4.8

Capítulo 5 – S2: Fatty acid composition of supplemented groups in the standard and HFHS diets: C (control group); ω-3 (fish oils group); GSP (polyphenols group); ω3&GSP (fish oils and polyphenols group). Results are expressed as a percentage of total fatty acids (mg/100mg of Total FA).

	C and GSP groups		ω3 and ω3&GSP groups	
	Standard diet	**HFHS diet**	**Standard diet**	**HFHS diet**
14:0	0,017	11,5	0,075	11,6
16:0	14,8	32,2	14,6	32,0
16:1ω7	0,015	1,7	0,08	1,7
18:0	2,9	13,7	2,9	13,7
18:1ω9	20,5	26,4	20,3	26,2
18:1ω7	0,026	0,67	0,033	0,68
18:2ω6	58,6	9,7	57,8	8,7
20:0	n.d.	n.d.	0,0055	0,0069
18:3ω3	2,9	1,1	2,9	1,1
20:1ω9	0,025	0,031	0,017	0,021
18:4ω3	0,0026	0,0032	0,026	0,033
20:2ω6	0,0034	0,0043	0,0036	0,0045
20:3ω6	n.d.	n.d.	0,0038	0,0048
20:4ω6	0,0069	0,0086	0,029	0,036
22:1ω11	0,019	0,023	0,02	0,024
22:1ω9	0,0043	0,0054	0,0048	0,006
20:4ω3	0,0034	0,0043	0,018	0,022
20:5ω3	0,012	0,015	0,43	0,54
24:1ω9	0,0048	0,0060	0,0065	0,0082
22:5ω3	0,0045	0,0056	0,074	0,093
22:6ω3	0,02	0,024	0,44	0,56
Total SFAs	17,5	59,4	18,3	60,5
Total MUFAs	21,1	29,3	20,3	28,4
Total PUFAs	61,1	10,8	61,0	10,7
Total ω3	3,3	1,6	3,2	1,4
Total ω6	58,8	10,4	58,9	10,6

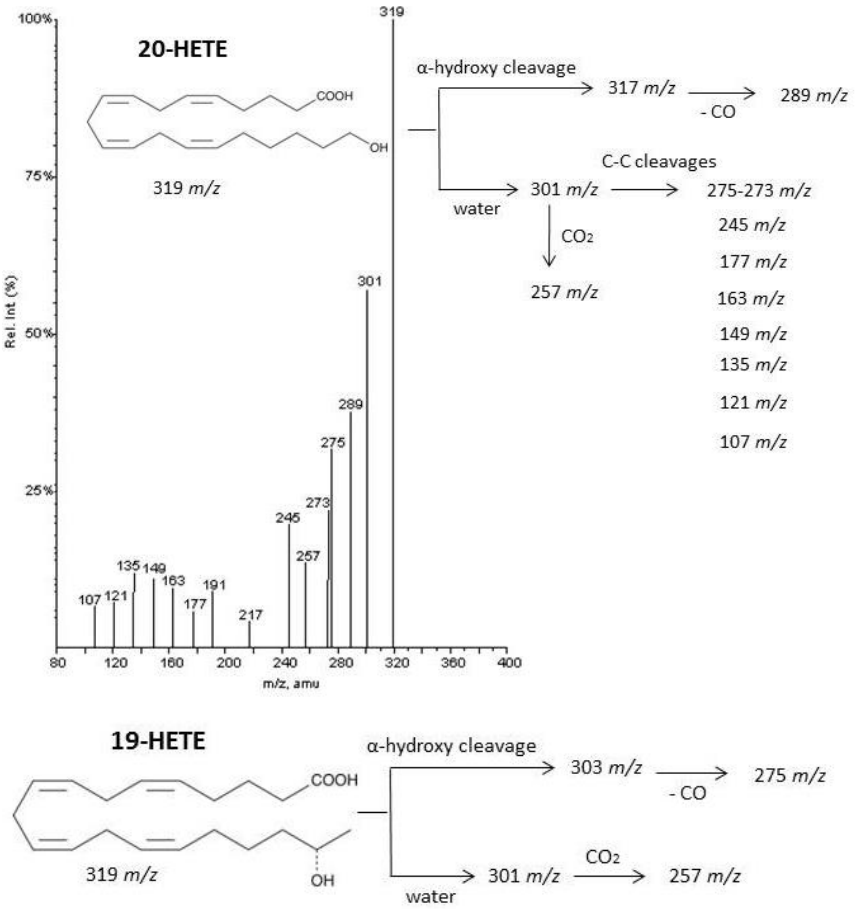
Capítulo 5 – S3: Retention times, collision energies and MS/MS transitions for ESI-LC-LIT/MS/MS

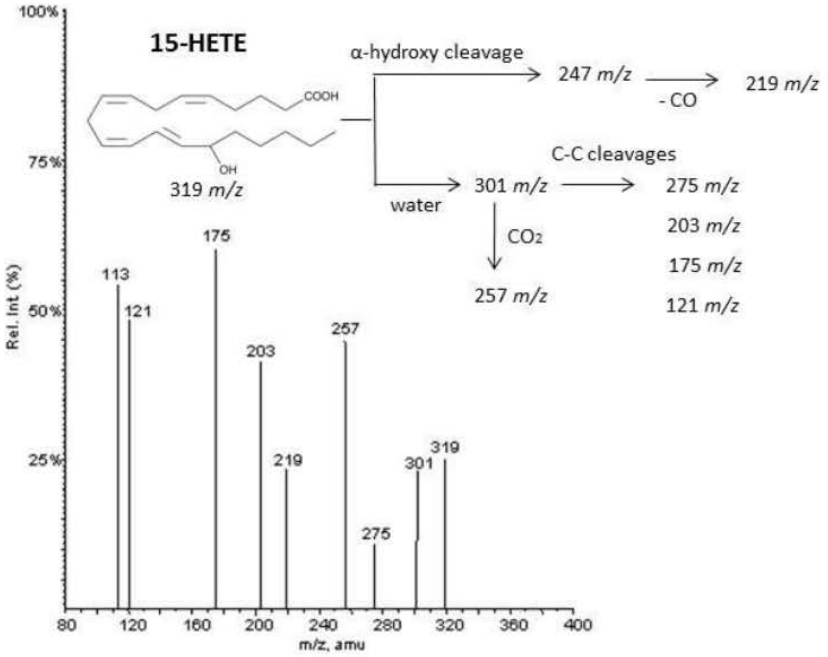
Compound	Retention Time (min)	LIT parameters	
		Collision energy (eV)	Quantification transition (*m/z*)
8iso-PGF$_{3\alpha}$	6.79	30	351>253
TXB$_3$	6.97	19	367>195
PGD$_3$/PGE$_3$	7.67	19	349>313
8iso-PGF$_{2\alpha}$	8.28	28	353>299
PGE$_2$	9.09	20	351>315
RvD$_1$	9.80	25	375>141
PD$_x$	12.89	30	359>153
LTB$_4$	13.79	27	335>195
15HpEPE	17.36	20	333>315
12HpEPE	17.80	25	333>315
15HEPE	17.92	27	317>219
12HEPE	18.72	27	317>179
5HEPE	20.47	25	317>255
17HpDoHE	21.90	26	359>341
17HDoHE	21.94	27	343>245
11HETE	22.09	30	319>167
12HETEd$_8$	22.66	30	325>307
11HDoHE	23.20	27	343>149
4HDoHE	23.64	27	343>281
EPA	24.43	27	301>257
DHA	24.93	30	327>283
ARA	25.10	30	303>259

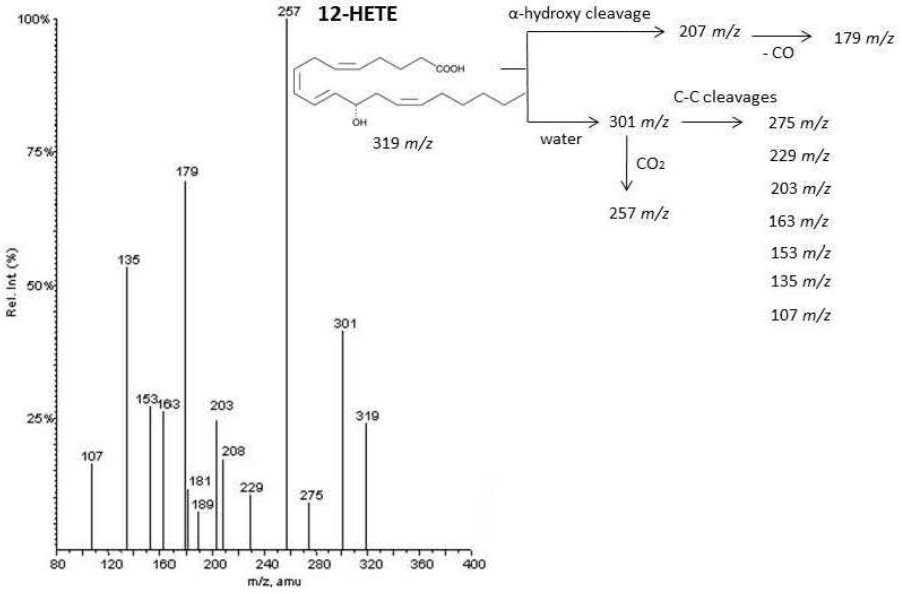
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

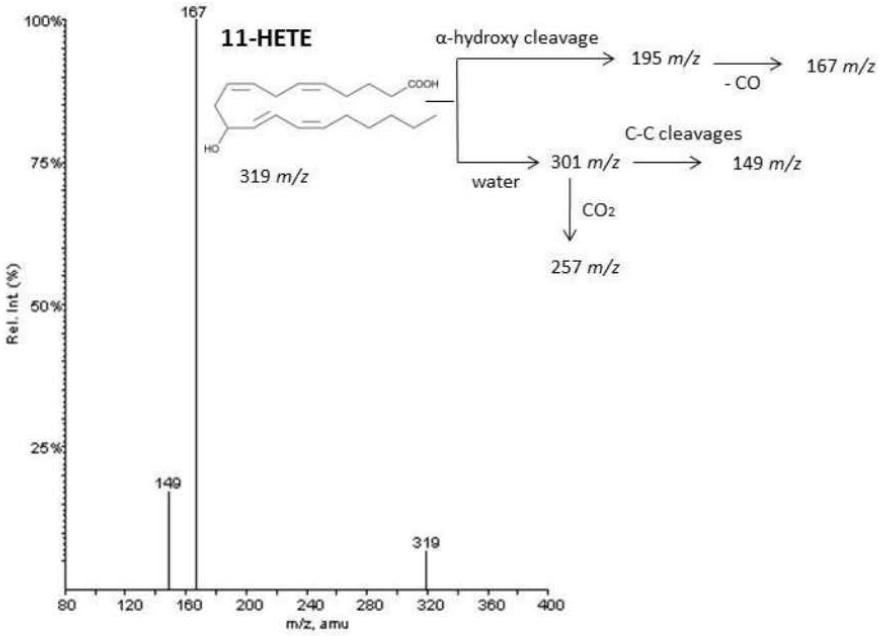
<u>ANEXO VI:</u> Material suplementario del Capítulo VI

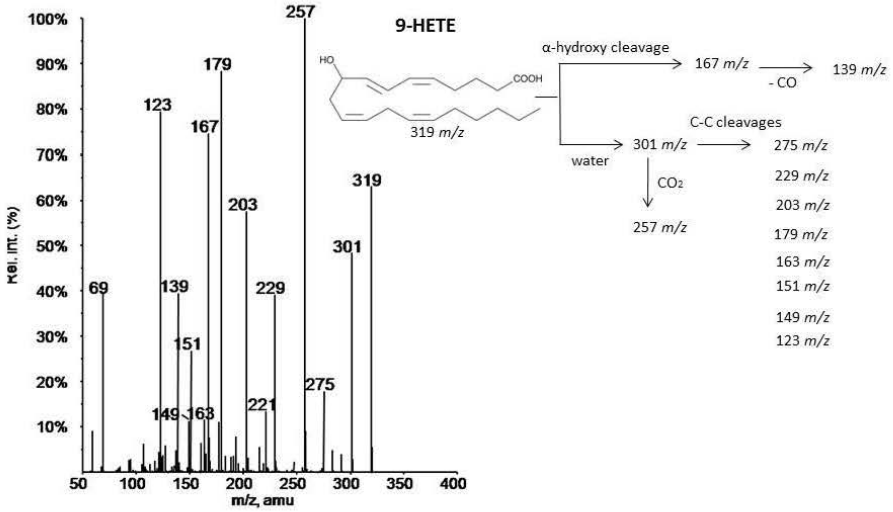
Capítulo 6 - S1: Common and specific transitions suggested for hydroxy-derivates from ARA, EPA and DHA. Product ion spectra at 319 *m/z* for HETEs, 317 *m/z* for HEPEs, and 343 *m/z* for HDoHEs were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage. No spectra was found for 19-HETE.

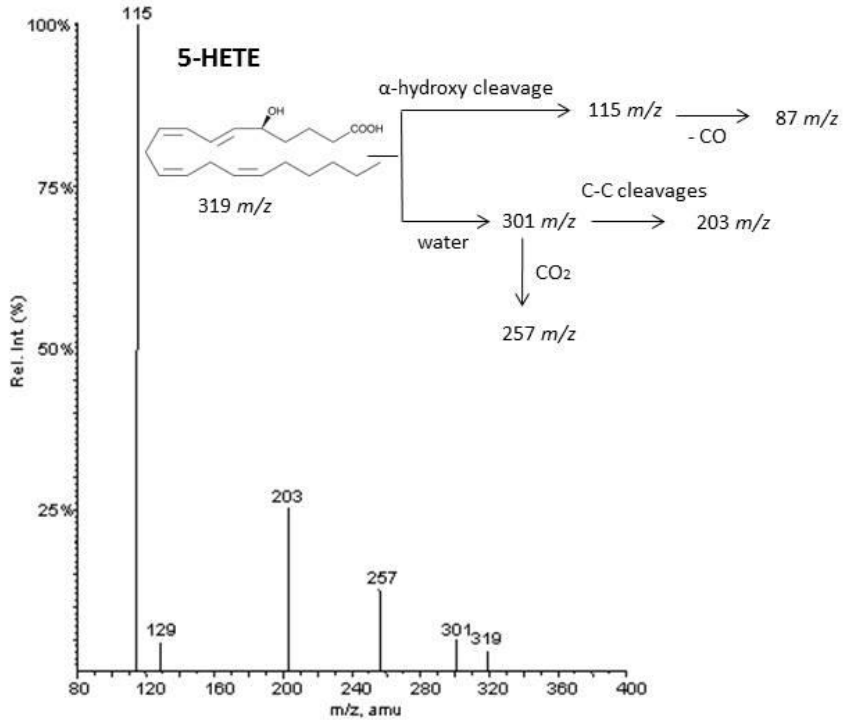


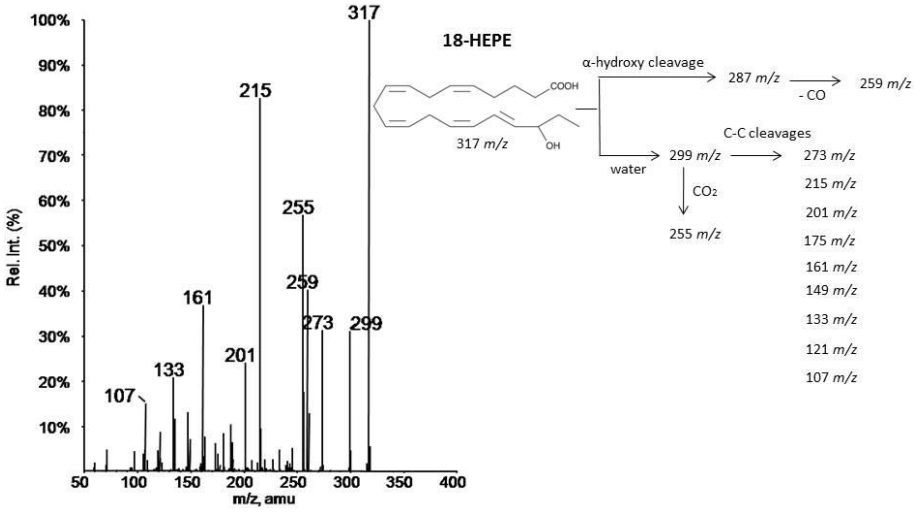

15-HETE
α-hydroxy cleavage
247 m/z
- CO
219 m/z
COOH
OH
319 m/z
C-C cleavages
water
301 m/z
275 m/z
CO2
203 m/z
257 m/z
175 m/z
121 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu

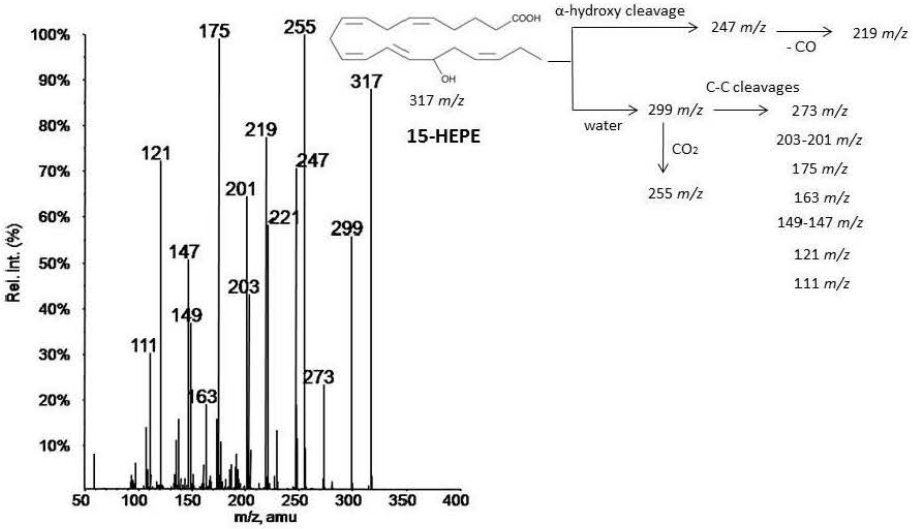

12-HETE
α-hydroxy cleavage
207 m/z
- CO
179 m/z
COOH
OH
319 m/z
C-C cleavages
water
301 m/z
275 m/z
CO2
229 m/z
257 m/z
203 m/z
163 m/z
153 m/z
135 m/z
107 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu

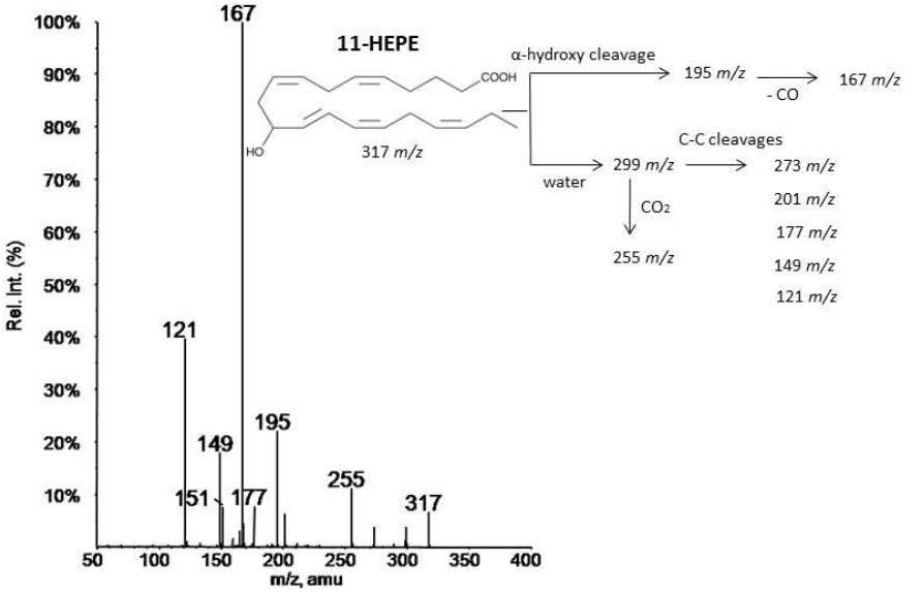

11-HETE
α-hydroxy cleavage
195 m/z
- CO
167 m/z
C-C cleavages
301 m/z
149 m/z
water
CO2
257 m/z
319 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu

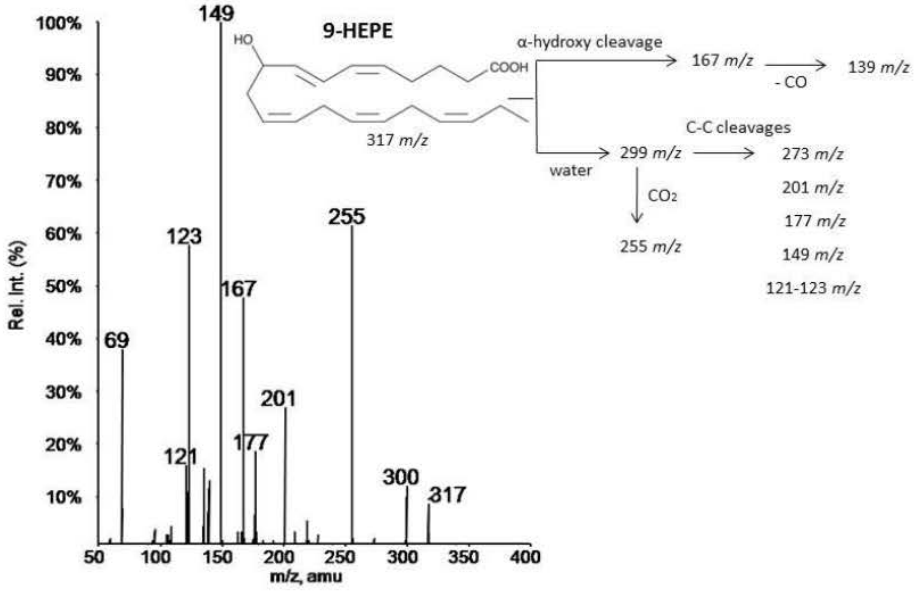

9-HETE
α-hydroxy cleavage
167 m/z
- CO
139 m/z
C-C cleavages
301 m/z
275 m/z
229 m/z
203 m/z
179 m/z
163 m/z
151 m/z
149 m/z
123 m/z
water
CO2
257 m/z
319 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu

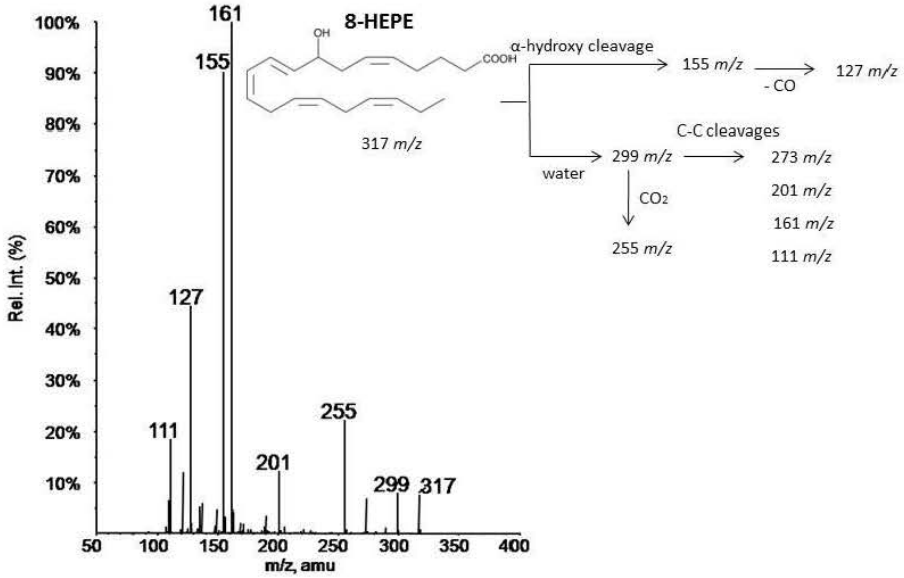

5-HETE
α-hydroxy cleavage
115 m/z
- CO
87 m/z
319 m/z
C-C cleavages
water
301 m/z
203 m/z
CO2
257 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu
115
203
257
129
301
319

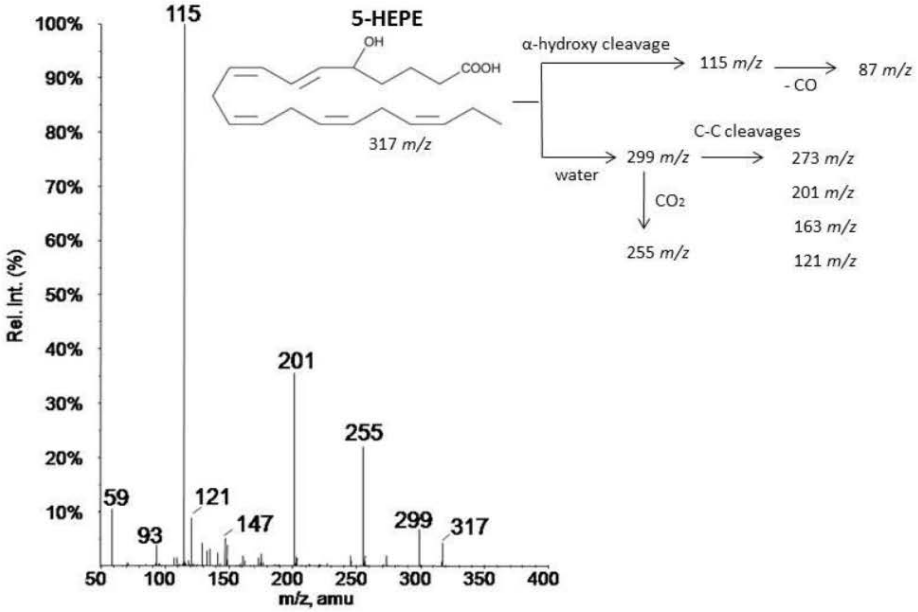

18-HEPE
α-hydroxy cleavage
287 m/z
- CO
259 m/z
317 m/z
C-C cleavages
water
299 m/z
273 m/z
CO2
255 m/z
215 m/z
201 m/z
175 m/z
161 m/z
149 m/z
133 m/z
121 m/z
107 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu
317
215
255
259
161
273
299
201
133
107

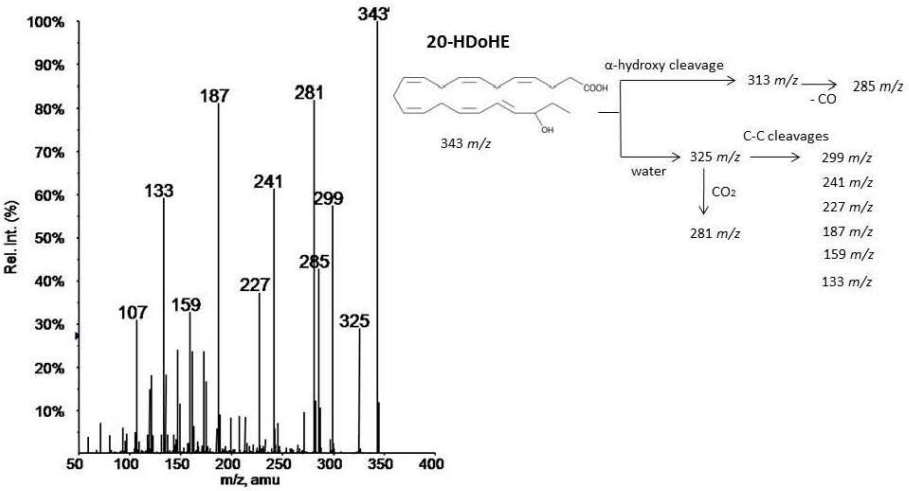

15-HEPE
Rel. Int. (%)
m/z, amu
α-hydroxy cleavage
317 m/z
247 m/z
- CO
219 m/z
C-C cleavages
water
299 m/z
CO2
255 m/z
273 m/z
203-201 m/z
175 m/z
163 m/z
149-147 m/z
121 m/z
111 m/z

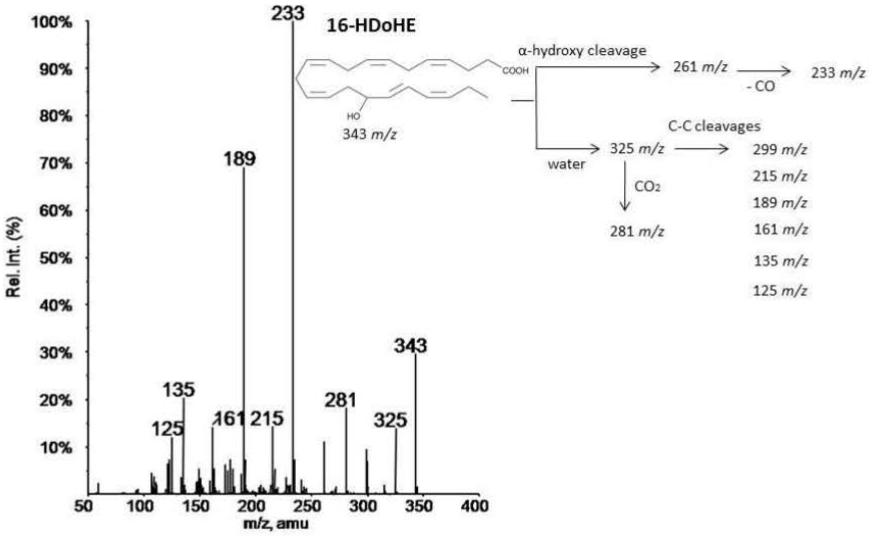

11-HEPE
Rel. Int. (%)
m/z, amu
α-hydroxy cleavage
317 m/z
195 m/z
- CO
167 m/z
C-C cleavages
water
299 m/z
CO2
255 m/z
273 m/z
201 m/z
177 m/z
149 m/z
121 m/z

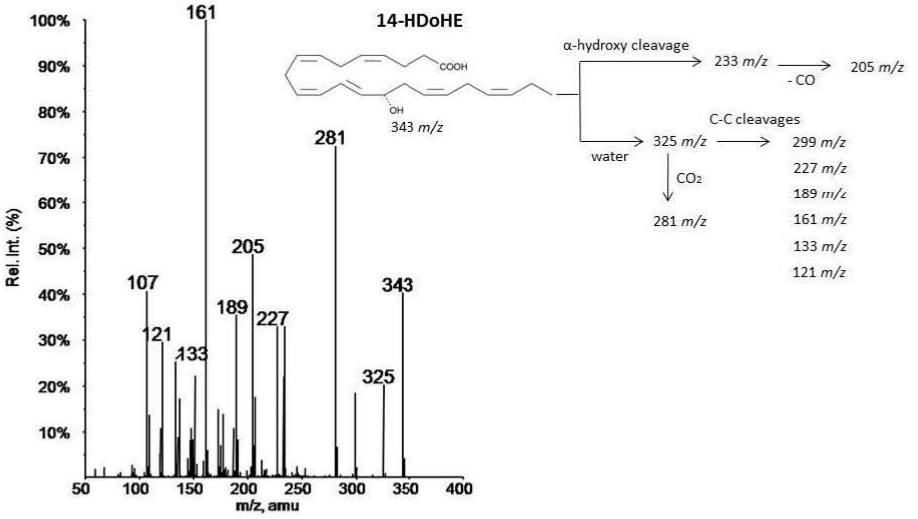

9-HEPE
HO
COOH
317 m/z
α-hydroxy cleavage
167 m/z
- CO
139 m/z
C-C cleavages
water
299 m/z
273 m/z
201 m/z
177 m/z
149 m/z
121-123 m/z
CO2
255 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu
149
123
255
167
69
201
177
121
300
317

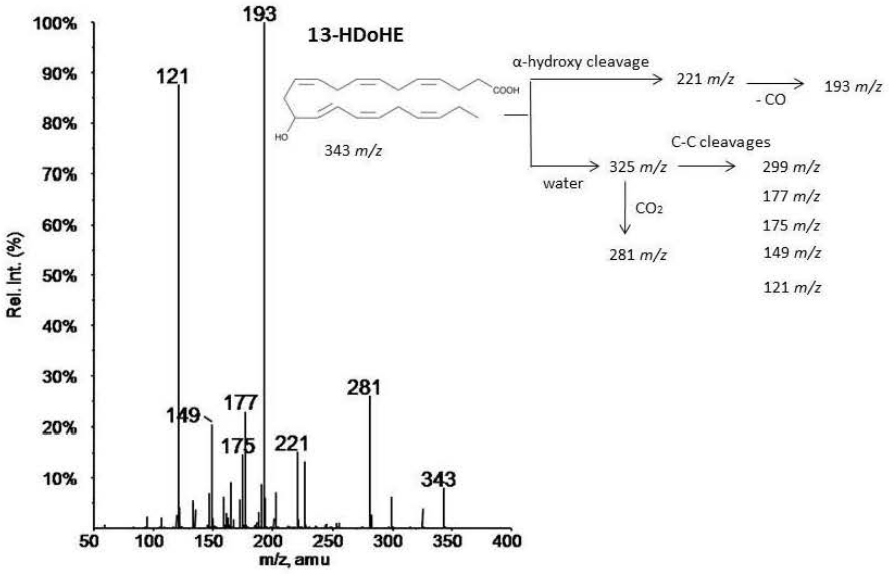

8-HEPE
OH
COOH
317 m/z
α-hydroxy cleavage
155 m/z
- CO
127 m/z
C-C cleavages
water
299 m/z
273 m/z
201 m/z
161 m/z
111 m/z
CO2
255 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu
161
155
127
111
255
201
299
317

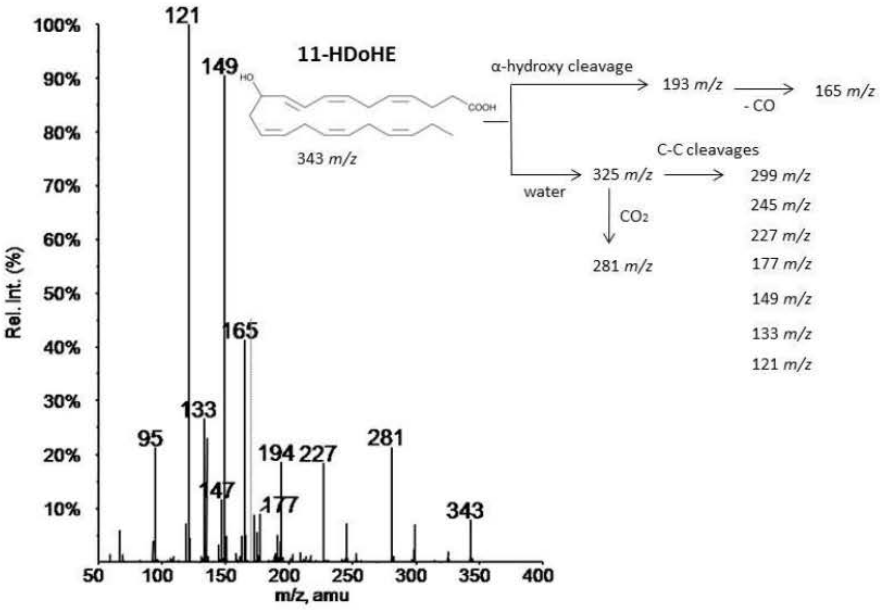

5-HEPE
OH
COOH
317 m/z
α-hydroxy cleavage
115 m/z
- CO
87 m/z
C-C cleavages
water
299 m/z
273 m/z
201 m/z
163 m/z
121 m/z
CO2
255 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu
115
201
255
59
121
147
93
299
317

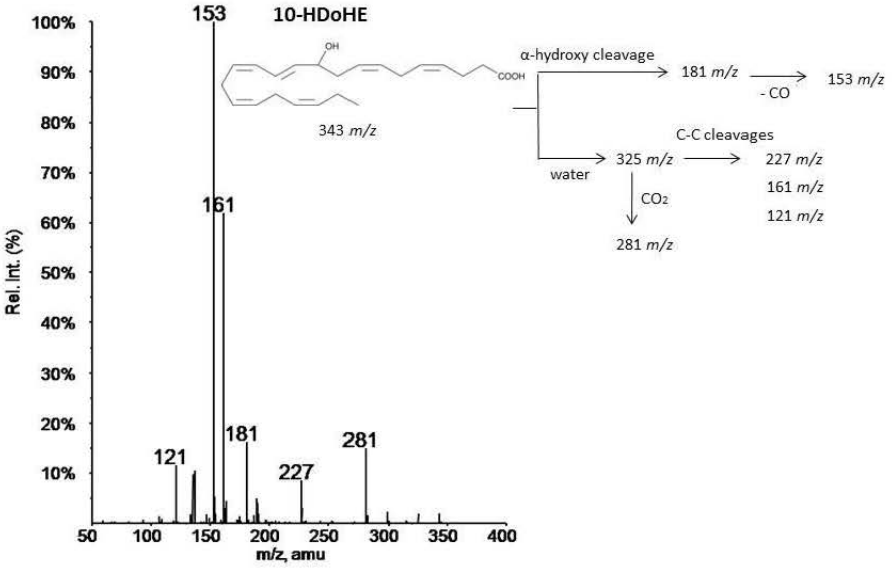

20-HDoHE
343 m/z
α-hydroxy cleavage
313 m/z
- CO
285 m/z
C-C cleavages
water
325 m/z
299 m/z
241 m/z
227 m/z
187 m/z
159 m/z
133 m/z
CO2
281 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu
343
187
281
133
241
299
285
227
107
159
325

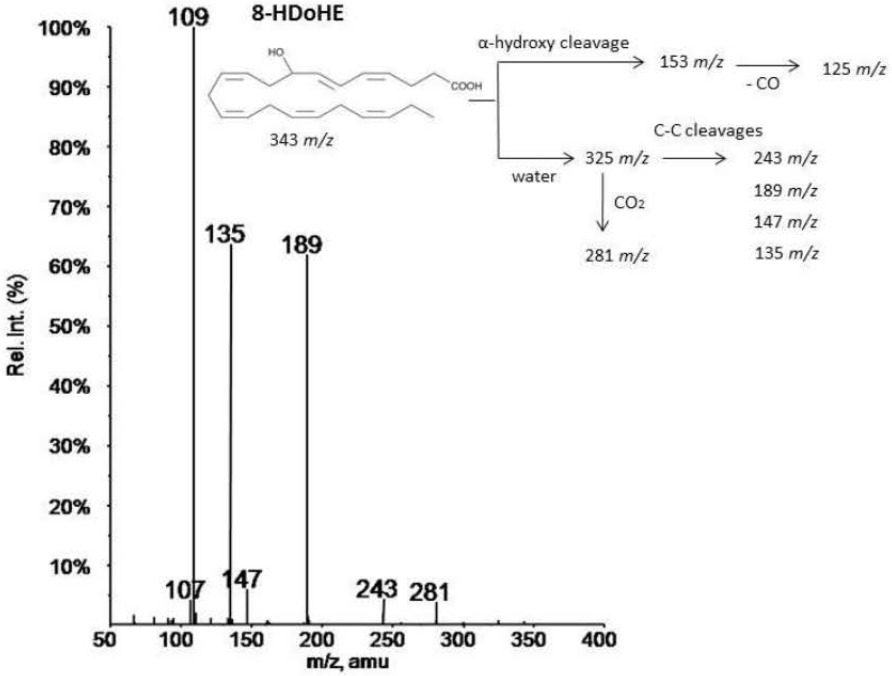

16-HDoHE
233
189
343
135
125
161
215
281
325
Rel. Int. (%)
m/z, amu
α-hydroxy cleavage
261 m/z
- CO
233 m/z
343 m/z
C-C cleavages
325 m/z
water
CO2
281 m/z
299 m/z
215 m/z
189 m/z
161 m/z
135 m/z
125 m/z

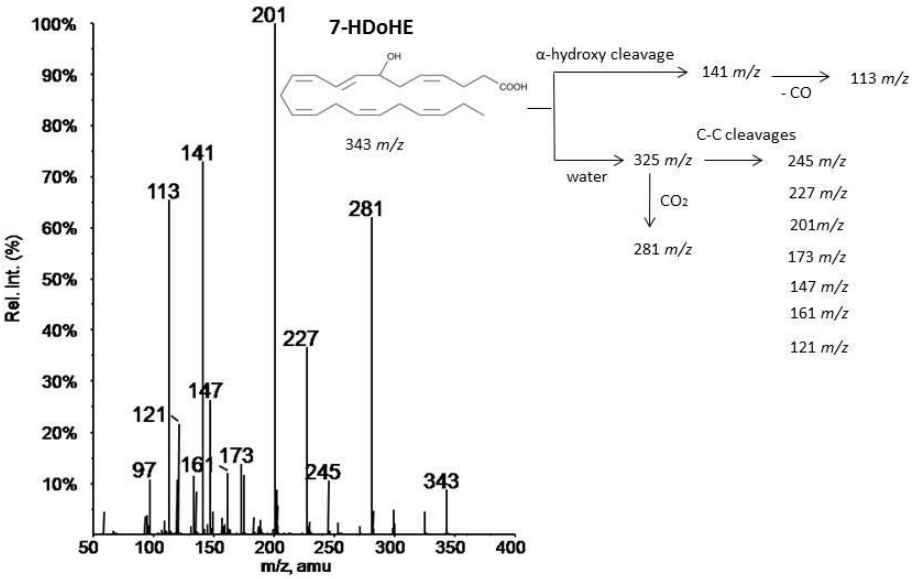

14-HDoHE
161
281
205
107
189
227
343
121
133
325
Rel. Int. (%)
m/z, amu
α-hydroxy cleavage
233 m/z
- CO
205 m/z
343 m/z
C-C cleavages
325 m/z
water
CO2
281 m/z
299 m/z
227 m/z
189 m/z
161 m/z
133 m/z
121 m/z

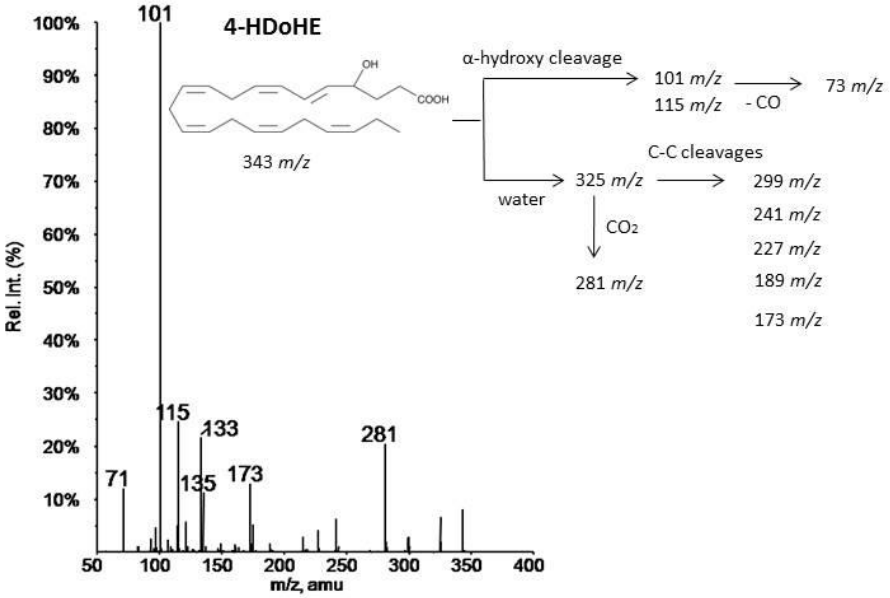

13-HDoHE
Rel. Int. (%)
m/z, amu
193
121
149
177
175
221
281
343
α-hydroxy cleavage
221 m/z
- CO
193 m/z
343 m/z
water
325 m/z
C-C cleavages
299 m/z
177 m/z
175 m/z
149 m/z
121 m/z
CO2
281 m/z


11-HDoHE
Rel. Int. (%)
m/z, amu
121
149
165
133
95
194
227
281
147
177
343
α-hydroxy cleavage
193 m/z
- CO
165 m/z
343 m/z
water
325 m/z
C-C cleavages
299 m/z
245 m/z
227 m/z
177 m/z
149 m/z
133 m/z
121 m/z
CO2
281 m/z

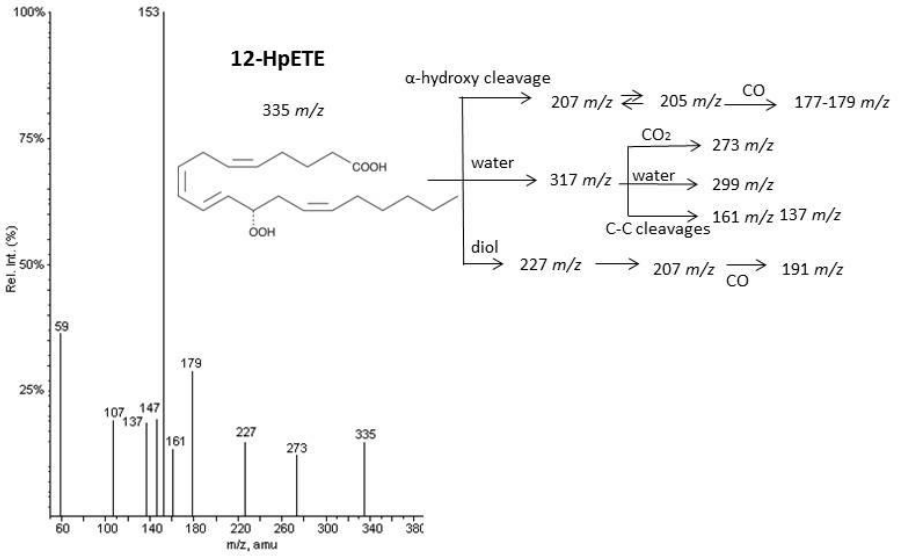

153
10-HDoHE
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
Rel. Int. (%)
161
181
121
227
281
50
100
150
200
250
300
350
400
m/z, amu
OH
COOH
343 m/z
α-hydroxy cleavage
181 m/z
- CO
153 m/z
C-C cleavages
325 m/z
227 m/z
161 m/z
121 m/z
water
CO2
281 m/z

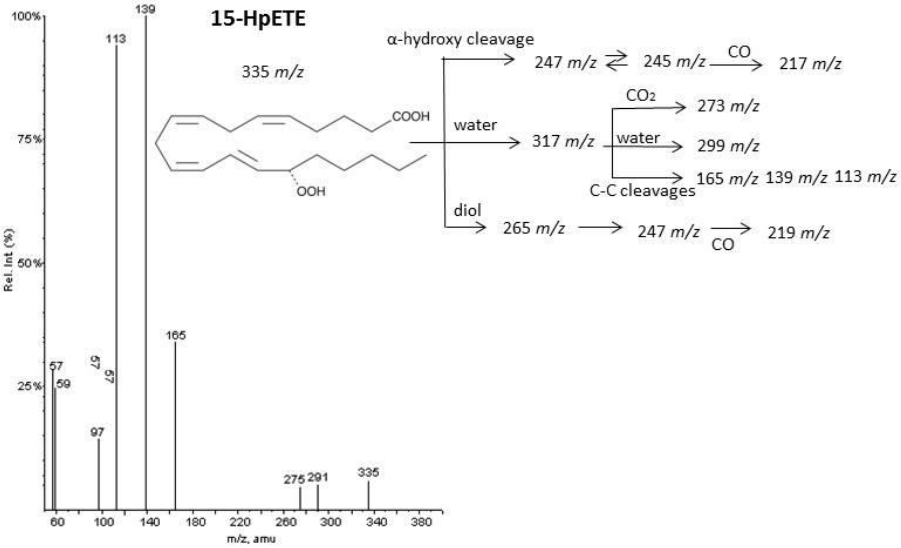

109
8-HDoHE
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
Rel. Int. (%)
135
189
107
147
243
281
50
100
150
200
250
300
350
400
m/z, amu
HO
COOH
343 m/z
α-hydroxy cleavage
153 m/z
- CO
125 m/z
C-C cleavages
325 m/z
243 m/z
189 m/z
147 m/z
135 m/z
water
CO2
281 m/z

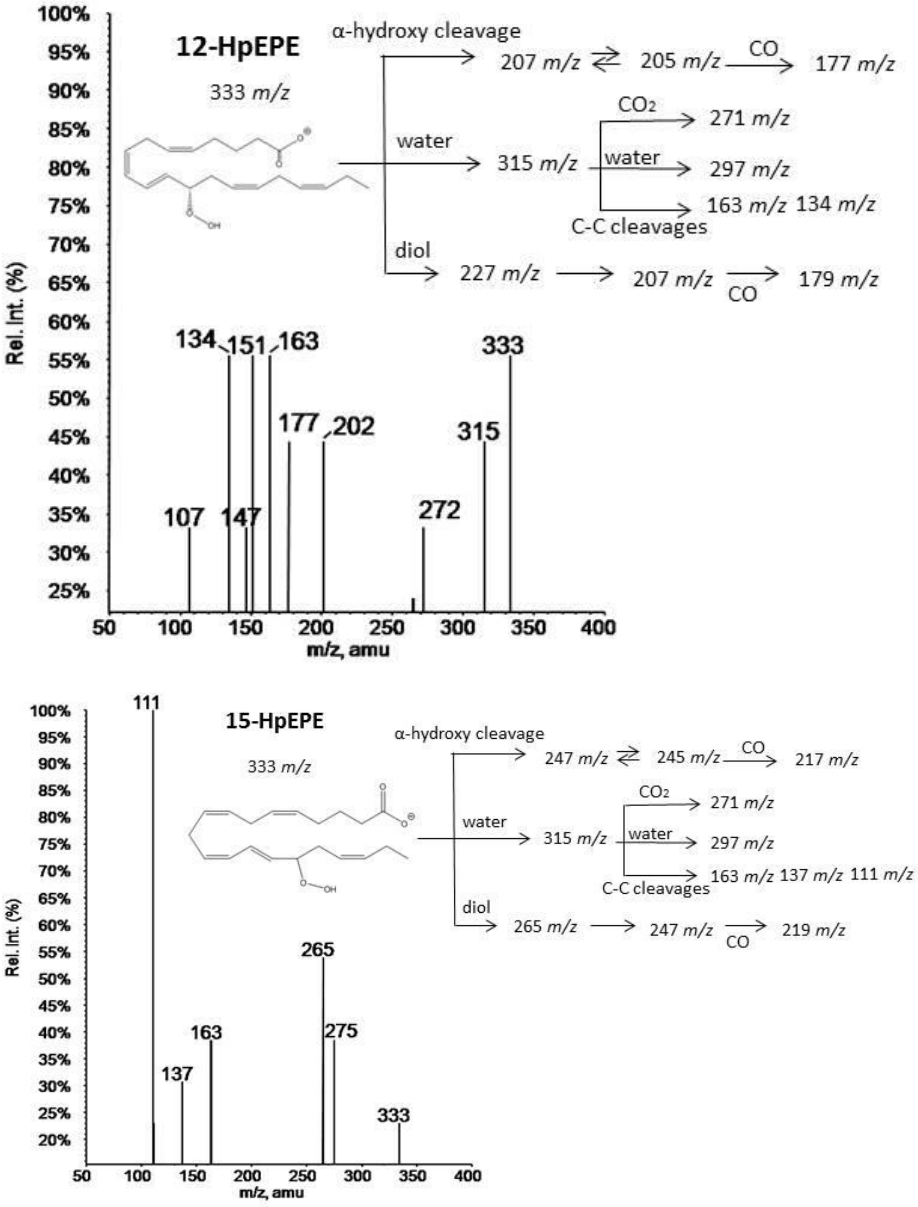

7-HDoHE
343 m/z
α-hydroxy cleavage
141 m/z
- CO
113 m/z
water
325 m/z
CO2
281 m/z
C-C cleavages
245 m/z
227 m/z
201m/z
173 m/z
147 m/z
161 m/z
121 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu


4-HDoHE
343 m/z
α-hydroxy cleavage
101 m/z
115 m/z
- CO
73 m/z
water
325 m/z
CO2
281 m/z
C-C cleavages
299 m/z
241 m/z
227 m/z
189 m/z
173 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu

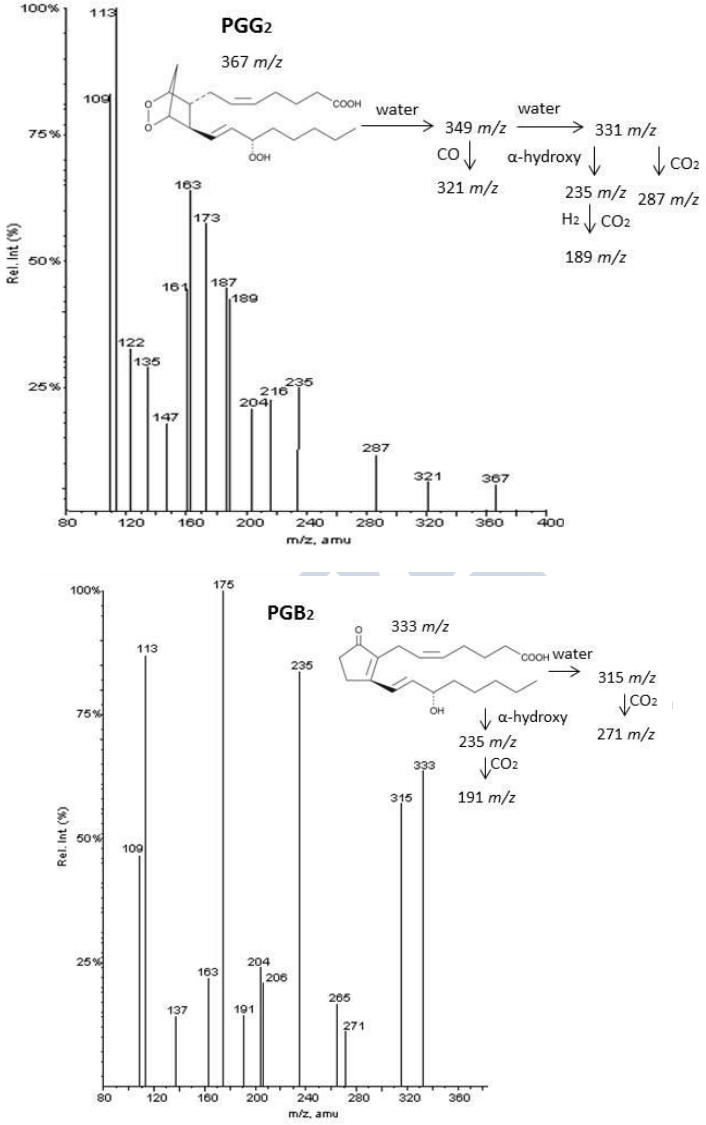
Capítulo 6 – S2: Common and specific transitions suggested for 12 and 15 hydroperoxy-derivates of ARA and EPA. Product ion spectra at 335 *m/z* for HpETEs, and 333 *m/z* for HpEPEs were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

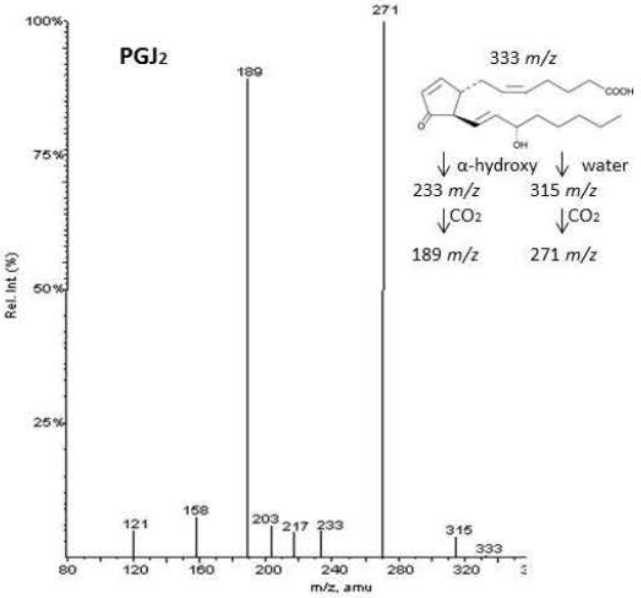


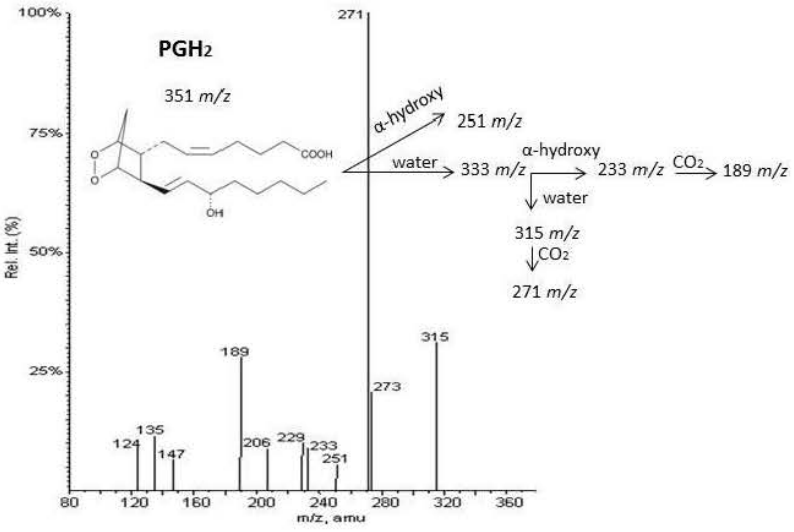


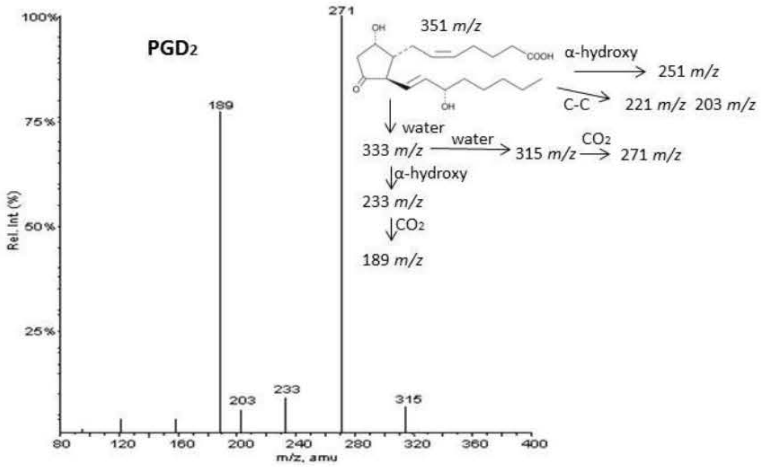

12-HpEPE
333 m/z
α-hydroxy cleavage
207 m/z
205 m/z
CO
177 m/z
water
315 m/z
CO2
271 m/z
water
297 m/z
163 m/z
134 m/z
C-C cleavages
diol
227 m/z
207 m/z
CO
179 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu
15-HpEPE
333 m/z
α-hydroxy cleavage
247 m/z
245 m/z
CO
217 m/z
CO2
271 m/z
water
315 m/z
water
297 m/z
163 m/z
137 m/z
111 m/z
C-C cleavages
diol
265 m/z
247 m/z
CO
219 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu

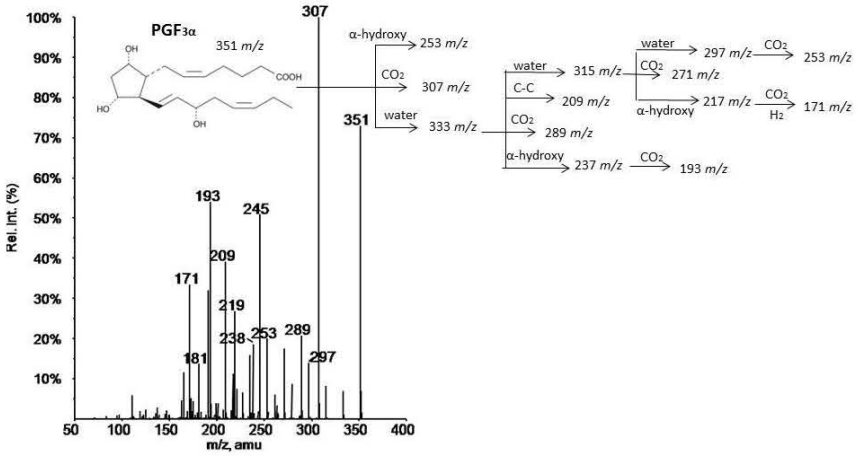
Capítulo 6 – S3: Fragmentation pattern suggested for prostaglandins derived from ARA and EPA. Product ion spectra at 331 *m/z*, 333 *m/z*, 351 *m/z,* and 367 *m/z* were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

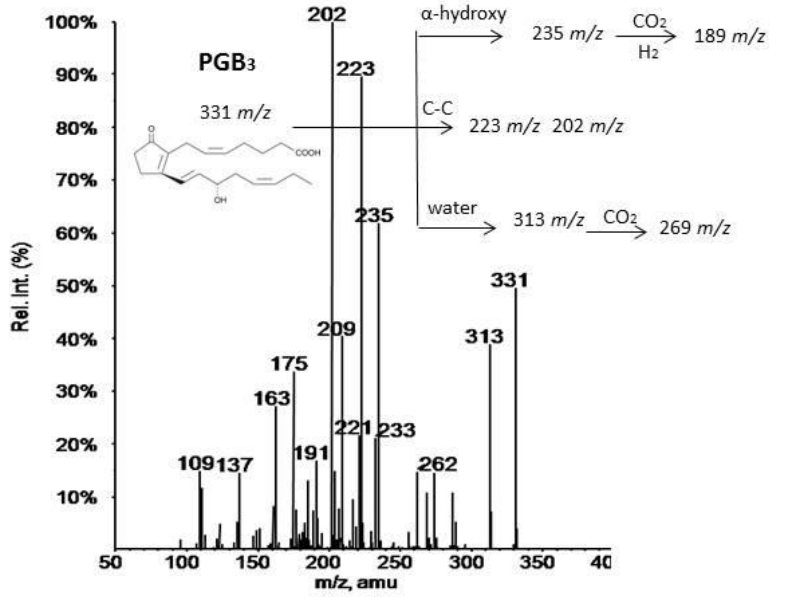


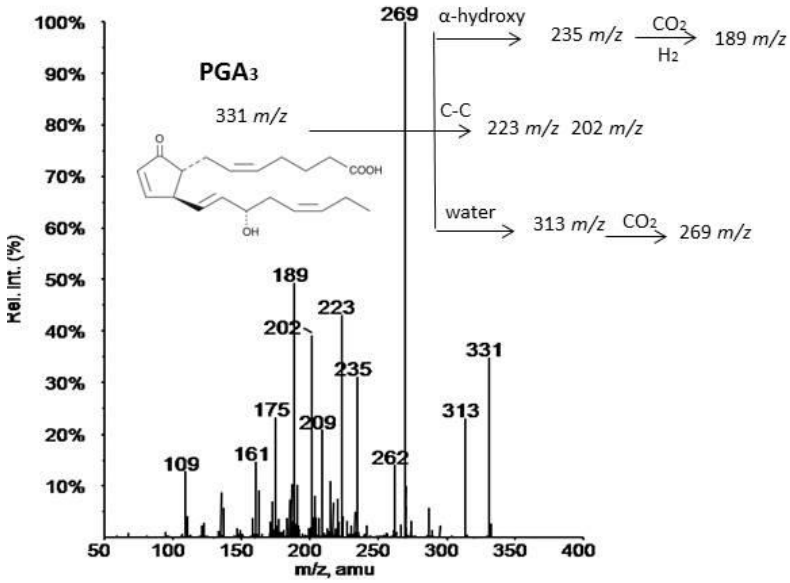

PGJ2
100%
75%
50%
25%
Rel. Int (%)
271
189
121
158
203
217
233
315
333
80
120
160
200
240
280
320
m/z, amu
333 m/z
COOH
OH
α-hydroxy
water
233 m/z
315 m/z
CO2
CO2
189 m/z
271 m/z


PGH2
100%
75%
50%
25%
Rel. Int. (%)
271
351 m/z
COOH
OH
α-hydroxy
251 m/z
water
333 m/z
α-hydroxy
233 m/z
CO2
189 m/z
water
315 m/z
CO2
271 m/z
315
189
273
135
124
147
206
229
233
251
80
120
160
200
240
280
320
360
m/z, amu

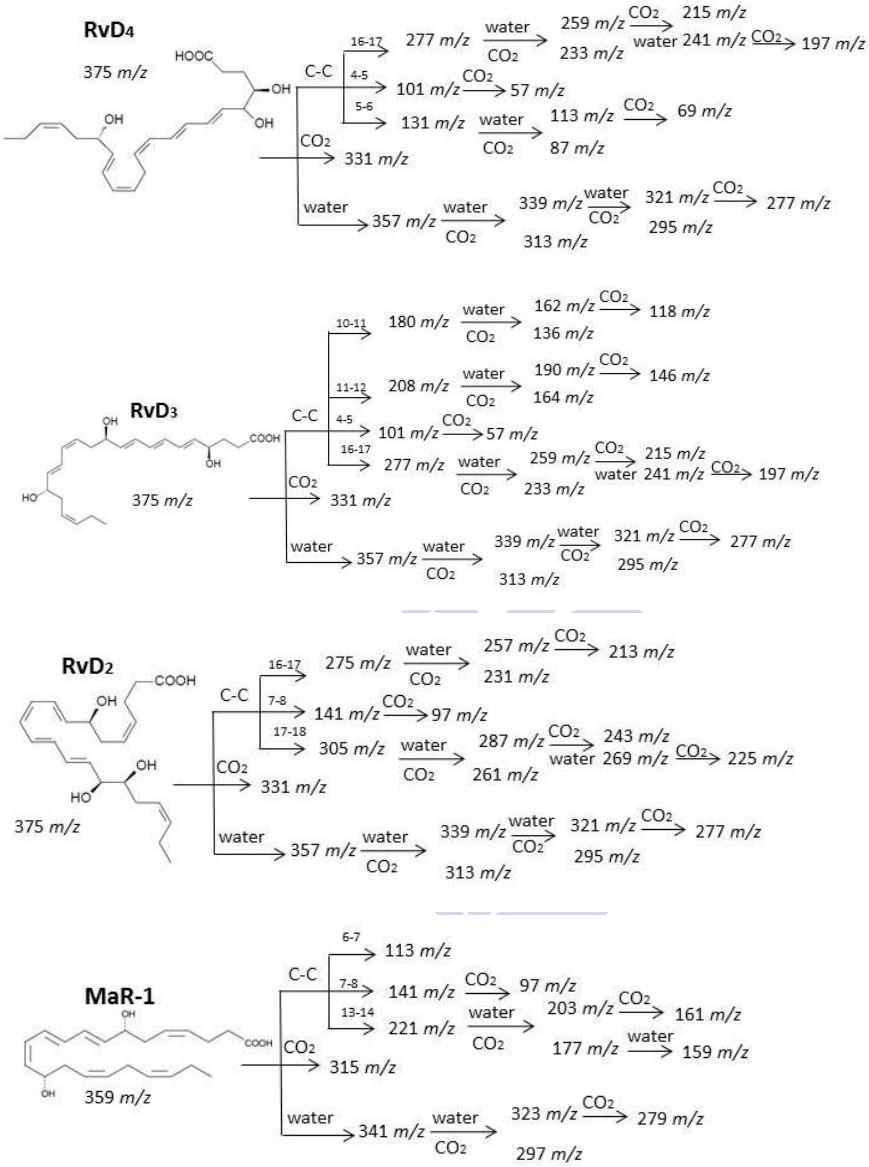

PGD2
351 m/z
271
189
203
233
315
Rel. Int (%)
m/z, amu
α-hydroxy
251 m/z
C-C
221 m/z 203 m/z
water
333 m/z
315 m/z
CO2
271 m/z
233 m/z
189 m/z

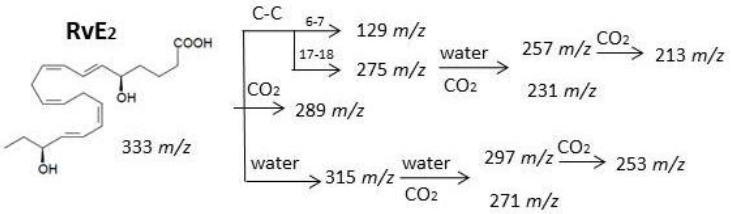

PGF3α
351 m/z
307
351
193
245
209
171
219
238
253
289
181
297
Rel. Int. (%)
m/z, amu
α-hydroxy
253 m/z
CO2
307 m/z
water
333 m/z
315 m/z
C-C
209 m/z
289 m/z
237 m/z
193 m/z
271 m/z
217 m/z
H2
171 m/z


PGB3
331 m/z
α-hydroxy
235 m/z
CO2
H2
189 m/z
C-C
223 m/z 202 m/z
water
313 m/z
CO2
269 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu

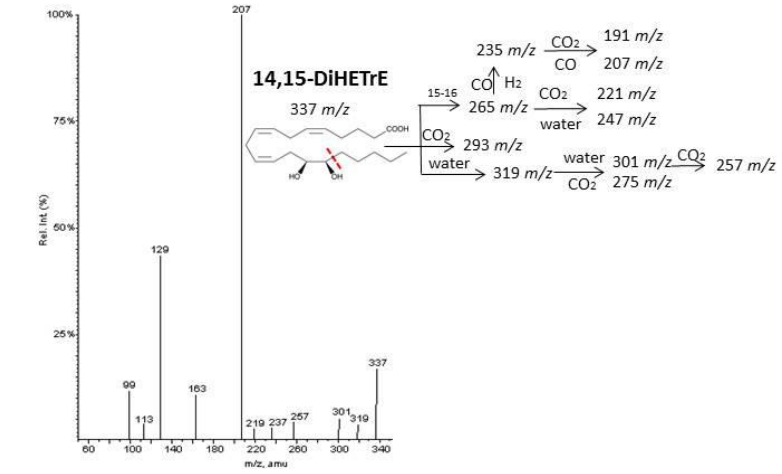

PGA3
331 m/z
α-hydroxy
235 m/z
CO2
H2
189 m/z
C-C
223 m/z 202 m/z
water
313 m/z
CO2
269 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu

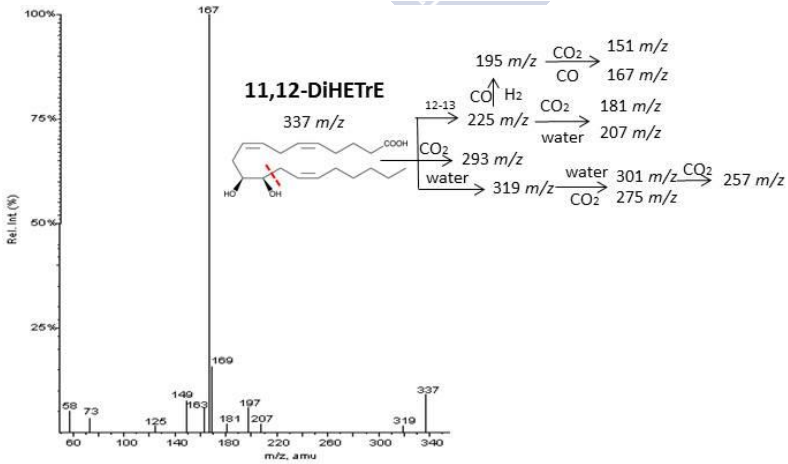
Capítulo 6 – S4: Possible fragments for identification of RvD_2, RvD_3, RvD_4, RvE_2, and MaR-1.

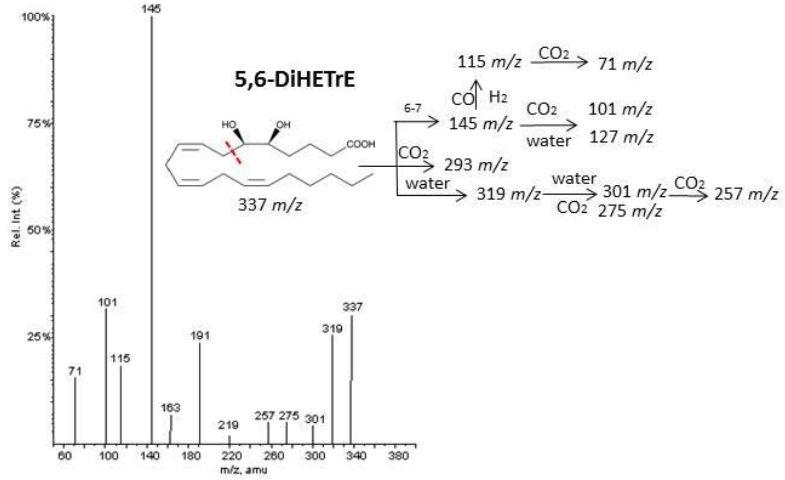


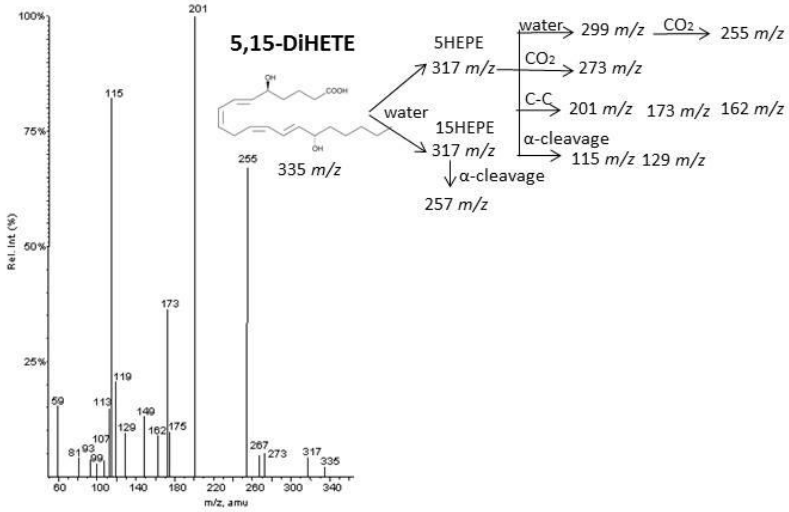


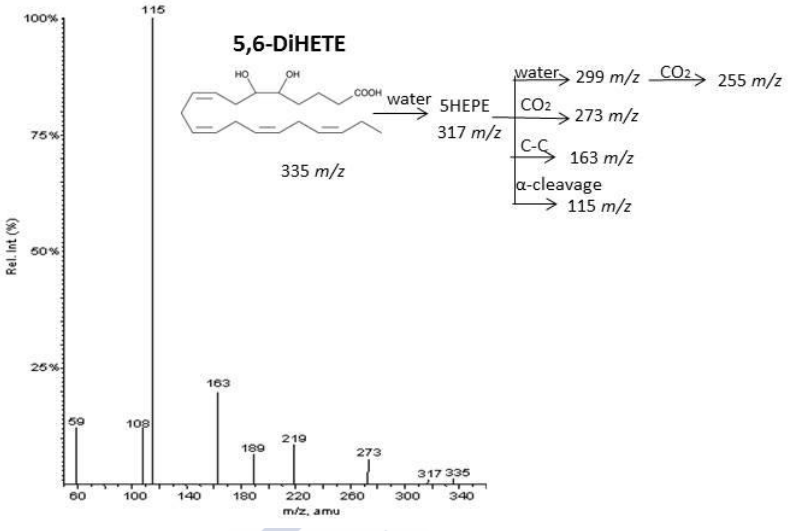
Capítulo 6 – S5: Fragmentation pattern suggested for LxB_4 (product ion spectra at 351 *m/z* (546)), and several DiHETEs and DiHETrEs (product ion spectra at 335 and 337 *m/z* obtained from *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI). MS/MS spectra was not found for LxA_5, 8,15-DiHETE, 14,15-DiHETE, and 17,18-DiHETE; thus, possible fragments for identification were suggested based on lipid structure.

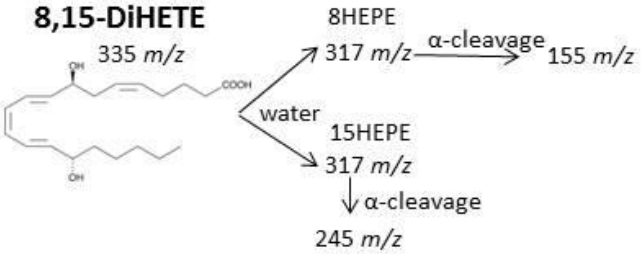


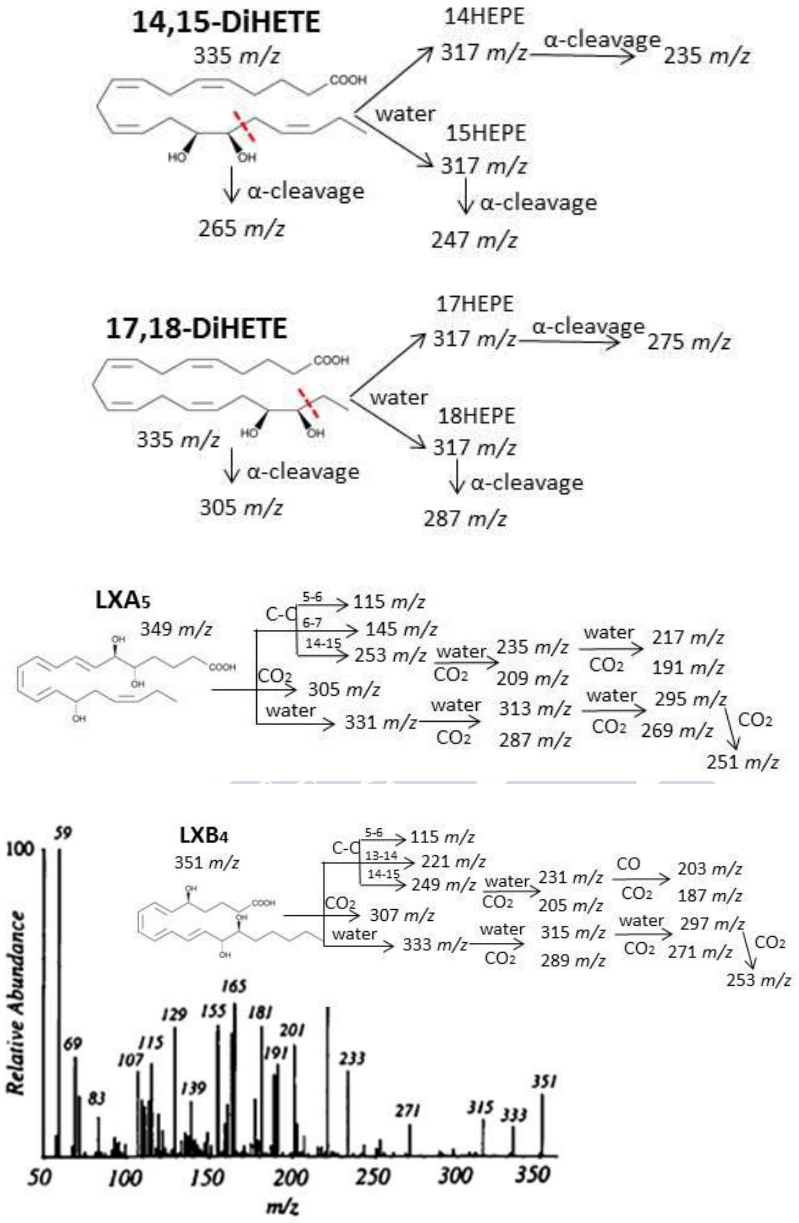



5,6-DiHETrE
337 m/z
115 m/z
71 m/z
CO
H2
6-7
145 m/z
101 m/z
127 m/z
293 m/z
319 m/z
301 m/z
275 m/z
257 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu

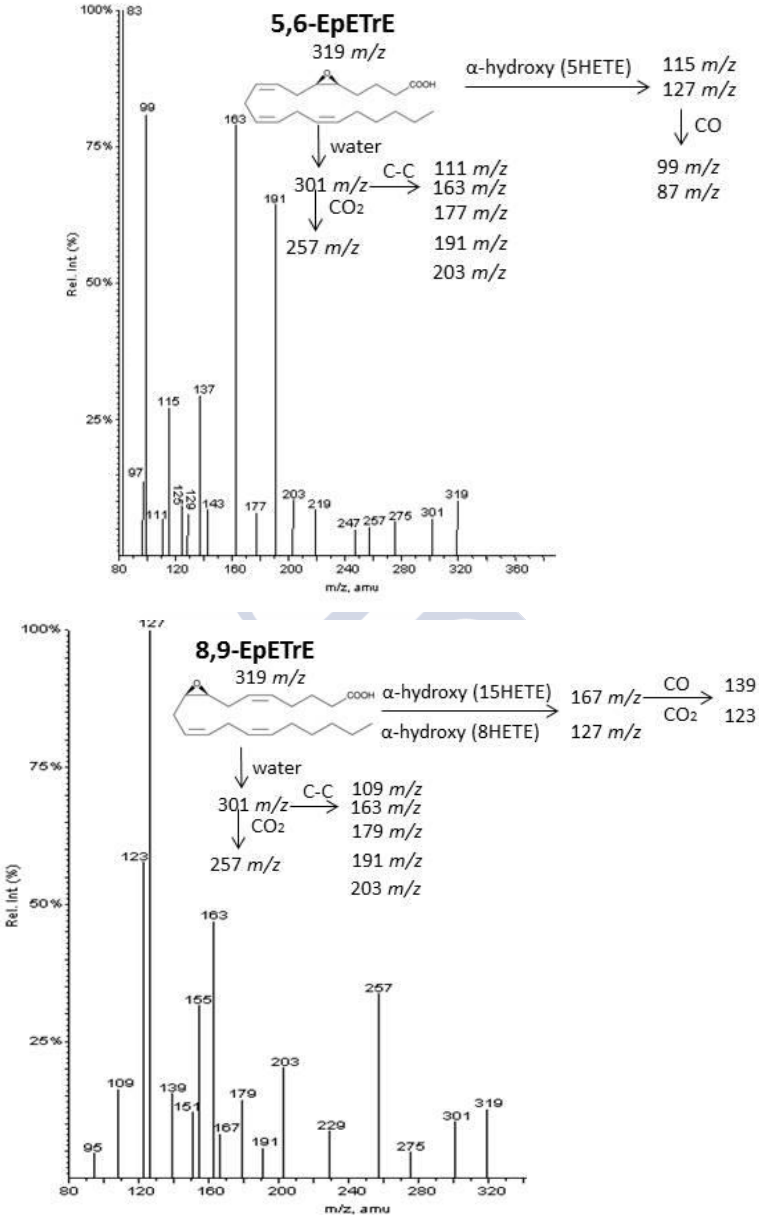

5,15-DiHETE
335 m/z
5HEPE
317 m/z
299 m/z
255 m/z
273 m/z
201 m/z
173 m/z
162 m/z
15HEPE
317 m/z
115 m/z
129 m/z
257 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu

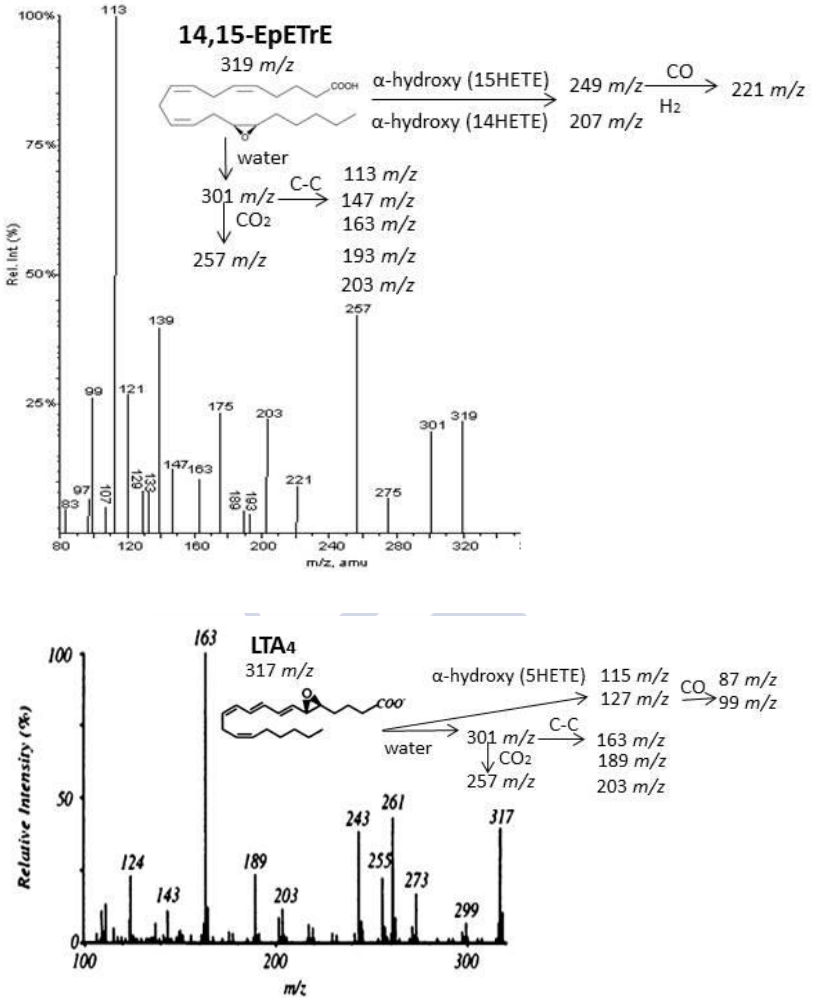

5,6-DiHETE
335 m/z
water
5HEPE
317 m/z
water
299 m/z
CO2
255 m/z
CO2
273 m/z
C-C
163 m/z
α-cleavage
115 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu
115
163
59
109
189
219
273
317 335


8,15-DiHETE
335 m/z
8HEPE
317 m/z
α-cleavage
155 m/z
water
15HEPE
317 m/z
α-cleavage
245 m/z

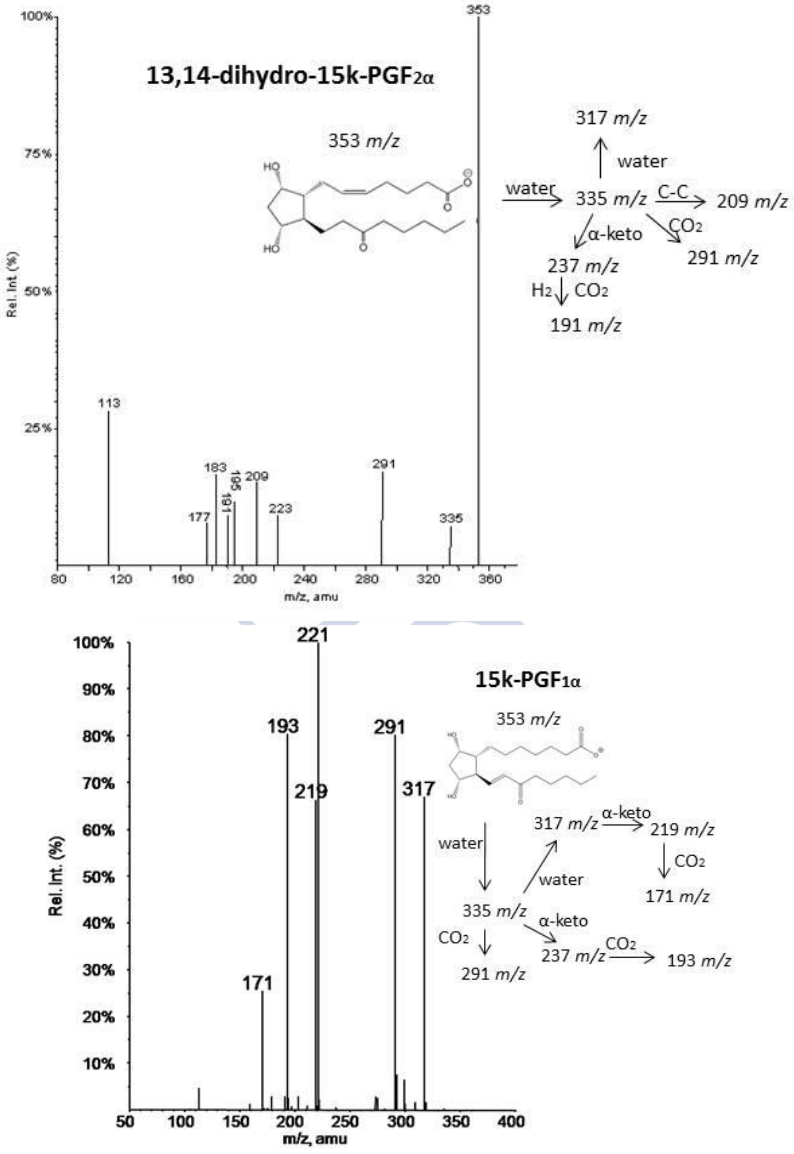


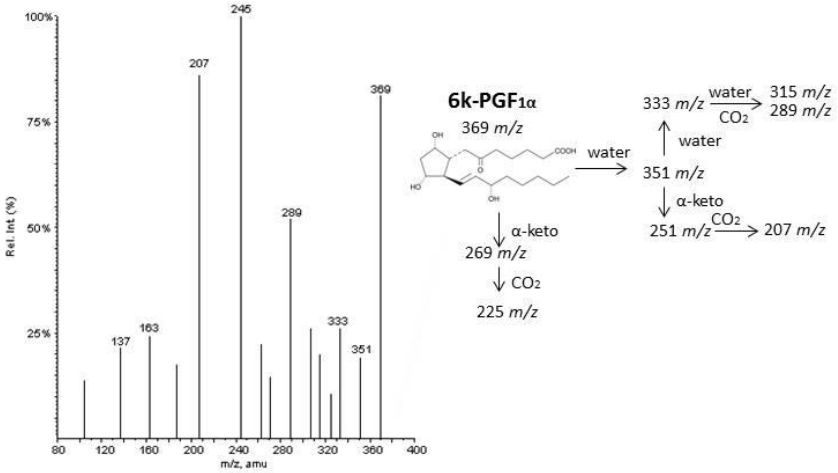
Capítulo 6 – S6: Fragmentation pattern suggested for EpETrE isomers and LTA_4. Product ion spectra at 319 *m/z* were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage, and 317 *m/z* was obtained from Murphy et al. (546).

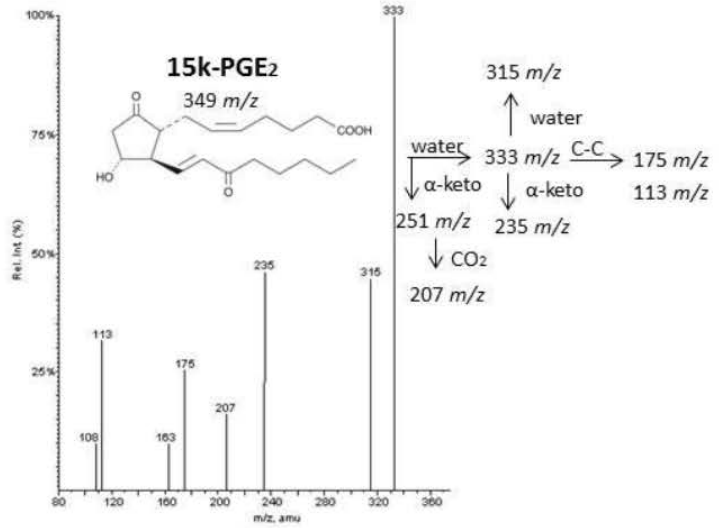

5,6-EpETrE
319 m/z
α-hydroxy (5HETE)
115 m/z
127 m/z
CO
99 m/z
87 m/z
water
301 m/z
C-C
111 m/z
163 m/z
177 m/z
191 m/z
203 m/z
CO2
257 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu
8,9-EpETrE
319 m/z
α-hydroxy (15HETE)
α-hydroxy (8HETE)
167 m/z
127 m/z
CO
CO2
139 m/z
123 m/z
water
301 m/z
C-C
109 m/z
163 m/z
179 m/z
191 m/z
203 m/z
CO2
257 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu

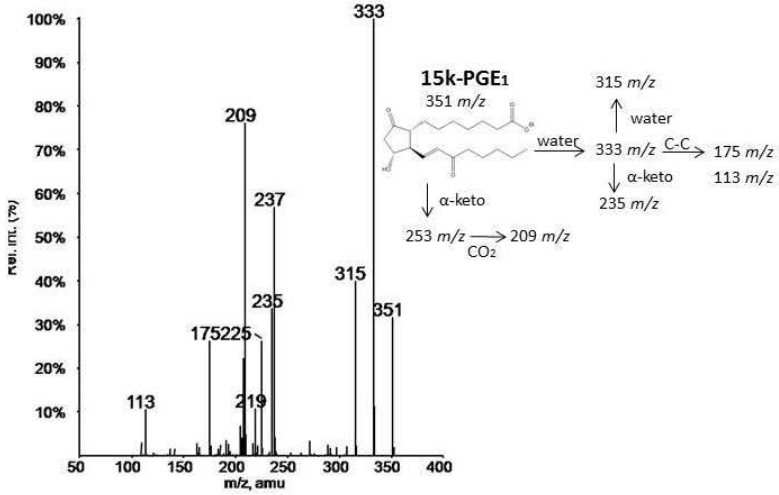


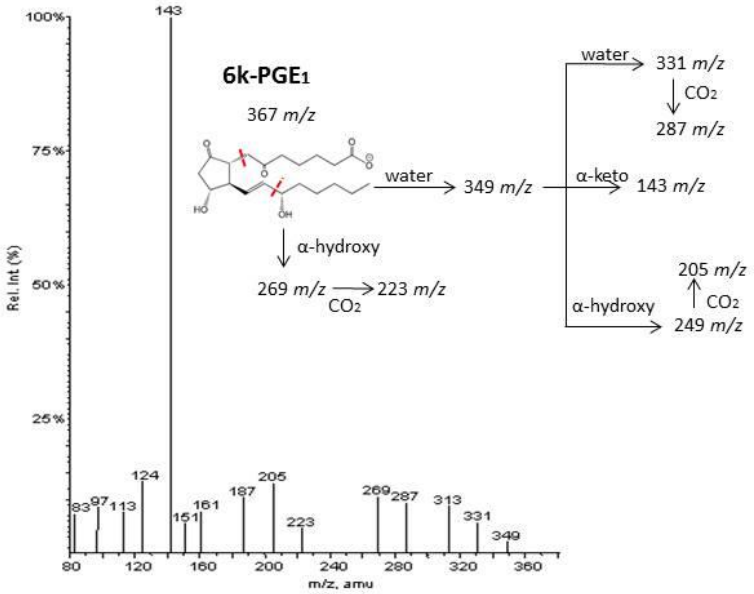
Capítulo 6 – S7: Fragmentation pattern suggested for several keto-PGs. Product ion spectra at 349 *m/z,* 351 *m/z,* 353 *m/z,* 367 *m/z,* and 369 *m/z* were obtained from database of *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI spray voltage.

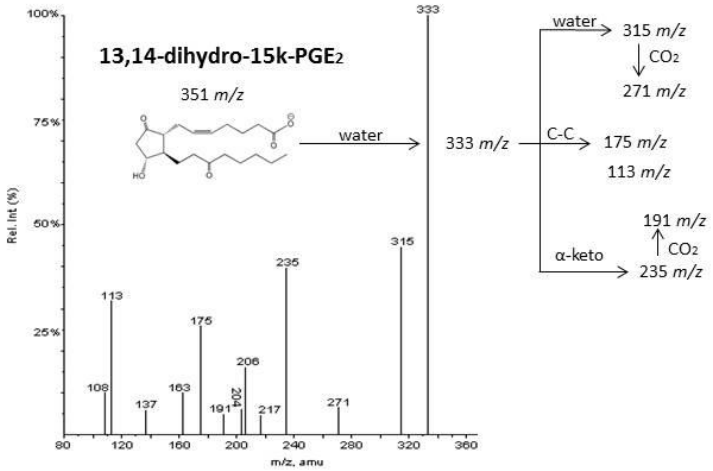

13,14-dihydro-15k-PGF2α
353 m/z
317 m/z
water
water
335 m/z
C-C
209 m/z
α-keto
CO2
291 m/z
237 m/z
H2
CO2
191 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu
15k-PGF1α
353 m/z
317 m/z
α-keto
219 m/z
CO2
171 m/z
water
water
335 m/z
α-keto
CO2
237 m/z
CO2
193 m/z
291 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu


100%
75%
50%
25%
Rel. Int. (%)
245
207
369
289
333
163
137
351
80
120
160
200
240
280
320
360
400
m/z, amu
6k-PGF1α
369 m/z
water
351 m/z
α-keto
269 m/z
CO2
225 m/z
333 m/z
water
CO2
315 m/z
289 m/z
water
α-keto
251 m/z
CO2
207 m/z


15k-PGE2
349 m/z
315 m/z
water
333 m/z
C-C
175 m/z
113 m/z
α-keto
251 m/z
235 m/z
CO2
207 m/z
Rel. Int. (%)
m/z, amu


15k-PGE1
351 m/z
315 m/z
water
333 m/z
C-C
175 m/z
113 m/z
α-keto
235 m/z
253 m/z
209 m/z
CO2
Rel. Int. (%)
m/z, amu


6k-PGE1
367 m/z
water
349 m/z
α-hydroxy
269 m/z
223 m/z
CO2
α-keto
143 m/z
water
331 m/z
CO2
287 m/z
α-hydroxy
205 m/z
CO2
249 m/z
Rel. Int (%)
m/z, amu


13,14-dihydro-15k-PGE2
351 m/z
water
333 m/z
C-C
175 m/z
113 m/z
α-keto
235 m/z
water
315 m/z
CO2
271 m/z
191 m/z
CO2
Rel. Int (%)
m/z, amu

Capítulo 6 – S8: Fragmentation pattern suggested for TXB_2 and TXA_2. The product ion spectrum at and 369 *m/z* was obtained from *lipidmaps* at CID 30V and -4500 ESI. Characteristic MS/MS transitions were suggested for TXA_2 based on lipid structure.