



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Análisis de ácidos grasos nitrados en leche bovina

Joaquín Barbeito

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

11-2023

Análisis de ácidos grasos nitrados en leche bovina

Tribunal:

Dr. Matias Moller

Dr. Horacio Heinzen

Dra. Caterina Rufo

Dr. Andrés Trostchansky, Director

Análisis de ácidos grasos nitrados en leche bovina

Joaquín Barbeito, Mag.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química,
Universidad de la República

2023

DIRECTOR: Dr. Andrés Trostchansky¹

**(1. Laboratorio de Bioquímica Oxidativa de Lípidos,
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad de la República)**

Los ácidos grasos nitrados (NO_2 -FAs) son productos de oxidación formados de la reacción entre los ácidos grasos (FA) insaturados y especies reactivas del nitrógeno, por ejemplo dióxido de nitrógeno (NO_2), derivados del metabolismo celular o de procesos como la inflamación. Los NO_2 -FAs, principalmente los nitroalquenos, son compuestos electrofílicos que median acciones de señalización complejas con efectos fisiológicos citoprotectores, antiinflamatorios y metabólicos. En los mamíferos, los niveles endógenos de NO_2 -FAs se encuentran en sangre y tejidos a concentraciones nanomolares. Sin embargo, actualmente se desconoce si la leche bovina, fuente alimenticia relevante de ácidos grasos poliinsaturados, también contiene endógenamente NO_2 -FAs electrofílicos. La hipótesis del presente trabajo se basa en que la leche vacuna contiene concentraciones micromolares de ácido nitrolinoleico conjugado (NO_2 -cLA). La hipótesis se postula dada la presencia de una alta concentración relativa de ácido linoleico conjugado (cLA) en la leche vacuna, el cual es reconocido como uno de los principales ácidos grasos endógenos susceptibles de reaccionar con especies reactivas del nitrógeno, tanto in vitro como in vivo, generando NO_2 -cLA. El objetivo general de esta tesis de maestría fue aplicar técnicas analíticas basadas en diferentes y sucesivos métodos de extracción lipídica y espectrometría de masas, para demostrar formalmente que la leche bovina contiene endógenamente ácido nitro-linoleico conjugado (NO_2 -cLA). Se utilizaron muestras de leche obtenidas por la Facultad de Agronomía (Paysandú, Plataforma EEMAC) e INIA-La Estanzuela

(Colonia; Plataforma LE) en forma controlada y estandarizada. Se analizaron muestras de animales de diferentes razas y en diferentes estados metabólicos de acuerdo al período de lactancia de los animales. Las muestras de leche fueron procesadas para extraer ácidos grasos utilizando $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$ y $\text{NO}_2\text{-SA}$ como estándares internos. El análisis cuantitativo se realizó en un espectrómetro de masa QTRAP 4500 y los softwares Analyst 1.6.1, MultiQuant, LipidViewer y GraphPad 8.0. Los resultados obtenidos permitieron detectar $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en la leche de este grupo de animales en el rango de 0.013-1.6 mg/L correspondiente a 0.4-4.8 μM . El análisis comparativo de cLA y de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en muestras individuales de leche permitió establecer que hasta el 2.7% del cLA lácteo se encuentra nitrado. Sin embargo, mientras que más del 97% de cLA estaba esterificado en forma de triglicéridos y fosfolípidos, la gran mayoría del $\text{NO}_2\text{-cLA}$ se encontró como ácidos grasos libres no esterificados. Este resultado sugiere que la incorporación enzimática de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ a triglicéridos y fosfolípidos no es óptima y apoya la hipótesis de que el $\text{NO}_2\text{-cLA}$ lácteo se podría estar formando en el tracto digestivo, en particular en los compartimentos ácidos. Los niveles de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en la leche bovina variaron significativamente con el período de lactancia para diferentes genéticas bovinas NZ y USA, en algunos casos con niveles más altos al comienzo de la lactancia. Para confirmar que el $\text{NO}_2\text{-cLA}$ detectado en la leche por MS correspondía a un ácido graso nitrado electrofílico, se realizó un ensayo de reactividad con el nucleófilo β -mercaptoetanol (BME). De esta manera se demostró la formación de aductos reversibles covalentes que confirman el $\text{NO}_2\text{-cLA}$ como nitroalqueno. En condiciones gástricas ácidas en presencia de nitrito (NO_2^-), se produjo un aumento significativo en los niveles de $\text{NO}_2\text{-cLA}$, lo que sugiere que el $\text{NO}_2\text{-cLA}$ de la leche puede originarse, al menos en parte, a partir de nitración de cLA en el tracto digestivo. En resumen, mostramos por primera vez que la leche contiene concentraciones micromolares de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ endógeno. Teniendo en cuenta que en concentraciones micromolares el $\text{NO}_2\text{-cLA}$ es capaz de modular a nivel fisiológico la expresión génica antiinflamatoria y las respuestas metabólicas, nuestro hallazgo de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ presente endógenamente en la leche vacuna convierte a este ácido graso en un nutriente funcional de potencial importancia para la salud humana.

Análisis de ácidos grasos nitrados en leche bovina

Joaquín Barbeito, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de
Química, Universidad de la República

2023

DIRECTOR: Dr. Andrés Trostchansky¹

**(1. Laboratorio de Bioquímica Oxidativa de Lípidos,
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad de la República)**

Nitrated fatty acids (NO₂-FAs) are oxidation products formed from the reaction between unsaturated fatty acids (FA) and reactive nitrogen species, for example nitrogen dioxide ($\bullet\text{NO}_2$), derived from cellular metabolism or processes such as inflammation. NO₂-FAs, mainly nitroalkenes, are electrophilic compounds that mediate complex signaling actions with cytoprotective, anti-inflammatory and metabolic physiological effects. In mammals, endogenous levels of NO₂-FAs are found in blood and tissues at nanomolar concentrations. However, it is currently unknown whether bovine milk, a relevant food source of polyunsaturated fatty acids, also endogenously contains electrophilic NO₂-FAs. The hypothesis of this work is based on the fact that bovine milk contains significant concentrations of conjugated nitrolinoleic acid (NO₂-cLA). The hypothesis is postulated given the presence of a high relative concentration of conjugated linoleic acid (cLA) in bovine milk, which is recognized as one of the main endogenous fatty acids susceptible to reacting with reactive nitrogen species, both in vitro and in vivo, generating NO₂-cLA. The general objective of this master's thesis was to apply analytical techniques based on different and successive methods of lipid extraction and mass spectrometry, to formally demonstrate that bovine milk endogenously contains conjugated nitro-linoleic acid (NO₂-cLA). Milk samples obtained by the Faculty of Agronomy (Paysandú, EEMAC Platform) and INIA-La Estanzuela (Colonia; LE

Platform) were used in a controlled and standardized manner. Samples from animals of different breeds and in different metabolic states were analyzed according to the lactation period of the animals. Milk samples were processed to extract fatty acids using $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$ and $\text{NO}_2\text{-SA}$ as internal standards. Quantitative analysis was performed on a QTRAP 4500 mass spectrometer and Analyst 1.6.1, MultiQuant, LipidViewer, and GraphPad 8.0 software. The results obtained allowed detecting $\text{NO}_2\text{-cLA}$ in the milk of this group of animals in the range of 0.013-1.6 mg/L corresponding to 0.4-4.8 μM . The comparative analysis of cLA and $\text{NO}_2\text{-cLA}$ in individual milk samples allowed us to establish that up to 2.7% of dairy cLA is nitrated. However, while more than 97% of cLA was esterified in the form of triglycerides and phospholipids, the vast majority of $\text{NO}_2\text{-cLA}$ was found as non-esterified free fatty acids. This result suggests that the enzymatic incorporation of $\text{NO}_2\text{-cLA}$ into triglycerides and phospholipids is not optimal and supports the hypothesis that dairy $\text{NO}_2\text{-cLA}$ could be forming in the digestive tract, particularly in the acidic compartments. $\text{NO}_2\text{-cLA}$ levels in bovine milk varied significantly with the lactation period for different NZ and USA bovine genetics, in some cases with higher levels at the beginning of lactation. To confirm that the $\text{NO}_2\text{-cLA}$ detected in milk by MS corresponded to an electrophilic nitrated fatty acid, a reactivity assay was performed with the nucleophile β -mercaptoethanol (BME). In this way, the formation of reversible covalent adducts was demonstrated that confirm $\text{NO}_2\text{-cLA}$ as a nitroalkene. Under acidic gastric conditions in the presence of nitrite (NO_2^-), there was a significant increase in $\text{NO}_2\text{-cLA}$ levels, suggesting that $\text{NO}_2\text{-cLA}$ in milk may originate, at least in part, from nitration of cLA in the digestive tract. In summary, we show for the first time that milk contains micromolar concentrations of endogenous $\text{NO}_2\text{-cLA}$. Taking into account that in micromolar concentrations $\text{NO}_2\text{-cLA}$ is capable of modulating at a physiological level anti-inflammatory gene expression and metabolic responses, our finding of $\text{NO}_2\text{-cLA}$ endogenously present in bovine milk converts this fatty acid into a functional nutrient of potential importance for human health.

Índice

Antecedentes.....	10-44
• Principales nutrientes en la leche bovina.....	10
• Ácido linoleico conjugado (cLA) y biosíntesis.....	13
• Funciones biológicas del cLA.....	16
• Ácidos grasos nitrados y significación funcional.....	22
• Métodos de análisis de FA y NO ₂ -FA.....	28
• Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)..	34
Hipótesis y objetivos.....	45-46
Materiales y Métodos.....	47-55
Resultados	56-67
Discusión.....	68-74
Conclusiones y perspectivas.....	75-76
Referencias.....	77-90

Lista de abreviaturas.

Ácido eicosapentaenoico (EPA)

Ácido linolénico (LN)

Holando de origen americano (USA)

Holando de origen Neozelandés (NZ)

Dioxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$)

Óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)

Nitrito (NO_2^-)

Extracción líquido-líquido (LL)

Fosfolipasa A2 (PLA2)

Extracción en fase sólida (SPE)

Espectrometría de masas (MS)

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Ionización por electrospray (ESI)

Cromatografía líquida (LC)

Potencial de desagrupamiento (DP)

Potencial de entrada (EP)

Energía de colisión (CE)

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Fragmentación inducida por colisión (CID)

Reacción de monitoreo múltiple (MRM)

Disociación por captura de electrones (ECD)

Disociación por transferencia de electrones (ETD)

Reacción de monitoreo único (SRM)

Ácidos grasos nitrados ($\text{NO}_2\text{-FAs}$)

Nitro ácido linoleico conjugado ($\text{NO}_2\text{-cLA}$)

Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

Ácidos grasos libres (FFA)

Ácido oleico (OA)

Metanol(MeOH)

Acetonitrilo (ACN)

4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD)

Triacilglicéridos (TAG)

β -mercaptoethanol(BME)

Ácido linoleico conjugado (cLA)

Ácido linoleico (LA)

Ácido esteárico (SA)

Ácido vaccénico (VA)

Cromatografía en capa fina (TLC)

Antecedentes

La leche bovina es un alimento considerado de alto valor nutritivo, con buen equilibrio de macronutrientes. De acuerdo a datos del Instituto Nacional de la Leche (1), el consumo de leche en Uruguay ronda en 230 litros de leche per cápita, más del doble del consumo medio mundial. Se estima que en Uruguay se ordeñan 2.000 millones de litros de leche anuales, los que permitirían alimentar a más de 20 millones de personas en base a una taza de leche diaria.

Las propiedades físico-químicas de la leche han sido bien estudiadas (2–4). La leche bovina es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases, i) una solución en la cual minerales así como los glúcidos se encuentran disueltos en el agua, ii) una suspensión de sustancias proteicas; iii) una emulsión formada por la grasa, proteínas y sales como el calcio. Las moléculas de caseína (80% de las proteínas de la leche) interaccionan entre sí, con lípidos y con sales formando una dispersión coloidal que consiste en partículas esféricas llamadas micelas con un diámetro que suele variar entre 60 a 450 nm. Además de esta complejidad fisicoquímica, la composición de la leche tiene una naturaleza dinámica, y la composición varía con la etapa de lactancia (estado metabólico del animal), la edad, la raza, la nutrición, el balance energético y el estado de salud de la ubre (5–8).

Principales nutrientes en la leche bovina

La leche de vaca es un alimento básico en la alimentación humana con un contenido equilibrado de macronutrientes y una excelente relación entre la calidad nutricional y el aporte energético. Si bien la composición puede variar en función de la alimentación de la vaca, el valor nutricional medio por cada 100 mL de leche entera es de 3,8 g de grasa, 3,1 g de proteína y 4,7 g de carbohidratos, aportando aproximadamente 66 kcal/100 mL. La leche y sus derivados son una de las principales fuentes de calcio en la población. También es fuente de vitaminas B1, B2, B3, B12, A, D y E. La composición grasa de la leche está representada mayoritariamente por triglicéridos

incluyendo ácidos grasos de cadena corta y media fácilmente digeribles, fosfolípidos y lípidos insaponificables, entre los que destacan el colesterol, carotenoides y cLA (9).

La proteína de la leche bovina tiene un alto valor biológico y biodisponibilidad, por lo que la leche es una buena fuente de aminoácidos esenciales. Además, la leche contiene una amplia gama de proteínas con actividades biológicas incluyendo péptidos antimicrobianos, factores de crecimiento, hormonas, enzimas, anticuerpos y estimulantes inmunitarios. El contenido de caseína de la leche representa alrededor del 80% de las proteínas de la leche, seguida por también proteínas del tipo globulares (principalmente beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina y albúmina bovina) más hidrosolubles que la caseína. (2,10)

La leche contiene muchos minerales, vitaminas y antioxidantes (11). Los antioxidantes más importantes de la leche son las vitaminas liposolubles E y A y derivados del selenio. Los antioxidantes tienen un papel en la prevención de la oxidación de la leche y también pueden tener efectos protectores en la célula productora de leche en la ubre.

Lípidos

Las grasas y los lípidos de la leche bovina juegan un papel crucial en la leche de vaca, ya que contribuyen a su sabor, textura y valor nutricional. Se consideran como una parte importante de una dieta sana y equilibrada. La grasa de la leche contiene ácidos grasos esenciales incluyendo omega-3 y omega-6, que son esenciales para la función cerebral, la salud ocular y la función del sistema inmunológico (9). Los lípidos en la leche de vaca también ayudan con la absorción de vitaminas liposolubles como las vitaminas A, D, E y K.

La cantidad de grasa en la leche puede variar según la especie animal, la raza, la dieta y otros factores (12). Los principales lípidos de la leche son los triglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol. Los triglicéridos son los lípidos más abundantes en la leche y constituyen alrededor del 98% del contenido total de lípidos. Están compuestos por

tres ácidos grasos y una molécula de glicerol. El colesterol está presente en cantidades muy pequeñas en la leche, normalmente menos del 0,5 % (9,13).

Los fosfolípidos y glicoesfingolípidos representan aproximadamente el 1% de los lípidos totales de la leche y son importantes para la estructura y función de las membranas celulares (3). Estos lípidos contienen cantidades relativamente mayores de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que los triacilgliceroles. Tienen papeles funcionales en la digestión, en el epitelio del tracto digestivo, diferenciación celular, proliferación, reconocimiento inmunitario y señalización transmembrana. Además, algunos glicoesfingolípidos tienen efecto sistémico y desempeñan un papel importante en el desarrollo del cerebro neonatal.

Ácidos grasos de la leche. De acuerdo con el estándar de referencia, la leche contiene alrededor de 33 g de lípidos totales/L (12). Los triacilgliceroles, que representan alrededor del 95% de la fracción lipídica, están compuestos por ácidos grasos de diferente longitud (4–24 átomos de carbono) y grado de saturación. Los ácidos grasos libres (FFA) representan menos del 0,5 % de los lípidos totales de la leche (12).

Ácidos grasos saturados. Más de la mitad de los ácidos grasos de la leche son saturados, lo que representa alrededor de 19 g/L de leche entera, incluyendo ácidos grasos de cadena corta (hasta 10 átomos de carbono), media (12-16 átomos de carbono) y larga (mayor o igual a 18 átomos de carbono). Entre ellos se destaca en importancia para la salud, el ácido butírico (4:0), reconocido como modulador metabólico, antiinflamatorio y preventivo del cáncer. También los ácidos caprílico y cáprico (8:0 y 10:0) y láurico (12:0) tienen actividades biológicas beneficiosas, incluyendo la inhibición de la enzima ciclooxigenasa I y II (14–17).

Ácidos grasos insaturados. El ácido oleico (18:1c9, OA) es el ácido graso mono-insaturado de la leche que se encuentra en mayor abundancia, con una alta concentración relativa de aproximadamente 8 g/litro en leche entera. En consecuencia,

la leche y los productos lácteos juntos con el aceite de oliva contribuyen sustancialmente a la ingesta dietética de OA en muchos países. El OA se considera favorable para la salud, ya que las dietas con altas cantidades de ácidos grasos monoinsaturados reducen las concentraciones plasmáticas de colesterol, LDL-colesterol y triacilglicéridos (18).

La concentración de PUFA en la leche es de aproximadamente 2 g/L. Los PUFA mayoritarios son el LA (18:2 omega-6) y alfa-linolénico (18:3 omega-3). Estos ácidos grasos en el cuerpo humano pueden convertirse en ácidos grasos con 20 átomos de carbono, actuando como precursores del ácido araquidónico (AA, 20:4 omega-6) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 omega-3) (19). A su vez, estos actúan como precursores de eicosanoides, compuestos de gran importancia en fisiología y patología.

Ácido linoleico conjugado (cLA) y biosíntesis

El precursor biosintético del cLA, el ácido linoleico (LA), un ácido graso dietético esencial, contiene 18 átomos de carbono con dos enlaces dobles no conjugados (C18:2) (Figura 1A). cLA es un término que se utiliza para designar una mezcla de diversos isómeros geométricos y posicionales del LA, con enlaces dobles conjugados. Se han identificado 20 isómeros de cLA, pero la forma cis 9-trans 11 (9c, 11t) (Figura 1B y 1C), también conocido como "ácido ruménico", es la forma natural más común de cLA. También se ha identificado el isómero trans 10-cis 12 (10t, 12c) (Figura 1C). El cLA fue aislado e identificado por primera vez en los años 80 por el Dr. Michael Pariza como un producto con actividad anticancerosa (20,21).

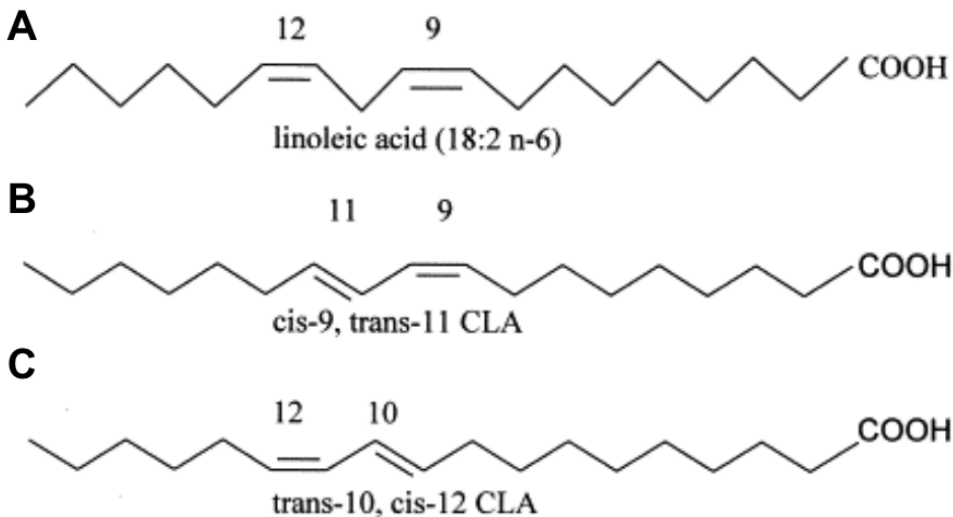


Figura 1. Principales isómeros de LA (A) y cLA (B y C).(22).

Los isómeros de cLA más abundantes en los alimentos son cis-9, trans-11 18:2 y trans-10, cis-11 18:2. Los productos lácteos, la carne bovina y de cordero son las principales fuentes dietéticas de cLA, con predominio del isómero cis9, trans-11 del cLA (9c,11t-cLA) (23). Es de destacar que es el isómero de cLA más abundante en la leche bovina (24). cLA son compuestos estables, que no se destruyen por el almacenamiento o el procesamiento de los alimentos.

El cLA está presente en triacilgliceroles, fosfolípidos y lipoproteínas endógenas. Los diferentes isómeros del cLA se pueden considerar como una nueva familia de ácidos grasos poliinsaturados desde el punto de vista metabólico. Mientras que algunos isómeros de cLA se metabolizan como el LA, los dos isómeros principales, 9c,11tr- y 10tr,12c-18:2, muestran diferencias. Por ejemplo, el isómero 9c,11tr-18:2 da lugar al isómero conjugado 20:3, mientras que el 10tr,12c-18:2 se metaboliza a las formas conjugadas 16:2 y 18:3 (25).

El contenido de 9c,11t-cLA en la leche varía considerablemente, pero puede constituir alrededor del 0,6 % de la fracción grasa. Los mecanismos por los cuales el cLA podría afectar el metabolismo graso y la inflamación son parcialmente conocidos. El cLA

puede competir con el AA en la reacción de la ciclooxigenasa, lo que da como resultado una concentración reducida de prostaglandinas y tromboxanos en la serie 2 (26). El cLA también puede modular la activación de factores de transcripción incluyendo PPAR y NF-kappa B (26,27), resultando en una disminución de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión.

El cLA ha despertado interés como nutriente beneficioso para la salud por su actividad antimutagénica y anticancerígena, pero también por sus efectos antiaterogénicos e hipocolesterolémicos y parece reducir la grasa corporal, modular la respuesta inmune y tener actividad antioxidante. La actividad biológica depende de los diferentes isómeros: por ejemplo, el isómero *9c,11tr*-cLA tiene probados efectos anticancerígenos y antiinflamatorios, mientras el *10tr,12c*-cLA regula el metabolismo graso (23,28–32). Por estas razones, en los últimos años han aparecido suplementos nutricionales conteniendo cLA, especialmente destinados a la pérdida de peso en personas obesas (20–22).

Reactividad y estabilidad del cLA. La reactividad del cLA está relacionada con su estructura química, que consiste en un sistema de dobles enlaces conjugados (dieno conjugado). Esta estructura única le confiere un alto grado de reactividad. Los dobles enlaces del cLA son susceptibles de oxidación y degradación, lo que puede dar lugar a la formación de subproductos como los NO₂-FA (Figura 3) (33,34).

La estabilidad del cLA puede variar según varios factores, incluidas las condiciones de almacenamiento, los métodos de procesamiento y la presencia de otros compuestos reactivos. En general, se considera que el cLA es relativamente estable en condiciones normales de almacenamiento y procesamiento, aunque puede ser sensible al calor, la luz y el oxígeno. La exposición prolongada a altas temperaturas, luz o aire puede causar que el cLA se oxide, lo que lleva a la formación de productos de degradación que pueden afectar negativamente sus propiedades nutricionales y funcionales. El cLA en su conjunto se oxida rápidamente y más del 80 % se degrada en 110 h en aire a 50 °C. A su vez, los isómeros *c,c*-cLA son los más inestables seguidos de los isómeros

c,t-cLA y por último los isómeros t,t-cLA los cuales son los isómeros más estables bajo las mismas condiciones experimentales, por lo que la estabilidad oxidativa del cLA no debe pasarse por alto (35). A su vez en los procesos de pasteurización con temperaturas más elevadas se puede observar un aumento de los isómeros t,t-cLA por lo que si se quiere evitar la oxidación de cLA es recomendable una pasteurización más larga pero con menor temperatura para poder conservar los mismos isómeros de cLA originales de la leche cruda (36).

Funciones biológicas del cLA

En términos de reactividad biológica, se cree que el cLA interactúa con varias vías biológicas, incluidas las involucradas en el metabolismo energético, la inflamación y la carcinogénesis. Los estudios han demostrado que el cLA es un componente importante de la leche bovina y tiene una serie de efectos beneficiosos para la salud tanto de las vacas como de los humanos. Por ejemplo, se ha demostrado que el cLA tiene efectos antiinflamatorios y antioxidantes, lo que puede mejorar la salud general y la productividad de los rumiantes (37). Además, se ha demostrado que el cLA tiene efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de los terneros recién nacidos. Los terneros alimentados con leche o sustitutos de leche con alto contenido de cLA tienden a crecer más rápido y tienen una mayor eficiencia alimenticia en comparación con los terneros alimentados con leche o sustitutos de leche con bajo contenido de cLA (16). También se cree que el cLA puede tener un papel en la protección contra ciertas enfermedades en las vacas, como la mastitis y los abscesos hepáticos. Los estudios han demostrado que alimentar a las vacas con dietas ricas en cLA puede mejorar su función inmunológica y reducir el riesgo de desarrollar estas enfermedades a nivel de la glándula mamaria o el hígado, órganos sumamente implicados en el periodo de lactancia (7,38,39).

Biosíntesis de FA en la leche. Varios componentes de la leche bovina que son de gran importancia en la nutrición humana pueden verse significativamente alterados por el régimen de alimentación (40). Uno muy importante es el contenido y la composición

lipídica, ya que los ácidos grasos de la leche bovina se derivan de dos fuentes. La primera fuente son los ácidos grasos suministrados a la ubre por la sangre, compuestos por ácidos grasos absorbidos desde el intestino y movilizados desde el tejido adiposo, principalmente ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0) y ácidos grasos de cadena más larga. La segunda fuente se deriva del acetato y butirato sanguíneos circulantes producidos durante la fermentación en el rumen (síntesis de novo), y los ácidos grasos de hasta 14 átomos de carbono se sintetizan en la ubre. A su vez, en la ubre se produce la desaturación de ácidos grasos como 12:0, 14:0, 16:0 y 18:0, generando así los productos 12:1, 14:1, 16:1 y 18:1 respectivamente (12,41).

Las enzimas de la ubre no pueden formar dobles enlaces en las posiciones omega-3 y omega-6. Consecuentemente, el contenido de LA y LnA en la leche depende del suministro de estos a la ubre. El cLA en la leche proviene de dos fuentes. Una pequeña parte se origina de la biohidrogenación incompleta del LA en el rumen que son absorbidos desde el intestino delgado transportados a la ubre e incluidos en la síntesis de grasa. Sin embargo, la mayor parte del 9c,11t-cLA es sintetizado en la ubre y proviene del VA (aprox 80-90%), el cual es un producto intermedio de la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados en el rumen. Después de la absorción y el transporte por la sangre a la ubre, una porción del VA es desaturada por la delta-9-desaturasa a cLA. Como se puede observar en la figura 2 (13), existe una estrecha correlación positiva entre el contenido de VA en la leche y el 9c,11t-cLA (42,43).

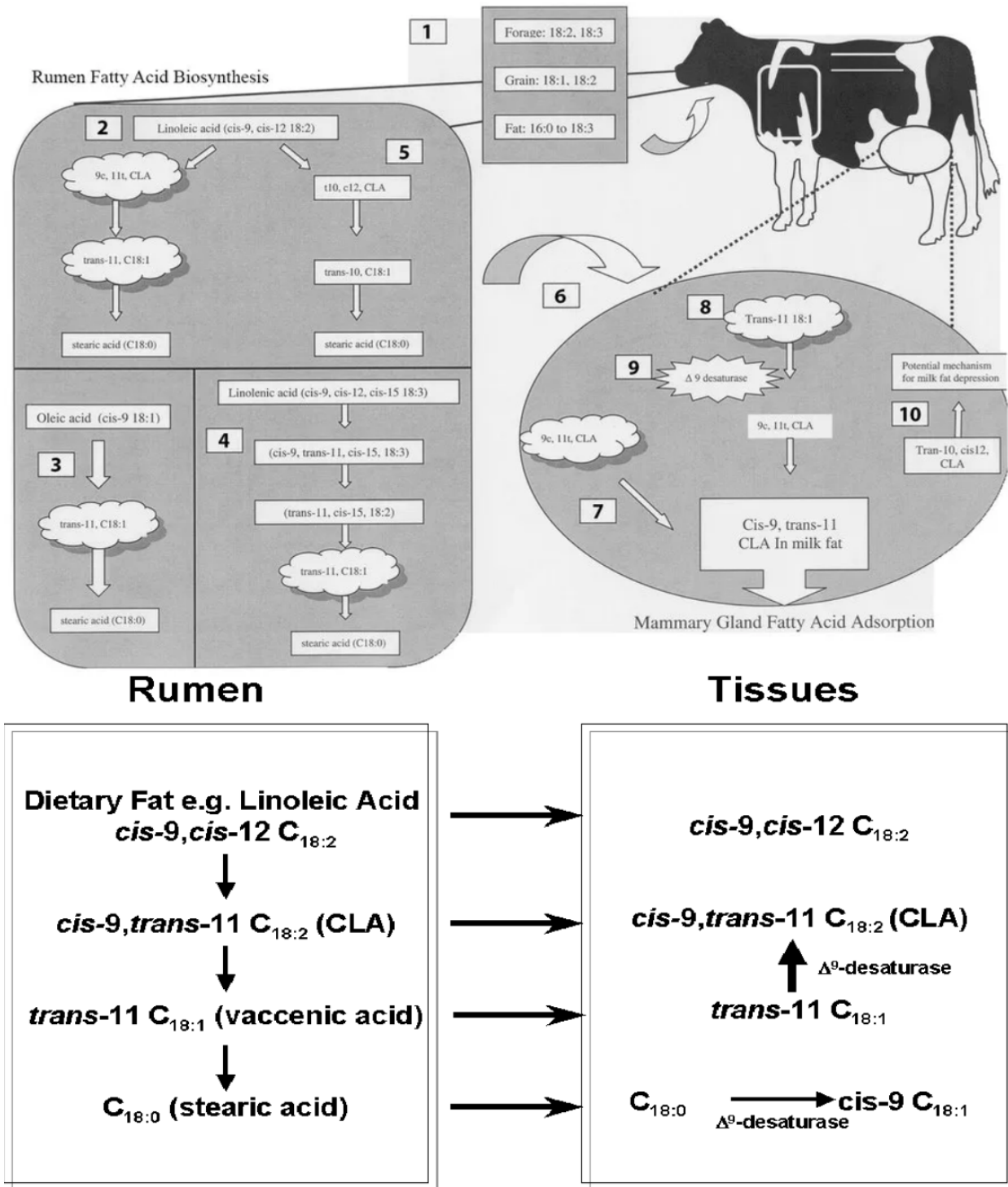


Figura 2. Distintas vías biosintéticas de cLA en bovinos a nivel del rumen y glándula mamaria. Tomado de Lock and Bauman, 2004 (13).

Biosíntesis de cLA. La biosíntesis de cLA en bovinos tiene mecanismos complejos. Las bacterias del rumen son claves para la formación de cLA, lo que explica por qué la producción de cLA es única y se encuentra casi exclusivamente en productos alimenticios de animales rumiantes. Una de las vías metabólicas de biosíntesis propuestas tiene lugar en el rumen (25). Aquí el cLA es un intermediario de la biohidrogenación del LA a ácido esteárico (SA). Estos metabolitos intermediarios son absorbidos continuamente a través del intestino delgado y se incorporan a la grasa de la leche en la glándula mamaria. Otra fuente significativa de cLA es generada por otros intermediarios de biohidrogenación y síntesis secuencial de cLA, a nivel de la glándula mamaria (25,41,44,45). La biohidrogenación de los ácidos oleico (OA), LA y linolénico (LnA) da como resultado trans-11-18:1. El trans-11-18:1 se puede convertir en 9c, 11t cLA en la glándula mamaria mediante la enzima delta 9 desaturasa tisular. Se ha estudiado la importancia de estas dos fuentes, y la biosíntesis a nivel de la glándula mamaria puede representar hasta el 70 a 80 % del cLA total que se encuentra en la leche. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el sustrato para la síntesis de cLA mamario – el ácido vaccénico (VA) - se origina principalmente en el rumen a través de la biohidrogenación microbiana. Por esta razón, el rumen es considerado la fuente primaria de producción de cLA (figura 2) (13).

Por tanto, los niveles de cLA en leche bovina van a estar fuertemente determinados por el tipo de alimentación que reciben los animales y particularmente por la naturaleza de los sustratos lipídicos (46,47). De la misma manera, los niveles de lípidos en leche y particularmente de cLA varían de acuerdo con el período de lactancia del bovino (temprano o tardío) y eventualmente entre las diferentes razas, por lo que resulta interesante considerar todas estas variables al momento de estudiar especies de ácidos grasos en la leche bovina (6,45,48).

Los ácidos grasos en los alimentos de forrajes tienden a ser altos en LA y LnA. En cambio, los ácidos grasos en los alimentos compuestos por granos tienden a ser más altos en OA y LA. Los suplementos de grasas varían en forma de aceites vegetales

(16:0, 18:1, 18:2, 18:3) a sales de calcio de grasas (16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2) y 18:3) a grasas hidrogenadas (16:0 y 18:0).

A continuación se resume el metabolismo de los principales ácidos grasos en los distintos compartimentos vinculados con el **cLA**:

- **Ácido linoleico:** Los microorganismos del rumen isomerizan el LA a cLA y gran parte de este se hidrogena a trans-11 (VA) y SA (pasos 2 y 5 de Figura 2).
- **Ácido oleico:** Recientemente, se ha demostrado que se isomeriza a varios ácidos grasos trans diferentes, antes de la hidrogenación a SA. Trans-11 18:1 (VA) es un importante isómero trans formado y un precursor de la formación de cLA en la glándula mamaria (paso 3 de Figura 2).
- **Ácido linolénico (LN):** La biohidrogenación del LN no produce cLA en el rumen. Sin embargo, trans-11 es un paso intermedio en la biohidrogenación a SA (paso 4 de Figura 2).
- **Intestino delgado:** todos los productos e intermedios de la biohidrogenación son absorbidos desde el rumen al torrente sanguíneo. Estos ácidos grasos pueden ser captados por la glándula mamaria para continuar su transformación (paso 6 de Figura 2).
- **cLA preformado:** el cLA es captado por la glándula mamaria a partir de la biohidrogenación del LA en el rumen y se puede incorporar a la grasa de la leche (paso 7 de Figura 2).
- **Captación mamaria de trans-11:** El trans-11 18:1 (VA) es captado por la glándula mamaria, el cuál se forma por biohidrogenación de OA, LA y LnA en el rumen.
- **Síntesis tisular de cLA:** una enzima mamaria, la “delta 9 desaturasa”, cataliza la inserción de un doble enlace en el carbono 9 de los ácidos grasos. El cLA se forma por la inserción de un doble enlace en el carbono 9 de trans-11 18:1. Esta vía puede representar hasta el 80 % del cLA en leche (pasos 8 y 9 de Figura 2).

Ácido trans vaccénico (VA) como precursor de cLA. El principal isómero trans 18:1 en la grasa de la leche es el VA (18:1, 11t, VA). La cantidad de VA en la grasa de la leche puede variar; constituyendo del 1,7 al 4 % del contenido total de ácidos grasos (19,69) (19). Por lo general, la concentración de VA puede ser del 2 al 4 % cuando las vacas están en pasto fresco y del 1 al 2 % cuando se alimentan en el interior. El VA tiene una doble función en el metabolismo, ya que es un ácido graso trans y un precursor del 9c,11t-cLA (67). Aproximadamente el 90 % del 9c,11t-cLA en la grasa de la leche se produce de forma endógena mediante la desaturación delta-9 del VA. A su vez el VA también se puede convertir en 9c,11t-cLA en roedores, cerdos y humanos (49–51).

Influencia de la alimentación. La estrategia de alimentación, y el genotipo del animal, constituyen componentes centrales en un sistema lechero. La producción lechera en nuestro país suele estar basada en sistemas mixtos de producción que combinan la cosecha directa por parte del animal (pastoreo) y la suplementación con reservas y concentrados (52). En este sentido, los sistemas de producción que incluyen una mayor proporción de pastura directamente cosechada en la dieta, en contraste a sistemas estabulados que se basan en el uso de reservas forrajeras y concentrados, presentan un menor costo de producción y necesidades de inversión, a la vez que tiene el potencial de presentar beneficios para la calidad de producción, bienestar animal y el impacto con el medio ambiente (53). Existen variaciones del perfil lipídico de la leche acorde a la alimentación. Por lo general, el contenido de cLA en la leche producida en pastos es al menos el doble del obtenido con la alimentación en interiores en base a granos (54,55). Esto posiciona de forma ventajosa a nivel internacional a los sistemas pastoriles de producción de leche acorde al valor lipídico (13).

Influencia del periodo de lactancia. A su vez, el metabolismo lipídico de una misma vaca lechera dependerá del período de lactancia, discriminando la lactancia temprana (+21 días del parto) de la tardía (+240 días del parto). La lactancia temprana constituye el momento más desafiante en términos metabólicos para la vaca lechera, ya que los

excesivos requerimientos energéticos de la lactogénesis no pueden alcanzarse con el consumo de materia seca y se desarrolla el balance energético negativo (56). Para responder esta demanda, el metabolismo de la vaca lechera se adapta a los requerimientos de la lactogénesis movilizándolo sus reservas corporales. Estas adaptaciones requieren un incremento y adecuado funcionamiento del metabolismo hepático, ya que el hígado es la central metabólica del animal y el principal regulador e integrador del estatus metabólico (56,57). En cambio, durante la lactancia tardía estos requerimientos energéticos no son tan exacerbados. Es reconocido que el metabolismo lipídico es diferente en estos períodos y por tanto esto se refleja en el perfil lipídico de la leche y sus derivados (6). Por lo tanto, es esperable un cambio a nivel del perfil lipídico de la leche en las dos diferentes lactancias y, posiblemente, un cambio a nivel de los ácidos grasos nitrados.

Influencia de la genética animal. Las genéticas vacunas utilizadas en esta investigación son de genotipo Holando de origen americano (USA) y origen Neozelandés (NZ). El genotipo USA es predominante en nuestro país (aprox. 80%), caracterizada por tener una capacidad de producir más litros de leche por la mayor partición de nutrientes consumidos hacia la glándula mamaria (74–76). En contraste, la literatura (58–60) sugiere que las vacas Holstein de origen neozelandés (NZ) se adaptan mejor en base pastoril que las vacas USA ya que si bien no tienen diferencias en rendimiento de sólidos, contenido proteico de la leche y persistencia de la lactancia, las de genotipo USA no lograron mantener un índice de condición corporal y variaciones de peso vivo aceptables, mientras que las NZ sí.

Ácidos grasos nitrados y significación funcional

El descubrimiento de NO₂-FAs en tejidos y fluidos de seres humanos tuvo lugar hace aproximadamente 20 años atrás, con el advenimiento de técnicas analíticas de alto poder resolutivo (61–63). Recién en el año 2012 se reconoce que el cLA nitrado es el NO₂-FAs más abundante en humanos (64).

Los NO₂-FAs se forman endógenamente a través de mecanismos no enzimáticos por la reacción de ácidos grasos conjugados con dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$), un producto de oxidación reactivo derivado de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), peroxinitrito ($\text{ONOO}^- + \text{ONOOH}$) o NO_2^- en medio ácido (ej. durante la digestión gástrica). Estudios en seres humanos y modelos animales han demostrado que los NO₂-FAs se forman en el compartimento gástrico, en sitios de inflamación y durante la isquemia-reperfusión. Mientras que el pH ácido del compartimento gástrico facilita la reacción de NO_2^- con FA derivados de los alimentos, se considera que la formación de NO₂-FAs en la inflamación e isquemia se asocia a la formación local de especies nitrantes que reaccionan con FA libres (62,65).

La presencia de dobles enlaces conjugados en la cadena de alquilo del FA es esencial para las reacciones de nitración, al aumentar significativamente la eficiencia de la reacción de nitración (Figura 3) (64). En comparación, los FA oxidados que contienen dobles enlaces no conjugados o carbonos bis-alílicos no son buenos sustratos endógenos de las reacciones de nitración. Por tanto, la evidencia en seres humanos y modelos animales concluye que reacciones de nitración endógenas ocurren principalmente en los ácidos grasos conjugados (66,67). La reacción de nitración de los FA ocurre cuando se agrega un grupo nitro a una cadena de alquilo. En condiciones biológicas la nitración ocurre por adición directa de $\bullet\text{NO}_2$ al doble enlace (Figura 3A). Esta reacción de adición es reversible y ocurre con todos los dobles enlaces produciendo un radical β -nitroalquilo. En la mayoría de las condiciones biológicas, estos radicales inestables eliminan $\bullet\text{NO}_2$ (reacción inversa) induciendo isomerizaciones cis-trans del doble enlace (Figura 3B). Sin embargo, cuando estas reacciones ocurren en lípidos que contienen dobles enlaces conjugados como el cLA, el radical inicial se estabiliza por resonancia, lo que disminuye en gran medida la velocidad de la reacción de eliminación, favoreciendo las reacciones con oxígeno y óxidos de nitrógeno (p. ej., $\bullet\text{NO}_2$ y $\bullet\text{NO}$), generando así intermediarios que se descomponen para formar nitroalquenos electrofílicos (por ejemplo, NO₂-cLA; Figura 3C).

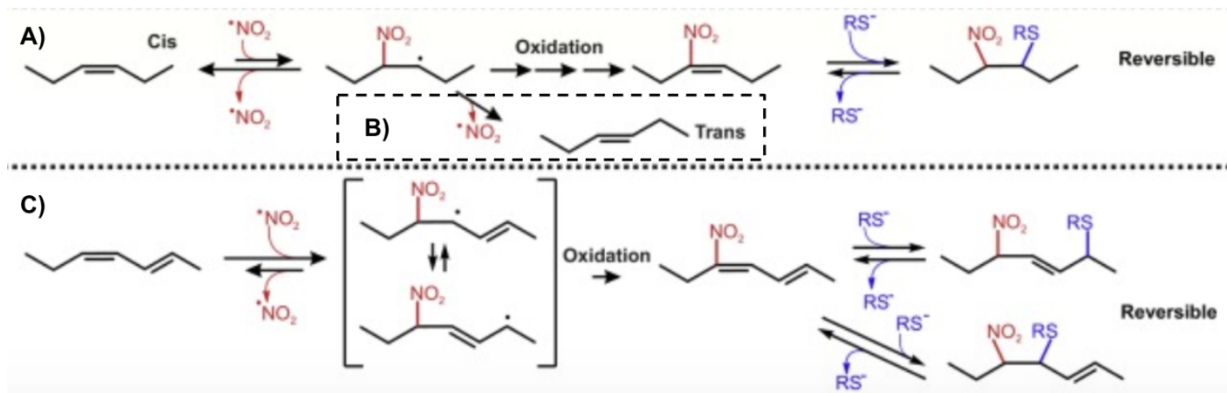


Figura 3. Reacciones de nitración de ácidos grasos que ocurren en condiciones fisiológicas o patológicas. **A)** Nitración de ácidos grasos monoinsaturados y bis-alílicos: este mecanismo de nitración es ineficiente ya que la adición inicial de $\bullet\text{NO}_2$ da como resultado un radical inestable. El intermedio radical se invierte de nuevo al alqueno con la eliminación de $\bullet\text{NO}_2$, lo que por lo general resulta en la isomerización cis-trans del doble enlace (**B**). Esta reacción produce NO_2 -FAs solo en presencia de altas concentraciones de $\bullet\text{NO}_2$. **C)** Nitración de dienos conjugados: $\bullet\text{NO}_2$ se suma al doble enlace y el radical resultante también se estabiliza por resonancia. Este radical luego se oxida para formar un NO_2 -FAs con dobles enlaces conjugados. La molécula resultante contiene dos carbonos electrofílicos, y los tioles pueden agregarse reversiblemente a través de la reacción de adición de Michael al carbono β y δ . Abreviatura: NO_2 -FA, ácido graso nitrado. Tomado de Schopfer & Kho, 2019 (68).

NO_2 -cLA. Hasta el momento, la formación y metabolismo de NO_2 -cLA en bovinos no ha sido estudiada. En seres humanos, se acepta que el NO_2 -cLA es el NO_2 -FAs endógeno más abundante. Su formación endógena fue puesta en evidencia por primera vez en un modelo murino de isquemia-reperfusión (69), su formación fue caracterizada formalmente años más tarde (64). Es importante destacar las dificultades analíticas para el estudio de NO_2 -cLA en tejidos y fluidos biológicos, debido a su naturaleza electrofílica y su particular reactividad frente a los tioles endógenos que actúan como aceptores intracelulares nucleofílicos (70). Estos incluyen glutatión y tioles de proteínas, los que alcanzarían una concentración local entre 2 mM a 50 mM (68). Por tanto, se estima que más del 99% de NO_2 -cLA celular se encuentra formando aductos

covalentes a residuos cisteína mediante reacciones de adición de Michael, lo que aumenta considerablemente las dificultades analíticas.

Por ejemplo, los niveles plasmáticos $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en individuos sanos se encuentran entre 1 nM y 3 nM (67). Sin embargo, los niveles de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ plasmático formando aductos o esterificado no han sido cuantificados con precisión en virtud de su baja estabilidad en condiciones de hidrólisis (68).

Como se esquematiza en la Figura 4, se considera que la mayor parte del $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en seres humanos, se forma en el medio ácido del estómago a partir de cLA alimentario (lácteos y carne bovina principalmente) en presencia de NO_2^- . Luego, los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ se absorben a nivel de enterocitos y aumentan la expresión de FABP4, lo que promueve un ciclo de retroalimentación positiva para las acciones de señalización descendente de este mediador (71), luego se empaquetan mayoritariamente en forma esterificada en quilomicrones que llegan a la circulación sistémica. (72). De acuerdo a experimentos de biodistribución del ácido $\text{NO}_2\text{-OA}$ marcado radiactivamente, el tejido adiposo actúa como reservorio de $\text{NO}_2\text{-FA}$, manteniendo constantes los niveles plasmáticos (65). De acuerdo con estos estudios, los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ liberados por los adipocitos se une a la albúmina del plasma uniéndose principalmente a sitios hidrofóbicos (70).

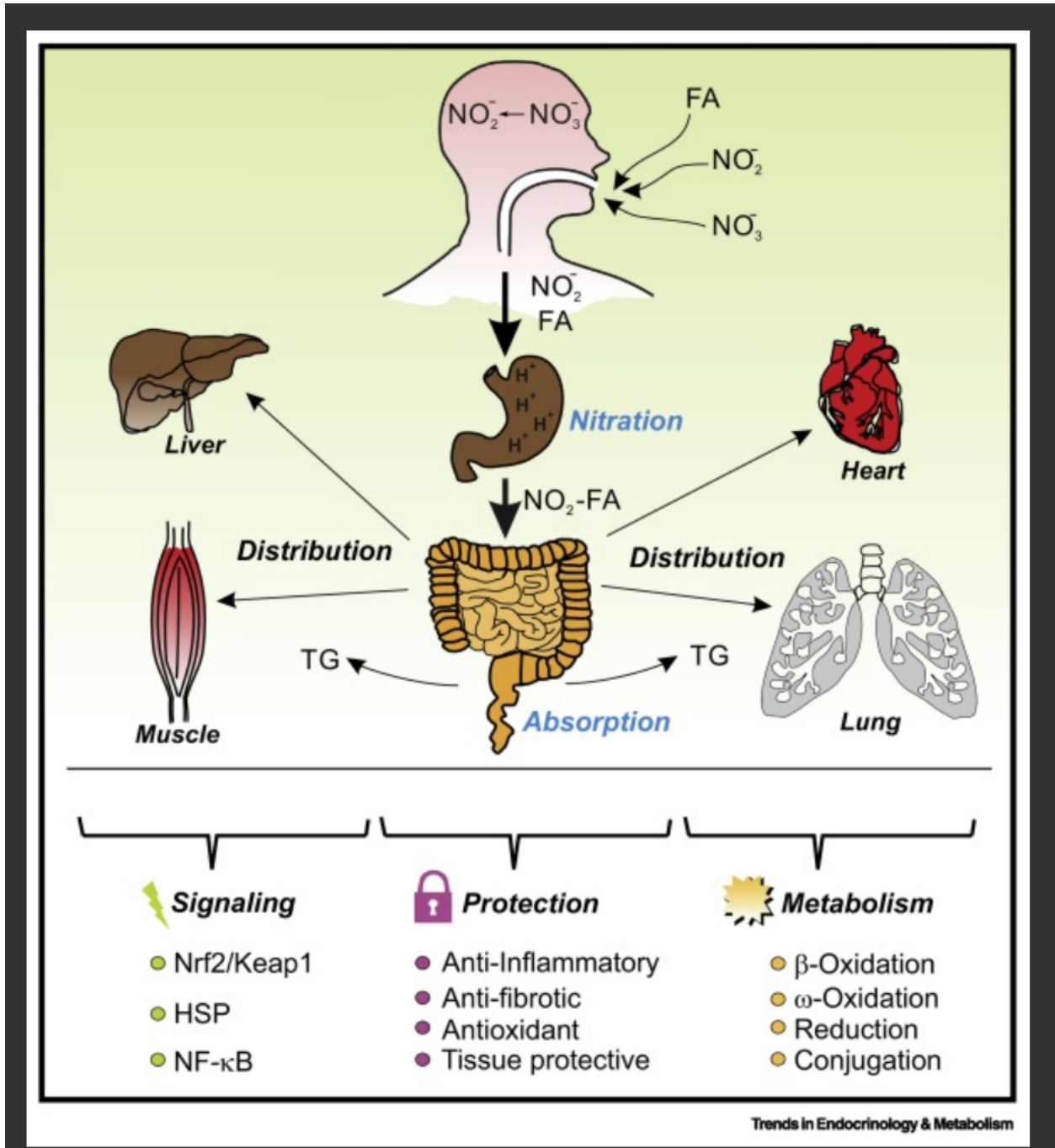


Figura 4. Esquema sobre la formación, distribución, metabolismo, señalización celular y funciones citoprotectora de NO₂-FA. Los NO₂-FAs se forman principalmente en el compartimento gástrico y, tras su absorción y distribución, ejercen efectos protectores al activar vías de señalización antioxidantes, antiinflamatorias y antifibróticas. Los NO₂-FAs son finalmente metabolizados y eliminados, al menos parcialmente, a través de la filtración renal. Abreviaturas: HSP, proteína de choque

térmico; NF-κB, factor nuclear-κB; NO₂-FA, ácido nitrograso; Keap1, proteína 1 asociada a ECH similar a kelch; Nrf2, factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar a 2; TG, triglicéridos. Tomado de Schopfer & Kho, 2019 (68).

Estos conceptos pueden ser aplicados a la absorción y distribución del NO₂-cLA. La administración oral de cLA (3 g) y 20 mg ¹⁵NO₂⁻ en seres humanos resultó en un aumento de los niveles plasmáticos de ¹⁵NO₂-cLA, llegando a 25 nM en 1h (67). Considerando que los niveles plasmáticos de NO₂-cLA en voluntarios sanos es ~1 nM, estos resultados indican que la formación y absorción de NO₂-cLA pueden ser influidos por la dieta.

Actividades biológicas y reactividad. En general, la química de los NO₂-FAs es un área activa de investigación y existe un interés creciente por comprender los mecanismos por los cuales estos compuestos ejercen sus efectos biológicos, así como su potencial como agentes terapéuticos para una variedad de enfermedades. (68,73–76). En cuanto a sus propiedades químicas, los NO₂-FAs son compuestos relativamente estables, pero pueden descomponerse con el tiempo debido a la presencia del grupo nitro altamente reactivo y de los dobles enlaces de la cadena del ácido graso. Son solubles en solventes orgánicos y generalmente tienen un alto punto de fusión debido a sus largas cadenas hidrocarbonadas (68).

Los NO₂-FAs representan una familia de moléculas derivadas de FA con dobles enlaces conjugados en la cadena de acilo graso, que cumplen varias funciones biológicas que incluyen una variedad de efectos antiinflamatorios, antitrombóticos y anti-cancerígenos, así como la capacidad de regular el tono vascular, el metabolismo glucídico, la función mitocondrial y la expresión génica (73,75,76).

Los NO₂-FAs también activan la respuesta al estrés por calor (heat shock protein), regulando así el procesamiento y plegado de proteínas (77,78). Otro blanco molecular de los NO₂-FAs es la enzima GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) que contiene la cisteína 149 susceptible de ser nitroalquilada (79). En los últimos años han mejorado las técnicas analíticas para reconocer nuevos blancos proteicos de los

NO₂-FA. Por ejemplo, la modificación de residuos cisteínas de la calcineurina por el ácido nitro-oleico (NO₂-OA) en linfocitos T aparece como un nuevo mecanismo de inmunomodulación (80). Otro estudio ha usado sondas específicas para reconocer proteínas susceptibles de nitroalquilación (81), permitiendo reconocer 184 proteínas blanco en una línea de macrófagos en cultivo, destacándose STAT3, el receptor TLR2, el receptor de retinoides RXR α y el receptor de glucocorticoides NR3C1. Estos estudios refuerzan el concepto de la actividad biológica pleiotrópica de los NO₂-FAs como moléculas reguladoras de señales celulares. En el caso de NO₂-cLA, se ha mostrado evidencia que la generación endógena del nitroalqueno así como la administración exógena ejerce una acción anti-inflamatoria en un modelo de sepsis (82). Estos efectos pueden ser explicados por la acción multifacética de NO₂-cLA a través de múltiples blancos moleculares, incluyendo disminución de la transcripción mediada por NF- κ B y activación de la transcripción mediada por Nrf2 (34,82). Estos resultados sugieren que la formación de NO₂-cLA tiene el potencial de modular procesos inflamatorios y proteger tejidos vecinos del proceso patológico. Los estudios también han demostrado que los NO₂-FAs desempeñan un papel en la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos, y los NO₂-FAs derivados de fuentes dietéticas pueden mejorar la sensibilidad a la insulina y disminuir la adiposidad en modelos animales (83,84). Además, se ha demostrado que los NO₂-FAs tienen efectos neuroprotectores en modelos de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (34,79–81,85,86).

Métodos de análisis de FA y NO₂-FA

El análisis de NO₂-FA en muestras biológicas contempla varias etapas analíticas que culminan con el análisis por HPLC-MS/MS. Sin embargo, teniendo en cuenta la posible oxidación de los NO₂-FAs a temperatura ambiente, es importante considerar aspectos como la toma de muestra, almacenamiento, extracción, separación y purificación, la eliminación de interferencias, y la detección de señal para analitos en niveles traza.

Toma de muestra y almacenamiento. El muestreo y el almacenamiento de muestras que contienen nitrolípidos son pasos críticos en el análisis de estos compuestos, ya que pueden afectar la precisión y confiabilidad de los resultados. A continuación, describiré algunas consideraciones importantes para su muestreo y almacenamiento con un enfoque en leche vacuna:

- **Muestreo:** Para obtener muestras representativas, es importante seguir los protocolos establecidos para la recolección y conservación de muestras. Por ejemplo, las muestras deben recolectarse de manera que se minimice la contaminación y almacenarse a temperaturas adecuadas para evitar la degradación u oxidación de los nitrolípidos. A su vez, las muestras deben recolectarse de la ubre y evitar el primer flujo de leche que puede contener contaminantes. También es importante mantener las muestras a una temperatura entre 4°C y 10°C para evitar el crecimiento bacteriano.
- **Almacenamiento:** Los nitrolípidos son compuestos inestables que pueden sufrir fácilmente oxidación, hidrólisis o degradación. Por lo tanto, es importante almacenar las muestras a bajas temperaturas, como en un congelador o refrigerador, y en un ambiente con exposición mínima a la luz y al oxígeno (fotooxidación). Las muestras también se pueden almacenar en un congelador a -80 °C para el almacenamiento a largo plazo.
- **Conservación:** para evitar la oxidación y degradación de los nitrolípidos durante el almacenamiento, las muestras se pueden conservar con antioxidantes como el ácido ascórbico o el tocoferol.

Pretratamiento y extracción. La extracción de NO₂-FAs de las distintas matrices biológicas es un paso importante para reducir el posible efecto de supresión iónica resultante de otros componentes de la propia matriz. Para ello se han utilizado una variedad de aproximaciones como la extracción líquido-líquido y extracción en fase

sólida (SPE). Estas técnicas remueven interferentes de la matriz en distinto grado y permiten una buena recuperación de los analitos. A su vez, las muestras de leche de vaca se deben homogeneizar para garantizar una distribución uniforme de los lípidos, así generar un muestreo reproducible y evitar la segregación durante el análisis, para esto se utilizó una técnica basada en el molino de bolas, el cual permite homogeneizar, romper o lisar muestras de cultivo de tejidos, leche, células o muestras biológicas. Funciona cargando las muestras en los tubos de polipropileno estándar y luego se colocan en un homogeneizador molino de bolas. Éste contiene pequeñas bolas metálicas que golpean vigorosamente el interior de todos los tubos y homogeneizan la muestra en minutos. Para ello, 1 mL de la muestra de leche a 37 °C fue llevada a tubos Eppendorf Safe-Lock precargados con pastillas metálicas (tubos GREEN) para la homogeneización con tiempo de 4 min, de acuerdo a instrucciones del proveedor (<https://www.nextadvance.com/>).

Los métodos de extracción de nitrolípidos se refieren al proceso de separación y purificación de nitrolípidos de matrices biológicas como la leche vacuna. Los siguientes son algunos métodos de extracción comunes y utilizados en este trabajo.

Extracción líquido-líquido (LL). Este es un método ampliamente utilizado en el que la muestra se mezcla con un solvente que extrae selectivamente los nitrolípidos y deja atrás otros componentes. Dentro de este tipo de extracción podemos encontrar distintos métodos como el método de Hexano y Blight & Dyer.

- El método de **Hexano** es un método comúnmente utilizado para la extracción de lípidos de muestras biológicas. Este método consiste en la homogeneización a alta velocidad de la biomasa con una mezcla de Hexano:Isopropanol:Ácido Acético 30:20:1 v/v con respecto al volumen de la muestra, seguidamente del agregado de 2,5 vol de hexano y se deja homogeneizar por 30 segundos haciendo uso de vórtex o agitación. Posteriormente se centrifuga a baja temperatura (2-10 °C) y finalmente se toma la fase superior para luego evaporar al vacío controlando la temperatura (<35 °C) hasta sequedad (87). Una ventaja

del método del hexano es su simplicidad y bajo costo en comparación con otros métodos de extracción de lípidos. Además, el hexano es un solvente altamente eficiente para la extracción de lípidos, lo que lo hace ideal para buenos rendimientos. (87).

- El método **Bligh & Dyer** es un método comúnmente utilizado para la extracción de lípidos de muestras biológicas. El método se basa en una extracción líquido-líquido para matrices con un alto contenido de agua. La muestra se homogeneiza a alta velocidad con metanol en una proporción de 2:1 con respecto al volumen de la muestra. Seguidamente se agrega una parte de cloroformo y se deja homogeneizar por 30 segundos haciendo uso de vortex, después se agrega una parte de agua y homogeneiza por otros 30 segundos. Posteriormente se centrifuga a baja temperatura (2-10 °C) y finalmente se toma la fase inferior para luego evaporar al vacío controlando la temperatura (<35 °C) hasta sequedad. El método de Bligh & Dyer se usa ampliamente debido a su simplicidad y eficiencia, así como a su capacidad para extraer una amplia gama de lípidos, incluidos lípidos tanto neutros como polares (88,89).

Hidrólisis enzimática. Para analizar los ácidos grasos que componen la leche es de suma importancia realizar previamente la hidrólisis enzimática generando los ácidos grasos libres a partir de triglicéridos y fosfolípidos. Se refiere al proceso de hidrolizar principalmente moléculas de triglicéridos y fosfolípidos para generar los ácidos grasos libres utilizando enzimas. Para ello es importante primero realizar una extracción lipídica así evitamos interferencias como carbohidratos y proteínas que pueden dificultar el proceso hidrolítico. Este proceso se puede llevar a cabo utilizando enzimas como lipasas y fosfolipasas, que escinden los enlaces entre los ácidos grasos y los grupos glicerol en triglicéridos y fosfolípidos. Esto da como resultado la formación de ácidos grasos libres, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, lisofosfolípidos y otros componentes lipídicos. En la hidrólisis enzimática es importante la selección del tipo de enzima, el control cuidadoso del pH, temperatura (generalmente 37 °C) y la concentración de enzimas.(90,91)

Hidrólisis enzimática con lipasas: La lipasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol como se esquematiza en la Figura 5, favorece la hidrólisis particularmente en las posiciones sn-1 y sn-3 de triglicéridos. Las condiciones óptimas generales para la actividad de la enzima lipasa suelen ser: a) pH: la mayoría de las lipasas tienen un pH óptimo entre 7 y 8, aunque puede variar según la fuente de la enzima. Es importante ajustar el pH para obtener una actividad óptima; b) Temperatura: la temperatura óptima también varía según la fuente de la enzima, pero en general se encuentra en el rango de 30 a 50°C; c) Concentración de sustrato: la actividad de la lipasa aumenta con la concentración del sustrato (triglicéridos), aunque puede haber un punto en el que la actividad se sature (90).

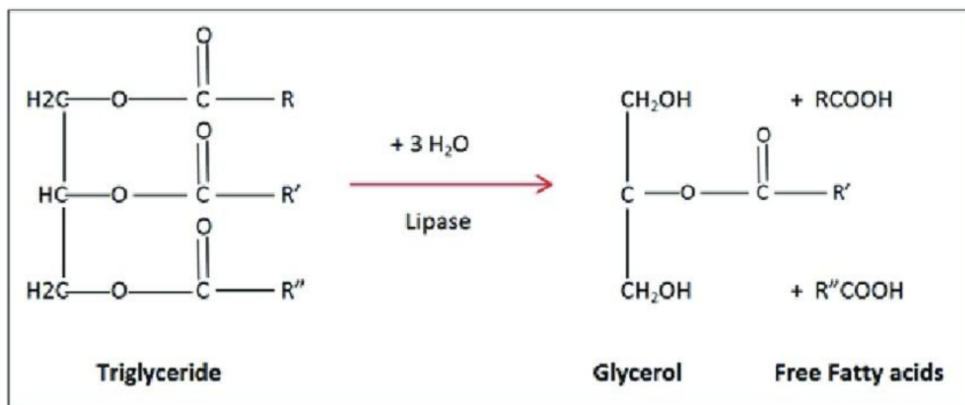


Figura 5. Hidrólisis de un triglicérido utilizando enzimas lipasas como catalizadores. Tomada de Zhou et al 2018 (92).

Hidrólisis enzimática con fosfolipasa A2. La superfamilia de fosfolipasa A2 (PLA2) consta de muchos grupos diferentes de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster sn-2 en una variedad de glicerofosfolípidos diferentes, generando como producto ácidos grasos libres y lisofosfolípidos como se muestra en la Figura 6. Las condiciones óptimas para el uso de las fosfolipasa A2 suelen ser similares a las ya mencionadas anteriormente para las lipasas (90,93).

La fosfolipasa A2 utilizada en esta maestría es una pequeña proteína de 124 residuos, rica en disulfuro y dependiente del calcio. Hidroliza el enlace β-éster de los glicerofosfolípidos zwitteriónicos. Los sustratos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y sus análogos de plasmalógeno. El fosfatidilinositol y la fosfatidilserina también se hidrolizan.

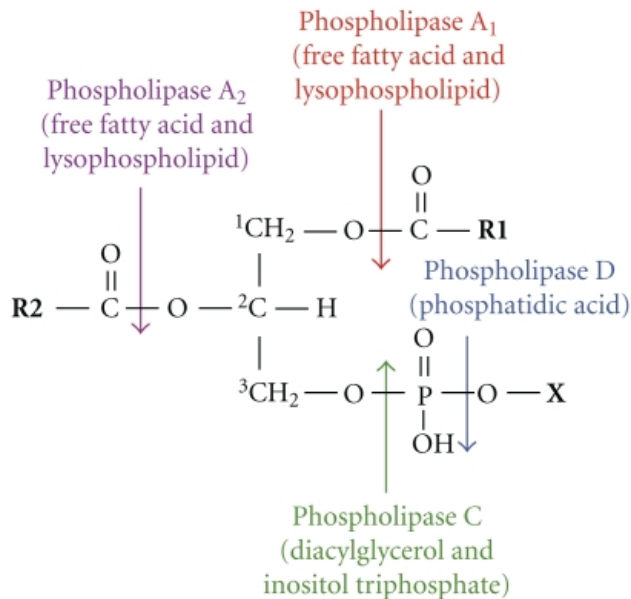


Figura 6. Sitios de corte en un glicerofosfolípido haciendo uso de diferentes enzimas fosfolipasas. Tomado de Belaunzaran et al, 2011 (93).

Extracción en fase sólida (SPE). La elección del método de extracción depende de las características específicas de los nitrolípidos que se analizan, el tipo de muestra biológica y el método de análisis posterior. La extracción en fase sólida utiliza un material de soporte sólido, como un cartucho o una placa, para adsorber los analitos de la muestra. A continuación, los analitos pueden eluirse del soporte sólido con un disolvente como se muestra en la Figura 7 y analizarse mediante HPLC y/o espectrometría de masas (MS).

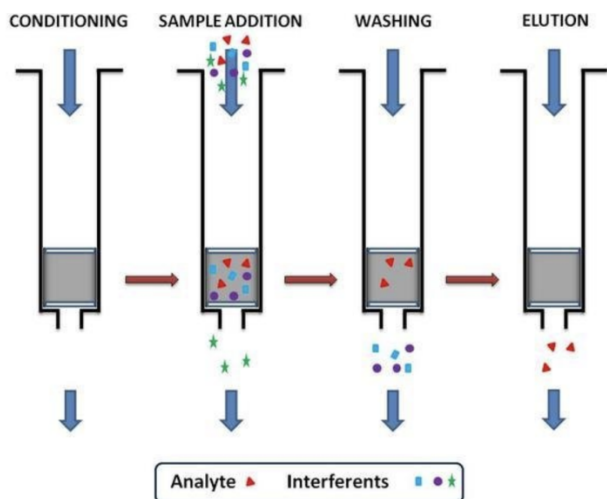


Figura 7. Etapas de una SPE. Tomado de Alkarawi et al, 2016 (94).

Se utiliza para la preparación de muestras para el análisis de NO₂-FAs debido a su alto porcentaje de recuperación, selectividad, precisión, relación costo/eficiencia y mínima supresión iónica. Se puede dividir en diferentes tipos según el tipo de soporte sólido y el mecanismo de interacción analito-soporte. Algunos de los tipos comunes de SPE incluyen SPE de fase normal, de fase inversa, de intercambio iónico, de afinidad y de exclusión por tamaño. En general, la elección del tipo de SPE dependerá de la naturaleza del analito y de los requisitos del análisis específico (95,96).

Es de particular interés para la leche bovina la SPE de afinidad con NH₂ (Amino). Ésta, es utilizada en la purificación y el aislamiento de analitos de mezclas complejas como lo es la leche bovina. En este método, se usa un soporte sólido funcionalizado con NH₂ (como una resina) para atrapar los FFA y NO₂-FAs en función de sus grupos NO₂ y carboxilatos. El NO₂-FAs se eluye del soporte sólido usando un solvente o tampón adecuado. Puede proporcionar una alta selectividad y especificidad para los NO₂-FAs y también se puede usar en combinación con otras técnicas para una mayor purificación (por ejemplo método de extracción de Hexano + SPE o SPE + cromatografía en capa fina (TLC) preparativa) (65).

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Si bien los FA y NO₂-FAs pueden ser analizados mediante técnicas de cromatografía de gases-espectrometría de masas y técnicas electroquímicas, el estudio analítico más utilizado en el presente es la LC-MS. Ésta permite la resolución, identificación y cuantificación de NO₂-FAs individuales, así como la medición de sus niveles en muestras biológicas (97–99). La combinación de LC y MS en una sola herramienta analítica (LC-MS) surgió hace unos 40 años gracias al poder de tecnologías que permitieron que compuestos no volátiles pudieran generar iones en fase gaseosa. En una primera instancia se empleó ionización por FAB (Fast Atom Bombardment) pero luego se cambió a la **ionización por electrospray (ESI)** y esta técnica acaparó el campo para el análisis de moléculas no volátiles y volátiles.

ESI es una fuente de ionización blanda, la cual genera muy poca fragmentación y es la más común para el análisis de NO₂-FAs por MS. Ocurre a presión atmosférica e incluye los siguientes procesos físico-químicos: i) formación del cono de Taylor y de gotas cargadas; ii) desolvatación de las gotas y explosión coulombica y; iii) formación de iones gaseosos “desnudos”. Comienza generando una corriente en la punta de la aguja y carga los iones positiva o negativamente. El exceso de cargas se desprende de la aguja y forma un cono de fase móvil con los iones (como de Taylor), que se convierte en pequeñas gotas gracias al gas caliente introducido en electrospray. Las gotas pierden solvente y disminuyen de tamaño, generando repulsión entre las cargas de los iones y produciendo la "explosión" de las gotas. Este proceso se llama repulsión coulombica y forma iones cargados en fase gaseosa ("ión desnudo"), que son analizados por MS (100–104).

El acople de los espectrómetros de masas ESI con la LC constituyó un elemento crítico para el análisis cuantitativo de NO₂-FAs en diversas matrices ya que se logran separar diferentes especies moleculares. Aunque en términos generales la ionización de moléculas orgánicas suele ser en modo positivo, los ácidos grasos y NO₂-FAs son generalmente analizados en modo negativo por la presencia de su grupo carboxilato, que posee carga negativa.

En lo que respecta a la separación por cromatografía líquida (LC), gracias a su apolaridad de la cadena alifática, se suelen usar columnas de fase reversa (105). En cuanto a las fases móviles empleadas, algunos autores proponen MeOH:H₂O con ácido fórmico o acetato de amonio, acetonitrilo con ácido fórmico o ácido acético. La adición de un ácido a la fase móvil puede parecer ineficiente para trabajar en ESI en modo negativo ya que se favorece la protonación de grupos carboxilo y por tanto disminuye la probabilidad de ionizarse en modo negativo pero al tratarse de ácidos grasos se utiliza fase móvil ácida, priorizando una correcta separación por el HPLC y evitando así picos asimétricos (98). Se puede mejorar la separación cromatográfica activando químicamente los grupos silanoles de las columnas de forma de aumentar las interacciones de Van der Waals con los analitos. Aunque algunas de las aplicaciones describen el uso de una corrida isocrática, la mayoría de los trabajos emplean gradientes para el análisis de un gran número de compuestos con alta sensibilidad y especificidad (64,105).

Espectrómetros de masas acoplados a cromatografía líquida. Hay varios tipos de espectrómetros de masas, que incluyen:

- Espectrómetro de masas de un solo cuadrupolo: este es el tipo más simple de instrumento para LC-MS y se usa a menudo para análisis cualitativos y para la detección de niveles bajos de compuestos objetivo (104).
- Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo: este tipo de MS está equipado con tres analizadores de masas de cuadrupolo y se utiliza a menudo para la cuantificación de compuestos objetivo en mezclas complejas (106).
- Espectrómetro de masas Orbitrap: este equipo utiliza un dispositivo de espectrometría de masas de resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier de alta resolución para lograr mediciones de masa precisas y de alta resolución (64).
- Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF): utiliza un analizador de tiempo de vuelo con un reflector para medir la relación masa-carga de los iones. A menudo se utiliza para el análisis de macromoléculas (107).

En este trabajo de Tesis nos enfocaremos en el sistema LC-MS/MS con trampa de iones. Por un lado, el equipo LC es un HPLC Infinity 1260, Agilent, el cual consta de una bomba binaria y autosampler refrigerado con un compartimento de columna termostatizado. El espectrómetro de masas empleado consta de una fuente de ionización de electrospray (ESI) y un analizador híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal como se muestra en la Figura 8.

Este espectrómetro de masas posee una serie de filtros (cuadrupolos, Q) que transmiten los iones según su m/z . El primer cuadrupolo de esa serie es el QJet, que actúa como guía de iones y se ubica entre la placa del orificio y la región de Q0. El QJet no filtra los iones pero sí los focaliza previo a su entrada al Q0. Mediante esta focalización, el QJet aumenta la sensibilidad del sistema y mejora la relación señal/ruido. A continuación los iones son enfocados e ingresan hacia el cuadrupolo Q1, el cual es un filtro que separa los iones antes de su entrada al Q2. El Q2 puede comportarse sólo enfocando los iones pero su utilidad subyace en que se puede comportar como una celda de colisión en la que la energía vibracional interna de los iones es aumentada a través de la colisión de éstos con moléculas de gas inerte (N_2 generalmente), hasta llegar al punto en que los enlaces moleculares se rompen (fragmentación) creando "iones producto". Luego de atravesar la celda de colisión, los iones entran al Q3 para el análisis, y posteriormente al detector. En el detector los iones crean una corriente que es convertida en un pulso de voltaje. Estos pulsos son directamente proporcionales a la cantidad de iones que entran al detector. El sistema monitorea estos pulsos de voltaje y convierte esta información en señal. La señal representa la intensidad de cada ion para un valor de m/z particular y eso se representa como un espectro de masas (108).



Figura 8. Esquema del interior del QTrap 4500.

Parámetros del espectrómetro QTRAP 4500. Toda la información a continuación sobre el QTrap 4500 fue obtenida del manual del QTrap 4500 proporcionado por SCIEX (108). Los parámetros del instrumento del espectrómetro de masas son varias configuraciones y variables que se ajustan y optimizan para lograr el rendimiento y la precisión deseados del instrumento. Controlan los voltajes que controlan los lentes, cuadrupolos, y otras partes del equipo. Hay tres tipos de parámetros según su dependencia:

Los parámetros **dependientes del compuesto** controlan principalmente elementos del lente en la vía por la que pasan los iones. Los valores óptimos para estos parámetros varían dependiendo del analito de interés (m/z).

Los parámetros **de la fuente** son básicamente la optimización del ESI, implicando el ajuste de varios parámetros para lograr la mejor eficiencia, sensibilidad y reproducibilidad de ionización. Estos parámetros incluyen: **Voltaje de capilar:** El potencial aplicado a la punta de la aguja y la diferencia de potencial entre este y la entrada a la parte de alto vacío del MS afecta directamente el tamaño de las gotas cargadas y la cantidad de iones en fase gaseosa producidos. **Tasa de flujo y disolvente:** La tasa de flujo del solvente a través de la aguja afecta el tamaño de las gotas cargadas, siendo esta inversamente proporcional a la eficiencia de ionización por

ESI, a su vez las características fisicoquímicas del disolvente también afectan la ionización. **Temperatura del capilar y gases cortina:** la temperatura del capilar y los gases cortina afectan la eficiencia de ionización y deben optimizarse para reducir la degradación y la descomposición térmica de los analitos, los gases cortinas suelen nombrarse como GS1 (gas 1) y GS2 (gas 2). **pH de la solución de muestra:** El pH de la solución de muestra puede afectar el estado de protonación de los análisis y su eficiencia de ionización. **Concentración de la muestra:** la concentración de la muestra debe optimizarse para garantizar la máxima eficiencia de ionización y evitar la supresión de iones. No siempre una concentración alta equivale a una alta conversión del analito a fase gaseosa e ionizado.

Los **parámetros del equipo** son básicamente la optimización de la parte de alto vacío del MS, enfocándose más en la optimización de los cuadrupolos. Estos parámetros incluyen: **Potencial de desagrupamiento (DP):** Controla el voltaje en el orificio, que controla la capacidad de declusterizar los iones entre el orificio y el QJet. Se utiliza para minimizar los clúster de solvente que pueden permanecer junto a los iones de la muestra luego de entrar a la sección de alto vacío y en algunos casos también para fragmentar iones, a su vez evita la formación de dímeros entre ácidos grasos mediante puente de hidrógeno entre grupos carboxilato y oxígeno. Cuanto mayor es el voltaje, mayor es la energía que se aplica a los iones. Por tanto, si el DP es muy elevado puede suceder algo de fragmentación no deseada, denominada fragmentación en fuente. **Potencial de entrada (EP):** El EP controla la diferencia de potencial entre el voltaje de Q0 y la tierra. Este potencial es el que guía y focaliza los iones a través de la región de alta presión del Q0. A su vez, ayuda a controlar la eficiencia de ionización y la selectividad de la fuente de iones, así como influir en la formación de diferentes tipos de iones, al aumentar el potencial de entrada, es posible aumentar la eficiencia de ionización y generar más iones. Sin embargo, esto también puede dar lugar a la formación de iones de carga múltiple no deseados, lo que puede afectar negativamente a la calidad de los espectros de masas. **Energía de colisión (CE):** La energía de colisión se refiere a la energía impartida a un ion en una celda de colisión (Q2). Esta energía puede hacer que el ion se fragmente, lo que da como resultado la producción

de iones de fragmentos más pequeños. El CE controla la diferencia de potencial entre Q0 y Q2 (la celda de colisión). Se utiliza únicamente en experimentos MS/MS. En aquellos experimentos de escaneo de masas sin fragmentación (SCAN o MS¹) el valor del CE es cero. **Gas de colisión:** Controla la presión del gas dentro de la celda de colisión (Q2). Para los escaneos en Q3 y los experimentos con la trampa iónica lineal, ayuda a focalizar los iones mientras que pasan por la celda de colisión utilizando presiones bajas. Para los experimentos de fragmentación (MS/MS) contribuye a la fragmentación, justamente por la colisión del N₂ con el ion de precursor, utilizando presiones altas de gas (109–111).

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El siguiente nivel de complejidad de análisis lo aporta la **espectrometría de masas en tándem**. Debido a que las similitudes estructurales y químicas entre los distintos NO₂-FAs requieren un paso de separación cromatográfica y análisis de fragmentación en conjunto con el ESI-MS/MS, para separar e identificar “inequívocamente” a los diferentes NO₂-FA. La LC separa a los analitos según sus propiedades fisicoquímicas mientras que la fragmentación (en MS tandem), generalmente **fragmentación inducida por colisión (CID)**, produce transiciones ion precursor/ion producto características que pueden ser monitoreadas en el MS. Para ello se emplea un modo de análisis denominado reacción de monitoreo múltiple del inglés “Multiple Reaction Monitoring” (MRM) del cual hablaremos luego.

Los métodos de fragmentación en espectrometría de masas tándem se refieren al proceso de descomponer iones en fragmentos más pequeños para obtener información estructural sobre la muestra. Hay varios métodos de fragmentación utilizados que incluyen principalmente:

- CID: este método utiliza colisiones de alta energía con un gas como el argón para romper los enlaces en la molécula y generar fragmentos. El espectrómetro de masas analiza los iones del fragmento resultante para obtener información estructural sobre la molécula (106,112, 113).

- Disociación por captura de electrones (ECD): este método utiliza la captura de un electrón por un ion altamente cargado para romper enlaces en la molécula y generar fragmentos. El espectrómetro de masas analiza los iones del fragmento resultante para obtener información estructural sobre la molécula (106).
- Disociación por transferencia de electrones (ETD): este método utiliza la transferencia de un electrón de la molécula a un ion altamente cargado para romper enlaces en la molécula y generar fragmentos. El espectrómetro de masas analiza los iones del fragmento resultante para obtener información estructural sobre la molécula (106,114).

Cada método de fragmentación tiene sus propias ventajas y limitaciones, y la elección del método dependerá de las propiedades de la muestra y la información que se desee. El uso combinado de múltiples métodos de fragmentación a menudo puede proporcionar una caracterización más completa de la muestra (106,112–117). En lo que respecta a la fragmentación de los NO₂-FAs, ésta se puede lograr a través de todos los mecanismos anteriormente mencionados (CID, ETD, ECD, etc). Podemos esperar encontrar fragmentos característicos de los NO₂-FAs, como por ejemplo el ion $\cdot\text{NO}_2$ y los iones de ácido graso nitroalquilo y nitroacilo, que pueden proporcionar información importante sobre su estructura y composición.

Modos operacionales de espectrometría de masas en tándem. En la Figura 9 se puede apreciar los métodos de MS/MS más utilizados.

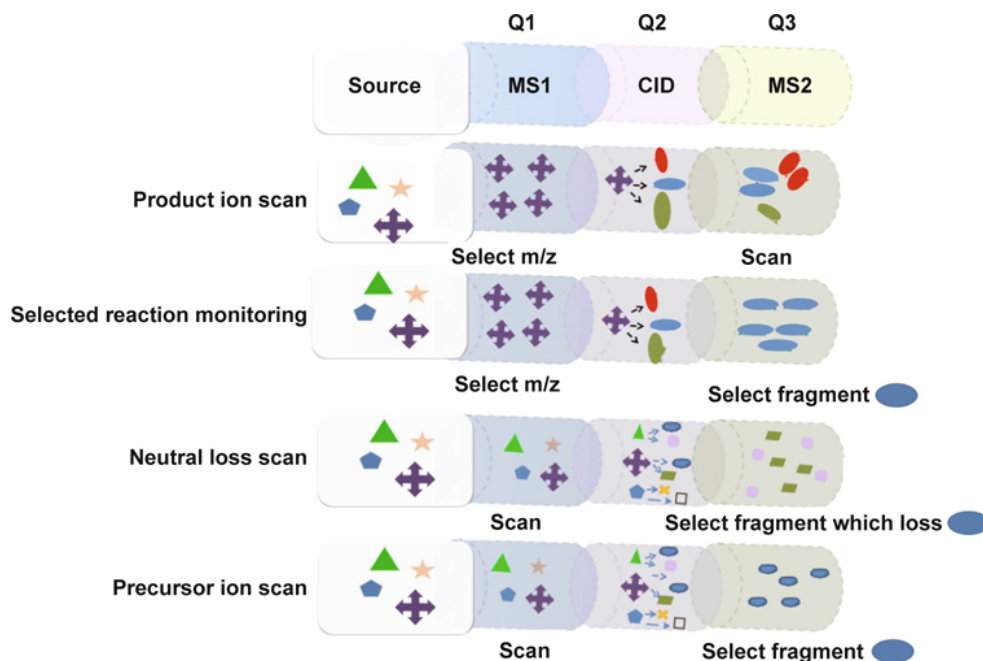


Figura 9. Modos operacionales de espectrometría de masas en tándem. (1) Escaneo de iones producto: Se selecciona el ion precursor en Q1 y escanee la producción de Q3. (2) Monitoreo de iones seleccionados: Se selecciona el ion precursor en Q1 y se monitorea uno o más iones de fragmento en Q3. (3) Escaneo de pérdida neutra: Se escanean todos los iones en Q1 y se seleccionan los iones con pérdida neutra en Q3. (4) Escaneo de iones precursores: se escanea el ion precursor en Q1 y se selecciona cierto fragmento de ion en Q3, toda la disociación inducida por colisión se lleva a cabo en Q2. Tomado de Lin et al, 2014 (118).

En espectrometría de masas en tándem (MS/MS), existen varios modos operacionales que se utilizan para llevar a cabo la fragmentación de las moléculas y la identificación de los compuestos analizados. A continuación se describirán brevemente los principales:

Iones producto. En modo operacional de iones producto, el primer analizador de masas (cuadrupolo, Q1) se establece en la masa de un ión precursor seleccionado y luego el segundo analizador de masas (usualmente celda de colisión, CID) genera la fragmentación de este, para luego el tercer analizador relación un escaneo MS1. El

resultado es un espectro de masas que contiene señales para todos los iones producto formados a partir de ese ion precursor seleccionado (118).

Multiple reaction monitoring (MRM) y single reaction monitoring (SRM). La espectrometría de masas en tándem es útil para identificar metabolitos, pero no para cuantificarlos. Para la cuantificación, se seleccionan transiciones distintivas precursor/producto y se miden sus intensidades cuantitativamente utilizando un estándar interno y una curva de calibración. Si se selecciona un único precursor de iones para cada intervalo de tiempo, hablamos de SRM. Si en el mismo intervalo de tiempo seleccionamos 2 o más iones precursores y sus respectivos fragmentos, hablamos de MRM. Se pueden seleccionar varias transiciones y el espectrómetro de masas puede medir varias de ellas simultáneamente en el modo MRM. Este modo permite cuantificar analitos en mezclas complejas, lo que aumenta la capacidad de medición en muestras de origen animal o vegetal. MRM es especialmente útil para la cuantificación de analitos de baja abundancia y puede proporcionar un análisis altamente sensible y específico en matrices complejas (65,66,98,105,119,120).

De barrido completo (SCAN, MS¹). MS¹ o SCAN, es la primera etapa de un experimento de espectrometría de masas en tándem. Durante el SCAN, se adquiere todo el rango de relación masa-carga (m/z) de la muestra y los espectros resultantes se utilizan para identificar la composición molecular de la muestra. En esta etapa, los iones resultantes se separan en función de su relación masa-carga y se detectan mediante el espectrómetro de masas. Los datos de MS¹ proporcionan una descripción completa de la composición molecular de la muestra y se pueden utilizar para análisis cualitativos y semicuantitativos de NO₂-FAs. Esta información se puede utilizar en las etapas previas del experimento de espectrometría de masas en tándem para obtener información más detallada sobre los componentes individuales de la muestra y en cuales queremos realizar MS/MS (121–125).

Pérdida neutra. La pérdida neutra es un proceso en el análisis de espectrometría de masas en el que parte de la masa del ion original se pierde en forma de fragmentos

neutros. En el análisis de nitrolípidos, la pérdida neutra se puede utilizar para identificar y confirmar la presencia de ácidos grasos nitrados. La característica pérdida neutra del grupo nitro (NO_2) se puede monitorear para permitir la detección y cuantificación selectiva de NO_2 -FAs. La pérdida neutra es específica de la estructura química de la molécula analizada y puede verse como una disminución en la relación masa-carga del ion original (105,126).

Hipótesis

Teniendo en cuenta que la leche bovina es una fuente importante de cLA, el cual tiene una elevada susceptibilidad a sufrir procesos de nitración, hemos formulado la hipótesis de que la leche contiene concentraciones endógenas relevantes de NO₂-cLA que pueden ser identificados y cuantificados por técnicas analíticas basadas en espectrometría de masas. Un método analítico para NO₂-cLAs lácteo permitiría determinar los factores genéticos y regímenes alimentarios que regulan su concentración, de forma de posicionar la leche bovina y sus derivados como una fuente natural NO₂-cLA, en virtud de sus reconocidos beneficios para la salud humana.

Objetivo

El objetivo de esta maestría ha sido aplicar técnicas de extracción de lípidos de la leche y utilizar técnicas analíticas (HPLC-MS/MS) para identificar y cuantificar NO₂-cLA, para luego realizar la comparación de los niveles de éste en diferentes genéticas bovinas y periodos de lactancias. El interés adicional de identificar NO₂-FAs en la leche bovina proviene del potencial de identificar nuevos nutrientes claves en la leche y los productos lácteos con un potencial impacto beneficioso para la salud.

Objetivos específicos:

1) Identificación y caracterización química de NO₂-cLA en leche bovina.

En este objetivo nos propusimos adaptar métodos ya descritos en lipidómica para el análisis de NO₂-cLA lácteo por MS/MS y HPLC-MS/MS, búsqueda de otros NO₂-FAs en la leche y confirmar reactividad electrofílica del NO₂-cLA como nitroalqueno electrofílico.

2) Formación de NO₂-cLA en condiciones del compartimiento gástrico.

En este objetivo nos propusimos confirmar si los lípidos extraídos de la

leche bovina y conteniendo cLA, eran capaces de formar NO₂-FA, y más particularmente NO₂-cLA.

- 3) **Comparación de NO₂-cLA y cLA lácteo en diferentes cohortes de vacas lecheras.** En este objetivo nos planteamos analizar cLA y NO₂-cLA en la leche de bovinos de dos razas lecheras, en periodos de lactancia temprana versus tardía. También se analizó la correlación entre cLA y NO₂-cLA en muestras de leche, así como la estimación de NO₂-cLA libre y esterificado en triglicéridos y fosfolípidos.

Materiales y Métodos

Materiales. El agua utilizada fue obtenida en un sistema de purificación Barnstead™ Smart2Pure™ (Thermo Scientific). El metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN) utilizados fueron de calidad HPLC-PLUS-gradient grade y HPLC-GOLD-ultragradient grade (CARLO ERBA Reagent S.A.S.). Los otros solventes empleados fueron de calidad ACS (CARLO ERBA Reagent S.A.S.). La lipasa pancreática y la fosfolipasa se adquirieron de Sigma-Aldrich (L3126, C122009, 658057, 471356). Las columnas de separación utilizadas fueron columnas Strata NH₂ (55 µm, 70A, 6 mL) Phenomenex (8B-S009-HCH). Todos los solventes y reactivos fueron de calidad HPLC.

Estándares. Los lípidos estándares analíticos fueron adquiridos de NuCheck (cLA, NO₂-SA) o sintetizados a partir de estos (¹⁵NO₂-cLA, NO₂-OA y NO₂-LA) (105, 64), las mezclas específicas se prepararon en MeOH grado HPLC (CARLO ERBA Reagent S.A.S.).

Muestras de leche y genética bovina. Las muestras de leche fueron aportadas por INIA-La Estanzuela (Colonia; Plataforma LE), en el marco del proyecto de investigación INNOVAGRO (Responsable científico: Mariana Carriquiry). Se evaluaron 18 vacas alimentadas con una dieta compuesta mayoritariamente por pasto de las cuales 9 fueron genotipo Holstein de origen estadounidense (USA) y 9 de genotipo Holstein de origen neozelandés (NZ). En ambas plataformas, previo al parto, las reses preñadas se manejaban de manera conjunta para cubrir los requerimientos de mantenimiento y gestación. La alimentación fue de alto porcentaje de pastura y durante la lactancia, las vacas fueron ordeñadas dos veces al día y la producción de leche se registró diariamente. Se colectaron para cada animal muestras en dos momentos del ciclo productivo, lactación temprana (EL, +21 días de parición) y lactación tardía (LL, +240 días de parición).

Las muestras obtenidas se dividieron en frascos de 10 mL y se congelaron a -20°C hasta el momento del análisis en el laboratorio.

Extracción de NO_2 -FAs. Los procedimientos generales para extraer FFA de las muestras de leche están basados en estudios previos (64, 65,120). En nuestro caso, las muestras de leche fueron descongeladas y enseguida homogeneizadas en base a la técnica de molino de bolas el cual permite homogeneizar, romper o lisar muestras de cultivo de tejidos, leche, células o muestras biológicas. Funciona cargando las muestras en los tubos de polipropileno estándar y luego se colocan en un homogeneizador molino de bolas de marca Bullet Blender. Éste contiene pequeñas bolas metálicas que golpean vigorosamente el interior de todos los tubos y homogeneizan la muestra en minutos. Para ello, 1 mL de la muestra de leche a 37°C fue llevada a tubos Eppendorf Safe-Lock precargados con pastillas metálicas (tubos GREEN) para la homogeneización con tiempo de 4 min, de acuerdo a instrucciones del proveedor (<https://www.nextadvance.com/>). Posteriormente, la muestra de leche se extrajo dos veces consecutivas por el método del hexano. Brevemente, se realizó la homogeneización a alta velocidad de la biomasa con una mezcla de Hexano:Isopropanol:Ácido Acético 30:20:1 v/v (2.5:1 con respecto al volumen de la muestra) seguida del agregado de 2,5 vol de hexano y se dejó homogeneizar por 30 segundos haciendo uso de vortex. Posteriormente se centrifugó a 4°C , 1800 rpm y finalmente se tomó la fase superior de hexano para luego evaporarla a 30°C en condiciones de vacío. Luego de llevar a sequedad se añadió el estándar interno correspondiente (9- NO_2 -SA y/o $^{15}\text{NO}_2$ -cLA), 1 mL de lipasa pancreática (5 mg de proteína/mL) y fosfolipasa A2 (40 U/mL) en buffer fosfato 0,5 M, pH 7,4 y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 h con agitación. La fracción lipídica se extrajo por el método del Hexano nuevamente, se secó al vacío a 35°C y se resuspendió en cloroformo (65,127).

Luego, se realizó una purificación final de los FFA libres en columnas Strata NH_2 de SPE. Para ello, las columnas se pre-condicionaron con 6 mL de MeOH, seguido de 6 mL de cloroformo; luego se añadieron las muestras y la columna se lavó con 4 mL de

cloroformo/isopropanol (2:1 v/v). Posteriormente, los FFA libres se eluyeron con 6 mL de éter dietílico/ácido acético al 2%. El disolvente se evaporó al vacío a 30 °C y los lípidos se disolvieron en metanol para el análisis por espectrometría de masas (65).

Rendimiento de hidrólisis enzimática. Con el fin de determinar el rendimiento de hidrólisis enzimática se realizó sobre una misma muestra la extracción lipídica y luego la muestra se dividió en dos partes iguales, una de estas partes fue sometida a hidrólisis enzimática mientras que la otra no. Posteriormente se sembró una misma cantidad de cada muestra en una TLC comparativa, utilizando como fase móvil Hexano:ácido acético 100:1 v/v. Finalmente, la TLC se reveló utilizando una solución de anisaldehído y tratamiento de calor. Para interpretar las áreas de la TLC y calcular así el rendimiento de hidrólisis enzimática se utilizó el programa Image Studio Lite y se calculó realizando el cociente entre el área de TAG/FFA de la fracción hidrolizada y el área TAG/FFA de la fracción no hidrolizada.

Caracterización de NO₂-FA por MS mediante inyección directa. Se realizó el espectro m/z de ion producto de los estándares ¹⁵NO₂-cLA, NO₂-LA y de NO₂-cLA lácteo. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron para la fuente: CAD -2.000, CUR 25.000, GS1 16.000 GS2, 0.000 IS, 4500.000 y TEM, 50.000 y para los parámetros de rangos de masas CE -37.000, DP -40.000 y EP -10.000, se analizó desde la masa 40.0 a 330.0 cada 0.100 Da y se realizó un SCAN con una CE desde -50 a -10.

Análisis de NO₂-cLA y cLA como ácidos grasos libres y esterificados en triglicéridos y fosfolípidos. Para poder cuantificar NO₂-cLA y cLA en muestras de leche tratadas y sin tratar con hidrólisis enzimática, se partió de 1 mL de leche al cual se le extrajeron los ácidos grasos como se explica en la sección de materiales y métodos “Extracción de NO₂-FA”. Posteriormente, cada muestra proveniente de 1 mL de leche se dividió en dos partes: a una parte se la trató, también como se describe en “Extracción de NO₂-FA”, con lipasa y fosfolipasa, y a la otra mitad no (para poder analizar NO₂-cLA y cLA en forma de ácidos grasos libres en la leche). Luego se

continuó de la misma forma para el análisis de NO₂-cLA y cLA como se describe en la sección materiales y métodos “Análisis de NO₂-cLA y otros NO₂-FAs por HPLC-MS/MS” y “Análisis de cLA por HPLC-MS/MS” correspondientemente.

Análisis de NO₂-cLA. NO₂-cLA puede existir en varias formas isoméricas, dependiendo de la posición del grupo nitro y la geometría de los dobles enlaces conjugados. Los isómeros más comunes de NO₂-cLA son 9,11-NO₂-cLA y el 10,12-NO₂-cLA, que tienen el grupo nitro unido al noveno o décimo átomo de carbono, respectivamente (64,105). Otros isómeros incluyen 12,14-NO₂-cLA, que tienen el grupo nitro unido al duodécimo o decimotercer átomo de carbono. El NO₂-cLA se suele analizar por MS en modo negativo debido a la presencia del grupo carboxilato del ácido graso para generar con mayor facilidad su ionización en la fuente ESI. Para cuantificar la totalidad de NO₂-cLA se pueden seguir transiciones MRM de los fragmentos característicos de todos los isómeros, estas transiciones son m/z 324.2/46.1 (pérdida del grupo ·NO₂) y 324.2/277.0 (C₁₈H₁₅O₂⁻) (105).

Análisis de NO₂-cLA y otros NO₂-FAs por HPLC-MS/MS. El análisis cualitativo y cuantitativo de NO₂-FAs se realizó de acuerdo a reportes previos (64, 65,120) con modificaciones. El análisis de NO₂-FAs se realizó mediante HPLC-ESI-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con trampa de iones (QTRAP4500, Applied Biosystems, Framingham, MA) en modo de iones negativos. Los NO₂-FAs en los extractos de lípidos fueron separados utilizando una columna de fase reversa C18 (100 mm x 2 mm, 5 μm Phenomenex) eluida a un caudal de 0,5 mL/min utilizando un sistema disolvente que consta de A (H₂O/ ácido acético 0,1%) y B (acetonitrilo/ácido acético al 0,1%), con el siguiente gradiente de disolvente: B al 30% (0–0,1 min); 30 a 100% de B (0,1 a 10 min); 100% B (10-11 min); 30% B (11.1-15 min) y luego las columnas se re-equilibraron a las condiciones iniciales durante 10 min más. Para cuantificar la totalidad de NO₂-cLA se siguieron las transiciones MRM de los fragmentos característicos de todos los isómeros, estas transiciones son m/z 324.2/46.1 (pérdida del grupo ·NO₂) y 324.2/277.0 (C₁₈H₁₅O₂⁻) (105).

El espectrómetro de masas se configuró con los siguientes parámetros: potencial de desagrupamiento (DP) de -65 V, energía de colisión (CE) de -35 eV y una temperatura de desolvatación de 650 uC. La detección de NO₂-FAs se realizó mediante el modo de exploración MRM con transiciones específicas de MRM correspondientes a los isómeros nitrados de OA, LA, cLA y SA (65,120). En todos los casos, los datos se adquirieron, analizaron y procesaron utilizando el software Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems, Framingham, MA).

Con el fin de cuantificar el NO₂cLA se realizó la curva de calibración (Figura 10) de este mismo con NO₂SA mediante HPLC-MS/MS utilizando el mismo método ya descrito que para cuantificar las muestras de NO₂cLA.

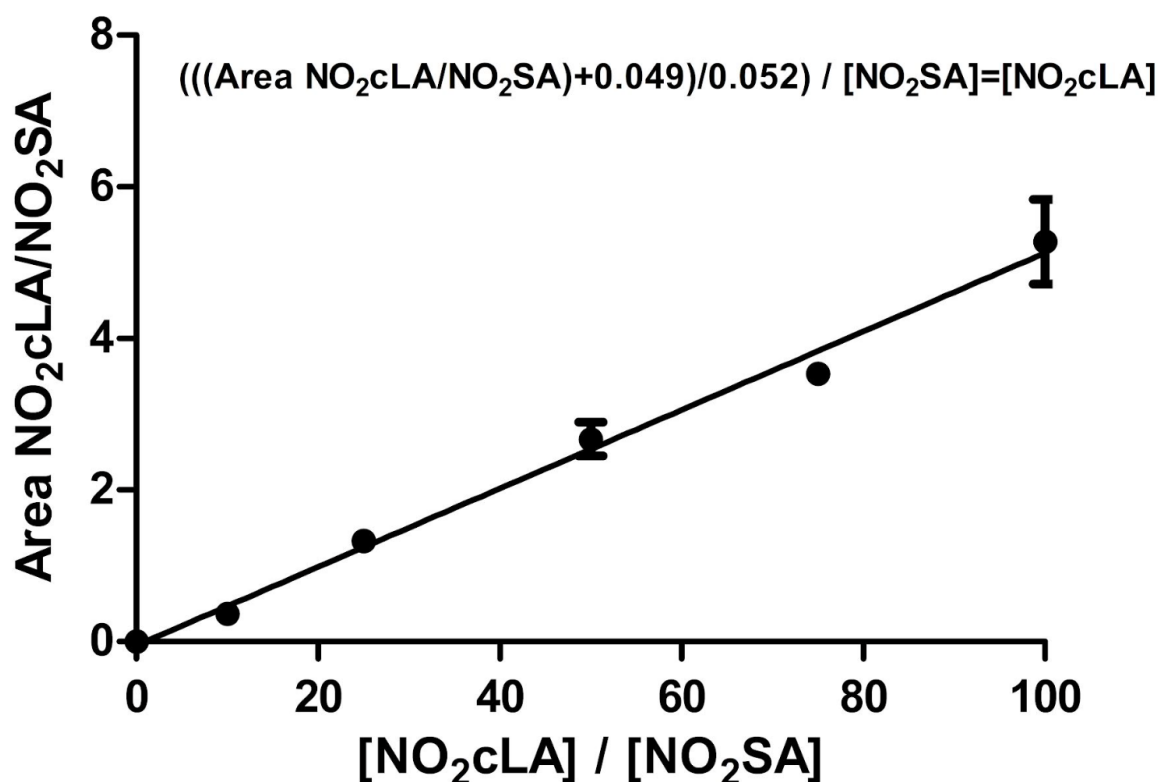


Figura 10. Curva de calibración de NO₂cLA utilizando como estándar interno NO₂SA.

Reacción y análisis de NO₂-cLA con β-mercaptoethanol (BME). Luego de purificar los FFA de la leche con estándares internos (NO₂-SA y/o ¹⁵NO₂-cLA) como se describió

anteriormente, se procedió a realizar la reacción con BME. El objetivo fue confirmar la presencia de NO₂-cLA en base a su reconocida naturaleza electrofílica derivada del grupo nitroalqueno, por el cual NO₂-cLA reacciona por trans-nitroalquilación con el nucleófilo β-mercaptoetanol para formar aductos covalentes (128). Para ello se dividieron los FFA de la muestra en dos partes iguales, luego una parte se incubó en 1 mL buffer fosfato de potasio 0,5 M, pH= 7.4, 100 mM de BME a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente se extrajeron los lípidos por el método de Hexano y se llevó a sequedad para luego resuspender con MeOH y realizar el análisis por HPLC-MS/MS. La otra fracción de ácidos grasos no se trató con BME y se procedió a realizar el mismo análisis para obtener una comparación de muestra incubada con BME y muestra sin incubar con BME.

Análisis cuantitativo por HPLC-ESI-MS/MS de BME-NO₂-cLA. El análisis cuantitativo de aductos de NO₂-FAs con BME se realizó de acuerdo a (128) con modificaciones. El análisis cualitativo de BME-NO₂-FAs por HPLC-ESI-MS/MS se realizó utilizando el QTrap 4500. Para detectar los aductos formados de BME-NO₂-FA, se realizaron estudios de HPLC de fase reversa utilizando una columna C18 (100 mm, 2 mm, 5 μm, Phenomenex) eluida a un caudal de 0,5 mL/min, utilizando un sistema disolvente que consta de A (H₂O/ ácido acético 0,1%) y B (ACN / ácido acético al 0,1%), con el siguiente gradiente de disolvente: B al 30% (0–0,1 min); 30 a 100% de B (0,1 a 10 min); mantengo 100% B (10-12 min); 30% B (12.1-15 min) y luego las columnas se re-equilibraron a las condiciones iniciales durante 10 min más.

Los aductos con BME se detectaron usando el modo MRM. Los aductos de BME se detectaron siguiendo aquellos iones que experimentan una transición M-/ [M-BME]⁻. Así, las transiciones utilizadas fueron las siguientes: i) BME-¹⁵NO₂-cLA, m/z 403,4/ 325,3; ii) BME-LNO₂ y BME-NO₂-cLA, m/z 402,4/ 324,3. Los DP fueron -90 y -50 V para los aductos con BME, respectivamente (128). Las energías de colisión se establecieron en 30 eV para los aductos con BME y se usó nitrógeno en la cámara de colisión. Los datos se adquirieron y analizaron utilizando el software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems).

Método de “nitrición gástrica”. Para reproducir las condiciones en donde los lípidos son nitrados a pH estomacal en presencia de NO_2^- , se utilizó la técnica descrita previamente (129). Se tomó un volumen de muestra de lípidos extraídos de la leche (sin digerir enzimáticamente) haciendo uso del homogeneizador molino de bolas bullet blender y utilizando el método de extracción de hexano; se incubaron junto a NaNO_2 5 mM en buffer pH=3 a 37°C por 1 hora. Para finalizar la reacción, se realiza una extracción por el método de Hexano y se lleva a sequedad para luego realizar el análisis por HPLC-MS/MS.

Análisis de cLA por HPLC-MS/MS. La detección y caracterización de cLA se puede realizar mediante LC-ESI-MS/MS en modo de iones negativos después de la derivatización con PTAD para formar los respectivos aductos de tipo “Diels-Alder” como se muestra en la Figura 11. Estos aductos formados presentan transiciones características para cada isómero, pudiendo cuantificar el cLA total y distinguirlo del LA. La fragmentación MS/MS de los iones producto heterocíclicos del aducto Diels Alder m/z 454,3 produce iones hijos específicos de isómero m/z 238,2, 220,4, 205,2 y 182,2 correspondientes a (10,12)-cLA e iones m/z 224,2, 206,2, 191,2, y 168,1 para (9,11)-cLA (64). En este trabajo se realizó la derivatización de cLA con PTAD para lograr su cuantificación (transición MRM 454/335) e identificación por HPLC-MS/MS con un gradiente de fase reversa utilizando una columna C18 (100 mm, 2 mm, 5 μm , Phenomenex) eluida a un caudal de 0,5 mL/min, utilizando un sistema disolvente que consta de A (H_2O / ácido acético 0,1%) y B (ACN / ácido acético al 0,1%), con el siguiente gradiente de disolvente: B al 30% (0–0,1 min); 30 a 100% de B (0,1 a 10 min); mantengo 100% B (10-12 min); 30% B (12.1-15 min) y luego las columnas se re-equilibraron a las condiciones iniciales durante 10 min más.

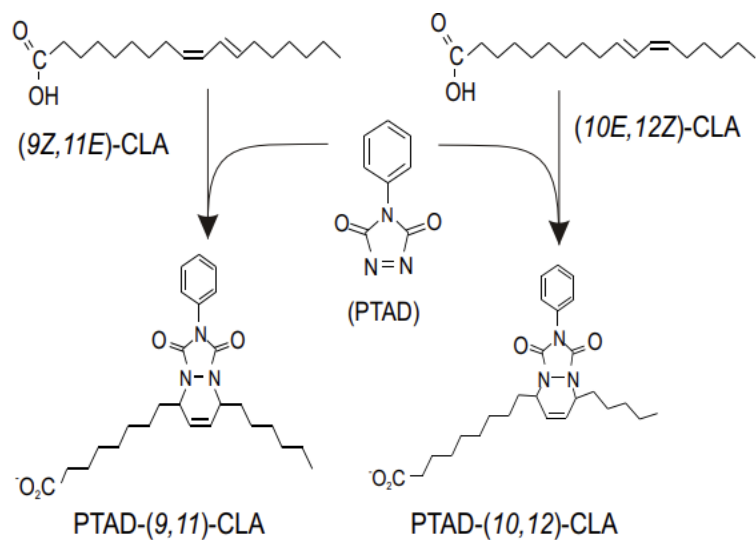


Figura 11. Formación de los aductos PTAD-cLA de los principales isómeros del cLA. Tomado de Bonacci et al, 2012 (64).

Curva de calibración 4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) y cLA. Con el fin de cuantificar el cLA se realizó la curva de calibración (Figura 12) con cLA de concentración conocida (patrón) mediante HPLC-MS/MS utilizando el mismo método que para cuantificar las muestras de PTAD-cLA (120).

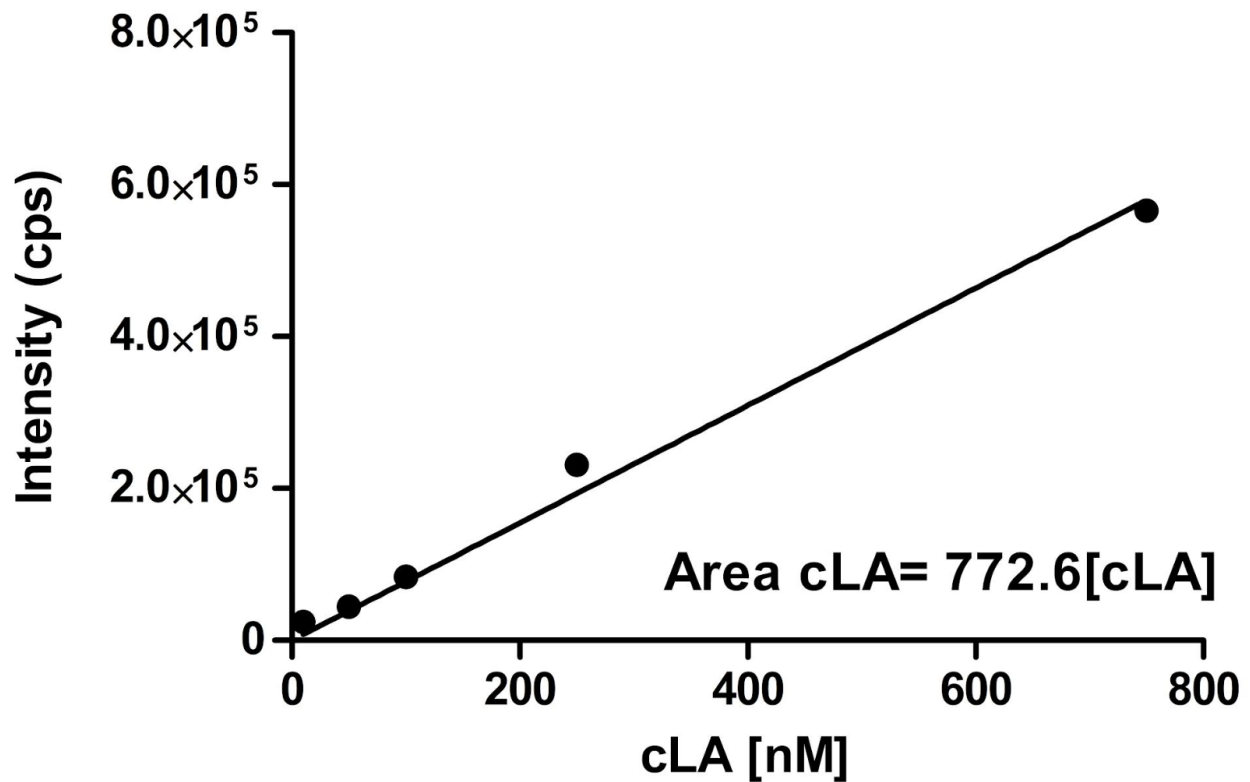


Figura 12. Curva de calibración de PTAD-cLA utilizando un estándar de cLA de concentración conocido como patrón.

Análisis estadísticos. Para el análisis de NO₂-FAs se realizó una prueba no paramétrica de Mann Whitney para comparaciones individuales entre los diferentes periodos de lactancia, diferentes genéticas vacunas y nitración exógena. Para el análisis de correlación de NO₂-cLA y cLA se realizó el test de correlación de Spearman no paramétrico de correlación de rangos (dependencia estadística entre las clasificaciones de las variables NO₂-cLA y cLA), evaluando qué tan bien se puede describir la relación entre estas dos variables utilizando una función monótona. Ambos análisis fueron realizados en GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

Resultados

Identificación y caracterización química de NO₂-FAs en leche bovina.

Utilizando un método de extracción de los triglicéridos de la leche, seguido de la hidrólisis enzimática y purificación de los ácidos grasos libres en columna SPE, se logró identificar por MS la presencia de NO₂-cLA “endógeno” en leche vacuna. En la Figura 13 se puede observar la coincidencia de los tiempos de retención cromatográficos de los picos correspondientes a NO₂-LA lácteo y el estándar interno ¹⁵NO₂-cLA, los que mostraron transiciones de fragmentación características (m/z 324,2/46 para NO₂-LA y NO₂-cLA, m/z 325,2/47 para ¹⁵NO₂-cLA). A su vez, cada una de las especies mostró espectros de fragmentación MS/MS característicos (Figura 13, columna derecha). En su conjunto, los datos obtenidos del perfil cromatográfico, el MRM y el análisis MS/MS aporta fuerte evidencia sobre la identidad molecular del NO₂-cLA lácteo mostrando las transiciones m/z 324.2/46.1 (pérdida de grupo nitro), m/z 324.2/277 (pérdida de la cadena C₁₈H₁₅O₂⁻), m/z 324.2/ 224.0 (pérdida de la cadena C₁₂H₁₈O₃N⁻) entre otras transiciones.

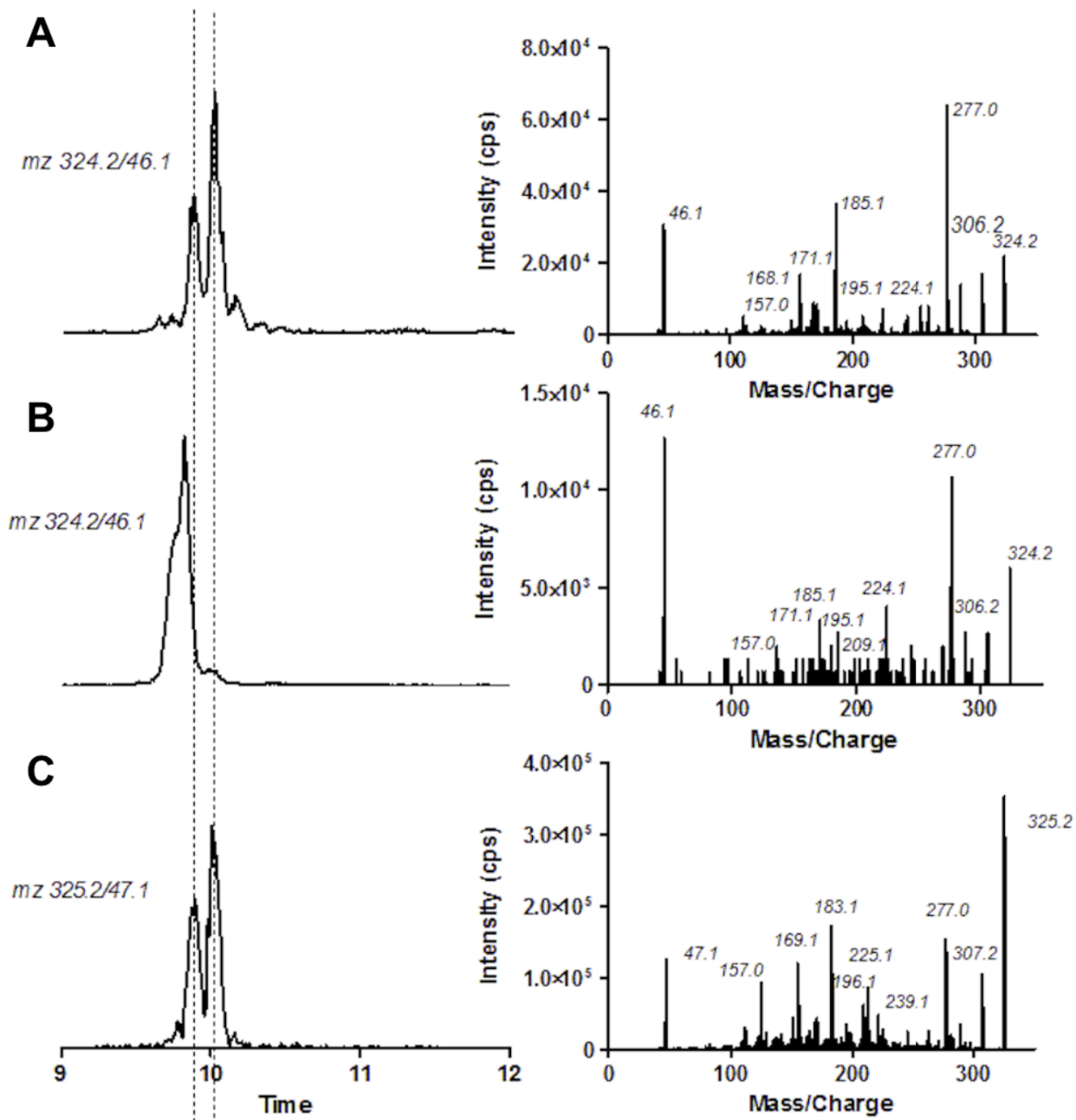


Figura 13. Detección de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en leche. Después de la digestión enzimática, extracción orgánica y SPE, los lípidos se analizaron por HPLC-MS/MS. La Figura muestra la transición MRM específica en el orden: A) $\text{NO}_2\text{-cLA}$ endógeno en la leche. B) Estándar de $\text{NO}_2\text{-LA}$. C) Estándar de $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$. Se analizaron las siguientes transiciones MRM: 324,2/46 para $\text{NO}_2\text{-LA}$ y $\text{NO}_2\text{-cLA}$, 325,2/47 para $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$. A la derecha de cada cromatograma se observan los patrones de fragmentación característicos de la muestra y los estándares.

En la tabla 1 se esquematiza la estructura así como también la masa de cada fragmento obtenido en los espectros de fragmentación correspondientes de la Figura 13, confirmando así la identificación de cada estándar y de NO₂-cLA presente en la leche. A su vez, el análisis realizado permitió confirmar la ausencia de otros NO₂-FAs como lo son el NO₂-OA o el ácido nitro linolénico (NO₂-LA) con las transiciones MRM: m/z 322.2/46.1 para NO₂-LA y MRM: m/z 326.2/46.1 para NO₂-OA.

NO ₂ -cLA		¹⁵ NO ₂ -cLA		NO ₂ -(9,12)-LA	
Fórmula	[M-H] ⁻	Fórmula	[M-H] ⁻	Fórmula	[M-H] ⁻
C ₈ H ₁₃ O ₃ ⁻	157.0	C ₈ H ₁₃ O ₃ ⁻	157.0	C ₈ H ₁₃ O ₃ ⁻	157.0
C ₉ H ₁₄ O ₂ N ⁻	168.1	C ₉ H ₁₄ O ₂ ¹⁵ N ⁻	169.1	C ₁₂ H ₁₇ O ₃ ⁻	209.1
NO ₂	46.1	¹⁵ NO ₂	47.1	NO ₂	46.1
C ₁₁ H ₁₅ O ₃ ⁻	195.1	C ₁₁ H ₁₅ O ₃ ⁻	195.1	C ₁₁ H ₁₅ O ₃ ⁻	195.1
C ₁₀ H ₁₇ O ₃ ⁻	185.1	C ₁₀ H ₁₆ O ₂ ¹⁵ N ⁻	183.1	C ₁₀ H ₁₇ O ₃ ⁻	185.1
C ₁₂ H ₁₈ O ₃ N ⁻	224.0	C ₁₂ H ₁₈ O ₃ ¹⁵ N ⁻	225.0	C ₁₂ H ₁₈ O ₃ N ⁻	224.1
C ₉ H ₁₅ O ₃ ⁻	171.1	C ₁₃ H ₂₀ O ₃ ¹⁵ N ⁻	239.1	C ₉ H ₁₅ O ₃ ⁻	171.1
C ₁₈ H ₁₅ O ₂ ⁻	277.0			C ₁₂ H ₁₉ O ₄ ⁻	227.1

Tabla 1. Productos de fragmentación CID obtenidos a partir de los diferentes isómeros posicionales de NO₂-cLA proveniente de la leche, estándar ¹⁵NO₂-cLA y NO₂-(9,12)-LA en modo de ion negativo.

Reactividad electrofílica del NO₂-cLA.

La reactividad de NO₂-cLA con el BME ha sido descrita previamente (64). Para determinar la reactividad electrofílica de NO₂-cLA en leche bovina, muestras de leche conteniendo NO₂-cLA endógeno y los estándares ¹⁵NO₂-cLA y NO₂-SA fueron analizadas antes (líneas negras) y después (líneas rojas) de la reacción con BME. Como muestra la Figura 14, el NO₂-cLA reaccionó rápidamente, generando productos detectados por la pérdida neutra de BME (78 Da) obteniendo los fragmentos para el NO₂-cLA (m/z 402.4/324.2) y ¹⁵NO₂-cLA (m/z 403.4/325.2) (Figura 14.d y 14.e). Para una misma cantidad de NO₂-cLA y ¹⁵NO₂-cLA provenientes de muestra de leche tratadas y sin tratar con BME, la cantidad de ambos fue menor en las tratadas con BME que en las sin tratar con BME (líneas rojas versus líneas negras en Figura 14.a y 14.b). Esto puede explicarse por la formación de los aductos BME-NO₂-cLA o BME-¹⁵NO₂-cLA correspondientes (Figura 14.d y 14.e, respectivamente, línea roja) en muestras de leche tratadas con BME, confirmando que el NO₂-FA presente en la leche corresponde a un nitroalqueno con propiedades electrofílicas compatibles con el NO₂-cLA. En comparación, el estándar interno NO₂-SA, el cual carece de electrofilicidad, agregado a la muestra de leche no reaccionó con el BME como era esperado (Figura 14.c).

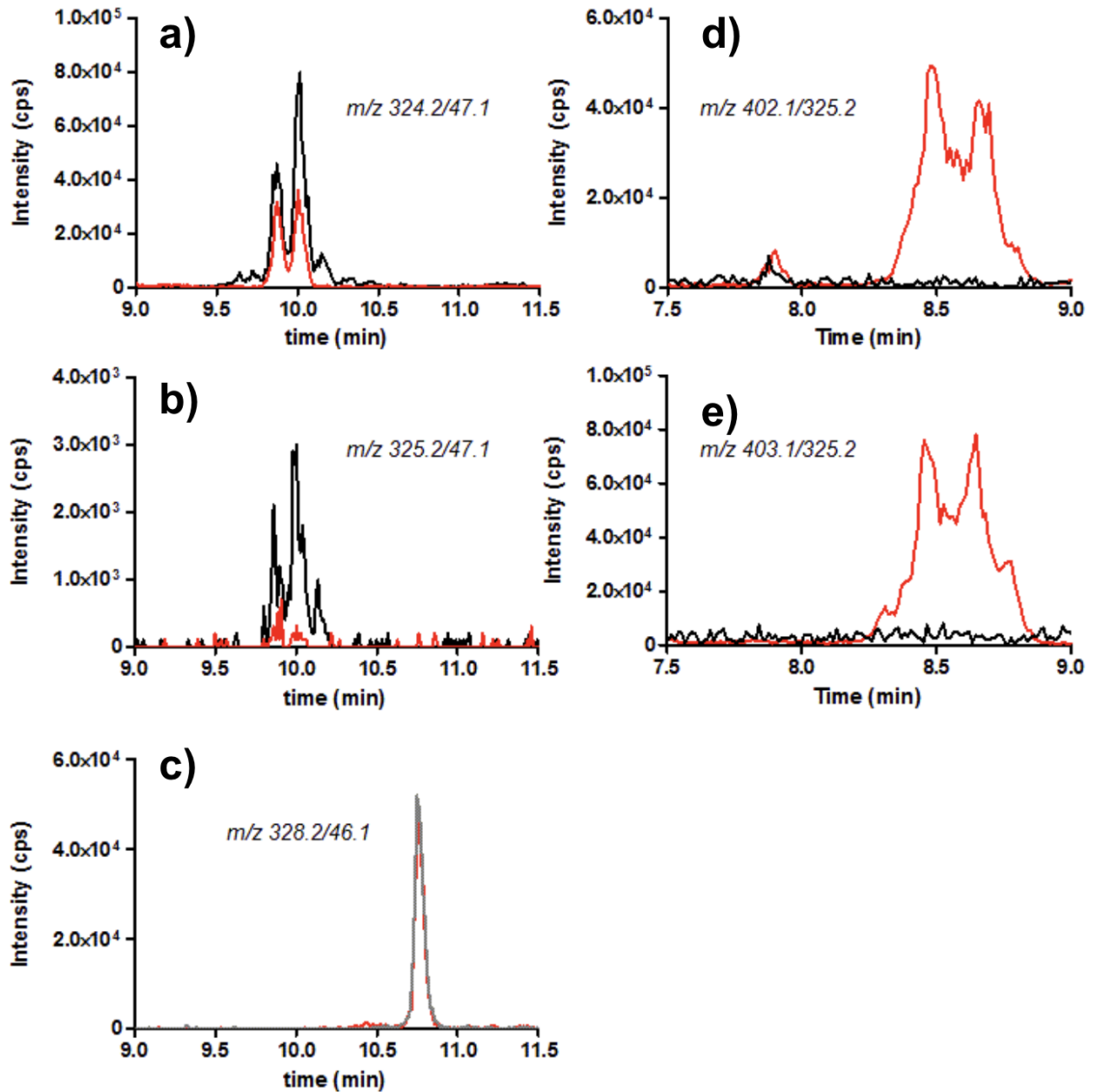


Figura 14. Reactividad de NO_2 -FAs con BME analizados por HPLC-MS/MS. Muestras de leche conteniendo NO_2 -cLA endógeno, y los estándares $^{15}\text{NO}_2$ -cLA y NO_2 -SA fueron analizadas antes (líneas negras) y después (líneas rojas) de la reacción con BME. La Figura muestra la transición específica de MRM. A) NO_2 -cLA endógeno en leche B) Estándar de $^{15}\text{NO}_2$ -cLA. C) Estándar de NO_2 -SA. D-E) Transición MRM específica de los aductos BME- NO_2 -cLA y BME- $^{15}\text{NO}_2$ -cLA respectivamente, de muestra de leche. Se analizaron las siguientes transiciones MRM: m/z 328,2/46 para

NO_2 -SA, m/z 324,2/46 para NO_2 -cLA, m/z 325,2/47 para $^{15}NO_2$ -cLA, m/z 402,2/324,2 para NO_2 -cLA-BME, m/z 403,2/325,2 para $^{15}NO_2$ -cLA-BME.

Formación de NO_2 -cLA en condiciones del compartimiento gástrico.

Es reconocido que el medio ácido del compartimento gástrico y la presencia de NO_2^- y/o NO_3^- (mediante transformación bacteriana se transforma a NO_2^- a nivel bucal) en los alimentos representa un entorno nitrante favorable para ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, siendo un mecanismo de síntesis de NO_2 -FAs (130). Potencialmente, estos podrían ser absorbidos y ser incorporados a la leche.

Para modelar esto, se incubaron los lípidos provenientes de la leche bovina en condiciones similares a las de digestión gástrica a pH = 3 conteniendo 50 mM de NO_2^- , y se determinó la generación de NO_2 -FAs. En estas condiciones, se determinó que los niveles de NO_2 -cLA en las muestras de leche aumentaban entre 2 y 3 veces en condiciones gástricas antes y después de la reacción. La Figura 15 muestra la variación de la intensidad correspondiente a la transición MRM característica de NO_2 -cLA (m/z 324.2/46.1) de una muestra de leche representativa, la que fue nitrada exógenamente en condiciones gástricas (color rojo) en comparación con muestra de leche sin nitrar (color negro), observándose el aumento de 3 veces en la intensidad. Este resultado sugiere en forma convincente la presencia de NO_2 -cLA en leche y que la nitración del cLA podría ocurrir *in vivo* en entornos fisiológicos ácidos, como el compartimento gástrico. (131,132)

A su vez, se analizó la formación de otros posibles NO_2 -FAs derivados del LA o OA. En ninguna de las muestras analizadas se pudo identificar mencionados NO_2 -FA (datos no mostrados), lo que sugiere que cLA es el ácido graso de la leche preferentemente nitrado en condiciones de acidez gástrica.

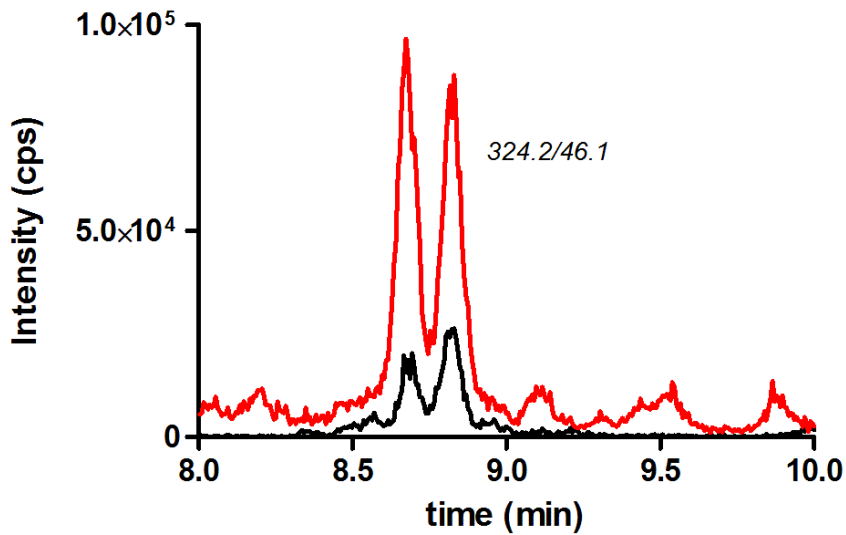


Figura 15. Espectros de NO_2 -cLA lácteo antes (línea negra) y después (línea roja) de la incubación en condiciones de nitración gástrica. Ambos espectros muestran la intensidad de la transición MRM 324.2/46.1 de NO_2 -cLA.

Comparación de NO_2 -cLA y cLA lácteo en diferentes cohortes de vacas lecheras

Para lograr cuantificar el NO_2 -cLA y cLA en leche se realizó el rendimiento de la hidrólisis enzimática con lipasa y fosfolipasa, como se muestra en la figura 16 se obtuvo un rendimiento de hidrólisis de 85% el cual se tuvo en cuenta para la cuantificación de cada muestra.

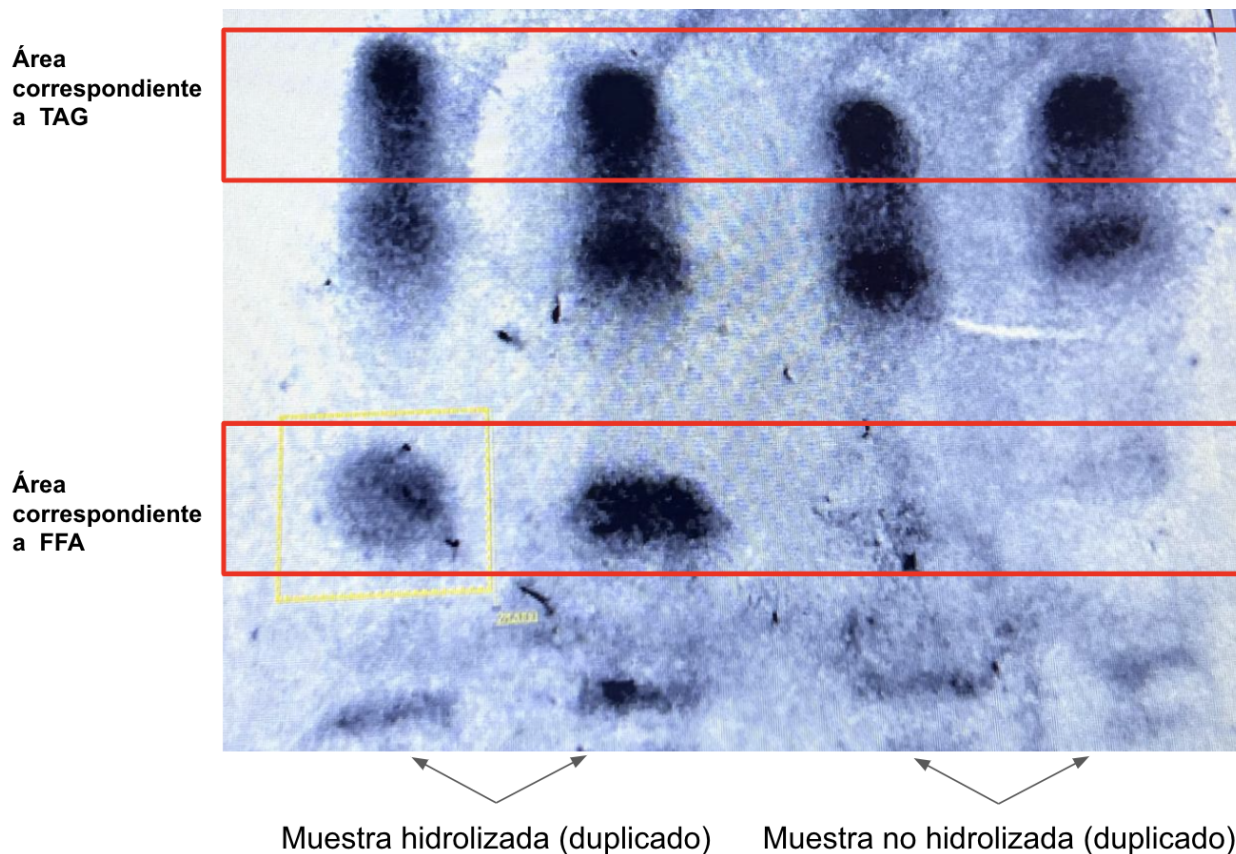


Figura 16. TLC comparativa utilizada para realizar el rendimiento de hidrólisis enzimática.

Se reconoce que la cantidad de cLA en la leche bovina es ampliamente variable, siendo influida por la alimentación, los períodos de lactancia del animal y las razas (6,48,133). En este trabajo nos propusimos analizar la concentración de NO₂-cLA y cLA en muestras de leche controladas, provenientes de 9 animales con genética NZ y USA para el análisis de NO₂cLA y provenientes de 6 (NZ) y 7 (USA) animales para el análisis de cLA, en diferentes periodos de lactancia, temprana (EL), y tardía (LL). La determinación de la concentración de NO₂-cLA se llevó a cabo teniendo en cuenta un rendimiento de hidrólisis enzimática de un 85%, el cual fué previamente caracterizado y estimado mediante TLC (Figura 16). La Figura 17 muestra que los niveles de NO₂-cLA tuvieron una media de 2.1 μ M para NZ-EL, 1.4 μ M para NZ-LL, 2.0 μ M para USA-EL y 1.5 μ M para USA-LL. No se pudieron detectar diferencias significativas en los niveles de NO₂-cLA entre las dos razas. Tampoco se observó una diferencia significativa en los

niveles de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ entre la lactancia temprana y tardía para ninguna de las dos genéticas.

En lo que respecta a los niveles totales de cLA, se observó una dispersión importante entre animales, con una media de $368 \mu\text{M}$ para NZ-EL, $333 \mu\text{M}$ para NZ-LL, $403 \mu\text{M}$ para USA-EL y $326 \mu\text{M}$ para USA-LL (Figura 17). A pesar de esto, los niveles de cLA en los bovinos en lactancia temprana (USA-EL) fueron significativamente mayores (aprox. +20%) comparado a los niveles en lactancia tardía (USA-LL). En comparación, no se registraron diferencias significativas en los niveles de cLA entre los dos periodos de lactancia para la genética NZ (Figura 17B).

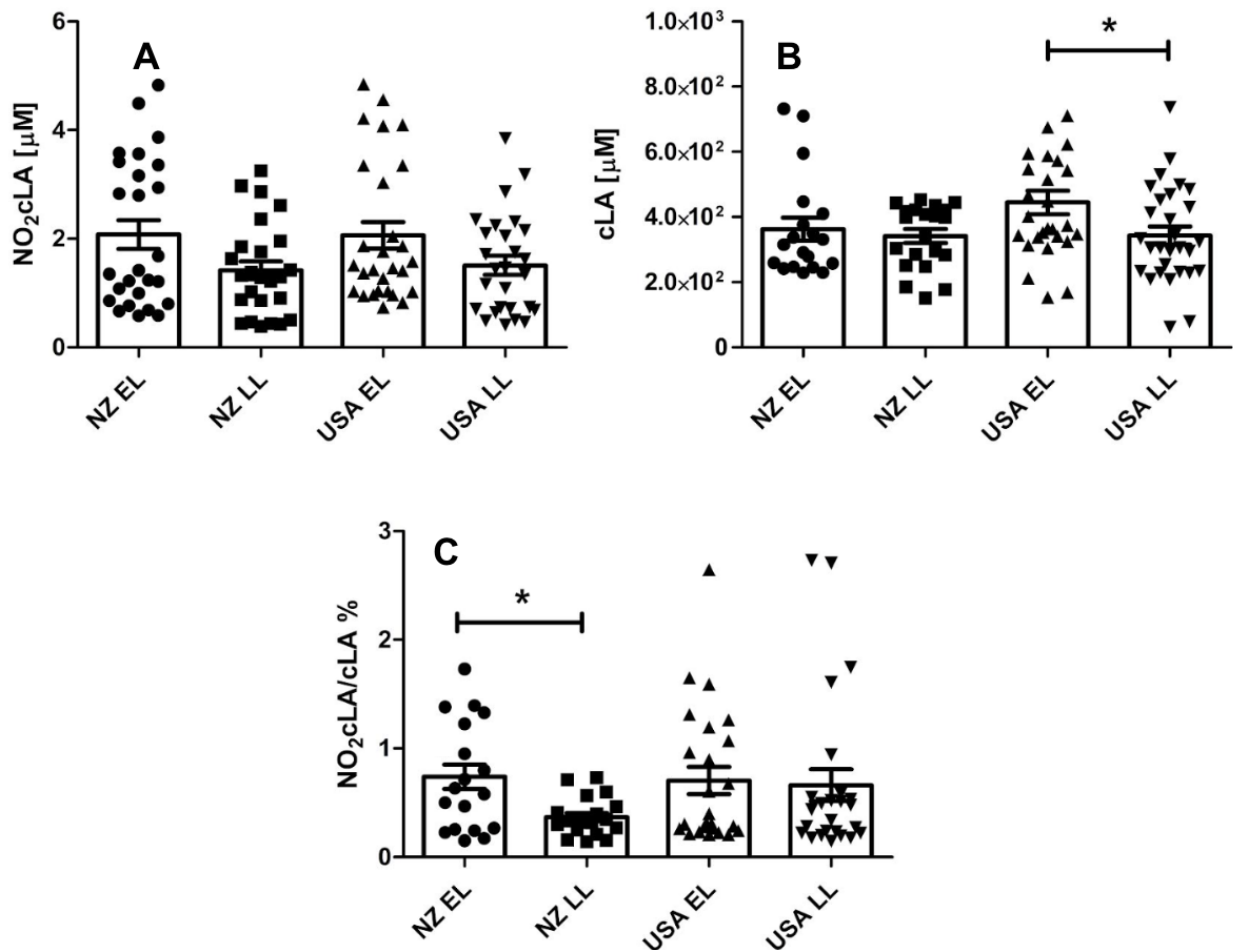


Figura 17. Niveles totales de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ y cLA en leche de bovinos de diferentes razas y periodos de lactancia. A) $\text{NO}_2\text{-cLA}$, $n=27$ para NZ y USA B) cLA, $n=18$ (NZ) y

*n=24 (USA), C) Porcentaje NO₂-cLA/cLA calculado para cada animal, n=18 (NZ) y n=24 (USA). Cada punto es una determinación independiente de los animales con un n=9 de las dos genéticas (USA y NZ) para la determinación de NO₂cLA, con respecto al cLA se utilizó un n=6 para NZ y n=8 para USA y finalmente para NO₂cLA/cLA % se utilizó un n=6 para NZ y n=8 para USA. NZ-EL: Bovinos neozelandeses durante lactancia temprana, NZ-LL: Bovinos neozelandeses durante lactancia tardía, USA-EL: Bovinos de origen americano durante lactancia temprana, USA-LL: Bovinos de origen americano durante lactancia tardía. La Figura muestra la dispersión de valores para diferentes determinaciones y las medias ± SEM. * señala una diferencia significativa *p<0.1 calculado por el t-test no pareado de varianzas no homogéneas (Mann Whitney test).*

De la misma manera, se calculó, para cada muestra, el porcentaje de cLA que se encuentra nitrado. Como muestra la Figura 17C, el NO₂-cLA representó entre 0.2% a 2.7% de cLA total. La comparación entre grupos de bovinos mostró un aumento significativo del porcentaje de NO₂-cLA/cLA en la lactancia temprana (0.7%) en comparación con lactancia tardía (0.2%) de la raza NZ. Por otro lado, para la raza USA el porcentaje de NO₂-cLA se mantuvo cercano al 0.6% en los dos periodos de lactancia.

A partir de estos datos, se analizó la correlación entre los niveles de NO₂-cLA y cLA para cada muestra de leche en la cual se analizó cLA y NO₂cLA teniendo en cuenta las dos genéticas (NZ y USA) y los dos periodos de lactancia (temprana y tardía). La Figura 18 muestra la existencia de una relación monótona débil (*coeficiente Spearman* r=0.3241) entre ambos ácidos grasos, mostrando que en promedio ante un mayor nivel de cLA se encuentra también un mayor nivel de NO₂cLA.

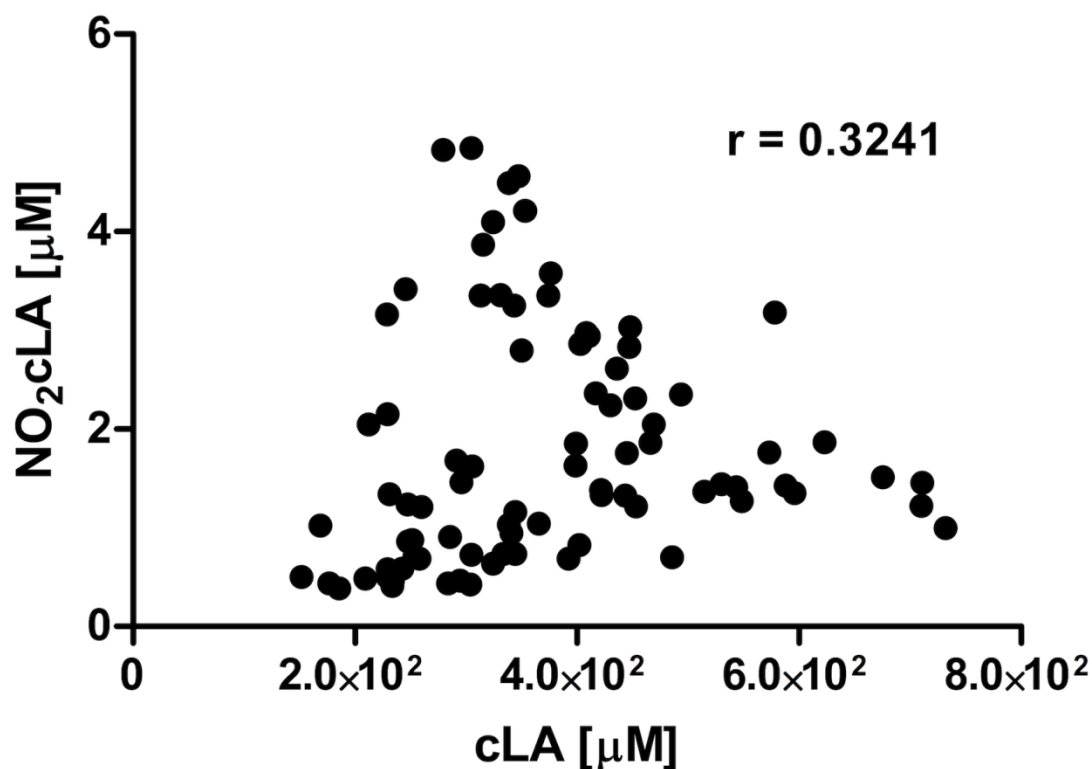


Figura 18. Correlación entre los niveles de cLA y NO_2cLA en leche bovina. El conjunto de valores de concentración de cLA y NO_2cLA para cada animal mostrados en la Figura 17, fueron graficados para analizar su correlación. La distribución de valores, así como el coeficiente Spearman $r = 0.3241$ obtenido indica que existe una correlación en los niveles de ambos ácidos grasos. Intervalo de confianza=95%, Prueba estadística de dos colas, coeficiente de correlación de Spearman.

El análisis comparativo de cLA y de NO_2cLA en muestras individuales de leche había permitido establecer que hasta un máximo del 2.7% del cLA lácteo se encuentra nitrado (Figura 17). Sin embargo, cuando se analizó la concentración en leche de NO_2cLA esterificado versus no-esterificado, se observó que mientras que más del 97% de cLA estaba esterificado, la gran mayoría del NO_2cLA se encontró como ácido graso libre no esterificado (Figura 19.a y 19.b). Por lo tanto, el cálculo del porcentaje de NO_2cLA no esterificado sobre cLA no esterificado fue de aproximadamente un 10% (Figura 19.c).

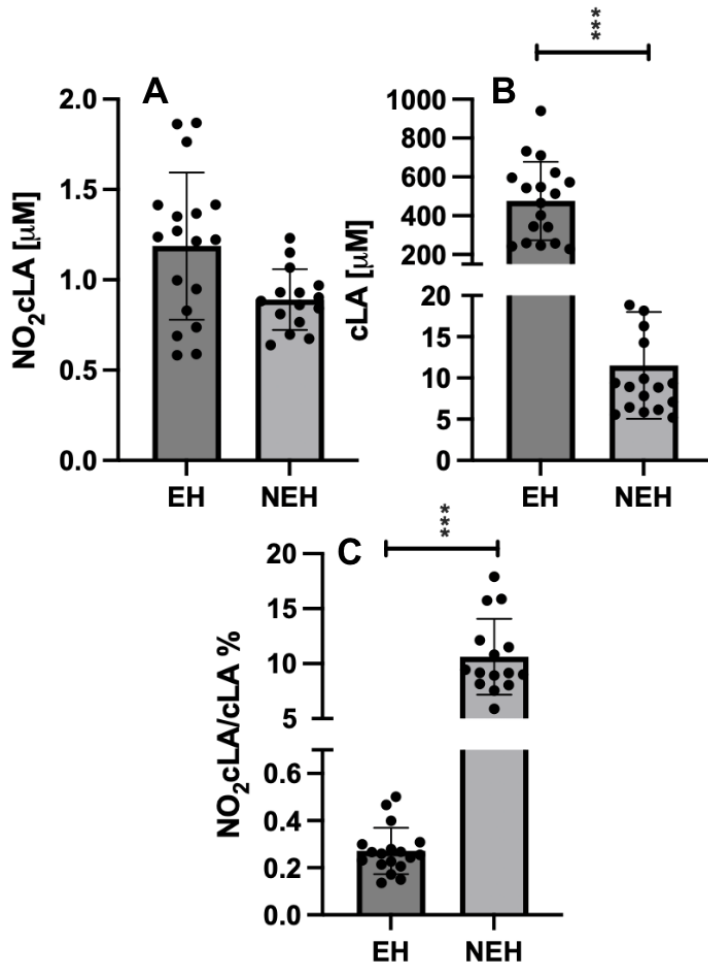


Figura 19. Cuantificación comparativa entre los niveles de NO₂-cLA y cLA esterificados y no esterificados en leche bovina. Muestras de leche provenientes de 6 animales representativos, fueron procesadas en paralelo y por triplicado (n=3) en condiciones de hidrólisis enzimática de triglicéridos y fosfolípidos (EH) y sin hidrólisis enzimática (NEH), antes de su cuantificación por LC/MS. **A)** Niveles de NO₂-cLA lácteo antes y después de la hidrólisis enzimática, mostrando que la mayoría de NO₂-cLA se encuentra no-esterificado. **B)** Niveles de cLA lácteo antes y después de la hidrólisis enzimática, mostrando que la mayoría de cLA se encuentra esterificado. **C)** Porcentaje NO₂-cLA/cLA esterificado y no-esterificados calculado en las mismas muestras. La Figura muestra la dispersión de valores para diferentes determinaciones y las medias ± SEM. * señala una diferencia significativa, ***p<0.001 calculado por el t-test no pareado de varianzas no homogéneas (Mann Whitney test).

Discusión

En este trabajo de Tesis, hemos analizado la hipótesis de que la leche bovina contiene niveles micromolares de NO₂-FA endógenos. Esta investigación tiene particular interés puesto que los NO₂-FA ejercen funciones fisiológicas únicas y diferentes a otros FA, pudiendo posicionarse como una nueva clase de nutrientes presentes en alimentos lácteos. Si bien hasta el presente no existen reportes en la literatura mostrando la existencia de NO₂-FAs en la leche de mamíferos, es posible anticipar la formación de NO₂-cLA teniendo en cuenta la presencia, estabilidad y particular reactividad del cLA de la leche bovina. En esta investigación nos hemos propuesto adaptar técnicas basadas en HPLC-MS/MS, para el análisis cualitativo y cuantitativo de cLA y NO₂-cLA en leche bovina. Nuestra investigación demuestra por primera vez en la literatura, que la leche de vacas lecheras alimentadas con alto porcentaje de pasto contiene niveles micromolares de NO₂-cLA (rango 0.4 - 4.8 μM), que representan hasta el 2,7% del cLA lácteo total. La investigación también muestra evidencias de que la totalidad o la gran mayoría del NO₂-cLA lácteo se encuentra como ácido graso libre no esterificado, en comparación con el cLA que se encuentra principalmente esterificado, y que se puede formar en a partir del cLA en presencia de nitrito y en condiciones de acidez gástrica. En suma, este trabajo de tesis demuestra que el NO₂-cLA de la leche bovina puede ser analizado y cuantificado con precisión utilizando espectrometría de masas, lo que permitiría el análisis sistemático de NO₂-cLA en leche de consumo y derivados lácteos.

Nuestros resultados muestran formalmente la existencia de concentraciones micromolares de NO₂-cLA lácteo, en virtud de que la presencia de NO₂-FAs en leche bovina o incluso de mamíferos no ha sido reportada en la literatura hasta ahora. En base a los conocimientos disponibles sobre formación y concentración de NO₂-cLA endógeno en tejidos y fluidos de mamíferos (34, 66, 70), se podía anticipar que la leche podría contener NO₂-FAs, particularmente NO₂-cLA. Concentraciones significativas de NO₂-cLA han sido detectadas en plasma y orina en el ser humano (130). Se ha especulado que el origen del mismo podría ser el consumo de alimentos lácteos ricos en cLA, a través de un proceso de nitración gástrica en el ser humano o bien a través

de la nitración tisular del cLA, por mecanismos que pueden involucrar la generación de especies nitrantes a partir de mitocondrias o procesos inflamatorios (34,65,128). En el presente trabajo hemos utilizado metodologías publicadas por otros autores para analizar NO₂-FAs en tejidos o fluidos biológicos (64–66,70) para analizar en detalle los NO₂-FAs de la leche bovina. Sin embargo, estos métodos no habían sido utilizados previamente en muestras de leche de mamíferos, por lo que nuestro trabajo contribuye con métodos cualitativos y cuantitativos para su determinación, que incluyen procedimientos de extracción, purificación, seguido de separación y cuantificación por HPLC-MS/MS haciendo uso de estándares internos como ¹⁵NO₂-cLA y NO₂-SA. Por otro lado, es importante hacer notar que el único NO₂-FAs que hemos detectado en la leche fue el NO₂-cLA, con una ausencia notable de nitración de otros FA mono- y poli-insaturados como ácido linolénico y OA. Esto puede deberse a que el cLA tiene mayor susceptibilidad a reaccionar con NO₂⁻ en medio ácido para formar el correspondiente NO₂-FAs debido a su grupo dieno conjugado sumamente reactivo (70).

Si bien se reconoce que NO₂-cLA es un nitroalqueno que puede reaccionar con grupos tioles para formar aductos (64,70), en este trabajo analizamos si la reactividad del NO₂-cLA lácteo como una forma de confirmar indirectamente su identidad molecular. Un interés adicional de este estudio sobre la reactividad electrófila del NO₂-cLA es diferenciarlo del NO₂LA, el cual es una molécula isobárica con el NO₂-cLA (64). Nuestro hallazgo que el NO₂-cLA lácteo forma aductos con BME, de la misma forma que el estándar [¹⁵]NO₂-cLA (64,65), representa una fuerte evidencia de que efectivamente se trata de una molécula con idéntica masa, estructura y reactividad como nitroalqueno que el NO₂-cLA. De la misma forma, la reactividad del NO₂-cLA reaccionando con grupos tioles puede dar indicios de posibles funciones fisiológicas similares a otros NO₂-FAs nitroalquenos (34, 64, 70), lo cual permite anticipar su impacto positivo como nutriente funcional.

Nuestros resultados también muestran que el cLA lácteo tiene la reactividad esperada de un sistema alfa-beta insaturado, reaccionando con NO₂⁻ en un medio ácido similar al del compartimiento gástrico para formar NO₂-cLA. Este resultado está de acuerdo a

varios estudios previos que muestran la formación gástrica de NO_2 -FAs a partir de ácidos grasos y nitratos/ NO_2 consumidos en la dieta (65,130). De la misma manera, los bovinos ingieren vegetales con altos niveles de nitratos, potencialmente generando NO_2^- y especies reactivas derivadas del nitrógeno, capaces de reaccionar con cLA a nivel del rumen y abomaso, formando NO_2 -cLA. A su vez, el cLA es un ácido graso con una alta reactividad con NO_2^- en medio ácido, siendo NO_2 -cLA el producto mayoritario y estable de esta reacción (64). En este contexto, la formación de NO_2 -cLA a nivel gástrico dependerá de la ingesta de nitratos y formación de NO_2^- , por ejemplo a través del consumo de pasturas (42,133). También se puede predecir que la formación de NO_2 -cLA dependerá de la cantidad de LA y LnA consumido y transformado a cLA por las bacterias del rumen con actividad saturasa (biohidrogenación) y linoleato isomerasa (formación del doble enlace trans del cLA) (25,42,134).

El análisis comparativo de NO_2 -cLA y cLA lácteo en diferentes cohortes de vacas lecheras representaba un objetivo importante puesto que es reconocido que la cantidad de cLA en la leche bovina está influida por la alimentación, los periodos de lactancia y las razas bovinas (6, 42, 48, 59,132,133). Todas las vacas analizadas en el presente trabajo fueron alimentadas con alto porcentaje de pasto natural, por lo que la variable de la alimentación no ha podido ser analizada en particular. Sin embargo, la concentración de NO_2 -cLA y cLA en animales con genética NZ y USA, y en periodos de lactancia temprana y tardía muestran que los niveles de NO_2 -cLA tuvieron una dispersión significativa, con una media de $2.1 \mu\text{M}$ para NZ-EL, $1.4 \mu\text{M}$ para NZ-LL, $2.0 \mu\text{M}$ para USA-EL y $1.5 \mu\text{M}$ para USA-LL, por lo que se puede concluir que el NO_2 -cLA es un ácido graso abundante en bovinos independientemente de variables genéticas o fisiológicas. En comparación, los niveles totales de cLA también mostraron una dispersión importante, con una media de $368 \mu\text{M}$ para NZ-EL, $333 \mu\text{M}$ para NZ-LL, $403 \mu\text{M}$ para USA-EL y $326 \mu\text{M}$ para USA-LL. En su conjunto, nuestros resultados indican que hasta un máximo del 2.7% del cLA lácteo se encuentra nitrado, lo que es una proporción significativa.

A partir de estas determinaciones, también procedimos a hacer la correlación entre los niveles de cLA y NO₂-cLA en muestras individuales de leche bovina. Si la formación de NO₂-cLA fuera exclusivamente a nivel digestivo y sin mediar otras variables diferenciales, se podría esperar una correlación positiva entre ambos ácidos grasos. Nuestro estudio de correlación de cLA y NO₂-cLA utilizando el test de spearman muestra la existencia de una relación monótona débil ($r=0.3241$), sugiriendo que los niveles de NO₂-cLA son dependientes de su precursor biosintético cLA por tanto, en términos generales, se comportaron como variables dependientes. Por lo tanto, si la formación de cLA es preferentemente a nivel digestivo, nuestros resultados apoyan que muy posiblemente el cLA se esté nitrando en el compartimento digestivo y que luego este se incorpora en la glándula mamaria a la leche. A su vez, este comportamiento podría estar reflejado en diferentes niveles de esterificación de cLA y NO₂-cLA a triglicéridos y fosfolípidos en la leche. Si bien es conocido que el cLA es transportado a nivel glandular y eventualmente esterificado enzimáticamente antes de ser secretado hacia la leche (7,8,42,134), se desconoce si el NO₂-cLA teniendo una reactividad de nitroalqueno puede seguir el mismo mecanismo o bien rutas metabólicas diferentes.

Si bien esta Tesis no tuvo como objetivo inicial estudiar la esterificación de los NO₂-FAs lácteos, aquí hicimos un estudio preliminar en donde cada muestra de leche fue sujeta a hidrólisis enzimática basado en tratamiento con lipasas y fosfolipasas, para liberar los FFA esterificados, lo que permitió calcular los niveles de esterificación tanto de cLA como de NO₂-cLA. Los resultados mostraron que más del 97% de cLA estaba esterificado, lo que está de acuerdo con publicaciones previas (42). Sin embargo, observamos que la gran mayoría del NO₂-cLA se encontró como ácido graso libre no esterificado, con un porcentaje de NO₂-cLA no esterificado sobre cLA no esterificado de aproximadamente 10%. La tasa de esterificación diferencial entre cLA y NO₂-cLA sugiere diferentes mecanismos de metabolismo e incorporación a la leche, que deberán ser estudiados en futuras investigaciones. Teniendo en cuenta que a nivel de la glándula mamaria los FFA son incorporados como FFA libres insaturados (135–137), nuestro resultado preliminar sugiere que la incorporación enzimática de NO₂-cLA a triglicéridos y fosfolípidos es menos eficiente, en comparación con cLA. Este resultado

permite aventurar la hipótesis de que el NO₂-cLA lácteo podría estar formándose en el tracto digestivo, particularmente en el pH ácido del abomaso y, luego de ser transportado por el torrente sanguíneo y ser captado por la glándula mamaria como NO₂-cLA libre (Figura 20). En bovinos, el NO₂-cLA podría ser incorporado enzimáticamente a triglicéridos y fosfolípidos en forma menos eficiente que el cLA, circulando al menos en parte en forma no-esterificada hasta la glándula mamaria. No se puede descartar completamente que las células epiteliales mamarias tengan transportadores específicos para NO₂-cLA, o bien que exista un mecanismo de nitración del cLA no esterificado a nivel mamario.

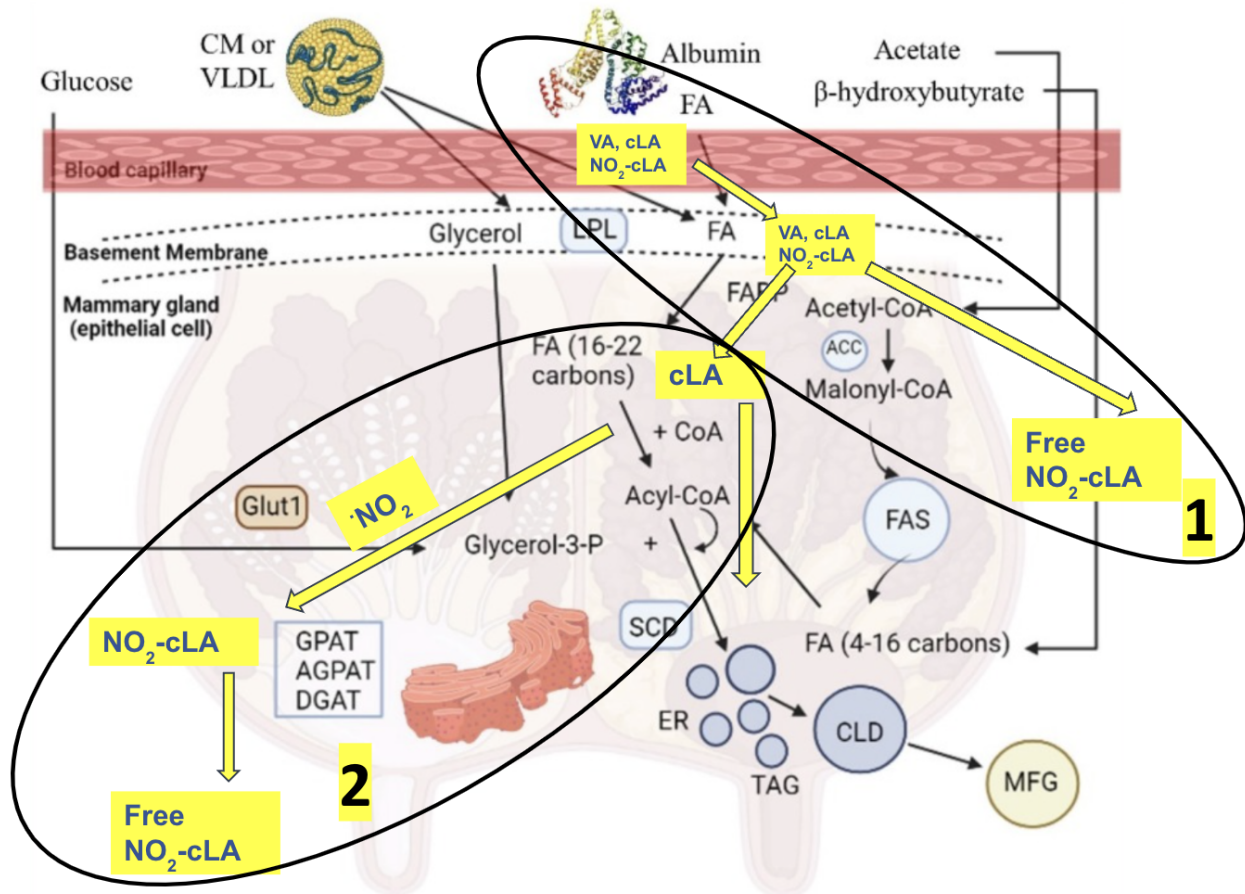


Figura 20. Hipótesis sobre el origen de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ lácteo generado en el tracto digestivo y/o en la glándula mamaria. 1) Vía directa de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ hacia la leche ya preformado en el tracto digestivo. 2) Vía de síntesis de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ a nivel de la glándula mamaria para luego incorporarse en la leche. Abreviaturas: $\cdot\text{NO}_2$ = ión nitrito, Free $\text{NO}_2\text{-cLA}$ = $\text{NO}_2\text{-cLA}$ no-esterificado, ACC= acetil-CoA carboxilasa; AGPAT= acil glicerol fosfato acil transferasa; CD36= transferasa de ácidos grasos (CD36); CLD= gotita de lípidos citoplasmáticos; CoA= coenzima A; CM= quilomicrón; DGAT= diacilglicerol aciltransferasa; RE= retículo endoplásmico; FA= ácido graso; FABP= proteína de unión a ácidos grasos; FAS= ácido graso sintasa; Glut1= transportador de glucosa 1; GPAT= glicerol-3 fosfato aciltransferasa; LPL= lipoproteína lipasa; MFG= glóbulo de grasa láctea; SCD= estearoil-CoA desaturasa; TAG= triglicérido; VLD= Lipoproteína de muy baja densidad. Esquema modificado tomado de Kyriakaki et al, 2022 (137).

El método analítico utilizado en esta Tesis podría utilizarse para futuras investigaciones que determinen cómo se regula el NO₂-cLA lácteo y sus isómeros, y cómo se puede optimizar la producción de leche “enriquecida” en NO₂-cLA. En virtud de que el NO₂-cLA tiene reconocidos efectos beneficiosos para la salud, derivado de su capacidad electrofílica capaz de modular procesos fisiológicos e inflamatorios, es posible que la leche enriquecida en NO₂-cLA pueda ser reconocida como un alimento funcional y saludable. El método analítico para NO₂-cLAs lácteo permitiría determinar los factores genéticos y regímenes alimentarios que regulan su concentración, de forma de posicionar la leche bovina y sus derivados como una fuente natural NO₂-cLA con un potencial impacto beneficioso para la salud.

Si bien el presente trabajo muestra formalmente la presencia de NO₂-cLA en leche bovina y caracteriza sus rangos de concentraciones absolutas y relativas a cLA, así como su formación en condiciones de nitración en el tracto digestivo *in vitro*, nuestra investigación presenta algunas limitaciones. Por ejemplo, nuestro trabajo no ha identificado los diferentes isómeros del NO₂-cLA lácteo, lo que podría aportar datos interesantes sobre especies de NO₂-FAs con efectos biológicos particulares. Es reconocido que el isómero mayoritario de cLA (cis-9,trans-11) tiene efectos protectores a nivel cardiovascular (139), lo que predice tentativamente una actividad biológica diferencial de ciertos isómeros de NO₂-cLA. Sin embargo, el análisis de isómeros de NO₂-cLA es experimentalmente complejo y requiere de equipos de MS de mayor resolución (Orbitrap o QTOF), así como de una batería de estándares internos puros de cada isómero.

Conclusiones y perspectivas

En esta tesis de maestría hemos desarrollado una técnica analítica basada en HPLC-MS/MS para determinar NO₂-cLA en la leche bovina y mostramos por primera vez la ocurrencia de concentraciones micromolares de NO₂-cLA lácteo, el cual parece encontrarse predominantemente en forma no-esterificada. Se reconoce que concentraciones micromolares de NO₂-cLA tienen funciones fisiológicas modulando la expresión génica controlada por factores de transcripciones, resultando en efectos antiinflamatorios y de regulación metabólica en sistemas biológicos (70,119,130). Esto sugiere la importancia del NO₂-cLA lácteo como ácido graso modificado de alto valor nutricional.

Los niveles de cLA y NO₂-cLA mostraron una correlación significativa, sugiriendo que el NO₂-cLA lácteo es regulado por la cantidad de cLA. A su vez, descubrimos que el NO₂-cLA en la leche se encontraría mayoritariamente en forma no-esterificada, en contraposición al cLA. Si se considera que NO₂-cLA en plasma u orina humana se encuentra esterificado en un 99% (66), la leche bovina parece ser una fuente biológica única de NO₂-cLA no-esterificado.

La determinación de NO₂-cLA por MS/MS en leche vacuna abre grandes perspectivas para la comprensión de cómo se regulan los NO₂-FAs en la leche, así como los posibles beneficios nutricionales que éstos pueden provocar en los consumidores de leche. Estudios previos han mostrado que el cLA ejerce efectos anticancerígenos (30,31,140). En seres humanos, la ingesta de cLA entre 15 y 150 mg/día, tiene efectos favorables en la regulación del metabolismo lipídico, así como en el sistema cardiovascular (22,31,141,142). Resta por analizar, en qué medida estos efectos adjudicados hasta ahora al consumo de cLA están mediados por especies de NO₂-cLA, teniendo en cuenta su reactividad como nitroalqueno electrófilo, actuando en varios blancos moleculares como los sistemas de señalización ARE/Nrf2, NFκB y PPRgamma (105,129,143,144).

De confirmarse que el NO₂-cLA lácteo aporta beneficios para la salud luego de su ingesta, este podría posicionarse como un nutriente de alto interés fisiológico y nutracéutico. Las técnicas analíticas desarrolladas en este trabajo podrían ser aplicadas para la selección de razas, formas de alimentación y período de lactancia que aportan altos niveles de NO₂-cLA. Eventualmente, también se podría utilizar para estandarizar los niveles de NO₂-cLA en productos o subproductos lácteos comerciales.

Otra perspectiva importante de nuestra investigación es extender nuestra metodología al descubrimiento de NO₂-cLA en leche humana, ya que este nutriente aún no ha sido analizado en personas sanas o en casos de enfermedad.

Referencias

1. <https://www.inale.org/uruguay-lechero/>.
2. Hayakawa S, Nakai S. Relationships of Hydrophobicity and Net Charge to the Solubility of Milk and Soy Proteins. *J Food Sci*. 2006 Aug 25;50(2):486–91.
3. Jensen RG. *J Dairy Sci*. 2002 Feb;85(2):295–350.
4. Walstra P. On the Stability of Casein Micelles. *J Dairy Sci*. 1990 Aug;73(8):1965–79.
5. Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest Prod Sci*. 2001 Jul;70(1–2):31–48.
6. Roche JR, Petch S, Kay JK. Manipulating the Dietary Cation-Anion Difference via Drenching to Early-Lactation Dairy Cows Grazing Pasture. *J Dairy Sci*. 2005 Jan;88(1):264–76.
7. Bernard L, Toral PG, Chilliard Y. Comparison of mammary lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J Dairy Sci*. 2017 Nov;100(11):9338–51.
8. Lacasse P, Farr VC, Davis SR, Prosser CG. Local Secretion of Nitric Oxide and the Control of Mammary Blood Flow. *J Dairy Sci*. 1996 Aug;79(8):1369–74.
9. Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis*. 2007;6(1):25.
10. Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *J Dairy Sci*. 2000 Jun;83(6):1187–95.
11. Lindmark-Månsson H, Åkesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr*. 2000 Nov;84(S1):103–10.
12. Jensen RG. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci*. 2002 Feb;85(2):295–350.
13. Lock AL, Bauman DE. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*. 2004 Dec;39(12):1197–206.
14. Grundy S. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 1994 Dec;60(6):S986–90.

15. Thormar H, Isaacs CE, Kim K, Brown HR. Inactivation of Visna Virus and Other Enveloped Viruses by Free Fatty Acids and Monoglycerides.: INACTIVATION OF ENVELOPED VIRUSES. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 May;724(1 Slow Infectio):465–71.
16. Sun CQ, O'Connor CJ, Roberton AM. The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chem Biol Interact.* 2002 May;140(2):185–98.
17. Henry GE, Momin RA, Nair MG, Dewitt DL. Antioxidant and Cyclooxygenase Activities of Fatty Acids Found in Food. *J Agric Food Chem.* 2002 Apr 1;50(8):2231–4.
18. Kris-Etherton PM, Pearson TA, Wan Y, Hargrove RL, Moriarty K, Fishell V, et al. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am J Clin Nutr.* 1999 Dec;70(6):1009–15.
19. De Caterina R, Zampolli A. Antiatherogenic effects of n-3 fatty acids - evidence and mechanisms. *Heart Int.* 2006 Dec 15;2(3–4):141.
20. Basak S, Duttaroy AK. Conjugated Linoleic Acid and Its Beneficial Effects in Obesity, Cardiovascular Disease, and Cancer. *Nutrients.* 2020 Jun 28;12(7):1913.
21. den Hartigh L. Conjugated Linoleic Acid Effects on Cancer, Obesity, and Atherosclerosis: A Review of Pre-Clinical and Human Trials with Current Perspectives. *Nutrients.* 2019 Feb 11;11(2):370.
22. Evans ME, Brown JM, McIntosh MK. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem.* 2002 Sep;13(9):508–16.
23. Wahle KWJ, Heys SD, Rotondo D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res.* 2004 Nov;43(6):553–87.
24. Delmonte P, Kataoka A, Corl BA, Bauman DE, Yurawecz MP. Relative retention order of all isomers of cis/trans conjugated linoleic acid FAME from the 6,8- to 13,15-positions using silver ion HPLC with two elution systems. *Lipids.* 2005 May;40(5):509–14.
25. Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ, Bauman DE. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. In: *Advances in Food and Nutrition Research* [Internet]. Elsevier; 2005 [cited 2023 Mar 6]. p. 179–217. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452605500068>

26. Renner L, Kersten S, Duevel A, Schuberth HJ, Dänicke S. Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid, linoleic acid, phytanic acid and the combination of various fatty acids on proliferation and cytokine expression of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Nutrients*. 2013 Jul 12;5(7):2667–83.
27. He X, Ma Q. NRF2 Cysteine Residues Are Critical for Oxidant/Electrophile-Sensing, Kelch-Like ECH-Associated Protein-1-Dependent Ubiquitination-Proteasomal Degradation, and Transcription Activation. *Mol Pharmacol*. 2009 Dec;76(6):1265–78.
28. Tricon S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Jones EL, et al. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2004 Nov;80(3):614–20.
29. Valeille K, Gripois D, Blouquit MF, Souidi M, Riottot M, Bouthegourd JC, et al. Lipid atherogenic risk markers can be more favourably influenced by the *cis* -9, *trans* -11-octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *Br J Nutr*. 2004 Feb;91(2):191–9.
30. Parodi PW. Conjugated Linoleic Acid and Other Anticarcinogenic Agents of Bovine Milk Fat. *J Dairy Sci*. 1999 Jun;82(6):1339–49.
31. Lp C, Scimeca JA, Thompson HJ. Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer*. 1994 Aug 1;74(S3):1050–4.
32. Ochoa JJ. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis*. 2004 Jan 16;25(7):1185–91.
33. Woodcock SR, Salvatore SR, Bonacci G, Schopfer FJ, Freeman BA. Biomimetic Nitration of Conjugated Linoleic Acid: Formation and Characterization of Naturally Occurring Conjugated Nitrodienes. *J Org Chem*. 2014 Jan 3;79(1):25–33.
34. Villacorta L, Minarrieta L, Salvatore SR, Khoo NK, Rom O, Gao Z, et al. In situ generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol*. 2018 May;15:522–31.
35. Yang L, Leung LK, Huang Y, Chen ZY. Oxidative Stability of Conjugated Linoleic Acid Isomers. *J Agric Food Chem*. 2000 Aug 1;48(8):3072–6.

36. Hurst S, Bunde T. The Effects of Pasteurization Types on the Content and Isomerization of Conjugated Linoleic Acid in Milk. *FASEB J* [Internet]. 2019 Apr [cited 2023 Sep 27];33(S1). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.796.4
37. Kyriazakis I, Oldham JD. Food intake and diet selection in sheep: the effect of manipulating the rates of digestion of carbohydrates and protein of the foods offered as a choice. *Br J Nutr*. 1997 Feb;77(2):243–54.
38. Dhiman TR, Anand GR, Satter LD, Pariza MW. Conjugated Linoleic Acid Content of Milk from Cows Fed Different Diets. *J Dairy Sci*. 1999 Oct;82(10):2146–56.
39. Chouinard PY, Corneau L, Barbano DM, Metzger LE, Bauman DE. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J Nutr*. 1999 Aug;129(8):1579–84.
40. Jenkins TC, McGuire MA. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *J Dairy Sci*. 2006 Apr;89(4):1302–10.
41. Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *J Dairy Sci*. 2006 Apr;89(4):1235–43.
42. Kay JK, Mackle TR, Auldish MJ, Thomson NA, Bauman DE. Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *J Dairy Sci*. 2004 Feb;87(2):369–78.
43. Kay JK, Mackle TR, Auldish MJ, Thomson NA, Bauman DE. Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *J Dairy Sci*. 2004 Feb;87(2):369–78.
44. Kharitonov E. The Processes of Nutrition and Metabolism Affecting the Biosynthesis of Milk Components and Vitality of Cows with High- and Low-Fat Milk. *Animals*. 2022 Feb 28;12(5):604.
45. Mosley EE, Shafiq B, Moate PJ, McGuire MA. cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Directly from Vaccenic Acid in Lactating Dairy Cattle. *J Nutr*. 2006 Mar;136(3):570–5.
46. Acosta Balcazar IC, Granados Rivera LD, Salinas Chavira J, Estrada Drouaillet B, Albarrán MR, Bautista Martínez Y. Relationship between the Composition of Lipids in Forages and the Concentration of Conjugated Linoleic Acid in Cow's Milk: A

- Review. *Animals*. 2022 Jun 24;12(13):1621.
47. Plata-Pérez G, Angeles-Hernandez JC, Morales-Almaráz E, Del Razo-Rodríguez OE, López-González F, Peláez-Acero A, et al. Oilseed Supplementation Improves Milk Composition and Fatty Acid Profile of Cow Milk: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Animals*. 2022 Jun 26;12(13):1642.
 48. Bauman DE, Perfield JW, Harvatine KJ, Baumgard LH. Regulation of Fat Synthesis by Conjugated Linoleic Acid: Lactation and the Ruminant Model , ,. *J Nutr*. 2008 Feb;138(2):403–9.
 49. Santora JE, Palmquist DL, Roehrig KL. Trans-Vaccenic Acid Is Desaturated to Conjugated Linoleic Acid in Mice. *J Nutr*. 2000 Feb;130(2):208–15.
 50. Gläser K, Wenk C, Scheeder MRL. Effects of Feeding Pigs Increasing Levels of C 18:1 *Trans* Fatty Acids on Fatty Acid Composition of Backfat and Intramuscular Fat as well as Backfat Firmness. *Arch Für Tierernaehrung*. 2002 Apr;56(2):117–30.
 51. Turpeinen AM, Mutanen M, Aro A, Salminen I, Basu S, Palmquist DL, et al. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans,,. *Am J Clin Nutr*. 2002 Sep;76(3):504–10.
 52. García SC. 2002. Desafíos y oportunidades para el establecimiento de sistemas estacionales de producción de leche en Argentina y Uruguay. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría. pp: 15-21.
 53. Chilbroste P. 2015. ¿Carga o producción individual? ¿Pasto o concentrado? Mitos y realidades en la intensificación de sistemas de producción de leche en Uruguay. XLIII. Jornadas Uruguayas de Buiatría. pp: 158-162.
 54. Dillon P. Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. In: Elgersma A, Dijkstra J, Tamminga S, editors. *Fresh herbage for dairy cattle* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2006 [cited 2023 Mar 6]. p. 1–26. (Wageningen UR Frontis Series; vol. 18). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-5452-5_1
 55. Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest Prod Sci*. 2001 Jul;70(1–2):31–48.

56. Drackley JK. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *J Dairy Sci.* 1999 Nov;82(11):2259–73.
57. McCarthy SD, Waters SM, Kenny DA, Diskin MG, Fitzpatrick R, Patton J, et al. Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. *Physiol Genomics.* 2010 Nov;42A(3):188–99.
58. Lucy MC, Verkerk GA, Whyte BE, Macdonald KA, Burton L, Cursons RT, et al. Somatotrophic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J Dairy Sci.* 2009 Feb;92(2):526–39.
59. Kolver ES, Muller LD. Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *J Dairy Sci.* 1998 May;81(5):1403–11.
60. Fulkerson WJ, Davison TM, Garcia SC, Hough G, Goddard ME, Dobos R, et al. Holstein-Friesian Dairy Cows Under a Predominantly Grazing System: Interaction Between Genotype and Environment. *J Dairy Sci.* 2008 Feb;91(2):826–39.
61. Lima ÉS, Di Mascio P, Rubbo H, Abdalla DSP. Characterization of Linoleic Acid Nitration in Human Blood Plasma by Mass Spectrometry. *Biochemistry.* 2002 Aug 1;41(34):10717–22.
62. Lima ES, Di Mascio P, Abdalla DSP. Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J Lipid Res.* 2003 Sep;44(9):1660–6.
63. Baker PRS, Schopfer FJ, Sweeney S, Freeman BA. Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: Synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Aug 10;101(32):11577–82.
64. Bonacci G, Baker PRS, Salvatore SR, Shores D, Khoo NKH, Koenitzer JR, et al. Conjugated Linoleic Acid Is a Preferential Substrate for Fatty Acid Nitration. *J Biol Chem.* 2012 Dec;287(53):44071–82.
65. Fazzari M, Trostchansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sánchez-Calvo B, Vitturi D, et al. Olives and Olive Oil Are Sources of Electrophilic Fatty Acid Nitroalkenes. Sladek FM, editor. *PLoS ONE.* 2014 Jan 14;9(1):e84884.

66. Salvatore SR, Vitturi DA, Baker PRS, Bonacci G, Koenitzer JR, Woodcock SR, et al. Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J Lipid Res.* 2013 Jul;54(7):1998–2009.
67. Delmastro-Greenwood M, Hughan KS, Vitturi DA, Salvatore SR, Grimes G, Potti G, et al. Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic Biol Med.* 2015 Dec;89:333–41.
68. Schopfer FJ, Khoo NKH. Nitro-Fatty Acid Logistics: Formation, Biodistribution, Signaling, and Pharmacology. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2019 Aug;30(8):505–19.
69. Rudolph V, Rudolph TK, Schopfer FJ, Bonacci G, Woodcock SR, Cole MP, et al. Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2010 Jan 1;85(1):155–66.
70. Turell L, Vitturi DA, Coitiño EL, Lebrato L, Möller MN, Sagasti C, et al. The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid. *J Biol Chem.* 2017 Jan;292(4):1145–59.
71. Lamas Bervejillo M, Bonanata J, Franchini GR, Richeri A, Marqués JM, Freeman BA, et al. A FABP4-PPAR γ signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol.* 2020 Jan;29:101376.
72. Fazzari M, Vitturi DA, Woodcock SR, Salvatore SR, Freeman BA, Schopfer FJ. Electrophilic fatty acid nitroalkenes are systemically transported and distributed upon esterification to complex lipids. *J Lipid Res.* 2019 Feb;60(2):388–99.
73. Schopfer FJ, Vitturi DA, Jorkasky DK, Freeman BA. Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide Biol Chem.* 2018 Sep 1;79:31–7.
74. Piesche M, Roos J, Kühn B, Fettel J, Hellmuth N, Brat C, et al. The Emerging Therapeutic Potential of Nitro Fatty Acids and Other Michael Acceptor-Containing Drugs for the Treatment of Inflammation and Cancer. *Front Pharmacol.* 2020;11:1297.
75. Koutoulogenis GS, Kokotos G. Nitro Fatty Acids (NO₂-FAs): An Emerging Class of Bioactive Fatty Acids. *Mol Basel Switz.* 2021 Dec 13;26(24):7536.

76. Wilkinson ML, Gow AJ. Effects of fatty acid nitroalkanes on signal transduction pathways and airway macrophage activation. *Innate Immun.* 2021 Jul;27(5):353–64.
77. Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, et al. Electrophilic Nitro-fatty Acids Activate NRF2 by a KEAP1 Cysteine 151-independent Mechanism. *J Biol Chem.* 2011 Apr;286(16):14019–27.
78. Kansanen E, Jyrkkänen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivelä AM, Häkkinen SK, et al. Nrf2-dependent and -independent Responses to Nitro-fatty Acids in Human Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 2009 Nov;284(48):33233–41.
79. Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PRS, Durán R, Baker LMS, Huang Y, et al. Reversible Post-translational Modification of Proteins by Nitrated Fatty Acids in Vivo. *J Biol Chem.* 2006 Jul;281(29):20450–63.
80. Bago Á, Cayuela ML, Gil A, Calvo E, Vázquez J, Queiro A, et al. Nitro-oleic acid regulates T cell activation through post-translational modification of calcineurin. *Proc Natl Acad Sci.* 2023 Jan 24;120(4):e2208924120.
81. Fang MY, Huang KH, Tu WJ, Chen YT, Pan PY, Hsiao WC, et al. Chemoproteomic profiling reveals cellular targets of nitro-fatty acids. *Redox Biol.* 2021 Oct;46:102126.
82. Villacorta L. Nitro-fatty acids in cardiovascular regulation and diseases characteristics and molecular mechanisms. *Front Biosci.* 2016;21(4):873–89.
83. Schopfer FJ, Cipollina C, Freeman BA. Formation and Signaling Actions of Electrophilic Lipids. *Chem Rev.* 2011 Oct 12;111(10):5997–6021.
84. Zhang J, Villacorta L, Chang L, Fan Z, Hamblin M, Zhu T, et al. Nitro-Oleic Acid Inhibits Angiotensin II–Induced Hypertension. *Circ Res.* 2010 Aug 20;107(4):540–8.
85. Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker Paul RS, et al. Nitrated Fatty Acids: Endogenous Anti-inflammatory Signaling Mediators. *J Biol Chem.* 2006 Nov;281(47):35686–98.
86. Kelley EE, Batthyany CI, Hundley NJ, Woodcock SR, Bonacci G, Del Rio JM, et al. Nitro-oleic Acid, a Novel and Irreversible Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *J Biol Chem.* 2008 Dec;283(52):36176–84.
87. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957

May;226(1):497–509.

88. Jensen SK. Improved Bligh and Dyer extraction procedure. *Lipid Technol.* 2008 Dec;20(12):280–1.
89. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959 Aug;37(8):911–7.
90. Exton JH. New Developments in Phospholipase D. *J Biol Chem.* 1997 Jun;272(25):15579–82.
91. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv.* 2001 Dec;19(8):627–62.
92. Zhou Y, Tian Y, Zhang L, Liu Y, Feng L. Application of Novel Biochars from Maize Straw Mixed with Fermentation Wastewater for Soil Health. In: Zakaria ZA, editor. *Sustainable Technologies for the Management of Agricultural Wastes* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [cited 2023 Mar 6]. p. 25–43. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-5062-6_3
93. Belaunzarán ML, Lammel EM, de Isola ELD. Phospholipases A in Trypanosomatids. *Enzyme Res.* 2011 Apr 5;2011:1–10.
94. Dheyaa Alkarawi. The investigation of the electrical control of hemimicelles on gold for analyte preconcentration. 2016 [cited 2023 Mar 6]; Available from: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.13906.15047>
95. Hennion MC. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1999 Sep 24;856(1–2):3–54.
96. Ötles S, Kartal C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2016;15(1):5–15.
97. Herz MM, Gad MZ, Hanafi RS. Development and Validation of a Bioanalytical Method for the Quantification of Nitrated Fatty Acids in Plasma Using LC-MS/MS: Application to Cardiovascular Patients. *Separations.* 2023 Jan 27;10(2):87.
98. Woodcock SR, Bonacci G, Gelhaus SL, Schopfer FJ. Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jun;59:14–26.
99. Hurst WJ, Tarka SM, Dobson G, Reid CM. Determination of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Concentrations in Milk Chocolate. *J Agric Food Chem.* 2001 Mar 1;49(3):1264–5.

100. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989 Oct 6;246(4926):64–71.
101. Loo JA. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 1997;16(1):1–23.
102. Want EJ. LC-MS Untargeted Analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1738:99–116.
103. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem*. 2012;2012:282574.
104. Sawaya ACHF, Tomazela DM, Cunha IBS, Bankova VS, Marcucci MC, Custodio AR, et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *The Analyst*. 2004 Aug;129(8):739–44.
105. Bonacci G, Ascitto EK, Woodcock SR, Salvatore SR, Freeman BA, Schopfer FJ. Gas-Phase Fragmentation Analysis of Nitro-Fatty Acids. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011 Sep 1;22(9):s13361-011-0185–x.
106. Vetere A, Alachraf MW, Panda SK, Andersson JT, Schrader W. Studying the fragmentation mechanism of selected components present in crude oil by collision-induced dissociation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 2018 Dec 30;32(24):2141–51.
107. Beckman JS, Voinov VG, Hare M, Sturgeon D, Vasil'ev Y, Oppenheimer D, et al. Improved Protein and PTM Characterization with a Practical Electron-Based Fragmentation on Q-TOF Instruments. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2021 Aug 4;32(8):2081–91.
108. AB SCIEX 4500 Series of Instruments System User Guide [Internet]. SCIEX; Available from: <https://collateral.sciex.com/manuals/4500-system-user-guide-en/4500-system-user-guide-en.pdf>
109. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009 Feb;30(1):19–34.
110. Moreiras G, Leão JM, Gago-Martínez A. Design of experiments for the optimization of electrospray ionization in the LC-MS/MS analysis of ciguatoxins. *J*

- Mass Spectrom JMS. 2018 Nov;53(11):1059–69.
111. Commodore JJ, Jing X, Cassady CJ. Optimization of electrospray ionization conditions to enhance formation of doubly protonated peptide ions with and without addition of chromium(III). *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 2017 Jul 15;31(13):1129–36.
 112. Barlow CK, O'Hair RAJ. Gas-phase peptide fragmentation: how understanding the fundamentals provides a springboard to developing new chemistry and novel proteomic tools. *J Mass Spectrom JMS*. 2008 Oct;43(10):1301–19.
 113. Iglesias AH, Santos LFA, Gozzo FC. Collision-induced dissociation of Lys-Lys intramolecular crosslinked peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2009 Apr;20(4):557–66.
 114. Penkert M, Hauser A, Harmel R, Fiedler D, Hackenberger CPR, Krause E. Electron Transfer/Higher Energy Collisional Dissociation of Doubly Charged Peptide Ions: Identification of Labile Protein Phosphorylations. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2019 Sep;30(9):1578–85.
 115. Hübner G, Crone C, Lindner B. Application of sustained off-resonance irradiation infrared multiphoton dissociation tandem mass spectrometry to the analysis of biomolecules. *Eur J Mass Spectrom Chichester Engl*. 2005;11(5):483–7.
 116. Spina E, Sturiale L, Romeo D, Impallomeni G, Garozzo D, Waidelich D, et al. New fragmentation mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight tandem mass spectrometry of carbohydrates. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 2004;18(4):392–8.
 117. Lössl P, van de Waterbeemd M, Heck AJ. The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. *EMBO J*. 2016 Dec 15;35(24):2634–57.
 118. Lin SY, Hsu WH, Lin CC, Chen CJ. Mass spectrometry-based proteomics in Chest Medicine, Gerontology, and Nephrology: subgroups omics for personalized medicine. *BioMedicine*. 2014 Dec;4(4):25.
 119. Tsikas D, Zoerner AA, Mitschke A, Gutzki FM. Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: a targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids*. 2009 Sep;44(9):855–65.

120. Mastrogiovanni M, Trostchansky A, Rubbo H. Data of detection and characterization of nitrated conjugated-linoleic acid (NO₂-cLA) in LDL. *Data Brief*. 2020 Feb;28:105037.
121. Feng WY. Mass spectrometry in drug discovery: a current review. *Curr Drug Discov Technol*. 2004 Dec;1(4):295–312.
122. Fung EN, Xia Y qing, Aubry AF, Zeng J, Olah T, Jemal M. Full-scan high resolution accurate mass spectrometry (HRMS) in regulated bioanalysis: LC-HRMS for the quantitation of prednisone and prednisolone in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011 Oct 1;879(27):2919–27.
123. Bouslimani A, Sanchez LM, Garg N, Dorrestein PC. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Nat Prod Rep*. 2014 Jun;31(6):718–29.
124. Abushareeda W, Vonaparti A, Saad KA, Almansoori M, Meloug M, Saleh A, et al. High resolution full scan liquid chromatography mass spectrometry comprehensive screening in sports antidoping urine analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Mar;151:10–24.
125. Harkewicz R, Dennis EA. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:301–25.
126. McClellan JE, Quarmby ST, Yost RA. Parent and neutral loss monitoring on a quadrupole ion trap mass spectrometer: screening of acylcarnitines in complex mixtures. *Anal Chem*. 2002 Nov 15;74(22):5799–806.
127. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2010 Mar;91(3):502–9.
128. Schopfer FJ, Batthyany C, Baker PRS, Bonacci G, Cole MP, Rudolph V, et al. Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic Biol Med*. 2009 May;46(9):1250–9.
129. Trostchansky A, Souza JM, Ferreira A, Ferrari M, Blanco F, Trujillo M, et al. Synthesis, Isomer Characterization, and Anti-Inflammatory Properties of Nitroarachidonate. *Biochemistry*. 2007 Apr 1;46(15):4645–53.
130. Schopfer FJ, Khoo NKH. Nitro-Fatty Acid Logistics: Formation, Biodistribution,

- Signaling, and Pharmacology. *Trends Endocrinol Metab.* 2019 Aug;30(8):505–19.
131. Rocha BS, Gago B, Barbosa RM, Lundberg JO, Radi R, Laranjinha J. Intra-gastric nitration by dietary nitrite: Implications for modulation of protein and lipid signaling. *Free Radic Biol Med.* 2012 Feb;52(3):693–8.
132. Lundberg JO, Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut.* 2013 Apr;62(4):616–29.
133. Wales WJ, Kolver ES, Egan AR, Roche R. Effects of strain of Holstein-Friesian and concentrate supplementation on the fatty acid composition of milk fat of dairy cows grazing pasture in early lactation. *J Dairy Sci.* 2009 Jan;92(1):247–55.
134. Latham EA, Anderson RC, Pinchak WE, Nisbet DJ. Insights on Alterations to the Rumen Ecosystem by Nitrate and Nitrocompounds. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Mar 4 [cited 2023 Mar 6];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00228/abstract>
135. Knutsen TM, Olsen HG, Tafintseva V, Svendsen M, Kohler A, Kent MP, et al. Unravelling genetic variation underlying de novo-synthesis of bovine milk fatty acids. *Sci Rep.* 2018 Feb 1;8(1):2179.
136. Bell JA, Griinari JM, Kennelly JJ. Effect of Safflower Oil, Flaxseed Oil, Monensin, and Vitamin E on Concentration of Conjugated Linoleic Acid in Bovine Milk Fat. *J Dairy Sci.* 2006 Feb;89(2):733–48.
137. Kyriakaki P, Zisis F, Pappas AC, Mavrommatis A, Tsiplakou E. Effects of PUFA-Rich Dietary Strategies on Ruminants' Mammary Gland Gene Network: A Nutrigenomics Review. *Metabolites.* 2022 Dec 27;13(1):44.
138. Boulanger V, Bouchard L, Zhao X, Lacasse P. Induction of Nitric Oxide Production by Bovine Mammary Epithelial Cells and Blood Leukocytes. *J Dairy Sci.* 2001 Jun;84(6):1430–7.
139. Nestel P, Fujii A, Allen T. The cis-9,trans-11 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) lowers plasma triglyceride and raises HDL cholesterol concentrations but does not suppress aortic atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2006 Dec;189(2):282–7.
140. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis.* 1987;8(12):1881–7.

141. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 1991 Nov 15;51(22):6118–24.
142. Peters JM, Park Y, Gonzalez FJ, Pariza MW. Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2001 Oct;1533(3):233–42.
143. González-Perilli L, Álvarez MN, Prolo C, Radi R, Rubbo H, Trostchansky A. Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2013 May;58:126–33.
144. Khoo NKH, Li L, Salvatore SR, Schopfer FJ, Freeman BA. Electrophilic fatty acid nitroalkenes regulate Nrf2 and NF- κ B signaling: A medicinal chemistry investigation of structure-function relationships. *Sci Rep.* 2018 Feb 2;8(1):2295.