



# **Detección, cuantificación y análisis de oxilipinas en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica**

Mag. Mauricio Mastrogiovanni

Doctorado en Ciencias Biológicas – PEDECIBA

Facultad de Medicina y Centro de Investigaciones Biomédicas

Universidad de la República

Tutor: Dr. Homero Rubbo

Co-Tutor: Dr. Andrés Trostchansky

Montevideo, Uruguay

Agosto 2022



## Tabla de contenido

Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	vi
RESUMEN.....	vii
PREFACIO.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
Oxilipinas.....	4
Fosfolipasas A2.....	6
Ciclooxigenasas.....	9
Lipoxigenasas.....	12
Citocromos P450.....	16
Intervenciones terapéuticas en las vías de biosíntesis de eicosanoides.....	19
Eicosanoides.....	21
Octadecanoides.....	24
Docosanoides.....	27
Oxilipinas en inflamación.....	29
Métodos de análisis de oxilipinas.....	32
Fragmentación.....	35
<i>Multiple Reaction Monitoring</i> .....	35
Pre-tratamiento de muestras.....	36
Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	41
Epidemiología Descriptiva.....	42
Causas de la enfermedad.....	44
Histopatología.....	52
Mecanismos de desarrollo de la enfermedad.....	54
Neuroinflamación.....	58
Biomarcadores.....	60
Mediadores lipídicos en ELA.....	63
OBJETIVOS.....	65
Objetivo general.....	65
Objetivos específicos.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
Materiales.....	66
Muestras humanas.....	66
Estándares.....	66

Equipamiento .....	68
Métodos .....	72
Análisis de datos .....	72
RESULTADOS .....	73
Resultados del objetivo específico 1.....	73
Optimización de parámetros .....	73
Diseño del método MRM.....	77
Cromatografía líquida .....	83
Extracción lipídica .....	89
Análisis en plasma control – <i>estabilidad y reproducibilidad</i> .....	98
Curvas de calibración .....	104
Cuantificación .....	107
Determinación de LOD general.....	107
Determinación de LOD para SPM .....	108
Resultados del objetivo específico 2.....	111
Análisis de plasma.....	111
Análisis de correlación .....	115
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	116
PERSPECTIVAS .....	128
BIBLIOGRAFÍA.....	129
ANEXOS .....	145

## Índice de figuras

Figura 1. Principales familias de lípidos bioactivos y sus metabolitos .....	1
Figura 2. Biosíntesis de eicosanoides y receptores asociados .....	6
Figura 3. Estructuras y rutas biosintéticas de los prostanooides más comunes .....	11
Figura 4. Eventos iniciales de la biosíntesis de LT .....	15
Figura 5. Mecanismo de formación de isoprostanos F2 $\alpha$ .....	17
Figura 6. Mecanismos de formación de ácidos grasos nitrados.....	18
Figura 7. Modulación de rutas biosintéticas de eicosanoides.....	20
Figura 8. Estructura de algunos eicosanoides clave .....	21
Figura 9. Biosíntesis de eicosanoides .....	22
Figura 10. Biosíntesis de octadecanoides.....	25
Figura 11. Biosíntesis de docosanoides .....	27
Figura 12. Eventos en una respuesta inflamatoria aguda típica .....	29
Figura 13. Mediadores lipídicos en una respuesta inflamatoria aguda, resolución y otras evoluciones .....	31
Figura 14. Ejemplos de fases estacionarias más comunes empleadas para SPE de oxilipinas.....	38
Figura 15. Manifestación clínica de la ELA .....	42
Figura 16. Curso temporal de la ELA .....	45
Figura 17. Esquema de genes asociados a ELA desde 1993 al 2022 .....	51
Figura 18. Histopatología de la ELA.....	54
Figura 19. Fisiopatología de la ELA.....	55
Figura 20. Vías inflamatorias en la ELA.....	60
Figura 21. Parámetros del QTRAP4500 .....	70
Figura 22. Esquema de pasos para la optimización de parámetros del QTRAP .....	73
Figura 23. Espectro de masas Q1 de MaR1 .....	74
Figura 24. Espectro de fragmentación de MaR1 y optimización de CE.....	76
Figura 25. Efecto del <i>Dwell time</i> en análisis MRM .....	82
Figura 26. Análisis de estándares deuterados de PGE2 y PGD2.....	84
Figura 27. Pruebas de gradiente de elución.....	85
Figura 28. Perfil de elución de oxilipinas por HPLC con el gradiente optimizado .....	88
Figura 30. Recuperación de oxilipinas por métodos de extracción líquido-líquido .....	90
Figura 31. Recuperación de estándares de oxilipinas por distintas SPE .....	91
Figura 32. Recuperación de estándares de oxilipinas empleando Strata-X .....	93
Figura 33. Recuperación de estándares por SPE.....	94
Figura 34. Recuperación de estándares de oxilipinas en plasma por SPE.....	96

Figura 35. Método optimizado de procesamiento de muestras para análisis de oxilipinas .....	97
Figura 36. Efecto de las condiciones de conservación del plasma sobre los niveles de oxilipinas .....	99
Figura 37. Variación intra-individual de los niveles de oxilipinas en plasma .....	102
Figura 38. Suplementación de plasma con SPMs.....	104
Figura 39. Determinación de LOD y LOQ para SPMs.....	109
Figura 40. Concentración plasmática de oxilipinas seleccionadas en grupos Control y ELA.....	113
Figura 41. Vías metabólicas alteradas en ELA .....	114
Figura 42. Correlación entre metabolitos del LA y duración de la enfermedad .....	115
Figura 43. Experimento del <i>preprint</i> de O'Donnell .....	123
Figura 44. Datos de Gomez que se analizan en el <i>preprint</i> de O'Donnell .....	124
Figura 45. Datos de Gomez que se analizan en el <i>preprint</i> de O'Donnell .....	126

## Índice de tablas

Tabla 1. Características de lipoxigenasas humanas con actividad dioxigenasa .....	12
Tabla 2. Mutaciones asociadas a la ELA y características fisiopatológicas asociadas .....	47
Tabla 3. Mediadores inmunológicos relevantes y su correlación con el curso clínico de la enfermedad .....	62
Tabla 4. Estándares de <i>Cayman Chemicals</i> . .....	67
Tabla 5. Lista de oxilipinas a analizar. ....	77
Tabla 6. Curvas de calibración empleadas para cada analito.....	106
Tabla 7. Límites de detección y cuantificación.....	108
Tabla 8. Curvas de calibración y valores de LOD y LOQ .....	110
Tabla 9. Características de los pacientes y voluntarios de grupo control. ....	111
Tabla 10. Concentración plasmática de oxilipinas en grupo ELA y Control determinadas por análisis de HPLC-MS/MS. ....	112

## RESUMEN

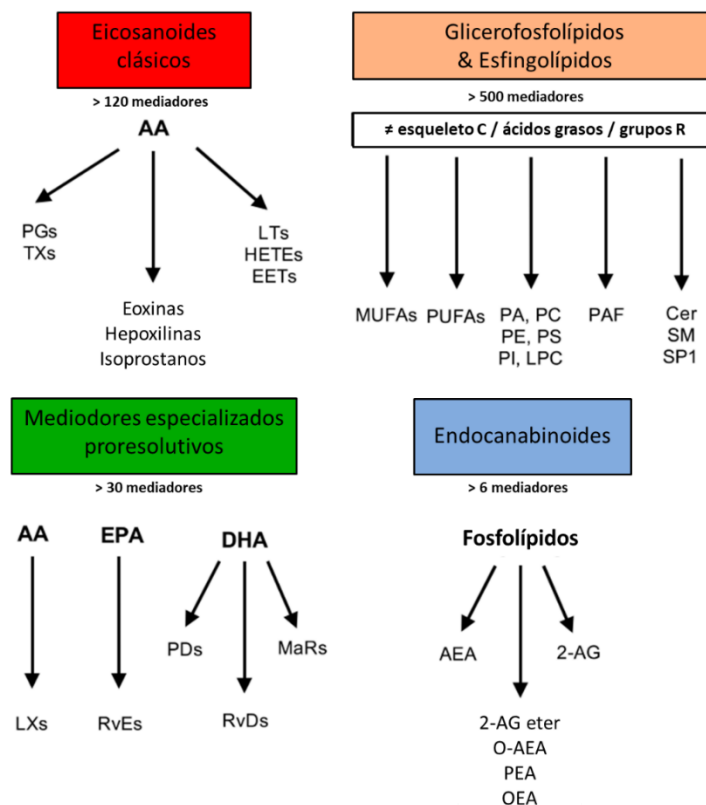
Las oxilipinas son compuestos oxigenados formados a partir de ácidos grasos por reacciones que involucran al menos un paso catalizado por mono o dioxigenasas. Este término incluye a los eicosanoides, docosanoides y octadecanoides. La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que presenta un componente neuroinflamatorio bien definido, habiéndose descrito marcadores de inflamación a nivel sistémico. Las oxilipinas juegan un rol crítico en las fases de inicio y resolución de la inflamación. Sin embargo, el perfil de oxilipinas de pacientes con ELA no ha sido estudiado aún. En este trabajo de tesis se desarrolla un método de análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS y se analiza el plasma de 74 pacientes con ELA y un grupo control, así como un grupo de pacientes con otra enfermedad neurodegenerativa (esclerosis múltiple). Se encontró una disminución significativa en los niveles plasmáticos de oxilipinas derivadas del ácido linoleico en los pacientes con ELA. Éstas incluyen a los ácidos 9-hidroxi-octadecanoico (9-HODE) y 13-HODE, que han sido descritos como importantes reguladores de la inflamación en diferentes sistemas celulares. Además algunos de los metabolitos derivados de la 5-lipoxigenasa también mostraron una disminución significativa en las muestras de plasma de pacientes con ELA. Los isoprostanos de la familia F2 $\alpha$  se detectaron en algunos de los pacientes con ELA pero no fueron detectados en ninguno de los individuos del grupo control, mientras que los niveles del ácido 11-hidroxi-eicosatetraenoico se vieron disminuidos en el grupo ELA de manera significativa. A pesar del esfuerzo realizado en el análisis de mediadores lipídicos de la resolución de la inflamación, no fueron detectados en ninguno de los grupos. Sin embargo, se encontró que los niveles del derivado hidroxilado del DHA, 14-HDHA, un marcador de la vía de biosíntesis de maresinas, se encuentran reducidos en plasma de pacientes con ELA. Precursores de la síntesis de maresinas y resolvinas estaban significativamente disminuidos en suero de pacientes con esclerosis múltiple, sugiriendo fallas en la activación de los programas de resolución de la inflamación en estas enfermedades neurodegenerativas. Se realizaron análisis de correlación entre los niveles de oxilipinas y algunos parámetros clínicos de los pacientes con ELA, encontrándose una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de 13-HODE y 9-HODE con la duración de la enfermedad, expresada como días desde el inicio de los síntomas. En resumen, en el presente trabajo de tesis se desarrolló un método de análisis de oxilipinas en plasma por HPLC-MS/MS y se describen perfiles de metabolitos y



nuevos derivados lipídicos de función biológica desconocida con potencial biomarcador del inicio de la ELA.

## PREFACIO

A pesar de que los lípidos son los componentes principales de las membranas biológicas de todos los seres vivos y la fuente de energía más eficiente, también actúan como mediadores en la señalización intercelular e intracelular que es necesaria para el correcto funcionamiento de las células. Esta mediación suele realizarse a través de receptores acoplados a proteína G específicos y es la principal razón por la que los mediadores lipídicos son entonces denominados “lípidos bioactivos”. Es importante mencionar que la formación y las funciones de estas moléculas está estrechamente relacionada con la prevalencia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, del inglés, *PolyUnsaturated Fatty Acid*) precursores omega 3 y omega 6, que por tanto puede depender de la dieta y puede ser alterada mediante la suplementación con dichos precursores. Las principales familias de lípidos bioactivos son los eicosanoides clásicos, glicerofosfolípidos y esfingolípidos, mediadores de la resolución de la inflamación especializados y los endocannabinoides, como se muestra en la **figura 1** [1].



**Figura 1. Principales familias de lípidos bioactivos y sus metabolitos.**  
Adaptada de [1].

Si bien el estudio de los lípidos bioactivos ha comenzado a difundirse en forma masiva en la literatura científica hace relativamente pocos años, sus inicios comenzaron posiblemente con los trabajos iniciales de Kurzrok y Lieb, Goldblatt, y von Euler en los años 1930s [2–5]. En estos trabajos se identificó una sustancia presente en semen y glándulas genitales accesorias que provocaban contracción en músculo liso, tenían actividad vasodepresora, y Euler nombró prostaglandinas (PG). Llevó casi tres décadas completar la elucidación estructural de las PG [6,7]. El PUFA ácido araquidónico (AA) se identificó como precursor de la serie de PG2 y luego los ácidos dihomo- $\gamma$ -linolénico y eicosapentaenoico como precursores de las series PG1 y PG3, respectivamente [6,7]. Los investigadores Bengt Samuelsson, Sune Bergström y Jon Vane fueron premiados con el Nobel de Medicina en 1982 por sus descubrimientos en este campo de investigación [8]. Desde estos trabajos a la actualidad, se ha identificado un vasto repertorio de lípidos bioactivos.

Los PUFA y sus derivados metabólicos juegan roles importantes en la inmunidad e inflamación. La relación que guardan éstos con la neuroinflamación ha recibido mucha atención en los últimos años, especialmente debido a las grandes cantidades de omega-3 y omega-6 presentes en el cerebro [9]. Se ha reportado que los PUFA omega-3 y omega-6 en cerebro humano representan el 12,1% y 16,9% del contenido total de ácidos grasos, respectivamente. El AA representa el 8,6% y el ácido docosahexaenoico un 11,5% [10]. En este sentido, la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que presenta un componente neuroinflamatorio bien definido y el rol de los lípidos en esta enfermedad ha sido objeto de estudio en diversos trabajos. En particular, se ha visto que los niveles de PGs proinflamatorias están elevados en muestras de pacientes y modelos animales de ELA [11–13]. En cuanto a los mediadores lipídicos responsables de la resolución de la inflamación no se encuentran reportes asociados a la enfermedad. Uno de los focos de este trabajo se centra en indagar si existe un desbalance entre los mediadores proinflamatorios, antiinflamatorios y los proresolutivos de la inflamación que den cuenta del componente neuroinflamatorio de esta enfermedad.

La presente tesis contempla dos grandes áreas de investigación. Por un lado se relaciona con el análisis, identificación y cuantificación de un grupo particular de lípidos bioactivos, las oxilipinas, y por otro se enfoca en una enfermedad neurodegenerativa con afectación principalmente neuromotora como lo es la ELA. En la introducción se mencionarán las principales rutas de biosíntesis y funciones biológicas más relevantes de las oxilipinas, así

como los métodos de análisis que han sido empleados para su detección y cuantificación. Posteriormente, se describen distintos aspectos de la enfermedad de ELA; características epidemiológicas, posibles causas y mecanismos, descripción de la histopatología, haciendo especial énfasis en la neuroinflamación y biomarcadores de la enfermedad. Más adelante se presentan los resultados de este trabajo de tesis que justamente tiene que ver con el desarrollo de un método de detección y cuantificación de oxilipinas en muestras biológicas, que es aplicado a un conjunto de muestras de plasma proveniente de pacientes con ELA. Finalmente se elabora una discusión de los resultados obtenidos, en la que se analizan en detalle los desafíos analíticos presentes en este campo de investigación, el rol de las oxilipinas en procesos neuroinflamatorios y se conecta con reportes recientes relacionados al tema.

## INTRODUCCIÓN

### Oxilipinas

La química, bioquímica, farmacología y biología molecular de los eicosanoides y lípidos relacionados (incluidos los octadecanoides, docosanoides y oxilipinas vegetales), son temas complejos y ocasionalmente contradictorios que están en continuo estudio y desarrollo. El término “oxilipinas” fue inicialmente propuesto por *Gerwick et al* 1991 [14], para referirse a los compuestos oxigenados que son formados a partir de ácidos grasos por reacción(es) que involucran al menos un paso catalizado por mono- o dioxigenasas. Por tanto, este término incluye a eicosanoides y compuestos de mayor o menor largo de cadena relacionados con su ruta biosintética. Las oxilipinas pueden poseer grupos funcionales hidroperóxidos, hidróxidos, epóxidos, cetonas, y/o endoperóxidos. A modo de simplificación, se puede decir que son usualmente descritos como sintetizados *in situ* de acuerdo a las necesidades biológicas y en respuesta a un estímulo, que tienen una vida media corta y actúan localmente mediante interacciones con receptores específicos o efectores intracelulares [15]. Las oxilipinas son entonces consideradas como integrantes del grupo de los lípidos bioactivos (en los que también se encuentran otros grupos de biomoléculas como los derivados de glicerofosfolípidos, esfingolípidos y endocannabinoides, entre otros).

El término eicosanoide <sup>1</sup> se utiliza para abarcar a los lípidos bioactivos derivados principalmente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de 20 carbonos, incluyendo las prostaglandinas (PG), tromboxanos (Tx), leucotrienos (LT), ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE), y derivados oxigenados relacionados. El precursor clave de los eicosanoides es el ácido araquidónico (AA, ácido 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico o 20:4(n-6)), aunque los ácidos dihomo- $\gamma$ -linolénico (DGLA, 8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico o 20:3(n-6)) y eicosapentaenoico (EPA, 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoico o 20:5(n-6)) también son precursores relevantes [15]. Mientras que éstos han sido de especial importancia desde una perspectiva histórica, en la actualidad es imposible hablar de las oxilipinas y su actividad biológica sin considerar a los docosanoides, esto es, protectinas, resolvinas y maresinas, o denominados en su conjunto como “mediadores proresolutivos (de la inflamación) especializados” [16] (SPM, del inglés, *Specialized Pro-resolving Mediators*), derivados del ácido docosahexaenoico (DHA, ácido 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoico o 22:6(n-3))

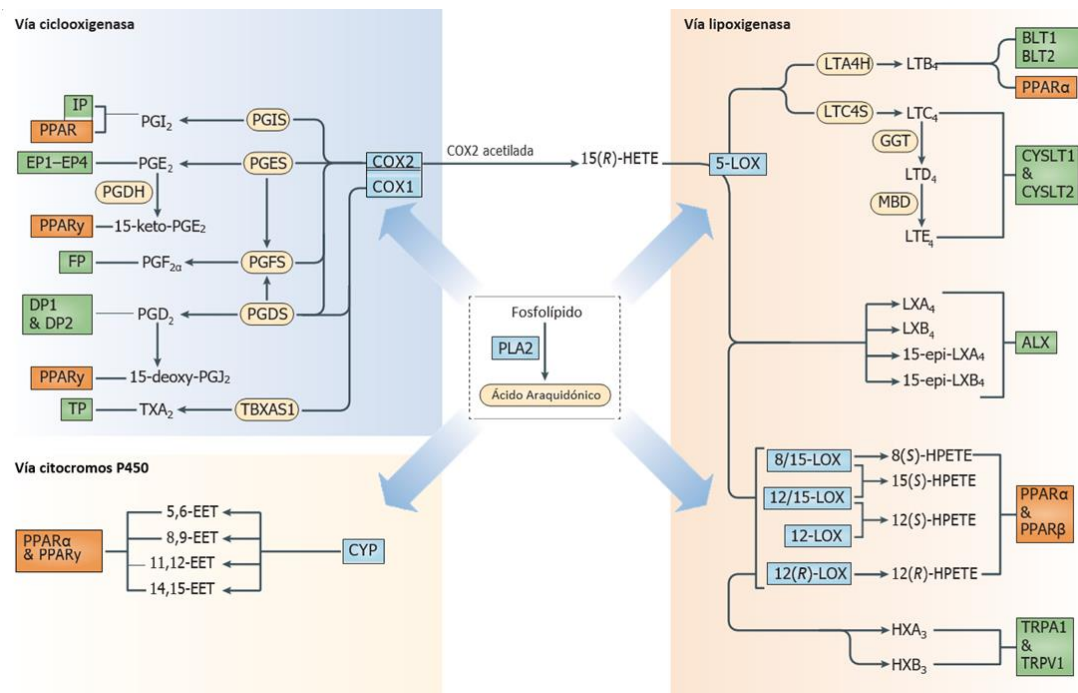
---

<sup>1</sup> El término IUPAC es “icosanoide”, pero en la literatura no se suele encontrar así.

y otros PUFA de la familia n-3 (las resolvinas de la serie E son eicosanoides). Tampoco se puede ignorar a los octadecanoides, derivados del ácido linoleico (LA, ácido 9Z,12Z-octadecadienoico o 18:2(n-6)). A su vez, existen otros productos relacionados de 20 o 22 átomos de carbono que se forman por vías no-enzimáticas y que incluyen a los isoprostanos [17]. Teniendo en cuenta la definición establecida para las oxilipinas también se incluyen a otros grupos de lípidos, tales como los FAHFA (ácidos grasos esterificados con ácidos grasos hidroxilados), ácidos grasos nitrados, aldehídos bioactivos, y otros.

De forma similar (aunque menos relevante para el presente trabajo) en las plantas aparecen los jasmonatos derivados del ácido  $\alpha$ -linolénico. Las oxilipinas no esterificadas son de primordial importancia, sin embargo, es cada vez más evidente que pueden también tener actividad biológica en su forma esterificada, incluyendo a fosfolípidos oxidados, endocannabinoides y ésteres de colesterol.

La biosíntesis de eicosanoides involucra la acción de múltiples enzimas, muchas de las cuales pueden ser limitantes de la velocidad y no menos importante, los mecanismos selectivos para la incorporación de ácidos grasos específicos en fosfolípidos, incluyendo la formación de ésteres de coenzima A (CoA) específicos y el remodelado por el ciclo de Lands [15]. La **figura 2** resume en términos simples las distintas vías de formación de eicosanoides a partir de fosfolípidos (tomando como ejemplo al AA). El primer paso en la biosíntesis es producir AA libre en tejidos a partir de fosfolípidos de membrana y luego de activar fosfolipasas específicas (PLA2) por distintos estímulos fisiológicos y/o patológicos, incluyendo hormonas y citoquinas. Existen luego tres vías principales de formación de eicosanoides: i) la de ciclooxigenasas (COX), ii) la de lipoxigenasas (LOX), y iii) la de las epoxigenasas de la familia de citocromos P450 (CYP450). La vía COX produce las prostaglandinas PGG2 y PGH2, que pueden ser luego convertidas en otros eicosanoides por diferentes sintetas [15,18].



**Figura 2. Biosíntesis de eicosanoides y receptores asociados.** En este esquema se muestra una visión general de las vías enzimáticas relacionadas con el metabolismo de los eicosanoides, derivados del ácido araquidónico. Las enzimas principales se muestran en recuadros celestes; (describir todas las siglas). Los pasos secundarios, están catalizados por enzimas que se representan en globos amarillos. Los receptores se muestran en recuadros verdes. En recuadros naranjas se muestran los receptores PPAR que son potencialmente activados por eicosanoides. Adaptado de [18].

### Fosfolipasas A2

La mayoría del AA (y otros PUFA) en tejidos animales está esterificado, principalmente en fosfolípidos, particularmente en fosfatidilinositol y derivados [15]. Antes de que el AA pueda ser usado para la síntesis de eicosanoides debe ser liberado del éster por acción de la enzima PLA2 mediante la hidrólisis del éster en la posición sn-2 de un fosfolípido en la que generalmente está enriquecido en AA. Además de los PI, la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) también pueden ser sustratos para la liberación de AA, dependiendo del tejido y condiciones fisiológicas. De forma similar, el DHA, EPA y otros ácidos grasos relacionados, como el DPA, que actúan como precursores de los SPM, también deben ser liberados de los fosfolípidos a los que se encuentran esterificados [19]. Es así, que la reacción de hidrólisis de los ácidos grasos desde fosfolípidos enciende una cascada de procesos celulares que involucran las COX, LOX, CYP450, y que son enzimas clave en la biosíntesis de oxilipinas de todos los tipos [15].

Las PLA2 conforman una superfamilia muy extensa de enzimas. Se han descrito más de 30 enzimas con actividad PLA2 y, basados en similitud de secuencias, se clasifican en 16 grupos

y cada uno contiene distintos sub-grupos [20]. Dentro de todas las PLA2 que se han identificado, se destacan tres tipos principales de gran relevancia para este trabajo: PLA2 calcio dependiente citosólica (cPLA2), PLA2 independiente de calcio citosólica (iPLA2, Grupo VI-A) y la PLA secretada (sPLA, Grupo V). Son todas proteínas hidrofílicas, asociadas a membrana, con estructuras y funciones biológicas diferentes. Cada una tiene un sitio activo característico, una díada catalítica Ser-Asp o His-Asp en la que el sustrato se une y una superficie de interfase que facilita la asociación con membranas celulares. En general distintas isoformas de estas y otras fosfolipasas A están presentes en tejidos específicos, tipos celulares u organelos, en donde pueden tener especificidad por sustrato, mecanismos regulatorios y funciones particulares. Por ejemplo, en humanos, la cPLA2 tiene preferencia por araquidónico mientras que la iPLA2 prefiere EPA y sPLA2 prefiere DHA como sustrato, todos en posición sn-2 de fosfolípidos [15].

La **cPLA2** (específicamente la cPLA2 $\alpha$ , Grupo IV-A) tiene marcada especificidad por fosfolípidos que contienen AA en sn-2, y hay una clara evidencia de que la enzima juega un papel importante en la liberación de AA para síntesis de prostanoïdes y similares. De hecho se cree que es el paso limitante en la velocidad de síntesis de eicosanoïdes para muchos tejidos [20]. Posee una díada catalítica Ser-Asp para la hidrólisis de FA y contiene un dominio C2 que facilita la translocación de la enzima calcio dependiente desde el citosol a la superficie de membrana, en donde se encuentran el sustrato (PL) y las enzimas clave en la síntesis de eicosanoïdes. Se cree que la especificidad de cPLA2 $\alpha$  se debe a la interacción de ciertos residuos aromáticos con los dobles enlaces del AA, o a los del EPA pero quizás sorprende que no lo haga con DHA (que no tiene un doble enlace en  $\Delta 5$ ) [15].

Para funcionar en ese sentido, cPLA2 $\alpha$  debe translocarse desde el citosol a la membrana perinuclear o del retículo endoplasmático en respuesta a un aumento en el Ca<sup>+2</sup> citosólico, en donde es fosforilada y activada por MAP quinasas. A su vez, existe regulación transcripcional en respuesta a varios estímulos tales como hormonas citoquinas o neurotransmisores. En particular se ha visto que ceramida-1-fosfato y PI4,5-biP se unen a la enzima. El PI4,5-biP se une 1:1 con la enzima y es necesario para su activación y translocación al sitio de acción [15].

La cPLA2 $\alpha$  es usualmente considerada como enzima proinflamatoria ya que cataliza el primer paso que lleva a la producción de PGs y LTs, que suelen estimular procesos inflamatorios. Por



otro lado, la misma enzima es responsable también de la liberación específica de 15-HETE desde su forma de almacenamiento bajo fosfolípidos en macrófagos cuando es requerido para la síntesis de mediadores pro-resolutivos (SPM), las lipoxinas. Es decir, puede hacer un *switch* de la formación de eicosanoides de actividad pro-inflamatoria a aquellos que inhiben o resuelven la inflamación. La fosfolipasa principalmente responsable de la liberación de AA dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  en mitocondrias es la cPLA2 $\zeta$  [15].

La **sPLA2** se presenta como una familia diversa de enzimas con distribuciones tisulares y celulares variables que hidrolizan fosfolípidos para liberar lisofosfolípidos y AG libres con un aumento en la concentración de calcio intracelular (que activa cPLA2). La sPLA2 es una enzima inducible que potencia los efectos de la cPLA2 para controlar la magnitud y duración de los niveles elevados de AG libres, incluido el AA. Es principalmente específica para la posición sn-1 de fosfolípidos cargados negativamente, pero algunas isoformas pueden hidrolizar otras posiciones. En contraste con la cPLA2 $\alpha$ , el  $\text{Ca}^{+2}$ , se requiere tanto para la unión del sustrato como para la activación de la mayoría de las isoformas. Recientemente se ha identificado una fosfolipasa peroxisomal independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero puede ser de particular importancia para la producción de eicosanoides ya que genera especies de araquidonilo, como la 2-araquidonil-lisofosfatidilcolina, con alta especificidad. Otra isoforma de fosfolipasa A2 (sPLA2-IIID), presente en el tejido linfoide y la piel, tiene una alta especificidad para la movilización de ácidos grasos n-3 y la posterior formación de mediadores de SPM a partir de EPA y DHA. En efecto, es una sPLA2 inmunosupresora que inclina el equilibrio de mediadores lipídicos hacia un estado antiinflamatorio [15].

La **iPLA2** no muestra especificidad por el AA en particular, y parece tener un papel menor en la producción de eicosanoides. Más bien, está involucrado principalmente en la remodelación de fosfolípidos o catabolismo general, donde asegura la disponibilidad de los sustratos necesarios. Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que la iPLA2 $\beta$  independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  es importante para la movilización de DHA, especialmente en el cerebro, y por lo tanto para la biosíntesis de SPM [15].

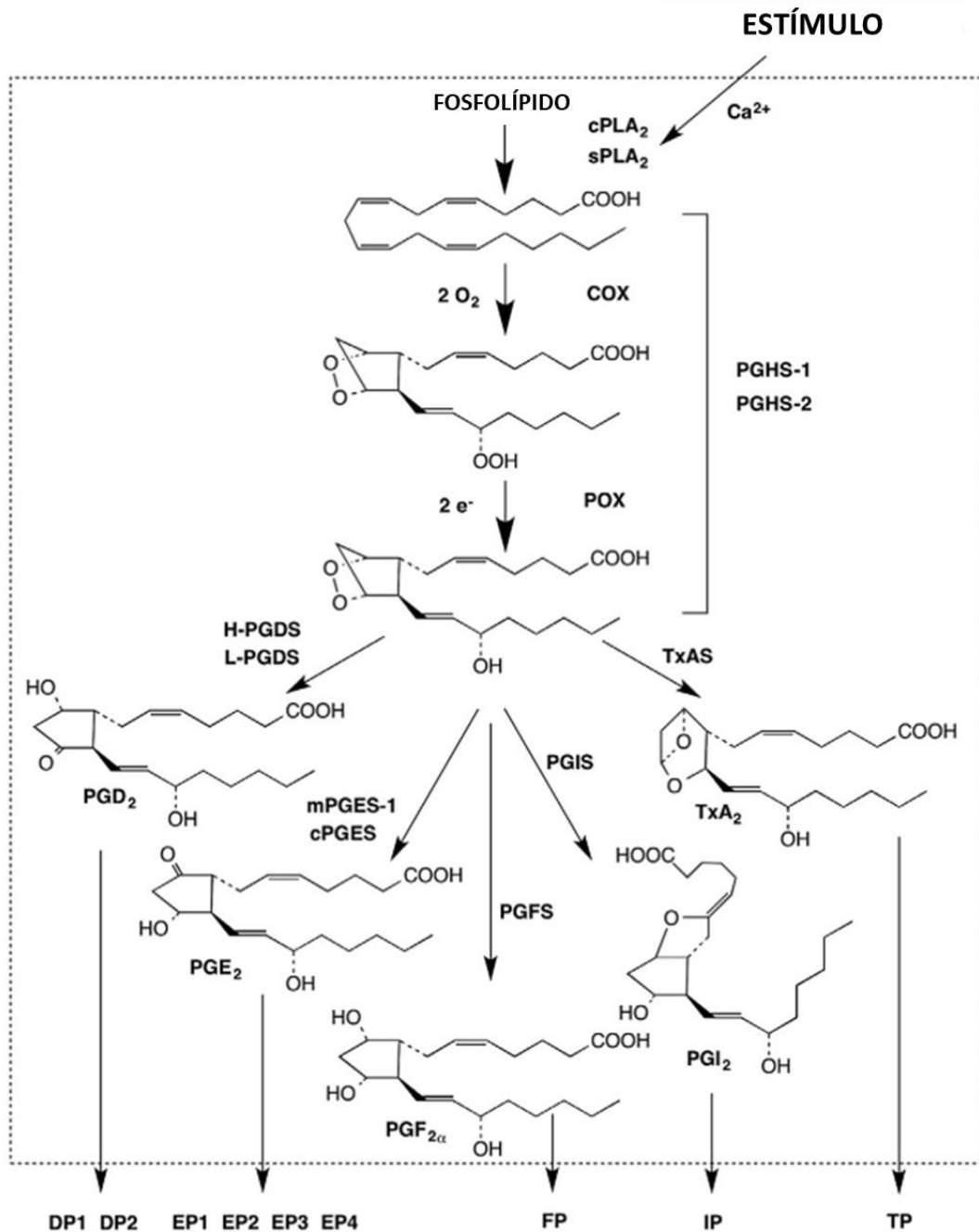
Dado que los PUFA son relativamente móviles y pueden difundir fuera de la célula o reincorporarse a los lípidos, la mayor parte de la producción de oxilipinas se tiene que producir muy cerca de la actividad PLA2, por lo que las enzimas que pueden migrar a las membranas perinucleares o del retículo endoplásmico, donde se encuentra la PLA2, son las

que pueden participar preferentemente en el metabolismo de estos PUFA. Por ejemplo, para la síntesis de prostanooides, el AA recién movilizado debe cruzar la bicapa de la membrana desde el lado citosólico hasta el luminal donde se encuentran las enzimas ciclooxigenasas. Es posible cierta difusión pasiva, pero también es probable el transporte activo por proteínas de unión a ácidos grasos (FABP, del inglés, *Fatty Acid Binding Protein*) [15], tal como sucede en el caso del transporte intracelular de ácidos grasos nitrados [21]. Los ácidos grasos nitrados, por su naturaleza lipídica tienen baja solubilidad en medios acuosos. Además son moléculas muy reactivas que tienen la capacidad de formar productos de adición de Michael con tioles de bajo peso molecular o proteicos [22]. Por tanto, para alcanzar sus proteínas blanco, como lo es el receptor nuclear PPAR $\gamma$  (del inglés, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), son transportados desde el citosol por la FABP4 [21,23].

### Ciclooxigenasas

Las ciclooxigenasas (COX) también llamadas prostaglandina endoperóxido sintasas y prostaglandina G/H sintasas, son enzimas hémicas que poseen tanto actividad oxigenasa como peroxidasa [24,25]. En humanos existen dos genes *PTGS1* y *PTGS2*, que codifican para COX-1 y COX-2, respectivamente [25]. La COX-1 está constitutivamente expresada en casi todos los tejidos, aunque particularmente presente en vasos sanguíneos, células de músculo liso, células intersticiales, plaquetas y células mesoteliales. La COX-2 es una enzima inducible en la mayoría de los tejidos en respuesta a estímulos inflamatorios. Sin embargo, hay expresión constitutiva en vasos sanguíneos, cerebro, tracto gastrointestinal, riñón, pulmón y timo [24,25]. Las COXs catalizan el paso inicial de oxigenación de ácidos grasos no esterificados para producir PGH, un intermediario de vida media corta, que se metaboliza a prostanooides tales como PGD, PGE y PGF, tromboxanos y ácidos grasos hidroxilados [24]. En la **figura 3** se muestran las estructuras y vías derivadas del AA a través de las COX como ejemplo. La aspirina (ácido acetilsalicílico) es un conocido inhibidor de las COXs, y su mecanismo de acción involucra la acetilación de un residuo de Ser en el sitio activo. La acetilación en la COX-1 inhibe completamente a la enzima, mientras que la acetilación de la COX-2 promueve una reacción *tipo* lipoxigenasa dando origen a 15*R*-HETE como producto mayoritario [25]. Las distintas isoformas de COX difieren en su especificidad por sustrato. Canónicamente utilizan AA para dar PGH<sub>2</sub>, pero mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que la eficiencia en la utilización de sustrato para las COXs humanas ( $K_{cat}/K_M$ ) es AA > DGLA > LA > ALA. Los ácidos grasos EPA y GLA son sustratos pobres para ambas isoformas pero son

mejores para la COX-2 [26]. Posteriormente se vio que también puede tomar EPA, DHA y otros ácidos grasos como sustrato, en general la COX-2 es más eficiente que la COX-1 para muchos de los ácidos grasos testeados, pero en todos los casos el preferencial es el AA [25]. Más recientemente se ha visto que la COX-2 puede oxigenar ácidos grasos esterificados, que forman parte de lípidos complejos y cuyo rol biológico aún es desconocido [25].



**Figura 3. Estructuras y rutas biosintéticas de los prostanoideos más comunes.** cPLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A2 citosólica; sPLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A2 secretada; PG: prostaglandina; PGHS: Prostaglandina endoperóxido H sintasa; COX: ciclooxigenasa; POX: peroxidasa; H-PGDS: PGD sintasa hematopoyética; L-PGDS: PGD sintasa tipo-lipocalina; cPGES: PGE sintasa citosólica; mPGES-1: PGE sintasa microsomal 1; PGFS: PGF sintasa; PGIS: PGI (prostaciclina) sintasa; TxAS: TxA sintasa. DP1, DP2, EP1, EP2, EP3, EP4, FP, IP y TP representan los receptores acoplados a proteína G asociados. Adaptada de [27].

## Lipoxigenasas

Las lipoxigenasas (LOX) son una familia de dioxigenasas que contienen hierro no hémico. Catalizan la adición estereoespecífica de oxígeno molecular a lípidos que contienen un grupo (1Z,4Z)-pentadieno, produciendo hidroperóxidos lipídicos [25,28]. La mayoría de las LOX humanas catalizan la formación de isómeros S. El genoma humano contiene seis genes funcionales, expresados en varios tejidos (ver **tabla 1**). Si bien tradicionalmente las LOX fueron nombradas según la especificidad en la posición de catálisis sobre el AA, esta nomenclatura es problemática ya que se han descrito nuevas LOX con actividades poco claras y también se ha visto que la especificidad no es única para una posición [25,29]. En la actualidad, para evitar confusión, se recomienda el empleo de la nomenclatura según los genes [30]. Son enzimas de expresión constitutiva, a excepción de *ALOX15* que es inducible por las interleuquinas IL-4 e IL-13 en macrófagos derivados de monocitos. Aunque la *ALOX15B* se expresa de forma constitutiva en el mismo tipo celular, su expresión puede aumentar por estímulos tales como citoquinas, hipoxia y LPS, lo que se supone le sucede a otras lipoxigenasas [25].

**Tabla 1. Características de lipoxigenasas humanas con actividad dioxigenasa.** Adaptada de [28].

Isoforma/ Gen	Tipo Celular/Tejido	Localización Subcelular	Actividad	Producto(s) Principal(es)	Rol Biológico
5-LOX / ALOX5	leucocitos, células dendríticas	citósol, núcleo, envoltura nuclear	5S-dioxigenasa	5-HpETE, LTA4	mediadores proinflamatorios, producción de leucotrienos
p12-LOX / ALOX12	trombocitos, piel	citósol, membranas intracelulares, membrana plasmática	12S-dioxigenasa	12S-HpETE	modulación de la agregación plaquetaria
12R-LOX / ALOX12B	piel	membrana plasmática	12R-dioxigenasa	12R-HpETE	función de la barrera epidermal
15-LOX1 / ALOX15	eosinófilos, reticulocitos, macrófagos, epitelio bronquial	citósol, intracelular, membrana plasmática	12S-dioxigenasa 15S-dioxigenasa	12S-HpETE 15S-HpETE	mediadores proinflamatorios, modificación oxidativa de lípidos
15-LOX2 / ALOX15B	epitelio, piel, próstata	citósol, envoltura nuclear	15S-dioxigenasa	15S-HpETE	regulador negativo del ciclo celular, progresión tumoral

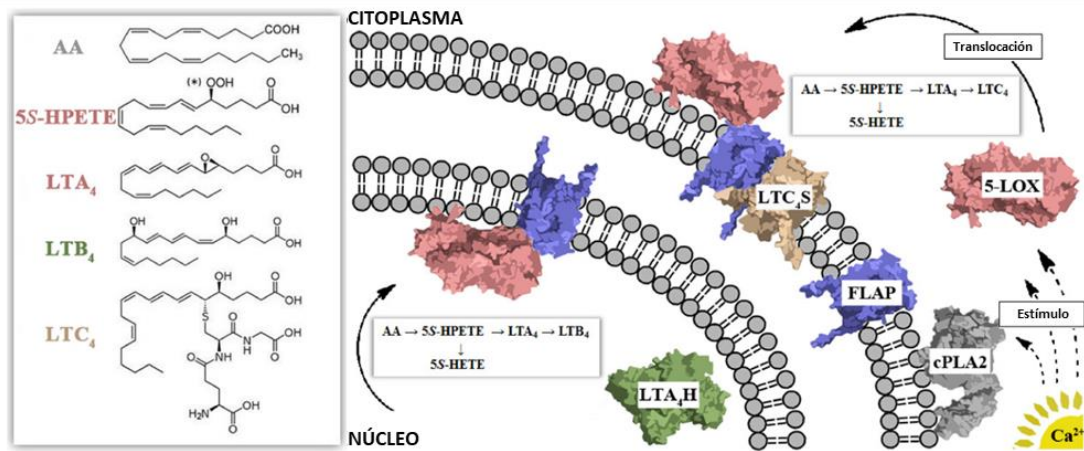
Las LOX tienen diferentes sustratos preferenciales. Los sustratos de la *ALOX5* de mamíferos incluyen al AA, al ácido 5S-hidroperoxi-eicosatetraenoico (5S-HpETE, el producto de reacción cuando usa AA como sustrato), así como hidroxí-alcoholes derivados de EPA y DHA. Los primeros dos son importantes en la síntesis de leucotrienos (LT), mientras que los otros dos se proponen como precursores de resolvinas de la serie E y D, respectivamente. Las *ALOX15* y *ALOX15B* aceptan como sustratos, en orden de preferencia, DHA > EPA > AA > GLA > LA, aunque la codificada por *ALOX15* posee doble especificidad en cuanto a la posición en que oxigena para algunos sustratos (p.ej. tiene actividad 12-LOX y 15-LOX, sobre AA)[25,29]. Otras actividades enzimáticas también han sido reportadas para estas LOX [25]. Los sustratos de la *ALOX12* (12S-LOX plaquetaria) incluyen al AA, EPA, DHA y DGLA, y aunque no hay estudios exhaustivos acerca de la preferencia por sustratos se ha propuesto que el orden de preferencia sería DHA > EPA > AA, aunque hay discrepancias en literatura [25,29]. En términos generales se puede decir que a medida que se identifican más sustratos para las distintas LOXs, se vuelve más difícil identificar los sustratos biológicamente relevantes y asignar funciones biológicas claras [25].

Otro ejemplo de derivados de la vía LOX, son los SPM, que se forman por combinaciones de diferentes actividades LOX y pasos secuenciales de actividades epoxigenasa e hidrolasa, que generan epoxialcoles (hepoxilinas) y epoxi-cetonas (eoxinas). Las hepoxilinas se forman de 12-HpETE y las eoxinas de 15-HpETE. Las hepoxilinas son epoxi-alcoholes y las eoxinas son 14,15-análogos de leucotrienos [24].

La localización subcelular y la compartimentalización son aspectos claves en las rutas biosintéticas de eicosanoides, especialmente las que involucran LOX. Como ejemplo de estos fenómenos se comenta a continuación algunos aspectos de la biosíntesis de LT. Las proteínas de la síntesis de LT, se encuentran en núcleo, citoplasma, membranas nucleares (interna y externa) y en el espacio extracelular. Por tanto, la libre formación reversible de un clúster de proteínas que funcione como un metabolón no es posible. Además, hay algunos pasos en la ruta biosintética en la que los LT son modificados y suceden de manera transcelular. Consecuentemente la regulación del flujo de metabolitos por la vía puede ser ejecutada por regulación de enzimas clave.

La LTC<sub>4</sub> sintasa y la LTA<sub>4</sub> hidrolasa representan un punto de bifurcación en la vía de síntesis de LTs: la primera toma productos de 5-LOX y los lleva a la producción de cisteinil-LTs como

el LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>, mientras que la segunda lleva a la síntesis de LTB<sub>4</sub>. Estos LTs presentan distintas actividades biológicas, por lo que la regulación de la biosíntesis de leucotrienos es un aspecto importante a considerar. Se ha propuesto que la compartimentalización de enzimas de las vías juega un rol significativo en la regulación. Previo a la activación (celular), la 5-LOX puede residir en citoplasma o núcleo, debido a sus múltiples secuencias de localización nuclear y el estado de fosforilación, que influyen en la localización, que es dinámica y varía dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, la 5-LOX se ubica predominantemente en citosol en el caso de neutrófilos primarios, macrófagos del peritoneo células HL-60 diferenciadas y células Mono Mac 6. En monocitos primarios, macrófagos alveolares, mastocitos derivados de médula ósea murina, células de Langerhans de piel humana y en mastocitos la 5-LOX se distribuye entre el citosol y núcleo. Y es predominantemente intranuclear en macrófagos RAW y en mastocitos derivados de médula ósea y en varias líneas celulares transfectadas con 5-LOX [31]. Por tanto, al momento de la activación celular que provoca liberación de Ca<sup>+2</sup> intracelular, dirigirá a la 5-LOX hacia la cara interna o externa de la envoltura nuclear dependiendo del compartimiento en el que la enzima se encontraba en el estado previo de reposo [32]. También hay que tener en cuenta a la proteína FLAP (del inglés, *Five LOX Activating Protein*) que es una proteína encargada de transferir el sustrato a la 5-LOX, y se localiza en la envoltura nuclear [31]. A su vez, la LTC<sub>4</sub> sintasa, es una proteína similar pero, a diferencia de la FLAP que se puede encontrar tanto en cara externa como interna de la envoltura, la LTC<sub>4</sub> sintasa se encuentra únicamente en la cara externa de la envoltura nuclear [32]. Por tanto la compartimentalización parece ser un determinante importante en el flujo de metabolitos por las distintas rutas biosintéticas que involucran LOX. A su vez, la regulación por modificaciones postraduccionales como la fosforilación parece jugar un rol importante (ver **figura 4**).



**Figura 4. Eventos iniciales de la biosíntesis de LT.** La liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular promueve la unión a membrana de la cPLA2 (gris) y 5-LOX (rosado). El AA generado por la PLA2 es el sustrato de la 5-LOX y el producto LTA4 se convierte a LTC4 o LTB4 dependiendo de la localización de la 5-LOX. (\*): -OH, en caso del HETE correspondiente; LTA4H: LTA4 hidrolasa; LTC4S: LTC4 Sintasa. Adaptada de [32].

Otro aspecto importante del rol biológico de la 5-LOX, tiene que ver con su participación en la biosíntesis de SPM, específicamente de lipoxinas y resolvinas. Así como la fosforilación de 5-LOX promueve su translocación al núcleo y la consecuente formación de LTs, para su participación en la síntesis de los SPM, es necesario que la 5-LOX se encuentre en un estado no fosforilado y en citosol. Esto se debe fundamentalmente a que las vías de biosíntesis de SPM también involucran a otras LOX de localización citosólica. El caso de la regulación de la ubicación subcelular de 5-LOX en macrófagos ha sido investigado y se ha identificado una cascada de señalización celular dependiente de quinasas como responsable de la localización citosólica de 5-LOX a partir de estímulos pro-resolutivos como Gas6 [33].



## Citocromos P450

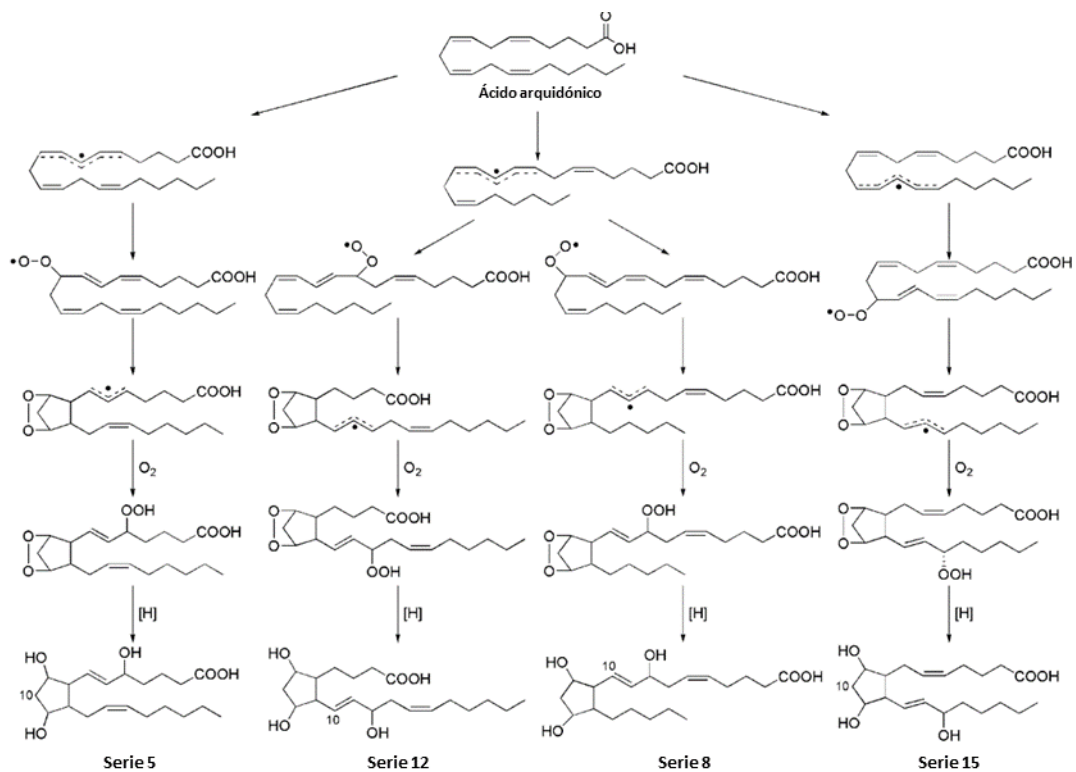
Los Citocromos P450 (CYP450) son una superfamilia de monooxigenasas hémicas que son ubicuas a lo largo de todos los dominios de la vida. En humanos hay 57 genes funcionales y sus productos se dividen en 18 familias y 41 sub-familias según su secuencia aminoacídica. Se ha desarrollado un sistema de nomenclatura complejo para contemplar a todos los CYP450 [25]. En términos generales, los CYP450 actúan como monooxigenasas, catalizando reacciones de epoxidación, hidroxilación y oxidación lipídica, que metaboliza los PUFA a mediadores lipídicos con diversas funciones biológicas tanto a nivel sistémico como celular. Regioestereoisómeros de EET y HETEs son producidos a partir de AA, mientras que los derivados de EPA incluyen EpETEs y HEPes, y los derivados de DHA generados son EDPs y HDHAs. El EPA es el sustrato preferido para la mayoría de las isoformas de CYP mientras que DHA y AA se metabolizan a velocidades similares [24].

## Oxidación lipídica no-enzimática

Además de las reacciones enzimáticas, los lípidos pueden ser oxidados por vías no-enzimáticas mediante especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno de forma no controlada. Generalmente por mecanismos radicalares que involucran un ataque inicial de un radical libre, seguido de propagación radicalar en cadena hasta pasos de terminación. Estas reacciones ocurren sobre lípidos intactos y el resultado es usualmente una compleja mezcla de isómeros posicionales y geométricos de hidroperóxidos que rápidamente re-arreglan o reaccionan para formar otros productos que también pueden tener actividad biológica, tanto libres como esterificados. Estos productos generados por especies reactivas del oxígeno incluyen fosfolípidos oxidados, isoprostanos y metabolitos secundarios oxigenados, usualmente con carbonilos electrofílicos reactivos tales como aldehídos de cadena corta [15].

Uno de los grupos de oxilipinas de síntesis no-enzimática descritas más estudiado son los isoprostanos. Descritos inicialmente por Morrow *et al* en los años 1990, los isoprostanos F2 se denominaron así porque contienen un anillo prostanoide análogo a la PGF2 $\alpha$  (ver **figura 5**) [17]. A diferencia de los prostanoides de origen enzimático que se forman a partir de AA libre (no esterificado), los isoprostanos se forman *in situ* esterificados a fosfolípidos. Entonces la formación de fosfolípidos “anormales” puede llevar a drásticos efectos sobre la fluidez e

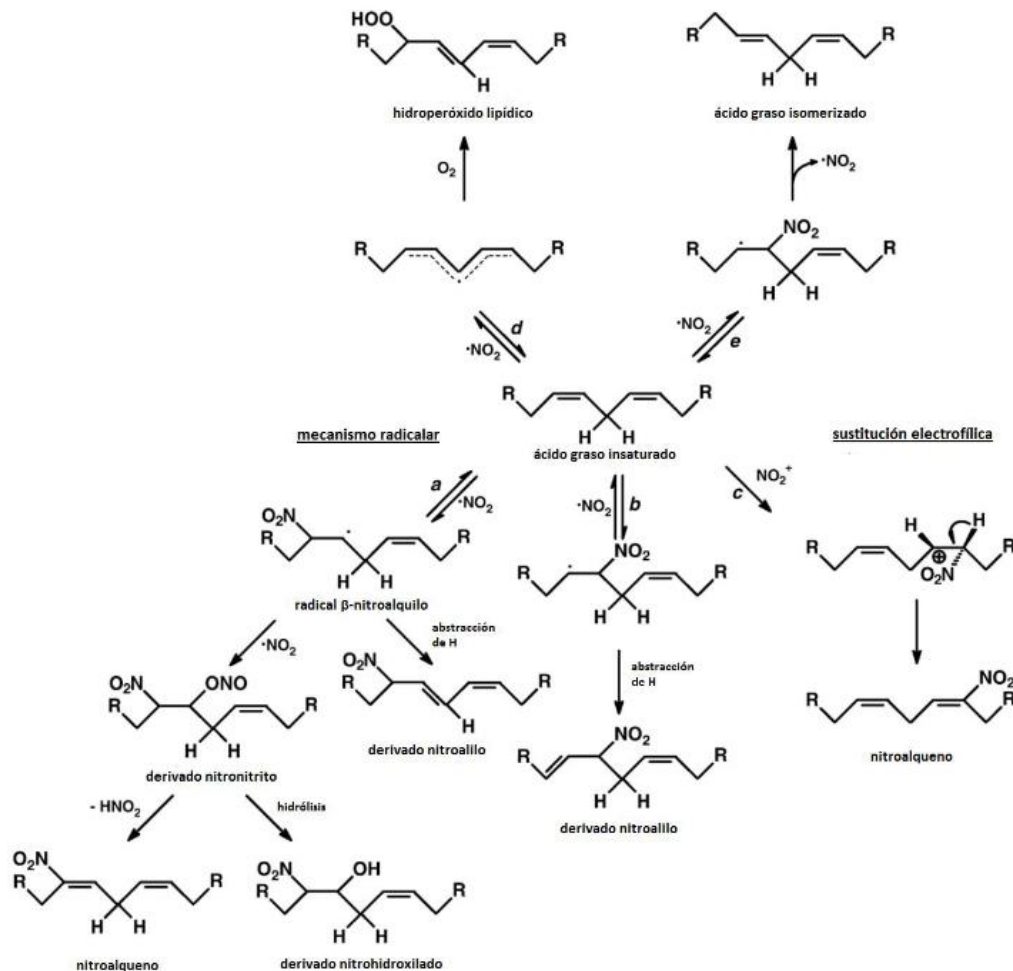
integridad de la membrana, consecuencia del daño oxidativo que se observa en muchos casos, además de los efectos que también presentan en su forma no esterificada [17].



**Figura 5. Mecanismo de formación de isoprostanos F2α.** Se representan cuatro regioisómeros formados a partir del ácido araquidónico, cada uno consiste de una mezcla racémica. Por simplicidad, la estereoquímica no se indica en el esquema. Adaptada de [34].

Otros de los derivados de ácidos grasos insaturados por vías no enzimáticas son los ácidos grasos nitrados. Existen múltiples mecanismos que promueven la nitración de biomoléculas. Si bien existen reportes en la literatura sobre diferentes mecanismos de nitración de ácidos grasos insaturados [35,36], el mecanismo *in vivo* no ha sido elucidado aún. En particular los ácidos grasos insaturados o sus radicales alquílicos derivados, pueden reaccionar con el  $\cdot\text{NO}_2$  dando como producto derivados lipídicos isomerizados, oxidados, nitrados, dinitrados o nitro-hidroxilados [35,36]. Un mecanismo propuesto es el que se ilustra en la **figura 6**, tomando como ejemplo la nitración de un grupo dieno bis alílico. Se propone [37–39] un ataque homolítico del  $\cdot\text{NO}_2$  al doble enlace del ácido graso produciendo un radical nitroalquilo que, en baja tensión de O<sub>2</sub>, puede combinarse con otro  $\cdot\text{NO}_2$  para formar un derivado nitro-nitrito del ácido graso. Los nitroalquenos se producirían a partir de estas especies mediante la pérdida de ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), mientras que la hidrólisis de este

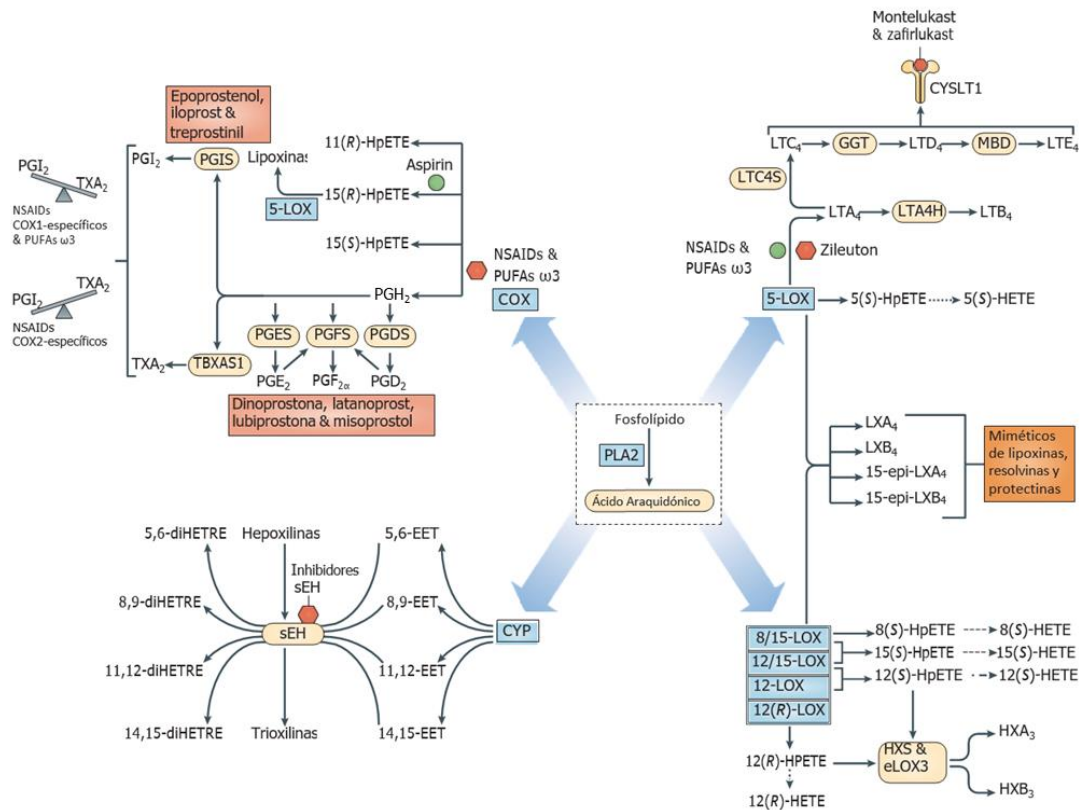
grupo produce derivados nitro-hidroxilados. Dado que el  $\cdot\text{NO}_2$  también puede iniciar lipoperoxidación, el grado de nitración depende esencialmente de la tensión de  $\text{O}_2$ : a bajas concentraciones de  $\text{O}_2$  predominarán los procesos de oxidación que concluyen en formación de hidroperóxidos lipídicos.



**Figura 6. Mecanismos de formación de ácidos grasos nitrados.** a) El  $\cdot\text{NO}_2$  reacciona con el ácido graso insaturado mediante una vía radicalar produciendo un radical  $\beta$ -nitroalquilo que combina con otro  $\cdot\text{NO}_2$  formando un intermediario nitro/nitrato. Luego, la pérdida de  $\text{HNO}_2$  o hidrólisis del grupo nitrato dan como producto un nitroalqueno o un derivado nitrohidroxilado, respectivamente. b) El radical  $\beta$ -nitroalquilo puede formar un nitroalilo por abstracción de un átomo de H. c) De forma alternativa, un mecanismo de sustitución electrofílica al doble enlace por ion nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ) también produce nitroalquenos. d) El  $\cdot\text{NO}_2$  y otros radicales formados durante estrés nitrooxidativo pueden iniciar oxidación lipídica que conlleva a la formación de hidroperóxidos que derivan en mediadores secundarios y toxinas tales como aldehídos. e) El  $\cdot\text{NO}_2$  promueve la isomerización trans del doble enlace. Adaptada de [35].

### Intervenciones terapéuticas en las vías de biosíntesis de eicosanoides

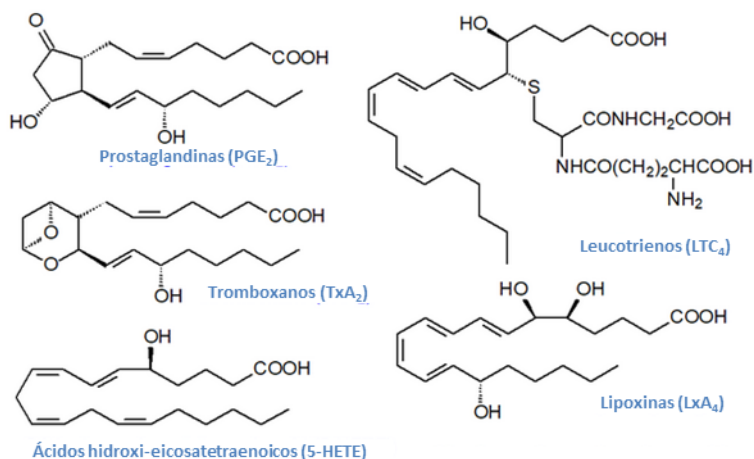
Las drogas dirigidas a las rutas biosintéticas de eicosanoides han sido utilizadas desde hace más de un siglo; la aspirina es el antiinflamatorio no esteroideo (NSAID, del inglés *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug*) más antiguo comercializado pero desde entonces existen numerosos ejemplos de NSAIDs. Desde que se conoce que el mecanismo de acción de los NSAIDs se debe a la inhibición de la síntesis de PG por la inhibición de COXs, se han desarrollado numerosos inhibidores, en algunos casos específicos para las distintas isoformas. Además la 5-LOX es el blanco preferido para el desarrollo de drogas para el tratamiento de alergias y asma, siendo el Zileuton un ejemplo de estos. Otros compuestos de relevancia en la modulación de la respuesta inflamatoria aún en ensayos clínicos son los ácidos grasos nitrados [40,41]. Se ha reportado que los ácidos grasos nitrados derivados del ácido oleico y ácido linoleico inhiben a la 5-LOX en leucocitos polimorfonucleares humanos [42]. Además el ácido araquidónico nitrado ha mostrado capacidad inhibitoria sobre COX-1 y COX-2 [43], por provocar liberación del grupo hemo. Estos son solo algunos ejemplos de moduladores de la vía de síntesis de oxilipinas, en la **figura 7** se comentan otros.



**Figura 7. Modulación de rutas biosintéticas de eicosanoides/ Terapéutica dirigida a vía de eicosanoides.** Las enzimas de la vía COX generan prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) y lipoxinas. Las enzimas de la vía LOX generan leucotrienos (LTs), ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) y hepoxilinas (HXs). Los citocromos P450 (CYP450) generan epóxidos y PUFAs dihidroxilados. Todas las vías tienen puntos de intervención farmacológica incluyendo inhibidores enzimáticos y antagonistas de receptores (como hexágonos rojos) o potenciadores (círculos verdes) y miméticos (cajas rojas). Los antiinflamatorios no-esteroides (NSAIDs) y PUFA omega-3 inhiben la actividad COX sobre el AA, a excepción de la aspirina, que potencia la formación de 15*R*-HpETE por COX-2 y que puede ser convertido en LXs por acción de 5-LOX. Los NSAIDs específicos para COX-1 y los PUFA omega-3 modifican el balance en la vasculatura hacia altos niveles de PGI<sub>2</sub>, mientras que los NSAIDs específicos para COX-2 lo hacen hacia elevados niveles de TxA<sub>2</sub> debido al acoplamiento entre la COX-1 plaquetaria y la TXA sintasa (TBXAS1), y la COX-2 endotelial con la PGI sintasas (PGIS). Los análogos a PG son usados en la clínica para mimetizar su actividad biológica endógena. Montelukast y Zafirlukast inhiben específicamente la activación del receptor de leucotrienos 1 (CYSLT1). El Zileuton inhibe la conversión de AA por 5-LOX, pero los NSAIDs y los PUFA omega-3 pueden potenciar dicha catálisis por inhibir las COX-1 y COX-2, y redirigir al AA hacia la 5-LOX. Los inhibidores de la epóxido hidrolasa soluble (sEH) reducen la inactivación de los epóxidos derivados del AA (EETs) y HXs. Los miméticos de LX, resolvinas y protectinas (caja naranja) han sido desarrollados para el tratamiento de enfermedades oculares, periodontal y cardiovascular. Las líneas punteadas representan pasos no-enzimáticos y transformaciones subsecuentes. eLOX3: epidermis LOX3; GGT: γ-glutamyl transferasa; diHETRE: ácido dihidroxi-eicosatrienoico; HXS: HX sintasa; LTA4H; LTA4 hidrolasa; LTC4S: LTC4 sintasa; MBD: dipeptidasa unida a membrana; PLA2: fosfolipasa A2. Adaptada de [18].

## Eicosanoides

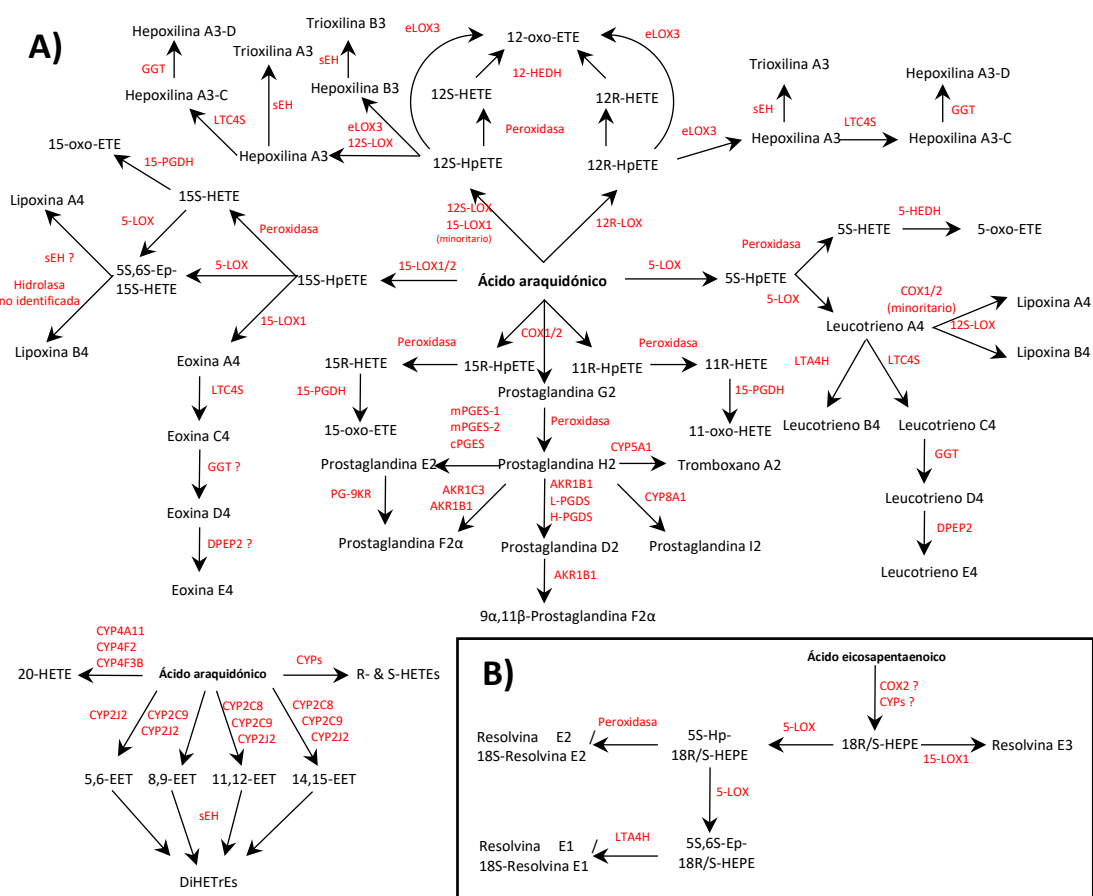
De los PUFA más relevantes, el AA ha sido el más estudiado y es especial en muchos aspectos. Es un ácido graso esencial para los animales ya que su síntesis *de novo* no es posible, y el LA de la dieta es requerido como su precursor principal. Como componente principal de los fosfolípidos y especialmente de PI, es importante para la integridad de membranas celulares pero también los lípidos complejos que contienen AA suelen poseer también actividades biológicas distintivas. Los metabolitos oxigenados derivados del AA y ácidos grasos relacionados se producen por una compleja e interrelacionada ruta biosintética denominada en ocasiones como “cascada del AA”. A modo de ejemplo en la **figura 8** se muestran las estructuras de algunos de los eicosanoides más relevantes. Las PG y Tx tienen un anillo distintivo en su estructura, mientras que los HETEs, que tienen una estructura más simple, son precursores de moléculas complejas tales como leucotrienos y lipoxinas [15].



**Figura 8. Estructura de algunos eicosanoides clave.** Adaptado de [15,44].

La mayoría de los eicosanoides se producen enzimáticamente con una gran precisión estereoquímica, y eso es esencial para su función biológica. Son muy potentes *in vitro* actuando a concentraciones nanomolar y se han identificado innumerables actividades, especialmente las relacionadas a respuesta inflamatoria, dolor y fiebre. La mayoría de los órganos y tipos celulares los producen; sin embargo hay que destacar el alto grado de especificidad tisular y su particularidad de ruta biosintética que, en algunos casos, se da de forma cooperativa entre distintos tipos celulares. Como fue mencionado anteriormente, existen distintas LOXs que actúan sobre diferentes posiciones del AA, para producir distintos HpETEs, que luego se convierten en sus correspondientes HETEs. Por ejemplo, el leucotrieno LTA<sub>4</sub> es producido a partir del 5-HETE y es también precursor de LTB<sub>4</sub>, cisteinil-leucotrienos

y lipoxinas. La vía de epoxigenasas de CYP450 genera HETEs y epóxidos (EETs) como productos principales, siendo los ácidos grasos dihidroxilados sus metabolitos secundarios (**figura 9**). Como se mencionó anteriormente, varias de las enzimas requeridas, precursores y productos son específicos de ciertos tipos celulares, lo que sumado a la proximidad de algunos tipos celulares puede facilitar la transferencia de eicosanoides entre células para continuar con su metabolización. Un ejemplo de ello es la biosíntesis de algunos leucotrienos que son producidos por mecanismos trans-celulares [15].



**Figura 9. Biosíntesis de eicosanoides.** En el esquema se representan las principales rutas biosintéticas de eicosanoides derivados del ácido araquidónico (A) y ácido eicosapentaenoico (B). HETE: ácido hidroxi-eicosatetraenoico; Hp: hidroperoxi; Ep: epoxi; LTA4H: LT4 hidrolasa; LTC4S: LTC4 sintasa; GGC:  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa; DPEP2: dipeptidasa; sEH: epóxido hidrolasa soluble; PGDS: PGD sintasa (L: tipo lipocalina, H: hematopoyética); 15-PGDH: 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa; PG-9KR: prostaglandina 9-oxoreductasa; EET: ácido epoxi-eicosatrienoico; DiHETrE: ácido dihidroxi-eicosatrienoico; HEPE: ácido hidroxi-eicosapentaenoico. Adaptada de [25].

La mayoría de los tipos celulares producen eicosanoides de ácidos grasos derivados de fosfolípidos, aunque la mayor parte de la investigación al momento se ha realizado con aquellas células que participan del sistema inmune innato. Por otra parte, los triacilglicéridos

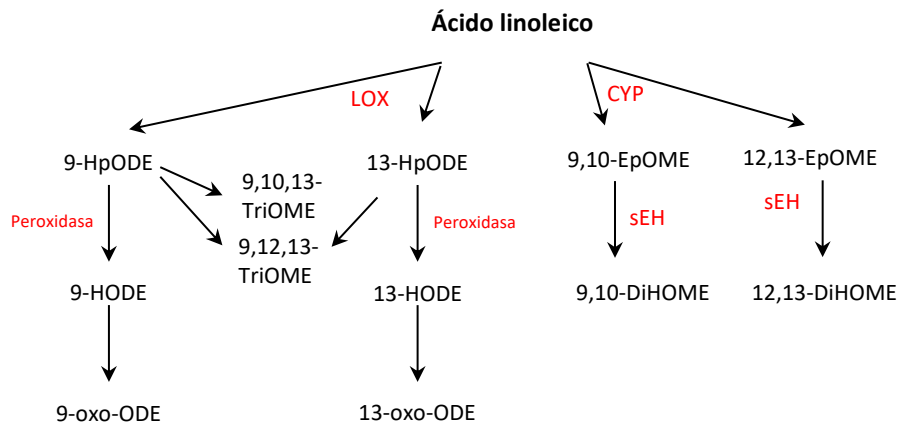
(TAG) que forman parte de gotas lipídicas citoplasmáticas de mastocitos humanos, que son potentes mediadores de reacciones inmunitarias y con fuerte influencia en varias enfermedades inflamatorias, tienen alto contenido de AA, y éste puede ser liberado por TAG lipasas para ser sustrato en la producción de eicosanoides específicos luego de una estimulación apropiada [45]. De hecho, en la actualidad se plantea que las gotas lipídicas en todos los tipos celulares son esenciales para los mecanismos de respuesta al estrés celular, incluyendo la inflamación e inmunidad, y actuando como *hubs* para integrar los procesos metabólicos e inflamatorios. Mediante su maquinaria lipolítica, regulan la disponibilidad de ácidos grasos para la activación de vías de señalización y producir oxilipinas a partir de PUFA [45]. A su vez, cada vez más se reconoce que los eicosanoides pueden aparecer como ésteres y que, en algunos casos, su síntesis puede darse aun estando esterificados. Esto podría ser una forma de tener depósitos disponibles de forma rápida para cuando una respuesta rápida sea requerida, pero algunos podrían tener actividad biológica como ésteres. Esto es particularmente cierto para las formas oxigenadas de los endocannabinoides. En última instancia muchos de los eicosanoides producidos en esta vía son dirigidos a membranas celulares en las que pueden interactuar con receptores específicos [15].



### Octadecanoides.

Desde los cambios en la agricultura hacia la producción de aceite de soja y maíz rico en LA por los años 1930s, ha habido un gran y rápido aumento en el consumo de LA a nivel mundial [46]. Los niveles históricos de consumo de LA varían entre 1 y 2% de las calorías diarias en la era pre-1930s hasta la actualidad en la que los niveles son mayores al 7% en promedio, siendo el LA el PUFA más consumido en la dieta occidental [46]. Se ha demostrado que el LA es precursor de oxilipinas, denominadas metabolitos oxidados de LA (OXLAMs, del inglés *Oxidized LA metabolites*), que han estado asociados a diversas condiciones patológicas [47]. Consecuentemente, los octadecanoides derivados de LA son las oxilipinas más abundantes en tejidos (en términos cuantitativos); sin embargo, comparado con otras clases de oxilipinas se conoce mucho menos acerca de sus funciones biológicas [24,47].

Durante varias décadas se asumió que el rol biológico del LA era actuar como sustrato para la síntesis de AA vía enzimas elongasas y desaturasas. El AA en sí mismo no es nutricionalmente esencial pero tiene un rol clave in vivo a través de sus metabolitos derivados (vía enzimática). Investigaciones de los años 1980s, proveyeron evidencia que el LA no solo es precursor de AA sino que tiene actividad biológica como autacoide y se definieron los OXLAMs. Los OXLAMs pueden ser formados por autooxidación o vía COX, CYP 15HPDH y sEH. Importante notar que estas mismas enzimas también oxidan  $\alpha$ -LnA para dar otros mediadores bioactivos. Ejemplos de OXLAMs incluyen a los derivados vía LOX 9 y 13 -HODEs, sus metabolitos cetona 9 y 13 -oxoODEs así como los derivados epóxidos CYP 9,10 y 12,13-EpOME y sus dioles correspondientes a los productos de acción de la enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH) (**figura 10**). De forma similar los derivados del ALA son HOTrEs, EpODEs DiHODEs. Algunos derivados de  $\alpha$ -LnA podrían tener efectos antiinflamatorios in vitro (p.ej. 13-HOTrE), aunque no está todo claro [24].



**Figura 10. Biosíntesis de octadecanoides.** En el esquema se representan las principales oxilipinas derivadas del LA. Es importante notar que el 9-HODE y 13-HODE también pueden ser producidos por vía COX. Adaptada de [47].

Ahora bien, la pregunta que siguió estando presente en el campo es si los OXLAM son bioactivos. Los primeros estudios de los años 1950s mostraron que pollos alimentados con una dieta con LA sin el agregado de alfa tocoferol desarrollaban encefalomalacia y ataxia [48–50]. Se reconoció entonces que la ausencia de vitamina E en la dieta promovía la oxidación no enzimática del LA en OXLAMs. Agregando los OXLAMs purificados a la dieta inducía comportamientos patológicos similares en los pollos, sugiriendo entonces una influencia directa de estas oxilipinas en la función cerebral [24]. Estudios adicionales por Hammock y colaboradores mostraron que los dioles del LA derivados de sEH (conocidos como leukotoxinas diol) son citotóxicos y promueven inflamación en ratas y ratones [51]. Prosiguieron algunos trabajos que, colectivamente, sugirieron que los OXLAMs son bioactivos *in vivo* e *in vitro*.

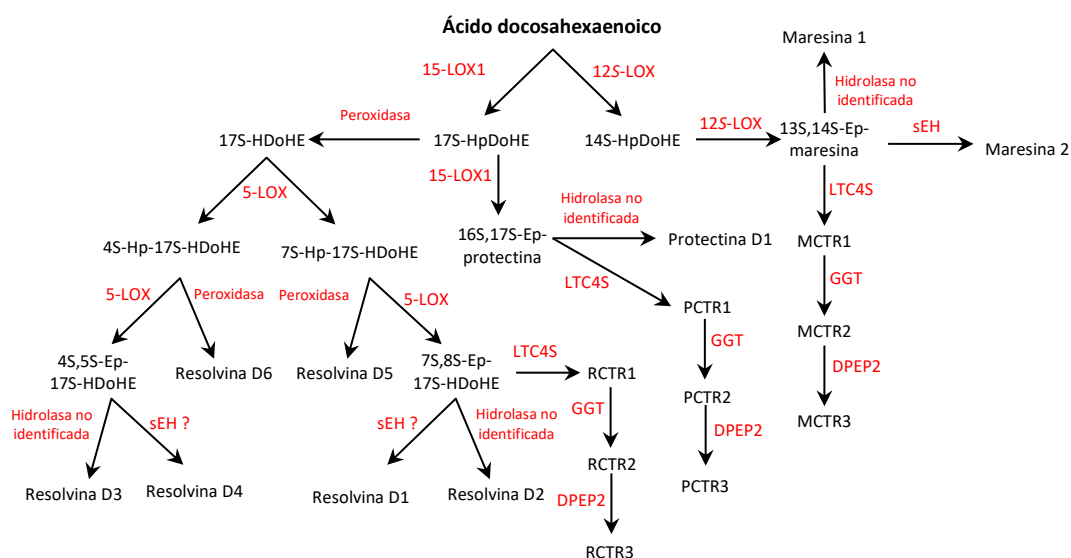
El grupo de da Costa Souza, Lein y Taha [24], realizó experimentos que mostraron que el LA del cerebro sirve como precursor de OXLAMs, pero el grado de conversión depende de la etapa de vida. En ratas adultas los OXLAMs constituyen un 7% de las oxilipinas detectadas en cerebro y ese valor crece si el LA de la dieta aumenta, sugiriendo que las concentraciones de OXLAMs cerebrales dependen de los niveles de LA en la dieta [52]. Entonces cuanto más LA en dieta, más LA entra al cerebro y más OXLAMs se sintetizan allí. En ratas recién nacidas (0–1 día de vida, machos y hembras) encontraron que las OXLAMs constituyen 50% de las oxilipinas de cerebro. Aún no comprenden si los altos niveles encontrados en recién nacidas se originan de la dieta o de la conversión del LA de la dieta que se puede dar en cerebro [24].

Estos estudios permitieron seguir investigando el rol de OXLAMs en cerebros adultos o en desarrollo. Encontraron que en adultos los OXLAMs se producen durante isquemia global, similar a los prostanoïdes y otros eicosanoïdes del AA, elevando la posibilidad de que est n involucrados en la respuesta a daño cerebral por isquemia [53,54].

En términos generales, la evidencia actual muestra que los OXLAMs son mediadores lipídicos bioactivos involucrados en la regulación del umbral de dolor, inflamación, respuesta a daño cerebral isquémico, neurotransmisión y morfogénesis neuronal. Sin embargo, los roles que pueden cumplir en cerebro aún permanecen sin comprender completamente [24].

## Docosanoides

Mientras que los eicosanoides fueron los primeros en ser identificados y estudiados de forma intensiva, en la actualidad se reconoce que los docosanoides (protectinas, resolvinas y maresinas, o SPMs) derivados de la familia de n-3 tales como EPA y DHA, son igual de importantes en sus funciones biológicas. Todas estas oxilipinas son producidas por vías relacionadas, que usualmente emplean las mismas enzimas por lo que son elementos importantes en este campo (**figura 11**) [15].



**Figura 11. Biosíntesis de docosanoides.** En el esquema se muestran las rutas biosintéticas propuestas para los SPM derivados de DHA. Adaptado de [25].

### Mediadores lipídicos de la resolución de la inflamación

Los SPM, denominados así por su íntima relación con la fase de la resolución de la inflamación, incluyen a derivados de AA, EPA y DHA<sup>2</sup>. En los últimos 15- 20 años ha habido un creciente interés en el descubrimiento y subsecuentemente elucidación de la biosíntesis y función biológica de los SPM. En contraste con las lipoxinas, que derivan de un ácido graso poliinsaturado omega-6 (AA), las protectinas, maresinas y resolvinas derivan de PUFAs omega-3; estos son principalmente EPA y DHA. Las oxilipinas derivadas del EPA son denominadas SPM de la serie-E y las derivadas de DHA se denominan SPM de la serie-D (**figura 11**). Las enzimas involucradas en su biosíntesis son las mismas que participan en la

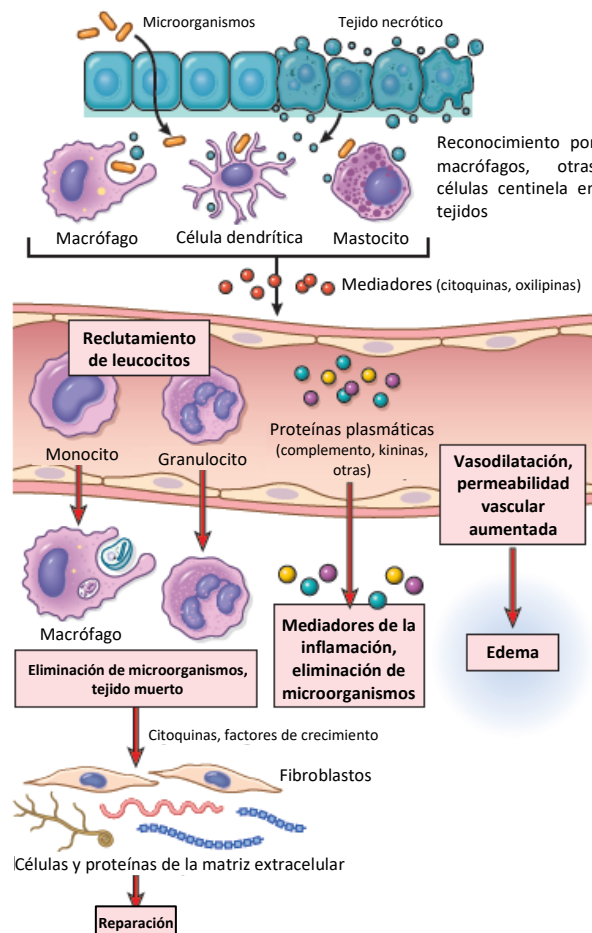
<sup>2</sup> Estrictamente, los SPM abarcan fundamentalmente el grupo de los docosanoides, pero también existen eicosanoides con actividad proresolutiva, como las lipoxinas, que también son consideradas SPM.

ruta de los eicosanoides, aunque hay una mayor preponderancia de reacciones catalizadas por LOXs [44].

Dada la diversa naturaleza de los SPM, no sorprende que posean una variedad de efectos biológicos. En general su acción se ejerce a través de receptores acoplados a proteínas G que pueden disparar acciones rápidas y de largo término. Además, los SPM pueden antagonizar los receptores proinflamatorios tales como el receptor de LTB<sub>4</sub>, BLT1. La inflamación aguda es una respuesta vital en respuesta a infección o daño tisular. Sin embargo, el tiempo que dura la inflamación debe ser lo mínimo necesario para evitar el establecimiento de inflamación crónica. Bajo circunstancias normales los compuestos involucrados en la inflamación inician la fase de la resolución. Por ejemplo, el propio LTB<sub>4</sub> y prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>, estimulan la inducción de 15-LOXs, que son necesarias para la producción de SPMs.

## Oxilipinas en inflamación

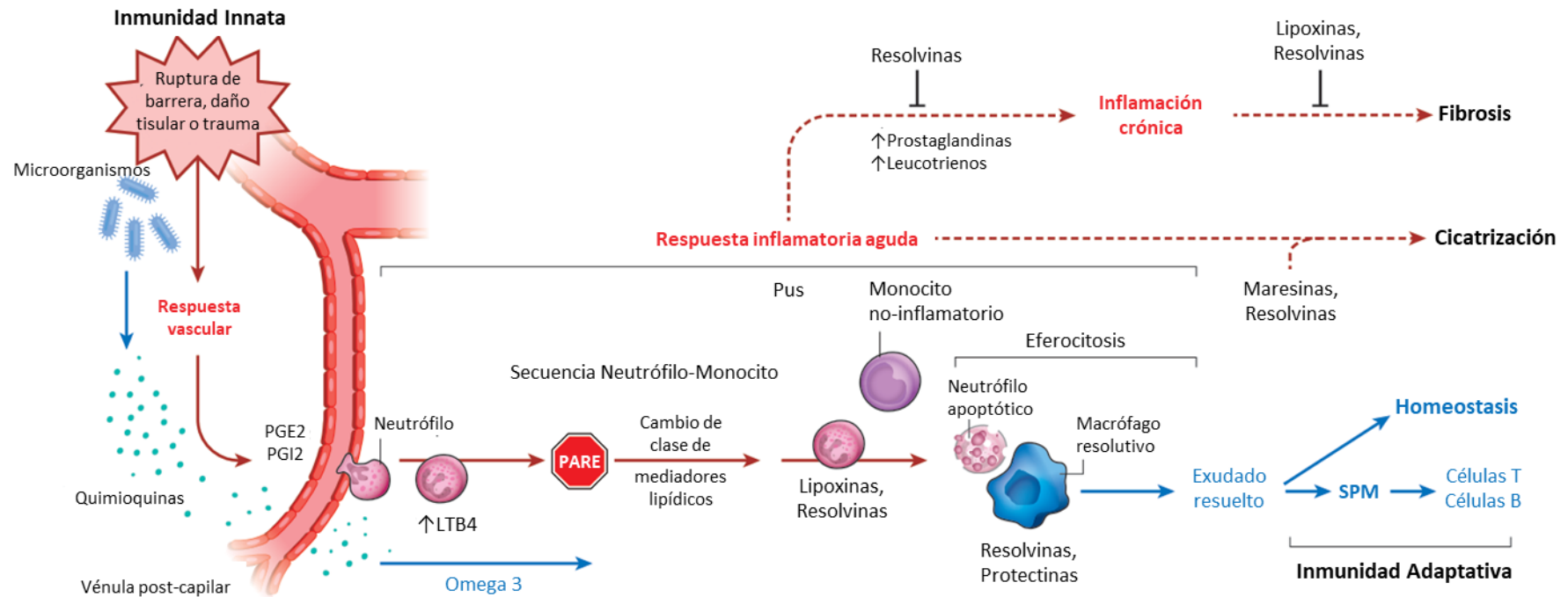
La inflamación es una respuesta de los tejidos vascularizados frente a las infecciones y/o daño tisular que recluta células y moléculas de la maquinaria de defensa del hospedero desde la circulación hacia los sitios en los que son necesarios para eliminar el agente agresor [55]. Típicamente una reacción inflamatoria se desarrolla a través de una serie de pasos (**figura 12**): i) el agente patógeno o de daño, que se localiza en un tejido extravascular es reconocido por células y moléculas del organismo hospedero; ii) leucocitos y proteínas plasmáticas son reclutadas desde la circulación hacia el sitio en el que se encuentra el daño; iii) los leucocitos y proteínas se activan y trabajan en conjunto para eliminar el agente de daño; iv) la reacción es controlada y terminada; v) el tejido dañado es reparado [55].



**Figura 12. Eventos en una respuesta inflamatoria aguda típica.** Los macrófagos y otras células en tejido reconocen patógenos y/o células dañadas y liberan mediadores (eicosanoides, entre otros) que disparan la respuesta vascular y celular de inflamación. Adaptada de [55].

Las PGs y LTs se producen rápidamente luego de la iniciación de la inflamación y promueven la inducción temprana de edema desde las vénulas postcapilares. Aunque esto ocurre naturalmente para mediar el sistema complemento y el reclutamiento de leucocitos al sitio de daño agudo, la respuesta mediada por eicosanoides puede ser abrumadora, causando una respuesta excesiva y hasta atentar contra la integridad del hospedero durante un shock séptico, por ejemplo [18]. La fase de resolución de la inflamación fue inicialmente considerada como un evento pasivo, en el que los efectos pro-inflamatorios desaparecían a medida el agente patógeno o de daño se controlaba y los mediadores de inflamación diluyen por difusión o dilución pasiva. Sin embargo, a medida que se investigó y descubrió el rol de los docosanooides en inflamación, se reveló que los denominados SPM actúan como agonistas con el potencial de estimular eventos celulares clave en de la resolución, fundamentalmente limitando la infiltración de neutrófilos y potenciando los procesos de eferocitosis por parte de los macrófagos [16]. En la **figura 13** se describen algunos eventos clave de un proceso de inflamación aguda, haciendo énfasis específicamente en el rol de los mediadores lipídicos.

En fases tempranas de la inflamación hay un cambio en el metabolismo del AA que va desde la síntesis de LT a la formación de Lx. La movilización local de PUFA omega-3, tales como el DHA, ocurre seguida de la producción de SPM. A medida que estos mediadores se producen, los macrófagos y mastocitos remueven el exceso de neutrófilos junto con los restos celulares que resultan de los patógenos y/o defensas del hospedero.



**Figura 13. Mediadores lipídicos en una respuesta inflamatoria aguda, resolución y otras evoluciones.** Los mediadores lipídicos tienen roles clave en la respuesta vascular y el tráfico leucocitario, desde la iniciación hasta la resolución de la inflamación. Las lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas, colectivamente denominadas SPM, se producen durante la respuesta inflamatoria autolimitada. Luego de daño tisular, trauma o ruptura de la barrera inmunológica, los eicosanoides son mediadores clave en la iniciación de los denominados signos cardinales de la inflamación: rubor, calor, dolor y edema. Como parte de la respuesta vascular los leucocitos son atraídos hacia el sitio de daño. Las prostaglandinas PGE2 y PGI2 (involucradas en la vasodilatación) y el LTB4 (involucrado en la quimiotaxis y adhesión celular) estimulan la migración de neutrófilos hacia el tejido. Como parte de la secuencia neutrófilo-monocito, sucede un cambio en el perfil de mediadores lipídicos producidos que va desde los eicosanoides “clásicos” hacia la producción de lipoxinas y que da una señal de PARE, dando inicio al final de la respuesta inflamatoria aguda. Las lipoxinas y resolvinas estimulan el reclutamiento de monocitos no activados. Los macrófagos resolutorios fagocitan neutrófilos en un proceso denominado eferocitosis (estimulado por resolvinas y protectinas). Luego de estos eventos se restaura la estructura normal del tejido y se da el retorno a la homeostasis. Los signos de la resolución incluyen el secuestro de citoquinas proinflamatorias, eferocitosis de neutrófilos desde superficies endoteliales y de cuerpos apoptóticos junto con restos celulares y de patógenos. Cuando la fase de resolución falla, se puede llegar a un estado en el que los niveles de prostaglandinas y leucotrienos están elevados y se establece una inflamación crónica y fibrosis. Los SPM contra-regulan los mediadores proinflamatorios reduciendo la magnitud y duración de la inflamación, y estimulan la re-epitelialización, cicatrización y regeneración tisular en organismos modelo. Adaptado de [16].



## Métodos de análisis de oxilipinas

Como se ha descrito hasta el momento, las oxilipinas contemplan un amplio espectro de metabolitos oxigenados de PUFA, con variadas e importantes funciones biológicas. Para comprender sus efectos biológicos, relación con fisiología o patología, o cómo una droga dirigida a modular su actividad puede afectar la función, es necesario contar con métodos analíticos precisos y sensibles. A su vez, es de gran importancia tener información acerca del más amplio espectro de oxilipinas posibles, ya que muchas de ellas actúan de forma sinérgica o antagónica. Por eso es que en la actualidad se apunta hacia el desarrollo de metodologías analíticas de *high-throughput* [56]. Los bioensayos fueron considerados para su análisis antes del desarrollo de inmunoensayos específicos y las técnicas analíticas para la cuantificación de eicosanoides. Existen numerosos ejemplos en los que se utilizaron bioensayos para cuantificar eicosanoides [56–58]. Los bioensayos empleados eran fundamentalmente ensayos *in vitro* en los que se determinaba la actividad de los eicosanoides sobre muestras de diferentes tejidos (estómago y colon de rata, recto de pollo, aorta de conejo, entre otros) o suspensiones celulares. Un ejemplo a citar podría ser la descripción del RCS (del inglés, *rabbit-aorta contracting substance*) que se realizó a partir de la exposición de material extraído de pulmones de cobayos sobre aorta de conejo. Más tarde se demostró el RCS se componía principalmente de TxA<sub>2</sub> [58]. La mayor preocupación asociada con el uso de bioensayos para la cuantificación de eicosanoides es que no era posible discriminar entre distintos eicosanoides que pudieran estar presentes en las muestras testeadas. Los inmunoensayos, incluyendo radionimunoensayos y ELISAs (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) fueron los primeros en emplearse para la cuantificación de eicosanoides. Estos métodos se basan en la afinidad de un anticuerpo por el eicosanoide de interés (epítipo) y por tanto requieren de anticuerpos específicos para cada eicosanoide que se desee cuantificar. Aparecen varias desventajas con el empleo de estos métodos; fundamentalmente podemos destacar que actualmente existen relativamente pocos anticuerpos comerciales disponibles, que los anticuerpos pueden presentar reactividad con más de un eicosanoide (oxilipina) y que con estos ensayos se puede determinar un analito por vez, por lo que se trata de una técnica que no es aplicable para analizar un gran número de oxilipinas (desde una perspectiva ómica) [59].

Con la aparición de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) muchas de las limitaciones de los inmunoensayos se vieron superadas y se comenzaron a

poder realizar análisis de múltiples oxilipinas en simultáneo [60]. De hecho, la GC-MS y GC-MS/MS (espectrometría de masas en tándem) ha jugado un rol central en la identificación y cuantificación de eicosanoides e *iso*-eicosanoides (los producidos por oxidación no enzimática) en los años 1980 – 2000 [60,61]. A medida fue avanzando el desarrollo de métodos de ionización, analizadores (aparecieron los análisis de masas en tándem) y cromatografías, se fueron mejorando e implementando los métodos de GC-MS para la cuantificación de eicosanoides [60]. Los métodos de GC-MS requieren de varios pasos analíticos: extracción, separación, purificación, derivatización y separación cromatográfica seguida del análisis de masas. Esta metodología combinó la selectividad de la separación por GC mediante la alta capacidad de resolución junto con la especificidad y sensibilidad de los análisis de espectrometría de masas. Esto permitió la cuantificación confiable de algunos eicosanoides en plasma y orina humana en niveles pg/mL [60]. A pesar de las virtudes de esta metodología, la mayor desventaja radica en la necesidad de contar con analitos volátiles y térmicamente estables a las temperaturas de las GC. Por eso el paso de derivatización es indispensable para poder analizar eicosanoides. Una forma empleada fue mediante la formación de fluorobencil-ésteres y trimetilsilil-ésteres a partir de las oxilipinas, y se aplicó a la determinación de iso-PGs, PGs, TxS, HETEs, diHETEs y epóxidos en muestras biológicas [62]. Existe una amplia variedad de métodos de derivatización disponibles, sin embargo no hay un método de derivatización apropiado que comprenda a todos los eicosanoides [59]. A su vez, algunos eicosanoides directamente no se pueden analizar por GC-MS (porque no se volatilizan a pesar de derivatización), como es el caso del LTC<sub>4</sub> [63]. Por otra parte, los grupos funcionales carboxilo, hidroxilo y cetona de los mediadores lipídicos son en ocasiones inestables a las temperaturas de análisis por GC [61].

La situación cambió completamente con el desarrollo de técnicas que permitieron que compuestos no volátiles pudieran generar iones en fase gaseosa. En una primera instancia se empleó ionización por FAB (del inglés, *Fast Atom Bombardment*) pero enseguida se cambió a la ionización por electrospray (ESI, del inglés, *ElectroSpray Ionization*) y esta técnica acaparó el campo para el análisis de todos los eicosanoides (volátiles y no volátiles) [64]. A su vez, el acople de los espectrómetros de masas ESI con la cromatografía líquida (LC) constituyó un elemento crítico para el análisis cuantitativo de oxilipinas en diversas matrices [64]. Es que la inyección o infusión directa de muestras biológicas que contienen una gran cantidad de compuestos ionizables al MS, puede llevar a la supresión iónica y reducir la sensibilidad

completamente. Aún más, muchas oxilipinas presentan diferencias estructurales que no pueden ser distinguidas por espectrometría de masas. Esto es claro y está muy demostrado para el caso de PGE2 y PGD2. En la mayoría de los casos, ambas limitaciones pueden ser superadas usando cromatografía líquida previa a la entrada al MS.

Entonces, en la actualidad se usa principalmente la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) como método preferencial para el análisis cuantitativo de oxilipinas, tanto que en la última década ha desplazado a otras técnicas [56]. La ESI, como técnica de ionización suave, genera muy poca fragmentación y es la más común para el análisis de oxilipinas. Aunque en términos generales la ionización de moléculas orgánicas suele ser en modo positivo, los mediadores lipídicos son generalmente analizados en modo negativo por la presencia de su grupo carboxilato, que posee carga negativa. Para la cromatografía líquida se suelen usar columnas de fase reversa, pero hoy en día hay un creciente empleo de columnas quirales para aplicaciones particulares en las que se requiere la separación de estereoisómeros R/S [62]. En cuanto a las fases móviles empleadas, algunos autores proponen MeOH:H<sub>2</sub>O con ácido fórmico o acetato de amonio, acetonitrilo con ácido fórmico o ácido acético [62]. La adición de un ácido 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. Sin embargo, mejoran la separación cromatográfica ayudando a activar los grupos silanoles de las columnas y por tanto, aumenta las interacciones de Van der Waals con los analitos [62]. 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 sensibilidad superior.

El nivel siguiente de complejidad de análisis lo aportó la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Es que las similitudes estructurales y químicas entre las distintas oxilipinas requieren un paso de separación cromatográfica y análisis de fragmentación en conjunto con el ESI-MS, para separar e identificar “inequívocamente” a las distintas especies de oxilipinas. La LC separa a los analitos según sus propiedades químicas y físicas mientras que la fragmentación, generalmente fragmentación inducida por colisión (CID, del inglés *Collision Induced Dissociation*), produce transiciones ion precursor/ion producto características que pueden ser utilizadas en monitoreadas en el MS. Para ello se emplea un modo de análisis denominado MRM (del inglés, *Multiple Reaction Monitoring*) y se describe más adelante. Los análisis de ESI-MRM fueron inicialmente empleados en este campo de estudio por Issakson

y colaboradores en 1996 para cuantificar 14 eicosanoides directamente de una muestra biológica [65]. En 2002, el poder de resolución de la cromatografía líquida se acoplo con la sensibilidad del MRM para estudiar 5 eicosanoides presentes en células sinoviales estimuladas con lipopolisacárido (LPS) [66]. En la actualidad existe una vasta bibliografía que reporta métodos de detección de decenas/cientos de oxilipinas en un solo análisis por LC-MS/MS [59,67–71]. Por una revisión general de métodos de análisis de oxilipinas se puede consultar en [72].

### Fragmentación

La espectrometría de masas ha jugado un rol crítico en la identificación de eicosanoides desde su caracterización estructural inicial en el trabajo seminal de Sune Bergström y Bengt Samuelsson en los años 1960s [8]. Mediante el empleo de ESI y espectrometría de masas en tándem, se vio que casi todos los eicosanoides son pasibles de análisis. En general el proceso de trabajo es el siguiente: en ESI en modo negativo, se remueve el protón del carboxilato, formando el ion pseudomolecular  $[M-H]^-$  (ion precursor), y permitiendo su entrada al espectrómetro de masas. El cuadrupolo 1 actúa como filtro permitiendo que solo pase el ion  $[M-H]^-$ . En el cuadrupolo 2 un pequeño voltaje excita al ion precursor que luego de impactar con un pequeño número de moléculas de nitrógeno se produce fragmentación (o descomposición) inducida por colisión, y se genera un perfil de iones producto (patrón de fragmentación) [59].

De forma análoga a las reacciones químicas que suceden en solución, los iones precursores se pueden fragmentar en el espectrómetro a través de distintas vías de descomposición. Estas suelen ocurrir en posiciones de la molécula en las que se encuentran grupos estructuralmente reactivos (en solución). En muchos casos, las descomposiciones ocurren por vías muy bien descritas [64] aunque otras suceden por vías no definidas. Bajo un cierto *set* de condiciones instrumentales, la probabilidad de atravesar una vía de descomposición u otra es fácilmente reproducible. Entonces, la intensidad relativa e identidad de los iones producto en el espectro de fragmentación genera una “huella” que puede ser utilizada para identificar eicosanoides en una muestra biológica [59].

### *Multiple Reaction Monitoring*

El espectro de fragmentación es una herramienta muy útil para la identificación, pero por sí misma no permite la cuantificación de un determinado metabolito en solución. Sin embargo,

seleccionando un par de iones precursor/producto (transición) que sea distintiva de un eicosanoide en particular, la intensidad del producto se puede determinar de manera cuantitativa. El espectro de fragmentación de la mayoría de los eicosanoides contiene muchos iones producto por lo que existe la posibilidad de elegir entre varias transiciones. El espectrómetro de masas es capaz de medir cierto número de diferentes transiciones casi de forma simultánea usando *multiple-reaction monitoring* (MRM). En el modo MRM, el espectrómetro mide inicialmente la primera transición por un tiempo acotado que depende de la configuración del equipo (típicamente milisegundos), luego cambia a la segunda transición y así. Una vez llega al final de la lista, reinicia con la primera transición y repite el proceso. En última instancia, combinando el poder de identificación con la separación de LC, se permite la identificación y cuantificación de una gran número de eicosanoides en un solo análisis [59].

#### Pre-tratamiento de muestras

Como se mencionó anteriormente, el análisis de oxilipinas en muestras biológicas contempla varias etapas analíticas. Hasta ahora se ha detallado acerca de los últimos pasos, el análisis por HPLC-MS/MS. No menos importante son los pasos de tratamiento previo de las muestras, esto es, extracción, separación y purificación. La preparación de las muestras es un paso crucial para la buena práctica analítica en el análisis de mediadores lipídicos. La extracción efectiva de los analitos de una matriz, la eliminación de interferencias, y la detección de señal para analitos en niveles traza, son aspectos a optimizar cuidadosamente. El almacenamiento de las muestras es también un paso crítico debido a la alta susceptibilidad oxidativa de los mediadores lipídicos a temperatura ambiente, o aún la actividad enzimática residual. Entonces, las muestras se suelen conservar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con EDTA para quelar  $\text{Ca}^{+2}$  y prevenir activación de PLA2, indometacina para inhibir COXs, ácido *trans*-4-[4-3(3-adamantan-1-il-ureido)-ciclohexil-oxi-benzoico (*t*-AUCB) como inhibidor de sEH, y/o con antioxidantes tales como el BHT [62,71,73].

#### Extracción

La extracción de oxilipinas 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 la precipitación proteica, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida (SPE, del inglés *Solid Phase Extraction*). Estas técnicas remueven interferentes de la matriz en distinto grado y permiten una buena

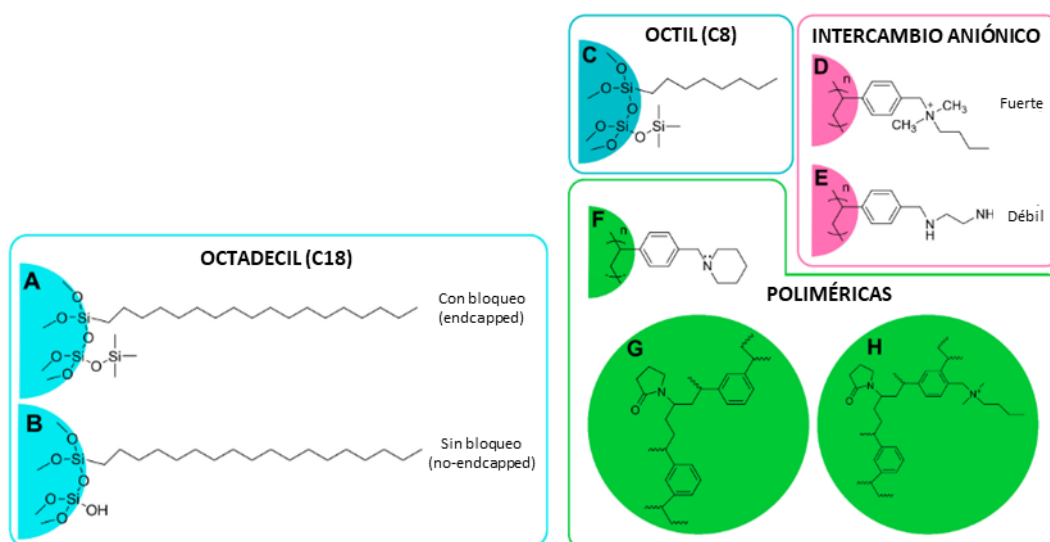
recuperación de los analitos, pero siendo procesos que llevan tiempo y manipulación, existe la posibilidad de generar productos de oxidación de PUFA nuevos durante el proceso. Esta es otra razón para agregar los antioxidantes antes mencionados.

La [precipitación de proteínas](#) puede realizarse disminuyendo la constante dieléctrica del medio acuoso, por adición de un solvente orgánico (metanol o acetonitrilo); por *salting out* mediante la adición de sulfato de amonio que aumenta la fuerza iónica, o cambiando el pH por adición de ácidos concentrados [56].

Para los métodos de [extracción líquido-líquido](#) se usan solventes orgánicos en los que los analitos de interés tienen mayor solubilidad que en agua. El método de Bligh & Dyer es un método tradicional para la extracción de lípidos que emplea cloroformo y metanol, sin embargo, para las oxilipinas, que son relativamente polares generalmente se opta por solventes o mezclas de solventes más polares. Algunos ejemplos son hexano y acetato de etilo, cloroformo y acetato de etilo, propanol y hexano. En cualquier caso, la fase orgánica se remueve, se evapora y reconstituye en solvente adecuado para los pasos siguientes [56].

La [extracción en fase sólida](#) es ampliamente utilizada para la preparación de muestras para el análisis de oxilipinas debido a su alto porcentaje de recuperación (superior al 90%), selectividad, precisión, relación costo/eficiencia y mínima supresión iónica. Mediante esta técnica los analitos son retenidos selectivamente a un adsorbente particular por interacción hidrofóbica y/o electrostática. Los adsorbentes se empacan en formatos diferentes tales como columnas, cartuchos jeringas o incluso en placas de 96 pocillos. La literatura de la última década revela que la SPE es el método de elección sin importar la muestra (orina, plasma, saliva, tejidos) [56]. La base de una SPE es la separación selectiva de analitos entre la fase líquida y la sólida (estacionaria). El principal objetivo es remover los compuestos que pueden causar efectos adversos durante el análisis y concentrar los analitos de interés, de forma tal de disminuir los límites de detección. Removiendo los interferentes e impurezas la SPE protege también al sistema analítico y mejora la eficiencia del equipamiento. El empleo de solventes adecuados para la etapa de lavado posterior a la siembra de la muestra y la elución permite enriquecer selectivamente en los analitos de interés [74]. La acidificación de la muestra y durante el acondicionamiento de los cartuchos es un aspecto importante. Los mediadores lipídicos son compuestos con polaridad moderada, por lo que en la literatura se describe el uso de pH neutro o ácido, entre 4-5 [62]. En ambos casos los porcentajes de

recuperación son similares. Las fases estacionarias más comunes son de fase reversa (C18), fase normal (sílica) y de intercambio iónico (aniónico o catiónico). Para el caso de las fases reversas el principio de funcionamiento se basa en la interacción de las regiones alifáticas de las oxilipinas con la fase estacionaria no polar. En el caso de la sílica, se retienen los compuestos polares y son típicamente utilizadas para limpieza. En caso de las resinas de intercambio aniónico poliméricas, se retienen selectivamente las oxilipinas debido a la carga negativa de su grupo carboxilo y las interacciones hidrofóbicas. Los adsorbentes poliméricos (que contienen grupos funcionales hidrofílicos y lipofílicos) han mejorado y ampliado el espectro de metabolitos lipídicos que pueden retener [74] (**figura 14**). Ostermann *et al* han realizado una comparación exhaustiva entre distintos cartuchos de SPE y extracción líquido-líquido para la extracción de oxilipinas y concluye que la SPE es siempre mejor [75].



**Figura 14. Ejemplos de fases estacionarias más comunes empleadas para SPE de oxilipinas.** A: Strata C18-E; B: Chromabond C18; C: Discovery DSC-8; D: Strata-X-A; E: Strata-X-AW; F: Strata-X; G: Oasis HLB; H: Oasis MAX. Adaptada de [74].

#### Calibración para cuantificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS

La falta de una matriz adecuada como blanco para la cuantificación de eicosanoides se presenta como un desafío mayor. Varios enfoques están disponibles para lidiar con las deficiencias de matrices blanco para la cuantificación incluyendo: sustracción del *background*, adición de estándar, soluciones limpias, matrices artificiales de fluidos biológicos, matrices *charcoal stripped*, y analitos marcados con isótopos estables [56].

#### -Método de sustracción de *background*

En este método, la curva de calibración se construye luego de sustraer la concentración de los eicosanoides (analitos) del *background* en una matriz *pooleada* o representativa de las concentraciones de los estándares adicionados. En este enfoque la matriz usada para la curva de calibración es idéntica a las muestras analizadas de modo que no hay diferencia en la recuperación y efecto matriz entre las muestras y curvas de calibración. La mayor desventaja de este método está asociada al límite de cuantificación, que queda limitado por el *background* endógeno en una matriz blanco y no por la sensibilidad analítica. La falta de reproducibilidad es otra desventaja mayor, y surge como resultado de usar diferentes *batches* de biofluidos *pooleados* como matriz blanco, requiriendo entonces la sustracción de distintos niveles según los valores endógenos [56]. Por ejemplo, este método ha sido empleado para cuantificar prostanoides en cultivos primarios de hepatocitos de rata [76].

#### -Método de adición de estándar

En este método cada muestra estudiada se divide en alícuotas de igual volumen y a todas las alícuotas se les agrega estándares de analitos en cantidades conocidas (*spike*) para construir una curva de calibración. Esta curva de calibración se usa para determinar la concentración en la muestra a partir del intercepto en el eje x (negativo). La gran ventaja es que se usa exactamente la misma matriz para cada estudio y se construye una curva de calibración específica para cada muestra. Las chances de error son mínimas en este método ya que la cuantificación directa de los analitos endógenos se lleva a cabo sin la sustracción manual del *background* (a diferencia del método anterior). Los requerimientos de grandes volúmenes de muestra hacen que este método sea muy consumidor de tiempo y poco adecuado para análisis rutinarios [56]. Por ejemplo, este método se propone en el trabajo de Yang *et al* para cuantificar oxilipinas en muestras biológicas [68].

#### -Matrices sustitutas (*Surrogate matrices*)

Obtener una matriz libre de analitos endógenos para la preparación de estándares de calibración es un desafío. Por tanto, en ocasiones se utilizan matrices sustitutas, incluyendo solventes de las fases móviles o agua pura. El uso de matrices sustitutas potencia la eficiencia del método pero debe ser notado que si se usan soluciones limpias como matriz sustituta los rendimientos de extracción y efectos de la matriz (real) podrían estar subestimados. Algunos de estos métodos involucran el uso de matrices artificiales y *stripped matrices*. Las matrices artificiales simuladas son auténticas en términos de composición, contenido de sal,



solubilidad del analito y tienen una recuperación de extracción y un efecto de matriz similares a los de la matriz original. En la práctica general, las matrices artificiales para cuantificar eicosanoides se preparan añadiendo albúmina de suero bovino (BSA) o humano (HSA) a solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 20-80 g/L. Las denominadas *stripped matrices* se pueden crear a partir de un pool de matriz original (o real) que se somete a un tratamiento con carbón activado. Se debe tener especial atención al usar carbón para eliminar todas las partículas de carbón después de la extracción y así evitar su unión con analitos enriquecidos que pueden afectar el resultado. La otra preocupación principal al usar matrices despojadas es que el carbón no puede eliminar todos los analitos endógenos y puede ocurrir una variación entre lotes en el *stripping* [56].

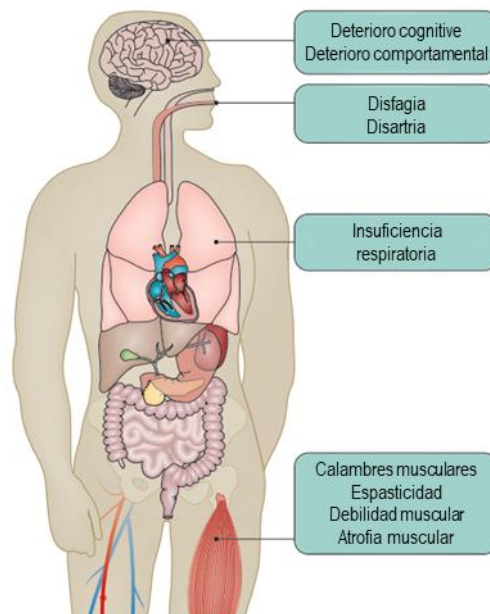
#### -Analito sustituto

El método de analito sustituto involucra el uso de un estándar marcado con isótopo estable como un analito sustituto para la cuantificación directa y sensible de los distintos analitos debido a la ausencia de éstos como potencial *background* endógeno. Los analitos sustitutos son idénticos o tienen mínimas diferencias en términos de recuperación de la extracción retención cromatográfica e intensidad de señal debido a lo similar de las propiedades fisicoquímicas entre ellos y sus analitos endógenos auténticos. El factor de respuesta entonces debería ser un valor fijo y constante durante todo el rango de calibración. Una limitación de este método es el costo de los estándares marcados. También se debe tener cuidado con el almacenamiento de estos estándares ya que pueden descomponerse en largos períodos [56]. Por ejemplo, éste es el propuesto por Deems *et al* [77] y muchos otros trabajos.

## Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa heterogénea que se caracteriza por la degeneración tanto de motoneuronas superiores (las que se proyectan desde la corteza hacia el tallo y la médula espinal) como de motoneuronas inferiores (las neuronas que se proyectan desde el tallo y médula hacia los músculos), lo que conlleva a síntomas motores y extra-motores [78]. La presentación inicial de la ELA puede variar entre pacientes; algunos se presentan con inicio espinal, es decir que se inicia con debilidad muscular en las extremidades, pero en otros pacientes se presenta con un inicio bulbar, que se caracteriza por disartria y disfagia (dificultad para hablar y tragar, respectivamente). La edad de inicio de los síntomas de la enfermedad es variable. Raramente comienzan previo a los 40 años de vida, y en la mayoría de los pacientes ocurre entre los 50 y 70 años. Es una enfermedad progresiva, la mayoría de los pacientes muere entre los 3 a 5 años luego del inicio de los síntomas, aunque existe gran variabilidad [79]. En la mayoría de los pacientes la causa de ELA es desconocida, aunque en algunos individuos aparecen antecedentes familiares que se asocian con mutaciones en genes que tienen un amplio y diverso espectro de funciones biológicas. Algunos de los genes implicados son incompletamente penetrantes los casos de ELA familiar, y salvo raras excepciones, el genotipo no necesariamente predice el fenotipo [78]. Como sucede con otras enfermedades neurodegenerativas, en la actualidad se reconoce que la ELA es una condición heterogénea asociada con más de un mecanismo patogénico y con características clínicas diferentes [80].

Aunque los síntomas primarios de la ELA están asociados con la disfunción motora (tales como debilidad muscular, espasticidad y disfagia), hasta el 50% de los pacientes desarrollan también deterioro cognitivo y/o *impairment* comportamental durante el transcurso de la enfermedad, y el 13% de los pacientes presentan una variante (comportamental) de demencia frontotemporal (DFT) (**figura 15**). La alta prevalencia de síntomas cognitivos o comportamentales en pacientes con ELA, junto con los descubrimientos de que una expansión de repetido de hexanucleótidos en *C9orf72* (*encoding guanine nucleotide Exchange C9orf72*) es la causa principal de ELA y DFT, han contribuido a la recharacterización de ELA como una enfermedad neurodegenerativa más que neuromuscular y ha servido de guía para la líneas de investigación en los últimos años [78].



**Figura 15. Manifestación clínica de la ELA.** Aunque las manifestaciones principales son motoras (debilidad muscular, disfagia), casi la mitad de los pacientes tienen síntomas no motores tales como el deterioro cognitivo. Adaptada de [78].

La clasificación de ELA puede variar dependiendo del criterio utilizado. Las definiciones clásicas de los subgrupos de ELA estaban basadas en el grado de participación de las motoneuronas superiores o inferiores, aunque otros sistemas de clasificación incluyen diferentes parámetros, tales como el sitio de inicio de los síntomas (bulbar o espinal), el nivel de certeza de diagnóstico de acuerdo al criterio El Escorial revisado<sup>3</sup> y heredabilidad (esporádica o familiar). A la fecha, ninguno de estos sistemas de clasificación ha incorporado los síntomas comportamentales o cognitivos, y dentro de cada sistema, se observa un rango de sub-fenotipos y trayectorias clínicas [78].

### Epidemiología Descriptiva

Los estudios poblacionales en ELA surgen de registros de buena calidad que provienen fundamentalmente de países europeos. De hecho una limitante principal para el estudio de esta enfermedad es que el ~80% de los trabajos poblacionales se han realizado en Europa y EEUU, y comprenden principalmente cohortes de ancestría del norte europeo. Mediante

<sup>3</sup> El criterio de diagnóstico El Escorial revisado clasifica el diagnóstico de ELA en Definitivo, Probable y Posible, según criterios clínicos.

estos estudios se ha reportado una incidencia de 2-3 casos cada 100.000 individuos. Como la ELA es una enfermedad rara, lo ideal sería contar con estudios poblacionales con múltiples fuentes de comprobación, pero no es la situación real. En la actualidad existen algunas iniciativas de consorcios de investigación que trabajan en esa línea para corregir esas deficiencias [78]. De todas formas, con los datos actuales se puede decir que, contrario a las suposiciones iniciales, la incidencia de la ELA difiere según el origen ancestral [78,81]. Los estudios de poblaciones de origen europeo han mostrado tener una incidencia de ~3 casos cada 100.000 individuos, pero la incidencia es menor en el este asiático (~0,8 casos cada 100.000) o en el sur de Asia (~0,7 casos cada 100.000). En algunas regiones (tales como Guam y la península Kii en Japón) la incidencia reportada fue mayor pero se ha reducido sustancialmente en los últimos 30 años por razones que aún se desconocen. En áreas en las que conviven poblaciones de diferente ancestría (como en EEUU) la incidencia de ELA en poblaciones indígenas es baja (0,63 casos por 100.000), mientras que las incidencias reportadas para las regiones con poblaciones relativamente homogéneas (como Irlanda, Escocia y las Islas Feroe) son altas (2.6 casos cada 100.000) [78,82].

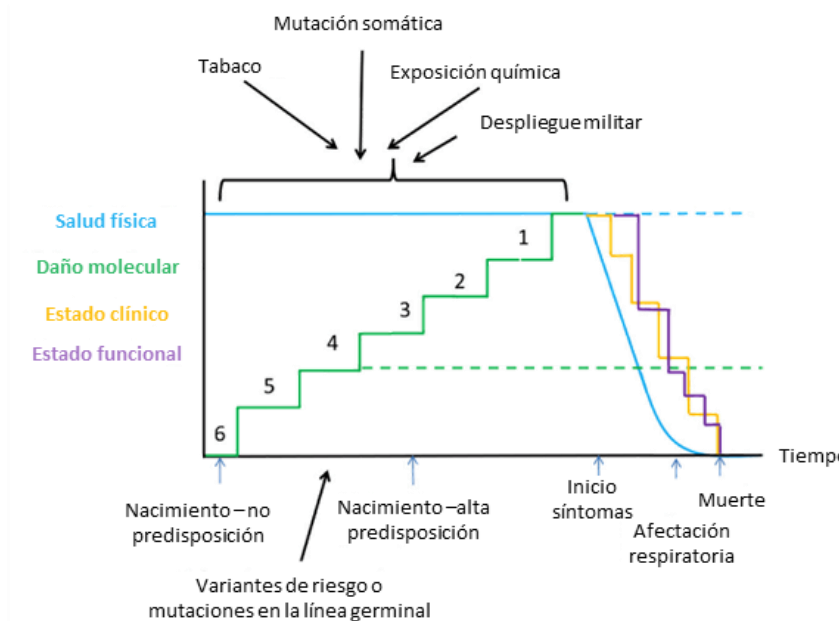
También se han evidenciado variaciones en el fenotipo y transcurso de la ELA en poblaciones de diferente ancestría; un claro ejemplo de esto es que la supervivencia en Europa es menor (24 meses) que en Asia (48 meses) [83]. A su vez, poblaciones de ancestría “mezclada” podrían tener formas de ELA de menor mortalidad. En un estudio poblacional en Cuba, se vio que la mortalidad de pacientes con ELA fue de 0,55 cada 100.000 en una población de ancestría mezclada, pero de ~0,9 cada 100.000 en individuos de ancestría con menor grado de mezcla [81], confirmando la importancia de origen ancestral en el riesgo de enfermedad. En Europa, la mayoría de los hombres tienen la versión de inicio espinal, y las mujeres son más propensas para el inicio bulbar [82]. El porcentaje de individuos con inicio bulbar es mucho más bajo en Asia que en Europa, pero se ha reportado un gradiente Norte-Sur para Europa, con alto porcentaje de inicio espinal en el sur [82]. En base de los datos disponibles, la edad de diagnóstico e inicio de los síntomas es mayor en Europa que en Asia y Sudamérica. En Europa, la edad de inicio es más probable a los 65 años [82]. En Uruguay, la incidencia reportada para la ELA es de 1,9 cada 100.000 [84] y se han evidenciado menores tiempos de supervivencia para los pacientes en comparación con datos provenientes de países europeos (según datos de 2009, sin centro de referencia en ELA y contemplando limitaciones en acceso a fármacos) [85]. En la actualidad se está llevando a cabo una red de trabajo, *LAENALS (Latin American*

*Epidemiology Network for ALS*), que tiene por objetivo el estudio de la incidencia y prevalencia de ELA en poblaciones de ancestría no europea. El objetivo es proveer una base con la cual se puedan implementar estudios comparativos entre tres poblaciones latinoamericanas diferentes (Chile, Cuba y Uruguay) y las poblaciones ya estudiadas (EEUU y europeas) [86].

## Causas de la enfermedad

### Genética

La ELA ha sido clásicamente clasificada como esporádica o familiar. La ELA familiar se define clásicamente como un caso heredado de ELA, pero el criterio consensuado implica que se debe definir en base a la probabilidad de que dos o más familiares posean la misma mutación causal de la enfermedad por lo que la clasificación es en algunos casos dificultosa [87,88]. La ELA esporádica clásica se define como la enfermedad causada en un paciente sin evidencia de que haya sido heredada, y hoy se entiende que aun así, comparte varios genes de riesgo con la ELA familiar [88]. Esta simple subdivisión ignora la compleja arquitectura génica de la enfermedad, que se caracteriza según herencia monogénica, oligogénica y poligénica, según penetrancia y heredabilidad. Los casos de ELA familiar comprenden el 10-15% de los individuos enfermos aunque la penetrancia es incompleta en la mayoría de las familias [82,88]. La arquitectura génica es compleja, con un patrón Mendeliano de herencia en algunos casos pero sin historial familiar discernible para el resto. Los modelos matemáticos desarrollados usando registros poblacionales han sugerido que los individuos con ELA probablemente llevan un número de variantes “de riesgo” que interactúan con los factores ambientales a través de una serie de (al menos) 6 pasos que conllevan a la manifestación de la enfermedad, **figura 16** [88–90]. Uno de estos pasos se cree que es el riesgo genético (de nacimiento), pero la interrelación con los factores ambientales que llevan a los pasos restantes aún no está definido completamente.



**Figura 16. Curso temporal de la ELA.** El tiempo se representa en el eje-x.; la salud física y daño molecular se representan en el eje-y. Con el tiempo, el daño molecular aumenta de a “pasos” hasta que alcanza un umbral en el que la salud física se deteriora, lo que representa el inicio de la enfermedad. Las personas con un historial familiar de ELA podrían tener una mayor predisposición genética para ELA por lo que necesitarían menos pasos para alcanzar el nivel umbral, lo que correspondería a una edad menor para el inicio de los síntomas. La no exposición a factores de riesgo suficientes, implica que la enfermedad no se manifiesta, aún si la causa genética está presente, lo que explicaría la baja penetrancia. No hay un “mapeo” de los factores de riesgo y pasos, ya que los pasos representan golpes moleculares que llevan al daño celular más que la exposición real. Una vez que los síntomas físicos han comenzado, la progresión se muestra como un decaimiento logarítmico hasta que el inicio de los síntomas respiratorios aparecen y entonces el decaimiento es exponencial. Las líneas punteadas muestran el transcurso de un individuo hipotético no afectado. Las flechas negras representan factores de riesgos genéticos y ambientales. Los números muestran los “hits” remanentes para dar inicio a la enfermedad. Adaptada de [90]

### Genes asociados

Existen diversos estudios con foco en genes asociados con el desarrollo de la ELA, la mayoría surgen principalmente de estudios en poblaciones con ancestría europea (Europa, Canadá, Australia, EEUU) y las poblaciones del este asiático (ver tabla). Aunque al menos 40 genes se han asociado con la enfermedad (ALSoD, alsod.ac.uk), solo 4 de ellos comprenden cerca del 48% de los casos de ELA familiar y el 5% de ELA esporádico en poblaciones de origen europeo [91] (tabla 2 y figura 17). Estos son *SOD1*, *C9orf72*, *TARDBP* (codificando para TDP-43) y *FUS*, y han permitido comprender aspectos importantes de la fisiopatología de la enfermedad [88,91]. Las mutaciones ligadas al gen de la *SOD1* fueron inicialmente descritas en 1993 [92]

y desde entonces se han encontrado mutaciones en cada exón del gen. La SOD1 es una proteína que actúa como atrapador de radicales (cataliza la dismutación del radical aniónico superóxido,  $O_2^{\cdot-}$ ) y su pérdida de función aumenta el daño celular causado por radicales y esto es una hipótesis de causa de enfermedad lógica a considerar. Sin embargo, distintas variantes de SOD1 han sido bien caracterizadas y no presentan disminución de su actividad, por lo que la evidencia apoya una ganancia de función tóxica. Los ratones transgénicos para SOD1 que se han generado, desarrollan una degeneración de motoneuronas y han sido empleados ampliamente como modelo de la enfermedad para el desarrollo de tratamientos. El segundo importante gen asociado a la ELA es el *TARDBP*, que codifica para TDP-43, una proteína reguladora de la expresión de ARN y es el componente principal de las inclusiones encontradas en ELA. El descubrimiento de mutaciones asociadas a ELA en este gen fue el primero en mostrar que defectos en el procesamiento del ARN son importantes en la patogénesis y también mostró que las inclusiones de TDP-43 no son simplemente un marcador pasivo de muerte neuronal sino una parte crucial del desarrollo de la enfermedad [90,93–95]. El tercer gen fue inicialmente vinculado y luego sí, asociado a un locus en el cromosoma 9 que llevó a los investigadores a identificar una expansión masiva de un hexanucleótido en el intrón 1 del gen *C9orf72*. Ésta es la causa más frecuente de ELA, siendo responsable de ~30% de los casos familiares y hasta un 10% de los esporádicos [90,96].

**Tabla 2. Mutaciones asociadas a la ELA y características fisiopatológicas asociadas.** Adaptada de [88]

Gen	Año de descubrimiento	Patrón de herencia	ELA familiar (%)*	ELA esporádica (%)*	Función	Fisiopatología asociada
<i>ALS2</i>	2001	Autosómico recesivo	<1%	<1%	GEF	Defectos en tráfico vesicular
<i>ANG</i>	2006	Factor de riesgo	<1%	<1%	Ribonucleasa	Angiogénesis
<i>ANXA11</i>	2017	Autosómico dominante	~1%	~1,7%	Proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio; tráfico vesicular	Inclusiones de anexina A11; defectos en unión a calciclina; LLPS putativa
<i>ATXN2</i>	2010	Autosómico dominante; Factor de riesgo	<1%	<1%	Proteína de unión a ARN	Defectos en ribostasis; LLPS putativa
<i>C21orf2</i> (también conocido como <i>CFAP410</i> )	2016	No establecido	<1%	<1%	Reparación del daño al ADN (putativa); estructura de actina	Defectos del citoesqueleto
<i>C9orf72</i>	2011	Autosómico dominante	40%	7%	GEF putativa, tráfico endosomal, y regulación de autofagia; reparación del AND	Deterioro en metabolismo del ARN; deterioro en proteostasis o autofagia; tráfico intracelular; defectos en transporte núcleo-citoplasma; LLPS; inflamación
<i>CCNF</i>	2016	Autosómico dominante	~1–3,3%	<1%	Componente de un complejo E3 ubiquitina ligasa; regulación del ciclo celular	Defectos en proteostasis
<i>CHCHD10</i>	2014	Autosómico dominante	<1%	<1%	Proteína mitocondrial localizada en el espacio intermembrana (junta de crestas)	Disfunción mitocondrial y bioenergética
<i>CHMP2B</i>	2006	Autosómico dominante	<1%	<1%	Componente del complejo ESCRT-III	Deterioro en proteostasis; defectos en tráfico vesicular

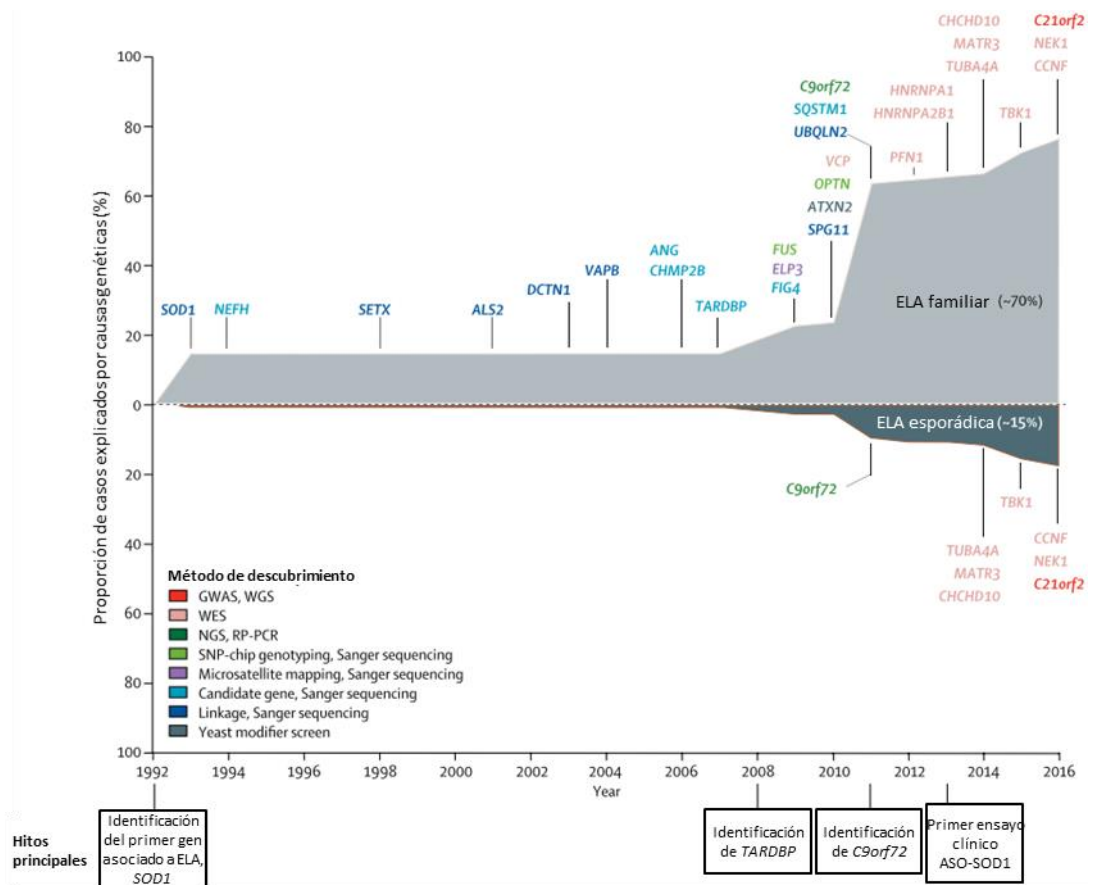


Gen	Año de descubrimiento	Patrón de herencia	ELA familiar (%)*	ELA esporádica (%)*	Función	Fisiopatología asociada
<i>DCTN1</i>	2003	Autosómico dominante; Factor de riesgo	<1%	<1%	Subunidad 1 de la dinactina	Defectos en tráfico axonal
<i>DNAJC7</i>	2019	No establecido	<1%	<1%	Co-chaperona de proteínas de <i>shock</i> térmico	No establecido
<i>ELP3</i>	2009	No establecido	<1%	<1%	Subunidad histona acetiltransferasa del complejo de elongación de la ARN polimerasa 2	Defectos en ribostasis; defectos en citoesqueleto
<i>FUS</i>	2009	Autosómico dominante; Autosómico recesivo	4%	1%	Proteína de unión a ARN; regulador de la transcripción; <i>splicing</i> ; localización y degradación del ARN; reparación del ADN	Defectos en ribostasis; defectos en transporte núcleo-citosol; LLPS
<i>GLT8D1</i>	2019	Autosómico dominante	<1%	<1%	Glicosiltransferasa; función celular desconocida; ampliamente expresada	No establecida; localizada en Golgi, se sugiere rol en deterioro de síntesis de gangliósidos y adición de $\beta$ -N-acetilglucosamina en uniones por O
<i>HNRNPA1</i>	2013	Autosómico dominante; Factor de riesgo	<1%	<1%	Proteína de unión a ARN	Defectos en ribostasis; LLPS
<i>HNRNPA2B1</i>	2013	Autosómico dominante; Factor de riesgo	<1%	<1%	Proteína de unión a ARN	Defectos en ribostasis; LLPS
<i>KIF5A</i>	2018	Autosómico dominante	~0,5–3%	<1%	Proteína motora de la familia de kinesinas	Defectos en citoesqueleto o tráfico sub-celular
<i>LGALS1</i>	2015	No establecido	<1%	<1%	No establecida	No establecida
<i>MATR3</i>	2014	Autosómico dominante	<1%	<1%	Proteína de unión a ARN localizada en matriz nuclear	Defectos en ribostasis
<i>NEFH</i>	1994	Autosómico dominante; Factor de riesgo	<1%	<1%	Proteína neurofilamento	Defectos en tráfico axonal

Gen	Año de descubrimiento	Patrón de herencia	ELA familiar (%)*	ELA esporádica (%)*	Función	Fisiopatología asociada
<i>NEK1</i>	2015	No establecido	~1–2%	<1%	Serina–treonina kinasa; regulación del ciclo celular; desarrollo o guía axonal; polaridad axonal; reparación del daño al ADN	Acumulación de daño al ADN (putativa); agregación proteica
<i>OPTN</i>	2010	Autosómico dominante; Autosómico recesivo	<1%	<1%	Proteína que contiene hélice superenrollada y regula tráfico de membrana, vesicular y activación de la transcripción	Autofagia; inflamación
<i>PFN1</i>	2012	Autosómico dominante	<1%	<1%	Proteína de unión a actina, regula polimerización de actina	Defectos en citoesqueleto o tráfico sub-celular; deterioro en crecimiento axonal
<i>SETX</i>	1998	Autosómico dominante	<1%	<1%	Helicasa	Defectos en ribostasis
<i>SOD1</i>	1993	Autosómico dominante; Autosómico recesivo	12%	1–2%	Enzima detoxificadora de radical aniónico superóxido	Defectos en proteostasis; estrés oxidativo; transmisión tipo-prion; inflamación
<i>SPG11</i>	2010	Autosómico recesivo	<1%	<1%	Proteína transmembrana putativa que se fosforila a partir del daño al ADN	Daño al ADN
<i>SQSTM1</i>	2011	Autosómico dominante	~1%	<1%	Proteína de unión a ubiquitina adaptadora de la autofagia (regula NF-κB)	Autofagia; inflamación
<i>TARDBP</i>	2008	Autosómico dominante; Autosómico recesivo	4%	1%	Proteína de unión a ARN; regulador de la transcripción; <i>splicing</i> ; localización y degradación del ARN	Defectos en ribostasis, proteostasis, y transporte núcleo-citoplasma; LLPS; transmisión tipo-prion; inflamación
<i>TBK1</i>	2015	Autosómico dominante	~3%	<1%	Serina–treonina kinasa; regula inmunidad innata, autofagia y ciclo celular	Autofagia; inflamación

Gen	Año de descubrimiento	Patrón de herencia	ELA familiar (%)*	ELA esporádica (%)*	Función	Fisiopatología asociada
<i>TIA1</i>	2017	Autosómico dominante	~2,2%	<1%	Proteína de unión a ARN	Deterioro del metabolismo ARN; LLPS
<i>TUBA4A</i>	2014	Autosómico dominante	<1%	<1%	Proteína de microtúbulos	Defectos en citoesqueleto o tráfico sub-celular
<i>UBQLN2</i>	2011	Ligado al X Autosómico dominante	<1%	<1%	Proteína tipo-ubiquitina (se asocia con el proteasoma y ubiquitina-ligasas)	Defectos en proteostasis; LLPS
<i>VAPB</i>	2004	Autosómico dominante	<1%	<1%	Proteína de membrana que se encuentra en plasma y vesículas intracelulares	Defectos en proteostasis
<i>VCP</i>	2010	Autosómico dominante	1%	1%	Enzima ATPasa que regula degradación proteica, fusión de membrana intracelular, reparación del ADN y replicación, activación de NF- $\kappa$ B, y el ciclo celular	Defectos en proteostasis; inflamación

\* Porcentaje de ELA familiar o esporádica para las mutaciones del gen particular. FTD: demencia frontotemporal; GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina; LLPS: separación de fase líquido-líquido



**Figura 17. Esquema de genes asociados a ELA desde 1993 al 2022.** A partir de la primer descripción de mutación en la *SOD1* asociado a ELA en 1993, dos contribuciones sustanciales fueron reportadas en 2008 y 2011, correspondientes con la identificación de *TARDBP* (que comprende cerca de un 4% de ELA familiar y 1% de ELA esporádico) y *C9orf72* (que comprende ~40% de ELA familiar y 8% de ELA esporádico). Adaptada de [97].

### Causas – ambiente

Estudios epidemiológicos caso-control han apuntado a determinar factores ambientales como causa de la ELA. Los primeros estudios de regiones con una alta incidencia de ELA y demencia, tales como Guam y la península de Kii (Japón) sugirieron un rol de las neurotoxinas contenidas en semillas de cícadas, entre las que se encuentra la  $\beta$ -metilamino-L-alanina. Aunque el rol de esta molécula en el riesgo de ELA no ha sido demostrado, se ha propuesto un posible rol para cianotoxinas relacionadas, y se ha sugerido que la exposición a agua con floraciones de cianobacterias también contribuyen al riesgo de ELA en individuos susceptibles [78]. En términos generales, los estudios para comprender los riesgos de

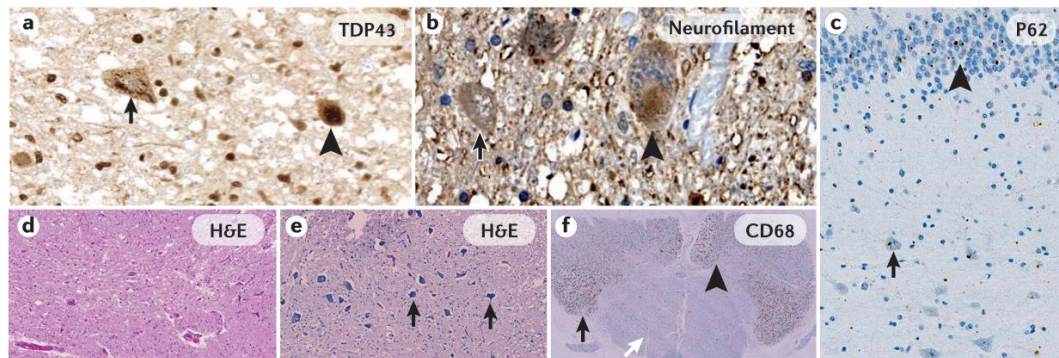
factores ambientales son costosos, difíciles de financiar y dependen en gran medida de la memoria y por ello, son muy susceptibles de sesgo de recuerdo. Además es imposible evaluar infinitos factores ambientales, por lo que se deben seleccionar algunos para estudiar en *subsets* [90]. Existen varios reportes en los que se vinculan factores ambientales con ELA pero la evidencia es en ocasiones contradictoria, debido al bajo número de individuos. Recientemente se ha empleado un estudio caso-control muy grande, en parte por el consorcio internacional Euro-MOTOR (euomotorproject.eu), en el que se colectaron datos de ~1500 casos de ELA y 3000 controles de tres países de Europa (Irlanda, Holanda, Italia) y se han reportado algunos resultados interesantes. El fumar tabaco (*smoking*) es quizás el factor ambiental asociado a ELA más claro, se ha propuesto desde hace años [98] y se ha reconfirmado con estos trabajos de Euro-MOTOR en los que revelan también que dentro del grupo de fumadores hay una disminución en el riesgo de ELA si llevan más tiempo sin fumar (correlación negativa entre riesgo y *time-since-quitting*) [99]. Otros factores estudiados son las partículas (sílica, asbestos, contacto animal, exposición a endotoxinas) y productos de combustión (hidrocarburos aromáticos policíclicos, escapes de motores diésel) ya que podrían estar asociados a determinadas ocupaciones laborales asociadas a la ELA. En este trabajo se reportó una asociación entre la exposición ocupacional a sílica con el riesgo de ELA [100]. El consumo de alcohol también se ha estudiado como factor de riesgo con ELA pero no se ha demostrado asociación [101]. La actividad física es otro factor de riesgo ampliamente estudiado, parcialmente por el número de atletas profesionales que tuvieron ELA y también porque los pacientes con ELA tienen bajo IMC y suelen practicar deportes [90]. A partir de datos de Euro-MOTOR, parece consolidarse la asociación entre actividad física y riesgo a ELA [102].

### Histopatología

Aunque los mecanismos fisiopatológicos fundamentales que subyacen a la ELA no son del todo comprendidos, una característica neuropatológica distintiva de la enfermedad es la agregación y acumulación de inclusiones proteicas ubiquitiniladas en las motoneuronas [103]– que también se comparte con demencia frontotemporal (DFT). Los procesos biológicos que llevan a la formación de estas inclusiones se han estudiado extensamente pero aún no están comprendidos del todo. En la mayoría de los subtipos de ELA, la TDP-43 es la principal constituyente de las inclusiones (**figura 18, panel a**), aunque mutaciones en *TARDBP* son raramente una causa de ELA. De hecho el ~97% de los pacientes con ELA tiene

características de una proteinopatía TDP-43, con depleción de TDP-43 en el núcleo pero con agregados citoplasmáticos de morfología compacta o similar a una madeja (*skein-like*) en motoneuronas residuales. En subtipos específicos de ELA, se pueden observar otros tipos de agregados proteicos, tales como inclusiones de neurofilamento (**figura 18, panel b**) y la acumulación de SOD1 mal plegada en pacientes con ELA asociada a mutaciones en *SOD1* y positivos para sequestosoma 1 (también conocido como P62, codificado por *SQSTM1*), y negativos para TDP-43 que son causadas por proteínas con repetidos de dipéptidos y pueden detectarse fuera del sistema motor en pacientes con ELA asociados con mutaciones en *C9orf72* (**figura 18, panel c**). Aunque los agregados proteicos son un *hallmark* de ELA, las especies tóxicas podrían ser los complejos de alto peso molecular que preceden la formación de los agregados, más que los agregados *per se*. El derramamiento de complejos proteicos de alto peso molecular podría mediar la propagación de la enfermedad célula-célula, vinculando la progresión de ELA a un mecanismo *prion-like*, que también ha sido sugerido para enfermedades mediadas por tau y sinucleína.

Las características patológicas macroscópicas de la ELA comprenden atrofia muscular esquelética, atrofia de la corteza motora y palidez y esclerosis de los tractos piramidales (esto es, el tracto corticoespinal y corticobulbar), junto con el adelgazamiento de los nervios hipolgosales (que están involucrados en el control de los músculos de la lengua) y las raíces ventrales de la médula espinal. La examinación microscópica usualmente revela una depleción de más del 50% de las motoneuronas espinales y gliosis astrocítica difusa e infiltración de la microglía en la materia gris y blanca de la médula espinal. La pérdida axonal, gliosis y palidez de la mielina se observan en los tractos corticoespinales, y la gliosis astrocíticas se observa usualmente en la corteza motora, junto con una depleción variable de motoneuronas superiores (**figura 18, d-f**). El músculo esquelético presenta características de denervación y re-inervación, con un agrupamiento tipo fibra y clúster de fibras atrópicas angulares.

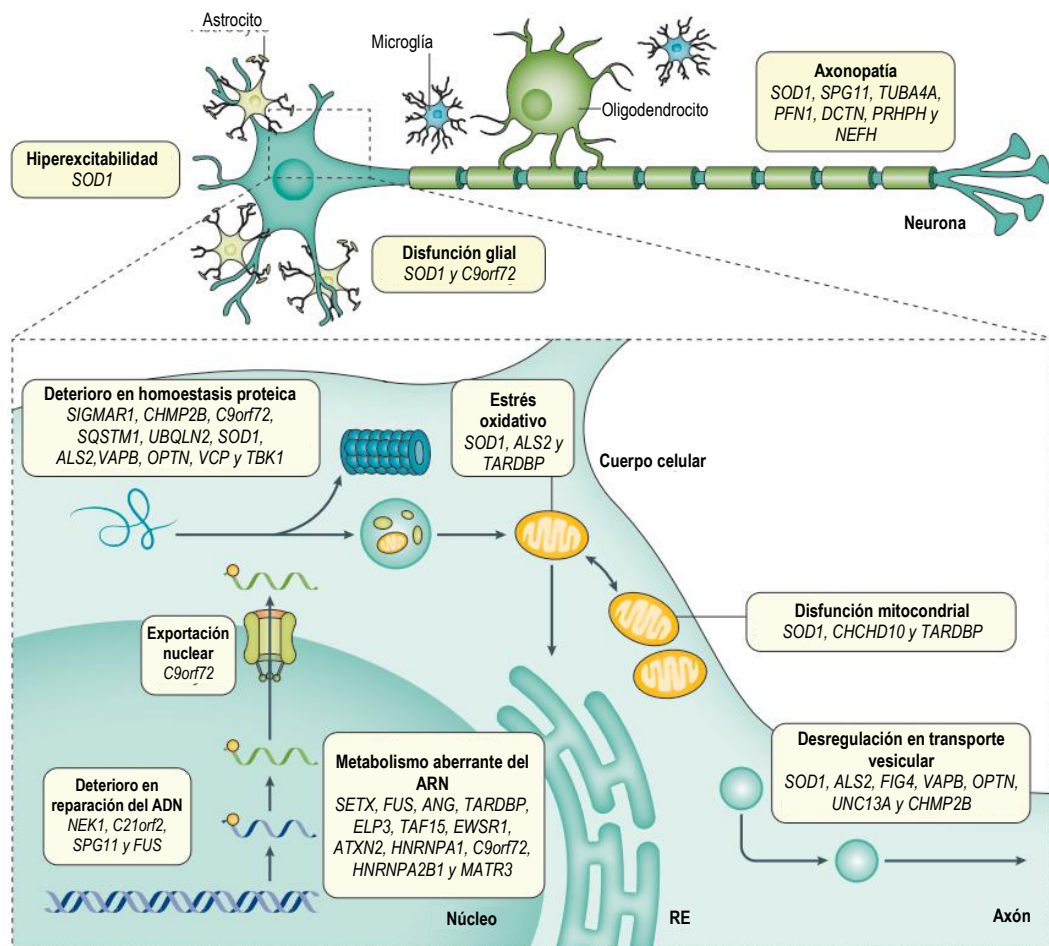


**Figura 18. Histopatología de la ELA.** **a)** localización normal de TDP-43 en el núcleo (cabeza de flecha) y localización aberrante en neurona enferma con falta de expresión nuclear y presencia de inclusión en el citoplasma (flecha). **b)** Motoneurona normal (flecha negra) e inclusiones que se marcan para neurofilamento (cabeza de flecha) en un paciente con ELA causada por mutación en SOD1. **c)** inclusiones de repetido de dipéptido P62-positivo, TDP43-negativo con morfología estrellada en células piramidales de CA4 (flecha negra) y células granulares de la fascia dentada (punta de flecha) en el hipocampo de un paciente con ELA causada por una mutación en C9orf72. **d)** reducción del número de motoneuronas (ausencia de flechas) en el asta ventral de la médula espinal en un paciente con ELA. **e)** motoneuronas (flechas) en el asta ventral de la medula espinal de un individuo sano. **f)** Marcada reactividad microglial (marcaje CD68) en los tractos laterales (flecha negra) y cuernos ventrales (cabeza de flecha), sin marcaje en las columnas dorsales de la médula espinal (flecha blanca) de un paciente con ELA. H&E: Hematoxilina y eosina. Tomada de [78]

### Mecanismos de desarrollo de la enfermedad

Se ha progresado en la identificación de las causas genéticas de ELA, y se han desarrollado modelos en ratas, ratones, pez cebra, moscas, gusanos y levaduras, para estudiar cómo estas mutaciones causan degeneración motoneuronas y para modelar proceso biológicos que se creen importante para la patología de la enfermedad. Todos estos modelos tienen sus limitaciones y ninguno recapitula completamente la enfermedad humana, que es en parte porque la mayoría de ellos se basan en sobreexpresión de genes (con múltiples copias de la variante humana insertada en el modelo transgénico) y porque la neuraxis humana difiere sustancialmente de aquella de animales inferiores. Sin embargo, descubrimientos a partir de modelos animales han contribuido al entendimiento de la biología celular subyacente a la neurodegeneración y puede seguir abriendo nuevos caminos hacia el desarrollo de drogas. En realidad, la disrupción celular en ELA es probablemente el resultado de diferentes mecanismos que interactúan y que culmina en disrupción de redes más grandes, y la separación en diferentes mecanismos en artificial. Esto está ejemplificado por el hecho del descubrimiento que los múltiples factores que contribuyen al daño neuronal en los modelos

con SOD1 mutada. El grado relativo en el que cada uno de estos factores contribuye en su conjunto a la patología de la enfermedad humana no puede ser completamente elucidado, y sería erróneo asumir que todos esos factores estarían involucrados en todos los casos de ELA, ya que la enfermedad humana es heterogénea (1).



**Figura 19. Fisiopatología de la ELA.** Mutaciones en varios genes que han sido implicados en la fisiopatología de la ELA pueden ejercer daño en motoneuronas a través de más de un mecanismo fisiopatológico, aunque estos mecanismos estén usualmente interconectados. SOD1, el gen más estudiado implicado en ELA ha sido vinculado con la mayor cantidad de mecanismos, mientras que los efectos sobre algunas mutaciones tales como ALS3 y ALS7 son aún desconocidas. El metabolismo aberrante del ARN y la alteración de la homeostasis proteica son factores predominantes que vinculan múltiples genes causantes de la ELA con el daño neuronal. La disfunción mitocondrial puede surgir de una mutación en CHCHD10 y de deficiencias secundarias de la cadena respiratoria que surgen de los agregados de proteínas generados en presencia de otras mutaciones asociadas con la ELA. Ambos casos conducen a un aumento en el estrés oxidativo, lo que ejerce más presión sobre un sistema de homeostasis de proteínas ya deteriorado. Otros mecanismos de la ELA pueden alterar directamente la función neuronal (como el deterioro de la exportación nuclear, el deterioro de la reparación del ADN y el transporte de vesículas desregulado) y la disfunción de las células gliales. Además, la hiperexcitabilidad neuronal y la disfunción axonal se han implicado en la ELA. La interacción de los mecanismos se indica mediante flechas. Adaptada de [78].



Algunos de los mecanismos implicados en la fisiopatología de la ELA, que comprenden distintos procesos celulares se comentan a continuación y en la **figura 19**.

*Vías que se centran en alteraciones del metabolismo del ARN, proteostasis o autofagia, defectos en citoesqueleto y tráfico celular, y alteraciones reparación del ADN.* Proteínas de unión al ARN (ej. FUS y TDP-43) alteran la transcripción del ARN y *splicing*. La expansión anormal del hexanucleótido GGGGCC en la región no codificante del *C9orf72* en el ARN mensajero provoca focos de agregación de ARN, secuestrando proteínas de unión a ARN y alterando el metabolismo de ARN. Adicionalmente, la haploinsuficiencia del alelo *C9orf72* remanente conlleva a la pérdida de función de la proteína nativa, relacionada con múltiples mecanismos tales como el tráfico celular, autofagia y reparación del ADN. Los mutantes en *C9orf72*, *FUS* y *TARDBP* alteran funcionalmente el transporte nucleocitoplasmático e inducen defectos en la morfología de la envoltura nuclear e inclusiones citoplasmáticas de los componentes del transporte nucleocitoplasmático (por ejemplo, nucleoporinas, importinas y RANs). La traducción de los repetidos en la expansión de *C9orf72* genera repetidos de dipéptidos, que son tóxicos por varios mecanismos que incluyen agregación de proteínas, alteración en la cromatina y daño al ADN; defectos en el transporte nucleocitoplasmático y secuestro de componentes de la maquinaria. También los agregados de proteínas (ej. TDP-43 y SOD1) provocan defectos en la proteostasis y autofagia. Los agregados proteicos bloquean la respuesta ERAD (degradación de proteínas asociadas a retículo endoplasmático) y UPS (sistema ubiquitina-proteasoma), impidiendo el *clearance* de agregados. Mutaciones en proteínas responsables de la ubiquitinación (ej. CCNF y UBQLN2) adicionalmente desregulan la UPS. Los agregados proteicos y las proteínas de unión al ARN también se acumulan en gránulos de estrés, que se vuelven persistentes en individuos con ELA. Mutaciones en proteínas formadoras de vesículas (ej. OPTN, VAPB, y VCP) corrompen el transporte y distribución vesicular, que afectan autofagia y homeostasis proteica. Las mutaciones en la maquinaria de transporte asociada a tubulina (DCTN1, KIF5A y TUBA4A) y actina (ej., PFN1) provocan defectos en el citoesqueleto o el tráfico celular lo que conlleva a falla en la distribución de organelos a través de las células (como son las mitocondrias o vesículas de carga). Los agregados proteicos (p.ej. SOD1 y TDP-43) junto con mutaciones en componentes de la mitocondria (como CHCHD10) disparan disfunción mitocondrial y bioenergética dando lugar a estrés oxidativo. La separación líquido-líquido de proteínas agregadas (p.ej. FUS y TDP-43) lleva a la formación de gránulos de estrés [88].

### *Excitotoxicidad*

Las motoneuronas son muy sensibles a la toxicidad inducida por la entrada de calcio luego de una estimulación excesiva por glutamato, debido a que tienen baja capacidad amortiguadora de calcio y poseen receptores AMPA que son más permeables a calcio que otros subtipos neuronales. Además la EAAT2 (*excitatory aminoacid transporter 2*), una proteína astroglial que es el principal transportador en la recaptación de glutamato sináptico, aparece dañada en ELA, lo que probablemente resulta en un exceso de glutamato en la sinapsis y toxicidad de la motoneurona. La pérdida de EAAT2 se ha observado tanto en modelos de roedores como en paciente. Se cree que la excitotoxicidad es un mecanismo común a todas las formas de ELA, aunque la evidencia de esto es indirecta. Por ejemplo, el riluzol<sup>4</sup> que atenúa la progresión de la enfermedad puede inhibir la liberación de glutamato aunque si este mecanismo es el responsable del efecto terapéutico no está claro [78].

### *Degeneración de oligodendrocitos*

La degeneración de oligodendrocitos también se ha observado en ELA. En el sistema nervioso central (SNC) sano, los oligodendrocitos son reemplazados por la proliferación de precursores celulares que están presentes en abundancia. Al menos en los modelos animales de ELA y por razones que no están claras, los precursores fallan al pasar por las etapas finales de la diferenciación. Los oligodendrocitos proveen soporte metabólico vital para los axones a través del transporte de lactato por el transportador monocarboxilato 2 y por consiguiente la disfunción de oligodendrocitos contribuye a la axonopatía de motoneuronas en ELA. Restaurar la función de oligodendrocitos bloqueando el gen de la SOD1 mutante enlentece significativamente la progresión de la enfermedad y prolonga la expectativa de vida en ratones. Pacientes con ELA pueden tener anomalías en oligodendrocitos pero si estos cambios contribuyen a la patogénesis de la enfermedad aún no está demostrado [78].

### *Vía común final*

El principal mecanismo que está involucrado en la patogénesis de ELA es probablemente dependiente de las causas iniciales de la enfermedad, aunque muchos mecanismos parecen explicar la toxicidad de cada mutación y todos estos mecanismos están probablemente

---

<sup>4</sup> El riluzol junto con la edaravona son los únicos dos fármacos aprobados para el tratamiento de ELA por la FDA en la actualidad. El riluzol se administra por vía oral y aumenta la expectativa de vida de 3 a 6 meses. La edaravona se administra por infusión intravenosa, diariamente durante dos semanas al mes, y demostró reducir el deterioro del funcionamiento diario.

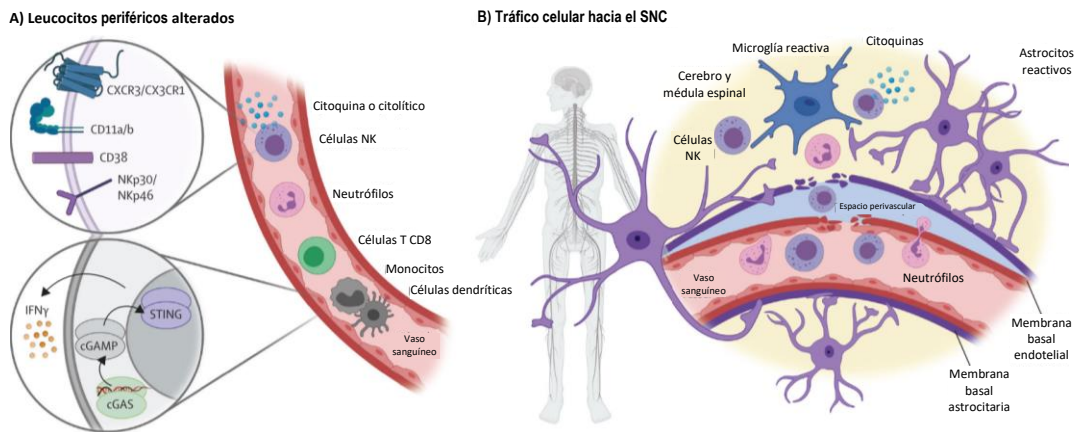
interconectados. Cualquiera sea el mecanismo subyacente de ELA, el resultado final es que la motoneurona no puede mantener sus proyecciones axonales, llevando a retracción axonal y denervación de su célula diana. Para las motoneuronas inferiores, esta retracción axonal resulta en la denervación del músculo pero para las superiores, esta retracción resulta en la pérdida del control adecuado de motoneuronas inferiores, hipertonicidad y debilidad. Además, sucede una pérdida importante de redes neuronales dentro de los dominios motores y extramotors. Como muchas de las proteínas codificadas por los genes implicados en ELA se expresan de forma ubicua, no está claro por qué las motoneuronas son el tipo celular más susceptible a estos efectos peligrosos de las mutaciones. Cuanto mayor el tamaño de la motoneurona y la necesidad de mantener el largo de sus proyecciones axonales, podría hacer estas células más sensibles a las anomalías metabólicas que otras. Pero otros subtipos neuronales, tales como las sensoriales, tienen aún más largas proyecciones axonales. Otros factores que podrían tener un rol son la alta expresión de *ephrin type-A receptor 4* y *matrix metaloproteinase 9* y la baja expresión de osteopontina e *insulin-like growth factor 2* por las motoneuronas, que podría limitar el florecimiento axonal y reparación. Algo interesante se da dentro del pool de motoneuronas; las que establecen unidades motoras rápidas fatigables mueren primero en ELA, pero cómo eso se relaciona con otros factores de vulnerabilidad no está claro [78].

### Neuroinflamación

Un aspecto de gran relevancia para esta tesis es la neuroinflamación que se da en el contexto de la ELA. La degeneración de motoneuronas está acompañada de procesos neuroinflamatorios, junto con la proliferación de la astrología, microglía y oligodendroglía [104]. La neuroinflamación se ha observado por estudios de imagenología en pacientes con ELA, muestras de tejido humano *post mortem*, y en modelos de ELA en roedores [105]. Biomarcadores de neuroinflamación tales como MCP-1, CHIT1, y YKL-40, están elevados en pacientes con ELA y han mostrado correlacionar con la severidad de la enfermedad y predicen la progresión de la enfermedad [106,107]. Desde el punto de vista fisiopatológico también se observa infiltración de células del sistema inmune al SNC, conteo celular de leucocitos en la periferia y perfil de citoquinas plasmáticas alterados [108]. Un ejemplo de esto sucede en los pacientes con ELA asociada a la pérdida de función de C9orf72 (debida a repeticiones en el gen *C9orf72*) ya que se pierde la capacidad de regular la producción de interferón por la vía del sistema inmune innato (vía cGAS-STING), llevando a la inflamación

sistémica y del SNC mediada por interferón del tipo 1 (INF $\gamma$ ) (**figura 20**) [88]. Se ha visto una alteración similar del interferón en ELA asociada a mutaciones en TDP-43 y otros signos de inflamación aún en casos de ELA asociados a mutaciones menos frecuentes (p.ej. *OPTN*, *SQSTM1*, *TBK1* y *VCP*) [88]. Las evidencias de inflamación sistémica y del SNC en ELA son contundentes y han sido replicadas en varios modelos animales. En pacientes con ELA esporádica, en los que no se conocen causas genéticas, el mecanismo de desregulación del sistema inmune permanece incierto, aunque es una característica distintiva [88]. También se presenta activación del sistema inmune en la periferia, con inducción de fenotipos activados y cambios en los niveles de citoquinas [88,108]. Diversos reportes sugieren que, además de la microglía, varias otras células del sistema inmune innato, incluyendo macrófagos, monocitos, dendríticas, NK, mastocitos y neutrófilos están implicados en la patogénesis de la ELA [109]. Hay evidencia de infiltración de varios tipos celulares, lo que también revela de cierto modo que las células endoteliales son afectadas en la ELA, lo que conduce a la alteración de la barrera hemato-encefálica y termina permitiendo la infiltración de células de la periferia. La contribución de los monocitos/macrófagos en la inducción de la neurodegeneración no es clara, pero estas células sí tienen un rol importante en la regulación de la inflamación periférica [109]. Se ha propuesto que la velocidad de la progresión de la enfermedad está relacionada con el grado de activación de monocitos/macrófagos a nivel sistémico [110].

Un gran cuerpo de evidencia muestra que la respuesta inflamatoria sistémica puede alterar la inflamación central en procesos degenerativos. Las respuestas proinflamatorias están presentes en la periferia además de la enfermedad neuroinflamatoria dentro del sistema nervioso central [111]. Los niveles de citoquinas circulantes son anormales en pacientes con ELA, con altos niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, y bajos niveles de INF- $\gamma$  en comparación con individuos sanos [109,112]. La IL-6 se ha asociado con los niveles de proteína C reactiva y en estudios longitudinales se vio que aumenta su expresión hacia los estadios avanzados de la enfermedad [112] (**ver tabla II-2**, más adelante).



**Figura 20. Vías inflamatorias en la ELA. (A)** Los niveles de las poblaciones celulares del sistema inmune están alterados en pacientes con ELA, incluyendo del sistema inmune innato (ej. Neutrófilos y células NK) y del sistema inmune adaptativo (ej. Linfocitos T-CD8). En pacientes con ELA, los NK circulantes sobreexpresan marcadores de función citotóxica (p. ej., CD38, NKG2D, NKp30 y NKp46) y relacionadas con el tráfico celular (p. ej., CD11a, CD11b, CXCR3 y CX3CR1). Los monocitos circulantes y las células dendríticas que expresan expansiones repetidas de TARDBP y C9orf72 mutantes aumentan la producción de IFN $\gamma$ . **(B)** Tráfico de células del sistema inmune periféricas al SNC en pacientes con ELA (p. ej., neutrófilos y células NK). cGAMP: guanosina monofosfato - adenosina monofosfato cíclico; cGAS: cGAMP sintasa; IFN $\gamma$ : interferón  $\gamma$ ; STING: proteína estimuladora de genes interferón. Adaptada de [88].

### Biomarcadores

Como la ELA es una enfermedad con manifestación fenotípica y curso clínico heterogéneas, los biomarcadores diagnósticos y pronósticos son necesarios para una buena estratificación [78]. El *Neurofilament light polypeptide* y el *phosphorylated neurofilament heavy polypeptide* en LCR o sangre son probablemente en la actualidad los biomarcadores de fluidos biológicos más promisorios de ELA [113]. Sus niveles correlacionan con el grado de progresión de la enfermedad y están más fuertemente asociados con la participación de motoneuronas superiores [78,114]. Además se ha visto que los niveles presentes en LCR pueden diferenciar con moderada sensibilidad y especificidad a pacientes con ELA de otras enfermedades que se mimetizan, como la mielopatía cervical, neuropatía motora multifocal y miositis por cuerpos de inclusión. Los niveles de la cadena liviana del neurofilamento en suero también se ha mostrado como medida sensible y específica para diferenciar pacientes con ELA de individuos sanos, aunque no está claro aún si es capaz de distinguir de otras miméticas [78]. De todos modos es importante mencionar que estas medidas (de los niveles de neurofilamento) no están integrados en la práctica clínica estándar.

Varios reportes investigaron otros potenciales biomarcadores. Un amplio cohorte de cuidados primarios identificó nuevos marcadores metabólicos, incluyendo alteraciones en los perfiles de carbohidratos, lípidos y apolipoproteínas, que están asociados con elevado riesgo de ELA en etapas avanzadas de la vida [114]. En cuanto a la inflamación, un meta-análisis reciente en el que contempla a 25 estudios sobre los niveles de citoquinas periféricas en ELA confirmaron que el TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, y el VEGF medidos en sangre están significativamente elevados en ELA comparado con controles [115]. Aunque la inflamación no es específica de ELA, explorar biomarcadores de inflamación podría mejorar el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad (**tabla 3**).

**Tabla 3. Mediadores inmunológicos relevantes y su correlación con el curso clínico de la enfermedad.** Adaptada de [109].

<b>Biomarcador</b>	<b>Biofluido</b>	<b>Significado</b>
TGF-β1	Sangre	Niveles elevados con la duración de la enfermedad Correlación negativa con ALSFRS-R
TGF-β3	Sangre	Correlación negativa con ALSFRS-R
IL-2	Sangre	Disminuye con la duración de la enfermedad Pobre sobrevida
IL-4	LCR	Menor velocidad de progresión de enfermedad Prevalente en fenotipo de motoneuronas inferiores
IL-5	Sangre	Correlación positiva con CK
IL-6	Sangre	Correlación positiva con CRP y estadios finales de la enfermedad
	LCR y Sangre	Aumenta con la disfunción respiratoria
IL-8	Sangre	Aumenta con la duración de la enfermedad
IL-10	Sangre	Correlación negativa con sobrevida
	LCR	Menor velocidad de progresión de la enfermedad Prevalente en fenotipo de motoneuronas inferiores
IL-13	Sangre	Correlación negativa con ALSFRS-R y velocidad de progresión de la enfermedad
TNF	Sangre	Correlación positiva con NfL Aumento con la disfunción respiratoria Correlación negativa con la sobrevida
	Sangre	Pobre sobrevida
Ferritin	Sangre	Aumento con la duración de enfermedad y velocidad de progresión
	Sangre	Aumento con la duración de enfermedad y velocidad de progresión
IFN-γ	LCR	Aumento con la duración de enfermedad y velocidad de progresión Sobrevida más corta
bFGF	LCR	Progresión de la enfermedad más lento y duración mayor
VEGF	LCR	Progresión de la enfermedad más lento y duración mayor
MIP-1α	LCR	Progresión de la enfermedad más lento y duración mayor
CCL2	LCR	Peor severidad de la enfermedad y progresión más rápida
TRAIL	Sangre	Correlación negativa con la sobrevida
CHIT1	LCR	Correlación positiva con la velocidad de progresión y los niveles de NfL y NfH Correlación negativa con sobrevida
	LCR	Correlación positiva con la velocidad de progresión y los niveles de NfH

ALSFRS-R = Escala de calificación funcional de ELA - Revisada; bFGF = factor de crecimiento de fibroblastos básico; CK = creatina kinasa; CRP = proteína C reactiva; MIP-1α = proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa; NfL = cadena liviana de neurofilamento; NfH = cadena pesada de neurofilamento; TRAIL = ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF; VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular

## Mediadores lipídicos en ELA

En cuanto a los mediadores lipídicos de la inflamación, existe alguna evidencia en alteraciones de los niveles de PGE2 en pacientes con ELA [11]. Los análisis de eicosanoides en muestras de pacientes con ELA han mostrado un aumento significativo en los niveles de PGE2 en LCR y también en muestras de médula espinal y corteza *post mortem* [12,13]. Reportes recientes en los que se emplean enfoques “ómicos” han mostrado alteraciones en el metabolismo lipídico en pacientes con ELA [116–121]. Henriques *et al* [116] analiza el perfil de ácidos grasos derivados de lípidos totales en suero y *clotted blood cells* por HPLC y reporta como conclusión mayor que la relación de palmitoleato/palmitato (16:1/16:0) en células sanguíneas y los niveles de palmitoleato correlacionan con la progresión de la enfermedad. Blasco *et al* [117] realizó una lipidómica de LCR de pacientes en busca de huellas diagnósticas y predictivas. Encontraron modelos predictivos para la variación del *ALSFRS-r score* (del inglés, *Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rate Score – revised*) a partir del lipidoma con un 71% de precisión. Además, una predicción significativa de la evolución clínica correlaciona con esfingomielinas y triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga. Un artículo reciente de Area-Gomez *et al* [118] reporta un análisis lipidómico (de lípidos complejos) de plasma de pacientes con ELA y esclerosis lateral primaria (ELP, una forma más benigna de enfermedad de motoneurona que afecta únicamente a las motoneuronas superiores). Ellos encontraron que aspectos comunes de estas patologías sugieren que ELP y ELA se comportan como parte de un continuo de enfermedades de la motoneurona desde el punto de vista de la lipidómica. Un trabajo reciente de Sol *et al*, reportó un análisis lipidómico realizado por HPLC-MS sobre muestras de plasma y LCR de pacientes con ELA y un grupo control. Sus resultados sugieren un hipermetabolismo sistémico en ELA (debido a los niveles elevados de triacilglicéridos) y alteraciones en vías de lípidos específicos que se encuentran asociadas a las distintas presentaciones y desarrollos de la enfermedad, proponiendo entonces el uso de estos análisis como potenciales clasificadores de la enfermedad [121]. Otro estudio de O’Reilly *et al* [119] evalúa la asociación entre los niveles de PUFA en plasma pre-diagnóstico y ELA. Los autores encontraron que la mayoría de los PUFA individuales no están asociados con ELA, aunque en hombres el LA se correlaciona inversamente con el riesgo de ELA y el DHA se correlaciona positivamente con el riesgo de ELA. En mujeres se encontró que el AA está positivamente relacionado al riesgo. Sin embargo, falta mucha investigación para confirmar estos descubrimientos. Recientemente Fernandes-Eulate *et al* [120] han reportado



un análisis lipidómico en suero de pacientes con ELA y voluntarios sanos, en el que se miden derivados hidroxilados del LA. Ellos aclaman haber estudiado el perfil lipídico más integral (comprensivo) en ELA, aunque no se evidencia la presencia de un perfil discriminante entre los pacientes con ELA y controles. Para nuestro conocimiento, no hay en la literatura ningún análisis de lipidómica que contenga un amplio espectro de oxilipinas que se haya aplicado a muestras humanas de pacientes con ELA. Entonces, aún no se conoce si los niveles de oxilipinas en circulación plasmática podrían reflejar el componente inflamatorio de la ELA. En este trabajo se propone desarrollar un método de análisis por HPLC-MS/MS para detectar y cuantificar un amplio panel de oxilipinas en plasma y LCR de pacientes con ELA y un grupo de voluntarios sanos.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Analizar el perfil de oxilipinas en muestras de plasma de pacientes con ELA y comparar con el perfil de una población sana. A su vez, se plantea estudiar la posible correlación de la concentración de oxilipinas en plasma con parámetros clínicos de los pacientes.

### Objetivos específicos

- 1- Desarrollar y optimizar un método de detección y cuantificación de oxilipinas en muestras biológicas por HPLC-MS/MS
- 2- Determinar la concentración de oxilipinas en muestras de plasma de pacientes con ELA y voluntarios sanos, y analizar la posible correlación entre los niveles de oxilipinas en plasma de pacientes con ELA y sus parámetros clínicos

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El agua utilizada en este trabajo es obtenida en forma local mediante un sistema de purificación Barnstead™ Smart2Pure™ (Thermo Scientific). El metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN) utilizados son calidad HPLC-PLUS-*gradient grade* y HPLC-GOLD-*ultrgradient grade* (CARLO ERBA Reagent S.A.S.). Los otros solventes empleados, acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (DCM) y n-hexano son calidad ACS (CARLO ERBA Reagent S.A.S.)

### Muestras humanas

Las muestras de sangre de pacientes y voluntarios sanos se colectaron en Barcelona según “*The Research Protocol for Biosamples*” aprobado por el comité de ética del hospital universitario de Bellvitge. Biobank HUB-ICO-IDIBELL (PT17/0015/0024) Unidad Funcional de Enfermedad de Motoneurona del Hospital Universitario de Bellvitge. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes. Las muestras de sangre se obtuvieron entre 3 y 66 meses luego del comienzo de los síntomas, y la ELA fue diagnosticada según el criterio El Escorial para ELA. El ALSFR (del inglés, *Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rate*) fue calculado y validado por dos neurólogos independientes. El grado de progresión se calculó (basal o en la última visita) como 48 menos el ALSFRS-R *slope*, dividido por la duración de la enfermedad desde el inicio de los síntomas. El plasma se obtuvo por centrifugación e inmediatamente congelado y mantenido a -80 °C y fueron mantenidas en hielo seco durante su traslado hacia la Facultad de Medicina, UdelaR, en Montevideo, Uruguay. Las muestras fueron mantenidas a -80 °C hasta su análisis.

### Estándares

Todos los lípidos son de Cayman Chemicals (**tabla 4**) y las mezclas específicas se prepararon en MeOH grado HPLC (marca).

**Tabla 4. Estándares de Cayman Chemicals.**

Estándares naturales			Estándares isotópicamente marcados		
Nombre	Ítem No.	Oxilipina	Nombre	Ítem No.	Oxilipina
<i>Arachidonic</i>	20666	5(S)-HETE	<i>Deuterated</i>	19228	(d4) 6k PGF1 $\alpha$
<i>Acid Oxylipin</i>		8(S)-HETE	<i>Primary COX</i>		(d4) TxB2
<i>LC-MS</i>		9(R)-HETE	<i>and LOX LC-</i>		(d4) PGF2 $\alpha$
<i>Mixture</i>		11(S)-HETE	<i>MS Mixture</i>		(d4) PGE2
		12(S)-HETE			(d4) PGD2
		15(S)-HETE			(d8) 15-HETE
		15-OxoETE			(d8) 12-HETE
		12-OxoETE			(d8) 5-HETE
		5-OxoETE		316350	(d4) 8-isoPGF2 $\alpha$
<i>Lipoxin LC-MS</i>	19412	15(R)-Lipoxina A <sub>4</sub>		10006654	(d11) 5-isoPGF2 $\alpha$
<i>Mixture</i>		Lipoxina A <sub>4</sub>		11182	(d5) RvD1
		Lipoxina B <sub>4</sub>		21823	(d5) MaR1
		AA		10009854	(d4) RvE1
<i>Primary</i>	10001	6k PGF1 $\alpha$		338610	(d4) 13(S)-HODE
<i>Eicosanoid</i>		TxB2		338410	(d4) 9(S)-HODE
<i>HPLC Mixture</i>		PGF2 $\alpha$			
		PGE2			
		PGD2			
<i>Linoleic Acid</i>	20794	9(S)-HODE			
<i>Oxylipins LC-</i>		9-OxoODE			
<i>MS Mixture</i>		13(S)-HODE			
		13-OxoODE			
		( $\pm$ )9(10)-EpOME			
		( $\pm$ )9(10)DiHOME			
		( $\pm$ )12(13)-EpOME			
		( $\pm$ )12(13)-DiHOME			
<i>SPM D-series</i>	18702	17(R)-Resolvina D1			
<i>LC-MS</i>		Resolvina D1			
<i>Mixture</i>		Resolvina D2			
		Resolvina D3			
		Resolvina D5			
		DHA			
	20110	Leucotrieno B4			
	33200	( $\pm$ )4-HDHA			
	33300	( $\pm$ )7-HDHA			
	33500	( $\pm$ )13-HDHA			
	33550	( $\pm$ )14-HDHA			
	33600	( $\pm$ )16-HDHA			
	10010390	Protectina D1			
	32840	( $\pm$ )18-HEPE			
	32540	( $\pm$ )12-HEPE			
	10007848	Resolvina E1			

## Equipamiento

El equipamiento utilizado para la detección y cuantificación de oxilipinas es un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS/MS). El sistema de cromatografía (Infinity 1260, Agilent) consta de una bomba binaria y *autosampler* refrigerado con un compartimiento de columna termostaticado. La columna de fase reversa empleada es una Luna C18(2), 5  $\mu$ , 100 x 2,0 mm (Phenomenex, PN 00D-4252-B0) con una precolumna *SecurityGuard* C18, 4 x 3,0 mm (Phenomenex, PN AJ0-4287). El espectrómetro de masas empleado es un QTRAP4500 (ABSciex), y consta de una fuente de ionización de *electrospray* (ESI) y un analizador híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal.

Debido a la relevancia del equipamiento para el desarrollo de este trabajo, es importante comentar en esta sección, las características principales del equipo y sus prestaciones. El espectrómetro de masas mide la relación masa-carga ( $m/z$ ) de los iones para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y proveer información acerca de las propiedades estructurales y químicas de las moléculas. El QTRAP4500 posee una serie de filtros cuadrupolo 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 iones pero sí los focaliza previo a su entrada al Q0. Mediante esta focalización del flujo de iones que entran por el orificio, el QJet aumenta la sensibilidad del sistema y mejora la relación señal/ruido. En la región Q0, los iones son nuevamente focalizados previo a su entrada al Q1.

El cuadrupolo Q1 es un filtro que separa los iones antes de su entrada al Q2. El Q2 se comporta como celda de colisión en la que la energía interna de un ion es aumentada a través de la colisión de éstos con moléculas de gas inerte ( $N_2$  en nuestro sistema), al punto en que enlaces moleculares se rompen creando "iones producto". Esta técnica permite que los usuarios diseñen experimentos que midan  $m/z$  de iones producto para determinar la composición de los iones precursores.

Luego de atravesar la celda de colisión, los iones entran al Q3 para una nueva etapa de filtración, 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 esa

información en señal. La señal representa la intensidad del ion para un valor de  $m/z$  particular y eso se representa como un espectro de masas.

#### *Experimentos disponibles (scan techniques)*

**MS:** En los escaneos de masas (*MS scan*), los iones se separan según su relación masa-carga ( $m/z$ ). Un escaneo simple puede ser utilizado para determinar el peso molecular de un compuesto. También son referidos como *survey scans*. Estos escaneos no proveen ninguna información de la estructura o naturaleza de los iones.

**MS/MS:** Estos escaneos son utilizados para contribuir en la identificación o confirmar la identidad de especies moleculares. En los escaneos MS/MS, un ion precursor puede ser fragmentado en dos lugares; en la celda de colisión (Q2) o en la trampa iónica lineal (LIT). Si se utiliza suficiente energía, el ion precursor se fragmenta para dar origen a un patrón de fragmentación característico.

#### **Experimentos**

**Q1 MS:** Se realiza un escaneo de masas ( $m/z$ ) completo utilizando el primer cuadrupolo. Se genera un espectro de masas con la intensidad que se detecta para cada rango de masas.

**MRM:** un scan MS/MS en el que únicamente los iones preestablecidos por el usuario pueden atravesar Q1 y son fragmentados en la celda de colisión (Q2). Posteriormente el Q3 actúa también como filtro seleccionando específicamente qué ion puede pasar hasta el detector. Este modo es principalmente utilizado para cuantificar.

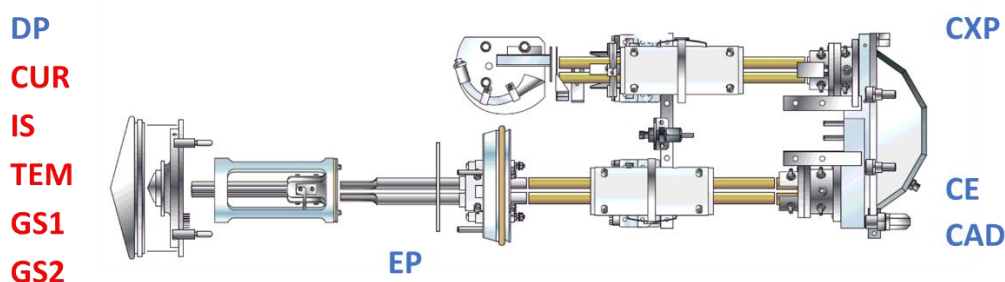
**Product Ion (MS2):** Un escaneo MS/MS completo en el que el Q1 se prefija para que transmita un ion precursor específico y el Q3 escanea un rango de masas definido. Se utiliza para identificar todos los posibles fragmentos que surgen de un ion precursor determinado.

Para que todo esto funcione es necesario optimizar una serie de parámetros.

#### **Parámetros del espectrómetro (*Instrument parameters*)**

Los parámetros del instrumento controlan los voltajes que en última instancia controlan los lentes, cuadrupolos, y otras partes del espectrómetro. Hay tres tipos de parámetros según su dependencia: del compuesto, de la fuente o del propio instrumento (**figura 21**).

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. Algunos de los parámetros se mantienen fijos, otros variables tienen fuerte incidencia en la ionización y detección de los iones, y se detallan a continuación.



**Figura 21. Parámetros del QTRAP4500.** Esquema de las partes internas del QTRAP4500, específicamente del “camino de los iones” (*ion path*). Los parámetros de la fuente, los específicos de cada compuesto y los del detector son todos configurables a través del software Analyst® y se utilizan para controlar el comportamiento de los iones en puntos específicos de su camino hacia el detector.

**DP (*Declustering Potential*):** El DP es un parámetro que 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 cámara de vacío y, si se requiere, para fragmentar iones. Cuanto mayor es el voltaje, mayor es la energía que se imparte a los iones. Por tanto, si el DP es muy elevado puede suceder algo de fragmentación no deseada, denominada fragmentación en la fuente.

**EP (*Entrance Potential*):** 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

**CE (*Collision Energy*):** El CE controla la diferencia de potencial entre Q0 y Q2 (la celda de colisión). Se utiliza únicamente en experimentos MS/MS. Representa la cantidad de energía que el ion precursor recibe mientras es acelerado hacia la celda de colisión, en la que choca con las moléculas de gas inerte (N<sub>2</sub>) y se fragmenta. En aquellos experimentos de escaneo de masas sin fragmentación (Q1 o Q3 *scan*) el valor del CE es RO2.

**CAD** (*Collision Gas*): Este parámetro controla la presión del gas en la celda de colisión durante los experimentos en los que se utiliza el Q3. 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. Para los experimentos de fragmentación contribuye a la fragmentación, justamente por la colisión del N<sub>2</sub> con el ion de precursor.

#### Parámetros de la fuente y gases

**IS** (*IonSpray Voltage*): Es el voltaje aplicado a la aguja que ioniza y nebuliza la muestra en la fuente de ionización (TIS). Depende de la polaridad y afecta la estabilidad del *spray* generado y la sensibilidad. Este parámetro puede ser dependiente del compuesto y debe ser optimizado para cada analito.

**CUR** (*Curtain Gas*): Es el gas que se encuentra entre las placas orificio y cortina. Contribuye a la evaporación del solvente y previene que entren gotas al sistema evitando así la contaminación de la óptica de iones. Este flujo debería mantenerse lo más alto posible sin perder sensibilidad en la detección del analito de interés.

**TEM** (*Temperature*): Hace referencia a la temperatura del gas calentador en la fuente.

**GS1** (*Gas 1*): Es el parámetro que controla la presión del gas nebulizador de la TIS. El gas nebulizador ayuda a generar pequeñas gotas a partir del flujo de ingreso de la muestra y afecta la estabilidad del *spray* y la sensibilidad.

**GS2** (*Gas 2*): Es el parámetro que controla la presión del gas auxiliar en la TIS. Este gas se usa para evaporar las gotas del *spray* y trabaja en conjunto con el parámetro TEM (que regula la temperatura en la que se administra GS2)



## Métodos

El método de análisis de oxilipinas por HPLC-MS, desde el procesamiento de las muestras hasta el análisis por espectrometría de masas forma parte del desarrollo del objetivo específico 1 del presente trabajo de tesis y se detalla en la sección resultados.

### Análisis de datos

En el caso de las comparaciones simples entre oxilipinas individuales del grupo Control vs el grupo ELA, se realizaron *tests* no-paramétricos U de Mann Whitney, empleando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). Se realizaron gráficos de caja para las oxilipinas más afectadas y gráficos de correlación, ambos empleando el mismo software.

Con el fin de identificar combinaciones de concentraciones de oxilipinas que permitan discriminar entre grupos de pacientes, se realizaron diversos análisis de múltiples variables exploratorios, incluyendo clusterización jerárquica y no jerárquica (*k-means*), *multidimensional scaling* métrico y no métrico, análisis discriminantes, regresión de mínimos cuadrados ortogonal -análisis discriminante (OPLS-DA, del inglés, *ortogonal partial least squares discriminant analysis*). Todo lo anterior empleando el software estadístico R [122].

Se realizaron análisis de varianza no paramétricos, Kruskal-Wallis, para detectar diferencias significativas en las variables continuas según los grupos de pacientes. Las correlaciones entre variables continuas se realizaron usando un *test* de correlación de Pearson luego de realizar una transformación logarítmica de las variables (en particular para las concentraciones de oxilipinas en plasma) con una corrección de Bejamini-Hochberg posterior para comparaciones múltiples. Se consideraron significativos valores  $p < 0,05$ .

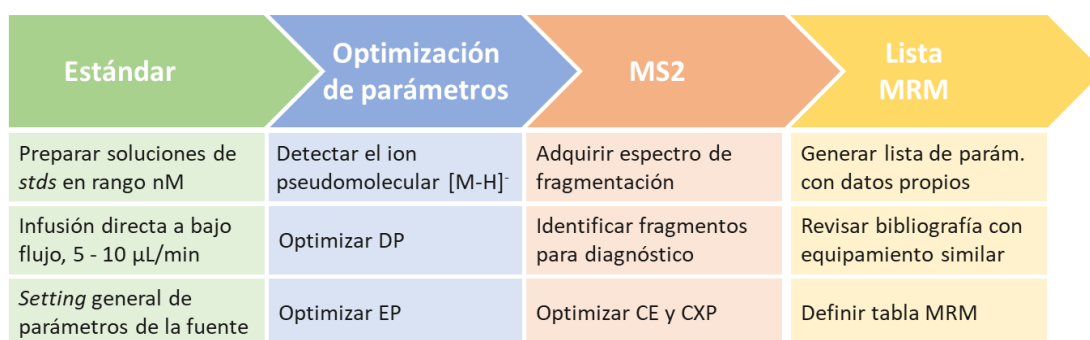
## RESULTADOS

### Resultados del objetivo específico 1

*Desarrollar y optimizar un método de detección y cuantificación de oxilipinas en muestras biológicas por HPLC-MS/MS.*

#### Optimización de parámetros

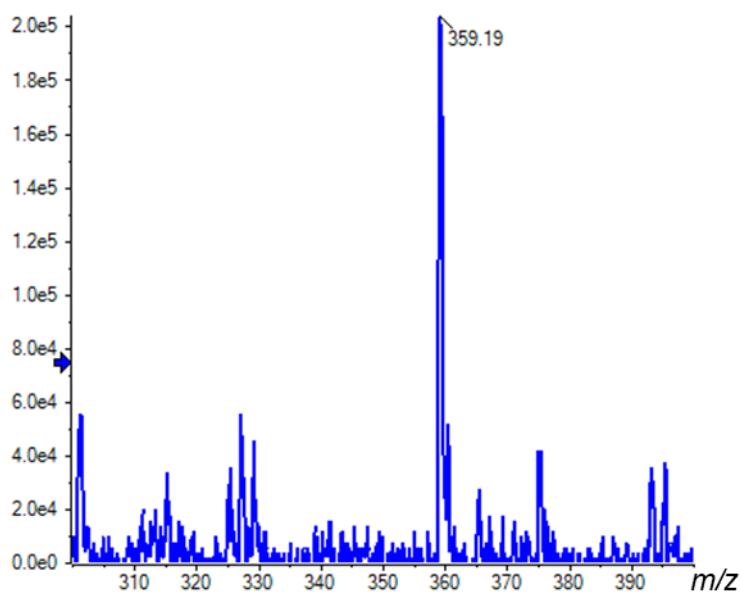
La primera etapa en el desarrollo del método fue la optimización de parámetros del espectrómetro de masas (QTRAP4500) para a la detección de cada uno de los estándares disponibles (**tabla 4** y **figura 22**).



**Figura 22. Esquema de pasos para la optimización de parámetros del QTRAP.**

Para ello se realizó un procedimiento modelo de optimización de parámetros que consta de una serie de pasos que se repiten para cada estándar disponible. Primeramente se prepara una solución conteniendo el estándar comercial en una concentración 10 - 100 nM en una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), que se introduce al equipo mediante infusión directa a un flujo de 5 - 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Durante la infusión del estándar, se realizan diferentes experimentos con el QTRAP4500 con el fin de encontrar los valores óptimos para cada parámetro. Óptimos son aquellos valores que permiten obtener la señal de mayor intensidad y calidad. En este trabajo de tesis el objetivo es desarrollar un método de análisis por HPLC-MS/MS, y por eso se intenta encontrar los parámetros óptimos para el diseño de este tipo de análisis. Inicialmente se realiza un espectro de masas empleando el cuadrupolo 1 en modo negativo (-Q1 scan) en el rango de masas esperado (recordar que las oxilipinas se detectan fácilmente en modo negativo por pérdida del H<sup>+</sup> del grupo carboxilo). En la **figura 23** se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en estos experimentos para el caso del estándar de MaR1. Luego de detectar al ion pseudomolecular ([M-H]<sup>+</sup>), para todas las oxilipinas analizadas, se configura

un nuevo experimento *-Q1 scan* en el que el rango de masas detectado sea mucho menor (típicamente en un intervalo de  $[M-H]^- \pm 2,5 m/z$ ) y se realiza un rampa de potencial de *declustering* (DP), con el fin de determinar el valor de DP para el que la señal óptima (*no se muestra*).

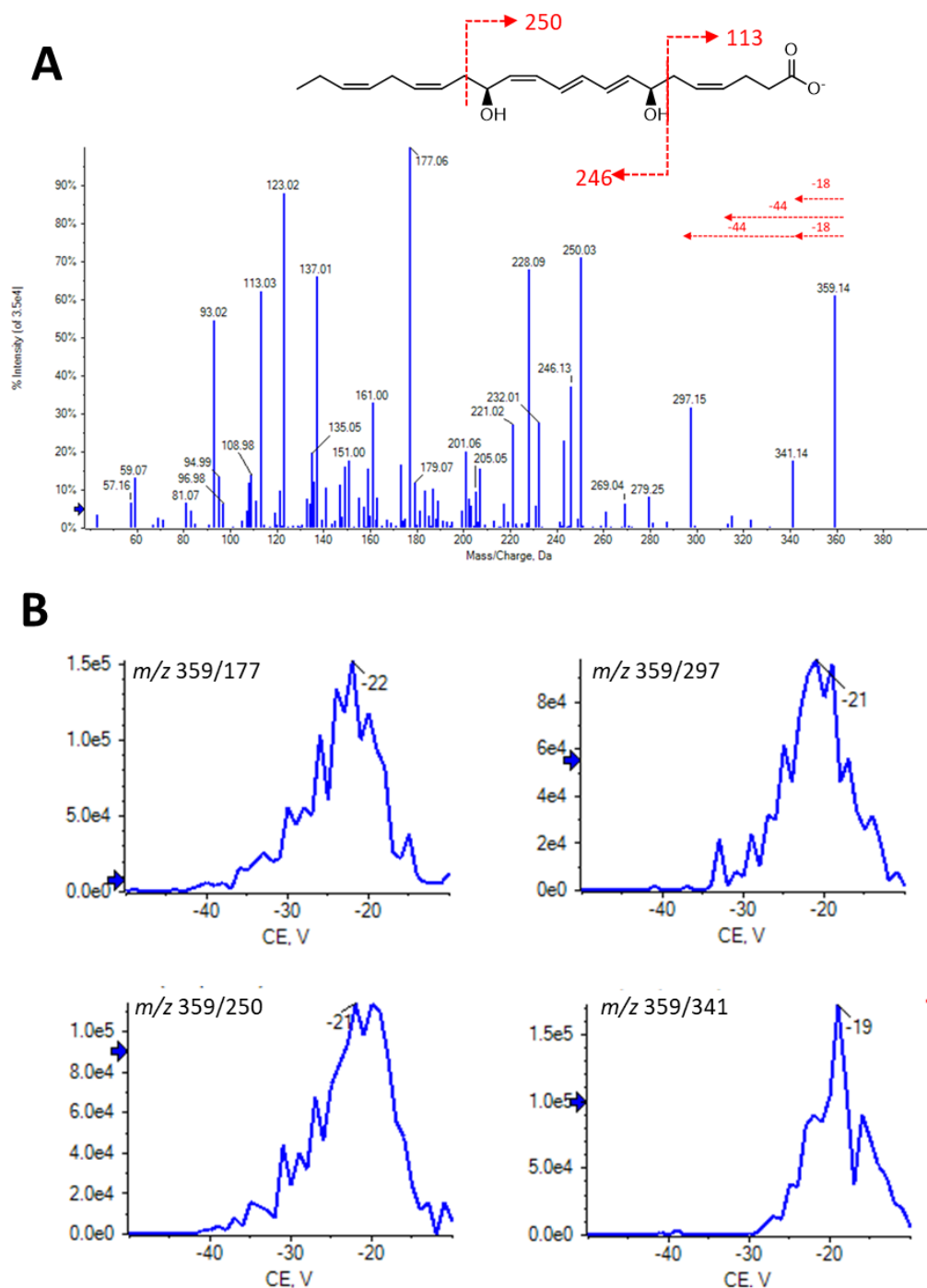


**Figura 23. Espectro de masas Q1 de MaR1.** Una solución de MaR1 10 nM se infunde directamente al QTRAP a un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se realiza un escaneo de masas en modo negativo (*Q1 scan*). En la figura se muestra la intensidad de señal (cps) para el rango de masas analizado. Se identifica el ion pseudomolecular para la MaR1 como  $[M-H]^- = 359 m/z$ .

Una vez establecido el DP óptimo y empleando la misma disposición experimental, se procede a realizar análisis de fragmentación, en el que se utilizan los tres cuadrupolos (*Prod1*) y se analiza en un rango de masas amplio, de  $m/z$  5 a  $m/z$  ( $[M-H]^- + 20$ ). El experimento de fragmentación se realiza variando la energía de colisión (CE) en un rango -150 – -10 V con el fin de obtener la más amplia cobertura de fragmentos posible. Una vez adquiridos todos los espectros de fragmentación, se realiza un análisis manual de los espectros obtenidos con el fin de determinar la CE óptima para cada uno de los fragmentos de interés. Típicamente, los fragmentos de interés son los más intensos (para poder detectar los analitos en concentraciones bajas) y aquellos que aportan información estructural, es decir, aquellos que surgen como producto de fragmentación de enlaces característicos de la molécula, y que, por consiguiente, permiten diferenciar ésta de otras (**figura 24**). Un ejemplo en el que se revela la importancia de tener fragmentos característicos se da en los isómeros de posición

de los compuestos monohidroxilados del DHA (se discute en mayor detalle más adelante, ver **figura 29**). En algunas ocasiones, es necesario hacer un nuevo barrido de CE para determinar con mayor precisión el valor óptimo para algún fragmento en particular. Los otros parámetros (CXP, EP) no presentaron mayor incidencia en la señal obtenida, por lo que se optimizaron de forma general para todo el análisis. Por otra parte, los parámetros de la fuente optimizados son los siguientes: CUR = 20 psi, IS = -4500 V, GS1 = 20 psi, GS2 = 0 psi, CEP: -10 V, y CXP = -13 V.

Los patrones de fragmentación de los estándares son estudiados en detalle y comparados con lo reportado en literatura especializada y bases de datos públicas, con el fin de comprender y establecer la identidad de cada fragmento (los espectros de fragmentación de los estándares disponibles se pueden ver en **anexo 1**).



**Figura 24. Espectro de fragmentación de MaR1 y optimización de CE.** Una solución de MaR1 10 nM se infunde directamente al QTRAP a un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se realizan experimentos de fragmentación. En A se muestra el espectro de fragmentación promedio del ion  $m/z$  359,1 y se representan las fragmentaciones identificadas sobre la molécula representada. En B se muestran los gráficos de intensidad de señal obtenidos para cada uno de los fragmentos indicados en una rampa de energía de colisión.

## Diseño del método MRM

Con el foco en el desarrollo de una metodología abarcadora (“ómica”) que permita obtener la mayor información de calidad posible por cada muestra analizada, se optó por ampliar al máximo el número de analitos a estudiar. Para ello se disponía inicialmente con un *stock* de estándares comerciales de varios eicosanoides, con los que se obtuvieron parámetros óptimos para su detección por MS. A su vez, se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica en busca de métodos de análisis de oxilipinas que emplean equipamiento similar al disponible para este trabajo, tal que permitiera obtener parámetros del equipamiento “pre-optimizados” para otras oxilipinas (especialmente docosanoides y OXLAMs) y así adaptar dichos parámetros a nuestro sistema ampliando el número de oxilipinas a detectar [67,68,70,71]. A su vez, conforme avanzó el trabajo de tesis doctoral, se adquirieron nuevos estándares comerciales de otras oxilipinas que permitieron ajustar y/o confirmar los valores de la lista inicial (lista de estándares en **tabla 4** y lista de oxilipinas a analizar en **tabla 5**).

**Tabla 5. Lista de oxilipinas a analizar.**

Nombre abreviado	Precursor	Vía	Nombre largo
AA	-	-	Ácido Araquidónico
AdA	-	-	Ácido Adrénico
DHA	-	-	Ácido Docosahexaenoico
EPA	-	-	Ácido Eicosapentaenoico
11,12-diHETrE	AA	CYP	ácido 11,12-dihidroxi-eicosatrienoico
11,12-EET	AA	CYP	ácido 11(12)-epoxi-eicosatrienoico
11b dhk PGF2 $\alpha$	AA	COX	ácido 11 $\beta$ -13,14-dihidro-15-ceto-Prostaglandinaa F2 $\alpha$
11b PGE2	AA	COX	11- $\beta$ -Prostaglandina E2
11b PGF2 $\alpha$	AA	COX	11- $\beta$ -Prostaglandina F2 $\alpha$
11d-TXB2	AA	COX	11-dehydro-tromboxano B <sub>2</sub>
11-HETE	AA	no-enz	11-hidroxi-eicosatetraenoico
11t LTC4	AA	LOX	11- <i>t</i> -Leucotrieno C <sub>4</sub>
11t LTD4	AA	LOX	11- <i>t</i> -Leucotrieno D <sub>4</sub>
11t LTE4	AA	LOX	11- <i>t</i> -Leucotrieno E <sub>4</sub>
12epi LTB4	AA	LOX	12-epi-Leucotrieno B <sub>4</sub>
12-HETE	AA	LOX	12-hidroxi-eicosatetraenoico
12-HHTrE	AA	COX	12S-hidroxi-heptadecatrienoico
12oxo LTB4	AA	LOX	12-oxo-Leucotrieno B <sub>4</sub>
12-oxoETE	AA	LOX	12-oxo-eicosatetraenoico
13-HDoHE	AA	LOX/no-enz	13-hidroxi-docosahexaenoico
14,15 LTC4	AA	LOX	14,15-Leucotrieno C <sub>4</sub>
14,15 LTD4	AA	LOX	14,15-Leucotrieno D <sub>4</sub>
14,15 LTE4	AA	LOX	14,15-Leucotrieno D <sub>4</sub>

Nombre abreviado	Precursor	Vía	Nombre largo
14,15-diHETrE	AA	CYP	14,15-dihidroxi-eicosatrienoico
14,15-EET	AA	CYP	14(15)-epoxi-eicosatrienoico
15d PGA2	AA	Sintético	15-desoxi-Prostaglandina A2
15d PGD2	AA	Sintético?	15-desoxi- $\Delta$ 12,14-PGD <sub>2</sub>
15d PGJ2	AA	COX	15-desoxi- $\Delta$ 12,14-PGJ <sub>2</sub>
15-HETE	AA	LOX	15-hidroxi-eicosatetraenoico
15k PGD2	AA	COX	15-ceto-Prostaglandina D2
15k PGE2	AA	COX	15-ceto-Prostaglandina E2
15k PGF2 $\alpha$	AA	COX	15-ceto-Prostaglandina F2 $\alpha$
15-oxoETE	AA	LOX	15-oxo-eicosatetraenoico
15R-LXA4	AA	LOX	5(S),15(R)-Lipoxina A <sub>4</sub>
16-HETE	AA	CYP	16-hidroxi-eicosatetraenoico
17-HETE	AA	CYP	17-hidroxi-eicosatetraenoico
18-HETE	AA	CYP	18-hidroxi-eicosatetraenoico
19-HETE	AA	CYP	19-hidroxi-eicosatetraenoico
19oh PGE2	AA	COX	19-hidroxi-PGE <sub>2</sub>
2,3 dinor 11b PGF2 $\alpha$	AA	COX	2,3-dinor-11- $\beta$ -Prostaglandina F2 $\alpha$
2,3 dinor 8-iso PGF2 $\alpha$	AA	no-enz	2,3-dinor-8-iso-Prostaglandina F2 $\alpha$
2,3 dinor TXB2	AA	COX	2,3-dinor-Tromboxano B2
2,3 dinor-6k PGF1 $\alpha$	AA	COX	2,3-dinor-6-ceto Prostaglandina F1 $\alpha$
20cooh AA	AA	CYP	20-carboxi araquidónico
20cooh LTB4	AA	LOX	20-carboxi-Leucotrieno B <sub>4</sub>
20-HETE	AA	CYP	20-hidroxi-eicosatetraenoico
20oh LTB4	AA	LOX	20-hidroxi-Leucotrieno B <sub>4</sub>
20oh PGE2	AA	COX	20-hidroxi-PGE2
20oh PGF2 $\alpha$	AA	COX	20-hidroxi-PGF2 $\alpha$
5,15-diHETE	AA	LOX	5S,15S-dihidroxi-eicosatetraenoico
5,6-diHETrE	AA	CYP	5,6-dihidroxi-eicosatrienoico
5,6-EET	AA	CYP	5(6)-epoxi-eicosatrienoico
5-HETE	AA	LOX	5-hidroxi-eicosatetraenoico
5-iso PGF2 $\alpha$ VI	AA	no-enz	Isoprostano F <sub>2<math>\alpha</math></sub> -IV
5-oxoETE	AA	LOX	5-oxo-eicosatetraenoico
6,15 dk-,dh- PGF1 $\alpha$	AA	COX	6,15-diceto-, 13,14-dihidro-Prostaglandina F1 $\alpha$
6k PGE1	AA	COX	6-ceto-Prostaglandina E1
6k PGF1 $\alpha$	AA	COX	6-ceto-Prostaglandina F1 $\alpha$
6R-LXA4	AA	LOX	5(S),6(R)-Lipoxina A <sub>4</sub>
6S-LXA4	AA	LOX	5(S),6(S)-Lipoxina A <sub>4</sub>
6t LTB4	AA	LOX	6-trans-Leucotrieno B <sub>4</sub>
6t,12epi LTB4	AA	LOX	6-trans-,12-epi-Leukotnene B <sub>4</sub>
8,15-diHETE	AA	LOX	8S,15S-dihidroxi-eicosatetraenoico
8,9-diHETrE	AA	CYP	8,9-dihidroxi-eicosatrienoico
8,9-EET	AA	CYP	8(9)-epoxi-eicosatrienoico
8-HETE	AA	no-enz	8-hidroxi-eicosatetraenoico
8-iso PGF2 $\alpha$ III	AA	no-enz	Isoprostano F <sub>2<math>\alpha</math></sub> -III
8-iso-15k PGF2 $\beta$	AA	no-enz	8-iso-15-ceto Prostaglandina F2 $\beta$
9-HETE	AA	no-enz	9-hidroxi-eicosatetraenoico

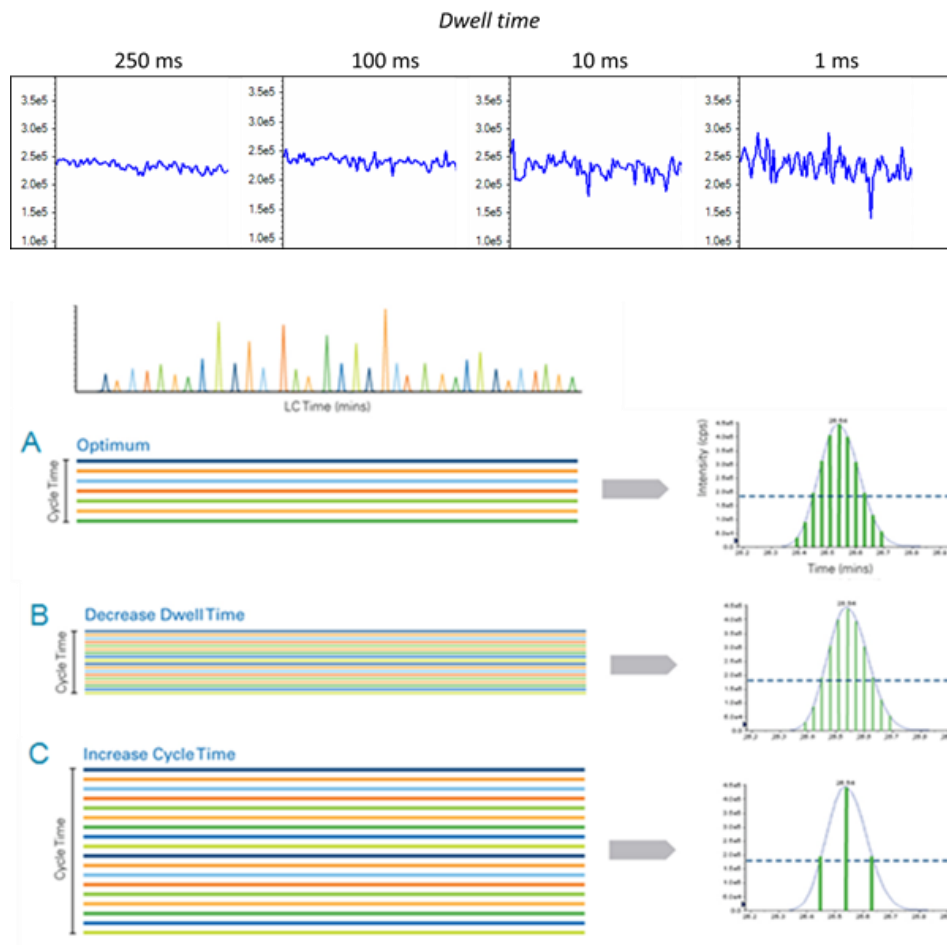
Nombre abreviado	Precursor	Vía	Nombre largo
9oh PGF2 $\alpha$	AA	COX	9-hidroxi-PGF2 $\alpha$
biciclo PGE2	AA	COX	biciclo Prostaglandina E2
dh PGF2 $\alpha$	AA	COX	13,14-dihidro-Prostaglandina F2 $\alpha$
dhk PGD2	AA	COX	13,14-dihidro-15-ceto Prostaglandina D2
dhk PGE2	AA	COX	13,14-dihidro-15-ceto Prostaglandina E2
dhk PGF2 $\alpha$	AA	COX	13,14-dihidro-15-ceto Prostaglandina F2 $\alpha$
HXA3	AA	LOX	Hepoxilina A3
HXB3	AA	LOX	Hepoxilina B3
LTB4	AA	LOX	Leucotrieno B4
LTC4	AA	LOX	Leucotrieno C4
LTD4	AA	LOX	Leucotrieno D4
LTE4	AA	LOX	Leucotrieno E4
LXB4	AA	LOX	Lipoxina B4
PGA2	AA	COX	Prostaglandina A2
PGB2	AA	COX	Prostaglandina B2
PGD2	AA	COX	Prostaglandina D2
PGE2	AA	COX	Prostaglandina E2
PGF2 $\alpha$	AA	COX	Prostaglandina F2 $\alpha$
PGJ2	AA	COX	Prostaglandina J2
PGK2	AA	COX	Prostaglandina K2
tetranor 12-HETE	AA	LOX	tetranor 12-hidroxi-eicosatetraenoico
tetranor-PGDM	AA	COX	tetranor-Prostaglandina D Metabolito
tetranor-PGEM	AA	COX	tetranor-Prostaglandina E Metabolito
tetranor-PGFM	AA	COX	tetranor-Prostaglandina F Metabolito
TxB2	AA	COX	Tromboxano B2
dihomo PGE2	AA/AdA	COX	dihomo Prostaglandina E2
dihomo 15d PGD2	AdA	COX	
dihomo PGD2	AdA	COX	dihomo Prostaglandina D2
dihomo PGF2 $\alpha$	AdA	COX	dihomo Prostaglandina F2 $\alpha$
dihomo PGJ2	AdA	COX	dihomo Prostaglandina J2
13-HOTrE	$\alpha$ LA	LOX	13-hidroxi-octadecatrienoico
15-HETrE	DyLA	LOX	15-hidroxi-eicosatrienoico
15k-PGF1 $\alpha$	DyLA	COX	15-ceto-Prostaglandina F1 $\alpha$
8-HETrE	DyLA	LOX	8-hidroxi-eicosatrienoico
PGD1	DyLA	COX	Prostaglandina D1
PGE1	DyLA	COX	Prostaglandina E1
PGF1 $\alpha$	DyLA	COX	Prostaglandina F1 $\alpha$
TXB1	DyLA	COX	Tromboxano B1
10-HDoHE	DHA	LOX/no-enz	10-hidroxi-docosahexaenoico
10S-PD1	DHA	LOX	10S,17S-dihidroxi-docosahexaenoico
11-HDoHE	DHA	LOX/no-enz	11-hidroxi-docosahexaenoico
14-HDoHE	DHA	LOX/no-enz	14-hidroxi-docosahexaenoico
15t-PD1	DHA	LOX	15-trans Neuroprotectina D1
16-HDoHE	DHA	no-enz	16-hidroxi-docosahexaenoico
16(17)-EpDPE	DHA	CYP	16,17-epoxi Docosapentaenoico
17-HDoHE	DHA	ac-COX / LOX	17-hidroxi Docosahexaenoico



<b>Nombre abreviado</b>	<b>Precursor</b>	<b>Vía</b>	<b>Nombre largo</b>
19(20)-EpDPE	DHA	CYP	19,20-epoxi-docosapentaenoico
19,20-DiHDPA	DHA	CYP	19,20-dihidroxi-docosapentaenoico
20-HDoHE	DHA	no-enz	20-hidroxi-docosahexaenoico
4-HDoHE	DHA	LOX/no-enz	4-hidroxi-docosahexaenoico
7-HDoHE	DHA	LOX/no-enz	7-hidroxi-docosahexaenoico
7(R)-MaR1	DHA	LOX	Maresina 1
8-HDoHE	DHA	no-enz	8-hidroxi-docosahexaenoico
PD1	DHA	LOX	Protectina D1
RvD1	DHA	LOX	Resolvina D1
RvD2	DHA	LOX	Resolvina D2
RvD3	DHA	LOX	Resolvina D3
RvD3	DHA	LOX	Resolvina D3
RvD3	DHA	LOX	Resolvina D3
RvD5	DHA	LOX	Resolvina D5
17k-DPA	DPA	LOX	17-ceto-docosapentaenoico
15-oxoEDE	EDA	LOX	15-oxo-eicosadienoico
11-HEPE	EPA	LOX	11-hidroxi-eicosapentaenoico
12-HEPE	EPA	LOX	12-hidroxi-eicosapentaenoico
14(15)-EpETE	EPA	CYP	14,15-epoxi-eicosatetraenoico
15-HEPE	EPA	LOX	15-hidroxi-eicosapentaenoico
17(18)-EpETE	EPA	CYP	17,18-epoxi-eicosatetraenoico
18-HEPE	EPA	CYP	18-hidroxi-eicosapentaenoico
5,6-diHETE	EPA	CYP	5,6 dihidroxi-eicosatetraenoico
5-HEPE	EPA	LOX	5-hidroxi-eicosapentaenoico
8-HEPE	EPA	LOX	8-hidroxi-eicosapentaenoico
8-isoPGF3 $\alpha$	EPA	no-enz	8-iso-Prostaglandina F3 $\alpha$
9-HEPE	EPA	no-enz	9-hidroxi-eicosapentaenoico
LXA5	EPA	LOX	Lipoxina A5
PGD3	EPA	COX	Prostaglandina D3
PGE3	EPA	COX	Prostaglandina E3
PGF3 $\alpha$	EPA	COX	Prostaglandina F3 $\alpha$
RvE1	EPA	LOX	Resolvina E1
TXB3	EPA	COX	Tromboxano B3
$\Delta$ 17-6k-PGF1 $\alpha$	EPA	COX	$\Delta$ 17-6-ceto-Prostaglandina F1 $\alpha$
13-HOTrE(y)	$\gamma$ LA	LOX	13-hidroxi- $\gamma$ -octadecatrienoico
PGK1	$\gamma$ LA	COX	Prostaglandina K1
12,13-diHOME	LA	CYP	12,13-dihidroxi-octadecenoico
12,13-EpOME	LA	CYP	12(13)-epoxi-octadecenoico
13-HODE	LA	LOX	13-hidroxi-octadecadienoico
13-oxoODE	LA	LOX	13-oxo-octadecatrienoico
9,10-diHOME	LA	CYP	9,10-dihidroxi-octadecenoico
9,10-EpOME	LA	CYP	9(10)-epoxi-octadecenoico
9-HODE	LA	LOX	9-hidroxi-octadecadienoico
9-HOTrE	LA	LOX	9-hidroxi-octadecatrienoico
9-oxoODE	LA	LOX	9-oxo-octadecadienoico
5-HETrE	MA	LOX	5-hidroxi-eicosatrienoico

De esta manera, se elaboró una extensa lista con las transiciones que se pretenden estudiar (ver **anexo 2**). Eso trae consigo un desafío instrumental importantísimo que tiene que ver principalmente con los tiempos de adquisición de datos, en particular con el *Dwell time* y el tiempo total del ciclo. El *Dwell time* es el tiempo que le toma al equipo en escanear una masa o transición en particular, típicamente en el orden de los milisegundos. Cuando el equipo está configurado para trabajar en altas velocidades, *Dwell time* ~1 ms, el efecto sobre la detección es bien claro: se genera una línea de base muy ruidosa (**figura 25, panel superior**). Esto no tiene mayor incidencia cuando las señales correspondientes a los analitos de interés son intensas, ya que se pueden diferenciar de la línea de base en cualquier caso. Sin embargo, cuando se analizan metabolitos que están presentes en baja concentración (como algunas de las oxilipinas), la intensidad de la señal es baja, y si la línea de base es ruidosa se dificulta la correcta definición de los picos.

En el otro extremo, definir un *Dwell time* demasiado largo para tener una línea de base estable, también tiene su desventaja, fundamentalmente sobre el tiempo de ciclo. El tiempo de ciclo en un experimento de MRM es el tiempo que le lleva el equipo analizar todas las transiciones y está estrechamente relacionado con el tiempo que toma en analizar cada una (*Dwell time*). Por tanto, si se buscan muchas transiciones (como es lo deseado en el presente estudio) el tiempo de ciclo se extiende demasiado y puede suceder que, durante la elución de un pico cromatográfico, sólo se pueda detectar cada transición particular unas pocas veces (**figura 25, panel inferior**). Por tanto, el *Dwell time* condiciona la cantidad de veces que se escanea una determinada transición por pico de elución cromatográfico. Las normas internacionales, p.ej. de la *European Medicines Agency* y la *US Food and Drug Administration* exigen un mínimo de 12-20 puntos para definir un pico en LC-MS/MS [123–125]. Por lo tanto, al momento de diseñar un método de MRM para analizar muchos analitos (enfoque ómico) hay un compromiso entre el número de transiciones y el *Dwell time* asignado a cada una.



**Figura 25. Efecto del *Dwell time* en análisis MRM. (Arriba)** Se realiza una inyección directa de solvente al espectrómetro de masas a la vez que se realiza un experimento de MRM con una única transición. La figura muestra la corriente iónica total a medida que se varía el *Dwell time* en valores 250, 100, 10 y 1 ms. Se observa que la línea de base se vuelve más ruidosa a medida que el *Dwell time* disminuye. **(Abajo)** Un esquema representativo en el que se muestra la definición de un pico cromatográfico a partir de un análisis MRM, con distintos tiempos de ciclo. A medida que aumenta el tiempo de ciclo el pico se define con menos puntos.

Por lo tanto, se trabajó con dos aproximaciones diferentes. Una de las estrategias, **MRM en múltiples períodos**, tiene que ver con la segmentación del método en etapas, esto es, durante la cromatografía se establecen cuatro períodos para que la lista de transiciones a escanear en cada uno de ellos sea más corta y así el *Dwell time* puede aumentar para cada metabolito en un período dado. La otra estrategia empleada se basa en el uso de un algoritmo de SCIEX, denominado *scheduled MRM<sup>TM</sup> (sMRM)* que permite analizar cada transición en una ventana de tiempo previamente fijada. En sí, consta de una lista de

transiciones MRM y tiempos de retención ( $t_R$ ). Este algoritmo maximiza la cantidad de puntos que definen un pico cromatográfico para dar una mejor definición del pico, además de mejorar la reproducibilidad. A su vez, existe una mejora a este método que se puede emplear: el *sMRM Pro Algorithm (sMRM Pro)*. Este método agrega algunas funcionalidades extra tales como: la posibilidad de definir ventanas de tiempo diferentes para diferentes transiciones, extensión automática de la ventana de tiempo si el pico cromatográfico aún no terminó de eluir, y además permite categorizar transiciones en primarias y secundarias (en ese caso la secundaria solo se analiza en caso que la primaria supere un umbral preestablecido, y es útil para su empleo como transiciones confirmatorias de la identidad). De esta forma se mejora la robustez del sMRM.

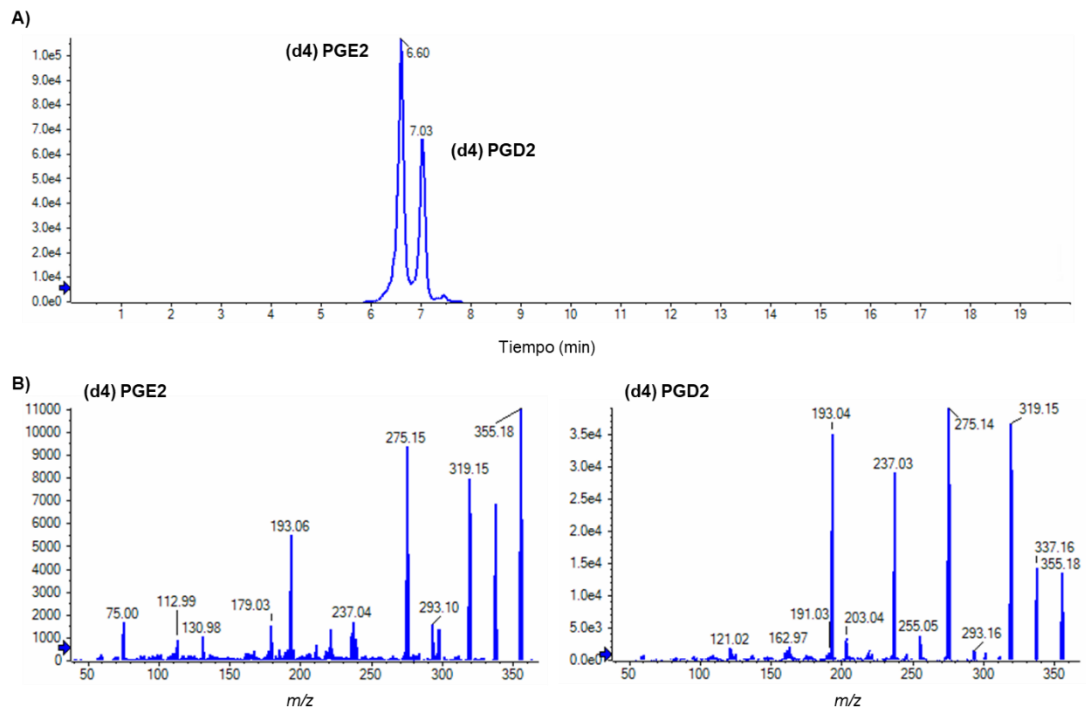
Un aspecto en común en ambas estrategias es la importancia de conocer el  $t_R$  de forma previa (aunque con diferente grado de precisión). Es que en un sMRM las ventanas típicas de análisis son de 60 s (el rango de 30 - 90 s es lo recomendado), por lo tanto, si el  $t_R$  no se conoce de forma (relativamente) precisa, se pueden “perder” picos por eluir fuera de la ventana del monitoreo de sus transiciones. En el caso de los MRM con múltiples períodos, es necesario conocer los  $t_R$  para que durante el diseño de los períodos se puedan establecer límites (las fronteras entre períodos) de manera tal que se evite la elución de cualquier analito justo en ese momento. Pero, a diferencia del caso anterior, el énfasis en la precisión de los  $t_R$  es imperiosa solo en aquellos analitos con  $t_R$  cercano a las fronteras entre períodos.

Las tablas con las listas *sMRM* y *MRM* se muestran en los **anexos 2 y 3**.

### Cromatografía líquida

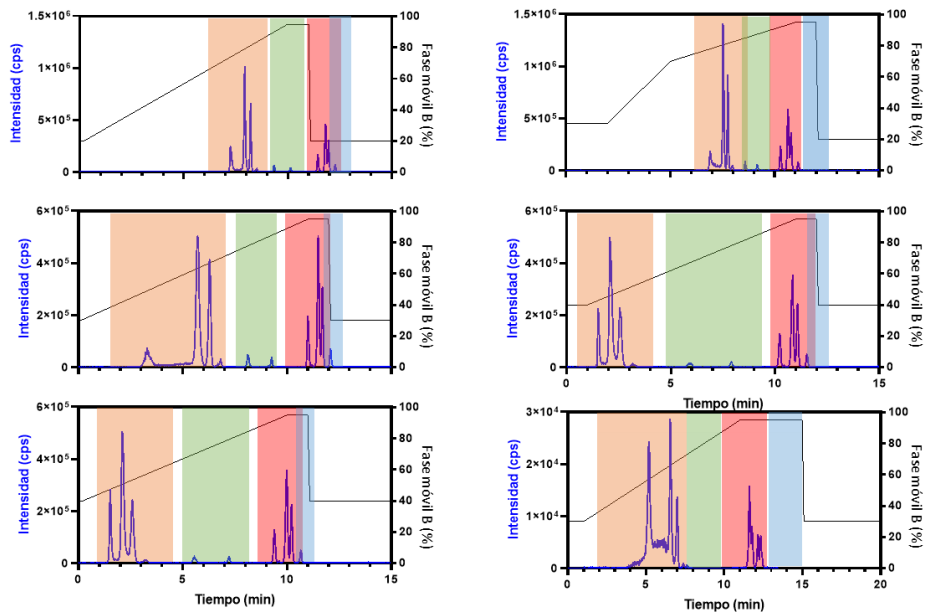
A pesar de que las oxilipinas pueden ser cuantificadas por espectrometría de masas, ésta técnica utilizada de forma individual tiene sus limitaciones. La inyección directa de muestras biológicas que contienen grandes cantidades de compuestos ionizables, puede causar supresión iónica y reducir la sensibilidad global de la técnica. Además, una fracción pequeña de oxilipinas presenta diferencias estructurales que no pueden ser diferenciadas por un analizador de masas. Pero muchas veces, las características estructurales que no se diferencian por MS, típicamente afectan su comportamiento cromatográfico, afectando el  $t_R$ . Esto se demuestra claramente para el caso de las PGE2 y PGD2 (**figura 26**). Ambos eicosanoides tienen el mismo ion precursor y generan el mismo ion producto. Son moléculas que difieren solo en la posición del grupo cetona e hidroxilo en el anillo prostanoide. A pesar

de que comparten muchas de sus características para el MS, la cromatografía líquida puede separar estos metabolitos haciendo fácil la diferenciación de éstos en el análisis y revelando la importancia del uso de cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas.



**Figura 26. Análisis de estándares deuterados de PGE2 y PGD2. A)** Análisis por HPLC-MS/MS de mezcla de estándares internos de las prostaglandinas PGE2 y PGD2, se muestra el cromatograma para la transición 355/275  $m/z$ . **B)** Espectros de fragmentación de (d4) PGE2 (izquierda) y (d4) PGD2 respectivamente (derecha).

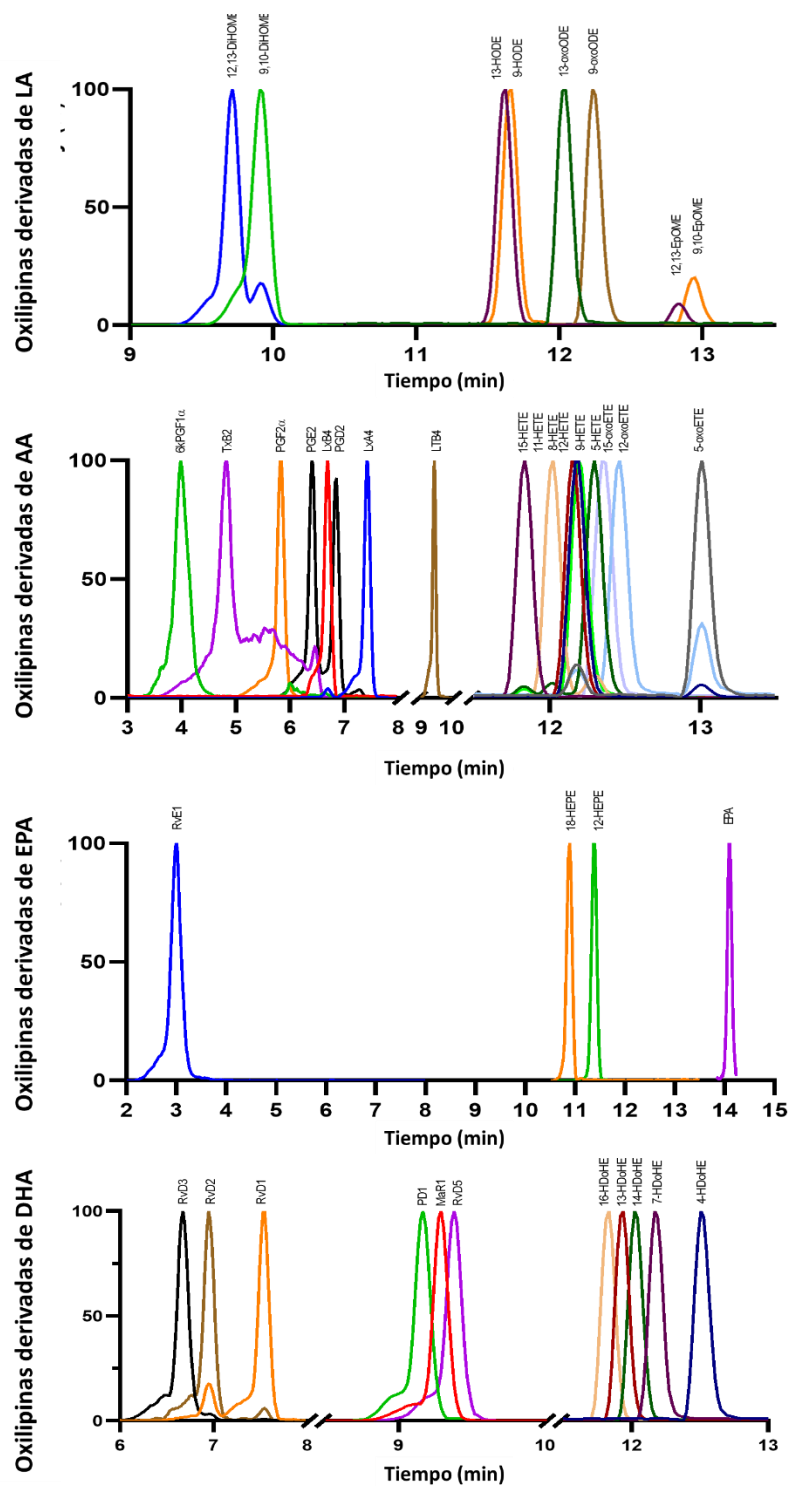
Como fuera demostrado en muchos otros trabajos, las oxilipinas se separan muy bien en fase reversa. En este caso, la cromatografía en fase reversa se realizó empleando una columna Luna C18(2), 5  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm (Phenomenex, Torrance, CA) a un flujo de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  a 30  $^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se inyectan con un *autosampler* mantenido a 4  $^{\circ}\text{C}$  para minimizar la degradación de oxilipinas mientras “esperan en cola” para su análisis. Para la optimización de la elución de las oxilipinas se probaron diferentes gradientes de solvente B (acetonitrilo) en solvente A (agua), ambos conteniendo 0,1% de ácido fórmico (**figura 27**). Para dichas pruebas se trabajó con un mix de estándares conteniendo diferentes oxilipinas, representativas de las más polares, tales como 6k-PGF1 $\alpha$ , y de las menos polares, tales como 5-HETE (y los propios ácidos grasos precursores).



**Figura 27. Pruebas de gradiente de elución.** En la figura se muestra el cromatograma de corriente iónica total (azul) obtenido para la separación de una mezcla de estándares de oxilipinas. En negro se representa el gradiente empleado en cada caso. Fase móvil B: ACN, 0,1% ácido fórmico. En sombreado se muestran regiones aproximadas de elución de distintos grupos de oxilipinas: naranja: prostanoideos; verde: leucotrienos y oxilipinas dihidroxiladas; rojo: oxilipinas monohidroxiladas; azul: ácidos grasos precursores.

Luego de evaluar el perfil de elución de los estándares utilizados, se busca el gradiente con el que se obtenga mejor separación de las oxilipinas a lo largo de toda la corrida. A su vez, es importante que todas las oxilipinas (analitos en general) eluyan luego de finalizado el gradiente y no en la fase de re-equilibrado. En función de ello, se definen como óptimas las siguientes condiciones cromatográficas: la columna se equilibra con 30% de solvente B y las muestras disueltas en 50% MeOH se inyectan en volumen variable (típicamente 50  $\mu$ L). La elución se hace mediante un gradiente lineal de 30 a 95% solvente B de 0,1 a 11 min, y luego se mantiene a 95% solvente B por 4 min adicionales. Posteriormente se reequilibra con las condiciones iniciales por 5 min.

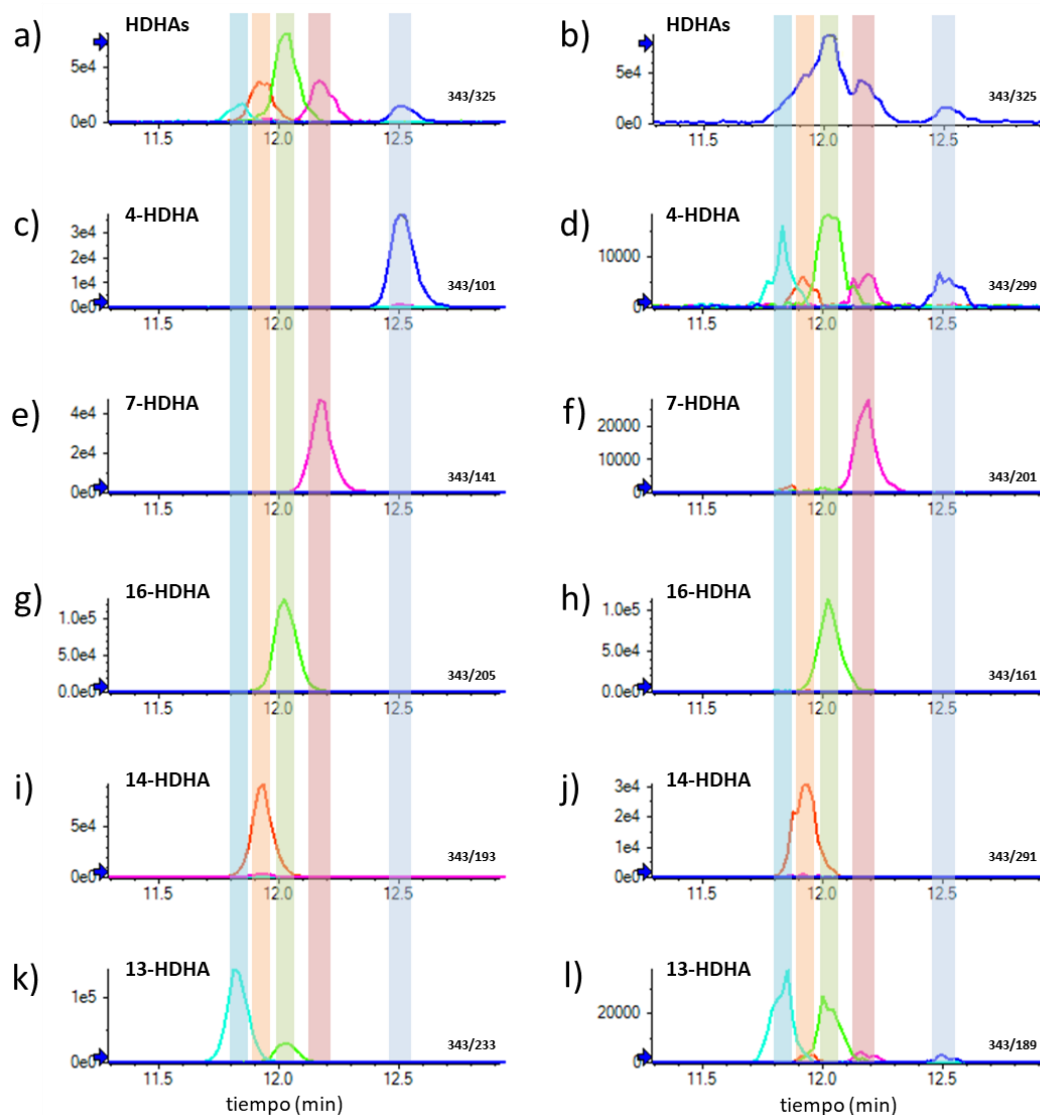
Los cromatogramas representativos de los análisis de los estándares de oxilipinas se pueden observar en la **figura 28**. El patrón de elución es similar a los publicados en muchos otros trabajos en los que se emplea una cromatografía en fase reversa [68,71,72]; primeramente eluyen fundamentalmente los prostanoideos (PGs, TXs, iso-PGs) junto con la RvE1 que es un eicosanoide trihidroxilado, luego siguen los leucotrienos y oxilipinas dihidroxiladas, más tarde las monohidroxiladas junto con los epóxidos y finalmente los PUFA sin modificar.



**Figura 28. Perfil de elución de oxilipinas por HPLC con el gradiente optimizado.** En cada panel se muestran los cromatogramas obtenidos para las oxilipinas, separados por precursor. Los cromatogramas representados en la figura corresponden a la transición más intensa para cada estándar. Notar que las escalas de tiempo en eje x no son iguales en todos los casos.

Un aspecto que resulta interesante destacar es la detección de distintos compuestos monohidroxilados del DHA. Se trata de isómeros de posición que se pueden analizar de manera individual justamente gracias a la combinación entre la cromatografía líquida y espectrometría de masas (ver **figura 29**). En este experimento se analizaron cinco isómeros posicionales de las oxilipinas monohidroxiladas del DHA: 4-HDHA, 7-HDHA, 16-HDHA, 14-HDHA y 13-HDHA. Todas ellas presentan transiciones similares (pérdida neutra de [H<sub>2</sub>O], [COOH], [H<sub>2</sub>O + COOH]) Como se observa en el **panel a** todos los isómeros dan señal para la transición  $m/z$  343/325 (pérdida neutra de H<sub>2</sub>O), y si se analiza una mezcla de distintos isómeros resulta imposible diferenciar a todos ellos y cuantificar de forma individual empleando únicamente dicha transición (ver **panel b**). Por lo que la forma de diferenciarlas para su análisis depende de contar con transiciones específicas y/o separarlas en el tiempo. Un ejemplo relevante de diferenciación de isómeros de HDHAs por  $t_R$ , es el que se da para el caso del 4-HDHA. En la **figura 29, paneles c y d** se muestran las transiciones empleadas para monitorizar al 4-HDHA,  $m/z$  343/101 y 343/299, respectivamente. Como se observa en la figura, el ion  $m/z$  101 es específico para dicho isómero, sin embargo el ion producto  $m/z$  299 es común a todos los isómeros analizados. De todos modos, como el 4-HDHA se separa en  $t_R$  con respecto a los demás, aún la transición  $m/z$  343/299 puede ser utilizada para seguir este isómero. Por otro lado, un ejemplo de diferenciación de isómeros por transición es el que se da entre el 16-HDHA y el 14-HDHA. La diferencia en sus  $t_R$  es muy pequeña, sin embargo ambos generan productos de fragmentación específicos (**figura 29, paneles g – j**).





**Figura 29. Análisis de isómeros de hidrox-DHA por HPLC-MS.** Cromatogramas obtenidos del análisis de 25 pg de distintos isómeros monohidroxilados del DHA: 4-HDHA, 7-HDHA, 16-HDHA, 14-HDHA y 13-HDHA, por HPLC-MS/MS. En los paneles a, c, d, e, f, g, h, i y j se muestra la superposición de los cromatogramas obtenidos para las inyecciones de cada uno de los estándares de HDHA. Las transiciones estudiadas en cada caso se muestran en el panel correspondiente. **a)** Análisis de la transición correspondiente al ion  $[M - H_2O]^+$ ,  $m/z$  343/325 para cada uno de los estándares inyectados de forma individual. **b)** Suma de todos los cromatogramas del panel a. **c y d)** Análisis de las transiciones elegidas para monitorear al 4-HDHA. **e y f)** Análisis de las transiciones elegidas para monitorear al 7-HDHA. **g y h)** Análisis de las transiciones elegidas para monitorear al 16-HDHA. **i y j)** Análisis de las transiciones elegidas para monitorear al 14-HDHA. **k y l)** Análisis de las transiciones elegidas para monitorear al 13-HDHA.

## Extracción lipídica

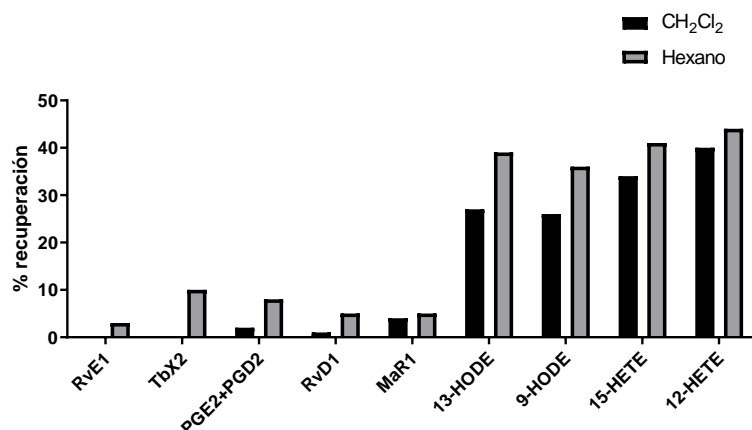
La preparación de las muestras es un paso crítico en el análisis de oxilipinas. Muchas existen en muy baja concentración en plasma u otras matrices biológicas (desde bajo pg/mL para el caso de los SPM [126,127], hasta µg/mL para el caso de los derivados monohidroxilados de los ácidos araquidónico y linoleico [128]). En el primer paso del desarrollo del método de esta tesis se evaluó la recuperación de oxilipinas luego de distintos métodos de extracción; líquido-líquido con hexanos y con diclorometano y tres matrices de SPE diferentes. Inicialmente se trabajó con estándares de oxilipinas en agua y posteriormente se avanzó hacia el trabajo con estándares deuterados en plasma.

En el primer paso, se prepararon mezclas de estándares naturales en 500 µL de agua, conteniendo (en orden de elución): RvE1, TxB2, PGE2, PGD2, RvD1, MaR1, 13-HODE, 9-HODE, 15-HETE y 12-HETE. El método de extracción líquido-líquido con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) es el método clásico de Bligh & Dyer [129] modificado, en el que se utiliza diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) en vez de cloroformo, como indica el método original. En el caso del método de Hexano, se adicionan 2,5 volúmenes de la mezcla Hexano/Isopropanol/ácido acético (30/20/2) y posteriormente se realizan dos extracciones consecutivas con 2,5 volúmenes de hexano. En ambos casos se toma la fase orgánica (inferior para el método de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y superior para el caso de método hexano), y se evapora a sequedad por agitación en vacío con temperatura controlada (30 °C). Finalmente las muestras se resuspenden en 50 µL de MeOH 50% y se analizan por HPLC-MS/MS<sup>5</sup>.

Luego del análisis por HPLC-MS/MS, se integran las áreas correspondientes a los picos detectados para cada estándar y se comparan con las señales obtenidas para los mismos estándares analizados directamente por HPLC-MS, sin proceso de extracción. De esta manera se calcula un porcentaje de recuperación relativo para cada estándar (**figura 30**).

---

<sup>5</sup> El método de análisis con el que se trabajó en esta etapa emplea la cromatografía optimizada y un análisis MRM dedicado únicamente a la búsqueda de los estándares adicionados (es decir, no se trabajó con el MRM de múltiples períodos o el sMRM)



**Figura 30. Recuperación de oxilipinas por métodos de extracción líquido-líquido.** Se muestran los% de recuperación obtenidos a partir del análisis de mezclas de estándares de oxilipinas en agua, extraídas por método de diclorometano y hexano (ver descripción en texto). Las barras se ordenan de izquierda a derecha según orden de elución creciente de las oxilipinas en cromatografía de fase reversa.

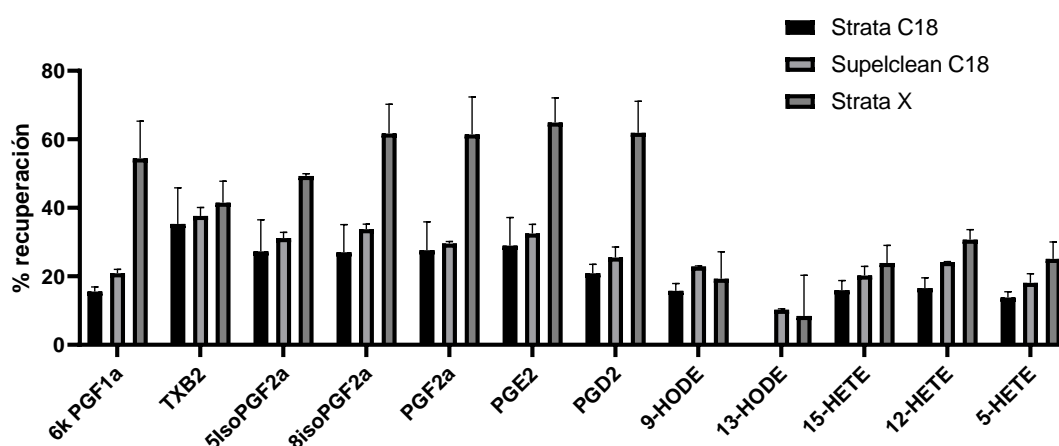
Los resultados obtenidos coinciden con lo esperado. En general el método de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrae mejor los lípidos más hidrofóbicos mientras que el método de hexanos extrae fundamentalmente, además de los lípidos más hidrofóbicos, aquellos más polares. También hay que considerar que el % de recuperación que aquí se representa contempla no solo la recuperación *per se*, sino que también incluye el efecto de la eliminación de posibles interferentes (en este caso es H<sub>2</sub>O np pero podría haber alguno presente en la matriz).

Luego de evidenciar que las oxilipinas más polares, tales como prostanoïdes y resolvinas trihidroxiladas (RvE1), no se extraen bien con extracciones líquido-líquido se definió entonces evaluar la SPE como método de extracción. Por tanto se evaluaron distintas matrices de adsorción para SPE: dos fases hidrofóbicas C18, Strata C18 y Supelclean C18, y una fase polimérica Strata X. En el caso de la extracción en fase sólida con cartuchos Strata C-18T (Phenomenex, P/N 8B-S004-HCH) y Supelclean C18 el procedimiento empleado es el descrito por el grupo de Serhan y Dalli [130] con mínimas modificaciones. Las muestras mezclan con 4 volúmenes de MeOH frío y se mantienen a -20 °C por 45 min para permitir la eventual precipitación de proteínas. Posteriormente se centrifugan a 2000 g y 4 °C por 10 min. Se toma el sobrenadante y previo a la siembra se diluye con agua de manera tal que el MeOH presente no supere un 10%v-v. Los cartuchos se pre-equilibran con agua y metanol, y luego de la siembra de la muestra se realizan dos lavados, uno con agua para eliminar compuestos

polares y otro con hexano para eliminar los compuestos más hidrofóbicos y el agua remanente. Finalmente las oxilipinas se eluyen con acetato de etilo y se llevan a sequedad mediante evaporación a vacío con temperatura controlada (45 °C). Posteriormente se agrega 1 mL de MeOH a cada tubo para que mediante agitación resuspenden las oxilipinas y transfiere a tubo *ependorf* para su secado a vacío con temperatura controlada (45 °C).

En el caso del cartucho polimérico Strata X, el procedimiento empleado fue el del grupo de Edward Dennis [67,131,132] con mínimas modificaciones. Las muestras se mezclan con MeOH 20% en proporción 1:1, y luego de agitación por vortex se centrifugan a 14.000 g y 4 °C por 40 min. El sobrenadante se siembra directamente sobre los cartuchos pre-condicionados con MeOH y equilibrados con MeOH 10%, pH 3 (HCl). Luego de la siembra se realiza un lavado con MeOH 10%, pH 3 (HCl) y luego la elución es realizada con MeOH 100% directamente sobre un tubo *ependorf* que se lleva a sequedad mediante evaporación a vacío con temperatura controlada (45 °C).

Luego de realizada la extracción por SPE, independientemente de los cartuchos utilizados, las muestras se resuspenden en 50 µL de MeOH 50% y se analizan por HPLC-MS/MS. Los resultados de porcentaje de recuperación se muestran en la **figura 31**.

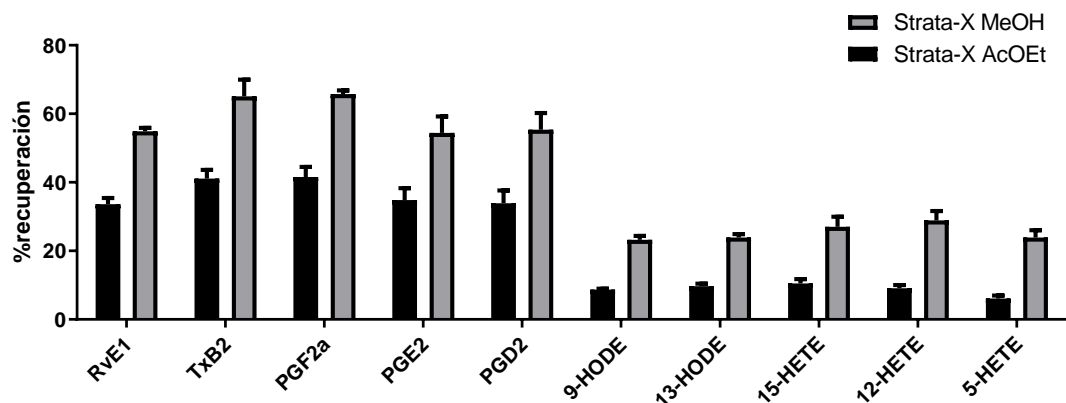


**Figura 31. Recuperación de estándares de oxilipinas por distintas SPE.** Se muestran los% de recuperación obtenidos a partir del análisis de mezclas de estándares de oxilipinas en agua, empleando tres cartuchos de extracción en fase sólida. Para todas las oxilipinas analizadas se obtiene mejor recuperación empleando el método Strata-X. Las barras se ordenan de izquierda a derecha según orden de elución creciente de las oxilipinas en cromatografía de fase reversa.

En base a los resultados obtenidos para los porcentajes de recuperación para las distintas matrices de SPE, se observa que el método de procesamiento por Strata X presenta mejor recuperación para todas las oxilipinas estudiadas, especialmente las de mayor polaridad. Llama la atención que las más hidrofóbicas (ácidos grasos monohidroxilados) no se extraen muy bien con cualquiera de las SPE ensayadas. De todas formas, estas oxilipinas y los PUFA no modificados (que también tendrían un comportamiento similar) suelen estar presentes en mayores concentraciones en las muestras biológicas. Por tanto, es preferible tener un método que enriquezca selectivamente a los compuestos menos abundantes. En conclusión se opta por emplear los cartuchos Strata X para la extracción de oxilipinas.

A pesar de obtener mejores resultados para la extracción de oxilipinas con los cartuchos de SPE, los valores de recuperación obtenidos aún están muy lejos de los reportados en distintos artículos [71,75,130,133], entonces ¿por qué no se obtienen valores de recuperación más altos?

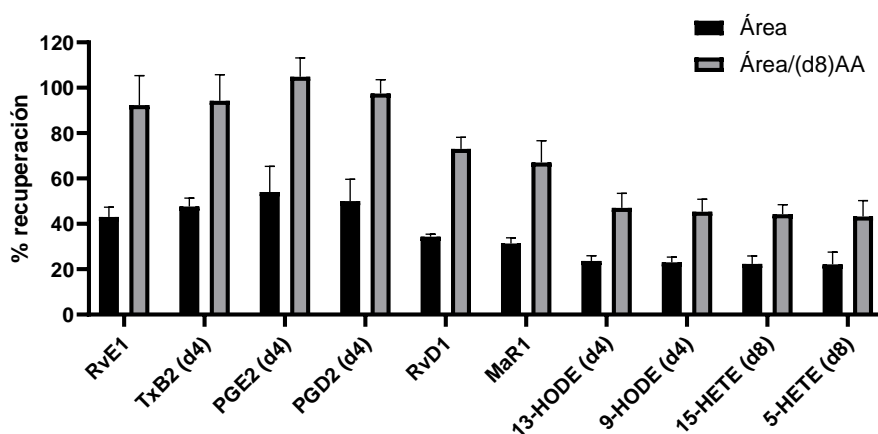
Para obtener una respuesta, una de las pruebas realizadas consistió en aplicar el método de SPE de los cartuchos C18 a los cartuchos Strata-X. Es decir, luego de sembrar las muestras comparar el método de lavado con H<sub>2</sub>O, hexano y posterior elución con AcOEt con el método de lavado con MeOH 10% y elución con MeOH, en ambos casos empleando los cartuchos poliméricos Strata-X. Los resultados de dicho análisis se muestran en la **figura 32**, y se observa que el método de elución con AcOEt no mejora la recuperación de oxilipinas empleando los cartuchos Strata-X.



**Figura 32. Recuperación de estándares de oxilipinas empleando Strata-X.** Se muestran los % de recuperación obtenidos a partir del análisis de mezclas de estándares de oxilipinas en agua, empleando el cartucho polimérico Strata-X con dos métodos de elución diferentes: MeOH y AcOEt (ver descripción en texto). Para todas las oxilipinas analizadas se obtiene mejor recuperación empleando el método de elución con MeOH. Las barras se ordenan de izquierda a derecha según orden de elución creciente de las oxilipinas en cromatografía de fase reversa.

Un aspecto a tener en cuenta en esta etapa es que el cálculo de rendimientos de extracción conlleva una dificultad importante. Esto se debe a que se utiliza la señal del estándar (natural o deuterado) que se adicionó en cada muestra (H<sub>2</sub>O o plasma), y ese valor absoluto es contrastado con la señal obtenida para el mismo estándar analizado por HPLC-MS/MS de forma directa (sin procesamiento). Por tanto, si se desea evaluar exclusivamente el rendimiento de la extracción, debe asegurarse que el volumen de cada muestra es idéntico, que el volumen inyectado también sea el mismo y que las condiciones de ionización también sean comparables. Idealmente estas condiciones se cumplen. Sin embargo, hay que tener en cuenta la posibilidad de que existen variaciones en el instrumento al momento de la inyección (desgaste de piezas u otros aspectos instrumentales) que pueden afectar el volumen exacto que se inyecta en la columna de HPLC. A su vez, hay que tener en cuenta que el % de recuperación no solo contempla la recuperación *per se*, sino que también toma en cuenta el efecto que podrían ejercer los interferentes que puedan permanecer en la muestra luego de la SPE, afectando la comparación entre métodos. Por último, y quizás el factor más importante (por ser el que tiene mayor incidencia y se evidencia a simple vista), en la etapa de secado no es inusual que las muestras no lleguen a evaporar a sequedad aún luego de más de 120 min de *Speedvac* (probablemente debido a trazas de agua en el cartucho de SPE que son arrastrados con el solvente de elución). Esto provoca que luego de adicionar los 50 µL de MeOH 50% para resuspender, no obtengamos en todos los tubos los 50 µL deseados.

Para intentar mejorar ese aspecto y así establecer una mejor comparación entre métodos, se trabajó con una alternativa: emplear otro estándar interno, que se agrega justo inmediatamente antes del análisis por HPLC-MS/MS; es decir, un estándar interno que no se somete a SPE. Luego se calcula la relación entre cada estándar interno y este último. En este caso se realizó un experimento en el que se prepararon muestras con una mezcla de estándares deuterados de oxilipinas en H<sub>2</sub>O y se les aplicó el método de SPE con Strata-X (y elución con MeOH) e inmediatamente antes del análisis por HPLC-MS/MS, se adicionó ácido araquidónico deuterado, (d8)-AA. Todas las muestras fueron analizadas obteniéndose valores de área de picos cromatográficos para cada uno de los estándares y se calculó el rendimiento comparando contra el análisis de la misma mezcla de estándares sin procesamiento por SPE y normalizando por la señal del (d8)-AA (ver **figura 33**).



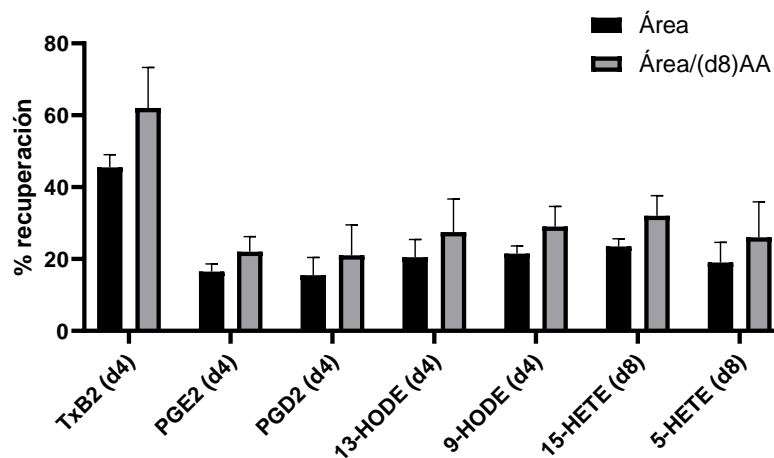
**Figura 33. Recuperación de estándares por SPE.** Se muestran dos formas de calcular el% de recuperación obtenidos a partir del análisis de mezclas de estándares de oxilipinas en agua, empleando el cartucho polimérico Strata-X. En negro se muestra el% de recuperación comparando área absoluta con la señal de los estándares sin procesamiento y en gris se muestran los datos normalizados por la señal del (d8)-AA (ver texto por descripción del cálculo). Las barras se ordenan de izquierda a derecha según orden de elución creciente de las oxilipinas en cromatografía de fase reversa.

Los resultados obtenidos a partir de los estándares en H<sub>2</sub>O muestran una amplia variación en la recuperación relativa cuando se normaliza por la señal del estándar interno que no atraviesa el procesamiento de SPE (d8)-AA. Aún más, ahora sí se obtienen valores de recuperación cercanos a los reportados en literatura [75]. Esta diferencia probablemente esté influenciada por las variaciones en el volumen real en que quedan resuspendidas las

muestras y por las interferencias que existen en las muestras. Siendo que en este caso se trata de H<sub>2</sub>O *nanopura* obtenida de forma local (ver sección materiales y métodos) las impurezas o interferencias no son lo más esperado, como sí lo son en el plasma. También se debe considerar que los solventes empleados son “calidad HPLC”, y también podrían provenir interferencias de los materiales utilizados (tubos, pipetas, cartuchos). De todos modos, estos resultados revelan que hay una recuperación cercana al 100% para algunas oxilipinas.

El método definido para procesar las muestras fue ahora aplicado a muestras de plasma humano “control” para continuar con el estudio del método. Dado que la matriz biológica es compleja, el tratamiento previo a la SPE cobra mayor relevancia en este tipo de muestras; principalmente, el paso de precipitación de proteínas. Para esta etapa existen muchos reportes que proponen diferentes estrategias, incluyendo la precipitación con TCA y con solventes orgánicos [56]. En este trabajo, como se mencionó anteriormente, se realizó tratamiento con solventes orgánicos bajo dos procedimientos levemente diferentes: la precipitación con MeOH y posterior dilución (adaptado de grupo de C.N. Serhan [130]) y también el mezclado con MeOH 20% 1:1 (método de grupo de E. Dennis [67]). Entonces, se realizó un experimento análogo al descrito anteriormente, preparando las muestras en plasma control en vez de H<sub>2</sub>O. Este plasma control es un plasma obtenido en grandes cantidades y a partir de un único donante. Por tanto no hay variabilidad biológica en este experimento. Las muestras fueron procesadas y analizadas por HPLC-MS/MS, se calculó el porcentaje de recuperación de cada estándar deuterado normalizando (o no) por la señal del (d8)-AA, tal como se muestra en la **figura 34**.

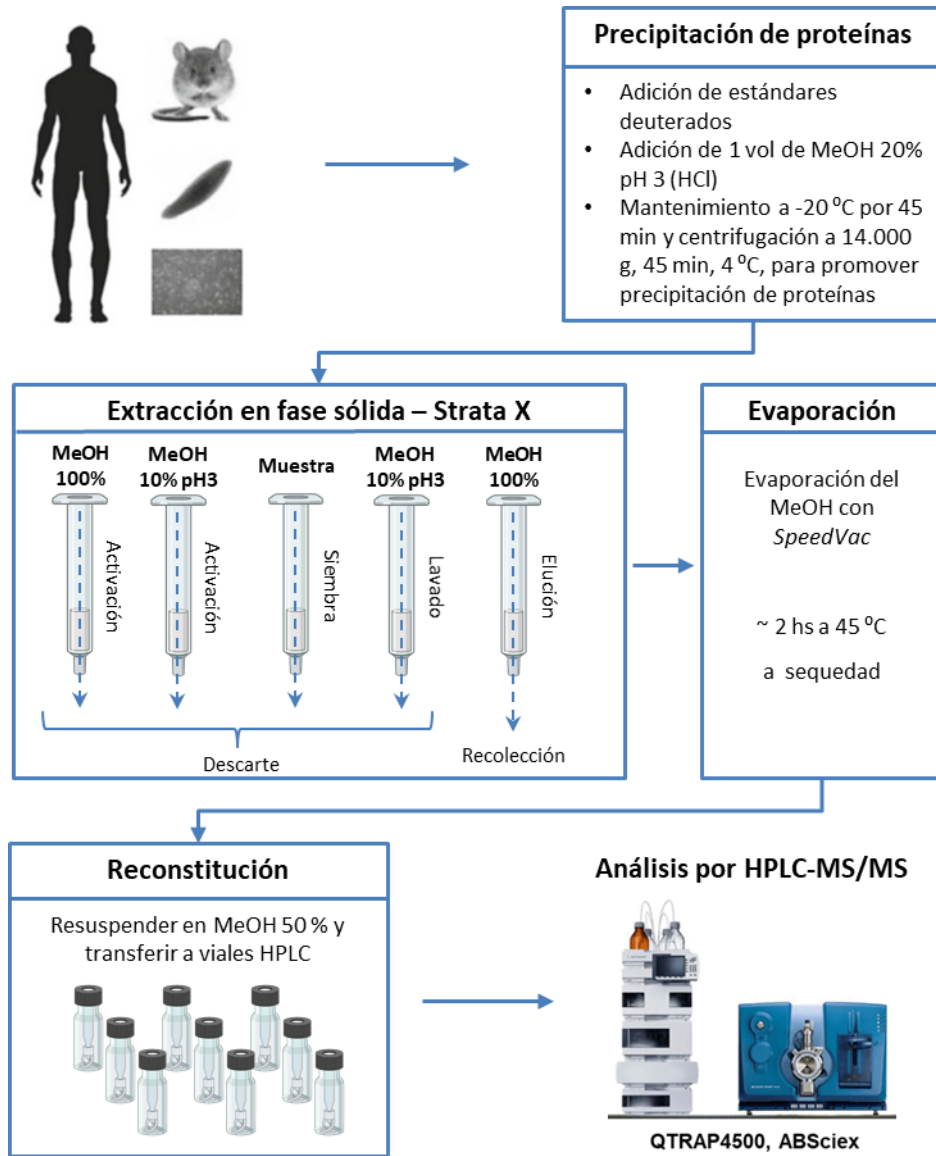




**Figura 34. Recuperación de estándares de oxilipinas en plasma por SPE.** Se muestran dos formas de calcular el % de recuperación obtenidos a partir del análisis de eicosanoides deuterados en plasma, empleando el cartucho polimérico Strata-X. En negro se muestra el % de recuperación comparando área absoluta con la señal de los estándares sin procesamiento y en gris se muestran los datos normalizados por la señal del (d8)-AA (ver texto por descripción del cálculo). Las barras se ordenan de izquierda a derecha según orden de elución creciente de las oxilipinas en cromatografía de fase inversa.

En el caso de las muestras que contienen estándares en plasma vemos que el cambio en el % de recuperación cuando se normaliza por (d8)-AA no es tan notorio como sucede en las muestras de oxilipinas en H<sub>2</sub>O (descritas anteriormente). Esto puede considerarse como llamativo, ya que habiéndose encontrado diferencias en los estándares presentes en agua era de esperar que existieran diferencias similares en este análisis. Sin embargo, se debe considerar que el hecho que las matrices sean distintas hace que los efectos puedan ser distintos. Una posible explicación a esta observación surge de considerar que el plasma puede contener interferencias que no son eliminadas por el paso de SPE y que afectan diferencialmente al (d8)-AA. Es decir, si en la matriz plasma existen interferentes que permanecen luego de la SPE, es probable que no afecten a todos los estándares analizados ya que eluirían de la columna de HPLC en un  $t_R$  o rango de  $t_R$  determinado. Si co-eluyen con los estándares deuterados analizados pero no con el (d8)-AA, entonces el % de recuperación obtenido sería más bajo, porque la señal de un estándar  $x$  estaría disminuida por la interferencia pero la del (d8)-AA no.

El método optimizado entonces se resume en la **figura 35**.



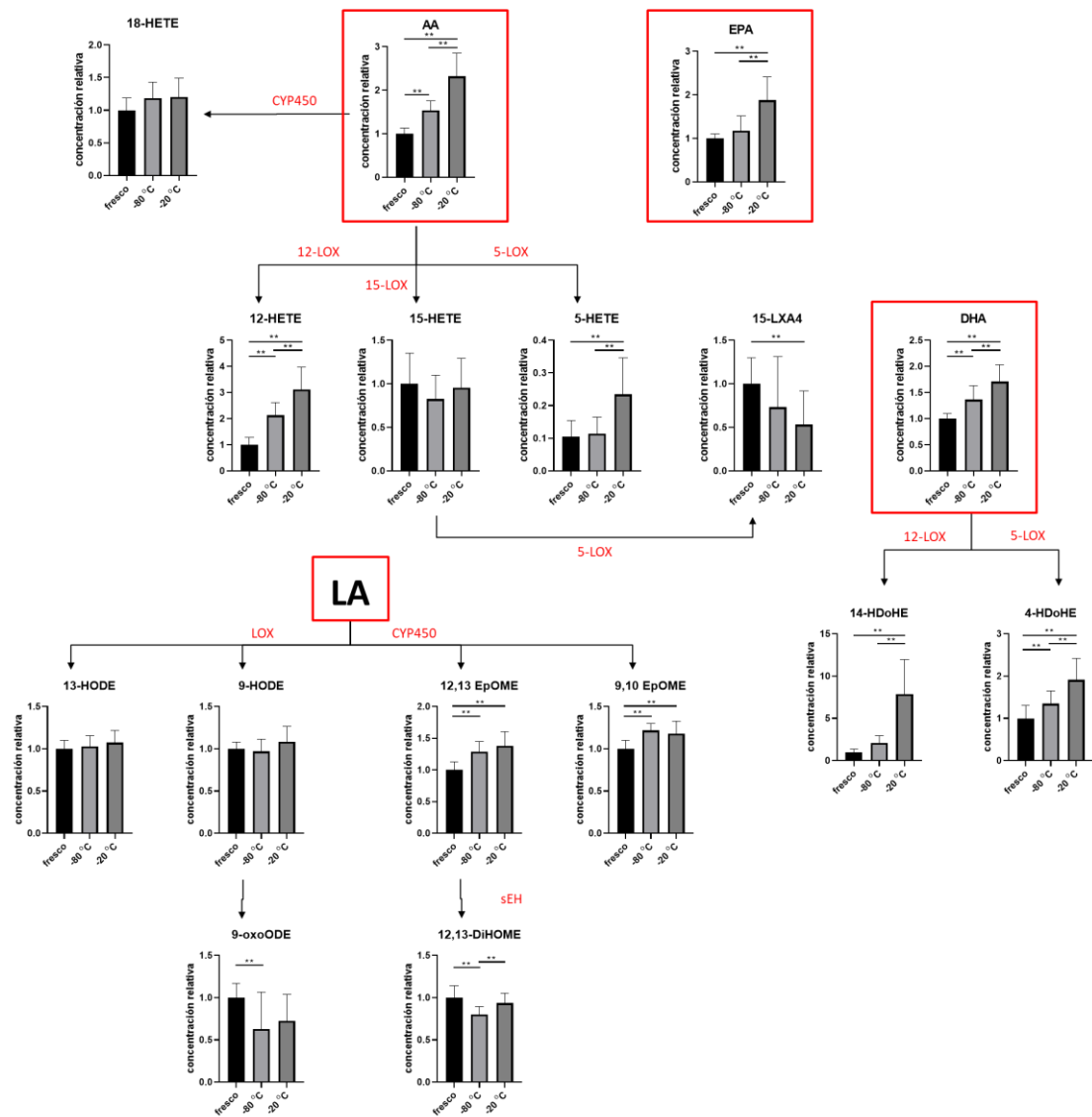
**Figura 35. Método optimizado de procesamiento de muestras para análisis de oxilipinas.** Los tejidos provenientes de distinto origen (humanos u otros animales, tejidos sólidos o líquidos, etc.) se deben homogenizar y mezclar con los estándares internos deuterados y diluir al medio en MeOH 10% pH 3 (con HCl). Para promover la precipitación proteica se deben mantener a -20 °C por 45 min y posteriormente centrifugar a 14.000 g por otros 45 min a 4 °C. Los sobrenadantes se transfieren a cartuchos Strata-X previamente acondicionados y luego de los lavados se eluye con MeOH. Los eluidos conteniendo las oxilipinas se llevan a sequedad y se resuspenden en MeOH 50% previo a su análisis por HPLC-MS/MS.

### Análisis en plasma control – estabilidad y reproducibilidad

Previo a la aplicación del método de análisis de oxilipinas por SPE-HPLC-MS/MS ya optimizado a las muestras de pacientes con ELA, se realizaron una serie de experimentos sobre un nuevo plasma control; esta vez, para evaluar la estabilidad y robustez (reproducibilidad) de las propias oxilipinas. Mucho de esto ya ha sido estudiado por otros autores, un trabajo muy exhaustivo que abarca muchos aspectos de la conservación de la muestra es el de Koch *et al* [73].

Se realizó una extracción de sangre y separación del plasma de un individuo sano (plasma control) de manera tal de tener suficiente volumen para poder realizar todos los análisis por quintuplicado sobre la misma muestra, y así evitar variación interindividual. En todos los casos se le agregó 0,025%v-v de BHT al plasma apenas fue aislado y los análisis de detección de oxilipinas se realizaron con iguales condiciones de procesamiento.

**Ensayo conservación/estabilidad.** En este caso, el plasma control se dividió en tres fracciones para evaluar el impacto de la temperatura de conservación de la muestra sobre las oxilipinas detectadas. Una fracción del plasma fue procesada y analizada en el mismo día de la extracción de sangre (en fresco). Las dos fracciones restantes se conservaron a -20 °C y -80 °C, y el análisis de oxilipinas fue realizado en distintos tiempos. Este experimento fue realizado tres veces, variando el tiempo de conservación en frío: 1, 2 y 3 semanas. Para evaluar la conservación/estabilidad de las oxilipinas (endógenas) detectadas en el plasma, la señal obtenida en cada caso (área de picos cromatográficos normalizada por el estándar interno) se normalizan con respecto a la condición de análisis en fresco. No se detectaron diferencias significativas en la señal obtenida para las distintas oxilipinas detectadas entre los distintos tiempos de conservación (no se muestra). Sin embargo, sí aparecen diferencias importantes para algunas oxilipinas cuando se compara las señales obtenidas en las muestras que tuvieron distinta condición de conservación. Los resultados se muestran en la **figura 36**.



**Figura 36. Efecto de las condiciones de conservación del plasma sobre los niveles de oxilipinas.** Se muestran las concentraciones de oxilipinas detectadas en plasma control luego de su conservación a -20 °C y -80 °C (relativa a la concentración del análisis del mismo plasma en fresco). Los ácidos grasos precursores se muestran recuadrados en azul. Cada barra representa el promedio ± desvío estándar, n = 15. \*p-valor < 0,05 ; \*\*p-valor < 0,01

Las distintas condiciones de conservación afectan de forma diferente a las oxilipinas detectadas. Primeramente, se pueden analizar las diferencias encontradas para los niveles de los ácidos grasos AA, EPA y DHA según las condiciones de conservación. En los tres casos los resultados muestran que en fresco se detectan menores niveles de ácidos grasos que en el plasma conservado a -20 °C, y se detectan niveles intermedios para el caso de conservación a -80 °C, siendo la diferencia significativa solo para el AA y DHA. Esto se podría interpretar como consecuencia de la actividad PLA2 presente en el plasma, y que es más pronunciada a

-20 °C. Para el caso de los derivados monohidroxilados del AA, los HETEs, no se detectan diferencias significativas para el 18-HETE (presumiblemente generado por autooxidación) ni 15-HETE, pero sí se evidencia un aumento significativo de los niveles de 5-HETE para la condición -20 °C y del 12-HETE en ambas condiciones de conservación del plasma. Esto se podría interpretar entonces como resultado de actividad LOX (5 y 12 LOX). En estas muestras de plasma no se detectaron PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, o TxB<sub>2</sub>, que son los metabolitos derivados del AA por vía COX que aparecen en mayor concentración en plasma, por tanto no podemos inferir mayores conclusiones sobre el comportamiento de los metabolitos de esta vía. Sí se evidencia un producto del catabolismo de PGE<sub>2</sub>, el tetranor PGEM, que parece disminuir en -80 °C y disminuye drásticamente cuando se conserva a -20 °C. En cuanto a los derivados de DHA los resultados son similares en cuanto a que se observa un aumento en los niveles de los derivados de 5 y 12-LOX, más pronunciado en las muestras conservadas a -20 °C. Los derivados del LA, en cambio, no presentan diferencias tan marcadas.

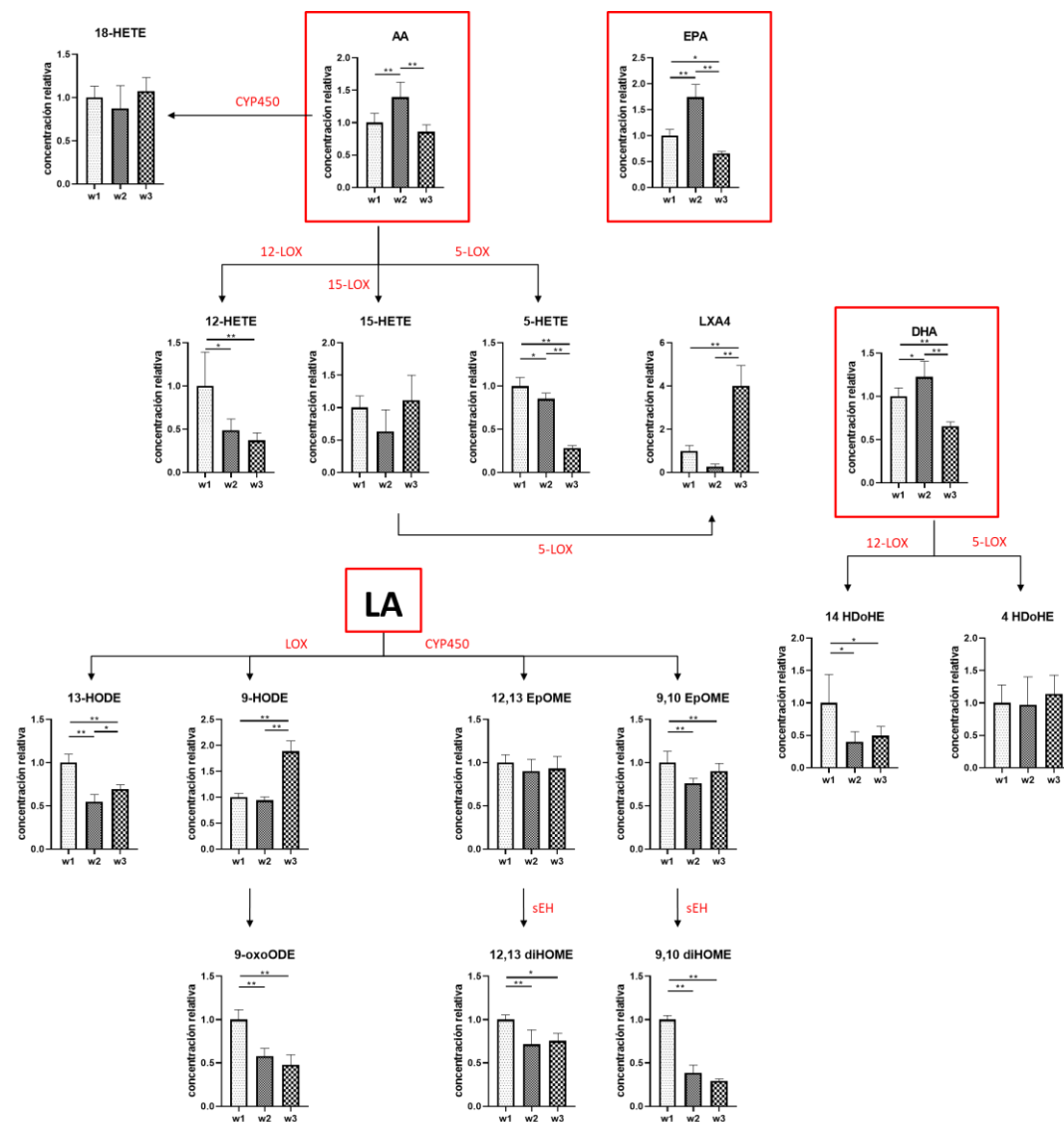
Con estos resultados se puede concluir que, ante la imposibilidad de analizar muestras de plasma en fresco hay que conservar a -80 °C para preservar los niveles de la mayoría de las oxilipinas detectadas. Esto coincide con otros reportes. Por ejemplo, Polinski *et al* mostraron que la conservación a -80 °C por hasta un año preserva los niveles de la mayoría de las oxilipinas analizadas y solo afecta algunas de ellas; un pequeño aumento en 12-HETE, 8-HETE, TxB<sub>2</sub>, 14-HDHA y 8-HDHA y disminución en 11,12-EpETE y 18-HEPE [134]. Estas observaciones (coincide lo del 12-HETE y 14-HDHA de nuestros datos) son compatibles con la activación lenta de plaquetas residuales que persisten en plasma congelado que se ha visto en otros trabajos [135].

Otro experimento, previo al análisis de plasma de pacientes tuvo que ver con el estudio de la variación intra-individual de los metabolitos (como idea de robustez par su propuesta como biomarcadores). Para ello, el mismo donante dona sangre tres semanas consecutivas en iguales condiciones de ayuno y mismo procesamiento de muestra (siempre en fresco).

Se ha demostrado que las concentraciones plasmáticas de oxilipinas poseen una determinada variación, tanto sea por factores ambientales como intrínsecos, y que son independientes de la variabilidad en la determinación analítica [136]. Dentro de los factores ambientales que afectan los niveles de oxilipinas plasmáticas se encuentra a la dieta como factor principal. En este sentido existen diversos trabajos en los que se estudia el efecto de

la dieta en la composición de membranas celulares (fosfolípidos que actúan como sustrato de PLA2, precursor biosintético de oxilipinas). Otro factor importante a considerar es la expresión de las enzimas que participan en la biosíntesis de oxilipinas. El consumo de inhibidores de COX (NSAIDs, del inglés, *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) está ampliamente distribuido para el tratamiento del dolor agudo y crónico. Otros fármacos, como el Zileuton (inhibidor 5-LOX para tratamiento de alergias y asma), antitrombóticos (inhibidores de Tx sintasa) también tienen impacto en la biosíntesis de oxilipinas. Y el impacto no es siempre el mismo, muchas veces impredecible. Quizás el caso de consumo de este tipo de fármacos es más fácil de detectar porque se declaran fácilmente en formulario previo al análisis. Pero el consumo de alcaloides, polifenoles, terpenoides y otros fitoquímicos provenientes de alimentos o medicinas naturales, también influyen en la síntesis de oxilipinas. Numerosos estudios han demostrado efectos de estos compuestos sobre la expresión y/o actividad de enzimas de la ruta biosintética de oxilipinas [136]. Esto es más difícil de tener en cuenta en un estudio. A su vez, también existen factores intrínsecos que afectan los niveles de oxilipinas. Se ha visto que la edad, sexo, polimorfismos genéticos influyen sobre los niveles/actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis. También, algunas patologías como diabetes tipo 2 y obesidad afectan los niveles de oxilipinas.

Además de todo lo antes mencionado, hay un aspecto menos estudiado que tiene que ver con la variación intra-individual, y en ese sentido se han reportado cambios temporales en los niveles de oxilipinas en plasma y orina. Éstos podrían estar influenciados por cambios inducidos por dieta, cambios en el metabolismo asociados al ritmo circadiano u otros. Por tanto, antes de avanzar al análisis de plasma de pacientes se diseñó un nuevo experimento con plasma proveniente de un mismo individuo “control sano” al que se le realizaron tres extracciones de sangre consecutivas, espaciadas por una semana, en iguales condiciones (10 hs de ayuno total, no NSAIDs en las últimas 48 hs, tres lunes consecutivos a la misma hora). Los resultados del análisis se muestran en la **figura 37**.



**Figura 37. Variación intra-individual de los niveles de oxilipinas en plasma.** Se muestran las concentraciones de oxilipinas detectadas en plasma de un mismo individuo sano en tres muestreos semanales. El análisis fue realizado con el plasma fresco el mismo día de la extracción de sangre. Cada barra representa los niveles relativos para cada oxilipina relativo a la semana 1. Los ácidos grasos precursores se muestran recuadrados en azul. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desvío estándar,  $n = 5$ .

A partir de estos resultados se observa que hay metabolitos cuya variación intra-individual es muy alta. Esto, de cierto modo, es esperable debido a los factores ambientales e intrínsecos mencionados anteriormente. En cuanto a los antecedentes reportados acerca de la variación intra-individual de oxilipinas se encuentra el trabajo de Ostermann *et al* [137], en donde analizan dos muestras de plasma de 18 individuos en ayunas espaciadas por 48 horas. En dicho trabajo reportan variaciones menores que en el presente trabajo y

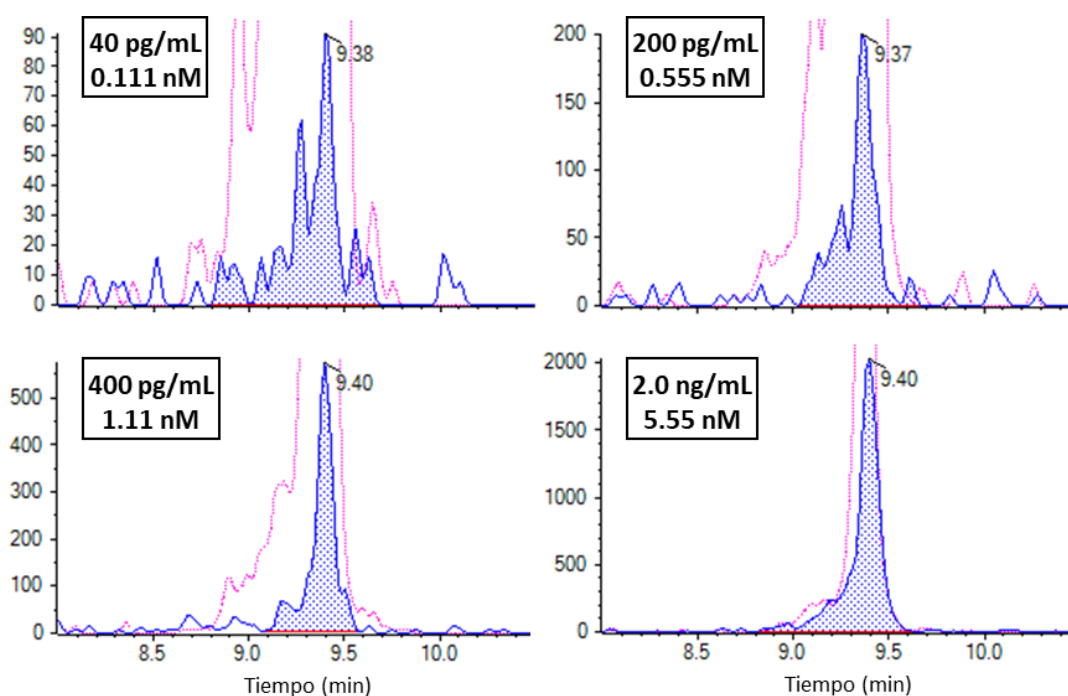
demuestran que, a excepción de algunas oxilipinas derivadas de LA y ALA, la variabilidad de los niveles encontrados es acorde a la variabilidad analítica. En nuestro caso la variación es mayor, pero es importante notar que el espaciado entre la toma de muestras de plasma también es mayor (una semana vs 48 hs en el trabajo de Ostermann).

Los resultados obtenidos muestran variaciones en distintos niveles. Por un lado hay mayores niveles de los ácidos grasos precursores AA, EPA y DHA en la semana 2, aunque esto no implica que los niveles de sus metabolitos derivados estén aumentados en esa semana. De hecho, no hay correlación entre los niveles de los precursores y los derivados. Un ejemplo claro es el que se puede observar para el caso de los derivados por vía 5-LOX. El 5-HETE presenta valores muy inferiores en la semana 3, comparado con semana 1, mientras que los niveles de LXA4 (que dependen de 15-LOX y 5-LOX) tienen un comportamiento opuesto. A su vez, los niveles de 4-HDoHE, derivado del DHA por 5-LOX permanecen incambiados a lo largo de las tres semanas. Sin lugar a dudas no se pueden hacer interpretaciones lineales a partir de estos resultados y resta profundizar en este tipo de análisis para validar la aplicabilidad de las mediciones de los niveles de estas oxilipinas como indicadores robustos de condiciones fisiológicas del organismo. En cualquier caso, según los resultados del presente experimento y para algunos metabolitos en particular, las concentraciones en condiciones patológicas tienen que alterarse mucho más para que puedan distinguirse de los niveles de una población control sana.

Otra de las observaciones importantes que se pueden realizar a partir de los resultados obtenidos de los experimentos anteriores, es la ausencia de SPM en las muestras de plasma control. No importa el método de almacenamiento, ni en las tres semanas en las que se extrajo sangre y se analizó en fresco, en ningún caso se detectaron SPM. Inmediatamente surge la pregunta, *¿por qué?* Para evaluar cómo influye el método de procesamiento y análisis de plasma sobre la detección de SPM, se diseñó un nuevo experimento. Primeramente se obtuvo una nueva muestra de plasma control y analizó en busca de SPM, corroborándose nuevamente que no se detecten estos mediadores. Luego, se preparó una mezcla de SPM conteniendo LXA4, LXB4, RvE1, RvD1, RvD2, RvD3, RvD5, MaR1, y PD1 y ésta fue adicionada al plasma en diferentes concentraciones que varían de 40 pg/mL a 2 ng/mL ( $\sim 0,10$  a  $\sim 5$  nM). Finalmente las muestras se procesaron y analizaron para la cuantificación



de oxilipinas. La detección de los SPM adicionados se verificó para todos los compuestos, aun en las concentraciones más bajas analizadas (0,1-0,5 nM) por lo que se verifica la capacidad del método para detectar SPM aún en el rango de bajo nM. Se puede concluir entonces que la no-detección de SPM en la muestra de plasma control sin suplementar se debe efectivamente a la ausencia de SPM (al menos en niveles mayores al LOD). En la **figura 38** se muestran los resultados (primarios) obtenidos para la suplementación con MaR1 como ejemplo (todos los demás se presentan en **anexo 4**).



**Figura 38. Suplementación de plasma con SPMs.** Muestras de plasma se suplementaron con distintas cantidades de una mezcla de SPM conteniendo LxA4, LxB4, RvE1, RvD1, RvD2, RvD3, RvD5, MaR1 y PD1, y fueron sometidas al análisis de oxilipinas por HPLC-MS/MS. En esta figura se muestran los cromatogramas obtenidos para cuatro muestras de plasma suplementadas con la MaR1 (azul). En el *inset* de cada cromatograma se muestra la concentración plasmática de la MaR1 luego de la suplementación. En rosado se muestra una sección del cromatograma del estándar interno de MaR1, (d5)-MaR1.

### Curvas de calibración

Como las oxilipinas presentes en plasma son diversas y los valores de concentración esperados varían entre rangos muy amplios, hay un desafío importante. En este caso se optó por una curva de calibración en rangos espaciados, y contemplando que los SPM (en menor

concentración que otros) utilizamos rangos más pequeños que permitieran definir concentraciones más bajas posibles. Se realizaron curvas de calibración en agua.

La adición de estándares a (un pool de) plasma, que lleve todo el proceso de preparación de muestras para poder considerar pérdidas durante el procesamiento y compensar el efecto matriz, es el mejor diseño para preparar curvas de calibración. Pero, aunque teóricamente es la mejor aproximación, un pool de plasma contendrá niveles endógenos de oxilipinas que deben ser considerados y sustraídos de la señal encontrada para cada muestra problema. Ahora bien, si los niveles en una muestra determinada son menores que los presentes en el pool usado para preparar la curva, esta aproximación no proveerá una cuantificación muy precisa, y este escenario es muy probable porque las variaciones interindividuales pueden ser muy grandes. Considerando entonces la gran variación inter-individuo para alguna de las oxilipinas, la probabilidad de este escenario es muy alta. Una forma de minimizar este problema sería obtener y usar un pool de plasma que sepamos tiene menores concentraciones endógenas de oxilipinas, pero eso ya excede nuestras posibilidades. Esto haría que el método se volviera muy costoso, en dinero y en tiempo (por la cantidad de puntos a utilizar y por lo rutinario).

Se resolvió entonces hacer una curva de calibración con el método del analito sustituto (estándares internos deuterados), en la que no se contempla la preparación de la muestra, pero que sí contempla la relación con el estándar interno que se agrega desde el inicio. En la **tabla 6** se muestran las curvas de calibración obtenidas.

**Tabla 6. Curvas de calibración empleadas para cada analito.** En los casos en que se detectaron oxilipinas para las que no se contaba con estándar con que elaborar curvas de calibración se empleó la curva de calibración del estándar con propiedades fisicoquímicas más similar (calibrador). T.I.: Término independiente.

Oxilipina	Estándar interno	pendiente	T.I.	r	Oxilipina	Calibrador
RvE1	(d4) RvE1	1.72330	0.00245	0.99944	13-HOTrE	13-HODE
6k PGF1 $\alpha$	(d4) 6k PGF1 $\alpha$	2.37925	0.01705	0.99581	9-HOTrE	9-HODE
PGF2 $\alpha$	(d4) PGF2 $\alpha$	2.22926	0.03296	0.99522	17-HETE	15-HETE
TxB2	(d4) TxB2	1.95717	0.01090	0.99575	5-iso PGF2 $\alpha$ VI	PGF2 $\alpha$
PGE2	(d4) PGE2	4.15027	0.02010	0.99817	8-iso PGF2 $\alpha$ III	PGF2 $\alpha$
PGD2	(d4) PGD2	6.92117	0.04975	0.99453	14,15-diHETrE	LTB4
RvD1	(d5) RvD1	0.58949	0.01048	0.99885	11,12-diHETrE	MaR1
RvD2	(d5) RvD1	0.30054	3.00E-04	0.99769	8,9-diHETrE	MaR1
RvD3	(d5) RvD1	0.65280	0.00114	0.99851	5,6-diHETrE	MaR1
12,13-diHOME	(d5) MaR1	31.28735	0.00461	0.99999	EPA	AA
9,10-diHOME	(d5) MaR1	225.14566	1.06863	0.99886	12-HEPE	18-HEPE
LTB4	(d5) MaR1	7.53503	-0.02112	0.99970	4-HDoHE	7-HDoHE
LXA4	(d5) MaR1	5.62113	-0.00230	0.99813	13-HDoHE	14-HDoHE
LXB4	(d5) MaR1	1.95314	0.00523	0.99763	20-HDoHE	16-HDoHE
PD1	(d5) MaR1	2.81574	-0.00558	0.99989	19,20-DiHDPA	MaR1
MaR1	(d5) MaR1	1.40761	0.00367	0.99998		
RvD5	(d5) MaR1	4.17593	0.00295	0.99971		
15-HETE	(d8) 15-HETE	1.52090	0.00216	0.99998		
15-oxoETE	(d8) 15-HETE	0.65030	0.00305	0.99994		
11-HETE	(d8) 15-HETE	4.16814	0.01445	0.99990		
18-HEPE	(d8) 15-HETE	0.46928	-0.00117	0.99953		
16-HDoHE	(d8) 15-HETE	2.03503	-0.00750	0.99956		
12-HETE	(d8) 12-HETE	1.88272	0.00637	0.99992		
12-oxoETE	(d8) 12-HETE	0.52842	-0.00159	0.99978		
8-HETE	(d8) 12-HETE	1.35855	0.00645	0.99980		
9-HETE	(d8) 12-HETE	0.38928	0.00131	0.99995		
14-HDoHE	(d8) 12-HETE	4.62304	-0.00544	0.99977		
AA	(d8) 5-HETE	0.04221	0.00541			
5-HETE	(d8) 5-HETE	1.25232	0.00505	0.99990		
5-oxoETE	(d8) 5-HETE	0.22993	-2.72E-04	0.99989		
DHA	(d8) 5-HETE	0.26642	0.01722			
7-HDoHE	(d8) 5-HETE	0.67953	3.73E-04	0.99990		

## Cuantificación

La cuantificación se basó entonces en una curva de calibración externa empleando 15 estándares internos marcados con isótopos pesados, que cubren todas las regiones cromatográficas. Tanto los estándares naturales como los marcados con isótopos pesados fueron empleados para elaborar las curvas de calibración, que se elaboraron en un rango de 500 a 2500 pg y graficando la relación de áreas de los picos (analito/estándar interno) en función de la relación de masas entre ambos (pg analito/pg estándar interno). Aquellas oxilipinas para las que no se dispone de estándares para elaboración de curvas de calibración, fueron cuantificadas a partir de las curvas de calibración de las oxilipinas más similares en estructura y tiempo de retención cromatográfico. En la **tabla 6** se muestra qué oxilipina fue utilizada como calibrador en estos casos.

## Determinación de LOD general

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para todos los metabolitos analizados se encuentran en la **tabla 7**. Junto con las curvas de calibración, se analizaron por HPLC-MS/MS muestras blanco (n=50-70) conteniendo solo el mix de estándar Interno y se obtuvo la desviación estándar del área ratio para cada analito. Los LOD y LOQ fueron calculados como la concentración correspondiente a la señal del blanco más 3 o 5 veces el desvío estándar del blanco, respectivamente. Para trasladar esto a LOD plasmático, se toma en cuenta el factor de dilución y el % de recuperación. El factor de dilución es de 10 ya que las oxilipinas derivadas de 500 µL de plasma son eventualmente evaporadas a sequedad y resuspendidas en 50 µL. Los porcentajes de recuperación para cada analito se asumen como el % de recuperación del estándar interno empleado como referencia.

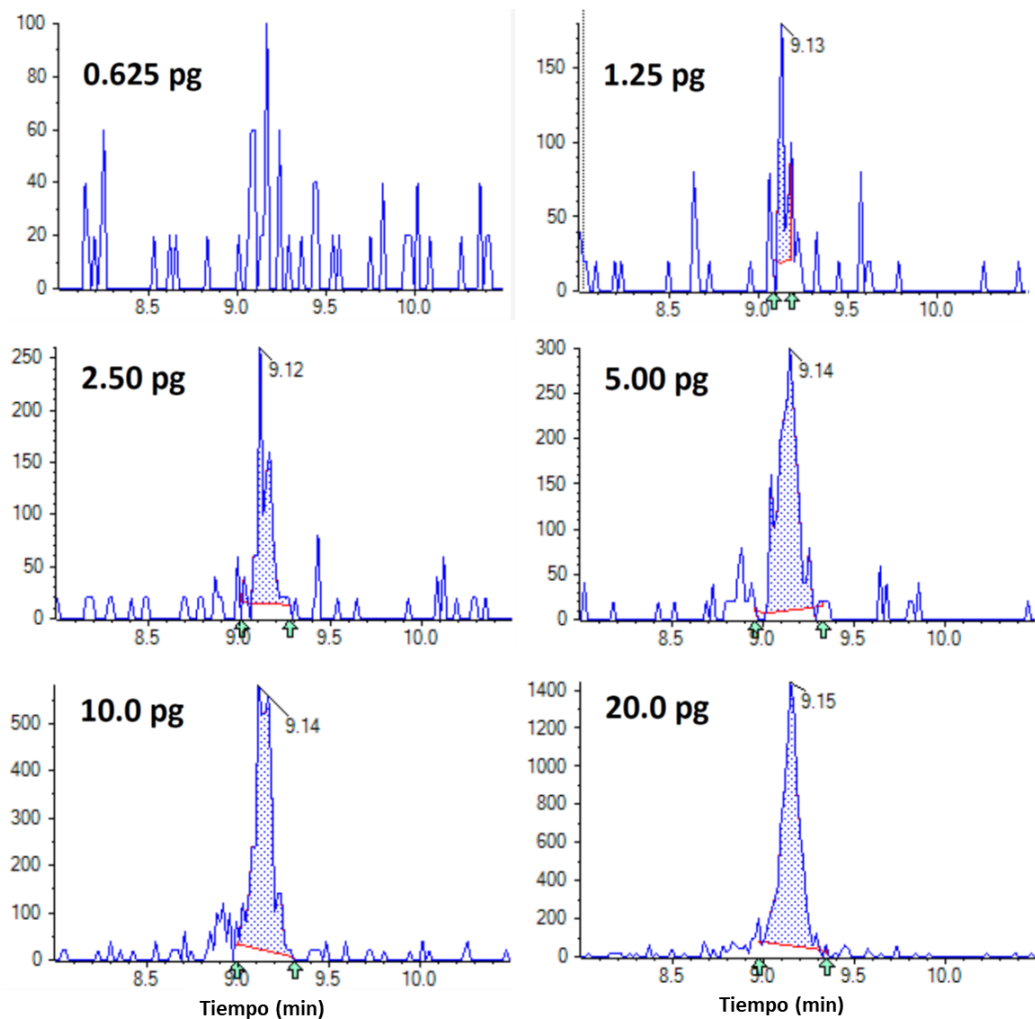
**Tabla 7.** Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ<sub>10</sub>, respectivamente) expresados como pg/mL de oxilipina en plasma, determinados a partir de las curvas de calibración y los porcentajes de recuperación a partir del procesamiento de las muestras.

Oxilipina	LOD (pg/mL plasma)	LOQ <sub>10</sub>	Oxilipina	LOD (pg/mL plasma)	LOQ <sub>10</sub>
6k PGF1α	1,10E+00	3,68E+00	13-HODE	5,11E+00	1,70E+01
RvE1	6,88E-01	2,29E+00	12,13-EpOME	1,05E+01	3,50E+01
TxB2	1,03E-01	3,44E-01	9-HODE	5,34E+01	1,78E+02
PGF2α	2,74E+01	9,13E+01	9,10-EpOME	6,60E+00	2,20E+01
8-iso PGF2α VI	2,89E+01	9,62E+01	13-oxoODE	2,00E+01	6,67E+01
5-iso PGF2αVI	5,17E+00	1,72E+01	9-oxoODE	1,16E+01	3,86E+01
PGE2	3,53E+00	1,18E+01	17-HETE	1,08E+00	3,61E+00
PGD2	9,75E-01	3,25E+00	15-HETE	1,09E+00	3,64E+00
LXB4	2,92E+00	9,72E+00	11-HETE	1,82E+00	6,06E+00
LXA4	5,77E-01	1,92E+00	8-HETE	1,90E+00	6,33E+00
RvD3	2,31E+00	7,69E+00	12-HETE	1,30E+00	4,33E+00
RvD2	1,36E+00	4,55E+00	9-HETE	1,62E+00	5,41E+00
RvD1	1,07E+01	3,56E+01	5-HETE	3,56E+00	1,19E+01
RvD5	6,21E-01	2,07E+00	15-oxoETE	3,96E+00	1,32E+01
MaR1	2,15E+00	7,16E+00	12-oxoETE	3,60E-01	1,20E+00
PD1	4,84E-01	1,61E+00	5-oxoETE	6,61E-01	2,20E+00
LTB4	5,88E-01	1,96E+00	20-HDoHE	2,21E-01	7,36E-01
12,13-DiHOME	3,73E-01	1,24E+00	16-HDoHE	2,56E-01	8,54E-01
9,10-DiHOME	1,94E+00	6,48E+00	13-HDoHE	7,92E-02	2,64E-01
14,15-DiHETrE	9,34E-02	3,11E-01	14-HDoHE	5,65E-02	1,88E-01
19,20-DiHDPA	1,45E+00	4,85E+00	10-HDoHE	1,29E-01	4,32E-01
11,12-DiHETrE	1,19E+00	3,98E+00	11-HDoHE	7,31E-02	2,44E-01
8,9-DiHETrE	1,62E+00	5,38E+00	7-HDoHE	1,80E+00	6,01E+00
9-HOTrE	4,36E+01	1,45E+02	4-HDoHE	1,68E+00	5,62E+00
13-HOTrE	2,51E+00	8,38E+00	AA	2,90E+02	9,68E+02
18-HEPE	1,35E+00	4,51E+00	DHA	8,29E+01	2,76E+02
12-HEPE	1,22E+00	4,05E+00	EPA	5,75E+01	1,92E+02

### Determinación de LOD para SPM

Para determinar el LOD y LOQ de los SPM también se empleó otro protocolo. Con un mix de estándares conteniendo todos los SPM disponibles en nuestro laboratorio se prepara un mix a baja concentración (los valores más bajos de la curva de calibración) y luego se diluyen al medio con MeOH varias veces (7). Luego se les agrega una mezcla de estándares internos y se analiza por HPLC-MS/MS. Luego de obtenidos los resultados del análisis se procesa con un

algoritmo de software *MultiQuant* denominado *Signal Finder algorithm* (ABSciex) para la integración de los picos para la transición más intensa de cada SPM. Luego, LOD y LOQ se definió como la masa (pg) a la que la relación señal ruido sea igual o mayor a 3 o 5 respectivamente (**figura 39, tabla 8, y anexo 5**).



**Figura 39. Determinación de LOD y LOQ para SPMs.** Una mezcla de estándares conteniendo todos los SPM disponibles a baja concentración se diluyó en MeOH varias veces previo al agregado de un mix de estándares internos y el análisis por HPLC-MS/MS. En la figura se representan los cromatogramas obtenidos para la transición más sensible correspondiente a MaR1 ( $m/z$  359/177) luego de la inyección de cantidades crecientes del estándar como se indica en cada panel. Posteriormente se integraron los picos cromatográficos empleando el algoritmo *Signal Finder* (MultiQuant 2.1, ABSciex). El LOD y LOQ se determinaron como la masa (pg) a la que la relación S/R es igual o mayor que 3 o 5, respectivamente.

**Tabla 8.** Curvas de calibración y valores de LOD y LOQ para todos los SPM y oxilipinas relacionadas analizadas por HPLC-MS/MS.

SPM	Estándar interno	pendiente	Término independiente.	r	LOD (pg)	LOQ (pg)
LXA4	(d5) MaR1	5.62113	-0.00230	0.99813	1.25	2.5
LXB4	(d5) MaR1	1.95314	0.00523	0.99763	10	20
RvE1	(d4) RvE1	1.72330	0.00245	0.99944	10	20
18-HEPE	(d8) 15-HETE	0.46928	-0.00117	0.99953	5	5
PD1	(d5) MaR1	2.81574	-0.00558	0.99989	2.5	5
MaR1	(d5) MaR1	1.40761	0.00367	0.99998	2.5	5
RvD1	(d5) RvD1	0.58949	0.01048	0.99885	1.25	2.5
RvD2	(d5) RvD1	0.30054	3.00E-04	0.99769	2.5	10
RvD3	(d5) RvD1	0.65280	0.00114	0.99851	2.5	5
RvD5	(d5) MaR1	4.17593	0.00295	0.99971	1.25	2.5
7-HDoHE	(d8) 5-HETE	0.67953	3.73E-04	0.9999	1.25	2.5
14-HDoHE	(d8) 12-HETE	4.62304	-0.00544	0.99977	0.313	0.625
16-HDoHE	(d8) 15-HETE	2.03503	-0.00750	0.99956	0.625	1.25

## Resultados del objetivo específico 2

*Determinar la concentración de oxilipinas en muestras de plasma de pacientes con ELA y voluntarios sanos, y analizar la posible correlación entre los niveles de oxilipinas en plasma de pacientes con ELA y sus parámetros clínicos*

### Análisis de plasma

Se obtuvieron muestras de plasma de pacientes con ELA y voluntarios sanos provenientes del hospital de Bellvitge, que se conservaron a -80 °C y fueron enviadas a Uruguay en hielo seco. Un total de 78 muestras de plasma de pacientes con ELA y 9 muestras de plasma de voluntarios aparentemente sanos fueron analizadas con el método de HPLC-MS/MS (MRM en múltiples períodos) en busca de oxilipinas. En la **tabla 9** se muestran las características de la población muestreada.

**Tabla 9. Características de los pacientes y voluntarios de grupo control.**

	ELA (n=78)	Control (n 9)
<b>Sexo</b>		
Femenino	31	7
Masculino	47	2
<b>IMC<sup>a</sup></b>	25.2 (± 3.8)	23.2 (± 1.8) <sup>b</sup>
<b>Fenotipo</b>		
Espinal	38	-
Bulbar	28	-
Otro	8	-
<b>Edad</b>		
al inicio de síntomas (años) <sup>a</sup>	62.2 (± 11.8)	-
a la toma de muestra (años) <sup>a</sup>	63.8 (± 11.1)	47.3 (± 15.8)
<b>Tiempo desde inicio de síntomas (meses)<sup>a</sup></b>	23.1 (± 30.9)	-
<b>ALSFRS-r slope en última visita (n=65)</b>	1.35 (± 1.61)	-
Progresión lenta (SP)	26	-
Progresión normal (NP)	17	-
Progresión rápida (FP)	22	-

<sup>a</sup> Los valores se muestran como promedio ± desvío estándar. <sup>b</sup>Datos obtenidos para n=5 de los voluntarios sanos

Una vez aplicado el método de HPLC-MS/MS, se calcularon las concentraciones de las oxilipinas detectadas a partir de las áreas de los picos cromatográficos, la señal de los



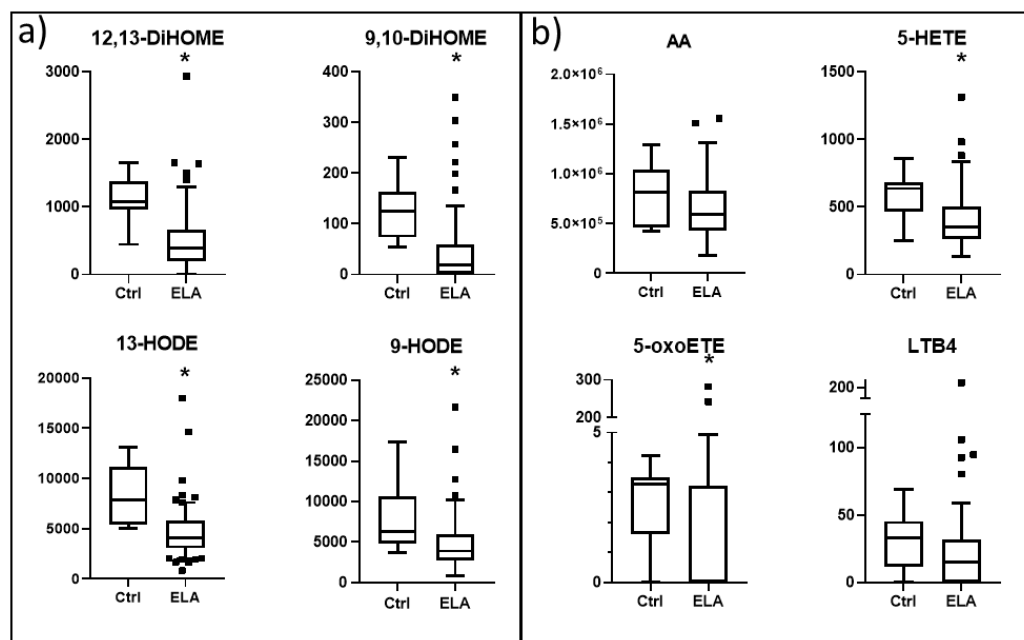
distintos estándares internos y las curvas de calibración realizadas. La concentración plasmática de todas las oxilipinas detectadas se muestra en la **tabla 10**. Se realizó un análisis comparativo entre el grupo control y los pacientes (Mann-Whitney) y los resultados también se muestran en la **tabla 10**.

**Tabla 10.** Concentración plasmática de oxilipinas en grupo ELA y Control determinadas por análisis de HPLC-MS/MS.

Oxilipina	Control (n=9)		ELA (n=74)		valor p <sup>b</sup>
	mediana (pg/mL)	percentil <sup>a</sup>	mediana (pg/mL)	percentil <sup>a</sup>	
<b>Metaboloma LA (18:2n-6)</b>					
* 12,13-DiHOME	1084	(969,3 ; 1381)	389	(201 ; 666)	0,0002
* 9,10-DiHOME	126	(73,1 ; 163)	19,4	(1,20 ; 60,0)	<0,0001
* 13-HODE	7865	(5375 ; 11132)	4049	(3044 ; 5773)	0,0001
* 9-HODE	6332	(4769 ; 10706)	3881	(2775 ; 5951)	0,0073
<b>Metaboloma AA (20:4n-6)</b>					
AA	811395	(457556 ; 1046666)	588400	(429801 ; 825059)	0,1601
TxB2	440	(46,9 ; 614)	125	(46,6 ; 412)	0,2800
PGE2	0	(0 ; 7,73)	0	(0 ; 0)	0,6111
PGD2	0	(0 ; 0)	0	(0 ; 0)	0,9029
isoPGF2	0	(0 ; 0)	0	(0 ; 443)	0,1935
* 5-HETE	636	(469 ; 685)	350	(261 ; 505)	0,0044
8-HETE	124	(83,0 ; 137)	84,7	(58,7 ; 117)	0,0531
* 11-HETE	191	(109 ; 224)	117	(87,9 ; 167)	0,0459
12-HETE	3144	(2673 ; 4431)	1616	(771 ; 4125)	0,0550
15-HETE	247	(181 ; 271)	187	(139 ; 247)	0,1312
* 5-oxoETE	3,29	(1,61 ; 3,52)	0	(0 ; 3,22)	0,0089
12-oxoETE	36,4	(0 ; 59,8)	0	(0 ; 42,3)	0,4171
15-oxoETE	67,9	(0 ; 119)	37,0	(27,7 ; 63,5)	0,5207
14,15-DiHETrE	379	(321 ; 446)	320	(269 ; 383)	0,1064
LTB4	33,2	(11,9 ; 45,5)	14,9	(0 ; 32,1)	0,0741
<b>Metaboloma EPA (20:5n-3)</b>					
EPA	198372	(121928 ; 361172)	208323	(146448 ; 292417)	0,9713
12-HEPE	117	(90,1 ; 169)	92,7	(0 ; 157)	0,1816
<b>Metaboloma DHA (22:6n-3)</b>					
DHA	329956	(189149 ; 560821)	376709	(261062 ; 529711)	0,8010
4-HDoHE	260	(158 ; 297)	196	(147 ; 283)	0,4142
7-HDoHE	75,6	(0 ; 111)	69,9	(0 ; 102)	0,8521
10-HDoHE	27,2	(20,0 ; 33,9)	24,3	(18,8 ; 31,1)	0,5217
11-HDoHE	30,0	(19,9 ; 39,2)	23,9	(16,9 ; 30,1)	0,1384
13-HDoHE	87,4	(45,3 ; 125)	56,1	(33,9 ; 81,3)	0,0675
* 14-HDoHE	117	(86,5 ; 222)	78,5	(41,1 ; 127)	0,0381
16-HDoHE	66,9	(37,5 ; 102)	56,1	(43,4 ; 84,9)	0,5114
20-HDoHE	31,2	(10,7 ; 44,0)	23,5	(16,1 ; 35,9)	0,6488
19,20-DiHDPA	160	(149 ; 201)	157	(136 ; 193)	0,4929

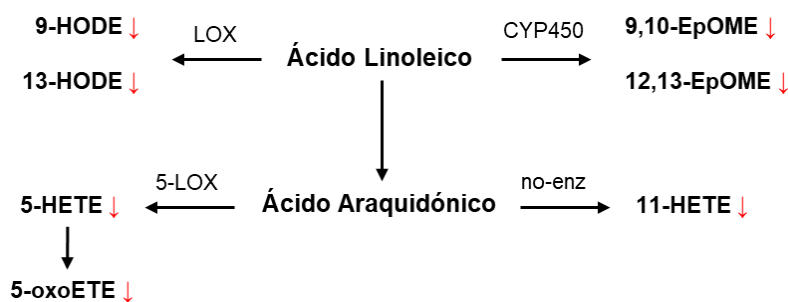
(\*) Oxilipinas con diferencias significativas entre grupo ELA y control según test Mann-Whitney. <sup>a</sup> se muestra el percentil (25% ; 75%); <sup>b</sup> valor derivado del test Mann-Whitney.

Los metabolitos derivados del LA en pacientes con ELA muestran una disminución significativa cuando se comparan con el grupo control (**tabla 10 y figura 40, panel a**). Particularmente aquellos derivados de vía LOX muestran una disminución del 50% mientras que los derivados de vía CYP450 muestran una reducción aun mayor (~3-9 veces). En cuanto a la vía del AA, primeramente se destaca que no existen diferencias para el AA entre ambos grupos. Sin embargo, algunos de los derivados de la vía de 5-LOX, tales como el 5-HETE y 5-oxoETE muestran una disminución significativa en pacientes con ELA mientras que otros, tales como el LTB<sub>4</sub>, presentan una disminución aunque no se alcanza la significancia estadística (valor  $p = 0,07$ ) (**figura 40, panel b**). De forma similar el 12-HETE también muestra una disminución aunque no significativa. En cuanto a los derivados de autooxidación u oxidación no enzimática, los isoprostanos de la familia F<sub>2</sub> $\alpha$  fueron detectados solo en 17 pacientes. Es interesante notar que el 11-HETE se detectó en todas las muestras mostrando una disminución significativa en los pacientes con ELA. Como resultado de este análisis se muestra una representación esquemática de las vías biosintéticas de oxilipinas con mayor alteración en plasma de pacientes con ELA respecto a voluntarios sanos (**figura 41**).



**Figura 40. Concentración plasmática de oxilipinas seleccionadas en grupos Control y ELA.** Se muestra un gráfico Tukey para la concentración plasmática de las oxilipinas indicadas expresada en pg/mL en grupos control (Ctrl) y ELA. **a)** Se muestran los derivados de LA que presentan una disminución significativa en pacientes con ELA respecto a grupo control. **b)** Se muestran los niveles del ácido araquidónico y metabolitos derivados por vía 5LOX. \* valor  $p < 0,05$ , *test* Mann-Whitney.

No se detectan diferencias significativas en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres de la familia omega 3, específicamente en EPA y DHA. Los derivados de omega 3 detectados fueron fundamentalmente los monohidroxilados y no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos.



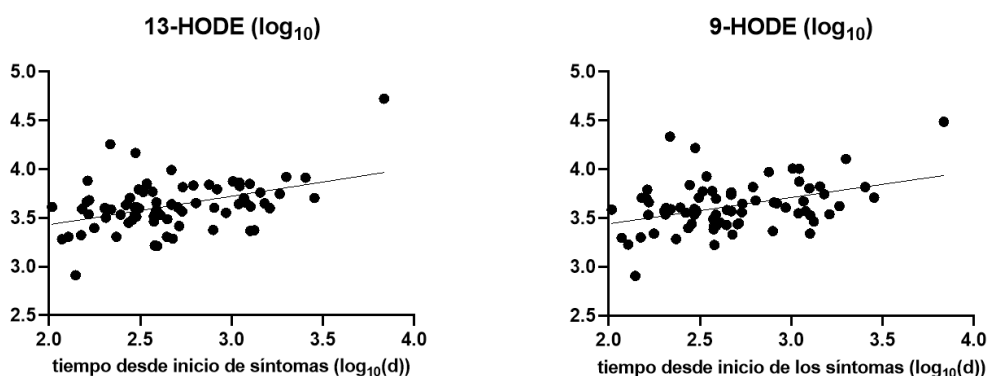
**Figura 41. Vías metabólicas alteradas en ELA.** Se muestra un esquema en el que se representan las rutas biosintéticas de oxilipinas alteradas en ELA. Los metabolitos con alteraciones significativas comprenden vías LOX, COX y oxidación no enzimática.

A pesar de que los SPM no fueron detectados en plasma, se observó que los niveles de 14-HDoHE, uno de los monohidroxilados del DHA más abundantes detectados en plasma y un marcador clave de la activación de biosíntesis de maresinas, se vieron reducidos significativamente en pacientes con ELA. Esto podría sugerir que los pacientes con ELA fallan en la activación del cambio de mediadores lipídicos hacia aquellos que promueven la resolución de la inflamación, al menos en tejidos periféricos.

Posteriormente, en colaboración con el Dr. Hugo Naya (Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur-Montevideo y Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, UdelaR) se realizó un análisis de múltiples variables. Considerando las oxilipinas detectadas, se realizaron análisis de múltiples variables; escalamiento multidimensional métrico y no métrico, clusterización jerárquica, clusterización k-medias, y análisis discriminante, en busca de diferencias entre el grupo control y el grupo ELA. Sin embargo fue imposible discriminar entre pacientes y controles (datos no mostrados). También se realizaron pruebas comparativas entre subgrupos de ELA teniendo en cuenta el fenotipo (bulbar o espinal), índice de progresión, sexo, y otros parámetros clínicos y no se encontraron diferencias significativas en ningún caso.

## Análisis de correlación

Posteriormente se analizaron los valores obtenidos únicamente para las muestras de plasma de pacientes con ELA, para evaluar la correlación entre metabolitos y parámetros clínicos. Se realizó una transformación logarítmica de los valores de concentración y se realizó un test de correlación de Pearson evaluando la correlación entre la concentración de oxilipinas y el fenotipo, edad, índice de progresión y tiempo desde inicio de los síntomas con corrección de Benjamini-Hochberg para testeos múltiples.



**Figura 42. Correlación entre metabolitos del LA y duración de la enfermedad.** Se realizaron análisis de correlación con el *test* de Pearson con ajuste de valores p (Benjamini-Hochberg) para todas las oxilipinas y los parámetros de la clínica. Se muestran los gráficos de correlación para los niveles plasmáticos de los derivados de LA, 13-HODE y 9-HODE, con quienes se encontró una correlación positiva con la duración de la enfermedad en los pacientes con ELA, expresada como días desde el inicio de los síntomas (escala logarítmica). (13-HODE,  $R^2 = 0.1826$ ; 9-HODE,  $R^2 = 0.1565$ )

Como se muestra en la **figura 42**, los niveles plasmáticos de los derivados de LA, 13-HODE y 9-HODE presentan una correlación positiva con la duración de la enfermedad (tiempo desde inicio de los síntomas a la extracción de sangre). No se encontró correlación entre la concentración plasmática del resto de las oxilipinas evaluadas y los demás parámetros que fueron aportados de la clínica.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se desarrolló un método HPLC-MS/MS [138,139], inicialmente basado en reportes previos [67,71,130,134,136], con el fin de estudiar los perfiles de oxilipinas en plasma en pacientes con ELA y voluntarios sanos. Este método comprende el procesamiento de muestras mediante extracción en fase sólida, cromatografía líquida en fase reversa y detección por espectrometría de masas en tándem. El análisis realizado sobre las muestras de pacientes con ELA permitió identificar nuevos derivados lipídicos con potencial biomarcador de la enfermedad en etapas tempranas.

Un desequilibrio en los mediadores lipídicos proinflamatorios, antiinflamatorios y proresolutivos podría desempeñar un papel fundamental en la neuroinflamación asociada a la enfermedad de ELA. A pesar de esto, hasta donde sabemos, no se ha realizado ningún enfoque de "(oxi)lipidómica" en muestras humanas de pacientes con ELA. Los reportes previos sobre el análisis de eicosanoides en muestras de pacientes con ELA mostraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de PGE2 [11] y en el tejidos *post mortem* de médula espinal y corteza cerebral [12,13]. Esto no se observó en las muestras analizadas en el presente trabajo, lo que enfatiza, entre otras cosas, la importancia de contemplar el fenotipo o las condiciones de aparición de la enfermedad en los pacientes analizados. Es decir, las muestras en trabajos anteriores procedían de tejidos *post mortem* o de pacientes con ELA en estadios avanzados, mientras que el presente análisis incluyó pacientes con solo 1 a 3 años de transcurso de la enfermedad (a partir del inicio de los síntomas). Por otra parte, es importante tener en cuenta que las determinaciones reportadas de oxilipinas fueron obtenidas por inmunoensayos mientras que aquí se realizó un análisis LC-MS con mayor especificidad y sensibilidad. Los inmunoensayos, como se mencionó en la sección "introducción", presentan ciertas desventajas, entre las que se encuentra la potencial presentación de reactividad cruzada y por tanto podrían estar detectándose más de una oxilipina en esos análisis.

En este trabajo de doctorado se reveló una disminución significativa de las oxilipinas derivadas de LA en pacientes con ELA. La ruta biosintética de los monohidroxiderivados comprende la acción de la 12-LOX, que oxida al LA en el C9, o la acción de la 15-LOX1, que oxida en el C13, dando como resultado la formación de los ácidos 9-hidroperoxi-octadecadienoico (9-HpODE) y 13-HpODE, respectivamente. Estos peroxiderivados son

inestables y son reducidos a la forma hidroxilo por las glutatión peroxidasas formando 9-HODE y 13-HODE [140]. El papel biológico de estos metabolitos no está completamente dilucidado; sin embargo, entre otros derivados de LA, se ha informado que los HODE son reguladores predominantes de la inflamación en diferentes sistemas celulares [140]. En concreto, los HODEs están implicadas en la regulación de la adhesión celular a la pared vascular en un contexto inflamatorio, mostrando efectos beneficiosos en la regulación a la baja de la adhesión celular. Se ha propuesto que 13-HODE desempeña un papel en la regulación negativa de la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales (a diferencia de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, IL-1 $\alpha$ ). Además, también se ha demostrado que los HODEs disminuyen la producción de PGE2 por parte de las células endoteliales [140]. Los resultados obtenidos en este trabajo están en línea con los reportados por Fernandez-Eulate *et al* [120], quienes describen una disminución de ambos isómeros HODEs en pacientes con ELA en comparación con un grupo Control. En ese trabajo, los autores tribuyen esta diferencia al efecto de estatinas hipolipemiantes; sin embargo, en nuestro caso no tenemos información acerca del tratamiento con estatinas para los integrantes del grupo de pacientes con ELA. Por lo tanto, se necesita investigar más para confirmar la alteración en los niveles plasmáticos de HODEs en pacientes con ELA y su papel en la inflamación periférica. Vale la pena mencionar que, contrariamente a los resultados obtenidos para los pacientes con ELA, los HODEs están aumentados en la sangre de los pacientes con enfermedad de Alzheimer y los autores los sugirieron como un biomarcador potencial para el diagnóstico de dicha enfermedad [141].

El LA puede ser metabolizado por vías CYP y convertido en epóxidos 9,10-EpOME y 12,13-EpOME, también conocidos como leucotoxina e isoleucotoxina, respectivamente. Estos epóxidos luego son metabolizados principalmente por la sEH a sus correspondientes dioles, 9,10-DiHOME y 12,13-DiHOME, denominados leucotoxina diol e iso-leucotoxina diol, respectivamente [51,142]. Se han atribuido varias funciones biológicas a estos derivados de CYP. Desde su primera descripción como toxinas producidas por los leucocitos (que le dieron su nombre) se han atribuido muchas funciones a EpOMEs y DiHOMEs. En cuanto a la inflamación y la respuesta inmunitaria, se ha demostrado que los neutrófilos producen DiHOMEs y estos metabolitos actúan como quimioatrayentes de otros neutrófilos a dosis relativamente más bajas ( $\sim 10$  nM) [51]. En el rango micromolar, se ha demostrado que inhibe el estallido respiratorio de neutrófilos en cultivos celulares, aunque no comparte el

mecanismo exacto de LXA4. Estas observaciones sugieren que la biosíntesis de DiHOME puede servir como un tipo de retroalimentación negativa que limita la inflamación; sin embargo, estos metabolitos no se consideran mediadores favorables a la resolución de la inflamación. Investigaciones recientes revelaron una función adicional para los DiHOMEs. Se encontró que el ejercicio físico (ciclismo) provoca un aumento en los niveles plasmáticos de DiHOMEs en humanos y posteriormente se reducen a la línea de base después de que termina el ejercicio [143]. Además, los HODE se correlacionaron positivamente con los niveles post ejercicio de 12,13-DiHOME, junto con los isoprostanos, lo que llevó a proponerlos como biomarcadores del estrés oxidativo [143]. Además, se encontró que los sujetos rutinariamente activos tienen niveles significativamente más altos de 12,13-DiHOME antes del ejercicio en comparación con los sujetos que no realizan ejercicio físico regularmente [51,144]. Entonces nuestros resultados, que muestran una disminución de DiHOMEs en pacientes con ELA, podrían revelar una activación disminuida de la regulación inflamatoria por retroalimentación negativa o simplemente un indicador de la actividad física disminuida en pacientes con ELA.

Nuestros resultados muestran que los pacientes con ELA tienen niveles plasmáticos de HODEs y DiHOMEs disminuidos en comparación con las muestras de control. Sin embargo, se encuentra que los HODEs correlacionaron positivamente con el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad, lo que requiere más investigación. También es importante destacar para las futuras investigaciones, la importancia de tener mejores registros de los individuos cuyas muestras son analizadas. La composición de la dieta, actividad física, consumo de fármacos, y las condiciones de toma de muestras y conservación, son parámetros que tienen incidencia en los niveles de oxilipinas y deben ser contemplados en los análisis.

En cuanto a los SPM, como fuera demostrado para otras enfermedades neurodegenerativas, p.ej., la enfermedad de Alzheimer [145] y la esclerosis múltiple [139,146], la falta de activación de los programas de resolución de la inflamación se presenta como una disminución en los niveles de SPM, lo que conduce a la inflamación sostenida. Recientemente, en un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Rubèn López-Vales de la Universidad Autónoma de Barcelona (ver **anexo 8**), se aplicó el método de HPLC-MS/MS

(empleando el método de análisis *sMRM Pro*) desarrollado en el presente trabajo de tesis, sobre un *set* de muestras de pacientes con esclerosis múltiple. A partir de los resultados obtenidos se reportó que la producción de los principales mediadores lipídicos que activan los programas de resolución de la inflamación es deficiente en el suero y en las lesiones cerebrales activas de pacientes con esclerosis múltiple, así como en la médula espinal de ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental [139]. Además, estas observaciones estuvieron acompañadas de un aumento en los mediadores lipídicos proinflamatorios derivados de AA, como LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> y TXB<sub>2</sub>, lo que enfatiza un desequilibrio entre los mediadores lipídicos proinflamatorios y proresolutivos [139]. Por tanto, teniendo en cuenta las características de la ELA, inicialmente consideramos que un escenario similar podría ser responsable del componente inflamatorio persistente en dicha enfermedad. Sin embargo, a pesar de nuestro esfuerzo, no se detectaron SPM en los grupos Control o ELA. Para descartar fallas en el método de detección, se analizaron muestras de plasma enriquecidas con una mezcla de SPM y se verificó que la detección es posible para todas las SPM, incluso en valores de concentración de pg/mL (**figura 39** y **anexo 4**). Estos valores son similares (o incluso más bajos) a los reportados para SPM en plasma, que varían en un rango de 1 a 2000 pg/mL en algunos reportes [126,127], por lo que el método de detección desarrollado debería ser capaz de detectar los SPM. Por otro lado, existen otros trabajos en los que declaran que los niveles se encontrarían por debajo de los LOD en individuos sanos [71].

El tema de los mediadores lipídicos de la resolución de la inflamación (SPM) requiere una discusión aparte, debido a que en la actualidad se encuentra en pleno debate. Se trata de un área de investigación relativamente joven, habiéndose cumplido menos de cuatro décadas desde el primer trabajo en que se describen trihidroxi-tetraenos (lipoxinas) producidos por leucocitos humanos en 1984 [147]. Desde entonces, se ha descrito a la resolución de la inflamación como parte de un proceso activo que conecta la respuesta inicial del sistema inmune innato con la biosíntesis de SPM, incluyendo resolvinas, protectinas, maresinas, así como los nuevos conjugados cisteinil-SPM [16]. Luego de las lipoxinas derivadas del AA, aparecieron otras SPM. La primer resolvina biosintetizada de EPA se aisló y reportó junto con su elucidación funcional en el año 2000 usando un diseño experimental con exudados inflamatorios [148]. Al día de la fecha, se han elucidado cuatro potentes resolvinas derivadas de EPA [149]. Las derivadas de DHA se elucidaron en los años siguientes y reportaron en



[150,151]. La serie RvD y PD sintetizadas de DHA mostraron inicialmente reducir la inflamación (peritonitis, inflamación neuronal (microglía) y contra-regular las citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y así promover la resolución de la inflamación. A continuación, el grupo de Serhan sistemáticamente determinó la asignación estereoquímica de cada SPM incluyendo protectinas y sus epímeros *aspirin triggered* [152,153], luego reportaron el descubrimiento y biosíntesis de maresinas a partir de macrófagos [154]. En la actualidad existen diversas publicaciones reportando la potente acción antiinflamatoria y proresolutiva, así como la producción de SPM en muchos modelos de enfermedad por investigadores de todo el mundo que confirman y expanden el conocimiento acerca de las potentes funciones de los SPM y su potencial rol como terapéuticos. Tal es así, que si se realiza una búsqueda de la palabra “lipoxin” en el PubMed, se identifican más de 2200 artículos y existen al menos tres compañías biotecnológicas planeando ensayos clínicos con moléculas sintéticas diseñadas para restaurar o potenciar la habilidad natural del organismo para activar el programa de resolución de la inflamación [155]. Un consenso inicial [156] reportado sirvió para definir y subrayar el potencial de este nuevo campo de resolución con impacto en la medicina moderna y cirugía [156]. La aparición de nuevos conceptos y nuevos mediadores dentro del terreno de la fase de resolución que activan programas endógenos de resolución y promueven la regeneración tisular han permitido la generación de nuevos campos de la fisiología y farmacología de la resolución [127].

Pero a medida crece el número de artículos, revisiones y proyectos de investigación con el foco en estos mediadores, también crece el número de escépticos. En los últimos años también se ha vuelto frecuente encontrar artículos en los que la detección de SPM en muestras biológicas (principalmente humanas) no ha sido posible realizarse [71,126,157–163]. Por ejemplo, se han reportado valores de concentración de SPM en plasma de individuos sanos oscilan entre 1 y 2000 pg/mL en algunos informes [126,127] mientras que otros han informado niveles <LOD luego de analizar muestras similares [71]. Se han reportado dificultades en los análisis de SPM (consultar la revisión de P. Calder *et al* [157] para ver ejemplos de problemas de cuantificación de SPM). A pesar del continuo esfuerzo de laboratorios individuales y las sociedades científicas internacionales, todavía no hay un consenso sobre los procedimientos de preparación de muestras y/o el estándares de análisis de rutina que permitan una alta confianza en los valores absolutos de la concentración de

oxilipinas [136,164]. Entonces, el análisis *per se* y la comparación entre laboratorios sigue siendo un desafío.

No obstante, la comparación de mediciones intra-laboratorio, es decir, entre nuestros grupos ELA y Control, es confiable con respecto a la validación del método. Incluso teniendo en cuenta las observaciones mencionadas anteriormente, se debe esperar que la concentración de SPM en plasma aumente ante los desafíos de la inflamación. Sin embargo, las muestras de plasma de pacientes con ELA en el presente trabajo, se comportan de manera similar al grupo Control, siendo imposible detectar SPM. La falta de detección de SPM podría indicar un programa de resolución defectuoso de la inflamación sistémica en la ELA. Además, en línea con esta interpretación, se detectó una disminución significativa en los niveles de 14-HDoHE, que es precursor de MaR1, en los pacientes con ELA. Por tanto, aunque no está completamente demostrada, la hipótesis de que se debe activar un programa de resolución en el estado inflamatorio de la ELA requiere más investigación.

Para profundizar un poco más en la discusión de los análisis de mediadores lipídicos de la inflamación, y en específico los SPM, se puede tomar como disparador un artículo de este año (2022) publicado en la revista *Frontiers in Pharmacology* [123]. Se trata de un artículo de revisión, elaborado por un grupo internacional de 18 especialistas en análisis de lípidos, que argumentan que los estudios en los que se identifican SPM en humanos los encuentran en niveles tan bajos que es muy improbable que tengan acción biológica. No es ésta la única crítica, ya que también se cuestionan las rutas biosintéticas propuestas, los mecanismos de acción, la correlación de niveles de SPM con el curso temporal de la inflamación, entre otras. Quizás la crítica más dura y concreta, tiene que ver con los protocolos de análisis que Serhan y sus colaboradores han desarrollado y empleado para detectar y cuantificar SPM en muestras biológicas; no se cumplen estándares de análisis [123,165]. Sobre estas críticas, que están estrechamente relacionadas con el trabajo de la presente tesis, se desarrolla un poco más en las siguientes líneas.

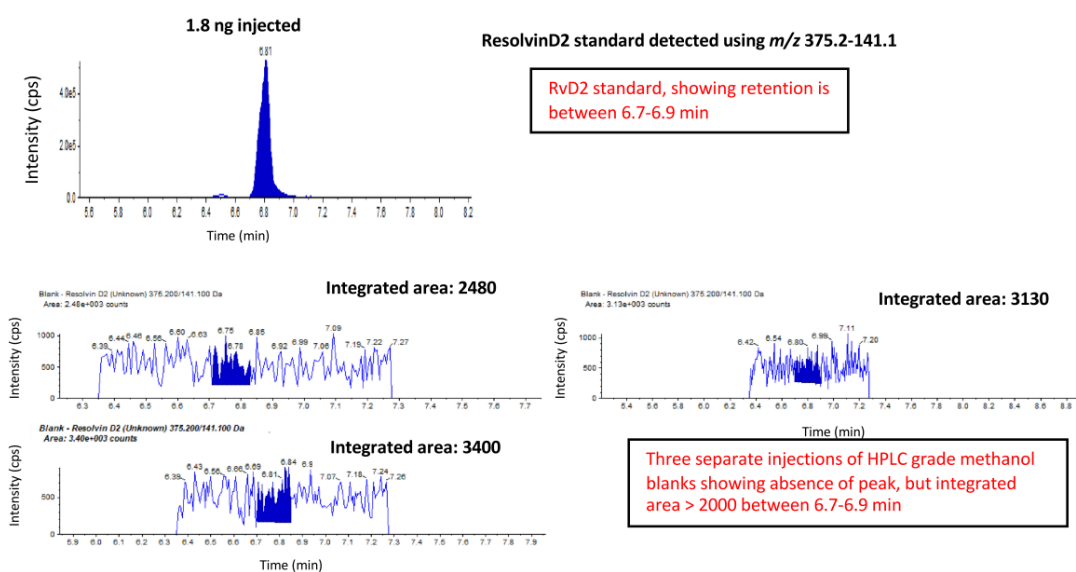
Asociado al anterior, se publicó también un artículo *preprint* de Valerie O'Donnell *et al* [165] en el que se enuncian asuntos serios. Se trata de un trabajo en el que analizan con profundo detalle algunos de los resultados que publican Gómez, Dalli y Serhan en 2020 [166], con los que identifican una lipoxina, una resolvina y una maresina en suero de pacientes con artritis

reumatoidea, y proponen que los SPM pueden ser utilizadas como biomarcadores para evaluar la respuesta de los pacientes a fármacos. En este *preprint* se analizan los métodos ensayados por Serhan *et al*, los datos suplementarios (primarios del análisis de SPM) y las conclusiones que se desprenden de éstos. Específicamente, declaran que la cuantificación de múltiples SPM está basada en picos cromatográficos débiles o incluso ausentes en los cromatogramas y que los espectros de masas extraídos de los registros no concuerdan con los estándares de SPM que se presentan.

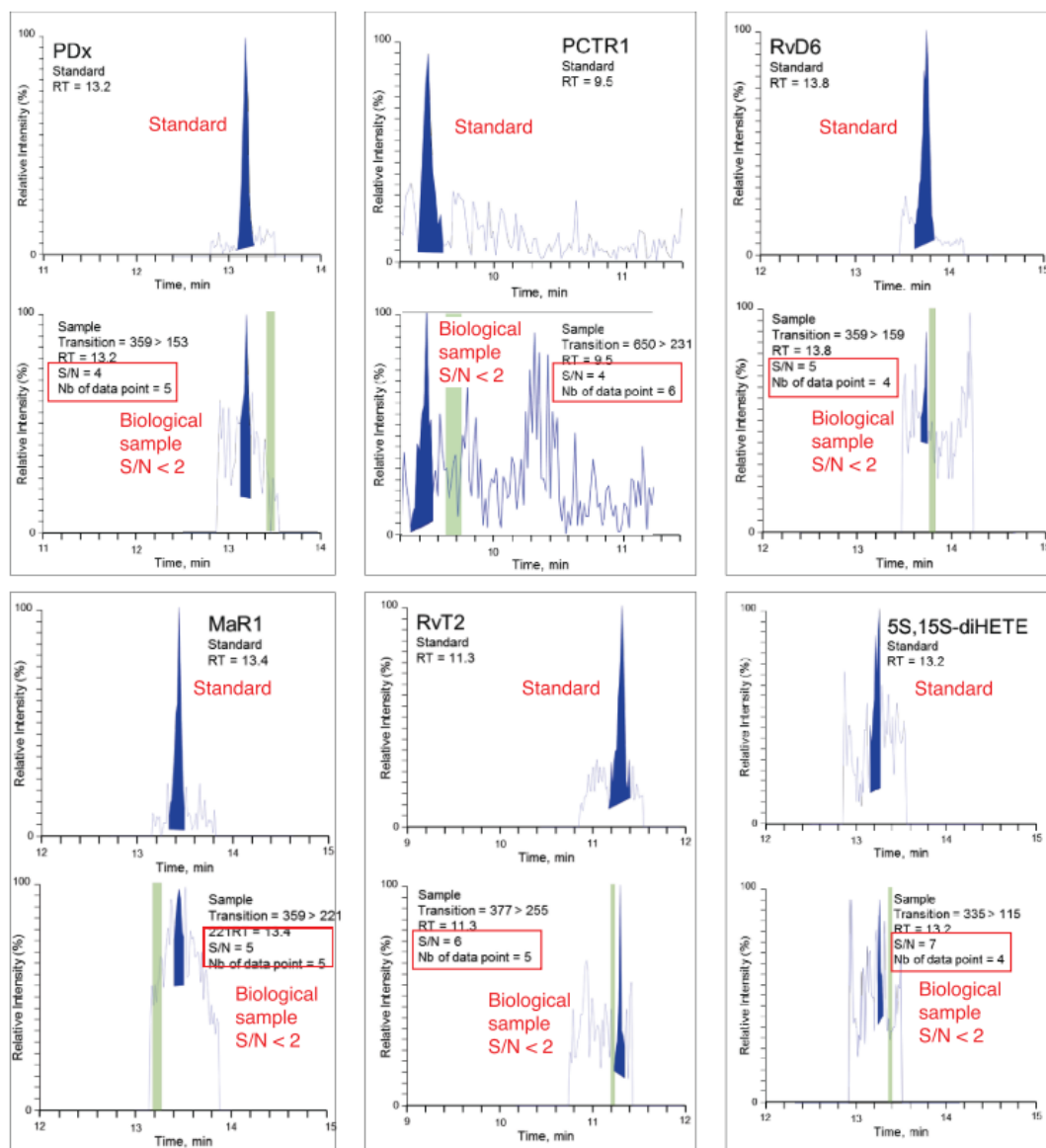
Las diferencias fundamentales se encuentran en los criterios específicos de identificación y cuantificación de SPM que emplea el grupo de Dalli y Serhan. Éstos son: 1) la presencia de un pico con un área mínima de 2000 cuentas, 2) coincidencia en el  $t_R$  con un estándar sintético, con una tolerancia máxima en la diferencia de  $t_R$  de 0,05 s, 3)  $\geq 4$  puntos para definir el pico cromatográfico, y 4) presencia de al menos 6 iones diagnóstico (fragmentos) que coincidan con los de un estándar, con al menos la identificación de 1 que represente la fragmentación del *backbone* (esqueleto) del SPM. Entonces, las críticas se centran en la ausencia de criterios generales establecidos en las guías de distintas agencias internacionales (EMA o FDA) para calcular la relación señal/ruido y aplicar dicha relación para definir los límites de detección y cuantificación. Eso es la metodología estándar aprobada por el ICH (del inglés, *International Conference on Harmonisation*), la farmacopea europea, el ISO (del inglés, *International Organisation for Standardisation*), la EMA (del inglés, *European Medicine Agency*), la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*), y la Organización Mundial de la Salud [165]. Mientras que para validar ensayos se recomienda una relación S/R cercana a 10 para el LOQ y de 3 para LOD, la práctica de muchos laboratorios académicos de investigación trabaja con una S/R de 5 para definir el LOQ. Esto implica que la señal del analito (la respuesta del detector) debe exceder 5 veces la señal del “punto 0” de la calibración.

Los problemas de emplear estos criterios especialmente diseñados para la identificación y cuantificación de SPM se vuelven muy evidentes cuando se trabaja con equipamiento de elevada sensibilidad, como lo son los espectrómetros de triple cuadrupolo más modernos. Es que la presencia de señales con áreas superiores a 2000 cuentas es muy fácil de lograr aun analizando un área de ruido. Y esto es justamente uno de los aspectos que son analizados en detalle por O'Donnell *et al*; ellos emplean un equipo similar al que se emplea en los laboratorios de Dalli y Serhan, un QTRAP 6500 (Sciex) y mediante experimentos sencillos en los que comparan la inyección de una estándar de RvD2 y una inyección de MeOH grado

HPLC, evidencian que el valor de 2000 cuentas se puede superar fácilmente aún en inyección del blanco, en regiones donde no existe un pico cromatográfico discernible. Además, mencionan un aspecto importante a tener en cuenta, y es que la línea de base de un cromatograma obtenido por inyección de un blanco no tiene en cuenta la variabilidad del ruido que se acentúa cuando la muestra inyectada proviene de una muestra biológica y se afectan diferencialmente cada una de las distintas transiciones que se pueden monitorizar en un MRM (**figuras 43 y 44**). Estos son ejemplos de falsos positivos representativos de los análisis realizados por el grupo de Dalli y Serhan, y si bien no representa lo que sucede para todas las SPM en todos los artículos, existen otros ejemplos (que se referencian en el *preprint*) y dispara un proceso de revisión crítico sobre los trabajos publicados en el área.



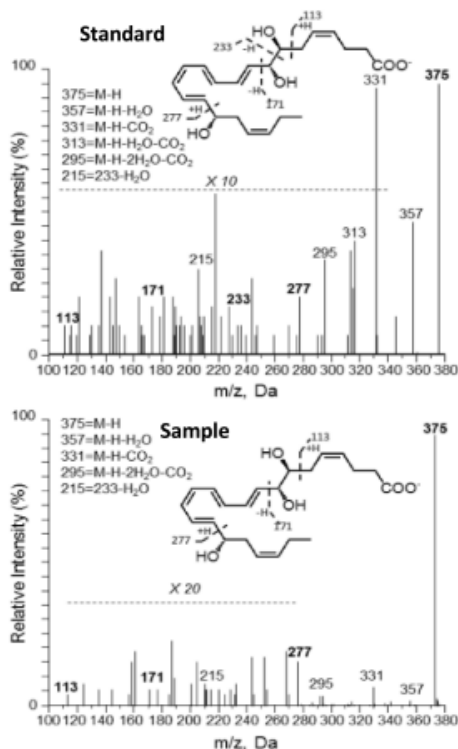
**Figura 43. Experimento del *preprint* de O'Donnell. Arriba.** Cromatograma representativo obtenido luego de la inyección de 1.8 ng de un estándar comercial de RvD2 analizado por HPLC-MS/MS. **Abajo.** Tres ejemplos de análisis de MeOH (blancos) en los que se evidencia que las regiones integradas superan fácilmente el umbral que proponen los investigadores Dalli y Serhan de 2000 cuentas. Obtenida, sin modificar, de [165].



**Figura 44. Datos de Gomez que se analizan en el *preprint* de O'Donnell.** Se muestran cromatogramas obtenidos a partir de las figuras suplementarias de Gómez y editados en *preprint* de O'Donnell. Los cromatogramas son representativos de mucha de la información suplementaria que parece en el artículo de Gómez, mostrando la señal de un estándar en el panel superior y la señal obtenida para la muestra biológica en el inferior. En azul se muestran los picos integrados en el artículo original y el sombreado verde indica la región que los autores usaron como línea de base, para determinar la relación S/R. En rojo, la edición de O'Donnell, se agrega la referencia de muestra (estándar, muestra biológica), se resalta la relación S/R y el número de puntos en cada pico de la figura original y se agrega el valor de relación S/R calculado considerando toda la línea de base (no solo la región verde). Obtenida, sin modificar, de [165].

Por otra parte, otro aspecto técnico muy importante para destacar tiene que ver con el patrón de fragmentación de los SPM reportados. Como práctica estándar, para asignar la

identidad de una molécula los patrones de fragmentación deben ser similares a los obtenidos a partir de un estándar con iguales equipamiento y parámetros empleados. Es decir, el fragmento más abundante y el patrón de fragmentación deben ser similares, al menos en términos de abundancias relativas. Esto también es resaltado como falla en la práctica de trabajo demostrada en el grupo de Serhan. En la **figura 45**. Se muestra claramente como el espectro de fragmentación de un estándar de RvD1 y el de la presunta RvD1 encontrada en una muestra biológica son ruidosos y débiles, pero lo más llamativo es que hay diferencias en la abundancia relativa de los llamados “iones diagnóstico”, marcando por ejemplo, que en el espectro de la muestra no aparece el tan llamativo y abundante ion en  $m/z$  215 que sí se ve en el estándar. Esto se denuncia como una práctica común en los artículos publicados por Dalli y Serhan [126,161,167–171]. En términos generales es necesario hacer algunas aclaraciones respecto a la tecnología empleada para la detección de SPM y oxilipinas en general. Las nuevas generaciones de espectrómetros de masas, incluyendo los QTRAP de Sciex, son instrumentos de muy alta sensibilidad, y son potencialmente capaces de detectar iones del laboratorio (ambiente), solvente, o simplemente ruido electrónico que pueden corresponderse con iones diagnóstico en los analitos de estudio. Esto se puede evidenciar en la práctica diaria empleando el mismo QTRAP4500 que se ha empleado en el presente trabajo, y es también bien demostrado en el *preprint* de O’Donnell. Entonces, la presencia de iones o espectros “fantasma” en muestras blanco puede generar señales que confunden al operador y es necesario entonces un análisis crítico y pormenorizado de los datos primarios para asignar la identidad de los analitos, en este caso las oxilipinas. El artículo *preprint* de O’Donnell deja en evidencia que estas prácticas son frecuentes en un gran número de publicaciones en las que se detectan y cuantifican SPM, y junto con una serie de artículos adicionales ponen en duda la formación endógena de los SPM [123,165].



**Figura 45. Datos de Gomez que se analizan en el *preprint* de O'Donnell.** Espectros de fragmentación de RvD1 estándar (arriba) y RvD1 en muestra (abajo) obtenido de figura suplementaria de Gomez *et al*. Los espectros no coinciden entre muestra y estándar. Obtenida, sin modificar, de [165].

Dalli, Gomez y Serhan se han pronunciado luego de que estas críticas se hicieran públicas [172], asegurando que las críticas no están bien fundadas o directamente equivocadas. Por un lado, plantean que hay una malinterpretación de los criterios de identificación descritos en Gomez *et al* [166]. Esto seguramente apunta a un tema de semántica en el que ellos dicen que el pico debe tener un área mayor a 2000 cuentas, así que primero tiene que haber un pico y luego se integra. Por tanto, en los hipotéticos casos en que no existen picos cromatográficos bien definidos como plantea O'Donnell, no habrían sido tomados en cuenta. Por otro lado, re-analizan los datos publicados en Gomez *et al* [166] empleando un criterio ortogonal, el descrito por O'Donnell, y aseguran obtener esencialmente los mismos resultados, apoyando y confirmando los resultados previamente publicados.

En términos generales, en cuanto a la identificación y cuantificación de oxilipinas en muestras biológicas, este tipo de discusiones también revelan fallas en el sistema de evaluación entre pares de las publicaciones científicas. Si las críticas son válidas y suceden en todos los artículos publicados en el área de SPM (más de 2000), ¿cómo es que estos trabajos han atravesado satisfactoriamente el proceso de evaluación entre pares? Probablemente esto se debe a que no hay en la comunidad científica muchos investigadores expertos en el área de espectrometría de masas de lípidos de baja abundancia. Consecuentemente, los trabajos de SPM, son usualmente evaluados por expertos en otras áreas que se abarcan dentro de ellos, que no necesariamente deben comprender los detalles del área de MS. A su vez, tal como se plantea en [155], las revistas prefieren publicar “resultados positivos” y no solo detecciones negativas.



## PERSPECTIVAS

En términos generales, el potencial de la lipidómica, y en particular la oxi-lipidómica, como herramienta de monitoreo para el diagnóstico, prognosis o tratamiento de enfermedades, es muy potente. Queda claro con este trabajo y con la revisión de literatura especializada en el tema, que aún existen desafíos importantes que tienen que ver con la armonización/sistematización de los procesamientos de muestras, conservación, criterios analíticos, y diversas variables tanto biológicas como técnicas. Sin embargo, existe evidencia de que, aun así, existen perfiles de oxilipinas característicos de determinados procesos patológicos. Uno de ellos es el caso de la esclerosis múltiple, otra enfermedad neurodegenerativa en la que se vio (con métodos desarrollados en el presente trabajo de tesis) que el perfil de mediadores proinflamatorios está elevado en muestras de suero humano y en modelos animales. Por lo tanto, es importante continuar trabajando para trasladar estos desarrollos analíticos hacia la práctica clínica. Para ello será necesario, entre otros, contar con procedimientos sistematizados de análisis, definir perfiles de oxilipinas de poblaciones sanas, validar la consistencia de los análisis en grandes cohortes, y también desarrollar herramientas de análisis (bioinformáticas) que, en última instancia, faciliten la interpretación clínica. El presente trabajo de tesis doctoral contribuye en esa dirección en algunos aspectos, particularmente en el estudio crítico de variables analíticas presentes en el método de cuantificación de oxilipinas por HPLC-MS/MS y en la fundamentación de la relevancia del estudio de oxilipinas en la ELA.

Este trabajo reveló por primera vez un análisis de oxi-lipidómica en plasma de pacientes con ELA y voluntarios sanos. Aunque en la actualidad hay extensa evidencia de inflamación periférica en la ELA, esto no fue evidenciado como un perfil discriminatorio de mediadores lipídicos proinflamatorios entre pacientes y controles. Sin embargo, en análisis individuales, se identificaron diferencias significativas para algunas oxilipinas, específicamente las derivadas del LA y algunos metabolitos de AA derivados de la vía 5-LOX. Estos resultados obtenidos para los OXLAMs, cuya función biológica no está claramente definida, son prometedores para proponerlos como biomarcadores potenciales de estadios tempranos de la ELA.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] V. Chiurchiù, M. Tiberi, A. Matteocci, F. Fazio, H. Siffeti, S. Saracini, N.B. Mercuri, G. Sancesario, Lipidomics of Bioactive Lipids in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Where Are We?, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 6235. doi:10.3390/ijms23116235.
- [2] B. Samuelsson, Role of Basic Science in the Development of New Medicines: Examples from the Eicosanoid Field, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 10070–10080. doi:10.1074/jbc.X112.351437.
- [3] R. Kurzrok, C.C. Lieb, Biochemical Studies of Human Semen II. The Action of Semen on the Human Uterus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 28 (1930) 268–272. doi:10.3181/00379727-28-5265.
- [4] M.W. Goldblatt, A depressor substance in seminal fluid, *J. Soc. Chem. Ind.* 52 (1933) 1056–1057. doi:10.1002/jctb.5000525203.
- [5] U.S. von Euler, Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen, *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 175 (1934) 78–84. doi:10.1007/BF01861161.
- [6] S. Bergström, H. Danielsson, D. Klenberg, B. Samuelsson, The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) PC4006–PC4008. doi:10.1016/S0021-9258(18)91234-2.
- [7] S. Bergström, B. Samuelsson, Prostaglandins, *Annu. Rev. Biochem.* 34 (1965) 101–108. doi:10.1146/annurev.bi.34.070165.000533.
- [8] N. Kresge, R.D. Simoni, R.L. Hill, The Prostaglandins, Sune Bergström and Bengt Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) e9–e11. doi:10.1016/S0021-9258(19)76743-X.
- [9] M.V. Catani, V. Gasperi, T. Bisogno, M. Maccarrone, Essential Dietary Bioactive Lipids in Neuroinflammatory Diseases, *Antioxidants Redox Signal.* 29 (2018) 37–60. doi:10.1089/ars.2016.6958.
- [10] M. Igarashi, K. Ma, F. Gao, H.-W. Kim, D. Greenstein, S.I. Rapoport, J.S. Rao, Brain lipid concentrations in bipolar disorder, *J. Psychiatr. Res.* 44 (2010) 177–182. doi:10.1016/j.jpsychires.2009.08.001.
- [11] J. Iłżecka, Prostaglandin E2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients, *Acta Neurol. Scand.* 108 (2003) 125–129. doi:10.1034/j.1600-0404.2003.00102.x.
- [12] G. Almer, C. Guégan, P. Teismann, A. Naini, G. Rosoklija, A.P. Hays, C. Chen, S. Przedborski, Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.* 49 (2001) 176–185. doi:10.1002/1531-8249(20010201)49:2<176::AID-ANA37>3.0.CO;2-X.
- [13] G. Almer, P. Teismann, Z. Stevic, J. Halaschek-Wiener, L. Deecke, V. Kostic, S. Przedborski, Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients, *Neurology.* 58 (2002) 1277–1279. doi:10.1212/WNL.58.8.1277.

- [14] W.H. Gerwick, M. Moghaddam, M. Hamberg, Oxylin metabolism in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: Mechanism of formation of vicinal dihydroxy fatty acids, *Arch. Biochem. Biophys.* 290 (1991) 436–444. doi:10.1016/0003-9861(91)90563-X.
- [15] W.W. Christie, The LIPID MAPS® Lipidomics Gateway, (n.d.). <https://www.lipidmaps.org/> (accessed July 3, 2022).
- [16] C.N. Serhan, Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology, *Nature.* 510 (2014) 92–101. doi:10.1038/nature13479.
- [17] L.J. Roberts, G.L. Milne, Isoprostanes, *J. Lipid Res.* 50 (2009) S219–S223. doi:10.1194/jlr.R800037-JLR200.
- [18] E.A. Dennis, P.C. Norris, Eicosanoid storm in infection and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 511–523. doi:10.1038/nri3859.
- [19] A.M. Astudillo, M.A. Balboa, J. Balsinde, Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1864 (2019) 772–783. doi:10.1016/j.bbalip.2018.07.002.
- [20] E.A. Dennis, J. Cao, Y.-H. Hsu, V. Magrioti, G. Kokotos, Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention, *Chem. Rev.* 111 (2011) 6130–6185. doi:10.1021/cr200085w.
- [21] M. Lamas Bervejillo, J. Bonanata, G.R. Franchini, A. Richeri, J.M. Marqués, B.A. Freeman, F.J. Schopfer, E.L. Coitiño, B. Córscico, H. Rubbo, A.M. Ferreira, A FABP4-PPAR $\gamma$  signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes, *Redox Biol.* 29 (2020) 101376. doi:10.1016/j.redox.2019.101376.
- [22] F.J. Schopfer, C. Cipollina, B.A. Freeman, Formation and Signaling Actions of Electrophilic Lipids, *Chem. Rev.* 111 (2011) 5997–6021. doi:10.1021/cr200131e.
- [23] M. Lamas Bervejillo, Estudio del eje FABP4-PPAR  $\gamma$  en los efectos de los nitroalquenos en monocitos y macrófagos, Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA, 2019. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/24993>.
- [24] S.C. Dyllal, L. Balas, N.G. Bazan, J.T. Brenna, N. Chiang, F. da Costa Souza, J. Dalli, T. Durand, J. Galano, P.J. Lein, C.N. Serhan, A.Y. Taha, Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions, *Prog. Lipid Res.* 86 (2022) 101165. doi:10.1016/j.plipres.2022.101165.
- [25] A.A. Hajeyah, W.J. Griffiths, Y. Wang, A.J. Finch, V.B. O'Donnell, The Biosynthesis of Enzymatically Oxidized Lipids, *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 11 (2020). doi:10.3389/fendo.2020.591819.
- [26] O. Laneuville, D.K. Breuer, N. Xu, Z.H. Huang, D.A. Gage, J.T. Watson, M. Lagarde, D.L. DeWitt, W.L. Smith, Fatty Acid Substrate Specificities of Human Prostaglandin-endoperoxide H Synthase-1 and -2, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19330–19336. doi:10.1074/jbc.270.33.19330.

- [27] W.L. Smith, R.C. Murphy, *The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways*, Sixth Edit, Elsevier, 2015. doi:10.1016/B978-0-444-63438-2.00009-2.
- [28] I. Wood, A. Trostchansky, H. Rubbo, Structural considerations on lipoxygenase function, inhibition and crosstalk with nitric oxide pathways, *Biochimie*. 178 (2020) 170–180. doi:10.1016/j.biochi.2020.09.021.
- [29] L. Kutzner, K. Goloshchapova, D. Heydeck, S. Stehling, H. Kuhn, N.H. Schebb, Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1862 (2017) 666–675. doi:10.1016/j.bbalip.2017.04.001.
- [30] H. Kuhn, S. Banthiya, K. van Leyen, Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1851 (2015) 308–330. doi:10.1016/j.bbalip.2014.10.002.
- [31] O. Rådmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1851 (2015) 331–339. doi:10.1016/j.bbalip.2014.08.012.
- [32] M.E. Newcomer, N.C. Gilbert, Location, location, location: Compartmentalization of early events in leukotriene biosynthesis, *J. Biol. Chem*. 285 (2010) 25109–25114. doi:10.1074/jbc.R110.125880.
- [33] B. Cai, C. Kasikara, A.C. Doran, R. Ramakrishnan, R.B. Birge, I. Tabas, MerTK signaling in macrophages promotes the synthesis of inflammation resolution mediators by suppressing CaMKII activity, *Sci. Signal*. 11 (2018) eaar3721. doi:10.1126/scisignal.aar3721.
- [34] G.L. Milne, E.S. Musiek, J.D. Morrow, F2 -Isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: An overview, *Biomarkers*. 10 (2005) 10–23. doi:10.1080/13547500500216546.
- [35] H. Rubbo, R. Radi, Protein and lipid nitration: Role in redox signaling and injury, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj*. 1780 (2008) 1318–1324. doi:10.1016/j.bbagen.2008.03.007.
- [36] A. Trostchansky, H. Rubbo, Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties., *Free Radic. Biol. Med*. 44 (2008) 1887–96. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.006.
- [37] A. a. Gallon, W. a. Pryor, The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen, *Lipids*. 29 (1994) 171–176. doi:10.1007/BF02536725.
- [38] A. Napolitano, E. Camera, M. Picardo, M. D'Ischia, Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: Formation and structural characterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1,3-pentadiene products, *J. Org. Chem*. 65 (2000) 4853–4860. doi:10.1021/jo000090q.

- [39] G. Bonacci, P.R.S. Baker, S.R. Salvatore, D. Shores, N.K.H. Khoo, J.R. Koenitzer, D.A. Vitturi, S.R. Woodcock, F. Golin-Bisello, M.P. Cole, S. Watkins, C. St. Croix, C.I. Batthyany, B.A. Freeman, F.J. Schopfer, C. St Croix, C.I. Batthyany, B.A. Freeman, F.J. Schopfer, Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 44071–44082. doi:10.1074/jbc.M112.401356.
- [40] M. Piesche, J. Roos, B. Kühn, J. Fettel, N. Hellmuth, C. Brat, I. V Maucher, O. Awad, C. Matrone, S.G. Comerma Steffensen, G. Manolikakes, U. Heinicke, K.D. Zacharowski, D. Steinhilber, T.J. Maier, The Emerging Therapeutic Potential of Nitro Fatty Acids and Other Michael Acceptor-Containing Drugs for the Treatment of Inflammation and Cancer, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 1. doi:10.3389/fphar.2020.01297.
- [41] F.J. Schopfer, D.A. Vitturi, D.K. Jorkasky, B.A. Freeman, Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases, *Nitric Oxide.* 79 (2018) 31–37. doi:10.1016/j.niox.2018.06.006.
- [42] K. Awwad, S.D. Steinbrink, T. Frömel, N. Lill, J. Isaak, A.-K. Häfner, J. Roos, B. Hofmann, H. Heide, G. Geisslinger, D. Steinhilber, B.A. Freeman, T.J. Maier, I. Fleming, Electrophilic Fatty Acid Species Inhibit 5-Lipoxygenase and Attenuate Sepsis-Induced Pulmonary Inflammation, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 2667–2680. doi:10.1089/ars.2013.5473.
- [43] A. Trostchansky, L. Bonilla, C.P. Thomas, V.B. O'Donnell, L.J. Marnett, R. Radi, H. Rubbo, Nitroarachidonic Acid, a Novel Peroxidase Inhibitor of Prostaglandin Endoperoxide H Synthases 1 and 2, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12891–12900. doi:10.1074/jbc.M110.154518.
- [44] W.W. Christie, J.L. Harwood, Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators, *Essays Biochem.* 64 (2020) 401–421. doi:10.1042/EBC20190082.
- [45] E. Jarc, T. Petan, A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators, *Biochimie.* 169 (2020) 69–87. doi:10.1016/j.biochi.2019.11.016.
- [46] T.L. Blasbalg, J.R. Hibbeln, C.E. Ramsden, S.F. Majchrzak, R.R. Rawlings, Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century, *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 950–962. doi:10.3945/ajcn.110.006643.
- [47] M. Gabbs, S. Leng, J.G. Devassy, H.M. Aukema, Advances in Our Understanding of Oxylipins, *Am. Soc. Nutr.* 6 (2015) 513–540. doi:10.3945/an.114.007732.PUFAs.
- [48] I. BARTOV, S. BORNSTEIN, Susceptibility of Chicks to Nutritional Encephalopathy: Effect of Fat and  $\alpha$ -Tocopherol Content of the Breeder Diet, *Poult. Sci.* 59 (1980) 264–267. doi:10.3382/ps.0590264.
- [49] V.W. Fischer, J.S. Nelson, Cerebrovascular Changes in Tocopheroldepleted Chicks, Fed Linoleic Acid, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 32 (1973) 474–483. doi:10.1097/00005072-197307000-00011.
- [50] H. DAM, G.K. NIELSEN, I. PRANGE, E. SØNDERGAARD, Influence of Linoleic and Linolenic Acids on Symptoms of Vitamin E Deficiency in Chicks, *Nature.* 182 (1958) 802–803. doi:10.1038/182802a0.

- [51] K. Hildreth, S.D. Kodani, B.D. Hammock, L. Zhao, Cytochrome P450-derived linoleic acid metabolites EpOMEs and DiHOMEs: a review of recent studies, *J. Nutr. Biochem.* 86 (2020) 108484. doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108484.
- [52] A.Y. Taha, M. Hennebelle, J. Yang, D. Zamora, S.I. Rapoport, B.D. Hammock, C.E. Ramsden, Regulation of rat plasma and cerebral cortex oxylipin concentrations with increasing levels of dietary linoleic acid, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 138 (2018) 71–80. doi:10.1016/j.plefa.2016.05.004.
- [53] M. Hennebelle, A.H. Metherel, A.P. Kitson, Y. Otoki, J. Yang, K.S.S. Lee, B.D. Hammock, R.P. Bazinet, A.Y. Taha, Brain oxylipin concentrations following hypercapnia/ischemia: effects of brain dissection and dissection time, *J. Lipid Res.* 60 (2019) 671–682. doi:10.1194/jlr.D084228.
- [54] M. Hennebelle, Z. Zhang, A.H. Metherel, A.P. Kitson, Y. Otoki, C.E. Richardson, J. Yang, K.S.S. Lee, B.D. Hammock, L. Zhang, R.P. Bazinet, A.Y. Taha, Linoleic acid participates in the response to ischemic brain injury through oxidized metabolites that regulate neurotransmission, *Sci. Rep.* 7 (2017) 4342. doi:10.1038/s41598-017-02914-7.
- [55] V. Kumar, A.K. Abbas, J.C. Aster, eds., *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, 9th ed., Elsevier saunders, 2015.
- [56] Y.S. Chhonker, V. Bala, D.J. Murry, Quantification of eicosanoids and their metabolites in biological matrices: a review, *Bioanalysis.* 10 (2018) 2027–2046. doi:10.4155/bio-2018-0173.
- [57] M.W. Buczynski, D.S. Dumlao, E.A. Dennis, Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1015–1038. doi:10.1194/jlr.R900004-JLR200.
- [58] J.A. Salmon, Measurement of eicosanoids by bioassay and radioimmunoassay, *Br. Med. Bull.* 39 (1983) 227–231. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a071824.
- [59] M.W. Buczynski, *Lipidomic analysis of eicosanoid dynamics in inflammation and disease*, University of California, San Diego, 2008.
- [60] D. Tsikas, Application of gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 717 (1998) 201–245. doi:10.1016/S0378-4347(98)00210-2.
- [61] D. Tsikas, A.A. Zoerner, Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A historical retrospect and a discussion, *J. Chromatogr. B.* 964 (2014) 79–88. doi:10.1016/j.jchromb.2014.03.017.
- [62] G. Dasilva, I. Medina, Lipidomic methodologies for biomarkers of chronic inflammation in nutritional research:  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 lipid mediators, *Free Radic. Biol. Med.* 144 (2019) 90–109. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.017.

- [63] R.C. Murphy, R.M. Barkley, K. Zemski Berry, J. Hankin, K. Harrison, C. Johnson, J. Krank, A. McAnoy, C. Uhlson, S. Zarini, Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 1–42. doi:10.1016/j.ab.2005.04.042.
- [64] R.C. Murphy, R.M. Barkley, K.Z. Berry, J. Hankin, K. Harrison, C. Johnson, J. Krank, A. McAnoy, C. Uhlson, S. Zarini, Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 1–42. doi:10.1016/j.ab.2005.04.042.
- [65] A. Margalit, K.L. Duffin, P.C. Isakson, Rapid Quantitation of a Large Scope of Eicosanoids in Two Models of Inflammation: Development of an Electrospray and Tandem Mass Spectrometry Method and Application to Biological Studies, *Anal. Biochem.* 235 (1996) 73–81. doi:10.1006/abio.1996.0093.
- [66] M. Takabatake, T. Hishinuma, N. Suzuki, S. Chiba, H. Tsukamoto, H. Nakamura, T. Saga, Y. Tomioka, A. Kurose, T. Sawai, M. Mizugaki, Simultaneous quantification of prostaglandins in human synovial cell-cultured medium using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 67 (2002) 51–56. doi:10.1054/plef.2002.0381.
- [67] D.S. Dumlao, M.W. Buczynski, P.C. Norris, R. Harkewicz, E.A. Dennis, High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acylethanolamines, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1811 (2011) 724–736. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.005.
- [68] J. Yang, K. Schmelzer, K. Georgi, B.D. Hammock, Quantitative Profiling Method for Oxylipin Metabolome by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8085–8093. doi:10.1021/ac901282n.
- [69] K.M. Rund, A.I. Ostermann, L. Kutzner, J.M. Galano, C. Oger, C. Vigor, S. Wecklein, N. Seiwert, T. Durand, N.H. Schebb, Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs, *Anal. Chim. Acta.* 1037 (2018) 63–74. doi:10.1016/j.aca.2017.11.002.
- [70] J.T. English, P.C. Norris, R.R. Hodges, D.A. Dartt, C.N. Serhan, Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 117 (2017) 17–27. doi:10.1016/j.plefa.2017.01.004.
- [71] L. Kutzner, K.M. Rund, A.I. Ostermann, N.M. Hartung, J.-M. Galano, L. Balas, T. Durand, M.S. Balzer, S. David, N.H. Schebb, Development of an Optimized LC-MS Method for the Detection of Specialized Pro-Resolving Mediators in Biological Samples, *Front. Pharmacol.* 10 (2019). doi:10.3389/fphar.2019.00169.
- [72] I. Liakh, A. Pakiet, T. Sledzinski, A. Mika, Methods of the Analysis of Oxylipins in Biological Samples, *Molecules.* 25 (2020) 349. doi:10.3390/molecules25020349.
- [73] E. Koch, M. Mainka, C. Dalle, A.I. Ostermann, K.M. Rund, L. Kutzner, L.-F. Froehlich, J. Bertrand-Michel, C. Gladine, N.H. Schebb, Stability of oxylipins during plasma generation and long-term storage, *Talanta.* 217 (2020) 121074. doi:10.1016/j.talanta.2020.121074.

- [74] Liakh, Pakiet, Sledzinski, Mika, Modern Methods of Sample Preparation for the Analysis of Oxylipins in Biological Samples, *Molecules*. 24 (2019) 1639. doi:10.3390/molecules24081639.
- [75] A.I. Ostermann, I. Willenberg, N.H. Schebb, Comparison of sample preparation methods for the quantitative analysis of eicosanoids and other oxylipins in plasma by means of LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1403–1414. doi:10.1007/s00216-014-8377-4.
- [76] M. Teppner, M. Zell, C. Husser, B. Ernst, A. Pähler, Quantitative profiling of prostaglandins as oxidative stress biomarkers in vitro and in vivo by negative ion online solid phase extraction – Liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 498 (2016) 68–77. doi:10.1016/j.ab.2016.01.005.
- [77] R. Deems, M.W. Buczynski, R. Bowers-Gentry, R. Harkewicz, E.A. Dennis, Detection and Quantitation of Eicosanoids via High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry, in: *Methods Enzymol.*, 2007: pp. 59–82. doi:10.1016/S0076-6879(07)32003-X.
- [78] O. Hardiman, A. Al-Chalabi, A. Chio, E.M. Corr, G. Logroscino, W. Robberecht, P.J. Shaw, Z. Simmons, L.H. van den Berg, Amyotrophic lateral sclerosis, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3 (2017) 17071. doi:10.1038/nrdp.2017.71.
- [79] W. Robberecht, T. Philips, The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 248–264. doi:10.1038/nrn3430.
- [80] O. Hardiman, A. Al Chalabi, C. Brayne, E. Beghi, L.H. van den Berg, A. Chio, S. Martin, G. Logroscino, J. Rooney, The changing picture of amyotrophic lateral sclerosis: lessons from European registers, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. (2017) jnnp-2016-314495. doi:10.1136/jnnp-2016-314495.
- [81] T. Zaldivar, J. Gutierrez, G. Lara, M. Carbonara, G. Logroscino, O. Hardiman, Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: A population-based mortality study, *Neurology*. 72 (2009) 1640–1645. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a55f7b.
- [82] G. Logroscino, B.J. Traynor, O. Hardiman, A. Chio, D. Mitchell, R.J. Swingler, A. Millul, E. Benn, E. Beghi, Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 81 (2010) 385–390. doi:10.1136/jnnp.2009.183525.
- [83] B. Marin, G. Logroscino, F. Boumédiène, A. Labrunie, P. Couratier, M.C. Babron, A.L. Leutenegger, P.M. Preux, E. Beghi, Clinical and demographic factors and outcome of amyotrophic lateral sclerosis in relation to population ancestral origin, *Eur. J. Epidemiol.* 31 (2016) 229–245. doi:10.1007/s10654-015-0090-x.
- [84] M.C. Vázquez, C. Ketzoián, C. Legnani, I. Rega, N. Sánchez, A. Perna, M. Penela, X. Aguirrezábal, M. Druet-Cabanac, M. Medici, Incidence and Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Uruguay: A Population-Based Study, *Neuroepidemiology*. 30 (2008) 105–111. doi:10.1159/000120023.
- [85] J. Gil, M.C. Vazquez, C. Ketzoián, A. Perna, B. Marin, P.M. Preux, P. Couratier, Prognosis of ALS: Comparing data from the Limousin referral centre, France, and a Uruguayan population, *Amyotroph. Lateral Scler.* 10 (2009) 355–360. doi:10.3109/17482960902748686.



- [86] O. Hardiman, M. Heverin, J. Rooney, P. Lillo, G. Godoy, D. Sáez, D. Valenzuela, R. Hughes, A. Perna, C.N. Ketzioian, C. Vazquez, J. Gutierrez Gil, A. Arias Morales, G. Lara Fernandez, T. Zaldivar, K. Horton, P. Mehta, G. Logroscino, The Latin American Epidemiology Network for ALS (Laenals), *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* (2022) 1–6. doi:10.1080/21678421.2022.2028168.
- [87] S. Byrne, M. Elamin, P. Bede, O. Hardiman, Absence of consensus in diagnostic criteria for familial neurodegenerative diseases, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 83 (2012) 365–367. doi:10.1136/jnnp-2011-301530.
- [88] S.A. Goutman, O. Hardiman, A. Al-Chalabi, A. Chió, M.G. Savelieff, M.C. Kiernan, E.L. Feldman, Emerging insights into the complex genetics and pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis, *Lancet Neurol.* 21 (2022) 465–479. doi:10.1016/S1474-4422(21)00414-2.
- [89] A. Al-Chalabi, A. Calvo, A. Chio, S. Colville, C.M. Ellis, O. Hardiman, M. Heverin, R.S. Howard, M.H.B. Huisman, N. Keren, P.N. Leigh, L. Mazzini, G. Mora, R.W. Orrell, J. Rooney, K.M. Scott, W.J. Scotton, M. Seelen, C.E. Shaw, K.S. Sidle, R. Swingler, M. Tsuda, J.H. Veldink, A.E. Visser, L.H. van den Berg, N. Pearce, Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study, *Lancet Neurol.* 13 (2014) 1108–1113. doi:10.1016/S1474-4422(14)70219-4.
- [90] S. Martin, A. Al Khleifat, A. Al-Chalabi, What causes amyotrophic lateral sclerosis?, *F1000Research.* 6 (2017) 371. doi:10.12688/f1000research.10476.1.
- [91] Z.-Y. Zou, Z.-R. Zhou, C.-H. Che, C.-Y. Liu, R.-L. He, H.-P. Huang, Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 88 (2017) 540–549. doi:10.1136/jnnp-2016-315018.
- [92] D.R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. Figlewicz, P. Sapp, a Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J.P. O’Regan, H.X. Deng, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis., *Nature.* 362 (1993) 59–62. doi:10.1038/362059a0.
- [93] C. Lagier-Tourenne, M. Polymenidou, K.R. Hutt, A.Q. Vu, M. Baughn, S.C. Huelga, K.M. Clutario, S.-C. Ling, T.Y. Liang, C. Mazur, E. Wancewicz, A.S. Kim, A. Watt, S. Freier, G.G. Hicks, J.P. Donohue, L. Shiue, C.F. Bennett, J. Ravits, D.W. Cleveland, G.W. Yeo, Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 1488–1497. doi:10.1038/nn.3230.
- [94] V.M. Van Deerlin, J.B. Leverenz, L.M. Bekris, T.D. Bird, W. Yuan, L.B. Elman, D. Clay, E.M. Wood, A.S. Chen-Plotkin, M. Martinez-Lage, E. Steinbart, L. McCluskey, M. Grossman, M. Neumann, I.-L. Wu, W.-S. Yang, R. Kalb, D.R. Galasko, T.J. Montine, J.Q. Trojanowski, V.M.-Y. Lee, G.D. Schellenberg, C.-E. Yu, TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis, *Lancet Neurol.* 7 (2008) 409–416. doi:10.1016/S1474-4422(08)70071-1.

- [95] J. Sreedharan, I.P. Blair, V.B. Tripathi, X. Hu, C. Vance, B. Rogelj, S. Ackerley, J.C. Durnall, K.L. Williams, E. Buratti, F. Baralle, J. de Belleruche, J.D. Mitchell, P.N. Leigh, A. Al-Chalabi, C.C. Miller, G. Nicholson, C.E. Shaw, TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Science*. 319 (2008) 1668–1672. doi:10.1126/science.1154584.
- [96] C. Vance, A. Al-Chalabi, D. Ruddy, B.N. Smith, X. Hu, J. Sreedharan, T. Siddique, H.J. Schelhaas, B. Kusters, D. Troost, F. Baas, V. de Jong, C.E. Shaw, Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2–21.3, *Brain*. 129 (2006) 868–876. doi:10.1093/brain/awl030.
- [97] R. Chia, A. Chiò, B.J. Traynor, Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications, *Lancet Neurol*. 17 (2018) 94–102. doi:10.1016/S1474-4422(17)30401-5.
- [98] A. Alonso, G. Logroscino, M.A. Hernan, Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 81 (2010) 1249–1252. doi:10.1136/jnnp.2009.180232.
- [99] S. Peters, A.E. Visser, F. D’Ovidio, J. Vlaanderen, L. Portengen, E. Beghi, A. Chio, G. Logroscino, O. Hardiman, E. Pupillo, J.H. Veldink, R. Vermeulen, L.H. van den Berg, Effect modification of the association between total cigarette smoking and ALS risk by intensity, duration and time-since-quitting: Euro-MOTOR, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 91 (2020) 33–39. doi:10.1136/jnnp-2019-320986.
- [100] A.E. Visser, F. D’Ovidio, S. Peters, R.C. Vermeulen, E. Beghi, A. Chiò, J.H. Veldink, G. Logroscino, O. Hardiman, L.H. van den Berg, Multicentre, population-based, case–control study of particulates, combustion products and amyotrophic lateral sclerosis risk, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 90 (2019) 854–860. doi:10.1136/jnnp-2018-319779.
- [101] F. D’Ovidio, J.P.K. Rooney, A.E. Visser, U. Manera, E. Beghi, G. Logroscino, R.C.H. Vermeulen, J.H. Veldink, L.H. van den Berg, O. Hardiman, A. Chiò, Association between alcohol exposure and the risk of amyotrophic lateral sclerosis in the Euro-MOTOR study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 90 (2019) 11–19. doi:10.1136/jnnp-2018-318559.
- [102] A.E. Visser, J.P.K. Rooney, F. D’Ovidio, H.-J. Westeneng, R.C.H. Vermeulen, E. Beghi, A. Chiò, G. Logroscino, O. Hardiman, J.H. Veldink, L.H. van den Berg, Multicentre, cross-cultural, population-based, case–control study of physical activity as risk factor for amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 89 (2018) 797–803. doi:10.1136/jnnp-2017-317724.
- [103] M. Neumann, D.M. Sampathu, L.K. Kwong, A.C. Truax, M.C. Micsenyi, T.T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C.M. Clark, L.F. McCluskey, B.L. Miller, E. Masliah, I.R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H.A. Kretschmar, J.Q. Trojanowski, V.M.Y. Lee, Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Science*. 314 (2006) 130–133. doi:10.1126/science.1134108.
- [104] R.H. Brown, A. Al-Chalabi, Amyotrophic Lateral Sclerosis, *N. Engl. J. Med*. 377 (2017) 162–172. doi:10.1056/NEJMra1603471.

- [105] M.C. Evans, Y. Couch, N. Sibson, M.R. Turner, Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis, *Mol. Cell. Neurosci.* 53 (2013) 34–41. doi:10.1016/j.mcn.2012.10.008.
- [106] W. Camu, M. Mickunas, J.-L. Veyrone, C. Payan, C. Garlanda, M. Locati, R. Juntas-Morales, N. Pageot, A. Malaspina, U. Andreasson, J. Kirby, C. Suehs, S. Saker, C. Masseguin, J. De Vos, H. Zetterberg, P.J. Shaw, A. Al-Chalabi, P.N. Leigh, T. Tree, G. Bensimon, Repeated 5-day cycles of low dose aldesleukin in amyotrophic lateral sclerosis (IMODALS): A phase 2a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *EBioMedicine.* 59 (2020) 102844. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102844.
- [107] B. Gille, M. De Schaepdryver, L. Dedeene, J. Goossens, K.G. Claeys, L. Van Den Bosch, J. Tournoy, P. Van Damme, K. Poesen, Inflammatory markers in cerebrospinal fluid: independent prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis?, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 90 (2019) 1338–1346. doi:10.1136/jnnp-2018-319586.
- [108] D.R. Beers, S.H. Appel, Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies, *Lancet Neurol.* 18 (2019) 211–220. doi:10.1016/S1474-4422(18)30394-6.
- [109] L.-C. Béland, A. Markovinovic, H. Jakovac, F. De Marchi, E. Bilic, L. Mazzini, J. Kriz, I. Munitic, Immunity in amyotrophic lateral sclerosis: blurred lines between excessive inflammation and inefficient immune responses, *Brain Commun.* 2 (2020). doi:10.1093/braincomms/fcaa124.
- [110] M.S. Lyon, M. Wosiski-Kuhn, R. Gillespie, J. Caress, C. Milligan, Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology, *Muscle Nerve.* 59 (2019) 10–22. doi:10.1002/mus.26289.
- [111] S.H. Appel, D.R. Beers, W. Zhao, Amyotrophic lateral sclerosis is a systemic disease, *Curr. Opin. Neurol. Publish Ah* (2021) 1–8. doi:10.1097/WCO.0000000000000983.
- [112] C.-H. Lu, K. Allen, F. Oei, E. Leoni, J. Kuhle, T. Tree, P. Fratta, N. Sharma, K. Sidle, R. Howard, R. Orrell, M. Fish, L. Greensmith, N. Pearce, V. Gallo, A. Malaspina, Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis, *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation.* 3 (2016) e244. doi:10.1212/NXI.0000000000000244.
- [113] C. Zecca, M.T. Dell’Abate, G. Pasculli, R. Capozzo, R. Barone, S. Arima, A. Pollice, V. Brescia, R. Tortelli, G. Logroscino, Role of plasma phosphorylated neurofilament heavy chain (pNfH) in amyotrophic lateral sclerosis, *J. Cell. Mol. Med.* 26 (2022) 3608–3615. doi:10.1111/jcmm.17232.
- [114] M.C. Kiernan, S. Vucic, K. Talbot, C.J. McDermott, O. Hardiman, J.M. Shefner, A. Al-Chalabi, W. Huynh, M. Cudkowicz, P. Talman, L.H. Van den Berg, T. Dharmadasa, P. Wicks, C. Reilly, M.R. Turner, Improving clinical trial outcomes in amyotrophic lateral sclerosis, *Nat. Rev. Neurol.* 17 (2021) 104–118. doi:10.1038/s41582-020-00434-z.
- [115] X. Chen, Y. Hu, Z. Cao, Q. Liu, Y. Cheng, Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer’s Disease, Parkinson’s Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–10. doi:10.3389/fimmu.2018.02122.

- [116] A. Henriques, V. Croixmarie, D.A. Priestman, A. Rosenbohm, S. Dirrig-Grosch, E. D’Ambra, M. Huebecker, G. Hussain, C. Boursier-Neyret, A. Echaniz-Laguna, A.C. Ludolph, F.M. Platt, B. Walther, M. Spedding, J.P. Loeffler, J.L.G. De Aguilar, Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 7390–7405. doi:10.1093/hmg/ddv439.
- [117] H. Blasco, C. Veyrat-Durebex, C. Bocca, F. Patin, P. Vourc’h, J. Kouassi Nzougnet, G. Lenaers, C.R. Andres, G. Simard, P. Corcia, P. Reynier, Lipidomics Reveals Cerebrospinal-Fluid Signatures of ALS, *Sci. Rep.* 7 (2017) 17652. doi:10.1038/s41598-017-17389-9.
- [118] E. Area-Gomez, D. Larrea, T. Yun, Y. Xu, J. Hupf, F. Zandkarimi, R.B. Chan, H. Mitsumoto, Lipidomics study of plasma from patients suggest that ALS and PLS are part of a continuum of motor neuron disorders, *Sci. Rep.* 11 (2021) 13562. doi:10.1038/s41598-021-92112-3.
- [119] É.J. O’Reilly, K. Bjornevik, J.D. Furtado, L.N. Kolonel, L. Le Marchand, M.L. McCullough, V.L. Stevens, A.H. Shadyab, L. Snetselaar, J.E. Manson, A. Ascherio, Prediagnostic plasma polyunsaturated fatty acids and the risk of amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology.* 94 (2020) e811–e819. doi:10.1212/WNL.0000000000008676.
- [120] G. Fernández-Eulate, J.I. Ruiz-Sanz, J. Riancho, M. Zufiría, G. Gereñu, R. Fernández-Torrón, J.J. Poza-Aldea, J. Ondaro, J.B. Espinal, G. González-Chinchón, M. Zulaica, M.B. Ruiz-Larrea, A. López De Munain, F.J. Gil-Bea, A comprehensive serum lipidome profiling of amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 21 (2020) 252–262. doi:10.1080/21678421.2020.1730904.
- [121] J. Sol, M. Jové, M. Povedano, W. Sproviero, R. Domínguez, G. Piñol-Ripoll, R. Romero-Guevara, A. Hye, A. Al-Chalabi, P. Torres, P. Andres-Benito, E. Area-Gómez, R. Pamplona, I. Ferrer, V. Ayala, M. Portero-Otín, Lipidomic traits of plasma and cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis correlate with disease progression, *Brain Commun.* 3 (2021). doi:10.1093/braincomms/fcab143.
- [122] R\_Team\_Core, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, (2021). <https://www.r-project.org/>.
- [123] N.H. Schebb, H. Kühn, A.S. Kahnt, K.M. Rund, V.B. O’Donnell, N. Flamand, M. Peters-Golden, P.-J. Jakobsson, K.H. Weylandt, N. Rohwer, R.C. Murphy, G. Geisslinger, G.A. FitzGerald, J. Hanson, C. Dahlgren, M.W. Alnouri, S. Offermanns, D. Steinhilber, Formation, Signaling and Occurrence of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators—What is the Evidence so far?, *Front. Pharmacol.* 13 (2022) 1–22. doi:10.3389/fphar.2022.838782.
- [124] US Food and Drug Administration, Bioanalytical method validation Guidance for Industry, (2018). <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm>.
- [125] E.M. Agency, Guideline on bioanalytical method validation, London, 2011. [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact).

- [126] R.A. Colas, M. Shinohara, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue, *Am. J. Physiol. Physiol.* 307 (2014) C39–C54. doi:10.1152/ajpcell.00024.2014.
- [127] C.N. Serhan, Discovery of specialized pro-resolving mediators marks the dawn of resolution physiology and pharmacology, *Mol. Aspects Med.* 58 (2017) 1–11. doi:10.1016/j.mam.2017.03.001.
- [128] A.I. Ostermann, A.L. West, K. Schoenfeld, L.M. Browning, C.G. Walker, S.A. Jebb, P.C. Calder, N.H. Schebb, Plasma oxylipins respond in a linear dose-response manner with increased intake of EPA and DHA: results from a randomized controlled trial in healthy humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 109 (2019) 1251–1263. doi:10.1093/ajcn/nqz016.
- [129] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917. doi:10.1139/o59-099.
- [130] J. Dalli, R.A. Colas, M.E. Walker, C.N. Serhan, Lipid mediator metabolomics via LC-MS/MS profiling and analysis, in: M. Giera (Ed.), *Clin. Metabolomics Methods Protoc.*, 1st ed., Humana Press, 2018: pp. 59–72.
- [131] Y. Wang, A.M. Armando, O. Quehenberger, C. Yan, E.A. Dennis, Comprehensive ultra-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric analysis of eicosanoid metabolites in human samples, *J. Chromatogr. A.* 1359 (2014) 60–69. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.006.
- [132] G. Astarita, A.C. Kendall, E.A. Dennis, A. Nicolaou, Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851 (2015) 456–468. doi:10.1016/j.bbalip.2014.11.012.
- [133] M. Masoodi, A.A. Mir, N.A. Petasis, C.N. Serhan, A. Nicolaou, Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 75–83. doi:10.1002/rcm.3331.
- [134] K.J. Polinski, M. Armstrong, J. Manke, J. Seifert, T. Crume, F. Yang, M. Clare-Salzler, V.M. Holers, N. Reisdorph, J.M. Norris, Collection and Storage of Human Plasma for Measurement of Oxylipins, *Metabolites.* 11 (2021) 137. doi:10.3390/metabo11030137.
- [135] H.S. Jonasdottir, H. Brouwers, R.E.M. Toes, A. Ioan-Facsinay, M. Giera, Effects of anticoagulants and storage conditions on clinical oxylipid levels in human plasma, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1863 (2018) 1511–1522. doi:10.1016/j.bbalip.2018.10.003.
- [136] C. Gladine, A.I. Ostermann, J.W. Newman, N.H. Schebb, MS-based targeted metabolomics of eicosanoids and other oxylipins: Analytical and inter-individual variabilities, *Free Radic. Biol. Med.* 144 (2019) 72–89. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.012.

- [137] A.I. Ostermann, T. Greupner, L. Kutzner, N.M. Hartung, A. Hahn, J.P. Schuchardt, N.H. Schebb, Intra-individual variance of the human plasma oxylipin pattern: low inter-day variability in fasting blood samples versus high variability during the day, *Anal. Methods*. 10 (2018) 4935–4944. doi:10.1039/C8AY01753K.
- [138] M. Mastrogiovanni, E. Ifrán, A. Trostchansky, H. Rubbo, Lipidomic Analysis of Oxygenated Polyunsaturated Fatty Acid–Derived Inflammatory Mediators in Neurodegenerative Diseases, in: P. Wood (Ed.), *Metab. - Neuromethods* 159, 1ed ed., Springer Science+Business Media, New York, NY, 2021: pp. 121–141. doi:10.1007/978-1-0716-0864-7\_11.
- [139] A. Sánchez-Fernández, S. Zandee, M. Mastrogiovanni, M. Charabati, H. Rubbo, A. Prat, R. López-Vales, Administration of Maresin-1 ameliorates the physiopathology of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroinflammation*. 19 (2022) 27. doi:10.1186/s12974-022-02386-1.
- [140] V.N. Vangaveti, H. Jansen, R.L. Kennedy, U.H. Malabu, Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer, *Eur. J. Pharmacol.* 785 (2016) 70–76. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.096.
- [141] Y. Yoshida, A. Yoshikawa, T. Kinumi, Y. Ogawa, Y. Saito, K. Ohara, H. Yamamoto, Y. Imai, E. Niki, Hydroxyoctadecadienoic acid and oxidatively modified peroxiredoxins in the blood of Alzheimer's disease patients and their potential as biomarkers, *Neurobiol. Aging*. 30 (2009) 174–185. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.012.
- [142] J.W. Newman, C. Morisseau, B.D. Hammock, Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism, *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 1–51. doi:10.1016/j.plipres.2004.10.001.
- [143] D.C. Nieman, M.P. Meaney, C.S. John, K.J. Knagge, H. Chen, 9- and 13-Hydroxy-octadecadienoic acids (9 + 13 HODE) are inversely related to granulocyte colony stimulating factor and IL-6 in runners after 2 h running, *Brain. Behav. Immun.* 56 (2016) 246–252. doi:10.1016/j.bbi.2016.03.020.
- [144] K.I. Stanford, M.D. Lynes, H. Takahashi, L.A. Baer, P.J. Arts, F.J. May, A.C. Lehnig, R.J.W. Middelbeek, J.J. Richard, K. So, E.Y. Chen, F. Gao, N.R. Narain, G. Distefano, V.K. Shettigar, M.F. Hirshman, M.T. Ziolo, M.A. Kiebish, Y.-H. Tseng, P.M. Coen, L.J. Goodyear, 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake, *Cell Metab.* 27 (2018) 1111-1120.e3. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.020.
- [145] X. Wang, M. Zhu, E. Hjorth, V. Cortés-Toro, H. Eyjolfsdottir, C. Graff, I. Nennesmo, J. Palmblad, M. Eriksdotter, K. Sambamurti, J.M. Fitzgerald, C.N. Serhan, A.-C. Granholm, M. Schultzberg, Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease, *Alzheimer's Dement.* 11 (2015) 40. doi:10.1016/j.jalz.2013.12.024.

- [146] G. Kooij, C.D. Troletti, A. Leuti, P.C. Norris, I. Riley, M. Albanese, S. Ruggieri, S. Libreros, S.M.A. van der Pol, B. van het Hof, Y. Schell, G. Guerrera, F. Buttari, N.B. Mercuri, D. Centonze, C. Gasperini, L. Battistini, H.E. de Vries, C.N. Serhan, V. Chiurchiù, Specialized pro-resolving lipid mediators are differentially altered in peripheral blood of patients with multiple sclerosis and attenuate monocyte and blood-brain barrier dysfunction, *Haematologica*. 105 (2020) 2056–2070. doi:10.3324/haematol.2019.219519.
- [147] C.N. Serhan, M. Hamberg, B. Samuelsson, Trihydroxytetraenes: A novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 (1984) 943–949. doi:10.1016/0006-291X(84)91486-4.
- [148] C.N. Serhan, C.B. Clish, J. Brannon, S.P. Colgan, N. Chiang, K. Gronert, Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1197–1204. doi:10.1084/jem.192.8.1197.
- [149] S. Libreros, A.E. Shay, R. Nshimiyimana, D. Fichtner, M.J. Martin, N. Wourms, C.N. Serhan, A New E-Series Resolvin: RvE4 Stereochemistry and Function in Efferocytosis of Inflammation-Resolution, *Front. Immunol.* 11 (2021). doi:10.3389/fimmu.2020.631319.
- [150] S. Hong, K. Gronert, P.R. Devchand, R.L. Moussignac, C.N. Serhan, Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells: Autacoids in anti-inflammation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14677–14687. doi:10.1074/jbc.M300218200.
- [151] C.N. Serhan, S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, R.L. Moussignac, Resolvins: A family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 1025–1037. doi:10.1084/jem.20020760.
- [152] C.N. Serhan, K. Gotlinger, S. Hong, Y. Lu, J. Siegelman, T. Baer, R. Yang, S.P. Colgan, N.A. Petasis, Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes., *J. Immunol.* 176 (2006) 3843.2-3843. doi:10.4049/jimmunol.176.6.3843-a.
- [153] C.N. Serhan, G. Fredman, R. Yang, S. Karamnov, L.S. Belayev, N.G. Bazan, M. Zhu, J.W. Winkler, N.A. Petasis, Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway, *Chem. Biol.* 18 (2011) 976–987. doi:10.1016/j.chembiol.2011.06.008.
- [154] C.N. Serhan, R. Yang, K. Martinod, K. Kasuga, P.S. Pillai, T.F. Porter, S.F. Oh, M. Spite, Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 15–23. doi:10.1084/jem.20081880.
- [155] G. Sinha, Doubt cast on inflammation's stop signals, *Science*. 376 (2022) 565–566. doi:10.1126/science.abq8310.
- [156] C.N. Serhan, S.D. Brain, C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C. Haslett, L.A.J. O'Neill, M. Perretti, A.G. Rossi, J.L. Wallace, Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *FASEB J.* 21 (2007) 325–332. doi:10.1096/fj.06-7227rev.

- [157] P.C. Calder, Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid derived specialised pro-resolving mediators: Concentrations in humans and the effects of age, sex, disease and increased omega-3 fatty acid intake, *Biochimie*. 178 (2020) 105–123. doi:10.1016/j.biochi.2020.08.015.
- [158] R.C. Murphy, Specialized pro-resolving mediators: Do they circulate in plasma?, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1641–1642. doi:10.1194/jlr.C062356.
- [159] A. Barden, E. Mas, K.D. Croft, M. Phillips, T.A. Mori, Short-term n-3 fatty acid supplementation but not aspirin increases plasma proresolving mediators of inflammation, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 2401–2407. doi:10.1194/jlr.M045583.
- [160] C. Skarke, N. Alamuddin, J.A. Lawson, X. Li, J.F. Ferguson, M.P. Reilly, G.A. FitzGerald, Bioactive products formed in humans from fish oils, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1808–1820. doi:10.1194/jlr.M060392.
- [161] H.H. Arnardottir, J. Dalli, L. V. Norling, R.A. Colas, M. Perretti, C.N. Serhan, Resolvin D3 Is Dysregulated in Arthritis and Reduces Arthritic Inflammation, *J. Immunol.* 197 (2016) 2362–2368. doi:10.4049/jimmunol.1502268.
- [162] T.K. Elajami, R.A. Colas, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, F.K. Welty, Specialized proresolving lipid mediators in patients with coronary artery disease and their potential for clot remodeling, *FASEB J.* 30 (2016) 2792–2801. doi:10.1096/fj.201500155R.
- [163] A.E. Barden, V. Chavez, M. Phillips, E. Mas, L.J. Beilin, K.D. Croft, T.A. Mori, I.B. Puddey, A Randomized Trial of Effects of Alcohol on Cytochrome P450 Eicosanoids, Mediators of Inflammation Resolution, and Blood Pressure in Men, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 41 (2017) 1666–1674. doi:10.1111/acer.13466.
- [164] M. Mainka, C. Dalle, M. Pétéra, J. Dalloux-Chioccioli, N. Kampschulte, A.I. Ostermann, M. Rothe, J. Bertrand-Michel, J.W. Newman, C. Gladine, N.H. Schebb, Harmonized procedures lead to comparable quantification of total oxylipins across laboratories, *J. Lipid Res.* 61 (2020) 1424–1436. doi:10.1194/jlr.RA120000991.
- [165] V. O'Donnell, N.H. Schebb, G. Milne, M. Murphy, C.P. Thomas, D. Steinhilber, S.G. Wendell, H. Kühn, P.-J. Jakobsson, I. Blair, R.C. Murphy, B.A. Freeman, A.R. Brash, G. FitzGerald, Failure to apply standard limit-of-detection or limit-of-quantitation criteria to specialized pro-resolving mediator analysis incorrectly characterizes their presence in biological samples, *Zenodo Prepr. Serv.* (2021) 1–14. <https://zenodo.org/record/5766267#.Yqbni6FByUk>.
- [166] E.A. Gomez, R.A. Colas, P.R. Souza, R. Hands, M.J. Lewis, C. Bessant, C. Pitzalis, J. Dalli, Blood pro-resolving mediators are linked with synovial pathology and are predictive of DMARD responsiveness in rheumatoid arthritis, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–13. doi:10.1038/s41467-020-19176-z.
- [167] G. Fredman, L. Ozcan, S. Spolitu, J. Hellmann, M. Spite, J. Backs, I. Tabas, Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B<sub>4</sub> synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 14530–14535. doi:10.1073/pnas.1410851111.



- [168] M.O. Freire, J. Dalli, C.N. Serhan, T.E. Van Dyke, Neutrophil Resolvin E1 Receptor Expression and Function in Type 2 Diabetes, *J. Immunol.* 198 (2017) 718–728. doi:10.4049/jimmunol.1601543.
- [169] L. V. Norling, L. Ly, J. Dalli, Resolving inflammation by using nutrition therapy, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 20 (2017) 145–152. doi:10.1097/MCO.0000000000000353.
- [170] J. Dalli, S. Ramon, P.C. Norris, R.A. Colas, C.N. Serhan, Novel proresolving and tissue-regenerative resolvin and protectin sulfido-conjugated pathways, *FASEB J.* 29 (2015) 2120–2136. doi:10.1096/fj.14-268441.
- [171] J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Elucidation of novel 13-series resolvins that increase with atorvastatin and clear infections, *Nat. Med.* 21 (2015) 1071–1075. doi:10.1038/nm.3911.
- [172] J. Dalli, E.A. Gomez, C.N. Serhan, Evidence for the presence and diagnostic utility of SPM in human peripheral blood, *BioRxiv.* (2022). doi:10.1101/2022.04.28.489064.

## ANEXOS

**ANEXO 1** - Espectros de fragmentación.

**ANEXO 2** - Tabla con lista de transiciones y parámetros para método *sMRM Pro*.

**ANEXO 3** - Tabla con lista de transiciones y parámetros para método MRM en 4 períodos.

**ANEXO 4** - Suplementación de plasma con oxilipinas.

**ANEXO 5** - Límite de detección y cuantificación para SPM y metabolitos relacionados.

**ANEXO 6** - Artículo. Mastrogiovanni *et al*, HPLC-MS/MS Oxylipin Analysis of Plasma from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients, *Biomedicines*. 10 (2022) 674. doi:10.3390/biomedicines10030674.

**ANEXO 7** - Capítulo libro. M. Mastrogiovanni *et al*, Lipidomic Analysis of Oxygenated Polyunsaturated Fatty Acid–Derived Inflammatory Mediators in Neurodegenerative Diseases, en: P. Wood (Ed.), *Metab. - Neuromethods* 159, 1ed ed., Springer Science+Business Media, New York, NY, 2021: pp. 121–141. doi:10.1007/978-1-0716-0864-7\_11.

**ANEXO 8** - Artículo. Sánchez-Fernández *et al*, Administration of Maresin-1 ameliorates the physiopathology of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroinflammation*. 19 (2022) 27. doi:10.1186/s12974-022-02386-1. Ruben EM