



**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**  
**(Bioquímica)**

**Priscilla Bento Matos Cruz Derogis**

ESTUDOS DOS PRODUTOS DA OXIDAÇÃO NÃO  
ENZIMÁTICA DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO COMO  
POSSÍVEIS BIOMARCADORES PARA DOENÇAS  
NEURODEGENERATIVAS

**Versão corrigida da Tese defendida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

01/ 07/2014

**Priscilla Bento Matos Cruz Derogis**

**ESTUDOS DOS PRODUTOS DA OXIDAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA  
DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO COMO POSSÍVEIS  
BIOMARCADORES PARA DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Tese apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do Título de doutor em  
Ciências (Bioquímica)

Orientador: Profa. Dra. Sayuri  
Miyamoto

São Paulo

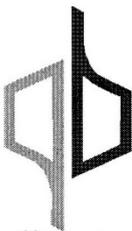
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

D437e	Derogis, Priscilla Bento Matos Cruz Estudos dos produtos da oxidação não enzimática do ácido docosaheptaenoico como possíveis biomarcadores para doenças neurodegenerativas / Priscilla Bento Matos Cruz Derogis. -- São Paulo, 2014. 151p.  Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Miyamoto, Sayuri.  1. Bioquímica 2. Lipídeos : Metabolismo 3. Bioquímica clínica I. T. II. Miyamoto, Sayuri, orientador.  574.192 CDD
-------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Estudos dos produtos da oxidação não enzimática  
do ácido docosahexaenoico como possíveis  
biomarcadores para doenças neurodegenerativas”**

**PRISCILLA BENTO MATOS CRUZ DEROGIS**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências – Área: Bioquímica.

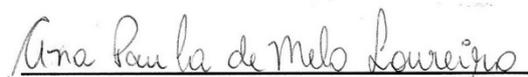
Aprovado (a) por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Sayuri Miyamoto  
(Orientadora e Presidente)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Iolanda Midea Cuccovia  
IQ - USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Flávia Carla Meotti  
IQ - USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia  
ICB - USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro  
FCF - USP

SÃO PAULO  
05 de setembro de 2014

*Aos meus pais, Maria Fernanda e  
Paulo José, ao meu irmão Rômulo  
e ao meu amor Fernando por tudo.*

## AGRADECIMENTOS

Desenvolver um trabalho de doutorado durante mais de quatro anos e resumir todos os esforços em uma tese só é possível graças ao apoio de muitas pessoas e, por isso, tenho muito a agradecer. A todos vocês familiares, amigos, colegas, professores e colaboradores faço questão de demonstrar explicitamente a muita eterna gratidão.

A Deus por ser meu guia e por colocar pessoas especiais no meu caminho que me auxiliaram, tanto profissionalmente quanto pessoalmente, nos últimos 5 anos.

À professora Sayuri Miyamoto pela orientação científica constante, incentivo, confiança, parcerias firmadas e oportunidade de desenvolver o presente trabalho. Pelos ensinamentos e por sempre me permitir ir mais além, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores Marisa Helena Gennari de Medeiros, Paolo Di Mascio, Miriam Uemi, Janice Onuki e Alicia Juliana Kowaltowski pela colaboração científica, apoio e críticas construtivas.

Às professoras Elisete C. Quintaneiro Aubin e Viviana Giampaoli, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo pelo imprescindível suporte na análise estatística.

A todos os professores do Instituto de Química que foram sempre prestativos e que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas Marcelo Henrique dos Santos, Claudio Viegas, Marcia Veloso, Olinda Vilas-Boas, Geraldo Alves da Silva que me apresentaram o gosto pela pesquisa científica.

Aos amigos Angélica Sanchez (Angel, a forma como te chamamos combina exatamente com o que você representa para mim), Adriano Filho (mais um irmão que adotei), Alexsandra Scalfó (Alê, sempre presente e solícita), Daniela Cunha (Dani, pessoa mais organizada que eu conheço), Florêncio Freitas (Amigo com A, muitas vezes você

foi meu ombro amigo para desabafar, meus braços para executar determinadas tarefas...), Thiago Matos (Thiaguito, com quem muito discuti e aprendi) e Patricia Appolinário (amiga querida com a qual formava a dupla Paty –Pri, como temos coisas em comum...), pela amizade e carinho, presença constante, apoio fundamental, momentos inesquecíveis, cafezinhos que tomamos... Enfim por tudo o que fizeram por mim.

Aos amigos e colegas Adriana Domarques, Alessandra Sussulini, Camila Carrião, Erich B. Tahara, Fernando Mansano, José Pedro Angeli, Júlio, Leticia Anderson, Lucas Souza, Nicole Noda, Rafaela Kazaoka, Raphael Queiroz, Rita Tokikawa, Silvio Oliveira, Tatiana Yamaguti e Vanderson Bispo pela amizade e pelos momentos que passamos juntos.

À Andressa Bolsoni-Lopes pelo lindo trabalho que desenvolvemos. Pela dedicação e carinho.

À minha querida amiga Maurette pela amizade que começou em Minas e pretendo levar para onde eu for.

Aos amigos Fabio Gomes, Iná Caputo, Renata e Rafael Ferrari, por deixarem a minha vida mais alegre.

Às técnicas do nosso laboratório Adriana Wendel e Zilda Izzo (Zildinha) com quem sempre pude contar.

Ao Osmar Francisco Gomes pela transmissão de conhecimento.

Às técnicas Izaura Toma, Fernanda Manso, Alessandra, Giovana, Luzia e a todos os outros funcionários que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A todos os órgãos de apoio à pesquisa tornam possível o trabalho dentro da universidade: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), INCT de Processos redox em Biomedicina-Redoxoma e Pró-Reitoria-USP.

A empresa Waters Technologies do Brasil, nomeadamente à Anna S. F. Marques, ao Fernando de Paula, ao Tiago C. Lourenço, ao Michael Murgu, ao Danilo Pereira e à Grasiela Bonfanti pela disponibilidade da estrutura, pelo conhecimento e pela dedicação.

Aos amigos da empresa ABSciex Helio Martins e Aluísio, pela dedicação e amizade. Sou eternamente grata a toda a confiança depositada e por tudo o que fizeram. À querida amiga Viviane Nascimento, Mateus Campos, Célio Buganza, Daniella Benchimol e a todos os outros que me acolheram com tanto carinho e profissionalismo exemplar. À Brigitte Simons pelo conhecimento transmitido, trabalho inspirador e auxílio. Ao Xu Wang pela análise desenvolvida nos EUA. Obrigada por tudo.

Aos meus pais Maria Fernanda e Paulo José e ao meu irmão, pelo amor, exemplo que são, carinho, dedicação, apoio incondicional, por tudo. Nem um oceano nos separando fisicamente é obstáculo para tudo o que vocês fizeram, fazem e farão sempre por mim. Amo muito vocês.

Ao meu amor, Fernando, que sempre esteve do meu lado com muito amor, que me permitiu sonhar e correr atrás dos meus objetivos e da minha formação, que suportou a minha ausência em diversos momentos e a minha intensa dedicação ao trabalho e que, acima de tudo, sempre me mostrou o que a vida tem de bom a oferecer. Meu eterno agradecimento e amor.

A todos os meus familiares que são a minha base e o meu porto seguro.

Muito muito obrigada a todos.

*“Pode ser que um dia tudo acabe...Mas, com a amizade construiremos tudo novamente, Cada vez de forma diferente. Sendo único e inesquecível cada momento. Que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre. Há duas formas para viver a sua vida: uma é acreditar que não existe milagre. A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

DEROGIS, P. B. M. C. Estudos dos produtos da oxidação não enzimática do ácido docosahexaenoico como possíveis biomarcadores para doenças neurodegenerativas. 2014. 151 p. Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

Os n-3 e n-6 são duas famílias de ácidos graxos poli-insaturados. Os ácidos graxos de cadeia longa como o ácido araquidônico (AA) e docosahexaenoico (DHA) apresentam importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro. Os produtos de oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados estão presentes ou aumentados ao longo do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A caracterização de tais produtos é crítica para o estudo que busca entender o seu papel fisiopatológico no desenvolvimento de tais doenças. No presente trabalho, buscou-se o desenvolvimento de uma ferramenta analítica sensível e específica para a detecção e quantificação dos hidroperóxidos e hidróxidos do AA (HpETE e HETE), do seu precursor, o ácido linoleico (HpODE e HODE) e do DHA (HpDoHE e HDoHE). Estes hidroperóxidos foram sintetizados por fotooxidação e os hidróxidos correspondentes foram obtidos através da redução com o NaBH<sub>4</sub>. Os isômeros isolados foram caracterizados por LC-MS/MS. Os íons produto específicos de cada isômero foram escolhidos para a construção do método de monitoramento de reação selecionada (*selected reaction monitoring* - SRM) para a realização da análise quantitativa dos analitos de interesse. Cabe salientar que os dados obtidos poderão ser utilizados em bibliotecas de análise lipídômica e oxi-lipídômica pois serão essenciais para a identificação e quantificação dos analitos de interesse do presente estudo em diversas doenças. Utilizando o método padronizado, buscamos investigar o papel dos hidroperóxidos e hidróxidos do DHA, LA e AA em um modelo animal para a esclerose lateral amiotrófica (ELA), uma doença neurodegenerativa que acomete neurônios motores. Foi observado um aumento nos níveis de 13-HpODE, 9-HpODE e 12-HETE no córtex motor dos animais avaliados. Adicionalmente, foram observadas alterações nas taxas lipólise e lipogênica no tecido adiposo para os animais ELA em relação aos respectivos controles. Em conjunto, os dados apresentados no presente trabalho corroboram com os trabalhos da literatura que associam alteração dos níveis dos produtos de oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados em doenças neurodegenerativas e o metabolismo energético alterado em ELA. Futuramente é necessária uma investigação mais ampla dos níveis dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos em diferentes tecidos e do metabolismo lipídico, e os conhecimentos gerados poderão ser uma importante fonte de novas opções terapêuticas para os pacientes portadores de ELA.

Palavras-chave: ácido docosahexaenoico, produtos de oxidação, espectrometria de massas, metabolismo lipídico

## ABSTRACT

DEROGIS, P. B. M. C. Study of Docosahexaenoic acid non-enzymatic oxidation products as biomarkers for neurodegenerative diseases. 2014. 151 p. [Ph. D. thesis (Biochemistry) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

The n-3 and n-6 are two polyunsaturated fatty acids families. The long chain fatty acids such as arachidonic (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) have important roles in the development and function of the brain. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) oxidation products are present or increased during the progression of neurodegenerative diseases. The characterization of DHA oxidation products is critical to understand their roles in the development of such diseases. In the present study, we sought to develop a sensitive and specific analytical tool for the detection and quantification of AA hydroperoxides and hydroxides (HPETE and HETE), its precursor linoleic acid (HPODE and HODE) and DHA (HpDoHE and HDoHE). These hydroperoxides were synthesized by photooxidation and the corresponding hydroxides were obtained by reduction with NaBH<sub>4</sub>. The isolated isomers were characterized by LC-MS/MS, and unique and specific fragment ions were chosen to construct a selected reaction monitoring (SRM) method for the targeted quantitative analysis. It should be emphasized that the data obtained - in the form of lipidomics and oxy-lipidomics libraries - may be used to assist in several diseases. Using the standardized method, we investigated the role of hydroperoxides and hydroxides of DHA, LA and AA in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disease that affects motor neurons. Increased levels of 13-HPODE, 9-HPODE and 12-HETE were observed in the animals motor cortex. Additionally, results show changes in lipogenic and lipolytic rates in adipose tissue for ALS animals when compared to their respective controls. Altogether, the data presented herein corroborate with the literature by linking altered levels of PUFAs oxidation products in neurodegenerative diseases with altered energetic metabolism in ALS. In the future, a more extensive investigation of the hydroperoxide and hydroxide level in different tissues as well as the lipid metabolism must be done, which could lead to new therapeutic options for ALS patients.

Keywords: docosahexaenoic acid, oxidation products, mass spectrometry, lipid metabolism

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biossíntese de PUFAs em mamíferos. O ALA é alongado e dessaturado por uma série de reações enzimáticas, levando a formação EPA e do DHA. O ácido linoleico obtido da dieta é dessaturado, formando o ácido $\gamma$ -linolênico (n-6), que sofre um alongamento da sua cadeia carbônica, originando o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (n-6), o qual é dessaturado, formando o ácido araquidônico (n-6). Fonte: Wall et al 2010 e Appolinário et al 2011. ....	25
Figura 2: Estrutura básica dos fosfolípidos. Os fosfolípidos podem ter como base o glicerol ou a esfingosina. Na presente figura estão esquematizados os que são derivados do glicerol, os chamados fosfoglicerídeos. Estes apresentam a esterificação de dois ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-2 do glicerol e na posição sn-3 há um fosfato formando o composto conhecido como diacilglicerol 3-fosfato. O grupamento R ligado ao fosfato pode ser a etanolamina, a serina, a colina, o inositol, o glicerol ou o fosfatidilglicerol. 26	26
Figura 3 Estrutura do ácido docosahexaenoico. Em destaque os hidrogênios bis-aliílicos que são altamente suscetíveis à oxidação. ....	29
Figura 4: Produtos de oxidação enzimática e não enzimática do DHA, LA e AA. ....	34
Figura 5: Esquema da fotooxidação de PUFA. ....	39
Figura 6: O $^1O_2$ se adiciona diretamente aos carbonos das ligações duplas (A) (4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 e 20) e conseqüentemente são formados 12 isômeros de hidroperóxidos do ácido docosahexaenoico (HpDoHE); (B) (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 e 15) e conseqüentemente são formados 8 isômeros de hidroperóxidos do ácido araquidônico (HpETE) e (C) (9, 10, 12 e 13) e conseqüentemente são formados 4 isômeros de hidroperóxidos do ácido linoleico (HpODE).....	63
Figura 7: Formação dos hidroperóxidos lipídicos em decorrência da reação de fotooxidação dos ácidos graxos ao longo do tempo. (A) Os isômeros foram analisados por UV através da leitura em modo scan de 200 a 400nm. Para quantificação foi utilizada a leitura em 235 nm; (B) As alíquotas de HpDoHE foram analisadas por TLC eluída com clorofórmico: metanol (90:6); (C) espectros de absorbância das alíquotas da reação de fotooxidação do ácido araquidônico e (F) respectivo perfil cromatográfico quando analisados por TLC. (E) espectros de absorbância das alíquotas da reação de fotooxidação do ácido linoleico e (F) respectivo perfil cromatográfico quando analisados por TLC. 64	64
Figura 8: Análise cromatográfica da mistura de HpDoHE resultantes da fotooxidação, do 19-HpDHA e do 5-HpDoHE. As três amostras foram analisadas por HPLC utilizando a coluna kinetex C18, 100x 2,1mm, 2.6 $\mu$ m, eluída com um gradiente composto por água: acetonitrila: ácido fórmico (45:55:0,05), com fluxo 0,2mL/min e detecção por arranjos de diodos em 205 (cromatogramas em preto, azul e verde, respectivamente) e 235nm (cromatogramas em rosa, marrom e azul escuro, respectivamente). O 19 e o5-HpDoHe não possuem dienos conjugados por isso não absorvem no comprimento de onda 235nm (vide círculos vermelhos). ....	65
Figura 9: Análise cromatográfica do 8-HpDoHE e seu correspondente hidróxido. Em azul, é possível verificar que após a redução do 8-HpDoHE pelo $NaBH_4$ há um consumo total do hidroperóxido acompanhado da formação do 8-HDoHE.....	66
Figura 10: Diagrama de seleção de coluna (Waters Technologies do Brasil). Foram selecionadas 4 colunas de UPLC (50 x 2.1 mm) marcadas em vermelho.....	68

Figura 11: Análise de uma mistura de HpDoHE e HDoHE por UPLC-MS. Os HpDoHE foram detectados através do monitoramento do precursor com m/z 359 (A) e os HDoHE com m/z 343 (B). Cada pico cromatográfico detectado foi numerado e posteriormente identificado pela através da análise dos fragmentos.....	71
Figura 12: Esquema de identificação dos fragmentos específicos da análise por MS/MS dos HpDoHE e HDoHE.....	73
Figura 13: Espectro de fragmentação dos 12 isômeros HpDoHE injetados isoladamente para a análise por LC-MSMS – espectro MS/MS dos íons produto do precursor com m/z 359. As setas em vermelho indicam o íon precursor e o íon decorrente da desidratação do precursor. Os círculos indicam os íons produto selecionados para o método de SRM. Os números em vermelho estão relacionados aos picos numerados no cromatograma da Figura 11.....	76
Figura 14: Espectro de fragmentação dos 12 isômeros HDoHE, injetados isoladamente para a análise por LC-MSMS – espectro MS/MS dos íons produto do precursor com m/z 343. Os círculos e setas indicam os íons produto selecionados para o método de SRM. Os números em vermelho estão relacionados aos picos numerados no cromatograma da Figura 11.....	78
Figura 15: Cromatograma representativo do monitoramento por LC-MS/MS SRM dos HpDoHE e HDoHE. Os anaitos foram injetados na forma de mistura. Em detalhe estão apresentadas as transições de massa selecionadas como quantitativas. ....	80
Figura 16: Perfil de HDoHE detectados em plasma e homogenato de cérebro de ratos Sprague-dawley. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão de três análises realizadas independentemente. ....	86
Figura 17: Espectros de fragmentação dos HpODE e HODE. Em destaque estão os íons selecionados para o monitoramento por SEM na análise por LC-MS/MS dos produtos de oxidação de ácidos graxos. ....	91
Figura 18: Estudo da fragmentação dos HpETE através da análise por LC-MS/MS fragmentando o íon precursor com m/z = 335. Os íons mais intensos/específicos foram selecionados e testados no modo de monitoramento por SRM. Em negrito estão destacadas as transições que se mostraram mais específicas para cada isômero. A fragmentação teórica dos fragmentos selecionados para o método final de SRM são mostradas em detalhe.....	95
Figura 19: Estudo da fragmentação dos HETE através da análise por LC-MS/MS fragmentando o íon precursor com m/z = 319. Os íons mais intensos/específicos foram selecionados e testados no modo de monitoramento por SRM. Em negrito estão destacadas as transições que se mostraram mais específicas para cada isômero. A fragmentação teórica dos fragmentos selecionados para o método final de SRM são mostradas em detalhe.....	97
Figura 20: Estudo da fragmentação obtido através dos softwares PeakView e MS fragmenter.....	107
Figura 21: Comparativo do espectro de fragmentação do isômero 20-HpDoHE não deuterado e deuterado.....	107
Figura 22: Espectro de fragmentação por QToF do isômero 13-HDoHE.....	109
Figura 23: Diferenciação de dois isômeros que coeluem na condição cromatográfica utilizada. Estes além de coeluirem apresentam uma série de fragmentos em comum. Cada um dos isômeros foi injetado isoladamente e seus espectros foram avaliados no intuito de escolher um íon específico que permita a diferenciação entre eles. Pelo uso do PeakView	

foi possível escolher os 153,0922 e 205,1232 para o 10- e o14-HDoHE, respectivamente. .....	110
Figura 24: Em (A) é possível ver a atrofia muscular dos membros superiores de um paciente portador de esclerose lateral amiotrófica (fonte: Kiernan et al. (2011). A utilização desta figura na presente tese foi autorizada pelo autor Matthew Kiernan, da Universidade de Sydney). Em (B) e (C) é possível visualizar a atrofia do braço direito e paralisia da mão direita de um animal sintomático. ....	114
Figura 25: Análise do peso corporal dos animais ELA e respectivos controles do grupo de animais pressintomáticos com 60(A) e 90(B) dias de vida .....	118
Figura 26: Análise do peso corporal dos animais ELA sintomáticos e respectivos controles. * idade em que os sintomáticos apresentaram o peso máximo.....	119
Figura 27: Cromatograma representativo da análise por LC- ESI/MS/MS das amostras de homogenato de cérebro utilizando o método 2 de extração e as condições de análise descritas no item 3.2.3.2 - . (A) cromatograma obtido pela análise de LC-DAD selecionando os comprimentos de onda 205nm e 235nm; (B) de 0 a 4 minutos os analitos com menor afinidade pela coluna como resolvinas, neuroprostanos foram analisados qualitativamente através do monitoramento por SRM; (C) a partir dos 4 minutos, os analitos cujo método de quantificação está descrito no item 3.2.3.2.1 - foram monitorados e quantificados. Em destaque, estão descritos no cromatograma os dois padrões deuterados utilizados no presente estudo.....	120
Figura 28: Dosagem dos HpDoHE nos homogenatos de córtex motor nos animais ELA e respectivos controles, com 60, 90 e 120 dias de vida (box-plot). Grupos de animais: Controle 60 (n= 10); ELA 60 (n=9); Controle 90 (n=8), ELA 90 (n=7), Controle 120 (n=7) e ELA 120 (n=5).....	122
Figura 29: Dosagem dos HDoHE nos homogenatos de córtex motor nos animais ELA e respectivos controles, com 60, 90 e 120 dias de vida (box-plot). Grupos de animais: Controle 60 (n= 10); ELA 60 (n=9); Controle 90 (n=8), ELA 90 (n=7), Controle 120 (n=7) e ELA 120 (n=5).....	123
Figura 30: Dosagem dos produtos de AA e LA nos homogenatos de córtex motor nos animais ELA e respectivos controles, com 60, 90 e 120 dias de vida (box-plot). Grupos de animais: Controle 60 (n= 10); ELA 60 (n=9); Controle 90 (n=8), ELA 90 (n=7), Controle 120 (n=7) e ELA 120 (n=5).....	124
Figura 31: Representação gráfica da análise estatística realizada para os dados de dosagem dos níveis dos produtos de oxidação dos ácidos graxos nos homogenatos de córtex cerebral dos animais Controle (C) e ELA (E), com 60, 90 e 120 dias de vida. Os analitos cujos níveis diferenciaram 10% estão representados no ponto de intersecção entre os grupos avaliados. A leitura é realizada de baixo para cima conforme seta verde representada. (*) diferença estatística de 5%.....	126
Figura 32: Perfil dos ácidos graxos dos homogenatos de cérebro, nomeadamente do córtex motor, dos animais ELA e respectivos controles com o avançar da idade obtido através da análise por cromatografia gasosa. Ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) ácido oleico (C18:1n9); ácido vacênico (C18:1n7); LA (C18:2n6); ácido 11-eicosenóico (C20:1n9); AA (C20:4n6); ácido lignocérico (C24:0); DHA (22:6n3); e, ácido nervônico (C24:1). ....	127
Figura 33: Acompanhamento do peso corporal do animal ELA sintomático e respectivo controle. São destacados os pontos chave deste tipo de monitoramento onde são definidas as idades em que o animal atinge o peso máximo e inicia os sintomas. O último ponto da	

curva é o “end point” do experimento definido com o momento em que animal perdeu 20% de peso em relação ao peso máximo e apresenta atrofia/paralisia de algum dos membros. ....	131
Figura 35: Animais ELA e controle sintomáticos no dia da eutanásia.....	133
Figura 36: Coleta dos 3 diferentes tecidos adiposos: (A) subcutâneo-inguinal; (B) epididimal; e, (C) retroperitoneal. ....	133
Figura 37: Análise do peso dos tecidos adiposos epididimal, subcutâneo-inguinal (SC inguinal) e retroperitoneal coletados nos animais ELA (n=6) e respectivos controles (n=6), com (A) 70 dias e (B) sintomáticos. Dados estatisticamente diferentes controle vs ELA (* P< 0,001(ANOVA, Bonferroni)).....	134
Figura 38: Análise morfométrica dos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal. ....	135
Figura 39: Análise da indução da lipólise em resposta ao estímulo com isoproterenol nos diferentes tecidos nos animais ELA e respectivos controles com 70 dias: (A) adipócitos isolados do tecido adiposo branco epididimal; (B) adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo-inguinal; (C) adipócitos isolados do tecido adiposo branco retroperitoneal, e (D) Diferença na resposta basal vs estímulo para os diferentes tecidos. Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001 (n= 6 para cada grupo). ....	138
Figura 40: Análise da indução da lipólise em resposta ao estímulo com isoproterenol nos diferentes tecidos nos animais ELA sintomáticos e respectivos controles: (A) adipócitos isolados do tecido adiposo branco epididimal; (B) adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo-inguinal; (C) adipócitos isolados do tecido adiposo branco retroperitoneal, e (D) Diferença na resposta basal vs estímulo para os diferentes tecidos. Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001 (n= 6 para cada grupo). ....	139
Figura 41: Análise da taxa lipogênica em resposta ao estímulo com insulina para os adipócitos isolados do tecido adiposo branco epididimal dos animais ELA e respectivos controles. Foram realizadas medidas da taxa de incorporação da D-[U <sup>14</sup> C]-glicose em: triacilgliceróis nos adipócitos (A, animais com 70 dias e B, animais sintomáticos); em ácidos graxos (C, animais com 70 dias e D, animais sintomáticos); e, em glicerol (E, animais com 70 dias e F, animais sintomáticos). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001. (n=6) .....	142
Figura 42: Análise da taxa lipogênica em resposta ao estímulo com insulina para os adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo-inguinal dos animais ELA e respectivos controles. Foram realizadas medidas da taxa de incorporação da D-[U <sup>14</sup> C]-glicose em: triacilgliceróis nos adipócitos (A, animais com 70 dias e B, animais sintomáticos); em ácidos graxos (C, animais com 70 dias e D, animais sintomáticos); e, em glicerol (E, animais com 70 dias e F, animais sintomáticos). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001. (n=6).....	143
Figura 43: Análise da taxa lipogênica em resposta ao estímulo com insulina para os adipócitos isolados do tecido adiposo branco retroperitoneal dos animais ELA e respectivos controles. Foram realizadas medidas da taxa de incorporação da D-[U <sup>14</sup> C]-glicose em: triacilgliceróis nos adipócitos (A, animais com 70 dias e B, animais sintomáticos); em ácidos graxos (C, animais com 70 dias e D, animais sintomáticos); e,	

em glicerol (E, animais com 70 dias e F, animais sintomáticos). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001. (n=6).....	144
Figura 44: Conteúdo total de ácidos graxos para os 3 tecidos analisados (A) tecido epididimal, (B) tecido retroperitoneal e (C) subcutâneo-inguinal. Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001. (n=6).....	146
Figura 45: Análise da composição de ácidos graxos dos adipócitos isolados dos tecidos adiposos (A) epididimal, (B) retroperitoneal e (C) subcutâneo. Ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0, ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido vecenico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) ácido linolênico (C18:3) e ácido araquidônico (C20:4). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001. (n=6) .....	147

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura dos ácidos graxos .....	24
Tabela 2: Parâmetros do espectrômetro de massas padronizados para a análise dos íons produto selecionados. ....	49
Tabela 3: Parâmetros selecionados para o estudo do desenvolvimento cromatográfico.	69
Tabela 4: Fragmentação teórica dos HpDoHE. Os íons em negrito foram selecionados para o método por SRM. ....	74
Tabela 5: Fragmentação teórica dos HDoHE. Os íons em negrito foram selecionados para o método por SRM. ....	77
Tabela 6: Condições otimizadas para a análise dos HpDoHE por LC-MS/MS.....	81
Tabela 7: Condições otimizadas para a análise dos HDoHE por LC-MS/MS.....	82
Tabela 8: Recuperação dos HpDoHE e HDoHE em PBS, homogenato de cérebro e plasma, quando contaminados antes e em paralelo depois da extração com 1 ng/μL de cada isômero. ....	83
Tabela 9: Exatidão e precisão do método de análise intradia and interdía dos HpDoHE em metanol. ....	84
Tabela 10: Exatidão e precisão do método de análise intradia and interdía dos HDoHE em metanol. ....	85
Tabela 11: Fragmentação teórica dos 8 isômeros de HpETE obtidos por fotooxidação.	94
Tabela 12: Fragmentação teórica dos 8 isômeros de HETE.....	96
Tabela 13: Parâmetros de validação tais como limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e linearidade obtidos através da plotagem das curvas de calibração em metanol dos produtos de oxidação do DHA. ....	99
Tabela 14: Parâmetros de validação tais como limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e linearidade obtidos através da plotagem das curvas de calibração em metanol dos produtos de oxidação do LA. ....	100
Tabela 15: Parâmetros de validação tais como limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e linearidade obtidos através da plotagem das curvas de calibração em metanol dos produtos de oxidação do AA.....	100
Tabela 16: Taxas de recuperação dos HpDoHE e HDoHE em amostras de controle de qualidade constituídas por tampão fosfato salino (PBS) (n=3). ....	101
Tabela 17: Taxas de recuperação dos HpODE e HODE em amostras de controle de qualidade constituídas por tampão fosfato salino (PBS) (n=3). ....	102
Tabela 18: Taxas de recuperação dos HETE em amostras de controle de qualidade constituídas por tampão fosfato salino (PBS) (n=3).....	102
Tabela 19: lista animais nascidos entre 26 de março de 2011 e 11 de maio de 2011 (GRUPO 1) num total de 59 animais divididos em 2 grupos (ELA e Controle) e 3 subgrupos de acordo com a idade (60, 90 e 120 dias).....	116
Tabela 20: Animais nascidos entre março e abril de 2013 divididos em 2 subgrupos (ELA e Controle), subdivididos de acordo com a idade no momento da eutanásia (70 dias e sintomáticos).....	130
Tabela 21: Acompanhamento dos animais ELA sintomáticos e respectivos controles. ....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $^1\text{O}_2$  - oxigênio singlete
- AA - ácido araquidônico
- ALA - ácido  $\alpha$ -linolênico
- BHT - 2,6-di-tert-butil-p-cresol
- BSA - albumina de soro bovino
- CAD - gás de colisão
- CE - energia de colisão
- COX - ciclooxigenases
- cPLA<sub>2</sub> - fosfolipase citosólica
- CUR – do inglês *curtain gas*
- CV – coeficiente de variação
- CXP - potencial de colisão na saída da cela de colisão.
- CYP450 - monooxigenases do citocromo P450
- DAD - detector de arranjos de diodo
- DHA – ácido docosaenoico
- DP – do inglês *declustering potential*
- DPA – ácido docosapentaenoico
- DPA - ácido docosapentaenóico
- DTPA - ácido dietilenetriaminopentaacético
- EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético
- ELA – esclerose lateral amiotrófica
- EP – do inglês *Entrance potential*
- EPA – ácido eicosapentaenoico
- FATP – do inglês *fatty acid transport protein*
- HCl - ácido clorídrico
- HDoHE - hidroxi-docosaenoico
- HETE - ácido hidroxi-eicosatetraenoico
- HODE – ácido hidroxi-octadecadienoico

HpDoHE - hidroperoxi-docosahexaenoico  
HpETE - ácido hidroperoxi-eicosatetraenoico  
HPLC – do inglês High performance liquid chromatography  
HpODE – ácido hidroperoxi-octadecadienoico  
ihe-do inglês *interface heater*  
iPLA<sub>2</sub> - fosfolipase independente de cálcio  
IS – do inglês *ion spray*  
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemists  
KCl - cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de potássio monobásico  
KOH - Hidróxido de potássio  
L• - radical alquila  
LA - ácido linoleico  
LC-MS/MS - cromatografia acopladas à espectrometria de massas  
LD- limite de detecção  
LO•<sup>-</sup> radical alcóxila  
LOO• - radical peróxila  
LOX - lipoxigenases  
LQ – limite de quantificação  
LTB<sub>4</sub> - leucotrieno B<sub>4</sub>  
*m/z* – relação massa/carga  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O - fosfato de sódio dibásico  
NaBH<sub>4</sub> – boridreto de sódio  
NaCl - cloreto de sódio  
NaOH - hidróxido de sódio  
NPD1- neuroprotectina D1  
O<sub>2</sub> – oxigênio molecular  
PBS – do inglês *phosphate buffered saline*  
PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>  
PUFAs - do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*

Qtrap – do inglês *triple-quadrupole – ion trap*

RNS - espécies reativas de nitrogênio

ROS - espécies reativas de oxigênio

SDS - dodecilssulfato de sódio

SOD1 - proteína cobre-zinco superóxido dismutase

sPLA<sub>2</sub> - fosfolipase secretória

SRM - *selected reaction monitoring*

TEM - temperatura da fonte (TEM)

TLC - do inglês *thin layer chromatography*

Tris- tris(hidroximetil)aminometano

UHPLC - do inglês *Ultra High Performande Chromatography*

X<sup>•</sup> - radical livre

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
2. OBJETIVOS GERAIS .....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
3.1 - MATERIAIS .....	38
3.2 - MÉTODOS .....	39
3.2.1 - Síntese e purificação dos hidroperóxidos lipídicos.....	39
3.2.2 - Obtenção dos hidróxidos .....	41
3.2.3 - Análise dos produtos de oxidação dos ácidos graxos .....	42
3.2.4 - Animais utilizados .....	50
3.2.5 - Extração dos produtos de oxidação dos ácidos graxos .....	54
3.2.6 - Isolamento e análise dos adipócitos .....	55
3.2.7 - Análise dos ácidos graxos nos animais por cromatografia gasosa .....	58
3.2.8 - Tratamento estatístico .....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
4.1 - SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	61
4.1.1 - Síntese dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos.....	62
4.1.2 - Análise dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos por LC-MS/MS .....	67
4.2 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS LINOLEICO, ARAQUIDÔNICO E DOCOSAHEXAENOICO NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA .....	112
4.2.1 - Grupo de animais utilizados.....	114
4.2.2 - Avaliação dos animais .....	115
4.2.3 - Análise dos produtos de oxidação dos ácidos graxos araquidônico, docosahexaenoico e linoleico.....	119
4.3 - ANÁLISE DO METABOLISMO LIPÍDICO .....	128
4.3.1 - Coleta do tecido adiposo .....	132
4.3.2 - Lipólise .....	135
4.3.3 - Lipogênese .....	140
4.3.4 - Análise da composição de ácidos graxos nos tecidos adiposos estudados	145
5. CONCLUSÃO .....	149

6. REFERÊNCIAS.....	151
7. ANEXOS.....	175

# 1. INTRODUÇÃO

Os lipídeos são uma classe de biomoléculas com diversas estruturas e funções biológicas. Eles são caracterizados pela alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água ([Fahy, 2005](#); [Wenk, 2005](#)).

A maioria dos lipídeos é derivada ou possui ácidos graxos em sua estrutura. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas contendo até 36 carbonos ([Nelson e Cox, 2011](#)). Eles podem ser saturados (contendo apenas ligações simples), monoinsaturados (uma ligação dupla) ou poliinsaturados (PUFAs) (2 ou mais ligações duplas) ([Chow, 2007](#)).

Os ácidos graxos saturados estão envolvidos na produção e armazenamento de energia, transporte de lipídeos, síntese de fosfolipídios e esfingolipídios necessários para a síntese de membranas e modificação covalente de muitas proteínas regulatórias. Os monoinsaturados apresentam um papel adicional como chave na manutenção da fluidez de membranas. Os PUFAs apresentam um papel importante na manutenção da permeabilidade de membranas, estão envolvidos na produção de eicosanoides, na transdução de sinal, na ativação de fatores de transcrição nuclear ([Spector, 1999](#)) e na regulação de pressão arterial, coagulação sanguínea, e no correto desenvolvimento/funcionamento do sistema nervoso ([Wall et al., 2010](#)).

Os ácidos graxos são denominados de diferentes formas de acordo com o sistema utilizado. Como pode ser observado na tabela 1, o ácido graxo saturado com 16 carbonos é conhecido como ácido palmítico (nomenclatura trivial) ou ácido hexadecanóico (nomenclatura definida pela “International Union of Pure and Applied Chemists” - IUPAC).

A nomenclatura IUPAC relaciona-se à estrutura química do composto e a trivial se relaciona, geralmente, à fonte natural ou a uma característica química apresentada.

Como no exemplo citado, o ácido palmítico apresenta esse nome por ser obtido a partir do óleo de palma.

Os ácidos graxos podem ser representados usando a abreviação estrutural que os identifica única e exclusivamente através do número de carbonos e de ligações duplas (o ácido palmítico - 16:0, e o ácido oleico - 18:1n-9). A posição das insaturações é indicada contando-se a posição do carbono da ligação dupla a partir da carboxila, nomenclatura adotada pela IUPAC, ou da metila terminal. Quando a contagem é feita a partir da carboxila utiliza-se a letra grega delta ( $\Delta$ ), enquanto que feita a partir da metila é especificada pela letra grega ômega ( $\omega$ ) ou pela letra n. Assim, o ácido oleico pode ser representado como: 18:1  $\Delta$ 9 ou 18:1 $\omega$ -9 (Tabela 1) ([Calder, 2006](#)).

Os ácidos graxos insaturados, de acordo com a nomenclatura “ômega”, são divididos em famílias: ômega-3 (como, por exemplo, os ácidos  $\alpha$ -linolênico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), ômega-6 (ácido linoleico (LA) e ácido araquidônico (AA), ômega-7 (ácido palmitoleico) e ômega-9 (ácido oleico) ([Russo, 2009](#)).

Os n-6 são encontrados principalmente em óleos vegetais como o de girassol, soja, milho, cártamo e de sementes de algodão. Já os  $\omega$ -3 são encontrados nos óleos de linhaça e canola, azeite, em mexilhões, ostras, camarões, nozes e sementes como gergelim ([Riediger et al., 2009](#); [Russo, 2009](#); [Gogus e Smith, 2010](#)). Os três principais  $\omega$ -3 constituintes da dieta são: ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) ([Martin et al., 2006](#)).

Os n-3 e n-6 precisam ser obtidos através da dieta ou ser sintetizados a partir do seu precursor essencial. Os seus precursores, o ALA e o LA, são descritos como ácidos graxos “essenciais” ([Spector, 1999](#)). Estes sofrem uma sequência de reações onde

ocorrem adição de novos carbonos e insaturações à cadeia original (Figura 1) ([Qiu, 2003](#); [Martin et al., 2006](#); [Nelson e Cox, 2011](#); [Lands, 2012](#)).

Tabela 1: Nomenclatura dos ácidos graxos

Nomes		Representação relativa ao grupo	
Trivial	IUPAC	Carboxila	Metila (n) (ω)
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	16:0	16:0
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	18:0	18:0
Ácido oleico	Ácido 9-octadecenoico	18:1Δ9	18:1n-9 ou 18:1ω-9
Ácido linoleico	Ácido 9,12 - octadecadienoico	18:2Δ9,12	18:2n-6 ou 18:2ω-6
Ácido linolênico	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	18:3Δ9,12,15	18:3n-3 ou 18:3ω-3
Ácido araquidônico	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4Δ5,8,11,14	20:4n-6 ou 20:4ω-6
Ácido docosahexaenoico	Ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenóico	22:6Δ4,7,10,13,16,19	22:6n-3 ou 22:6ω-3

Atualmente, é comum a discussão sobre os efeitos da dieta em relação à composição de ácidos graxos de membranas e o consequente impacto na função celular ([Surette, 2008](#)).

A literatura recomenda como ideal uma dieta cuja proporção de n-6:n-3 é de 4:1. Contudo, na dieta ocidental há um aumento da ingestão de n-6 em detrimento dos n-3, fato este que tem sido relacionado ao aumento de doenças em que estão envolvidos processos inflamatórios como: doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, obesidade, câncer e algumas doenças psiquiátricas (ver revisão de [Lands \(2012\)](#)). Este aumento de incidência de doenças inflamatórias está associado à produção excessiva dos eicosanóides pró-inflamatórios, a prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrieno B4 (LTB4),

que são derivados do ácido araquidônico (AA). Por possuírem enzimas comuns à biossíntese e metabolização, uma alternativa para tal problema é o incremento da ingestão de fontes de n-3 na dieta. Os n-3 passam a ser o substrato para a síntese de eicosanóides e, portanto, diminuem a produção de eicosanóides pró-inflamatórios derivados de n-6 ([Karanian et al., 1988](#); [Horrocks e Yeo, 1999](#); [Connor, 2000](#); [Marai e Massalha, 2014](#)).

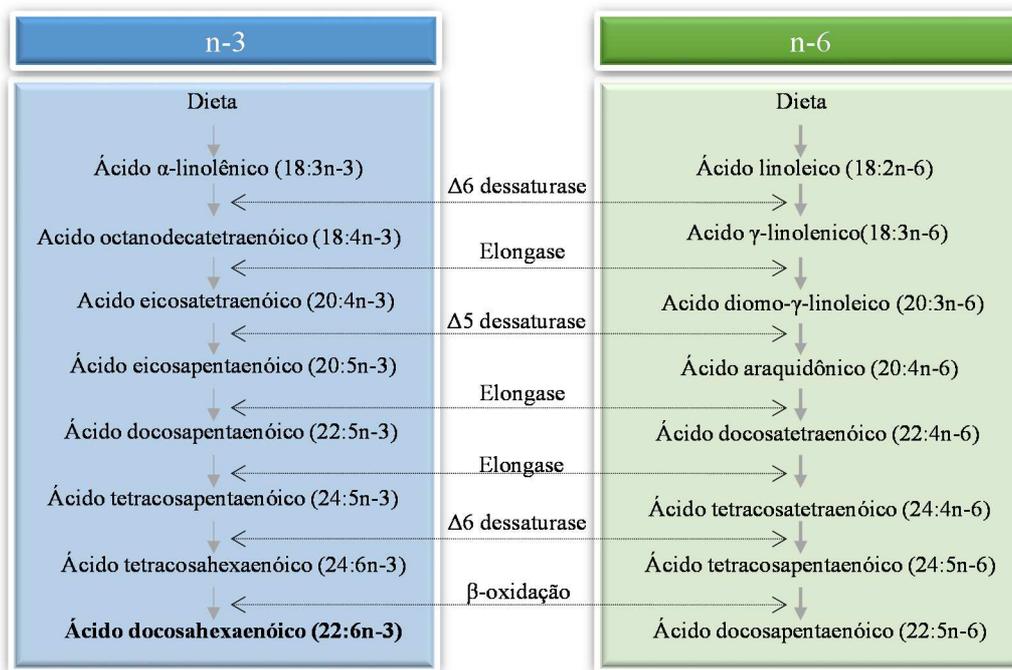


Figura 1: Biossíntese de PUFA em mamíferos. O ALA é alongado e dessaturado por uma série de reações enzimáticas, levando a formação EPA e do DHA. O ácido linoleico obtido da dieta é dessaturado, formando o ácido  $\gamma$ -linolênico (n-6), que sofre um alongamento da sua cadeia carbônica, originando o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (n-6), o qual é dessaturado, formando o ácido araquidônico (n-6). Fonte: Wall et al 2010 e Appolinário et al 2011.

O ácido 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z- docosahexaenoico [DHA, 22:6n-3] é um n-3, altamente enriquecido em óleo de peixe e em microalgas fotossintéticas e heterotróficas ([Surette, 2008](#); [Riediger et al., 2009](#)). Estudos realizados nos anos 60 revelaram a presença de níveis elevados de DHA no cérebro humano ([O'brien e Sampson, 1965](#); [Svennerholm, 1968](#)). Posteriormente, foram descritas altas concentrações de DHA em membranas dos sinaptossomos e nas vesículas sinápticas, sugerindo um papel importante

deste ácido graxo para o sistema nervoso central ([Cotman et al., 1969](#); [Neuringer et al., 1988](#)).

Em condições normais, o DHA não é encontrado na forma livre e sim esterificado na posição *sn*-2 dos fosfolípídeos (Figura 2) ([Nelson e Cox, 2011](#)).

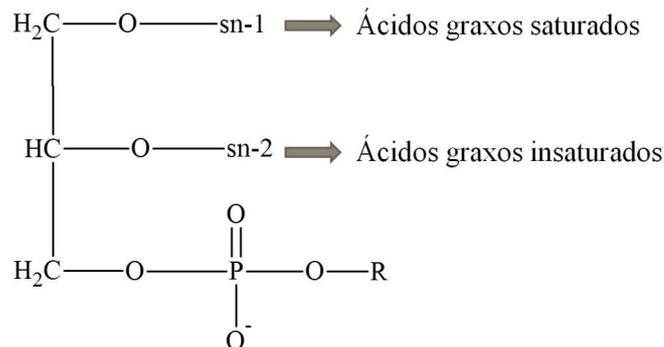


Figura 2: Estrutura básica dos fosfolípídeos. Os fosfolípídeos podem ter como base o glicerol ou a esfingosina. Na presente figura estão esquematizados os que são derivados do glicerol, os chamados fosfoglicerídeos. Estes apresentam a esterificação de dois ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-2 do glicerol e na posição *sn*-3 há um fosfato formando o composto conhecido como diacilglicerol 3-fosfato. O grupamento R ligado ao fosfato pode ser a etanolamina, a serina, a colina, o inositol, o glicerol ou o fosfatidilglicerol.

Nas membranas neuronais o DHA é encontrado principalmente em fosfoglicerídeos, cujo grupo R é a etanolamina ou a serina com o ácido esteárico na posição *sn*-1 e o DHA na posição *sn*-2. Em condições normais, o perfil lipídico no cérebro é rigorosamente mantido e este é importante para manutenção da função cerebral normal ([Kim, 2007](#)).

Os ácidos graxos são liberados pela ação das lipases lingual e pancreática, no momento da ingestão de alimentos ricos em lipídeos.

A absorção dos mesmos ocorre primariamente no intestino delgado através de transportadores de ácidos graxos, como FATP4 (FATP – *fatty acid transport protein*). Nos enterócitos os ácidos graxos podem: ser captados por proteínas ligadoras de ácidos graxos; sofrer beta-oxidação nas mitocôndrias; ou ser reconvertidos em triacilgliceróis e

empacotados com o colesterol da dieta e proteínas específicas em agregados de lipoproteínas, os quilomicrons ([Bazan et al., 2011](#); [Nelson e Cox, 2011](#)). Estes são as principais formas de transporte de lipídeos do intestino até ao fígado. No fígado, o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA) é convertido a DHA. O DHA é formado a partir do ALA pela  $\Delta 5$  e  $\Delta 6$  dessaturase e alongase gerando o EPA e o ácido docosapentaenóico (DPA), no retículo endoplasmático. O DPA é então convertido nos peroxissomos no DHA. O DHA volta para o retículo endoplasmático onde é esterificado principalmente na forma de fosfatidiletanolamina. Estes podem ser então secretados para o sangue na forma de lipoproteínas e distribuídos para os demais tecidos, dentre eles, cérebro e retina ([Scott e Bazan, 1989](#)).

A alta concentração de DHA no endotélio de capilares sugere que o mesmo é obtido através da dieta via transportadores plasmáticos para DHA, incluindo carreadores específicos para ácidos graxos ligados a lipoproteínas ([Innis e Dyer, 2002](#); [Lukiw e Bazan, 2008](#)). Os mecanismos celulares e/ou moleculares responsáveis pela captação e retenção do DHA no sistema nervoso central não são totalmente conhecidos. O DHA seria liberado de lipoproteínas ou da albumina por lipases, transferido para os astrócitos e depois transferido para os neurônios ([Bazan et al., 2011](#)).

O cérebro, células da glia e do endotélio da microvasculatura, apresentam uma pequena capacidade de síntese do DHA por alongação. Esta síntese não ocorre nos neurônios. Acredita-se que o DHA sintetizado nos astrócitos seja transportado e concentrado nos neurônios, entretanto, esta contribuição não parece ser significativa ([Reich et al., 2001](#)).

O DHA encontra-se em uma alta concentração no cérebro (principalmente na substância negra do córtex cerebral), na retina ([Kim, 2008](#)) e, em menores concentrações, no coração e esperma ([Picq et al., 2010](#)). No cérebro corresponde a 97% dos ômega-3

totais e, na retina, corresponde a 95% ([Kuratko e Salem, 2009](#)). O DHA alcança sua concentração mais elevada em sinapses do sistema nervoso central e em células fotorreceptoras da retina; de fato, até 60% de todos os ácidos graxos poliinsaturados esterificados a fosfolípidios de membrana neuronais consistem em DHA ([Svennerholm, 1968](#); [Lukiw e Bazan, 2008](#)). Além disso, o DHA também está envolvido no funcionamento da memória ([Gamoh et al., 1999](#)), função excitável da membrana ([Mcgahon et al., 1999](#)), biogênese e função de células fotorreceptoras ([Gordon e Bazan, 1990](#)), sinalização neuronal e neuroproteção ([Kim et al., 2000](#); [Rodriguez De Turco et al., 2002](#)).

Estudos demonstraram que suprimentos inadequados de ácidos graxos n-3 durante o desenvolvimento pré e pós-natal resultam em decréscimo de DHA no cérebro e, conseqüentemente, em uma variedade de deficiências cognitivas e comportamentais em modelos animais ([Moriguchi et al., 2000](#)). Na revisão de [Hur et al. \(2013\)](#) é descrito que a redução dos níveis de DHA em hipocampo de ratos está amplamente ligada ao processo de envelhecimento, provavelmente por mecanismos que envolvem a baixa captação de ácidos graxos insaturados do sangue para o cérebro, peroxidação enzimática e não-enzimática e níveis alterados de enzimas dessaturases.

Contrariamente, a suplementação de DHA na dieta durante a infância mostrou-se importante no desenvolvimento mental. Adicionalmente, uma literatura extensa tem apontado para um efeito protetor do DHA em doenças como a aterosclerose, asma, câncer e doenças neurodegenerativas ([Calder, 2006](#)).

Acredita-se que os efeitos neurofisiológicos benéficos do DHA ocorrem em parte pela manutenção da fluidez e integridade da função de membranas plasmáticas cerebrais, e em parte pela geração de produtos de oxidação ([Lukiw e Bazan, 2008](#)). Dentre os mecanismos no qual o DHA pode atuar como neuroprotetor, destaca-se a sua

capacidade em atuar como precursor da síntese de neuroprotectina D1 (NPD1). A NPD1 pode ser induzida como resposta ao estresse oxidativo, inibindo a ativação de caspases e proteínas pró-apoptóticas (BAD, BAX e Bid), além de ativar proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xL e Bfl-1), preservando assim, os neurônios de morte celular por apoptose ([Oster e Pillot, 2010](#); [Chang et al., 2012](#)). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos benéficos mediados por DHA.

Ácidos graxos insaturados são muito suscetíveis à peroxidação lipídica, devido à presença de duplas ligações, o que provoca um enfraquecimento da energia de ligação CH no carbono vizinho à dupla (hidrogênio alílico), especialmente se há uma ligação dupla em ambos os lados da ligação CH (hidrogênios bis-alílicos). O DHA é um ácido graxo altamente insaturado (possui 6 insaturações), consequentemente, susceptível à oxidação (Figura 3).

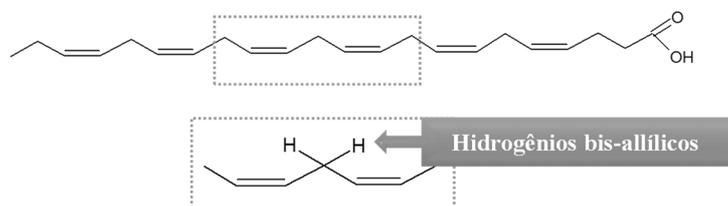


Figura 3 Estrutura do ácido docosahexaenoico. Em destaque os hidrogênios bis-alílicos que são altamente suscetíveis à oxidação.

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de reações oxidativas resultante da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radical alquila ( $L^\bullet$ ), radical alcóxila ( $LO^\bullet$ ) e radical peróxila ( $LOO^\bullet$ ) ([Lima e Abdalla, 2001](#); [Yin et al., 2011](#)).

Nos sistemas biológicos, a lipoperoxidação pode ocorrer principalmente por duas vias: (i) a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS) e metais de transição ([Cheng e Li, 2007](#));

e, (ii) uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases ([Lima e Abdalla, 2001](#); [Yin et al., 2011](#)).

A oxidação não-enzimática ocorre via espécies reativas de oxigênio tais como oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), hipoclorito, ozônio ou via radicais inorgânicos como o radical hidroxila.

A peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres (autooxidação) começa com a abstração de um átomo de hidrogênio por um radical livre ( $\text{X}^\bullet$ ). No caso de PUFA que contenham mais de duas ligações duplas, a abstração de hidrogênio ocorre nos hidrogênios bis-alílicos (Figura 3), resultando na formação de um radical centrado em carbono. Este radical sofre rearranjos produzindo um radical pentadienila que combina rapidamente com  $\text{O}_2$  para gerar um  $\text{LOO}^\bullet$ , e este propaga a reação em cadeia por abstrair um átomo de hidrogênio de outra molécula lipídica. O radical peroxila pode ser estabilizado pela abstração de um hidrogênio alílico de outro ácido graxo com concomitante geração de outro radical centrado no carbono, ou sofrer  $\beta$  cisão e rearranjo intramolecular ([Porter et al., 1981](#); [Xu et al., 2009](#); [Yin et al., 2011](#)). O número de hidroperóxidos isômeros de posição ( $2n-2$ ) que pode ser formada após a autooxidação de um PUFA depende do número de ligações duplas ( $n$ ) ([Esterbauer, 1993](#)).

Quando a oxidação é mediada por  $^1\text{O}_2$ , o mecanismo é um pouco diferente. O  $^1\text{O}_2$  é adicionado diretamente ao carbono da dupla ligação, através de uma adição tipo “ene”. Como resultado, são formados isômeros de hidroperóxidos em cada um dos C insaturados do PUFA que está sendo oxidado. É importante notar que alguns hidroperóxidos são formados especificamente em oxidação mediada por  $^1\text{O}_2$  e, portanto, podem ser usados como uma impressão digital para  $^1\text{O}_2$  em sistemas biológicos ([Stratton e Liebler, 1997](#)).

O  $^1\text{O}_2$  pode ser gerado endogenamente através de mecanismos como a ativação de neutrófilos, incluindo a reação entre peróxido de hidrogênio e hipoclorito mediada pela mieloperoxidase, durante o processo de fagocitose ([Badwey e Karnovsky, 1980](#)); nos eosinófilos através de mecanismos catalisados por peroxidases ([Kanofsky \*et al.\*, 1988](#)); através da reação de fotossensibilização mediada por fotossensibilizadores endógenos, como as porfirinas ([Girotti e Kriska, 2004](#)); durante a peroxidação lipídica através do mecanismo de Russel ([Russell, 1957](#); [Miyamoto, Martinez, Medeiros, \*et al.\*, 2003](#)); durante a oxidação enzimática de ácidos graxos mediada pelas lipogenases e ciclooxigenases ([Kanofsky, 1989](#)).

Hidroperóxidos de lípidos são produtos primários da peroxidação lipídica, instáveis, que podem sofrer reações de oxidação não enzimática sucessivas formando compostos como: aldeídos, neuroprostanos (oxidação do DHA) ou isoprostanos (oxidação do AA), neurofuranos (oxidação do DHA) ou isofuranos (oxidação do AA), alcanos e mono ou dihidroxi-ácidos graxos ([Smith e Murphy, 2008](#)).

São ainda excelentes substratos para diversas enzimas, tais como glutathione peroxidase e fosfolipases. A redução de hidroperóxidos de lípidos não é apenas uma ferramenta para evitar a oxidação ou outras reações de decomposição, com a formação concomitante de radicais livres, mas também está envolvida em eventos de sinalização. As células têm um sistema de redução dos hidroperóxidos de lípidos, que é composto de várias enzimas antioxidantes, com diferentes estruturas, especificidade de substrato, e localização celular ([Niki \*et al.\*, 2005](#)).

Os níveis dos hidroperóxidos/hidróxidos podem aumentar em várias condições patológicas. Por esta razão, uma expressiva atenção tem sido direcionada para o estudo da sua formação e seu papel patofisiológico. Por exemplo, estudos recentes sobre os hidroperóxidos/hidróxidos e outros derivados de DHA (por exemplo, resolvinas e

protectinas) têm contribuído para a melhoria dos conhecimentos sobre a fase de resolução da inflamação, bem como, compreender o papel do ácido acetil salicílico e dos n-3 neste processo ([Jira et al., 1998](#); [Sun et al., 2007](#); [Dmitriev e Titov, 2010](#)). Neste contexto, a identificação e caracterização estrutural de hidroperóxidos/hidróxidos de PUFA formados através de mecanismos enzimáticos e/ou não enzimáticos continua a revelar novas enzimas, produtos e ações biológicas ([Schneider, 2009](#)).

O AA e o DHA são liberados da membrana plasmática através da ação das fosfolipases: fosfolipase citosólica (cPLA<sub>2</sub>), seletiva para AA requer baixa concentração de cálcio e uma etapa de fosforilação para a sua ativação e se localiza próxima à COX-2; fosfolipase secretória (sPLA<sub>2</sub>) depende de uma concentração de cálcio maior (20mM); fosfolipase independente de cálcio (iPLA<sub>2</sub>) seletiva para o DHA. Enzimaticamente, os ácidos graxos são substratos para as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e monooxigenases do citocromo P450 (CYP450) e dão origem a uma série de produtos oxidados biologicamente ativos ([Siddiqui et al., 2008](#)). A grande diferença em relação à oxidação não-enzimática é a estereosseletividade de reação (exemplo: formação do 17R-hidroperoxi-docosahexaenoico (17R-HpDoHE) pela ciclooxigenase na presença de ácido acetilsalisílico).

Pequenas quantidades de hidroperóxidos são suficientes para iniciar a atividade catalítica das COX. O grupo heme da enzima sofre oxidação gerando um radical ferril-oxo que oxida um grupo tirosina a radical tirosila. O radical tirosila no sítio ativo da enzima pode abstrair hidrogênio do grupo metilênico do ácido graxo, formando o radical centrado no carbono que, ao se combinar com O<sub>2</sub>, forma um radical peroxila. O radical peroxila pode sofrer ciclização, formando um endoperóxido que rapidamente se adiciona a mais uma molécula de oxigênio levando à formação de um intermediário hidroperoxi-endoperóxido, a partir do qual uma série de compostos é formada ([Marnett, 2000](#)).

Existem 3 isoformas da COX: COX-1, COX-2 e COX-3. As mais estudadas são a COX-1 e COX-2. Ambas são constitutivamente expressas no cérebro. O substrato preferencial é o AA, mas podem oxidar também o DHA, o LA, o EPA e o ácido  $\gamma$ -linolênico. Durante a oxidação do AA mediada pela COX o ácido 11(R)-hidroperoxi-eicosatetraenoico (11(S)-HpETE) é formado como produto intermediário da reação que termina com a formação de uma série de prostaglandinas ([Phillis et al., 2006](#); [Schneider et al., 2007](#)).

Após ser liberado das membranas pela ação da fosfolipase-A2, o DHA é oxidado em ácido 17R-hidroperoxi-docosahexaenoico pela ciclooxigenase na presença de ácido acetilsalicílico ou pelo citocromo P450. Este hidroperóxido sofre uma série de reações enzimáticas mediadas tanto por LOX quanto por COX, originando uma série de compostos anti-inflamatórios, as resolvinas D ([Serhan et al., 2004](#)).

Para as LOX, assim como as COX, a oxidação do ferro do sítio ativo é requerida para a catálise da reação ([Brash, 1999](#); [Schneider et al., 2007](#)). As LOX são denominadas de acordo com a posição que oxidam o AA: 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX e 15-LOX. A 12-LOX encontra-se enriquecida no tecido cerebral. Pela ação das LOX uma série de leucotrienos são formados. Sob a ação da 15-lipoxigenase, o DHA é oxidado em ácido 17S-hidroperoxi-docosahexaenoico (17S-HpDoHE) que após sucessivas reações dá origem a docosatrienos, entre eles a neuroprotectina D1 ([Kohli e Levy, 2009](#)). A neuroprotectina D1 apresenta diferentes ações neuroprotetoras tais como: indução de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas e modulação da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória ([Lukiw e Bazan, 2008](#)). O ácido 13-hidroperoxi-octadecadienoico (13-HpODE) é formado pela ação da 12-LOX e da 15-LOX ([Fujimoto et al., 2008](#)). A 5-LOX gera a formação do 9-hidroperoxi-octadecadienoico (9-HpODE) (Figura 4) ([Fujimoto et al., 2008](#)).

A cascata enzimática de oxidação do AA, LA e DHA também ocorre através das enzimas do CYP450 que catalisam a formação de uma série de compostos, tais como, hidróxidos e epóxidos ([Capdevila et al., 2000](#); [Phillis et al., 2006](#); [Fer et al., 2008](#); [Mulugeta et al., 2010](#)) (Figura 4).

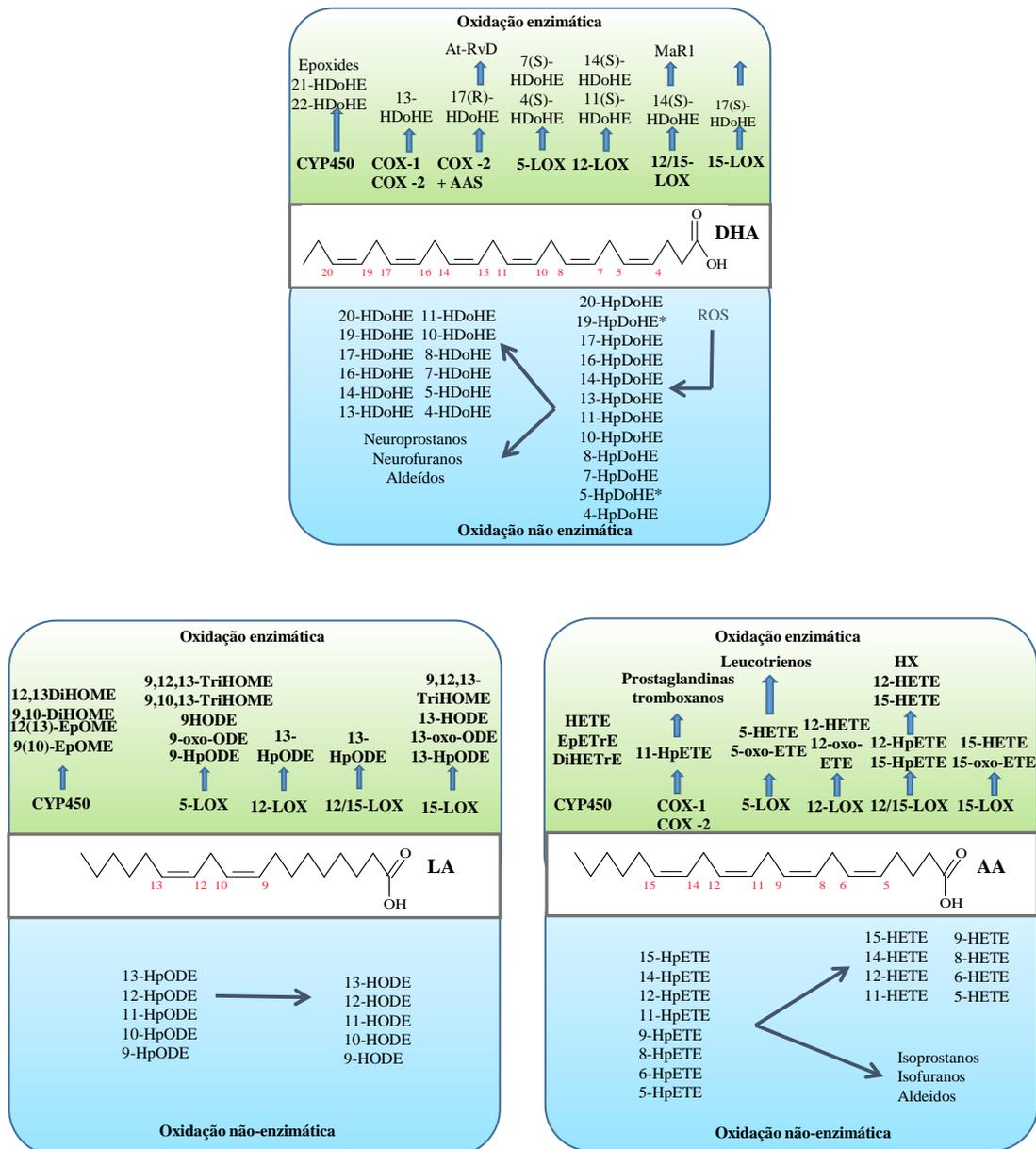


Figura 4: Produtos de oxidação enzimática e não enzimática do DHA, LA e AA.

O aumento do dano oxidativo ocorre em todas as doenças neurodegenerativas ([Halliwell, 2006](#)). Muitos dos produtos de oxidação do DHA estão presentes ou

aumentam com a progressão de doenças neurodegenerativas; nomeadamente podem-se citar os neuroprostanos que estão presentes em altos níveis no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer, sendo que estes níveis tendem a aumentar com a progressão da doença ([Halliwell, 2006](#)).

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios motores do trato corticoespinal, tronco cerebral e medula ([Dmitriev e Titov, 2010](#)). Por este motivo, a maioria dos pacientes portadores desta doença desenvolvem fraqueza muscular, inicialmente, que avança rapidamente para a atrofia muscular e paralisia generalizada ([Thonhoff et al., 2007](#)). Assim que começam a apresentar os sintomas os pacientes passam a ter uma expectativa de vida de no máximo mais 2 a 3 anos ([Jira et al., 1998](#)).

A maior parte dos casos de ELA não tem uma causa conhecida e, portanto, são descritos como esporádicos, contudo 10% dos casos estão relacionados a causas genéticas e, por isso, são descritos como familiares ([Jira et al., 1998](#)). 20% dos casos familiares estão envolvidos com a mutação da proteína cobre-zinco superóxido dismutase (SOD1).

[Almer et al. \(2001\)](#), descreveram um aumento significativo na expressão da COX-2 na ELA. Os dados obtidos corroboraram com os trabalhos descritos por ([Mahoney et al., 2006](#)) e [Kiaei et al. \(2005\)](#) que descreveram aumento do estresse oxidativo, ativação de enzimas antioxidantes e da cPLA<sub>2</sub>.

O *trans*-4-hidroxi-2-hexenal é descrito na literatura como o principal produto de peroxidação *in vitro* do DHA. Apesar da possibilidade de ser produto de outros ácidos graxos n-3, no cérebro o DHA está presente em uma proporção superior a 30x em relação aos demais e por isso o *trans*-4-hidroxi-2-hexenal é utilizado como biomarcador da oxidação do DHA ([Long et al., 2008](#)). Este aldeído é neurotóxico, é um potente indutor da permeabilidade de transição em mitocôndrias hepáticas; elevados níveis de aductos de *trans*-4-hidroxi-2-hexenal-histidina foram encontrados em pacientes com esclerose lateral amiotrófica ([Shibata et al., 2004](#); [Long et al., 2008](#)).

Por estes motivos, a caracterização e quantificação dos produtos oxidação em sistemas biológicos são necessárias para compreender o papel dessas espécies no desenvolvimento da doença. Considerando que existem fortes evidências de que a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio está envolvida em doenças neurodegenerativas, é muito provável que o DHA e outros PUFAs, sejam oxidados não-

enzimaticamente e também enzimáticamente gerando como produtos primários os hidroperóxidos/hidróxidos, os quais podem servir como precursores de outros produtos oxidados biologicamente ativos com importante papel na ELA.

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Em face do exposto, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização dos produtos de oxidação não-enzimática do DHA, AA e LA, através de técnicas de análise lipidômica, visando identificar produtos oxidados que pudessem servir como biomarcadores de doenças neurodegenerativas.

Assim, para atingir este objetivo o presente trabalho tem como principais metas:

- sintetizar, purificar e caracterizar os produtos da oxidação não-enzimática do DHA, AA e LA utilizando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas;
- estudar mecanismos de formação dos produtos oxidados do DHA em sistemas químicos e biológicos;
- estabelecer métodos analíticos para quantificação;
- detectar e quantificar os produtos de oxidação do DHA, AA e LA no modelo de esclerose lateral amiotrófica;
- avaliar o perfil de ácidos graxos e do metabolismo lipídico no tecido adiposo dos animais modelo de esclerose lateral amiotrófica.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - MATERIAIS

Ácido 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,9Z-docosahexaenoico (DHA), ácido 5S-hidroxi-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico 8-5,6,8,9,11,12,14,15-d8 (5(S)-HETE-d8) (padrão interno) e ácido 12S-hidroxi-5Z,8Z,10E,14Zeicosatetraenoico-5,6,8,9,11,12,14,15-d8 (12(S)-HETE-d8) (padrão externo) foram obtidos da CAYMAN CHEMICALS CORP. (Ann Arbor, MI). Metanol, acetonitrila, isopropanol, hexano e clorofórmio, todos grau HPLC, assim como o hidróxido de amônio, ácido fórmico e éter etílico grau PA foram adquiridos da JT Baker (Avantor Performance Materials, Mexico). Hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), 2,6-di-tert-butil-p-cresol (BHT), mesilato de deferoxamina, resina Chelex 100, ácido dietilenetriaminopentaacético (DTPA), borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), proteinase K, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), dodecilssulfato de sódio (SDS), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O), agarose, triton X-100, albumina de soro bovino (BSA) foram obtidos da SIGMA-ALDRICH INC. (St. Louis, MO). Cloridrato de cetamina e de xilazina foram adquiridos da Vet Brands (Sespo Ind. Com., Brazil). Mix para reação de PCR 2x e tampão azul (6x DNA Loading Dye) foram obtidos da Fermentas Molecular Biology tools (THERMO SCIENTIFIC). Os primers sodi3-f (GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA) e sodE4-r (CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA) foram adquiridos da LIFE TECH BRASIL (Brasil). O reagente de Bradford foi adquirido da BIO-RAD (Hercules, CA, EUA). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura purificada através do Sistema Direct-Q3 system

(MERCK MILLIPORE, Alemanha) tratada com a resina Chelex 100 e filtrada com filtros 0.22  $\mu\text{m}$  da MERCK MILIPORE, Alemanha.

### 3.2 - MÉTODOS

#### 3.2.1 - Síntese e purificação dos hidroperóxidos lipídicos

A síntese de hidroperóxidos do ácido docosahexaenoico (HpDoHE), do ácido araquidônico (HpETE) e do ácido linoleico (HpODE) foi realizada por fotooxidação ([Miyamoto, Martinez, Martins, et al., 2003](#)) acrescentando-se 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de azul de metileno (0,1 M em metanol) a 1 g de ácido graxo dissolvido em 50 mL de clorofórmio. A reação foi conduzida em um balão (pyrex, 100 mL) imerso em banho de gelo. A mistura foi irradiada com duas lâmpadas de tungstênio (500 W) distantes cerca de 10 cm do balão de vidro por aproximadamente 2 horas (Figura 5).

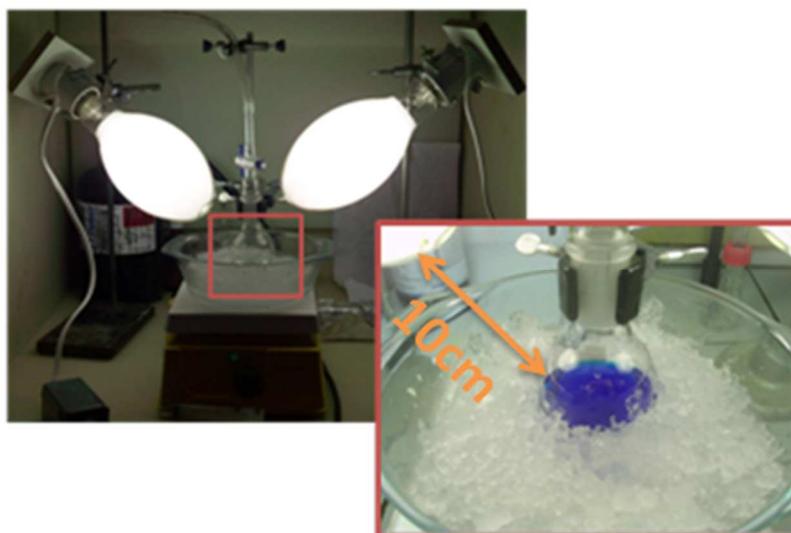


Figura 5: Esquema da fotooxidação de PUFA..

A formação de hidroperóxidos foi monitorada por cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês *thin layer chromatography*) em placas de sílica eluídas com uma mistura de clorofórmio:metanol (90:6, v/v) e medindo-se a absorvância da solução no UV a 234 nm. A visualização dos hidroperóxidos nas placas foi realizada através da nebulização das placas com uma solução ácido sulfúrico 50% em água seguida de aquecimento.

Os hidroperóxidos foram analisados e purificados por HPLC utilizando um equipamento da SHIMADZU (Tóquio, Japão) equipado com duas bombas LC20AD, um auto injetor SLL20AC, um detector de arranjo de diodos SPDM20A, forno para a coluna CTO20A e uma interface controladora SLL20AC. O detector PDA foi programado para varrer de 200 a 500nm, os hidroperóxidos foram monitorados em 205 e 235 nm. Para a análise foi utilizada a coluna kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  C18 100 $\text{\AA}$  dimensões 100 x 4,6 mm (Phenomenex Inc., Torrance, CA), eluída com fase móvel constituída por fase A (ácido fórmico 0,005 % em água) e fase B (acetonitrila com ácido fórmico 0,005 %). A eluição foi realizada em modo gradiente: de 0 a 20 min 55 % B, de 20 a 21 min de 55 a 95 % B, de 21 a 28 min 95 % B, de 28 a 29 min de 95 a 55 % B e de 29 a 35 min 55 % B; com fluxo de 0,6 mL/min. Para a purificação, inicialmente os hidroperóxidos foram separados em fase reversa utilizando uma coluna C18 semi-preparativa – Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (2) 100  $\text{\AA}$ , 250 x 10 mm, (Phenomenex Inc., Torrance, CA) eluída com fase móvel constituída por acetonitrila: água: ácido fórmico (70:30:0,005; v/v/v) com fluxo de 4,7 mL/min, adaptado de [Lyberg e Adlercreutz \(2006\)](#) e [Vanrollins e Murphy \(1984\)](#). As frações obtidas foram secas com o auxílio de rotoevaporador e nitrogênio. O resíduo foi solubilizado em metanol e estocado a – 80 °C. Cada um dos 5 grupos obtidos foi repurificado por HPLC em fase normal utilizando um coluna de sílica semi-preparativa– Luna 5  $\mu\text{m}$  sílica 100  $\text{\AA}$ , 250 x 10mm, (Phenomenex Inc., Torrance, CA) eluída com fase

móvel constituída por hexano: isopropanol: ácido acético (99:1;0,1; v/v/v) com fluxo de 10 mL/min, adaptado de [Reynaud \*et al.\* \(1993\)](#).

A quantificação dos hidroperóxidos foi realizada através da medida da absorvância dos dienos conjugados a 235 nm ( $\epsilon_{235\text{nm}} = 23000 \sim 25200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ([Gibian e Vandenberg, 1987](#); [Mulliez \*et al.\*, 1987](#); [Wu e Rao, 1999](#); [Browne e Armstrong, 2000](#); [Butovich \*et al.\*, 2005](#)) e por reação iodométrica ([Buege e Aust, 1978](#)).

### 3.2.2 - Obtenção dos hidróxidos

A redução de HpDoHE a HDoHE, HpETE a HETE e HpODE a HODE foi realizada de acordo com [Terao e Matsushita \(1977\)](#). A uma alíquota de 1ml de HpDoHE em metanol ( $\approx 3 \text{ mM}$ ) foram adicionados  $\approx 0,0001 \text{ g}$  de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). A mistura reacional foi deixada em repouso em banho de gelo por 2 horas. Acrescentou-se 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $20 \mu\text{L}$  HCl (10N) e 4 mL hexano: éter (50:50). Agitou-se, vigorosamente, a solução com vórtex. Coletou-se a fase orgânica. Depois foram acrescentados 2ml de clorofórmio. Agitou-se, vigorosamente, a solução com vórtex. Coletou-se a fase orgânica. As duas fases coletadas foram combinadas e secas sob fluxo de nitrogênio. A redução foi realizada tanto com a mistura de hidroperóxidos quanto com os isômeros isolados.

A eficiência de redução e a concentração dos hidróxidos foram determinadas por HPLC-PDA através da comparação das áreas dos cromatogramas monitorando comprimento de onda igual a 205 nm (isômeros que não possuem dienos conjugados) e a 235 nm (isômeros que possuem dienos conjugados) com relação aos hidroperóxidos previamente quantificados.

### 3.2.3 - Análise dos produtos de oxidação dos ácidos graxos

#### 3.2.3.1 - *Análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro de massas triplo-quadrupolo apenas para os produtos de oxidação do DHA*

##### 3.2.3.1.1 - Padronização cromatográfica

O método cromatográfico foi desenvolvido em um sistema de *Ultra High Performande Chromatography* - UHPLC (Acquity UPLC HClass, WATERS CORPORATION, Milford, MA) equipado com bomba quaternária, detector de PDA, termoestato para coluna e autoinjeter de amostra, todos UPLC<sup>®</sup> ACQUITY (Waters, Manchester, UK). O desenvolvimento do método foi realizado com o auxílio do software Fusion (S- Matrix Corp , Eureka, CA). Os dados foram obtidos e processados através do software Empore 3 (Waters, Manchester, UK).

##### 3.2.3.1.2 - Padronização do método LC-MS/MS

O método cromatográfico padronizado foi transferido para o sistema Acquity UPLC (Waters, Manchester, UK) acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO<sup>™</sup> TQ-S (Waters, Manchester, UK), para a obtenção de método quantitativo de análise dos HpDoHE e HDoHE em amostras biológicas. Os dados foram adquiridos e processados utilizando o software MassLynx 4.1.

As análises de MS e MS/MS foram realizadas por eletrospray (ESI) em modo negativo. A temperatura da fonte foi fixada para 150 °C, a temperatura de dessolvatação foi 550 ° C, e a voltagem do capilar foi fixada a 3 kV. O “*dwell time*” foi definido automaticamente em 9 ms. A energia de colisão e voltagem do cone foram otimizados para cada composto com o auxílio da ferramenta Intellistart de software MassLynx (Waters Corporation, Milford, MA). Pequenos ajustes em energias de colisão, também

foram realizadas manualmente para alguns dos analitos cujos íons alvo apresentavam baixa intensidade. Em ambos os casos, a otimização foi efetuada através de infusão direta dos padrões isolados. A voltagem do cone e da energia de colisão foram escolhidas como as energias que geram o sinal mais forte e o maior precursor de intensidade para o fragmento escolhido, respectivamente. Dois métodos de monitoramento de reação selecionada - *selected reaction monitoring (SRM)*, um para HpDoHE e outro para HDoHE, foram criados separadamente para assegurar a máxima sensibilidade para a detecção e quantificação dos isômeros. A identificação e quantificação de analitos foram realizadas com o software TargetLynx (Waters Corp, Milford, MA).

#### 3.2.3.1.3 - Validação do método

A validação do método foi realizada em 3 dias diferentes no intuito de determinar a linearidade, o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), variação inter- e intradia, e a recuperação para todos os compostos. Soluções estoque dos analitos (padrões sintetizados e purificados de acordo com os itens 3.2.1 - e 3.2.2 - ) foram preparadas em acetonitrila: metanol: H<sub>2</sub>O (52:18:30, v/v/v) e armazenadas em frascos âmbar a -80 ° C. Estas soluções foram diluídas para a construção das curvas de calibração, nas seguintes concentrações. 10, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025 e 0.01 ng/μL os HpDoHE; e 4, 2, 1, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, 0.0050, 0.0025, 0.0012, 0.0006 e 0.0003 ng/μL para os HDoHE . Para a análise quantitativa, 10 μL de 5(S)- HETE-d8 (12,5 ng/mL em acetonitrila: metanol: H<sub>2</sub>O (52:18:30, v/v/v) e 12(S)-HETE-d8 (12,5 ng/mL em acetonitrila: metanol: H<sub>2</sub>O (52:18:30, v/v/v) foram adicionados às amostras. O volume de injeção foi de 10 μL. As curvas de calibração foram construídas através da representação gráfica da relação entre as áreas dos picos do analito e do padrão interno em função da concentração de

analito por meio de uma regressão linear. A linearidade do método foi avaliada da análise das curvas de calibração contendo 8 concentrações diferentes, em quintuplicata.

Para o cálculo de recuperação uma solução de tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline* - PBS) foi enriquecida quer antes quer após a extração (3.2.5.1.1 - Método 1) com 1 ng/mL de cada analito. A relação entre as áreas dos cromatogramas antes e depois foi utilizada no cálculo da recuperação. O mesmo procedimento foi realizado com o plasma e homogenato de cérebro. A exatidão e precisão do ensaio foram avaliadas através da análise de soluções dos analitos em metanol preparadas em três diferentes concentrações, em três réplicas no mesmo dia (intradia) e em 3 dias consecutivos (interdia). A precisão foi calculada como o desvio -padrão relativo, ou seja, coeficiente de variação (CV %) e a exatidão foi determinada a partir da relação percentual da concentração medida pela concentração esperada.

### 3.2.3.2 - *Análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro de massas triplo quadrupolo – armadilha de íons (Qtrap – do inglês triple-quadrupole – ion trap)*

A análise dos produtos de oxidação do ácido docosahexaenoico, do ácido linoleico e do ácido araquidônico foi realizada por LC-ESI/MS/MS. Foi utilizado um HPLC série 1200 da Agilent constituído por três bombas (G1312B, G1312A e 1200 Isocratic Pump), uma válvula de troca automática, um forno de coluna (G1316B), um detector de arranjos de diodo (DAD) (G1315C) e autoinjeter (G1367C) acoplado ao espectrômetro de massas 4000-Qtrap constituído por um triplo quadrupolo acoplado a um “ion trap” (armadilha de íons) (AB SCIEX, Concord, CA). Os dados foram obtidos e processados através do software Analyst 1.6 (AB SCIEX, Concord, CA).

Os analitos foram separados cromatograficamente através de uma coluna Kinetex C18 2.6 µm 100Å, 100 x 2.1 mm (PHENOMENEX, Torrance, CA) eluída com a fase A (ácido fórmico 0,005 % em água) e B (acetonitrila com 0,005 % de ácido

fórmico), em um fluxo igual a 0.200 mL/min. O gradiente de eluição consistiu em: 55% B de 0 a 9 min, no minuto seguinte o gradiente subiu linearmente de 55 para 99% B, permaneceu por mais 5 min a 99% B, no minuto seguinte a porcentagem de B baixou novamente para 55% e por fim ficou por 9 minutos nesta condição, para garantir o equilíbrio da coluna. Totalizando um tempo de corrida de 25 minutos.

A bomba isocrática foi mantida durante os 25 minutos de análise com fluxo de 0.2 mL/min.

Foi utilizado um sistema de válvula no intuito de direcionar o fluxo do detector de DAD para o espectrômetro de massas de 0 a 13 minutos. Nos demais minutos da análise o eluente proveniente das bombas binárias que passou pela coluna e pelo detector de DAD foi descartado e o espectrômetro de massas recebeu apenas o eluente que vinha diretamente da bomba isocrática. O volume de injeção foi de 5 µL. A temperatura do forno de coluna e do autoinjeter foi mantida a 40 e 4 °C, respectivamente.

O método de aquisição foi dividido em dois períodos. No primeiro período os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados da seguinte forma: modo de monitoramento SRM, fluxo de gás que impede a entrada de gotículas de solvente na parte interna do espectrômetro (CUR - *curtain gas*) 30 psi, voltagem aplicada na fonte de íons onde se forma o spray (IS - *ion spray*) -4000 V, temperatura da fonte (TEM) = 550 °C, gás de nebulização (GS1) = 40 psi, gás auxiliar (GS2) = 60 psi, gás de colisão (CAD) = baixo (LOW), aquecimento da interface (*ihe-interface heater*) = ligada (ON), potencial de entrada na cela de colisão (EP) -10 V. Os demais parâmetros foram padronizados individualmente conforme Tabela A 1. Neste período, o interesse era apenas uma análise qualitativa de produtos de oxidação secundária dos ácidos graxos de interesse.

No segundo período os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados automaticamente da seguinte forma: CUR = 30 psi, IS = -4000 V, TEM = 550

°C, GS1 = 40 psi, GS2 = 60 psi, CAD = LOW, ihe = ON, EP = -10. Os demais parâmetros foram padronizados individualmente conforme Tabela A 2, Tabela A 3, Tabela A 4 e Tabela A 5. Neste período, o interesse era quantitativa dos hidroperóxidos e hidróxidos dos ácidos graxos de interesse.

#### 3.2.3.2.1 - Validação do método

A validação do método foi realizada em 3 dias diferentes no intuito de determinar a linearidade, o limite de detecção (LD) e de quantificação (LOQ), variação inter- e intradia, e a recuperação para todos os compostos. Soluções estoque dos analitos (padrões sintetizados e purificados de acordo com o itens 3.2.1 - e 3.2.2 - ) foram preparadas em metanol e armazenadas em frascos âmbar a -80 ° C. As soluções estoques eram compostas por: 40, 15, 11, 15, 11, 11, 9, 9, 9, 12, 3 e 4 ng/μL dos isômeros 20-, 19-, 17-, 16-, 14-, 13-, 11-, 10-, 8-, 7-, 5- e 4-HpDoHE, respetivamente; 25, 11, 6, 6, 6, 6, 10, 9, 4, 6, 0.8 e 3 ng/μL dos isômeros 20-, 19-, 17-, 16-, 14-, 13-, 11-, 10-, 8-, 7-, 5- e 4-HDoHE, respetivamente; 0,6 ng/μL dos isômeros 15-, 12-, 11-, 8- e 5-HETE; 30 ng/μL dos isômeros 13-, 12-, 10- e 9-HpODE e 2 ng/μL de 13-, 12-, 10- e 9-HODE. Estas soluções foram diluídas para a construção das curvas de calibração (2x, 4x, 16x, 32x e 125x). Para a análise quantitativa, 10 μL de 5(S)- HETE-d8 (padrão interno) (12,5 ng/mL em metanol com 100 μM de BHT e no final as amostras foram ressuspensas em 100 μL de metanol contendo 12(S)-HETE-d8 250 ng/mL (padrão externo). O volume de injeção foi de 5 μL. As curvas de calibração foram construídas através da representação gráfica da relação entre as áreas dos picos do analito e do padrão interno em função da concentração de analito por meio de uma regressão linear. A linearidade do método foi de avaliada da análise das curvas de calibração contendo 6 concentrações diferentes, em quintuplicata.

Para o cálculo da taxa de recuperação, uma solução de tampão fosfato solução salina (*phosphate buffered saline* - PBS) foi enriquecida quer antes quer após a extração (3.2.5.1.2 - Método 2) com cada analito. A relação entre as quantidades obtidas dos analitos antes e depois da contaminação foi utilizada no cálculo da recuperação. A exatidão e precisão do ensaio foram avaliadas através da análise nas soluções de PBS, contaminadas com cada analito em uma dada concentração e submetidas à extração. Estas foram preparadas em três réplicas no mesmo dia (intradia) e em 3 dias consecutivos (interdia). A precisão foi calculada como o desvio-padrão relativo, ou seja o coeficiente de variação (CV - %) e a exatidão foi determinada a partir da relação percentual da concentração medida pela concentração esperada.

### *3.2.3.3 - Análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro de massas quadrupolo – tempo de voo (QTOF – do inglês quadrupole – time of flight)*

Uma análise mais ampla dos ácidos graxos araquidônico, linoleico, linolênico, eicosapentaenoico, docosahexaenico e seus produtos de oxidação foi conduzida por LC-MS/MS utilizando HPLC Shimadzu constituído por uma unidade controladora (modelo CBM20A) uma bomba (modelo LC20AB), um forno de coluna (CTO20AC), e autoinjeter (SIL20AC) acoplado ao espectrômetro de massas híbrido TripleTOF 5600 que consiste em um quadrupolo acoplado a um “TOF” (“Time of flight” sigla em inglês para tempo de voo) (AB SCIEX, Concord, ON). Os dados foram obtidos através do software Analyst TF 1.6 (AB SCIEX, Framingham, USA) e processados através dos softwares MultiQuant 2.1.1 e Peak View 2.0 (AB SCIEX, Framingham, USA).

Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna Kinetex C18 2.6 µm 100 Å, 100 x 2.1 mm (Phenomenex Inc., Torrance, CA) eluída com a fase A (ácido fórmico 0,005% em água) e B (acetonitrila com 0,005% de ácido fórmico), em um fluxo igual a

0.200 mL/min. O gradiente de eluição foi realizado conforme o seguinte esquema: 55 %B de 0 a 9 min, no minuto seguinte o gradiente subiu linearmente de 55 para 99 %B, permaneceu por mais 5min a 99 %B, no minuto seguinte a porcentagem de B baixou novamente para 55% e por fim ficou por 6 minutos nesta condição, para garantir o equilíbrio da coluna. Foram injetados 20  $\mu$ L. As amostras foram mantidas no autoinjeter a 15 °C e a coluna a 40 °C.

No espectrômetro de massas, os analitos foram monitorados em modo negativo através de dois tipos de monitoramento: varredura total (*full scan ToF MS*) e varredura do íon produto (*product ion scan*).

No monitoramento do tipo varredura total foram analisados todos os íons com  $m/z$  de 100 a 1000. Os diferentes parâmetros do espectrômetro foram acertados da seguinte forma: CUR = 30 psi, voltagem aplicada no capilar que ioniza a amostra na fonte de íons (ISVF- *IonSpray Voltage Floating*) = -4500 V, TEM = 450 °C, GS1 = 45 psi, GS2 = 50 psi, DP = - 80.00, CE = -10.00 e parâmetro de auxilia na focalização da massa XA1 = 136.62.

No monitoramento do íon produto foram selecionados os precursores relativos aos hidroperóxidos e hidróxidos do ácido linoleico, do ácido docosaenoico, do ácido araquidônico, do ácido linolênico e do ácido docosaenoico deuterado, bem como aos próprios ácidos graxos não oxidados e os isoprostanos (8-iso-PGF2 alfa e 8.12-iso-iPF2 alfa-VI, na forma não deuterada e deuterada), resolvinas D1 e D2 e a neuroprotectina D1 (Tabela 2). Foram monitorados todos os íons produtos dos precursores selecionados na faixa de 50-1000 Da. Os diferentes parâmetros do espectrômetro foram acertados da seguinte forma: CUR = 30 psi, ISVF = -4500 V, TEM = 500 °C, GS1 = 45 psi, GS2 = 50 psi, IRD - tempo em milissegundos antes do pulso de íons (*Ion Release Delay*) = 67 ms,

IRW – duração em milissegundos do pulso de íons (*Ion Release Width*) = 24,92. As demais energias estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros do espectrômetro de massas padronizados para a análise dos íons produto selecionados.

<b>Abreviação</b>	<b>MS</b>	<b>DP</b>	<b>CE</b>	<b>CES*</b>	<b>XA1</b>
<b>DHA</b>	327.7	-70	-22	5	122.35
<b>HpDoHE</b>	359.2	-80	-50	30	127.44
<b>HODE</b>	343.2	-80	-50	30	124.91
<b>Resolvinas</b>	375.2	-80	-50	30	130.03
<b>Neuroprotectina D1</b>	359.2	-80	-50	30	127.44
<b>DHA-d5</b>	332.2	-80	-50	30	123.15
<b>HpDoHE-d5</b>	364.2	-80	-50	30	128.27
<b>HDoHE-d5</b>	348.2	-80	-50	30	125.71
<b>LA</b>	279.2	-90	-110	25	114.67
<b>HpODE</b>	311.1	-60	-20	3	119.78
<b>KODE</b>	293.1	-170	-27	3	116.9
<b>HODE</b>	295.1	-60	-25	3	117.22
<b>AA</b>	303.2	-80	-50	30	118.51
<b>HpETE</b>	335.2	-80	-50	30	123.63
<b>HETE</b>	319.2	-80	-50	30	121.67
<b>HETE-d8</b>	327.7	-70	-22	5	122.35
<b>EPA</b>	301.2	-80	-50	30	118.19
<b>HpEPE</b>	333.2	-80	-50	30	123.31
<b>HEPE</b>	317.2	-80	-50	30	120.75
<b>LNA</b>	277.2	-80	-50	30	114.35
<b>HpOTrE</b>	309.2	-80	-50	30	119.47
<b>HOTrE</b>	293.2	-80	-50	30	116.91
<b>OA</b>	281.2	-80	-50	30	114.99
<b>HpOME</b>	313.2	-80	-50	30	120.11
<b>HOME</b>	297.2	-80	-50	30	117.55
<b>Isoprostanos</b>	353.2	-80	-50	30	126.51
<b>Isoprostanos-d4</b>	364.2	-80	-50	30	128.27

\* CES Collision energy spread (é o valor da faixa de variação da energia de colisão)

Abreviações: Ácido linoleico (LA), hidroperóxidos do ácido linoleico (HpODE), hidróxidos do ácido linoleico (HODE), ácido docosaexaenoico (DHA), hidroperóxidos do ácido docosaexaenoico (HpDoHE), cetonas resultantes da desidratação do hidroperóxido do ácido docosaexaenoico (KODE), hidróxidos do ácido docosaexaenoico (HDoHE), ácido docosaexaenoico deuterado (DHA-d5), hidroperóxidos do ácido docosaexaenoico com 5 deutérios (HpDoHE-d5), hidróxidos do ácido docosaexaenoico com 5 deutérios (HDoHE-d5), ácido araquidônico (AA), hidroperóxidos do ácido araquidônico (HpETE), hidróxidos do ácido araquidônico (HETE), ácido eicosapentaenoico (EPA), hidroperóxidos do ácido eicosapentaenoico (HpEPE), hidróxidos do ácido eicosapentaenoico (HEPE), ácido linolênico (LNA), hidroperóxidos do ácido linolênico (HpOTrE), hidróxidos do ácido linolênico (HOTrE), ácido oleico (OA), hidroperóxidos do ácido oleico (HpOME), hidróxidos do ácido oleico (HOME), isoprostanos (8-iso-PGF2 alfa e 8.12-iso-IPF2 alfa-VI, na forma não deuterada e deuterada), resolvinas D1 e D2 e a neuroprotectina D1.

### 3.2.4 - Animais utilizados

O modelo animal utilizado para o estudo do DHA, LA, AA e se seus produtos de oxidação foram os ratos da raça Sprague Dawley transgênicos que superexpressão a proteína cobre-zinco-superóxido dismutase (SOD1) contendo a mutação G93A (SOD1<sup>G93A</sup>), eles são portadores de oito cópias do gene humano da proteína citada, modelo este desenvolvido pela empresa Taconic para a esclerose lateral amiotrófica (ELA).

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e ciclo de claro-escuro, alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela comissão de ética em cuidados e Uso animal (CECUA) do IQ-USP no dia 22 de dezembro de 2009, vide anexos. O mesmo foi renovado em 2011 (certificado número 15/2011) e em 2013 (certificado número 15/2011).

O acompanhamento dos animais bem como o estudo dos níveis de produtos de oxidação dos ácidos graxos nos animais ELA foram realizados em colaboração com o aluno de doutorado Florêncio Porto Freitas, do grupo da Profa. Marisa Helena Gennari de Medeiros, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

#### 3.2.4.1 - *Genotipagem dos animais*

A distinção entre os animais ELA e os animais controles só é possível através da técnica de genotipagem. Para isso um pequeno pedaço da orelha dos animais foi coletado

pelo biotério FCF-IQ-USP. A este foram adicionados 300  $\mu$ L de tampão de digestão (tampão 50mM tris-HCl, pH 8,0 contendo 50mM de EDTA e 0,5 % SDS) e incubados a 65 °C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão de digestão contendo proteinase K (10 mg/mL). A mistura reacional foi então incubada durante a noite a 55 °C, sob agitação. Após a digestão, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 min. 10  $\mu$ L da amostra digerida foram diluídos em 190  $\mu$ L de água autoclavada e aquecidos a 95 °C por 15 min para a inativação da proteinase. A 2  $\mu$ L de amostra foram adicionados 25  $\mu$ L de PCR master mix 2x constituído por *Taq* DNA Polimerase 0,05 U/ $\mu$ L, tampão PCR, MgCl<sub>2</sub> 4 mM e 0,4 mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador específico (primer): sodi3-f primer (GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA) e sodE4-r primer (CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA); e 22,6  $\mu$ L de água.

As amostras foram então submetidas à reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction” - PCR) para a amplificação do gene da SOD1 humana e assim identificar os animais positivos para a doença esclerose lateral amiotrófica (ELA). O ciclo de PCR utilizado foi 95 °C por 5 min (1x), 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 2 min (35x) e 72 °C por 5 min. Ao final da reação, foram adicionados 8  $\mu$ L de tampão azul a cada amostra. Por fim, os produtos obtidos foram então analisados por eletroforese em gel de agarose.

#### 3.2.4.2 - Acompanhamento dos sintomas

O desenvolvimento dos sintomas característicos da doença foi acompanhado pela avaliação do peso corporal dos animais e da perda de movimentos das patas ([Thonhoff et al., 2007](#)). A escala descrita por [Thonhoff et al. \(2007\)](#) classifica o estado geral do animal nos seguintes níveis: 5 – todos os movimentos normais; 4 – ligeira perda

de peso acompanhada de perda de força ou ligeira atrofia dos membros sem o comprometimento do movimento; 3 – perda acentuada de peso, atrofia dos membros e perda de capacidade de levantar na caixa; 2 - perda completa de força nos membros posteriores acompanhados por fraqueza dos membros anteriores, incapacidade de arrastar a parte inferior do corpo, ainda apresentam o reflexo de quando colocados de barriga para cima conseguem voltar à posição normal para ambos os lados; 1 – apresentam o reflexo de virar para apenas um lado; e 0 – ausência do reflexo para ambos os lados dentro de um espaço de tempo de 30 segundos.

Os animais foram considerados sintomáticos quando apresentaram uma perda de  $\approx 20\%$  do peso corporal máximo acompanhada de atrofia/paralisia dos membros, ponto 3 da escala de [Thonhoff \*et al.\* \(2007\)](#).

#### 3.2.4.3 - Eutanásia dos animais

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados com uma dose intraperitoneal de 90 mg/kg de animal de cloridrato de cetamina e 10 mg/kg de animal de cloridrato de xilazina. Após ser verificada a ausência de reflexos e sentidos, foi realizada a coleta de sangue por pulsão cardíaca. Os tecidos adiposos (subcutâneo, retroperitoneal e epididimal) e o cérebro foram coletados, lavados em solução salina 0,9 %. Os tecidos foram devidamente aliquotados.

Para os ensaios de perfil de ácidos graxos e de seus produtos de oxidação, as alíquotas correspondentes ao córtex motor foram homogeneizadas na proporção 1:5 em tampão PBS 10mM contendo 100  $\mu$ M de DTPA e 100  $\mu$ M mesilato de deferoxamina em pH 7,4.

Para os ensaios com os adipócitos, os tecidos adiposos epididimal (EPI), subcutâneo (SC) e retroperitoneal (RP) foram digeridos pela colagenase como descrito por [Rodbell \(1964\)](#).

#### 3.2.4.4 - Dosagem de proteínas

O método de quantificação de proteínas utilizado foi o método de Bradford. Este clássico método é baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” e proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm ([Bradford, 1976](#); [Zaia et al., 1998](#)).

A dosagem de proteínas foi feita utilizando kit de dosagem de proteína da Bio-Rad (Protein Assay). A 10 µL de homogenatos, ou plasmas, foram adicionados 395 µL de tampão de lise (composto por 500 µL tampão tris-HCl pH 7.4 1 M, 1 mL NaCl 1.5 M, 1 mL triton X-100 e 7.5 mL de água). Depois as amostras lisadas foram sujeitas a diluição em uma proporção igual a 5x em água. Para a análise foram utilizadas placas de 96 poços. Em cada poço foram adicionados, 10 µL de amostra, 790 µL água e 200 µL de reagente de Bradford.

A curva de calibração foi construída utilizando a albumina bovina nas concentrações de 0, 2, 4, 8, 10, 12,15 e 20 µg/mL, em triplicata.

As amostras foram analisadas em duplicata. As absorbâncias foram lidas no leitor de placas SpectraMax M5 Multi-Mode (Molecular Device Sunnyvale, CA), a 595 nm.

### 3.2.5 - Extração dos produtos de oxidação dos ácidos graxos

Os córtex motores coletados e homogeneizados foram sujeitos a dois métodos de extração.

#### 3.2.5.1.1 - Método 1

A 500  $\mu\text{L}$  de tampão PBS, homogenato de córtex motor ou plasma, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  metanol arrefecido em gelo contendo 100  $\mu\text{M}$  BHT e 5(S)-HETE-*d8* (0.25 ng/mL) e 500  $\mu\text{L}$  KOH (1 M) em solução metanólica. As misturas reacionais foram incubadas durante 30 minutos no escuro a 37 °C. Após o tempo de incubação, as amostras foram arrefecidas em gelo e acidificadas com 60  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico. Em seguida, as soluções foram extraídas com clorofórmio / metanol / H<sub>2</sub>O, tal como descrito por [Bligh e Dyer \(1959\)](#), com modificações como descrito por [Yoshida \*et al.\* \(2008\)](#). As amostras foram homogeneizadas usando um misturador tipo vórtex durante 1min, seguida de centrifugação a 1500 g durante 5 min a 4 °C. A camada orgânica foi recolhida e seca com nitrogênio, e o resíduo foi ressuspendido em 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila:metanol:H<sub>2</sub>O (52:18:30), acrescidos de 10  $\mu\text{L}$  de 12(S)-HETE-*d8* (12.5 ng/ $\mu\text{L}$ ) na mesma mistura de solventes. A solução resultante foi filtrada utilizando filtro Millex ® de 0,22  $\mu\text{m}$  de PTFE.

#### 3.2.5.1.2 - Método 2

A 500  $\mu\text{L}$  de PBS ou homogenato de cérebro, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  metanol contendo 100  $\mu\text{M}$  de BHT e 2.5  $\mu\text{g/mL}$  de 5(S)-HETE-*d8*. Em seguida, 1 mL da solução de extração composta por hexano: isopropanol: ácido acético 1 M (30:20:2). As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto. Adicionou-se mais 1 mL hexano, seguido de

agitação por 1 minuto e centrifugação a 1500 g, 4 °C por 1 min e coleta da fase orgânica. Este passo foi realizado duas vezes. As duas fases coletadas foram reunidas, secas com nitrogênio e ressuspensas em 1 mL isopropanol. Para reação de saponificação 1 ml de NaOH 1M foi adicionado. Após a agitação por 30 segundos, as misturas reacionais foram incubadas a 37 °C por 30 min. Após este período, as amostras foram resfriadas. Em banho de gelo, foram adicionados 60 µL de HCl. Por fim, 1 ml de hexano foi adicionado, seguido de agitação por 1 minuto, centrifugação a 1500 g, 4 °C por 1 minuto e coleta da fase orgânica. Este passo foi repetido mais uma vez. As fases coletadas foram secas, solubilizadas em 100µL do 12(S)-HETE-d8 250 ng/mL em metanol contendo 100 µM BHT e filtradas em filtros Millex ® de 0,22 µm de PTFE.

### 3.2.6 - Isolamento e análise dos adipócitos

Os adipócitos dos tecidos adiposos epididimal (EPI), subcutâneo (SC) e retroperitoneal (RP) foram isolados mediante a técnica de digestão de tecido pela colagenase, descrita por [Rodbell \(1964\)](#), com algumas modificações para adaptar o método às nossas condições laboratoriais. Em resumo, as gorduras EPI, SC e RP foram incubadas em 4,0 mL de tampão digestivo (DMEM, HEPES 25 mM, BSA 4 %, colagenase tipo II 1,25 mg/mL, pH 7,45) por cerca de 60 minutos, a 37 °C, em banho-maria, com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão EHB (sais de EARLE, HEPES 25 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45) mantido a 37 °C. Para a determinação do lipócrito (porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total), aproximadamente 40 µL da suspensão celular em tampão EHB foram colocados em

capilar de vidro e submetidos à rápida centrifugação (2.000 rpm por 1 minuto). O volume total da suspensão corresponde a 100 % e o volume de adipócitos obtido após a centrifugação nos fornece o lipócrito da amostra. Para análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram avaliadas em microscópio óptico (aumento de 100x) acoplado à câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 - MOTIC). Utilizou-se o programa Motic-Images Plus 2.0 para medida da área transversal celular, da qual se obteve o raio celular médio. Em cada preparação foram medidas 50 células. A partir deste valor, assumindo-se que o adipócito isolado é esférico foram calculados o volume, a área de superfície celular média e o número de células, conforme as fórmulas propostas por [Fine e Digirolamo \(1997\)](#).

#### 3.2.6.1 - Lipólise

A lipólise foi avaliada em condições basais (não-estimulada) e maximamente estimulada com isoproterenol. Adipócitos isolados foram incubados em tampão Earle/Hepes contendo 20 mM/BSA 1 % de glicose (5 mM), pH 7,4 na presença ou na ausência de isoproterenol 1  $\mu$ M (agente lipolítico). As células foram previamente tratadas por 15 minutos com adenosina (0,05  $\mu$ g/mL), a 37 °C. Em seguida, acrescentou-se adenosina desaminase nos tubos basais (ADA, Sigma, 0,2 U/mL em tampão EHB, pH 7,45) e incubou-se por mais 5 minutos, a 37 °C (para possibilitar a degradação da adenosina). Em seguida, adicionamos ácido ascórbico nos tubos destinados para ensaio basal e isoproterenol ( $2 \times 10^{-6}$  M) nos poços destinados para ensaio de lipólise estimulada. O tempo de incubação foi de 30 minutos a 37 °C e, ao final, a mistura de incubação (volume total de 200  $\mu$ l) foi centrifugada em microcentrífuga refrigerada a 0 °C por 5 minutos a 7.000 rpm. Alíquotas (120  $\mu$ L) do infranadante foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado pelas células, pelo método enzimático-

colorimétrico. Utilizou-se kit de determinação de glicerol livre (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos).

### 3.2.6.2 - *Teste de incorporação de D-[U-<sup>14</sup>C]-glicose em lipídios*

Os adipócitos (concentração final 30-40%) foram incubados em tampão Krebs/Ringer/Fosfato /BSA/glicose 1 mM, pH 7,4 a 37 °C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5%, foram pipetados em tubos de ensaio de polipropileno 17x100 mm contendo D-[U-<sup>14</sup>C]-glicose (0,05 µCi/tubo), na ausência ou presença insulina (10 nM). Estes tubos foram vedados com tampas de borracha. A seguir, os tubos foram enriquecidos com uma atmosfera com 95 % de O<sub>2</sub> 5 % de CO<sub>2</sub> e incubados por 120 minutos em banho-maria, a 37 °C. Em seguida, foi realizada a extração dos lipídios mediante a adição de 2,5 mL de reativo de DOLE (isopropanol:n-heptano:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N, 4:1:0.25 v:v:v) no meio de incubação. Agitou-se a mistura por 4 a 5 vezes (sessões de 10 segundos) em vórtex durante 30 minutos. Ao final do período, foram adicionados 1,5 mL de n-heptano e 1,5 mL de água deionizada. Após a agitação em vórtex, deixou-se a mistura decantar e alíquotas de 0,5 mL da fase superior (contendo os lipídios extraídos no n-heptano) foram transferidas para flaconetes contendo 2,5 mL de coquetel de cintilação biodegradável (EcoLume™, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para contagem da radioatividade beta incorporada. Os resultados foram expressos em nmol.10<sup>-6</sup> células. h<sup>-1</sup>.

### 3.2.6.3 - *Teste de incorporação de D-[U-<sup>14</sup>C]-glicose em ácidos graxos*

Na mistura composta por triacilglicerídeos (TAG) previamente obtida no experimento de incorporação de D-[U-<sup>14</sup>C]-glicose em lipídios foram adicionados 1 mL de etanol (95 %) e 250 µL de KOH (40 %). Os tubos de ensaio foram frouxamente

tampados e colocados em banho-maria à 60 °C por 1 hora. Em seguida o material foi resfriado a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e logo após adicionou-se 2 mL de HCl (3 N) e 2 mL de n-heptano. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e deixada em repouso por 10 minutos. Uma amostra de 1 mL da fase superior desta mistura foi retirada e transferida para um vial contendo 2,5 mL de líquido de cintilação que foi levado ao contador beta por 5 minutos.

#### 3.2.6.4 - *Teste de incorporação de D-[U-<sup>14</sup>C]-Glicose em glicerol*

A incorporação de D-[U-<sup>14</sup>C]-Glicose em glicerol foi obtida através do delta entre a incorporação de D-[U-<sup>14</sup>C]-Glicose em lipídios e ácidos graxos ([Alonso-Vale et al., 2008](#)).

#### 3.2.7 - Análise dos ácidos graxos nos animais por cromatografia gasosa

A análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa requer a sua derivatização na forma metilada. [Masood et al. \(2005\)](#) descrevem um método simplificado de análise destes compostos que associa a saponificação (liberação dos ácidos graxos) e sua metilação em um único método através de uma reação de transesterificação.

Os ácidos graxos foram determinados nas amostras de homogenato de adipócitos (adipócitos homogeneizados 1:4 em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4).

A 50 µL de amostra foram adicionados 1.75 ml de metanol, 50 µL de uma solução do padrão interno o ácido margárico (ácido heptadecanoico, 1 mg/mL em metanol) e por fim 100 µL de cloreto de acetila. Após um minuto de homogeneização através de um vórtex, as misturas foram incubadas por 60 min a 100 °C. Após o período de incubação, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente, até o total resfriamento. Foram então adicionados 750 µL de hexano, os tubos foram misturados por

1 min e a fase superior foi coletada. Este procedimento foi repetido mais uma vez. As duas fases coletadas foram combinadas, secas com nitrogênio e ressuspensas em 100 µL de hexano.

O perfil de ácidos graxos na forma metilada foi analisado utilizando a técnica de cromatografia gasosa (CG) com detecção por ionização de chama (ou em inglês *gas chromatography using flame ionization detection – GC-FID*). A análise foi conduzida em um CG modelo Trace 1310 (Thermo Scientific) utilizando uma coluna DB-FFAP (15 m x 0.1 mm ID x 0.1 µm espessura do filme. Programa de temperatura: inicial 150°C por 0.25min; rampa 35°C/min até 200°C; rampa 8°C/min até 225°C; mantém em 225°C por 3.2min; rampa 80°C/min até 245°C e mantém por 4.75min. Gás de arraste (hidrogênio - H<sub>2</sub>) em modo de pressão constante (345 kPa). O injetor foi acertado para as seguintes condições: temperatura 250 °C, em modo Split com fluxo de 60 mL/min, razão 30:1, fluxo da purga igual a 5 mL/min e volume de injeção de 1µl. O detector foi acertado da seguinte forma: temperatura igual a 250 °C, fluxo do ar sintético 350 mL/min, do hidrogênio igual a 35 mL/min, e do nitrogênio de 40mL/min.

Os ácidos graxos foram identificados pelo tempo de retenção usando como padrão o reagente Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich). Com este mesmo reagente foram construídas curvas de calibração. Para cada pico identificado, a área sob a curva foi integrada e a mesma foi normalizada pela área do padrão interno. A percentagem de cada um foi calculada em relação ao total de ácidos graxos identificados e integrados para cada amostra.

### 3.2.8 - Tratamento estatístico

Para a análise dos produtos de oxidação dos ácidos graxos foi utilizado o método de análise Kruskal-Wallis chi-squared que compara a mediana dos dados, considerando

nível de significância valor de  $p$  menor que 0,05. A análise estatística foi realizada em colaboração com as professoras doutoras Elisete C. Quintaneiro Aubin e Viviana Giampaoli, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

Para os dados do metabolismo lipídico foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com o pós-teste Bonferroni através do programa GraphPad InStat 3.01. Foi considerado significativo valor de  $p$  menor que 0,05.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os métodos de análise de hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos incluem as técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas à espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS) ([Wilson \*et al.\*, 1997](#); [Browne e Armstrong, 2000](#); [Masoodi e Nicolaou, 2006](#)).

Apesar de ter sido muito utilizada, a análise por GC-MS não é indicada para a análise dos hidroperóxidos lipídicos, visto que esta técnica necessita da redução dos hidroperóxidos a hidróxidos, seguida de derivatização dos mesmos. Por esse motivo, muitos trabalhos descrevem o cálculo da concentração os hidroperóxidos através da concentração dos hidróxidos. Fazendo uma dosagem antes e outra após a redução da amostra, a diferença entre os níveis encontrados corresponde à concentração dos hidroperóxidos ([Jira \*et al.\*, 1996](#)).

A análise por LC-MS apresenta como vantagem a possibilidade da análise qualitativa e quantitativa desses compostos sem a necessidade do processo de derivatização ([Browne e Armstrong, 2000](#)). Esta técnica permite o monitoramento da absorvância no UV em  $\approx 236$  nm e o monitoramento do espectro de massas.

Os hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos que possuem dienos conjugados absorvem fortemente nos comprimentos de onda de 234~236 nm ( $\epsilon=23000-27000$  M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) ([Browne e Armstrong, 2000](#)). O monitoramento de tais compostos por UV é, por si só, um método simples, contudo não específico nem sensível o suficiente para a detecção destes produtos em amostras biológicas ([Guichardant e Lagarde, 2009](#)).

A técnica de HPLC-MS/MS utilizada para a análise dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos oferece um grande ganho de sensibilidade e eficiência na identificação e quantificação dos produtos. Utilizando técnicas de ionização suaves, como o *electrospray*, é possível gerar o íon molecular o qual pode ser selecionado e fragmentado na câmara de colisão. O espectro dos íons resultantes da fragmentação desse íon molecular permite então a identificação do composto que está sendo analisado ([Murphy et al., 2001](#); [Lu et al., 2005](#)).

Com base nos íons filhos é possível montar o método de “*selected reaction monitoring*” (SRM), o qual se baseia no monitoramento dos compostos através de uma transição de  $m/z$ .

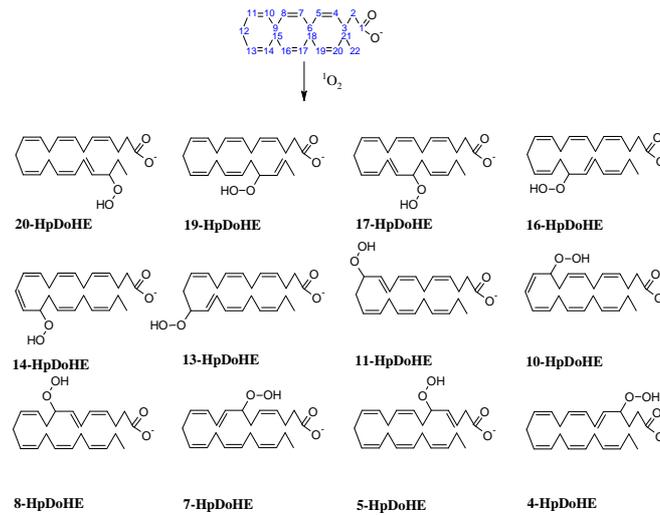
A maioria das análises lipidômicas descritas na literatura utiliza o modo de monitoramento SRM para a identificação e quantificação dos produtos de interesse. São parâmetros utilizados neste tipo de análise: o tempo de retenção e a transição de  $m/z$ . A “desvantagem” deste método é que este necessita de um conhecimento prévio da massa molecular e do perfil de fragmentação dos compostos na condição de análise utilizada ([Taguchi et al., 2005](#)).

Por todos os motivos expostos, uma descrição detalhada da padronização do método de análise quali e quantitativa por HPLC-ESI/MS/MS dos diferentes isômeros dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos é apresentada neste trabalho.

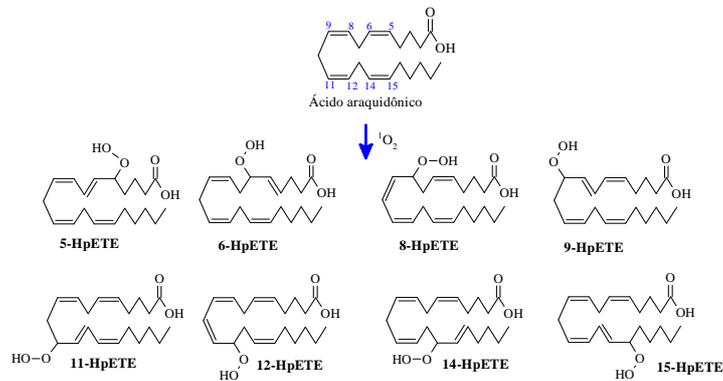
#### 4.1.1 - Síntese dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos

A síntese dos produtos de oxidação do DHA, LA e AA foi realizada de através da reação de fotooxidação (oxidação mediada pelo  $^1\text{O}_2$ ) dos mesmos (Figura 6).

(A) Ácido docosahexaenóico



(B) Ácido araquidônico



(C) Ácido linoléico

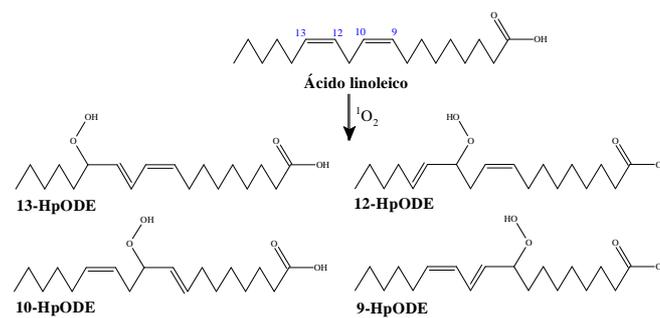


Figura 6:  $O^1O_2$  se adiciona diretamente aos carbonos das ligações duplas (A) (4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 e 20) e conseqüentemente são formados 12 isômeros de hidroperóxidos do ácido docosahexaenóico (HpDoHE); (B) (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 e 15) e conseqüentemente são formados 8 isômeros de hidroperóxidos do ácido araquidônico (HpETE) e (C) (9, 10, 12 e 13) e conseqüentemente são formados 4 isômeros de hidroperóxidos do ácido linoléico (HpODE).

A fotooxidação do DHA gera um conjunto de 12 isômeros do HpDoHE, uma vez que o DHA possui 6 ligações duplas. Assim a partir da fotooxidação são formados os

isômeros contendo hidroperóxidos na posição 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17,19 e 20 da cadeia do ácido graxo (Figura 6 - A).

Analogamente, a fotooxidação do ácido araquidônico gera um conjunto de 8 isômeros contendo hidroperóxidos nas posições 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 e 15 e do ácido linoleico gera os isômeros 9, 10, 12 e 13-HpODE (Figura 6 – B e C).

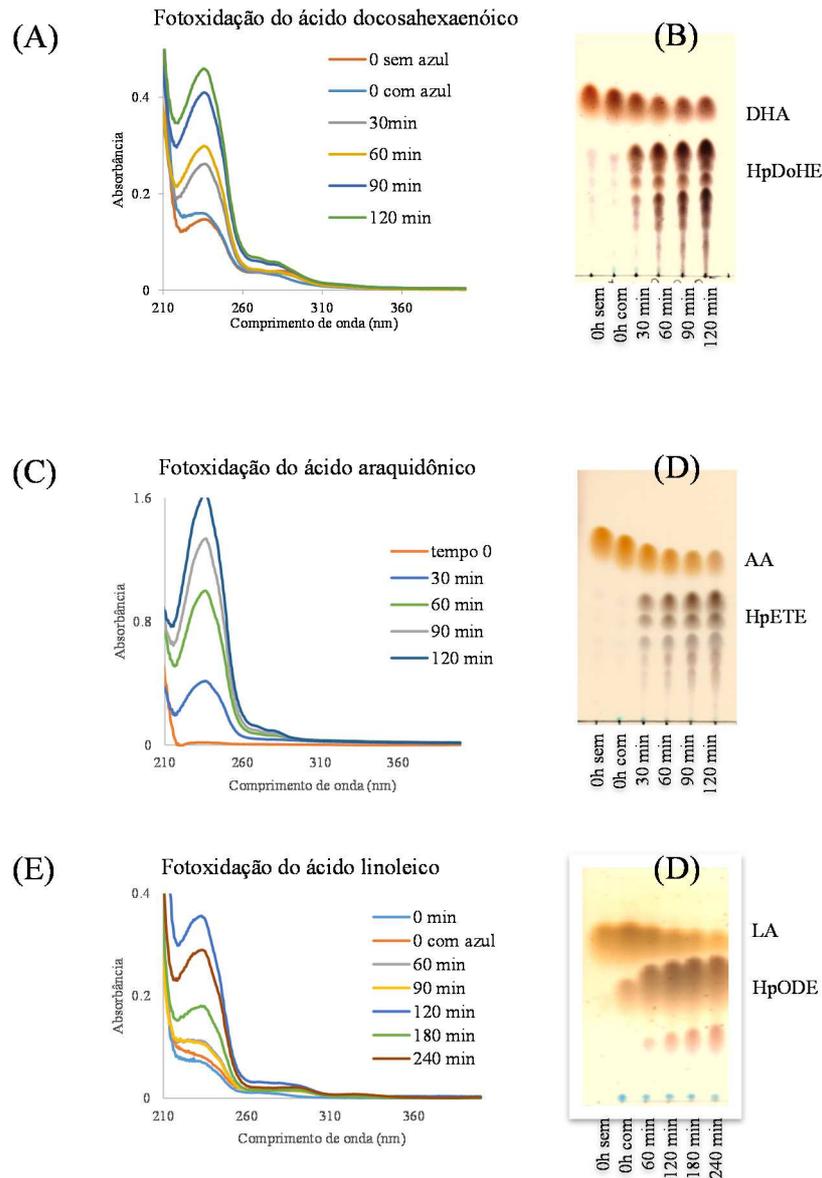


Figura 7: Formação dos hidroperóxidos lipídicos em decorrência da reação de fotooxidação dos ácidos graxos ao longo do tempo. (A) Os isômeros foram analisados por UV através da leitura em modo scan de 200 a 400nm. Para quantificação foi utilizada a leitura em 235 nm; (B) As alíquotas de HpDoHE foram analisadas por TLC eluída com clorofórmico: metanol (90:6); (C) espectros de absorbância das alíquotas da reação de fotooxidação do ácido araquidônico e (F) respectivo perfil cromatográfico quando analisados por TLC. (E) espectros de absorbância das alíquotas da reação de fotooxidação do ácido linoleico e (F) respectivo perfil cromatográfico quando analisados por TLC.

A reação de fotooxidação foi acompanhada pela formação de hidroperóxidos por espectrofotometria de UV (varredura de 200 a 400 nm) e por cromatografia em camada delgada (em inglês, *thin layer chromatography* – TLC). Alíquotas de 100µL foram colhidas a cada 30 min de reação e 5µL destes foram aplicados na placa de sílica, enquanto o restante foi seco sob fluxo de N<sub>2</sub>, solubilizado em metanol e analisado por UV (Figura 7).

A análise por HPLC da reação de fotooxidação do DHA e dos isômeros isolados mostrou a formação de 10 isômeros que podem ser monitorados pelos dienos conjugados em 235 nm. Em contraste a estes, dois isômeros não contêm dienos conjugados e foram detectados apenas em comprimentos de onda mais baixos (205 nm). São eles o 19- e o 5-HpDoHE, produtos exclusivamente formados na oxidação mediada por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Figura 8).

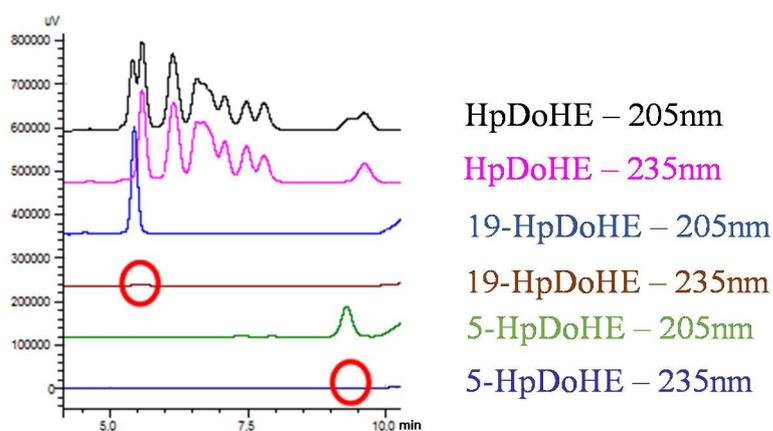


Figura 8: Análise cromatográfica da mistura de HpDoHE resultantes da fotooxidação, do 19-HpDHA e do 5-HpDoHE. As três amostras foram analisadas por HPLC utilizando a coluna kinetex C18, 100x 2,1mm, 2.6 µm, eluída com um gradiente composto por água: acetonitrila: ácido fórmico (45:55:0,05), com fluxo 0,2mL/min e detecção por arranjos de diodos em 205 (cromatogramas em preto, azul e verde, respectivamente) e 235nm (cromatogramas em rosa, marrom e azul escuro, respectivamente). O 19 e o 5-HpDoHe não possuem dienos conjugados por isso não absorvem no comprimento de onda 235nm (vide círculos vermelhos).

No caso do ácido araquidônico e do ácido linoleico, os isômeros específicos para a oxidação mediada por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> são os 6- e 14-HpETE, e 10- e 12-HpODE, respectivamente.

A redução dos hidroperóxidos lipídicos a hidróxidos foi realizada com sucesso utilizando o agente amplamente descrito na literatura o  $\text{NaBH}_4$  (Yoshida *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Após a redução com  $\text{NaBH}_4$  aos hidróxidos correspondentes, os compostos foram analisados por HPLC utilizando as mesmas condições cromatográficas da análise dos hidroperóxidos. A Figura 9 mostra o cromatograma do 8-HpDoHE e seu hidróxido correspondente.

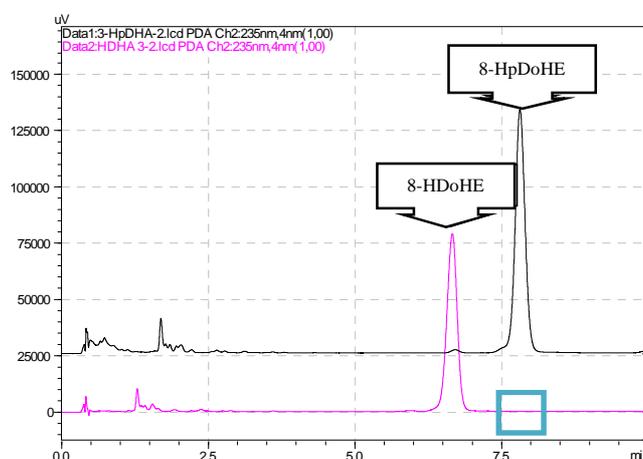


Figura 9: Análise cromatográfica do 8-HpDoHE e seu correspondente hidróxido. Em azul, é possível verificar que após a redução do 8-HpDoHE pelo  $\text{NaBH}_4$  há um consumo total do hidroperóxido acompanhado da formação do 8-HDoHE.

Para a realização de uma análise quali e quantitativa dos produtos de oxidação de ácidos graxos, ou mesmo, de uma forma mais ampla, uma análise lipidômica/oxi-lipidômica em amostras biológicas, os métodos descritos na literatura se baseiam majoritariamente no monitoramento dos analitos através de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (LC-MS/MS) (Taguchi *et al.*, 2005). No entanto, a literatura existente não permite adequadamente a análise completa dos analitos sintetizados. Por este motivo, a padronização do método de análise quali- e quantitativo para os isômeros alvo do presente trabalho se fez necessária.

#### 4.1.2 - Análise dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos por LC-MS/MS

4.1.2.1 - *Análise dos HpDoHE e HDoHE utilizando o sistema Acquity UPLC (Waters, Manchester, UK) acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO™ TQ-S (Waters, Manchester, UK)*

O desenvolvimento da análise quantitativa dos diferentes isômeros dos HpDoHE, HpETE, HpODE e respectivos hidróxidos não é uma tarefa trivial. Fato este justificado pelas semelhanças estrutural e de padrão de fragmentação. Entre tais compostos a análise dos produtos de oxidação do DHA é a que possui menor número relatos na literatura ([Hong \*et al.\*, 2003](#); [Seal e Porter, 2004](#); [Lyberg e Adlercreutz, 2006](#); [Hong \*et al.\*, 2007](#); [Gomolka \*et al.\*, 2011](#)).

Em uma parceria firmada com a empresa WATERS TECHNOLOGIES iniciamos a padronização do método cromatográfico para a análise dos HpDoHE e HDoHE. O primeiro passo da padronização foi a escolha da coluna cromatográfica. A WATERS TECHNOLOGIES dispõe de um diagrama que relaciona diferentes colunas (marcas e tipos de recheios variados) segundo a sua seletividade e hidrofobicidade, que auxilia na escolha das colunas cromatográficas (Figura 10). Através do uso deste diagrama, foram selecionadas 4 colunas (ACQUITY UPLC *High Strength Silica* (HSS) T3 (grupamento de modificação da superfície da sílica composto por 3 cadeias de C18), *HSS PFP* (coluna de sílica), *Ethylene Bridged Hybrid* (BEH) C8 (coluna C18) e *Charged surface hybrid* (CSH) *phenyl hexyl* (coluna com grupamento fenil hexil), com características bem distintas. As 4 colunas escolhidas estão destacadas em vermelho na Figura 10.

Uma separação cromatográfica é influenciada não só pelo tipo de coluna cromatográfica, mas por um conjunto de fatores tais como pH da fase móvel e composição da fase móvel e temperatura, os quais precisavam ser avaliados. Em uma abordagem tradicional cada um destes fatores é testado individualmente e, por esta razão, o tempo empregado é muito extenso. Utilizando o software *Fusion Method Development* (S-Matrix Corp., Eureka, CA), o desenvolvimento do método levou em conta o papel de cada um dos parâmetros, de uma forma simultânea resultando na escolha da melhor condição cromatográfica no menor espaço de tempo. Foram selecionados os seguintes parâmetros, ou fatores: tipo de coluna, pH da fase móvel, tempo de gradiente, proporção de fase móvel, solvente/modificador orgânico, temperatura da análise, fluxo e volume de injeção (ver Tabela 3).

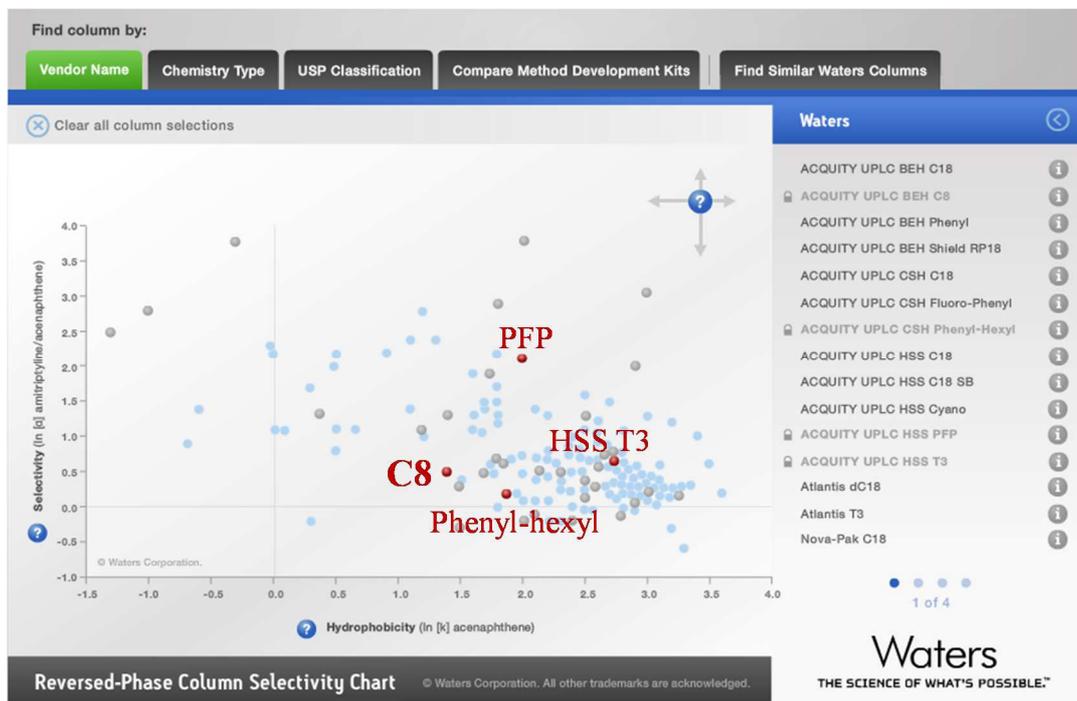


Figura 10: Diagrama de seleção de coluna (Waters Technologies do Brasil). Foram selecionadas 4 colunas de UPLC (50 x 2.1 mm) marcadas em vermelho.

O desenvolvimento foi realizado em duas fases, a triagem e a otimização. Na primeira os fatores principais da separação cromatográfica (tipo de coluna, pH, gradiente, modificador orgânico, tempo de gradiente e temperatura) foram avaliados e os fatores secundários (proporção de fase móvel, fluxo e volume de injeção) foram mantidos constantes. A otimização é uma parte importante do processo, uma vez que, nesta etapa os fatores são ajustados à condição final. Ambas as etapas foram planejadas utilizando o software *Fusion Method Development* (S-Matrix Corp., Eureka, CA), transferidas para o software *Empower 3 chromatography* data software (Waters Corp., Milford, MA) e testadas em um sistema de UPLC (*Acquity UPLC HClass*, Waters Corp., Milford, MA). As diferentes condições testadas foram avaliadas levando em conta o número de picos obtidos, a resolução dos picos (maior que 0.8) e assimetria (menor que 2.0).

Tabela 3: Parâmetros selecionados para o estudo do desenvolvimento cromatográfico.

<b><i>Efeto</i></b>	<b>Triagem</b>	<b>Otimização</b>
<i>Colunas Acquity UPLC® (50 x 2.1 mm, 1.7 μm)</i>	HSS T3, HSS PFP, BEH C8 e CSH Phenyl hexil	BEH C8
<i>pHs</i>	2.5, 3.5 e 10.0	7.9, 9.0 e 10.0
<i>Tempo de gradient (min)</i>	5 - 10	5.0
<i>Proporção da fase organica inicial (%)</i>	30	30
<i>Proporção da fase organica final (%)</i>	95	80 – 95
<i>Modificador orgânico</i>	Acetonitrila e Metanol	Acetonitrila/Metanol (82:18)
<i>Temperatura(°C)</i>	25, 35 e 40	40, 45 e 50
<i>Fluxo (mL/min)</i>	0.5	0.4, 0.5, 0.6 e 0.7
<i>Volume de injeção (μL)</i>	1.0	1.0

A condição cromatográfica otimizada consistiu de uma coluna C8 BEH (100 x 2,1 mm, 1,7 mm) eluída com uma fase móvel em gradiente composta por hidróxido de amónio a 0,1 % em água, a pH 10 (fase A), e 18 % de metanol em acetonitrila (fase B) a 0,5 mL/min. A eluição foi iniciada com 30 % de B por 1,55 min, seguida por um gradiente linear até 69% B durante 15 min, depois a percentagem de B foi elevada rapidamente a 95 % e mantida por 2 min, por fim a percentagem de B foi restabelecida para 30% e assim mantida por quatro min, para permitir o equilíbrio da análise. A temperatura da coluna foi estabelecida a 40 ° C. O desenvolvimento foi realizado com colunas de 50 x 2.1 mm, 1.7 µm para aperfeiçoar o tempo e consumo de solvente. A condição final foi transferida para uma coluna maior (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) justificável pela alta complexidade das amostras.

De posse do método cromatográfico o seguinte passo foi a padronização da análise por espectrometria de massas dos HpDoHE e HDoHE. Esta foi desenvolvida no espectrómetro de massas tipo triplo-quadrupolo modelo TQS. As análises de MS e MS/MS foram conduzidas em modo negativo. Foram utilizadas as seguintes condições iniciais: temperatura da fonte = 150 °C, temperatura de dessolvatação = 550 °C e voltagem do capilar = 3 kV. Os parâmetros como voltagem do cone, energia de colisão e dwell time foram padronizados automaticamente utilizando a ferramenta Intellistart do software MassLynx. Nestas condições as moléculas de HpDoHE e HDoHE sofrem desprotonação gerando um íon representado por  $[M-H]^-$  com  $m/z$  359 e 343, respectivamente (Figura 11).

Estes íons foram então selecionados e fragmentados por dissociação induzida por colisão. A fragmentação dos HpDoHE e dos HDoHE gera uma série de fragmentos que podem ser distinguidos em dois grupos: os não específicos (íons comuns a mais de

um isômero) e os específicos (indicativos da posição do grupamento hidroperóxido ou hidróxido) ([Macmillan e Murphy, 1995](#); [Kerwin e Torvik, 1996](#); [Lu et al., 2005](#)).

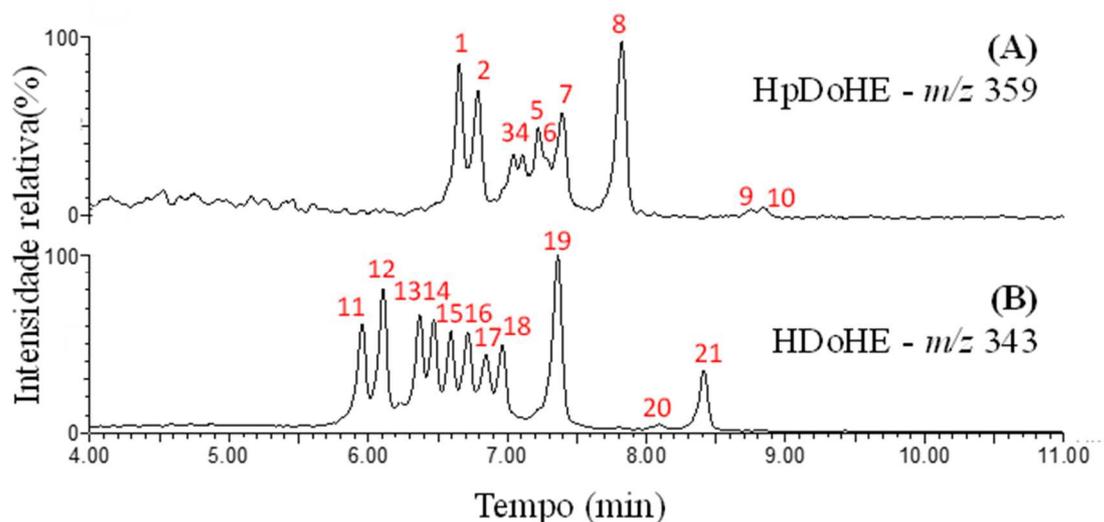


Figura 11: Análise de uma mistura de HpDoHE e HDoHE por UPLC-MS. Os HpDoHE foram detectados através do monitoramento do precursor com  $m/z$  359 (A) e os HDoHE com  $m/z$  343 (B). Cada pico cromatográfico detectado foi numerado e posteriormente identificado pela análise dos fragmentos.

São fragmentos não específicos os íons formados pelas perdas de água,  $\text{CO}_2$  e/ou ambos, e específicos os fragmentos resultantes da quebra de ligações carbono-carbono próximas ao grupamento hidroperóxido/hidróxido. No monitoramento dos HpDoHE foram observados os íons não específicos com  $m/z$  341  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ,  $m/z$  315  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$  e  $m/z$  297  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$ ; e para os HDoHE, foram detectados os íons com  $m/z$  325  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ,  $m/z$  299  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$  e  $m/z$  281  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$ . Os íons específicos são derivados de quebras das ligações carbono-carbono entre o carbono que possui o grupamento hidroperóxido/hidróxido e o carbono alfa ( $\alpha$ ) em relação ao mesmo (quebra  $\alpha$ ), ou entre o carbono  $\alpha$  e o carbono beta ( $\beta$ ) (quebra  $\beta$ ). Os dois tipos de quebra podem ocorrer nas porções carboxi- ou metil terminal, o que resulta em 4 pontos da molécula suscetíveis a fragmentações específicas. Cada uma destas 4 resulta em dois fragmentos distintos. No intuito de identificar sistematicamente cada fragmento formado adotamos uma nomenclatura previamente proposta pelo grupo do professor Charles Serhan da

Universidade de Harvard, com pequenas modificações ([Lu et al., 2005](#); [Hong et al., 2007](#)). O esquema de identificação é composto por um conjunto de 3 letras:

- primeira letra ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) representa a posição da ligação C-C quebrada;
- segunda letra (c ou m) indica se a quebra ocorreu no lado carboxi- ou metilterminal;
- terceira letra (c ou m) indica o segmento resultante da quebra, por exemplo uma quebra alfa na porção carboxiterminal ( $\alpha_c$ ) gera dois fragmentos um carboxiterminal ( $\alpha_{cc}$ ) e um metil terminal ( $\alpha_{cm}$ ).

Assim, através do presente sistema são identificados 4 fragmentos resultantes de quebras do tipo alfa ( $\alpha_{cc}$ ,  $\alpha_{cm}$ ,  $\alpha_{mc}$ ,  $\alpha_{mm}$ ) e 4 fragmentos resultantes de quebras do tipo beta ( $\beta_{cc}$ ,  $\beta_{cm}$ ,  $\beta_{mc}$ ,  $\beta_{mm}$ ) (Figura 12).

### Nomenclatura adotada para a identificação dos fragmentos específicos

#### Primeira letra



#### Segunda letra



#### Terceira letra

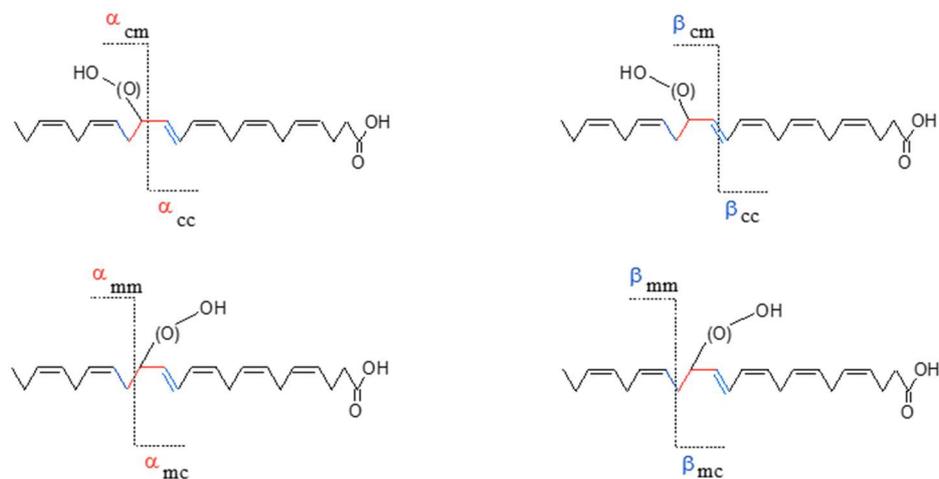


Figura 12: Esquema de identificação dos fragmentos específicos da análise por MS/MS dos HpDoHE e HDoHE.

Cada um dos isômeros foi analisado isoladamente por LC-MS/MS. O espectro de fragmentação obtido foi comparado à fragmentação teórica (Figura 13, Figura 14,

Tabela 4 e Tabela 5). A partir desta análise foram selecionadas duas transições de massa para serem utilizadas no monitoramento de reação selecionada (SRM), para a identificação e quantificação específica de cada isômero.

A perda de água é tão comum aos hidroperóxidos que durante o desenho do presente estudo para a montagem das transições de massas em Q1 foram selecionados os íons  $[M-H]^-$  ( $m/z$  359) e do íon  $[M-H-H_2O]^-$  ( $m/z$  341) e em Q3 os íons resultantes das fragmentações específicas (quebra das ligações  $\alpha$  e  $\beta$ , em relação ao grupo

hidroperóxido). [Macmillan e Murphy \(1995\)](#) ao analisarem hidroperóxidos do ácido araquidônico verificaram que quando analisadas por electrospray as cetonas resultantes da desidratação do hidroperóxido produziam espectros de fragmentação com diferenças ínfimas. Adicionalmente, os autores descreveram que muitos dos fragmentos envolvem efetivamente a formação de um intermediário cetona. Assim é possível analisar os hidroperóxidos através da fragmentação do próprio hidroperóxido ou da cetona correspondente ([Macmillan e Murphy, 1995](#)).

Nas condições utilizadas, aparentemente, as perdas não específicas (perda de água, CO<sub>2</sub> ou os dois) não são tão favorecidas para os hidróxidos. Para estes compostos se observou a perda de água, CO<sub>2</sub> ou os dois quando associadas às fragmentações específicas (Figura 14).

Consistentemente com dados descritos na literatura ([Macmillan e Murphy, 1995](#); [Murphy et al., 2001](#); [Lyberg e Adlercreutz, 2006](#); [Hong et al., 2007](#)), foi possível detectar nos espectros de fragmentação dos HpDoHE e HDoHE os íons resultantes das quebras alfa e beta associadas à migração de um ou dois hidrogênios (

Tabela 4 e Tabela 5).

Tabela 4: Fragmentação teórica dos HpDoHE. Os íons em negrito foram selecionados para o método por SRM.

Isômero	Perda de	Teóricos								Detectados
		$\beta_{cc}$	$\beta_{cm}$	$\alpha_{cc}$	$\alpha_{cm}$	$\alpha_{mc}$	$\alpha_{mm}$	$\beta_{mc}$	$\beta_{mm}$	
20-HpDoHE	-CO <sub>2</sub>	271	88	284	75	330	29	344	15	285 [ $\alpha_{cc}+H$ ] ou [ $\alpha_{mc}-H-CO_2$ ], 239 [ $\alpha_{cc}-H-CO_2$ ], 273 [ $\beta_{cc}+2H$ ], 229 [ $\beta_{cc}+2H-CO_2$ ], <b>71</b> [ <b><math>\beta_{cm}-H_2O</math></b> ]
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	227		240		286		300		
	-H <sub>2</sub> O		<b>71</b>		57	312		326		
19-HpDoHE	-CO <sub>2</sub>	258	101	272	87	318	41	331	28	273 [ $\alpha_{cc}+H$ ] ou [ $\alpha_{mc}-H-CO_2$ ], 229 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ], 255 [ $\alpha_{mc}-H-H_2O-CO_2$ ], 215 [ $\beta_{cc}+2H-CO_2$ ], <b>83</b> [ <b><math>\beta_{cm}-H_2O</math></b> ]
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	214		228		274		287		
	-H <sub>2</sub> O		<b>83</b>		69	300		313		
17-HpDoHE	-CO <sub>2</sub>	231	128	244	115	290	69	304	55	243 [ $\alpha_{cc}-H$ ], 201 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ], 227 [ $\alpha_{mc}-H-H_2O-CO_2$ ], 189 [ $\beta_{cc}+2H-CO_2$ ], <b>111</b> [ <b><math>\beta_{cm}+H-H_2O</math></b> ]
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	187		200		246		260		
	-H <sub>2</sub> O		<b>110</b>		97	272		286		

		218	141	<b>232</b>	127	278	81	291	68	<b>233</b> [ $\alpha_{cc}+H$ ], 189 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ],
16-	-CO <sub>2</sub>	174		188		234		247		217 [ $\alpha_{mc}+H-H_2O-CO_2$ ], 189
HpDoHE	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					216		229		[ $\beta_{cc}+2H-CO_2$ ], 123 [ $\beta_{cm}+H-$
	-H <sub>2</sub> O		123		109	260		273		H <sub>2</sub> O], 107 [ $\alpha_{cm}-2H-H_2O$ ]

Continuação tabela 4.

Isômero	Perda de	Teóricos								Detectados
		$\beta_{cc}$	$\beta_{cm}$	$\alpha_{cc}$	$\alpha_{cm}$	$\alpha_{mc}$	$\alpha_{mm}$	$\beta_{mc}$	$\beta_{mm}$	
		191	168	204	155	250	109	264	95	205 [ $\alpha_{cc}+H$ ], 161 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ],
14-	-CO <sub>2</sub>	147		160		206		220		189 [ $\alpha_{mc}+H-H_2O-CO_2$ ], 193
HpDoHE	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					188		202		[ $\beta_{cc}+2H$ ], 149 [ $\beta_{cc}+2H-CO_2$ ],
	-H <sub>2</sub> O		<b>150</b>		137	232		246		<b>151</b> [ $\beta_{cm}+H-H_2O$ ]
		178	181	192	167	238	<b>121</b>	251	108	193 [ $\alpha_{cc}+H$ ], 149 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ],
13-	-CO <sub>2</sub>	134		148		194		207		<b>121</b> [ $\alpha_{mm}$ ], 177 [ $\alpha_{mc}+H-H_2O-$
HpDoHE	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					176		189		CO <sub>2</sub> ], 163 [ $\beta_{cm}+H-H_2O$ ]
	-H <sub>2</sub> O		163		149	220		233		
		151	208	164	195	210	149	224	135	163 [ $\beta_{mc}+H-CO_2-H_2O$ ], 121
11-	-CO <sub>2</sub>	107		120		166		180		[ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ], 149 [ $\alpha_{mm}$ ] ou
HpDoHE	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					148		162		[ $\alpha_{mc}+H-H_2O-CO_2$ ], 175 [ $\alpha_{cm}-$
	-H <sub>2</sub> O		190		177	192		206		2H-H <sub>2</sub> O], 163 [ $\beta_{cm}+H-H_2O$ ],
		138	221	152	207	198	161	211	148	<b>243</b> *
10-	-CO <sub>2</sub>	94		108		154		167		153 [ $\alpha_{cc}+H$ ], 135 [ $\alpha_{mc}+H-H_2O-$
HpDoHE	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					136		149		CO <sub>2</sub> ], 161 [ $\alpha_{mm}$ ], <b>188</b> [ $\alpha_{cm}-H-$
	-H <sub>2</sub> O		203	<b>189</b>	180	193		193		<b>H<sub>2</sub>O</b> ], 203 [ $\beta_{cm}+H-H_2O$ ]
		111	248	124	235	170	189	184	175	171 [ $\alpha_{mc}+H$ ], <b>108</b> [ $\alpha_{mc}-H_2O-$
8-HpDoHE	-CO <sub>2</sub>	67		80		126		140		<b>CO<sub>2</sub></b> ], 81 [ $\alpha_{cc}+H-H_2O$ ], 189
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					<b>108</b>		122		[ $\alpha_{mm}$ ], 123 [ $\beta_{mc}+H-H_2O$ ], 215
	-H <sub>2</sub> O		230		217	152		166		[ $\alpha_{cm}-2H-H_2O$ ]
		98	261	112	249	158	<b>201</b>	171	188	261 [ $\beta_{cm}$ ], 243 [ $\beta_{cm}-H_2O$ ], 171
7-HpDoHE	-CO <sub>2</sub>	54		68		114		127		[ $\beta_{mc}$ ], 95 [ $\alpha_{mc}-H-H_2O-CO_2$ ], 68
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					96		109		[ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ], <b>201</b> [ $\alpha_{mm}$ ], 155
	-H <sub>2</sub> O		243		231	140		153		[ $\beta_{mc}+2H-H_2O$ ], 109 [ $\beta_{mc}-H_2O-$
		71	288	84	275	130	229	144	215	CO <sub>2</sub> ], 228 [ $\alpha_{cm}-2H-H_2O$ ]
5-HpDoHE	-CO <sub>2</sub>	27		40		86		100		123 [ $\alpha_{cm}-H-H_2O$ ], 171 [ $\alpha_{mc}+H$ ],
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					68		82		69 [ $\alpha_{mc}+H-H_2O-CO_2$ ], 227
	-H <sub>2</sub> O		270		257	112		126		[ $\alpha_{mm}-2H$ ], 83 [ $\beta_{mc}+H-H_2O-$
		58	301	72	287	118	241	131	229	CO <sub>2</sub> ], 257 [ $\alpha_{cm}-2H-H_2O$ ], <b>281</b>
4-HpDoHE	-CO <sub>2</sub>	14		28		74		87		[ $\gamma_{cm}-2H-H_2O$ ], <b>147</b> *
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					56		69		269 [ $\alpha_{cm}-2H-H_2O$ ], 229 [ $\beta_{mm}$ ],
	-H <sub>2</sub> O		283		269	100		<b>113</b>		241 [ $\alpha_{mm}$ ], <b>115</b> [ $\beta_{mc}+2H-H_2O$ ],
										69 [ $\beta_{mc}-H_2O-CO_2$ ]

\* fragmentação desconhecida

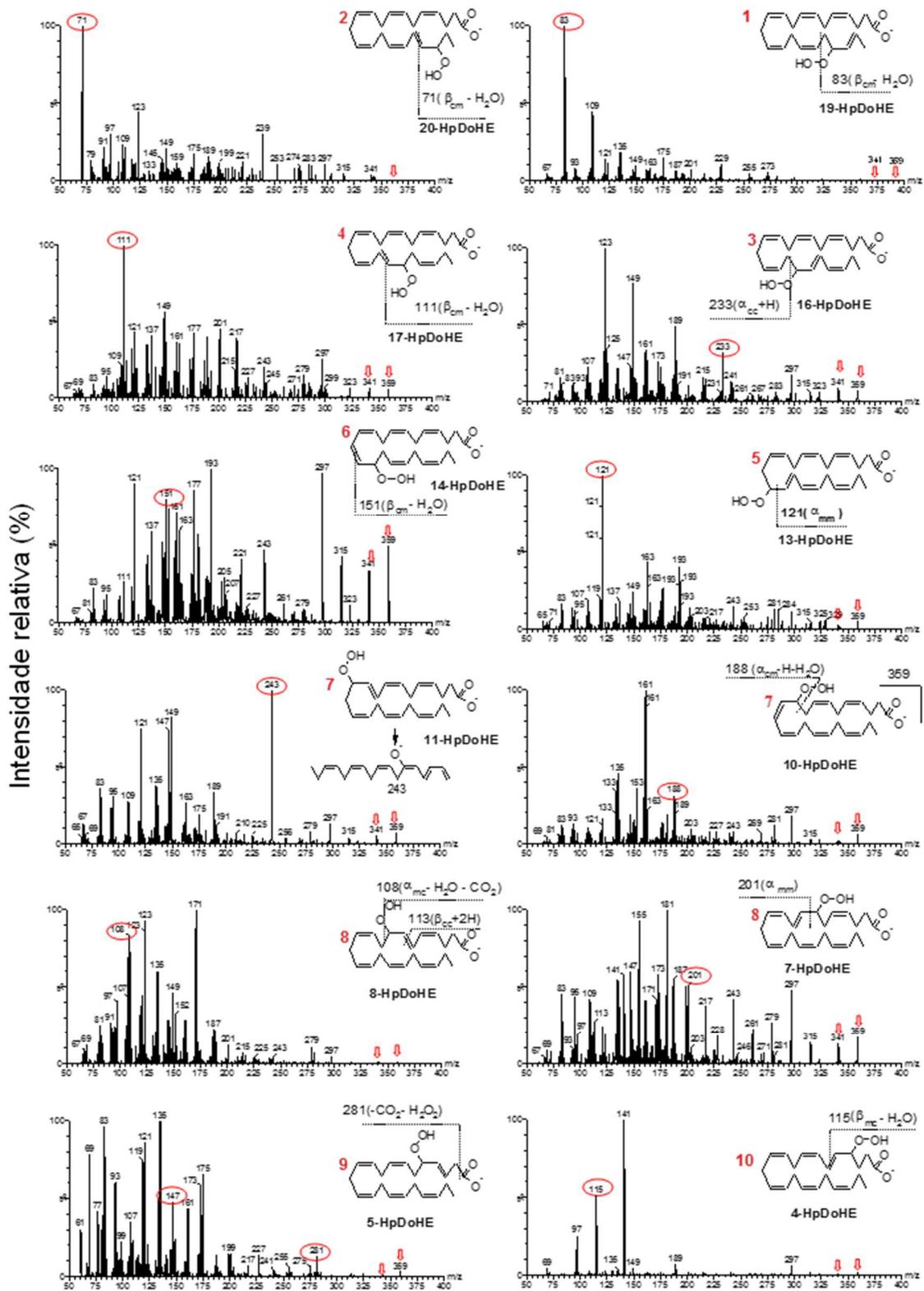


Figura 13: Espectro de fragmentação dos 12 isômeros HpDoHE injetados isoladamente para a análise por LC-MSMS – espectro MS/MS dos íons produto do precursor com m/z 359. As setas em vermelho indicam o íon precursor e o íon decorrente da desidratação do precursor. Os círculos indicam os íons produto selecionados para o método de SRM. Os números em vermelho estão relacionados aos picos numerados no cromatograma da Figura 11.

Tabela 5: Fragmentação teórica dos HDoHE. Os íons em negrito foram selecionados para o método por SRM.

Isômero	Perda de	Teóricos								Detectados
		$\beta_{cc}$	$\beta_{cm}$	$\alpha_{cc}$	$\alpha_{cm}$	$\alpha_{mc}$	$\alpha_{mm}$	$\beta_{mc}$	$\beta_{mm}$	
20-HDoHE		271	72	284	59	314	29	328	15	285 [ $\alpha_{cc}+H$ ], 271 [ $\alpha_{mc}+H$ ], 241 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ]
	-CO <sub>2</sub>	227		240		270		284		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					252		266		
	-H <sub>2</sub> O				41	296		310		
19-HDoHE		258	85	272	71	301	41	315	28	299 [ $\beta_{mc}+2H-CO_2$ ], 273 [ $\alpha_{cc}+H$ ], 256 [ $\alpha_{mc}-H-CO_2$ ], 229 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ]
	-CO <sub>2</sub>	214		228		257		271		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					239		253		
	-H <sub>2</sub> O				53	283		297		
17-HDoHE		231	112	244	99	274	69	288	55	273[ $\alpha_{mc}-H$ ], 245 [ $\alpha_{cc}+H$ ] or [ $\beta_{mc}+H-CO_2$ ], 227 [ $\alpha_{mc}-H-$ H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ], 201 [ $\alpha_{cc}+H-$ CO <sub>2</sub> ], 189 [ $\beta_{cc}+2H-CO_2$ ]
	-CO <sub>2</sub>	187		200		230		244		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					212		226		
	-H <sub>2</sub> O		94		81	256		270		
16-HDoHE		218	125	232	111	262	81	275	68	261 [ $\alpha_{mc}-H$ ], 233[ $\alpha_{cc}+H$ ] or [ $\beta_{mc}+2H-CO_2$ ], 215 [ $\beta_{mc}+2H-H_2O-CO_2$ ], 189 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ], 125 [ $\beta_{cm}$ ]
	-CO <sub>2</sub>	174		188		218		231		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					200		213		
	-H <sub>2</sub> O		107		93	244		257		
14-HDoHE		191	153	204	139	234	109	248	95	205 [ $\alpha_{cc}+H$ ], 189 [ $\alpha_{mc}-H-$ H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ], 161 [ $\alpha_{cc}+H-$ CO <sub>2</sub> ], 153 [ $\beta_{cm}$ ], 149 [ $\beta_{cc}+2H-CO_2$ ]
	-CO <sub>2</sub>	147		160		190		204		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					172		186		
	-H <sub>2</sub> O		135		121	216		230		
13-HDoHE		178	165	192	151	222	121	235	108	221 [ $\alpha_{mc}-H$ ], 193 [ $\alpha_{cc}+H$ ] or [ $\beta_{mc}+2H-CO_2$ ], 177 [ $\alpha_{mc}-H-H_2O-CO_2$ ], 149 [ $\alpha_{cc}+H-CO_2$ ], 135 [ $\beta_{cm}+H-$ H <sub>2</sub> O], 121 [ $\alpha_{mm}$ ]
	-CO <sub>2</sub>	134		148		178		191		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					160		173		
	-H <sub>2</sub> O		147		133	204		217		
11-HDoHE		151	192	164	179	194	149	208	135	177 [ $\alpha_{cm}+H-H_2O$ ], 165 [ $\alpha_{cc}+H$ ] or [ $\beta_{mc}+H-CO_2$ ], 149 [ $\beta_{cc}-2H$ ] or [ $\alpha_{mm}$ ], 121 [ $\beta_{cc}+H-CO_2$ ], 163 [ $\beta_{cm}-H-$ H <sub>2</sub> O]
	-CO <sub>2</sub>	107		120		150		164		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					132		146		
	-H <sub>2</sub> O		174		161	176		190		
10-HDoHE		138	205	152	191	182	161	195	148	188 [ $\beta_{cm}+H-H_2O$ ], 181[ $\alpha_{mc}-H$ ], 161[ $\alpha_{mm}$ ], 153 [ $\alpha_{cc}+H$ ] or [ $\beta_{mc}+2H-CO_2$ ], 135 [ $\beta_{mc}+2H-H_2O-CO_2$ ]
	-CO <sub>2</sub>	94		108		138		151		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					120		133		
	-H <sub>2</sub> O		187		173	164		177		
8-HDoHE		111	232	124	219	154	189	168	175	189 [ $\alpha_{mm}$ ], 149 [ $\beta_{mc}-H-$ H <sub>2</sub> O], 135 [ $\alpha_{mc}-H-H_2O$ ], 113 [ $\beta_{cc}+2H$ ], 109 [ $\alpha_{cc}-H-$ H <sub>2</sub> O]
	-CO <sub>2</sub>	67		80		110		124		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					92		106		
	-H <sub>2</sub> O		214		201	136		150		
7-HDoHE		97	245	112	231	142	201	155	188	245 [ $\beta_{cm}$ ], 227 [ $\beta_{cm}-H_2O$ ], 201 [ $\alpha_{mm}$ ], 141 [ $\alpha_{mc}-H$ ], 109 [ $\beta_{mc}-2H-CO_2$ ], 97[ $\alpha_{mc}-$ H-CO <sub>2</sub> ]
	-CO <sub>2</sub>	53		68		98		111		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					80		93		
	-H <sub>2</sub> O		227		213	124		137		
5-HDoHE		71	273	84	259	114	229	128	215	229 [ $\alpha_{mm}$ ], 95 [ $\alpha_{mc}-H-$ H <sub>2</sub> O], 93*, 85 [ $\alpha_{cc}+H$ ] or [ $\beta_{mc}+H-CO_2$ ]
	-CO <sub>2</sub>					70		84		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					52		66		
	-H <sub>2</sub> O		255		241	96		110		
4-HDoHE		58	285	72	271	102	241	115	228	115 [ $\beta_{mc}$ ], 101[ $\alpha_{mc}-H$ ], 83 [ $\alpha_{mc}-H-H_2O$ ], 71[ $\alpha_{cc}-H$ ] or [ $\beta_{cc}-H_2O$ ]
	-CO <sub>2</sub>	14		28		58		71		
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O					40		53		
	-H <sub>2</sub> O		267		253	84		97		

\* fragmentação desconhecida

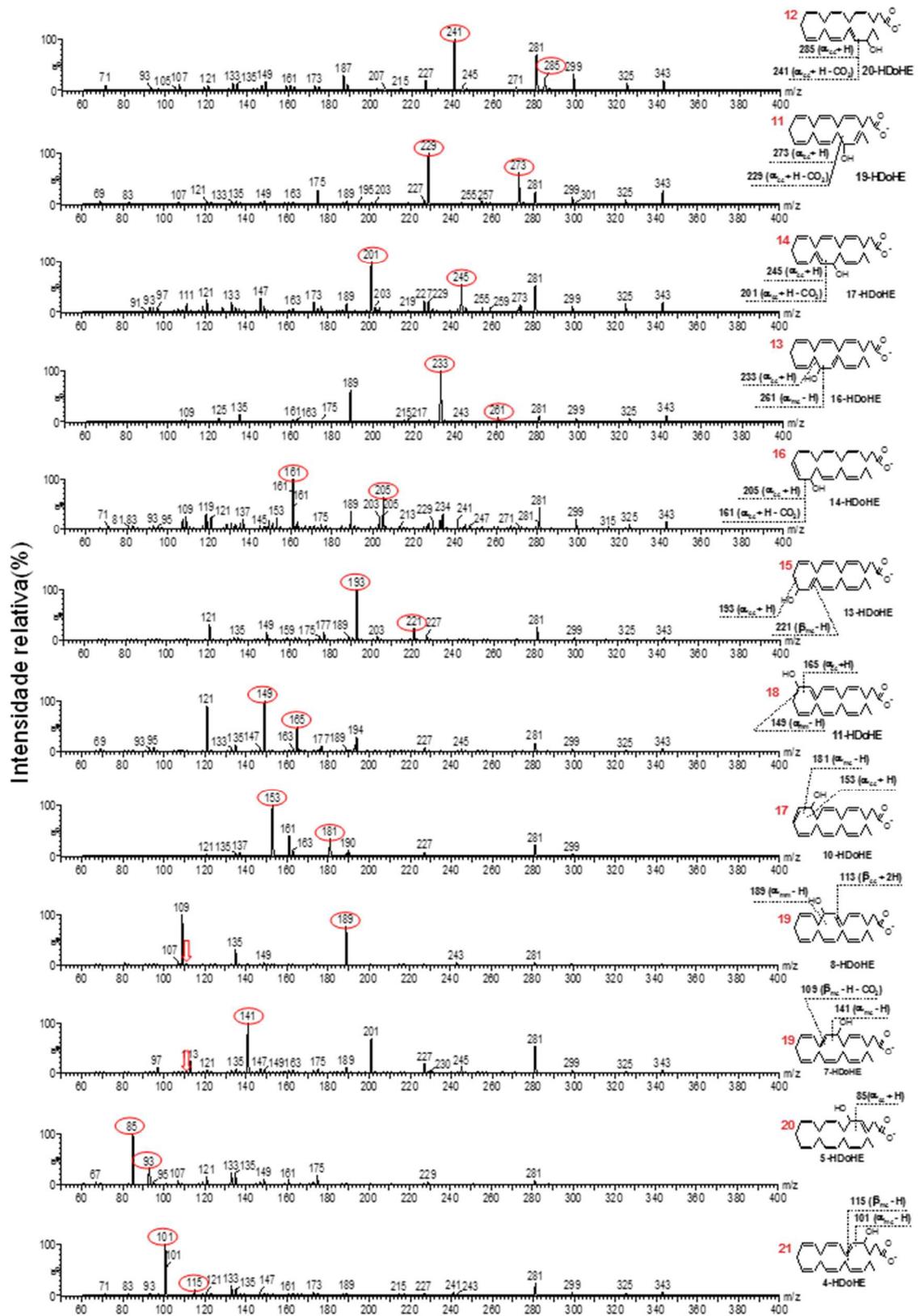


Figura 14: Espectro de fragmentação dos 12 isômeros HDcHE, injetados isoladamente para a análise por LC-MS/MS – espectro MS/MS dos íons produto do precursor com m/z 343. Os círculos e setas indicam os íons produto selecionados para o método de SRM. Os números em vermelho estão relacionados aos picos numerados no cromatograma da Figura 11.

Nos espectros de fragmentação dos isômeros 20-, 19-, 17-, 16-, 14- e 13-HpDoHE os íons mais intensos correspondem aos seguintes fragmentos  $[\alpha_{cc}+H]^-$ ,  $[\alpha_{cc}+H-CO_2]^-$  e  $[\beta_{cm}+H-H_2O]^-$ . Para os demais isômeros (11-, 10-, 8-, 7-, 5- e 4-HpDoHE), os íons produto apresentaram intensidades relativas semelhantes, tanto para os fragmentos resultantes das quebras  $\alpha$  e  $\beta$  quanto para fragmentações de cadeia não exploradas no presente trabalho.

As transições de massa selecionadas para o monitoramento dos analitos por LC-MS/MS-SRM foram escolhidas buscando-se a melhor resolução, seletividade e relação sinal/ruído.

Foram construídos dois métodos de análise um para a análise dos HpDoHE e outro para os HDoHE. As condições padronizadas estão descritas nas Tabela 6 e Tabela 7. Duas transições de massas foram selecionadas: uma quantitativa e uma de confirmação (qualitativa). Cada isômero foi única e exclusivamente quantificado quando o mesmo apresentou sinal em ambas as transições (Figura 15).

Os primeiros parâmetros de validação determinados foram a linearidade do método bem como o LD (concentração na qual a relação sinal/ruído é de 3:1). O LD foi determinado através da construção de curva que correlacionava a relação sinal/ruída com a concentração de amostra. Os valores de LD variaram de 1 a 670 pg para os HpDoHE (Tabela 6) e 0,5-8,5 pg para HDoHE (Tabela 7) aplicados na coluna. O método é cerca de 10-100 vezes mais sensível para a detecção dos hidróxidos em comparação aos hidroperóxidos. O método se mostrou linear ( $r^2 \geq 0,99$ ) nas faixas de concentração de 12,5-1.000 pg/mL para HpDoHE e de 0,3-100 pg/mL para HDoHE.

A recuperação foi determinada através do cálculo da razão da concentração do analito na amostra contaminada (PBS, homogenato de cérebro ou plasma) antes da extração em relação à sua concentração na amostra contaminada após a extração. A

recuperação dos compostos em PBS se mostrou eficiente variando entre 80 e 120 %, com a exceção do 20-HpDoHE (60 %), ver Tabela 8.

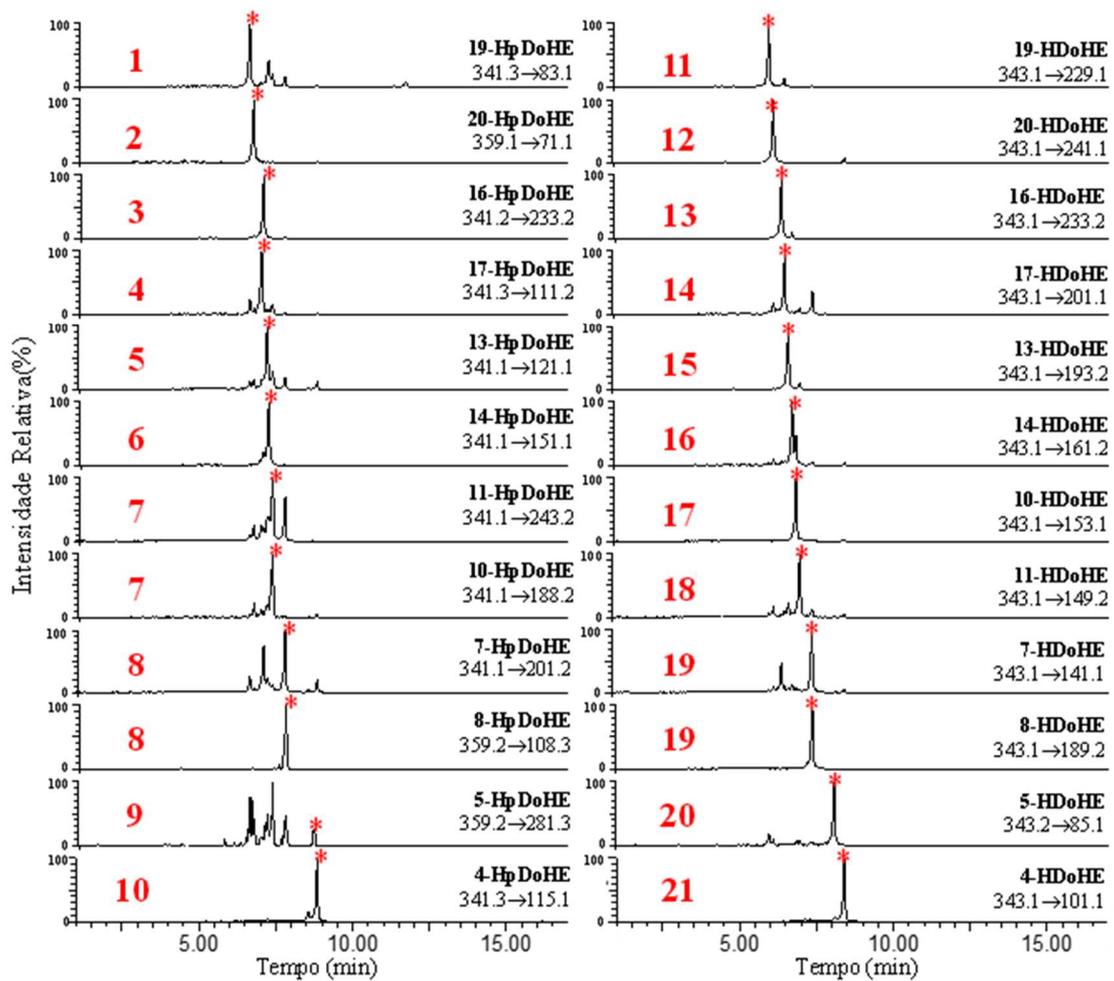


Figura 15: Cromatograma representativo do monitoramento por LC-MS/MS SRM dos HpDoHE e HDoHE. Os anáiticos foram injetados na forma de mistura. Em detalhe estão apresentadas as transições de massa selecionadas como quantitativas.

Tabela 6: Condições otimizadas para a análise dos HpDoHE por LC-MS/MS.

Isômero	SRM ( <i>m/z</i> )		CV (V)	CE (V)	RT (min)	LD (pg)*	<i>r</i> <sup>2</sup>	Faixa linear (ng/μL)
20-HpDoHE (2)	359.10 → 71.10	Quantitativa	33	14	6,79	471	0,998	0.25-10
	341.10 → 71.10	Qualitativa	33	14				
19-HpDoHE (1)	341.30 → 83.10	Quantitativa	41	19	6,66	23	0,992	0.01-1
	359.30 → 83.10	Qualitativa	41	19				
17-HpDoHE (4)	341.30 → 111.20	Quantitativa	30	12	7,03	1	0,991	0.01-1
	359.30 → 111.20	Qualitativa	30	12				
16-HpDoHE (3)	341.20 → 233.20	Quantitativa	31	11	7,11	49	0,99	0.01-1
	359.20 → 233.20	Qualitativa	31	11				
14-HpDoHE (6)	341.10 → 151.10	Quantitativa	29	11	7,28	29	0,991	0.01-1
	359.10 → 151.10	Qualitativa	29	11				
13-HpDoHE (5)	341.10 → 121.10	Quantitativa	32	16	7,22	1	0,996	0.01-1
	359.10 → 121.10	Qualitativa	32	16				
11-HpDoHE (7)	341.10 → 243.20	Quantitativa	29	11	7,39	76	0,998	0.01-1
	359.10 → 243.20	Qualitativa	29	11				
10-HpDoHE (7)	341.10 → 188.20	Quantitativa	31	12	7,39	671	0,983	0.01-1
	359.10 → 188.20	Qualitativa	31	12				
8-HpDoHE (8)	359.30 → 108.30	Quantitativa	30	16	7,83	116	0,995	0.01-1
	341.30 → 113.10	Qualitativa	31	9				
7-HpDoHE (8)	341.10 → 201.20	Quantitativa	25	13	7,80	96	0,997	0.01-1
	359.10 → 201.20	Qualitativa	25	12				
5-HpDoHE (9)	359.20 → 281.30	Quantitativa	32	10	8,73	162	0,981	0.01-1
	359.20 → 147.20	Qualitativa	32	8				
4-HpDoHE (10)	341.30 → 115.10	Quantitativa	22	15	8,84	502	0,999	0.01-1
	359.20 → 115.10	Qualitativa	22	15				
5(S)-HETE-d8	327.20 → 116.10		22	14	7,25			
12(S)-HETE-d8	327.20 → 184.20		30	14	6,13			

Abreviações: voltagem do cone (em inglês, *cone voltage* – CV), energia de colisão (em inglês, *collision energy* – CE), tempo de retenção (em inglês, *retention time* – RT).

Tabela 7: Condições otimizadas para a análise dos HDoHE por LC-MS/MS.

Isômero	SRM ( $m/z$ )		CV (V)	CE (V)	RT (min)	LD (pg)*	$r^2$	Faixa linear (ng/ $\mu$ L)
20-HDoHE (12)	343.10→241.10	Quantitativa	36	15	5,95	2,71	0,998	0.62-100
	343.10→285.10	Qualitativa	36	13				
19-HDoHE (11)	343.10→229.10	Quantitativa	32	15	6,1	5,02	0,999	0.62-100
	343.10→273.30	Qualitativa	32	14				
17-HDoHE (14)	343.10→201.10	Quantitativa	27	14	6,46	3,89	0,997	1.25-100
	343.10→245.30	Qualitativa	27	14				
16-HDoHE (13)	343.10→233.20	Quantitativa	26	13	6,36	1,27	0,996	0.62-100
	343.10→261.10	Qualitativa	26	13				
14-HDoHE (16)	343.10→161.20	Quantitativa	30	12	6,71	2,6	0,996	0.25-100
	343.10→205.10	Qualitativa	30	15				
13-HDoHE (15)	343.10→193.20	Quantitativa	30	12	6,58	1,16	0,997	0.25-100
	343.10→221.10	Qualitativa	30	13				
11-HDoHE (18)	343.10→149.20	Quantitativa	28	13	6,95	5,3	0,993	0.25-100
	343.10→165.10	Qualitativa	28	13				
10-HDoHE (17)	343.10→153.10	Quantitativa	28	13	6,84	2,07	0,998	0.62-100
	343.10→181.10	Qualitativa	28	15				
8-HDoHE (19)	343.10→189.20	Quantitativa	32	12	7,35	1,63	0,997	0.25-100
	343.10→113.10	Qualitativa	32	13				
7-HDoHE (19)	343.10→141.10	Quantitativa	31	15	7,36	0,46	0,994	0.25-100
	343.10→109.10	Qualitativa	31	13				
5-HDoHE (20)	343.20→85.10	Quantitativa	26	10	8,07	8,48	0,994	1.25-100
	343.20→93.10	Qualitativa	26	10				
4-HDoHE (21)	343.10→101.10	Quantitativa	29	13	8,4	0,5	0,994	0.25-100
	343.10→115.10	Qualitativa	29	16				
5(S)-HETE-d8	327.20→116.10		22	14	7,25			
12(S)-HETE-d8	327.20→184.20		30	14	6,13			

Nas matrizes biológicas, a recuperação média para os HpDoHE foi menos eficiente ( $16 \pm 22\%$  no cérebro e  $22 \pm 14\%$  no plasma) que a dos HDoHE ( $84 \pm 20\%$  no cérebro e  $90 \pm 13\%$  no plasma).

Tabela 8: Recuperação dos HpDoHE e HDoHE em PBS, homogenato de cérebro e plasma, quando contaminados antes e em paralelo depois da extração com  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de cada isômero.

	Isômeros	RECUPERAÇÃO (%)		
		PBS	Cérebro	Plasma
<i>HpDoHE</i>	20	60.9	nd	nd
	19	123.0	33.4	31.3
	17	91.4	2.1	11.3
	16	115.0	18.6	33.7
	14	83.8	2.5	15.6
	13	83.4	6.3	17.9
	11	94.5	3.0	10.9
	10	80.2	69.5	40.3
	8	112.7	nd	43.4
	7	85.6	3.3	32.5
	5	90.4	19.3	1.9
4	84.5	1.9	8.3	
<i>HDoHE</i>	20	84.7	45.9	96.6
	19	99.5	60.5	120.1
	17	88.8	78.2	90.2
	16	82.8	67.5	80.4
	14	111.6	92.4	107.9
	13	88.4	125.2	87.8
	11	89.3	85.2	86.0
	10	87.7	89.3	90.1
	8	89.3	86.5	86.7
	7	89.7	82.1	79.7
	5	101.0	101.1	80.9
4	95.8	89.8	72.2	

Abreviação: não detectado (nd).

A perda significativa da recuperação dos HpDoHE nas amostras biológicas pode ser justificada por: uma possível redução dos mesmos pelo maquinário celular antioxidante; ou mesmo, uma degradação mediada por componentes da amostra biológica. Em contraste, a recuperação para os HDoHE se mostrou eficiente e muito

semelhante ao obtido em PBS. Este fenômeno reflete uma maior estabilidade destes compostos.

Por fim, foram determinadas a precisão e exatidão do método. Precisão se refere à dispersão entre os dados de concentração obtidos e a exatidão mostra o quão próxima ficou a concentração determinada da esperada (considerada como sendo 100%). Após o teste de todo os isômeros, os valores de precisão dados pelo desvio padrão relativo foram de  $12,1 \pm 6,6$  para HpDoHE e  $5,7 \pm 2,0$  para HDoHE intradia e  $17,0 \pm 5,2$  para HpDoHE e  $5,1 \pm 6,5$  para HDoHE interdia. A exatidão para ambos foi superior a 90 % (Tabela 9 e Tabela 10).

Tabela 9: Exatidão e precisão do método de análise intradia and interdia dos HpDoHE em metanol.

Isômero	Concentração (ng/μl)	Intradia (n=3)		Interdia (n=3)		
		Precisão (CV %)	Exatidão (%)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	
HpDoHE	20	2	6.7	105.0	11.5	114.2
		4	10.8	103.3	16.9	109.6
	19	2	5.7	101.1	20.4	124.7
		4	9.3	101.0	8.6	114.8
	17	2	15.9	94.8	24.4	116.1
		4	8.0	98.2	15.0	104.7
	16	2	11.2	102.2	17.7	123.8
		4	10.0	100.4	15.1	109.8
	14	2	16.9	101.6	22.1	129.2
		4	7.9	100.7	15.8	114.8
	13	2	14.5	104.0	18.4	118.2
		4	9.8	99.1	13.8	103.5
	11	2	24.3	103.1	27.2	97.1
		4	11.2	102.8	19.0	121.6
	10	2	7.5	104.9	14.7	119.6
		4	11.8	100.2	13.5	106.8
	8	2	7.2	95.8	15.6	110.3
		4	11.5	98.6	13.0	108.6
	7	2	10.3	97.4	26.9	128.5
		4	8.6	100.4	13.3	108.2
5	2	13.3	86.9	17.0	46.5	
	4	36.8	174.9	8.4	132.0	
4	2	11.7	103.7	25.6	134.5	
	4	9.3	99.7	14.3	113.5	

Tabela 10: Exatidão e precisão do método de análise intradia and interdia dos HDoHE em metanol.

Isômero	Concentração (ng/μl)	Intradia (n=3)		Interdia (n=3)		
		Precisão (CV %)	Exatidão (%)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	
HDoHE	20	2	5.0	97.8	2.7	101.4
		4	5.6	100.7	1.9	99.1
	19	2	5.9	98.0	2.7	103.1
		4	7.0	101.2	2.1	99.2
	17	2	5.9	93.0	4.9	100.9
		4	4.3	100.3	4.4	104.7
	16	2	6.0	95.2	4.1	104.4
		4	5.3	100.5	2.0	99.7
	14	2	5.0	95.2	6.0	105.4
		4	4.4	100.3	2.2	100.7
	13	2	5.9	94.6	4.8	105.3
		4	5.8	100.3	2.9	101.0
	11	2	3.2	96.9	5.4	104.9
		4	5.3	101.1	4.6	98.9
	10	2	2.5	98.0	5.1	104.3
		4	6.2	98.3	2.3	99.1
	8	2	6.2	93.0	3.5	103.1
		4	5.1	99.6	2.1	98.4
	7	2	6.7	93.0	6.1	107.0
		4	6.1	98.4	1.6	99.9
5	2	13.2	101.1	34.4	66.1	
	4	4.5	103.6	2.5	97.6	
4	2	7.7	92.7	9.7	109.6	
	4	5.0	101.3	4.8	103.6	

Para demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido foram utilizadas amostras de plasma e cérebro de 3 animais Sprague Dawley com 4 meses de vida. O objetivo era determinar os níveis basais de cada um dos isômeros, cuja análise havia sido padronizada e validada. Todas as medidas necessárias para evitar oxidações *ex-vivo* foram tomadas, tais como: manter as amostras a baixas temperaturas, usar antioxidantes e agentes quelantes durante o preparo das amostras.

Como seria de se esperar, com base nos estudos de recuperação, os HpDoHE não foram detectadas nas amostras testadas. Dos 12 HDoHE, 11 isômeros foram detectados no plasma. Entre eles, o mais abundante foi o 14-HDoHE ( $51,55 \pm 9,45$  ng/mL), descrito como produto da 12-LOX. Este isômero estava presente numa concentração 6-10 vezes mais elevada do que os outros isômeros (Figura 16 A,  $P < 0,001$ ). Dados semelhantes foram observados por [Gomolka et al. \(2011\)](#).

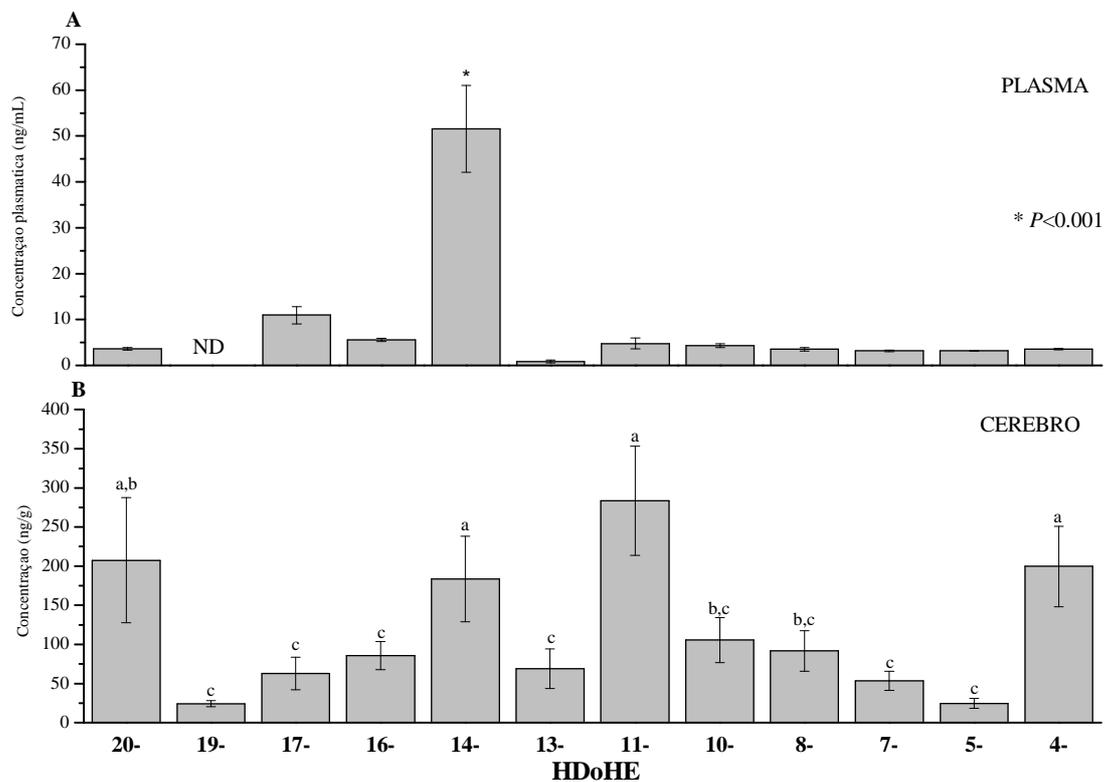


Figura 16: Perfil de HDoHE detectados em plasma e homogenato de cérebro de ratos Sprague-dawley. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três análises realizadas independentemente.

Nos cérebros foram detectados todos os doze isômeros HDoHE (Figura 16 B). Até o momento, os únicos estudos descrevendo a detecção de HDoHE no cérebro haviam sido realizados em modelos em que os homogenatos de cérebro foram incubados com DHA ou foram induzidos a produzir os produtos oxidados ([Kim et al., 1990](#); [Serhan et al., 2002](#); [Hong et al., 2003](#); [Hong et al., 2005](#)).

Sugere-se que devido à presença de altas concentrações de DHA no tecido nervoso seja esperado níveis, relativamente, mais elevados de HDoHE no cérebro em relação ao plasma. Entre os doze isômeros, 20-, 14-, 11- e 4-HDoHE foram encontrados em níveis semelhantes e predominantes em relação aos demais (Figura 16 B).

A 12-LOX é a principal LOX no cérebro, e pode ser a responsável pelos altos níveis de 14-HDoHE e 11-HDoHE encontrados neste tecido ([Hambrecht et al., 1987](#); [Bendani et al., 1995](#)). A predominância dos isômeros 20- e 4-HDoHE no cérebro foi também relatado anteriormente por [Kim et al. \(1990\)](#). Estes isômeros parecem ser preferencialmente gerados através da oxidação não-enzimática do DHA ([Lyberg e Adlercreutz, 2006](#)). Entre os HDoHE menos abundantes, vale destacar a detecção dos isômeros 19- e 5-HDoHE, os quais são formados especificamente pela oxidação mediada pelo  $^1\text{O}_2$ . Apesar da necessidade de maiores investigações, a detecção destes isômeros pode servir como uma impressão digital da oxidação mediada pelo  $^1\text{O}_2$  em amostras biológicas. ([Niki et al., 2005](#); [Iuliano, 2011](#))

Todos dados descritos no presente item foram publicados na revista PLOS ONE sob o título: *The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy- and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis* ([Derogis et al., 2013](#)) (vide arquivo em anexo).

*4.1.2.2 - Análise dos produtos de oxidação do DHA, do AA e do LA utilizando o sistema HPLC da série 1200 (AGILENT) acoplado ao espectrômetro de massas híbrido 4000Qtrap (AB SCIEX, Concord, CA)*

Impulsionados pelos conhecimentos gerados através desenvolvimento da metodologia descrita no item anterior prosseguimos com o desenvolvimento que agregasse a análise dos produtos de oxidação do DHA (n-3) e a análise dos produtos de oxidação do AA e do LA (n-6). Assim foram padronizadas as condições de análise por LC-MS/MS para: HpDoHE, HDoHE, HpETE, HETE, HpODE e HODE, resolvinas D1 e D2, neuroprotectina D1 e isoprostanos. Esta foi desenvolvida no espectrômetro de massas 4000Qtrap. O Qtrap é constituído por um triplo quadrupolo cujo terceiro quadrupolo atua também como um “íon trap” (armadilha de íons). As análises de MS e MS/MS foram conduzidas utilizando a ionização por electrospray (ESI) em modo negativo.

O íon precursor relativo a cada analito foi selecionado e então foram monitorados todos os íons produtos na faixa de 50-500 Da. Para o monitoramento dos HpDoHE, HDoHe, HpETE, HETE, HpODE, HODE, resolvinas e neuroprotectina foram selecionados os precursores com  $m/z$  igual a 359, 343, 335, 319, 311, 295, 375, 359, respectivamente. Para os diferentes isoprostanos foram selecionados os precursores com  $m/z$  353, 357 e 364 respectivamente.

Os espectros de fragmentação dos HpDoHE e HDoHE foram comparados ao obtidos no primeiro estudo utilizando o equipamento da Waters. As transições de massa selecionadas para o monitoramento por SRM de tais compostos foram as mesmas, com a exceção dos isômeros 11-HpDoHE ( $359 \rightarrow 149[\alpha_{mm}]$ ), 10-HpDoHE ( $359 \rightarrow 161[\alpha_{mm}]$ ), 8-HpDoHE ( $359 \rightarrow 171,1[\alpha_{mc}-H_2O]$ ) e 5-HpDoHE ( $359 \rightarrow 68,6 [\alpha_{mc}]$  e  $359 \rightarrow 99,0 [\beta_{mc}]$ ).

O estudo dos produtos de oxidação do ácido linoleico vem sendo realizado no nosso grupo de pesquisa há já alguns anos. A formação de tais produtos é amplamente descrita na literatura, assim sabe-se que os isômeros 9- e 13-hidroperóxidos do ácido

linoleico (ácido hidroperoxi-octadecanoico - HpODE) são formados enzimaticamente ([Hamberg et al., 1998](#)) e não enzimaticamente. Os isômeros 10- e 12-HpODE são formados exclusivamente pela ação do  $^1\text{O}_2$ , assim como os isômeros 19- e 5-HpDoHE ([Frankel, 1984](#)).

Assim como descrito para os produtos de oxidação do DHA, o espectro de fragmentação dos hidroperóxidos do LA é constituído predominantemente pelos íons com  $m/z$  311 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) e 293 ( $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ) ([Macmillan e Murphy, 1995](#); [Oliw et al., 1998](#); [Garscha et al., 2008](#); [Reverberi et al., 2010](#)).

Através do estudo da fragmentação dos HpODE foram selecionados os íons produtos com  $m/z$  113, 165, 153 e 185 para o monitoramento dos isômeros 13-, 12-, 10- e 9-HpODE (Figura 17).

O íon produto 113 pode ser explicado através de uma sequência de modificações constituída por perda de água do hidroperóxido que pode acontecer na fonte, convertendo o hidroperóxido, por exemplo, à cetona correspondente. Esta cetona formada por tautomerismo ceto-enólico, na forma de enol sofreria quebra da ligação  $\beta$  gerando o fragmento  $\beta_{\text{cm}}$  com  $m/z = 113$ . Este fragmento é descrito como sendo  $\beta_{\text{cm}}-\text{H}_2\text{O}$  e o seu mecanismo de sua formação explica também a formação do íon com  $m/z$  71 selecionado para o monitoramento do 20-HpDoHE. ([Oliw et al., 2006](#))

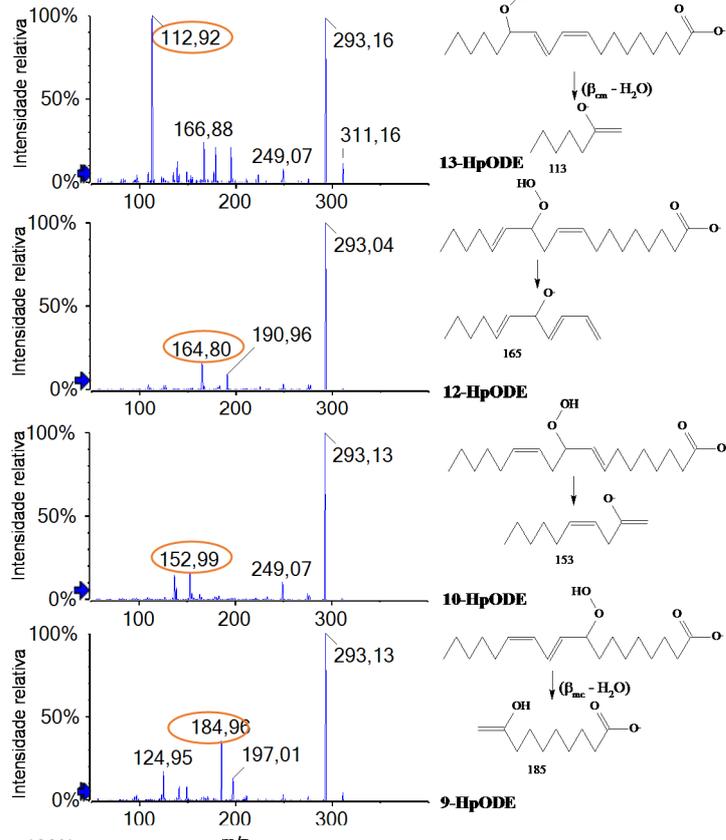
A perda de água seguida da quebra da ligação entre os carbonos 7 e 8 do 12-HpODE, gera o fragmento com  $m/z = 165$ . Este fragmento não é formado pela quebra das ligações  $\alpha$  ou  $\beta$  em relação ao grupamento, mas é descrito como impressão digital deste isômero assim como íon com  $m/z = 191$ , que também foi observado no espectro de fragmentação ([Garscha et al., 2008](#)).

[Garscha et al. \(2008\)](#), fazendo uma abordagem  $\text{MS}^3$  descreveram como íons característicos e intensos os íons com  $m/z$  139 ( $\alpha_{\text{cm}}-\text{H}_2\text{O}$ ) e 153 ( $\beta_{\text{cm}}-\text{H}_2\text{O}$ ).

[Macmillan e Murphy \(1995\)](#), descreveram a formação de dois íons produto característicos para o 9-HpODE um com  $m/z$  185, formado pela perda de água e quebra da dupla ligação alílica ao grupamento hidroperóxido associada à movimentação de dois prótons, e 125, formado pela clivagem da ligação C8-C9 após o movimento de 2 prótons. Assim como padronizado para o nosso método, a transição 359→185 foi descrita por [Reverberi et al. \(2010\)](#) para o monitoramento do 9-HpODE.

Os produtos de redução dos hidroperóxidos, os hidróxidos, quando analisados em modo negativo geram o íon precursor com  $m/z = 295$ . Foram selecionados os seguintes íons produtos 195 para o 13-HODE; 111 e 211 para o 12-HODE; 113 e 155 para o 10-HODE e 171 para o 9-HODE (vide Figura 17 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Para o monitoramento dos isômeros 9- e 13-HODE, [Masoodi et al. \(2008\)](#), [Reverberi et al. \(2010\)](#) e, mais recentemente, [Umeno et al. \(2013\)](#) descreveram as transições de massa 295→171 e 295→195, corroborando com os dados padronizados no presente trabalho. [Umeno et al. \(2013\)](#), descreveram uma única transição 295→183, como a transição de monitoramento para os isômeros específicos do oxigênio singlete. Esta transição já havia sido descrita como específica para o isômero 10, no trabalho de [Reverberi et al. \(2010\)](#). Apesar de extremamente favorecido no espectro, o íon produto selecionado não se trata de um íon específico para cada um dos isômeros. A distinção dos isômeros no trabalho do [Umeno et al. \(2013\)](#) só é possível graças à boa separação cromatográfica. No presente trabalho foram selecionados fragmentos mais específicos, que resultam das fragmentações  $\alpha$  ou  $\beta$ .

A) Fragmentação do precursor com  $m/z$  311



B) Fragmentação do precursor com  $m/z$  295

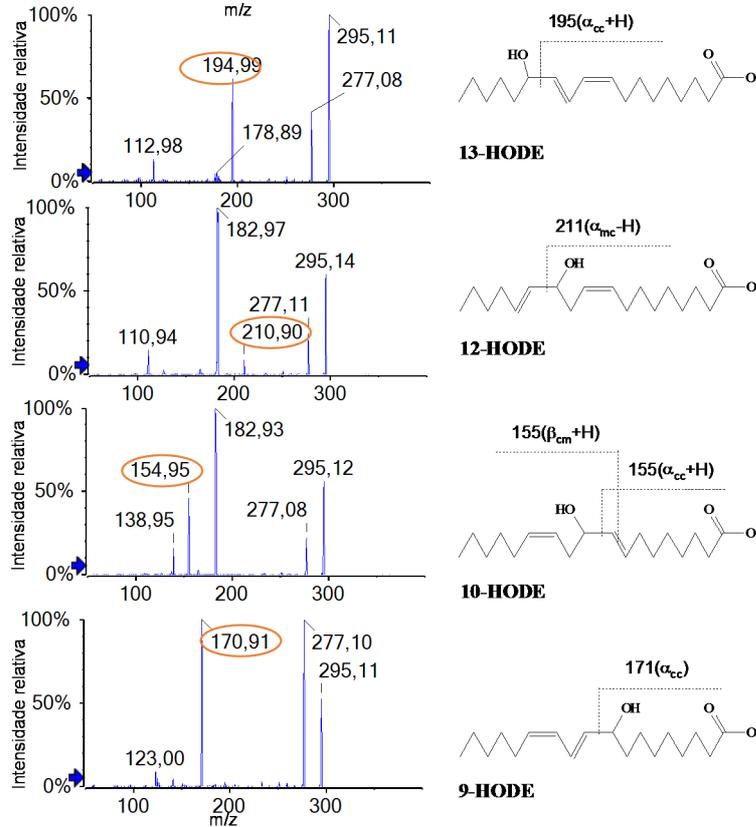


Figura 17: Espectros de fragmentação dos HpODE e HODE. Em destaque estão os íons selecionados para o monitoramento por SEM na análise por LC-MS/MS dos produtos de oxidação de ácidos graxos.

O ácido araquidônico é o substrato de uma série de enzimas envolvidas no processo inflamatório. Através da ação das lipoxigenases (LOX) 5, 12 e 15, são formados os isômeros 5-, 12- e 15-hidroperóxidos do ácido araquidônico (ácido hidroperoxi-eicosatetraenoico - HpETE). O isômero 11-HpETE é um intermediário da ação das ciclooxigenases (COX). Ainda enzimaticamente o AA pode sofrer ação das diferentes isoformas das monoxigenases do citocromo P450 gerando os isômeros 12-, 15-, 16-, 18-, 19- e 20-HETE ([Pace-Asciak e Asotra, 1989](#); [Capdevila \*et al.\*, 2000](#); [Barbosa-Sicard \*et al.\*, 2005](#); [Fer \*et al.\*, 2008](#)).

Através de reações radicalares são formados os isômeros 5-, 8-, 9-, 11-, 12- e 15-HpETE, em casos específicos como reações mediadas pelo oxigênio singlete são formados adicionalmente os isômeros 6- e 14-HpETE ([Terao e Matsushita, 1977](#); [Pace-Asciak e Asotra, 1989](#)).

Assim como descrito para os produtos de oxidação dos demais ácidos graxos foram inicialmente monitorados os íons precursores com  $m/z$  335 ( $[M-H]^-$ ) e 317 ( $[M-H_2O]^-$ ), para os HpETE e 319 ( $[M-H]^-$ ) para os HETE, ver Figura 18 e Figura 19 ([Macmillan e Murphy, 1995](#); [Nakamura \*et al.\*, 1997](#); [Gomolka \*et al.\*, 2011](#); [Shinde \*et al.\*, 2012](#)).

Através da análise do espectro de fragmentação de cada isômero e da fragmentação teórica foram selecionadas as SRM como pode ser observado na Tabela 11, na Figura 18, na Tabela 12 e na Figura 19. Entre as transições testadas as SRM que foram mais específicas para cada um dos isômeros foram selecionadas para o monitoramento dos mesmos (ver transições em negrito na Figura 18 e Figura 19).

Apesar da importância biológica do AA, poucos são os trabalhos que descrevem a análise por LC-MS/MS dos HpETE na forma de hidroperóxidos. Esta realidade é confirmada através de uma simples consulta ao Lipidmaps, base de dados sobre

lipidômica da Nature Publishing Group, no qual constam as condições de análise de apenas 3 isômeros: 15, 12 e 5-HpETE. Estes mesmos compostos foram analisados por [Macmillan e Murphy \(1995\)](#). As SRM selecionadas pelos autores estão de acordo com as transições selecionadas no presente trabalho.

Em contrapartida, a análise por LC-MS/MS dos HETE é amplamente descrita na literatura ([Macmillan e Murphy, 1995](#); [Nakamura et al., 1997](#); [Masoodi et al., 2010](#); [Morgan et al., 2010](#); [Gomolka et al., 2011](#); [Shinde et al., 2012](#)). Exceto para os isômeros formados especificamente pela oxidação mediada pelo oxigênio singlete seguida de redução, 14- e 6-HETE.

Os íons produtos selecionados para o desenvolvimento do método de SRM para o isômero 14-HETE foram os íons com  $m/z$  237 ( $\alpha_{mc}$ ), 207 ( $\alpha_{cc}$ ) e 191 ( $\alpha_{mc-CO_2}$ ), entre eles o íon produto com  $m/z$  207 foi o mais intenso e específico e, portanto, foi o escolhido para o monitoramento deste isômero. Analogamente os íons produtos selecionados para o 6-HETE foram os com  $m/z$  191 ( $\alpha_{mm}$ ), 221 ( $\alpha_{cm}$ ), 257 e 167, sendo o primeiro o selecionado para o método final.

[Kerwin e Torvik \(1996\)](#) e [Nakamura et al. \(1997\)](#) descreveram como íons característicos para o 15- HETE os íons produto com  $m/z$  121, 175 ( $\alpha_{cc-CO_2}$ ) e 219 ( $\alpha_{cc}$ ); 12-HETE  $m/z$  135( $\alpha_{cc-CO_2}$ ), 179( $\alpha_{cc}$ ) e 208 ( $\alpha_{mc}$ ); 11-HETE  $m/z$  167 ( $\alpha_{cc+H}$ ); 9-HETE  $m/z$  139 ( $\alpha_{cc}$ ), 151( $\alpha_{mm}$ ) e 167 ( $\alpha_{mc-H}$ ); 8-HETE  $m/z$  127 ( $\alpha_{cc}$ ), 155 ( $\alpha_{mc+H}$ ) e 163 ( $\alpha_{mm}$ ); e 5-HETE  $m/z$  203 ( $\alpha_{mm}$ ) e 115 ( $\alpha_{mc}$ ). Com base nos espectros obtidos e nos íons característicos descritos na literatura foram selecionados os íons produto para o teste da melhor SRM como mostra a Figura 19.

Foram selecionadas as transições com  $m/z$  319→219 para 15-HETE,  $m/z$  319→207 para 14-HETE,  $m/z$  319→179 para 12-HETE,  $m/z$  319→167 para 11-HETE,  $m/z$  319→151 para 9-HETE,  $m/z$  319→155 para 8-HETE,  $m/z$  319→191 para 6-HETE e

$m/z$  319→115 para 5-HETE. Adicionalmente foram selecionadas as transições  $m/z$  327→116 e 327→184 para os padrões interno e externo usados no presente estudo, 5-HETE- $d8$  e 12-HETE- $d8$ .

Tabela 11: Fragmentação teórica dos 8 isômeros de HpETE obtidos por fotooxidação.

Isômero	Perda de	$\beta_{mm}$	$\beta_{mc}$	$\alpha_{mm}$	$\alpha_{mc}$	$\alpha_{cm}$	$\alpha_{cc}$	$\beta_{cm}$	$\beta_{cc}$	Fragmentos testados ( $m/z$ )
15-HpETE		57	278	71	264	117	218	130	205	
	-CO <sub>2</sub>		234		220		174		161	113,1[ $\beta_{cm}$ -H <sub>2</sub> O];
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		216		202		156			163,0[ $\beta_{cc}$ -CO <sub>2</sub> ];
	-H <sub>2</sub> O		260		246	99	200	112		219,0[ $\alpha_{cc}$ ]
14-HpETE		70	265	83	252	129	206	143	192	125,0[ $\beta_{cm}$ ];
	-CO <sub>2</sub>		221		208		162		148	191,0[ $\alpha_{mc}$ -H <sub>2</sub> O-
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		203		190		144			CO <sub>2</sub> ]; 207,2[ $\alpha_{mc}$ -
	-H <sub>2</sub> O		247		234	111	188	125		CO <sub>2</sub> ]; 249,0[ $\beta_{mc}$ -
12-HpETE		97	238	111	224	157	178	170	165	
	-CO <sub>2</sub>		194		180		134		121	179,2[ $\alpha_{cc}$ +H];
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		176		162		116			153,1[ $\beta_{cm}$ -H <sub>2</sub> O]
	-H <sub>2</sub> O		220		206	139	160	152		
11-HpETE		110	225	123	212	169	166	183	152	
	-CO <sub>2</sub>		181		168		122		108	167,1[ $\alpha_{cc}$ +H];
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		163		150		104			123,1[ $\alpha_{mm}$ ];
	-H <sub>2</sub> O		207		194	151	148	165		165,1[ $\beta_{cm}$ -H <sub>2</sub> O];
9-HpETE		137	198	151	184	197	138	210	125	209[ $\beta_{mc}$ -H <sub>2</sub> O+2H]
	-CO <sub>2</sub>		154		140		94		81	219,2 [M-H <sub>2</sub> O-
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		136		122		76			CO <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> ];
	-H <sub>2</sub> O		180		166	179	120	192		193,1[ $\beta_{cm}$ -
8-HpETE		150	185	163	172	209	126	223	112	181,1[ $\beta_{mc}$ -
	-CO <sub>2</sub>		141		128		82		68	H <sub>2</sub> O+1H]
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		123		110		64			115,0;
	-H <sub>2</sub> O		167		154	191	108	205		163,1[ $\alpha_{mm}$ ];
6-HpETE		177	158	191	144	237	98	250	85	169[ $\beta_{mc}$ -H <sub>2</sub> O+2H]
	-CO <sub>2</sub>		114		100		54		41	191,1[ $\alpha_{mm}$ ]; 123
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		96		82		36			[ $\alpha_{mc}$ -H <sub>2</sub> O+3H];
	-H <sub>2</sub> O		140		126	219	80	232		233,0 [ $\beta_{mc}$ +H]
5-HpETE		190	145	203	132	249	86	263	72	
	-CO <sub>2</sub>		101		88		42		28	203,1[ $\alpha_{mm}$ ];
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		83		70		24			155,0; 129,0[ $\beta_{mc}$ -
	-H <sub>2</sub> O		127		114	231	68	245		H <sub>2</sub> O+2H]; 203,1

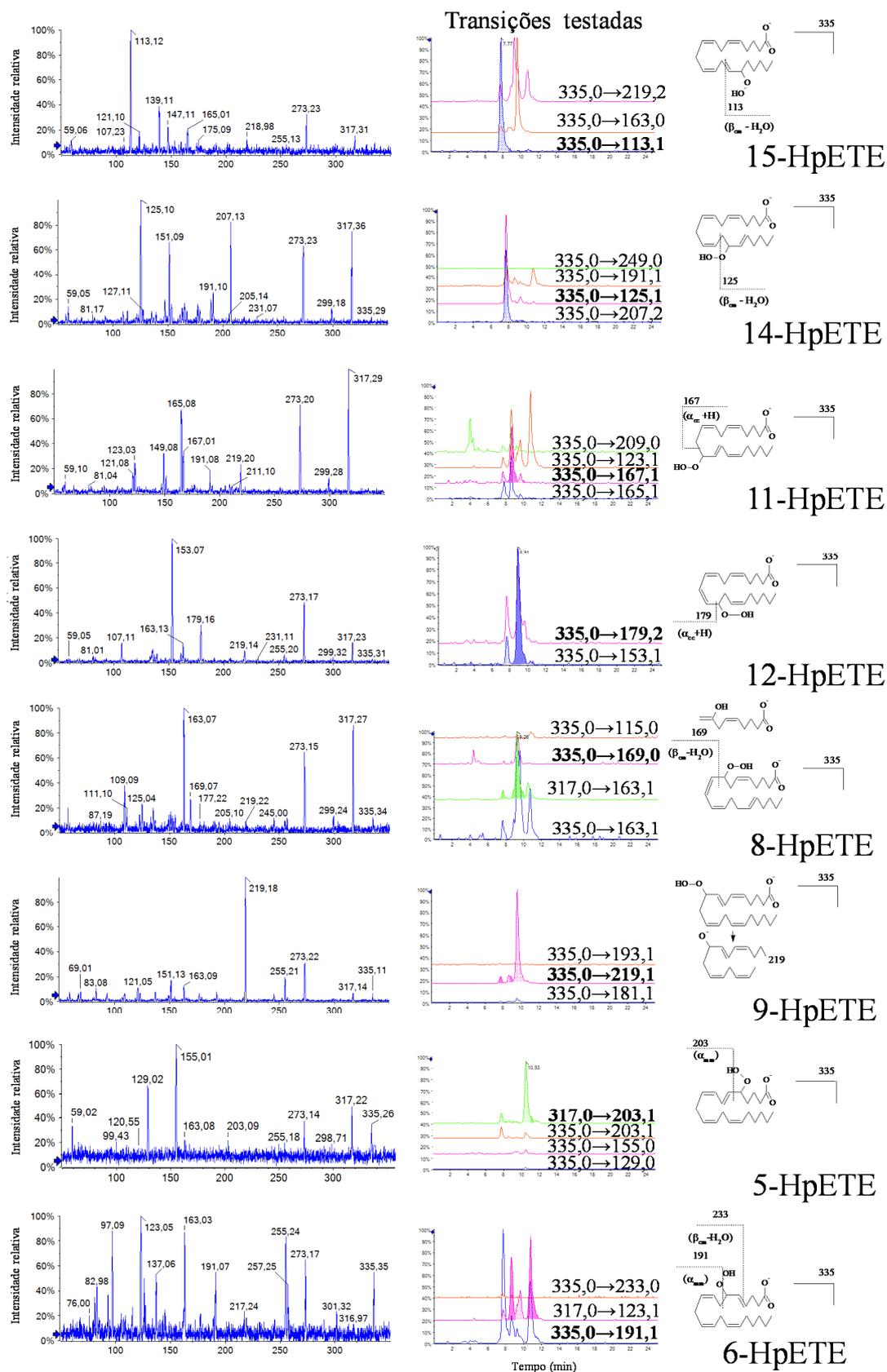


Figura 18: Estudo da fragmentação dos HpETE através da análise por LC-MS/MS fragmentando o íon precursor com  $m/z = 335$ . Os íons mais intensos/específicos foram selecionados e testados no modo de monitoramento por SRM. Em negrito estão destacadas as transições que se mostraram mais específicas para cada isômero. A fragmentação teórica dos fragmentos selecionados para o método final de SRM são mostradas em detalhe.

Tabela 12: Fragmentação teórica dos 8 isômeros de HETE.

Isômero	Perda de	$\beta_{mm}$	$\beta_{mc}$	$\alpha_{mm}$	$\alpha_{mc}$	$\alpha_{cm}$	$\alpha_{cc}$	$\beta_{cm}$	$\beta_{cc}$	Fragmentos testados ( $m/z$ )
15-HETE		57	262	71	248	101	218	114	205	
	-CO <sub>2</sub>		218		204		174		161	174,0; 219,0;
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		200		186		156			175,0;
	-H <sub>2</sub> O		244		230	83	200	96		
14-HETE		70	249	83	236	113	206	127	192	
	-CO <sub>2</sub>		205		192		162		148	237,0; 207,0;
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		187		174		144			191,0
	-H <sub>2</sub> O		231		218	95	188	109		
12-HETE		97	222	111	208	141	178	154	165	
	-CO <sub>2</sub>		178		164		134		121	179
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		160		146		116			
	-H <sub>2</sub> O		204		190	123	160	136		
11-HETE		1100	209	123	196	153	166	167	152	
	-CO <sub>2</sub>		165		152		122		108	149,0; 167,0
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		147		134		104			
	-H <sub>2</sub> O		191		178	135	148	149		
9-HETE		137	182	151	168	181	138	194	125	
	-CO <sub>2</sub>		138		124		94		81	151
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		120		106		76			
	-H <sub>2</sub> O		164		150	163	120	176		
8-HETE		150	169	163	156	193	126	207	112	
	-CO <sub>2</sub>		125		112		82		68	155
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		107		94		64			
	-H <sub>2</sub> O		151		138	175	108	189		
6-HETE		177	142	191	128	221	98	234	85	
	-CO <sub>2</sub>		98		84		54		41	221,0; 257,0;
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		80		66		36			167,1; 191,0
	-H <sub>2</sub> O		124		110	203	80	216		
5-HETE		190	129	203	116	233	86	247	72	
	-CO <sub>2</sub>		85		72		42		28	203,4; 163,0;
	-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O		67		54		24			115,0
	-H <sub>2</sub> O		111		98	215	68	229		

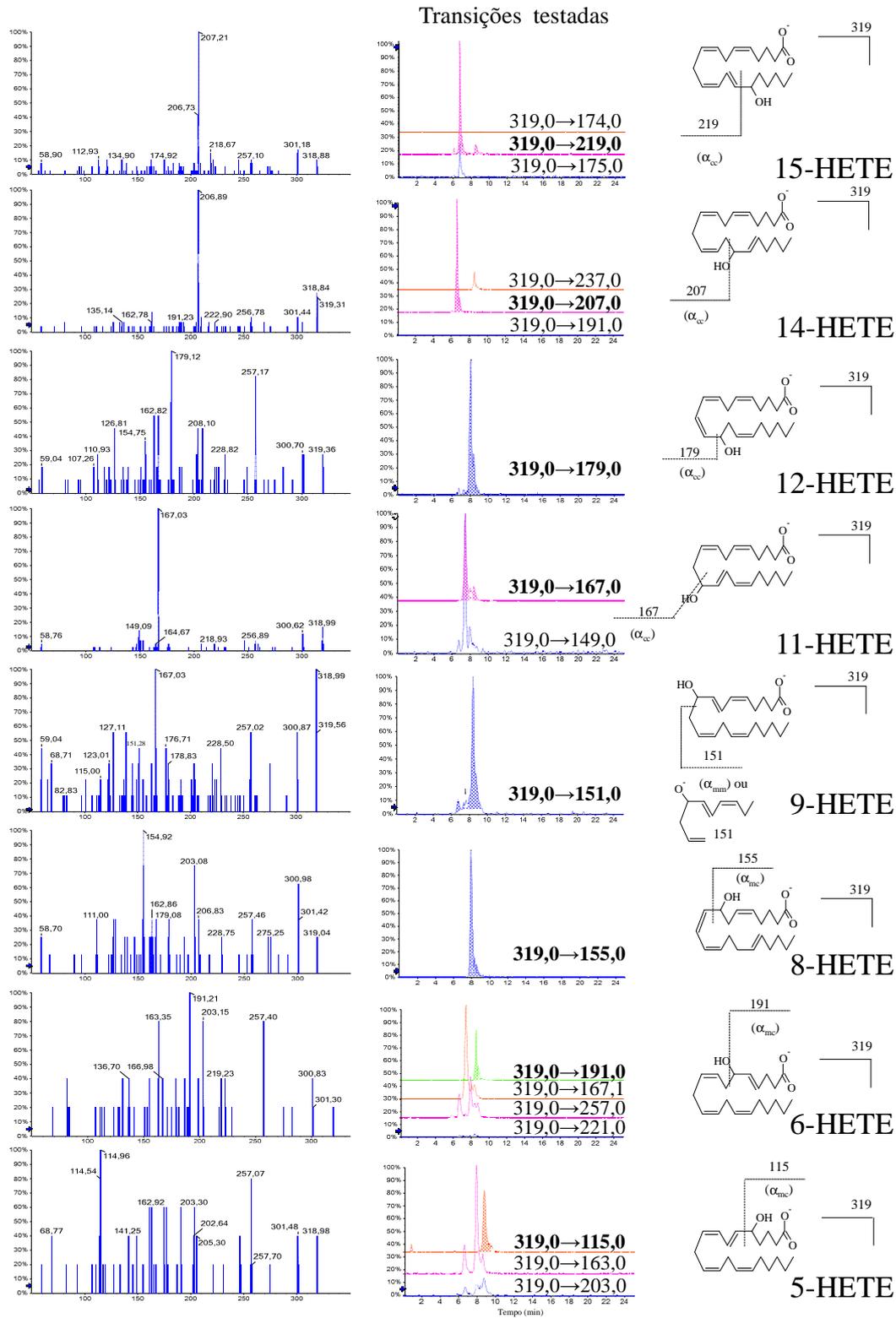


Figura 19: Estudo da fragmentação dos HETE através da análise por LC-MS/MS fragmentando o íon precursor com  $m/z = 319$ . Os íons mais intensos/específicos foram selecionados e testados no modo de monitoramento por SRM. Em negrito estão destacadas as transições que se mostraram mais específicas para cada isômero. A fragmentação teórica dos fragmentos selecionados para o método final de SRM são mostradas em detalhe.

A fragmentação das resolvinas D1 e D2 e da neuroprotectina D1 já era descrita na literatura então nos baseamos no trabalho de [Claria et al. \(2012\)](#), para a correta

interpretação do espectro bem como a seleção das transições de massas para o monitoramento por SRM. Foram selecionadas as transições com  $m/z$  374,9→233,2 (fragmento  $\alpha_{mm}$  em relação à hidroxila na posição 7), 374,9→174,9 e 359,0→153,1, para o monitoramento da resolvina D1, D2 e neuroprotectina, respectivamente (Figura A 1 – em anexos).

O mesmo procedimento foi realizado para o monitoramento dos isoprostanos: 8-isoprostaglandina $F_{2\alpha}$ -d<sub>4</sub> e 8,12-iso-iPF $_{2\alpha}$ -d<sub>11</sub>, e respectivos padrões não deuterados, de acordo com [Korecka et al. \(2010\)](#). Assim foram selecionadas as transições com  $m/z$  357,0→197,0 e 364,0→197,0 para o 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -d<sub>4</sub> e 8,12-iso-IPF $_{2\alpha}$ -d<sub>11</sub>. Usando os mesmos fragmentos, descontando os deutérios, foram selecionadas as SRM com  $m/z$  353,0→193,0 e 353,0→115,1 para o 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  e 8,12-iso-IPF $_{2\alpha}$  (Figura A 2 – em anexos).

Uma vez selecionadas as transições a serem monitoradas, as condições de análise no espectrômetro de massas foram automaticamente otimizadas. Foram então criados dois períodos de análise: primeiro estritamente qualitativo, de 0 a 4 minutos, buscando analisar qualitativamente compostos como resolvinas e isoprostanos; o segundo período, de 4 a 25 minutos foram analisados quali- e quantitativamente os produtos primários de oxidação dos ácidos graxos previamente descritos neste tópico.

#### 4.1.2.2.1 - Validação do método

A validação do método quantitativo foi realizada em 3 dias diferentes no intuito de determinar os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD –relação sinal/ruído é de 3:1), limite de quantificação (LQ - relação sinal/ruído é de 10:1), recuperação, exatidão e precisão inter- e intradia. Foram construídas curvas de calibração para todos os HpDoHE, HDoHE, HpODE, HODE (para todos os isômeros) e os HETE

(apenas para os isômeros presentes no mix da Cayman) com 6 pontos cada, em quintuplicata.

Tabela 13: Parâmetros de validação tais como limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e linearidade obtidos através da plotagem das curvas de calibração em metanol dos produtos de oxidação do DHA.

Composto	Q1	Q3	TR (min)	LQ (pg)	LD (pg)	Equação	r <sup>2</sup>	faixa linear (ng/μl)
20-HpDoHE	359.0	70.9	7,26±0,03	7,74	ND	y=0,0209x+0,0092	0,9978	37,08-0,14
19-HpDoHE	359.0	83.0	7,09±0,03	17,28	ND	y=0,0252x+0,0102	0,9973	14,40-0,07
17-HpDoHE	359.0	111.0	7,90±0,03	27,00	ND	y=0,0352x-0,0013	0,9977	9,00-0,04
16-HpDoHE	359.0	232.9	7,80±0,03	97,38	ND	y=0,0074x+0,0018	0,9985	14,40-0,07
14-HpDoHE	359.0	151.0	8,44±0,03	19,80	ND	y=0,0444x+,0034	0,9980	10,80-0,04
13-HpDoHE	359.0	121.1	8,25±0,03	35,28	10,08	y=0,0428x-0,0019	0,9834	10,80-0,04
11-HpDoHE	359.0	242.8	8,84±0,03	79,74	ND	y=0,0168x+0,0010	0,9873	9,00-0,04
10-HpDoHE	359.0	161.0	8,57±0,03	23,22	ND	y=0,0471x+0,0070	0,9981	9,00-0,04
8-HpDoHE	359.0	171.1	9,62±0,04	115,92	ND	y=0,0110x+0,0015	0,9978	9,00-0,04
7-HpDoHE	359.0	201.1	9,33±0,04	46,44	6,12	y=0,0099x+0,0029	0,9753	11,88-0,04
5-HpDoHE	359.0	68.6	11,25±1,23	669,6	ND	y=0,0022x-0,0001	0,9933	2,70-0,01
4-HpDoHE	359.0	115.0	11,49±0,04	70,74	27,9	y=0,0198x-0,0009	0,9974	3,60-0,01
20-HDoHE	343.0	285.0	6,30±0,02	168,04	ND	y=0,0181x-0,0257	0,9958	24,08-0,19
19-HDoHE	343.0	228.9	6,19±0,02	91,50	ND	y=0,0579x-0,0357	0,9951	10,66-0,08
17-HDoHE	343.0	245.0	7,10±0,03	54,52	ND	y=0,0519x-0,0024	0,9917	5,20-0,04
16-HDoHE	343.0	233.0	6,98±0,02	13,59	ND	y=0,2464x-0,0420	0,9944	5,20-0,04
14-HDoHE	343.0	205.0	7,68±0,02	50,22	ND	y=0,0646x-0,0097	0,9933	5,16-0,04
13-HDoHE	343.0	192.8	7,35±0,03	49,71	ND	y=0,0826x-0,0063	0,9927	5,16-0,04
11-HDoHE	343.0	149.0	8,09±0,03	127,80	53,15	y=0,0615x-0,0047	0,9904	10,32-0,08
10-HDoHE	343.0	153.0	7,67±0,03	28,04	ND	y=0,1118x-0,0018	0,9913	8,60-0,07
8-HDoHE	343.0	189.0	8,57±0,03	1,55	ND	y=0,2080x+0,0144	0,9847	3,44-0,03
7-HDoHE	343.0	113.0	8,25±0,03	146,03	ND	y=0,0225x-0,0015	0,9919	5,16-0,04
5-HDoHE	343.0	85.0	8,48±0,03	147,75	34,57	y=0,0216x-0,0006	0,9917	0,81-0,01
4-HDoHE	343.0	115.0	9,82±0,03	42,83	3,10	y=0,1783x-0,0249	0,9930	2,41-0,02

TR – tempo de retenção; LQ (S/R=10) (pg aplicados na coluna); LD (S/R=3) (pg aplicados na coluna); ND – não determinado; Q1 – m/z do íon precursor; Q3 – m/z do íon produto.

As curvas de calibração foram construídas plotando a seguinte equação:

$$\left( \frac{\text{Area do analito}}{\text{área do padrão interno}} \right)$$

em função da concentração do analito (parâmetros obtidos estão descritos na Tabela 13, Tabela 14 e Tabela 15).

Tabela 14: Parâmetros de validação tais como limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e linearidade obtidos através da plotagem das curvas de calibração em metanol dos produtos de oxidação do LA.

Composto	Q1	Q3	TR (min)	LQ (pg)	LD (pg)	Equação	r <sup>2</sup>	faixa linear (ng/μl)
<b>13-HpODE</b>	311	113	6,91 ± 0,01	592,4	449,9	y=0,0331x-0,0444	0,9987	31,20-0,24
<b>12-HpODE</b>	311	165	6,69 ± 0,01	1408,0	1326,4	y=0,0379x-0,0584	0,9988	31,20-0,24
<b>10-HpODE</b>	311	153	7,20 ± 0,01	ND	ND	y=0,0137x-0,005	0,9989	31,20-0,24
<b>9-HpODE</b>	311	185	7,09 ± 0,01	ND	ND	y=0,0368x-0,0139	0,9995	31,20-0,24
<b>13-HODE</b>	295	195	6,07 ± 0,01	ND	ND	y=0,6774x-0,0139	0,9994	2,07-0,01
<b>12-HODE</b>	295	111	5,81 ± 0,01	174,3	32,4	y=0,1049x-0,0028	0,9992	2,07-0,01
<b>10-HODE</b>	295	113	6,06 ± 0,01	116,8	ND	y=0,0752x-0,0009	0,9996	2,07-0,01
<b>9-HODE</b>	295	171	6,20 ± 0,01	ND	ND	y=0,4003x-0,0059	0,9993	2,07-0,01

ND (não determinado)

Tabela 15: Parâmetros de validação tais como limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e linearidade obtidos através da plotagem das curvas de calibração em metanol dos produtos de oxidação do AA.

Composto	Q1	Q3	TR (min)	LQ (pg)	LD (pg)	Equação	r <sup>2</sup>	faixa linear (ng/μl)
<b>15-HETE</b>	319	219	6,77 ± 0,03	15,20	ND	y=0,0328x-0,0000	0,9983	0,64-0,01
<b>12-HETE</b>	319	179	7,99 ± 0,03	4,96	ND	y=0,0330x+0,0004	0,9983	0,64-0,01
<b>11-HETE</b>	319	167	7,43 ± 0,03	8,80	0,96	y=0,1058x-0,0005	0,9973	0,64-0,01
<b>8-HETE</b>	319	155	7,92 ± 0,03	14,88	ND	y=0,0300x+0,0002	0,9972	0,64-0,01
<b>5-HETE</b>	319	115	8,75 ± 0,04	25,44	ND	Y=0,0242x+0,0004	0,9979	0,64-0,01

ND (não determinado)

Os primeiros parâmetros de validação determinados foram a linearidade do método bem como os valores de LD e LQ. Os valores de LQ variaram de 8 a 669 pg para os HpDoHE, 2-168 pg para HDoHE (Tabela 13), para os HpODE e HODE não foi possível determinar o LQ para todos os isômeros (Tabela 14), e de 5 a 25 pg para os HETE (Tabela 15) aplicados na coluna. O método se mostrou linear ( $r^2 \geq 0,99$ ) nas faixas de concentração testadas.

Para os ensaios de recuperação, uma solução tampão foi contaminada com quantidades conhecidas de cada analito antes e depois do processo de extração, em triplicata. A razão, em porcentagem, das concentrações obtidas nas contaminações antes e depois foi utilizada para o cálculo da recuperação, seguindo a seguinte equação:

$$\text{Recuperação \%} = \left( \frac{\text{concentração no tampão contaminado antes} - \text{concentração em tampão}}{\text{concentração no tampão contaminado depois} - \text{concentração em tampão}} \right) \times 100$$

Tabela 16: Taxas de recuperação dos HpDoHE e HDoHE em amostras de controle de qualidade constituídas por tampão fosfato salino (PBS) (n=3).

Isômero	RECUPERAÇÃO (%)		Isômero	RECUPERAÇÃO (%)	
	média ± desvio padrão	Precisão (CV %)		média ± desvio padrão	Precisão (CV %)
<b>20-HpDoHE</b>	29,23 ± 1,78	6,09	<b>20-HDoHE</b>	41,20 ± 3,86	9,37
<b>19-HpDoHE</b>	30,22 ± 3,86	12,76	<b>19-HDoHE</b>	41,60 ± 6,13	14,73
<b>17-HpDoHE</b>	35,02 ± 3,15	9,00	<b>17-HDoHE</b>	47,93 ± 6,16	12,85
<b>16-HpDoHE</b>	32,11 ± 3,69	11,50	<b>16-HDoHE</b>	47,14 ± 8,21	17,41
<b>14-HpDoHE</b>	33,58 ± 2,24	6,66	<b>14-HDoHE</b>	51,16 ± 8,77	17,14
<b>13-HpDoHE</b>	34,77 ± 3,97	11,42	<b>13-HDoHE</b>	ND	ND
<b>11-HpDoHE</b>	36,59 ± 4,10	11,21	<b>11-HDoHE</b>	47,48 ± 8,29	17,46
<b>10-HpDoHE</b>	39,72 ± 6,17	15,52	<b>10-HDoHE</b>	45,36 ± 6,44	14,20
<b>8-HpDoHE</b>	33,10 ± 4,48	13,52	<b>8-HDoHE</b>	39,39 ± 5,26	13,36
<b>7-HpDoHE</b>	39,16 ± 4,48	11,45	<b>7-HDoHE</b>	43,90 ± 5,13	11,69
<b>5-HpDoHE</b>	26,29 ± 5,18	19,70	<b>5-HDoHE</b>	37,58 ± 7,26	19,33
<b>4-HpDoHE</b>	34,25 ± 1,34	3,92	<b>4-HDoHE</b>	72,87 ± 9,83	13,49

Nas normas brasileiras, o parâmetro recuperação encontra-se descrito na resolução RE Nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária na qual consta que não existe um valor mínimo para a recuperação, contudo a precisão (expressa matematicamente pelo CV) da mesma deveria ser de até 20% entre as replicatas. De acordo com esta informação os valores de recuperação e sua precisão obtidos foram adequados para os 24 produtos de oxidação do DHA no tampão PBS (Tabela 16). Em PBS a recuperação dos produtos de oxidação do LA não se mostrou adequada para os isômeros 10- e 9-HpODE (Tabela 17). A recuperação dos HETE adequada com exceção do 15- e 5-HETE (Tabela 18).

*Tabela 17: Taxas de recuperação dos HpODE e HODE em amostras de controle de qualidade constituídas por tampão fosfato salino (PBS) (n=3).*

RECUPERAÇÃO (%)		
Isômero	média ± desvio padrão	Precisão (CV %)
<b>13-HpODE</b>	1,16 ± 0,00	0,00
<b>12-HpODE</b>	3,92 ± 0,00	0,00
<b>10-HpODE</b>	4,88 ± 5,17	106,07
<b>9-HpODE</b>	9,76 ± 6,45	66,14
<b>13-HODE</b>	23,81 ± 0,80	3,35
<b>12-HODE</b>	46,19 ± 9,78	21,19
<b>10-HODE</b>	27,42 ± 2,79	10,19
<b>9-HODE</b>	27,52 ± 3,96	14,38

*Tabela 18: Taxas de recuperação dos HETE em amostras de controle de qualidade constituídas por tampão fosfato salino (PBS) (n=3)*

RECUPERAÇÃO (%)		
Isômero	média ± desvio padrão	Precisão (CV %)
<b>15-HETE</b>	40,74 ± 11,11	27,27
<b>12-HETE</b>	58,33 ± 8,33	14,29
<b>11-HETE</b>	51,40 ± 9,85	19,16
<b>8-HETE</b>	39,06 ± 4,40	11,26
<b>5-HETE</b>	22,73 ± 13,64	60,00

A exatidão e precisão do método foram estabelecidas através da análise de amostras de controle de qualidade compostas por PBS contaminadas com quantidades conhecidas para cada analito. Três réplicas de cada amostra foram analisadas juntamente às curvas de calibração em três corridas analíticas em um mesmo dia (avaliação intradia). Para determinar a variabilidade interdia do método, as amostras de controle de qualidade foram analisadas em três dias diferentes, em triplicata.

A exatidão é definida como a concordância entre o valor real e o obtido do analito. Este parâmetro pode ser avaliado de 4 formas diferentes: fazendo uso de material de referência, comparando o método proposto ao método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos. No presente trabalho foi escolhida a abordagem de ensaios de recuperação em matriz. A exatidão foi calculada com base razão do valor de concentração obtido e esperado, em valores percentuais. Foram testadas duas concentrações para cada analito.

A precisão avalia o grau de variação de resultados de uma medição. Esta foi calculada como o desvio-padrão relativo (coeficiente de variação).

Foram considerados como aceitáveis de acordo com a legislação supracitada: CV de até 20% para a precisão; e, exatidão de 80 e 120%.

O método se mostrou preciso para a maioria dos compostos analisados, contudo inexato nas amostras de controle de qualidade (ver Tabela A 6 – em anexos) e à falta de exatidão é justificado pela baixa recuperação dos analitos. O método de extração utilizado preza pela limpeza da amostra em detrimento da quantidade recuperada do analito. Contudo este fato é contrabalanceado pela premissa de que todos os grupos amostrais foram submetidos ao mesmo erro e a precisão do método permite a análise de cada

composto. Estudos futuros de validação se fazem necessários, porém os dados obtidos até o presente momento se mostram promissores.

#### *4.1.2.3 - Análise por espectrometria de massas de alta resolução utilizando um espectrômetro QTOF*

A análise através do monitoramento por SRM utilizando para isso um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (QqQ) ou um híbrido quadrupolo – ion trap (Qtrap) é uma técnica clássica para a análise dos produtos de oxidação dos ácidos graxos. Esta depende diretamente de conhecimento e seleção prévios dos compostos de interesse.

De acordo com [Stolker et al. \(2004\)](#), o lançamento de um instrumento híbrido quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF: Quadrupole-time of flight) que associava dois quadrupolos a um analisador ToF alinhado na posição ortogonal em relação aos quadrupolos ([Dawson e Guilhaus, 1989](#)) resultou, na verdade, na criação de uma importante ferramenta de identificação de compostos. Fato que é devido à precisão da relação  $m/z$  para os íons precursores e produtos.

Ao utilizar a tecnologia dos espectrômetros do tipo Q-ToF é comum a varredura total de MS associada à varredura de íons produtos. Os íons precursores e os íons produtos podem ser escolhidos pelo usuário no momento da análise ou pós-aquisição.

Na análise de MS apenas o segundo analisador de massas atua, no caso o ToF. Assim todos os íons com  $m/z$  de 100 a 1000 são direcionados ao detector. Em um primeiro momento, obtém-se um cromatograma de íons totais (TIC) resultante do somatório de todos íons monitorados. Deste cromatograma é possível extrair as  $m/z$  correspondentes aos íons precursores de interesse com massa exata. Assim é possível monitorar, por exemplo, o ácido caprílico selecionando  $m/z$   $143.1072 \pm 0,01$ ; ácido cáprico - 171.1385

$\pm 0,01$ ; ácido láurico -  $199.1698 \pm 0,01$ ; ácido miristoleico -  $225.1854 \pm 0,01$ ; ácido mirístico -  $227.2011 \pm 0,01$ ; ácido palmitoleico -  $253.2167 \pm 0,01$ ; ácido palmítico -  $255.2324 \pm 0,01$ ; ácido alfa-linoleico -  $277.2167 \pm 0,01$ ; ácido linoleico -  $279.2324 \pm 0,01$ ; ácido gama-linoleico -  $279.2324 \pm 0,01$ ; ácido oleico -  $281.2480 \pm 0,01$ ; ácido esteárico -  $283.2637 \pm 0,01$ ; ácido eicosapentaenoico -  $301.2167 \pm 0,01$ ; ácido araquidônico -  $303.2324 \pm 0,01$ ; ácido araquídico -  $311.2950 \pm 0,01$ ; ácido docosaenoico -  $327.2324 \pm 0,01$ ; ácido docosapentaenóico -  $329.2480 \pm 0,01$ ; ácido docosaenoico deuterado -  $332.2715 \pm 0,01$ ; e ácido behênico  $339.3263 \pm 0,01$ .

Diferentemente da abordagem comumente utilizada pelos triplos quadrupolos, ou pelos híbridos QTrap, o nosso interesse na otimização não era favorecer exclusivamente a ionização de um dado íon produto. A riqueza dos íons produtos obtidos que permitem a identificação e quantificação dos analitos era mais importante. Por este motivo, utilizou-se uma faixa de energia de colisão para favorecer todos os íons. Faixa esta que é mostrada pelo parâmetro CES na Tabela 2. Esta abordagem diferenciada resulta em um menor tempo gasto na etapa de otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.

O método de aquisição foi construído baseado no estudo de fragmentação de: padrões sintetizados por fotooxidação (hidroperóxidos e hidróxidos); padrões comercialmente disponíveis como os ácidos graxos, isoprostanos, resolvinas e neuroprotectinas; e, amostras de plasma de ratos obtidas por cardiopunção extraídas através do método 2 (3.2.5.1.2 - Método 2).

Os íons utilizados no monitoramento de cada um dos ácidos graxos e seus produtos de oxidação foram selecionados através de um estudo da fragmentação de cada analito com a vantagem do uso da massa exata. Este estudo foi desenvolvido utilizando os softwares PeakView 2.0 e ACD/fragmenter 12.0 (vide Figura 20). Ambos os softwares

fornecem adicionalmente os erros relativos entre a massa exata da estrutura teórica para um determinado íon e o valor obtido no espectro. Este erro é mais uma ferramenta que incrementa o grau de confiança na identificação dos compostos estudados. Para os íons selecionados o erro foi inferior a 0,01 Da.

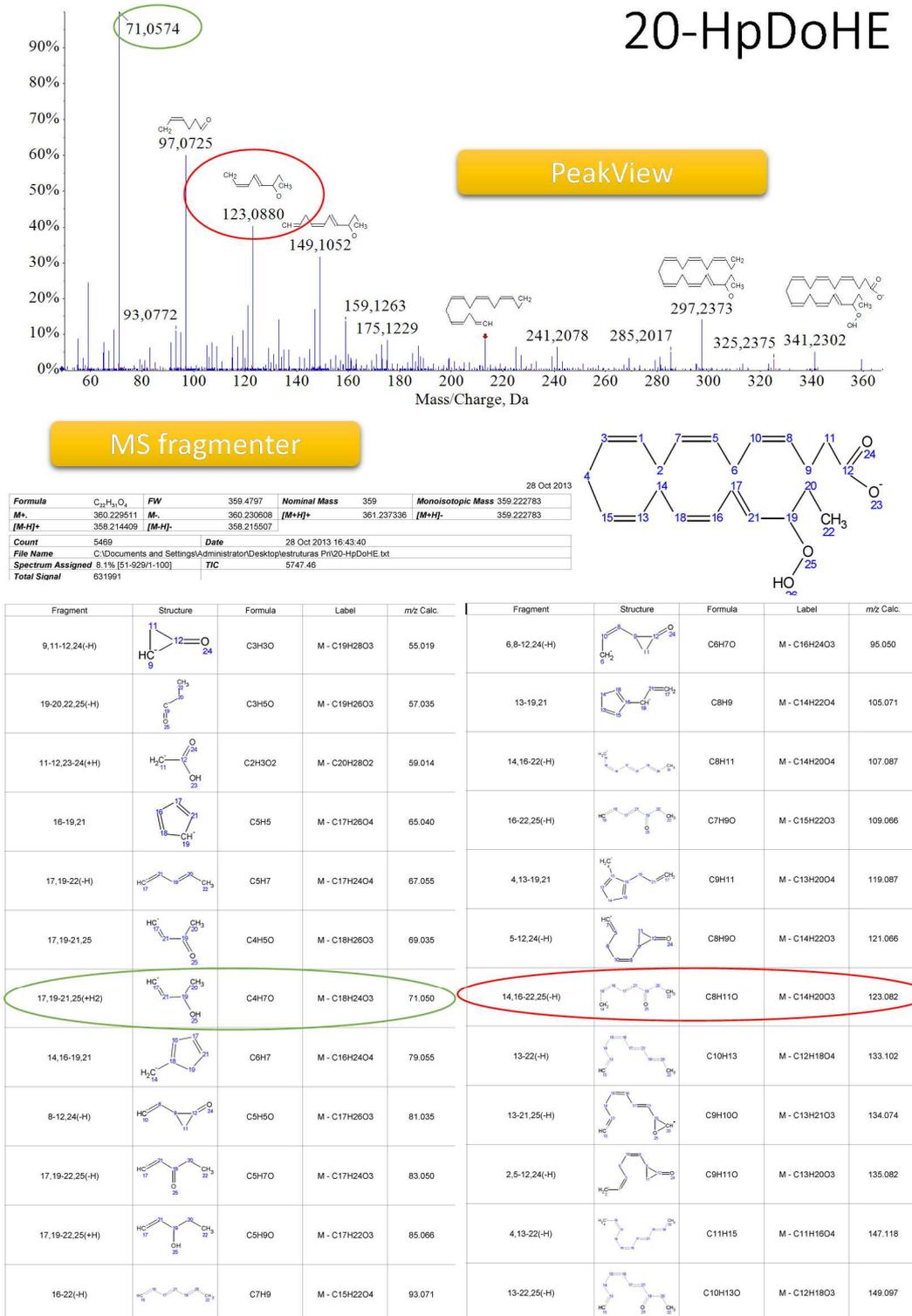


Figura 20: Estudo da fragmentação obtido através dos softwares PeakView e MS fragmenter.

Assim todos os isômeros foram analisados de acordo com o tempo de retenção, a massa exata do precursor, e o espectro de íons produto. Os dados preditos foram comparados aos dados obtidos.

Para os 12 isômeros dos HpDoHE o estudo de fragmentação foi realizado não só agregando os estudos de fragmentação anteriores, os softwares supracitados bem como comparando os espectros dos isômeros não deuterados aos respectivos deuterados (vide Figura 21).

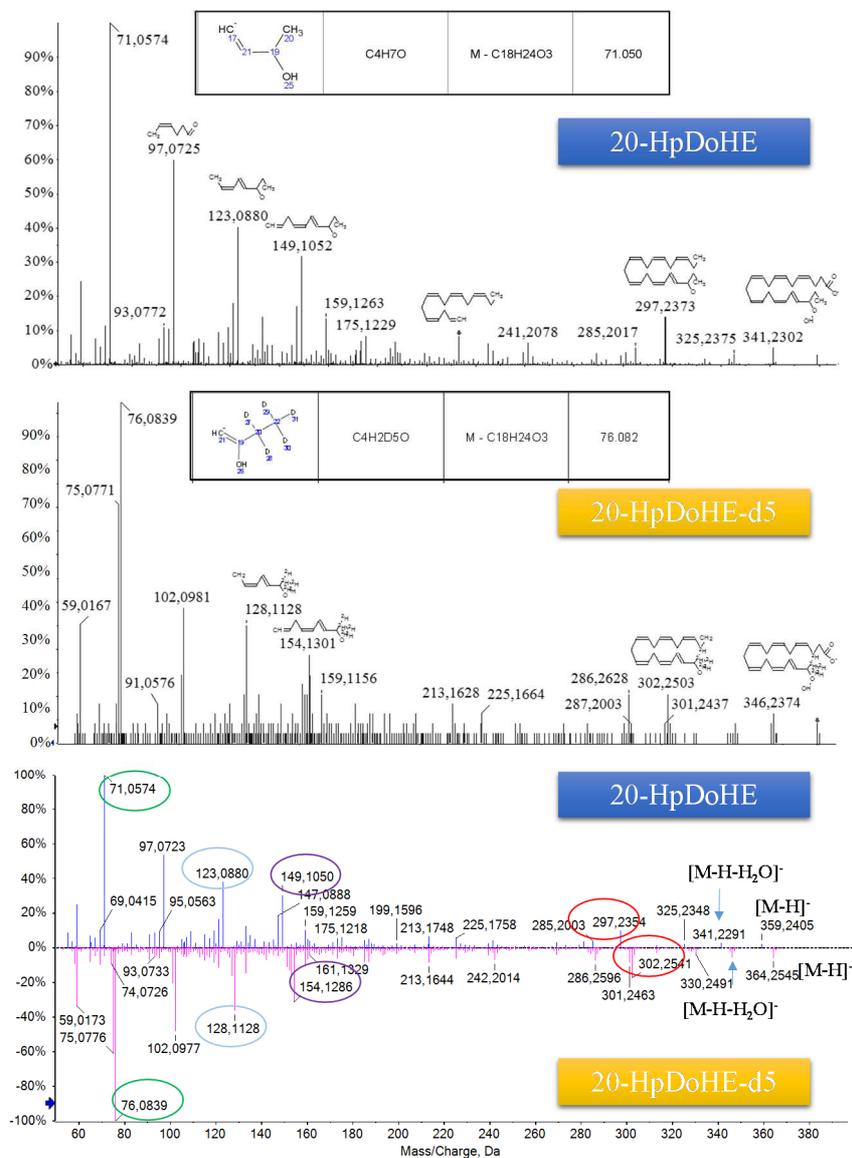


Figura 21: Comparativo do espectro de fragmentação do isômero 20-HpDoHE não deuterado e deuterado.

Assim como descrito nas análises utilizando o QqQ, no monitoramento, por exemplo, dos HpDoHE foram observados os íons não específicos com  $m/z$  341,2122 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,  $m/z$  315,2329 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e  $m/z$  297,2223 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; e para os HpDoHE-d<sub>5</sub>, foram detectados os íons com  $m/z$  346,2436 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,  $m/z$  320,2643 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e  $m/z$  302,2537 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, sendo permitido um erro de  $\pm 0,005$  Da. Além das fragmentações específicas alfa e beta.

Assim, como descrito anteriormente, baseados no trabalho de [Macmillan e Murphy \(1995\)](#) consideramos o íon com  $m/z$  71 como produto de uma fragmentação diferenciada  $\beta_{\text{cm-H}_2\text{O}}$ . Pelo estudo de fragmentação utilizando o MS/fragmenter consideramos que seria possível a formação deste mesmo íon como fragmento  $\gamma_{\text{cm-H}_2\text{O-CH}_3+2\text{H}}$ . O estudo de fragmentação do seu correspondente deuterado favoreceu a hipótese inicial (Figura 21).

O estudo com os produtos deuterados permite ainda confirmar a assinatura espectral de cada isômero. Na Figura 21 é possível observar alguns íons chave destacados com diferentes cores mostrando a diferença de 5 Da respectivos aos 5 deutérios.

Neste caso específico nos foi possível utilizar um modelo ideal para o desenvolvimento de um banco de dados para os produtos de oxidação do DHA porque contamos com espectros de massa exata e paralelamente é possível comparar as espécies não deuteradas às deuteradas (Figura 21). Contudo, na ausência dos produtos deuterados a riqueza do espectro dos íons produto obtidos no TripleToF já é suficiente para a identificação dos analitos de interesse.

Através estudo de fragmentação dos HDoHE foi possível observar a importância da exatidão de massas para identificar qual íon está presente no espectro de um dado analito. Este fato pode ser observado na fragmentação teórica do 13-HDoHE.

Os fragmentos  $\alpha_{cc}$  ( $C_{12}H_{17}O_2$ ; 193,123403 Da) e  $\beta_{mc}-CO_2$  ( $C_{13}H_{21}O$ ; 193,159789 Da) de 13-HDoHE possuem massa 193. Um QqQ não seria capaz de diferenciar tais íons, já um QToF sim. Assim foi possível observar que o íon presente no espectro do isômero 13-HDoHE se trata realmente do fragmento  $\alpha_{cc}$  (Figura 22).

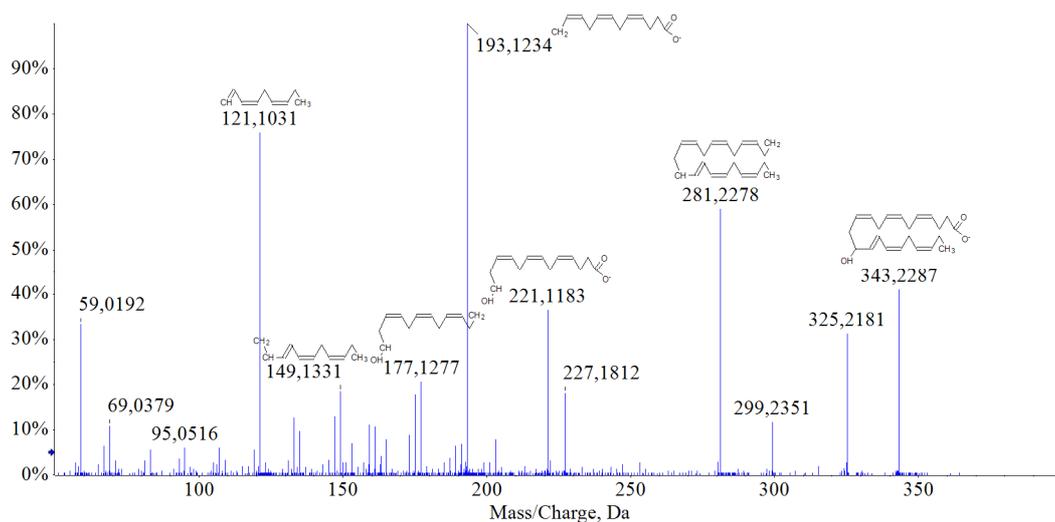


Figura 22: Espectro de fragmentação por QToF do isômero 13-HDoHE.

O software PeakView possui uma ferramenta de extrema importância para a distinção de isômeros. Através desta é possível sobrepor os espectros dos isômeros que desejamos distinguir e escolher os melhores íons para o monitoramento.

Por este estudo observamos que o íon com  $m/z$  161,1335 não é adequado para o monitoramento dos isômeros 14- e 10-HDoHE porque ele é um íon comum para os isômeros em questão, e por não haver separação cromatográfica para distingui-los. O monitoramento do íon 161 resulta, na verdade, do somatório dos isômeros 14- e 10-HDoHE. Para o monitoramento do 14-HDoHE é mais adequado selecionar os íons com  $m/z$  205,1232 ( $\alpha_{cc}$ ) e o 234,1264 ( $\alpha_{mc}$ ). Já para o monitoramento do isômero 10-HDoHE o íon 153,0937 ( $\alpha_{cc}$ ) foi o escolhido (Figura 23).

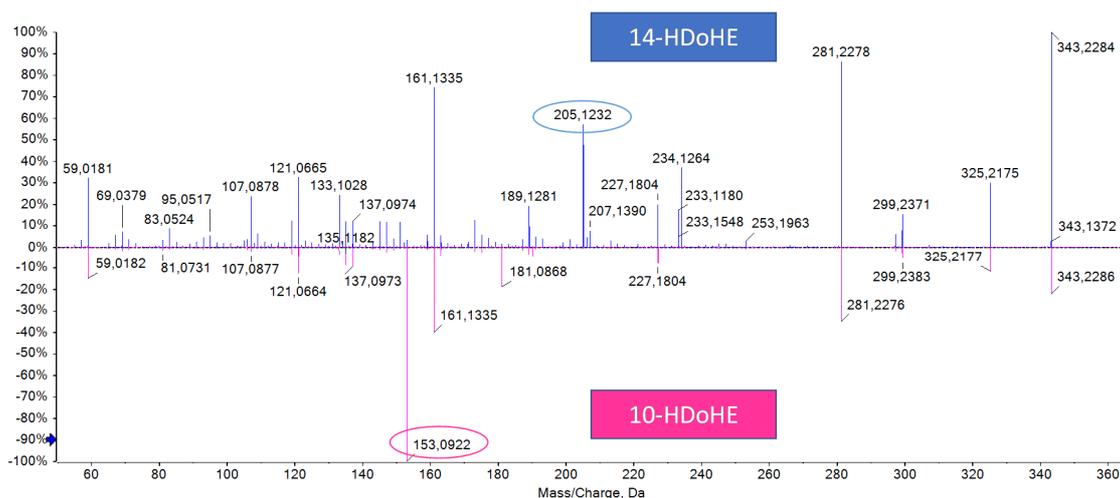


Figura 23: Diferenciação de dois isômeros que coeluem na condição cromatográfica utilizada. Estes além de coeluirem apresentam uma série de fragmentos em comum. Cada um dos isômeros foi injetado isoladamente e seus espectros foram avaliados no intuito de escolher um íon específico que permita a diferenciação entre eles. Pelo uso do PeakView foi possível escolher os 153,0922 e 205,1232 para o 10- e o 14-HDoHE, respectivamente.

Foram selecionadas ainda as transições com  $m/z$  de: 375,2→141,061, 375,2→175,081 (resolvinas d1 e d2); 359,2→153,093 (protectina d1); 327,2→116,114 e 327,2→184,139 (5(S)- e 12(S)-HETE-d8), para os íons produto das transições foi deixada uma janela de aquisição de  $\pm 0,005$  Da.

Nas condições de análise utilizadas as HSRM selecionadas para os HpETE e HETE se mantiveram compatíveis com o primeiro estudo desenvolvido no 4000Qtrap. Com pequenas exceções como: 335,2 → 149,102 (11-HpETE); 335,2 → 153,129 (12-HpETE); 335,2 → 129,056 (5-HpETE); 335,2 → 83,050 (6-HpETE) e 335,2 → 150,141 (9-HETE), para os íons produto das transições foi deixada uma janela de aquisição de  $\pm 0,005$  Da. A escolha de outras transições de massa teve como objetivo aumentar a sensibilidade e seletividade dos analitos em questão.

Cabe ressaltar que no monitoramento convencional utilizando um equipamento como o QqQ ou QTrap, a pré-seleção dos íons de interesse dita o sucesso do monitoramento/quantificação dos compostos de interesse. Além disso, o desempenho da análise é determinado fortemente pelo número de transições monitoradas. Fato este que justificou o monitoramento de apenas: 24 transições por análise como descrito no item

3.2.3.1 - que descreve a análise em um QqQAnálise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro de massas triplo-quadrupolo; e, 89 transições análise como descrito no 3.2.3.2 - que descreve a análise dos compostos em um Qtrap.

Neste sentido, é possível afirmar que, além da aquisição por massa exata, a grande vantagem do monitoramento por HSRM utilizando os QTOF é a seleção das transições de monitoramento ser realizada após a aquisição do dado. Como resultado o número de transições que podem ser monitoradas é infinito.

O desenvolvimento da análise dos produtos de oxidação de ácidos graxos é de suma importância para a investigação do papel fisiopatológico de tais compostos. De acordo com [Serhan \*et al.\* \(2008\)](#), apesar de serem facilmente ionizáveis os produtos de oxidação dos ácidos graxos, e porque não falar dos próprios ácidos graxos, a sua análise é uma tarefa no mínimo desafiadora. Fato este que se deve: ao grande número de isômeros e de compostos que são isobáricos; a diferentes compostos que apresentam espectros de fragmentação muito semelhantes; e à polaridade dos compostos muito semelhantes que acabam resultando em coeluição dos compostos de interesse.

Os três métodos de análise descritos (QqQ, QTrap, QTOF) constituem-se uma importante base de dados para o desenvolvimento de uma biblioteca de identificação e quantificação dos ácidos graxos DHA, LA e AA e seus respectivos produtos primários de oxidação. Apesar de todo o desafio, a análise de mais de 50 compostos com características tão análogas se tornou possível.

Muitos destes compostos estão descritos na literatura como sendo mediadores lipídicos pró e anti-inflamatório. A sua correta identificação e quantificação é uma importante ferramenta para o estudo do papel fisiopatológico destes compostos. Este é o principal motivo que faz a presente descrição da fragmentação e a construção de um método de detecção e quantificação ser de suma importância.

Baseados neste princípio, e de posse do método padronizado (ítem 3.2.3.2 - e 3.2.3.2.1 - ) resolvemos investigar o papel dos produtos de oxidação do ácidos graxos descritos na esclerose lateral amiotrófica. Para isso, utilizamos o modelo de ratos da raça Sprague Dawley transgênicos portadores de oito cópias do gene humano da proteína cobre-zinco-superoxido dismutase (SOD1) contendo a mutação G93A (SOD1<sup>G93A</sup>).

#### 4.2 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS LINOLEICO, ARAQUIDÔNICO E DOCOSAHEXAENOICO NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

Doenças neurodegenerativas são um grupo de enfermidades crônicas caracterizadas pela perda progressiva de neurônios que resultam no prejuízo de determinadas funções cerebrais, tais como memória, cognição e movimento. Fazem parte deste grupo as doenças como: esclerose lateral amiotrófica, Parkinson e Alzheimer ([Gao e Hong, 2008](#)). No caso específico da ELA, os neurônios acometidos são os neurônios motores superiores e inferiores ([Rowland e Shneider, 2001](#); [Dupuis et al., 2011](#); [Kiernan et al., 2011](#)). Os neurônios motores superiores originam-se no córtex motor cerebral e se projetam até a medula espinhal. Os neurônios inferiores conectam o tronco cerebral ou a medula espinhal aos músculos ([Turner et al., 2009](#); [Kiernan et al., 2011](#)).

Atualmente alguns autores têm descrito a ELA como uma síndrome e não uma doença ([Traub et al., 2011](#)). "Amiotrofia" refere-se à atrofia muscular (Figura 24), fraqueza e fasciculação, significa que é a doença dos neurônios motores inferiores. "Esclerose lateral" refere-se à dureza de colunas laterais da medula espinhal na palpação em amostras de autópsia, onde gliose segue a degeneração das vias corticoespinhais. A doença é progressiva, a duração média de sobrevivência é de três a cinco anos ([Jira et al., 1998](#); [Rowland e Shneider, 2001](#); [Thonhoff et al., 2007](#)).

De acordo com a portaria SAS/MS nº 496 de 23 de dezembro de 2009, os principais sinais e sintomas de ELA podem ser reunidos em dois grupos:

- sinais e sintomas resultantes diretos da degeneração motoneuronal – fraqueza e atrofia, fasciculações<sup>1</sup> e câibras musculares, espasticidade, disartria<sup>2</sup>, disfagia<sup>3</sup>, dispneia<sup>4</sup> e labilidade emocional;
- sinais e sintomas resultantes indiretos dos sintomas primários – distúrbios psicológicos, distúrbios de sono, constipação, sialorreia<sup>5</sup>, espessamento de secreções mucosas, sintomas de hipoventilação crônica e dor.

A maior parte dos casos de ELA não tem uma causa conhecida e, portanto, são descritos como esporádicos, contudo 10% dos casos estão relacionados a causas genéticas e, por isso, são descritos como familiares ([Barber e Shaw, 2010](#)).

[Rosen et al. \(1993\)](#) associaram pela primeira vez a SOD1 à ELA. Hoje em dia sabe-se que de 20 a 25 % de todos os casos familiares da ELA estão associados a diversas mutações de tal proteína. De acordo com [Thonhoff et al. \(2007\)](#), devido às semelhanças clínicas e patológicas entre a ELA na forma familiar ou esporádica em humanos, a nossa compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da doença vem sendo construída graças a diversos estudos utilizando como modelos animais roedores transgênicos hemizigotos que superexpressam genes humanos mutados Cu/Zn-SOD1 (ver Figura 24).

A ELA é uma doença, como citado anteriormente, fatal que pouco ainda se sabe de concreto sobre as causas da degeneração dos neurônios motores. Existem algumas hipóteses tais como transporte axonal deficiente, agregação proteica, estresse oxidativo, apoptose, disfunção mitocondrial e ativação da micróglia ([Ferrante et al., 1997](#); [Turner et](#)

---

<sup>1</sup> Fasciculações: contrações musculares pequenas.

<sup>2</sup> Disartria: dificuldade na pronúncia e articulação das palavras.

<sup>3</sup> Disfagia: dificuldade na deglutição.

<sup>4</sup> Dispneia: dificuldade em respirar.

<sup>5</sup> Sialorreia: salivação abundante.

[al., 2009](#)). Assim, a doença ELA pela sua complexidade e gravidade requer esforços de toda a comunidade científica no intuito de buscar um melhor entendimento sobre a doença. Neste sentido, levando em consideração que o cérebro é um órgão extremamente rico em lipídeos, o estudo dos produtos de oxidação dos ácidos graxos no modelo utilizado se fez necessário.

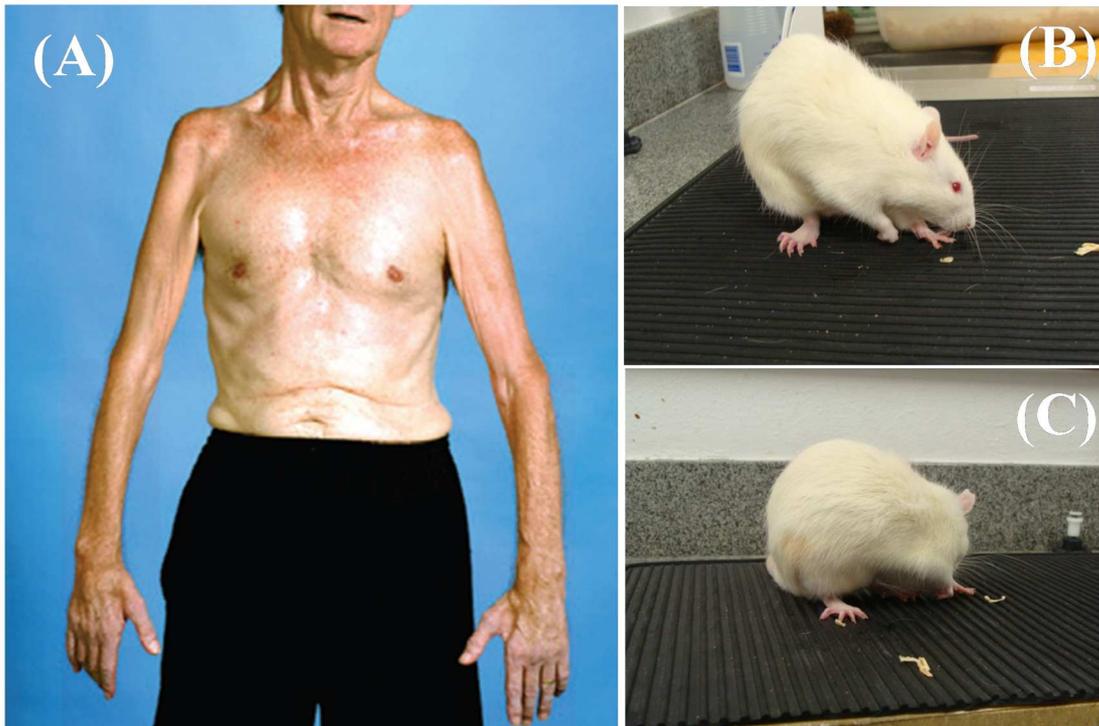


Figura 24: Em (A) é possível ver a atrofia muscular dos membros superiores de um paciente portador de esclerose lateral amiotrófica (fonte: [Kiernan et al. \(2011\)](#)). A utilização desta figura na presente tese foi autorizada pelo autor Matthew Kiernan, da Universidade de Sydney). Em (B) e (C) é possível visualizar a atrofia do braço direito e paralisia da mão direita de um animal sintomático.

#### 4.2.1 - Grupo de animais utilizados

As linhagens dos animais transgênicos portadores da SOD1 mutada (SOD1<sup>G93A</sup>) são mantidas no biotério do Instituto de Química da USP cruzando os machos transgênicos com fêmeas Sprague Dawley normais. A cada nova ninhada os filhotes precisam ser genotipados para definir quais são os animais ELA (portadores do gene da

SOD1 mutada) e quais são os animais controles. Dez filhotes ELA são selecionados como os reprodutores para a manutenção da colônia e os demais são utilizados no experimento.

Os 59 animais utilizados no experimento foram separados em dois grandes grupos de acordo com o resultado da genotipagem: grupo ELA (portador da SOD1<sup>G93A</sup>) e grupo Controle (irmãos do grupo ELA que não possuem o gene). Cada grupo foi subdividido em 3 grupos de acordo com a idade (60, 90 e 120 dias) (Tabela 19).

#### 4.2.2 - Avaliação dos animais

A degeneração dos neurônios motores no córtex motor leva a sinais clínicos aparentes de anormalidades do neurônio motor superior: com reflexos hiperativos, sinais de Hoffmann, sinais de Babinski e clônus (uma série de contrações musculares involuntárias); já a degeneração dos neurônios motores no tronco cerebral e na medula espinhal causa atrofia muscular, fraqueza e fasciculação ([Rowland e Shneider, 2001](#)).

Para a avaliação do quadro clínico e o desenvolvimento dos sintomas, diversos parâmetros estão descritos na literatura ([Thonhoff et al., 2007](#); [Colas et al., 2010](#)). Entre eles, a medida do peso corporal ao longo do tempo se mostrou como uma excelente ferramenta de trabalho, por ser um parâmetro objetivo e quantitativo. Matsumoto e colaboradores, 2006, realizaram um longo trabalho de avaliação da progressão da doença no mesmo modelo de ratos transgênicos. Segundo os autores, os animais apresentam o pico de peso máximo, momento definido por eles como pré-sintomático, seguido de uma perda acentuada de peso (período sintomático) ([Matsumoto et al., 2006](#)). Ainda sobre o peso corporal, [Paganoni et al. \(2011\)](#) mostraram uma correlação direta entre o índice de massa corporal e a probabilidade de sobrevida em pacientes, o que evidencia a importância deste parâmetro para o acompanhamento dos animais.

Tabela 19: lista animais nascidos entre 26 de março de 2011 e 11 de maio de 2011 (GRUPO 1) num total de 59 animais divididos em 2 grupos (ELA e Controle) e 3 subgrupos de acordo com a idade (60, 90 e 120 dias)

Grupo	Sub-grupo	Animal	Pai	Nascimento	Grupo	Sub-grupo	Animal	Pai	Nascimento
Controle	60	728	3223	26/03/2011	Controle	90	14B	714	11/05/2011
Controle	60	733	3223	26/03/2011	ELA	90	782	3230	21/04/2011
Controle	60	734	3223	26/03/2011	ELA	90	783	3230	21/04/2011
Controle	60	735	3235	27/03/2011	ELA	90	785	3230	21/04/2011
Controle	60	763	3236	03/04/2011	ELA	90	786	3230	21/04/2011
Controle	60	764	3236	03/04/2011	ELA	90	788	3230	21/04/2011
Controle	60	772	3224	12/04/2011	ELA	90	7B	714	08/05/2011
Controle	60	773	3224	12/04/2011	ELA	90	10B	714	11/05/2011
Controle	60	774	3224	12/04/2011	ELA	90	12B	714	11/05/2011
Controle	60	775	3224	12/04/2011	ELA	90	13B	714	11/05/2011
Controle	60	777	3224	12/04/2011	Controle	120	719	3232	29/03/2011
ELA	60	761	3236	03/04/2011	Controle	120	724	3233	27/03/2011
ELA	60	762	3236	03/04/2011	Controle	120	727	3223	26/03/2011
ELA	60	765	3236	03/04/2011	Controle	120	730	3223	26/03/2011
ELA	60	766	3236	03/04/2011	Controle	120	732	3223	26/03/2011
ELA	60	767	3236	03/04/2011	Controle	120	738	3235	27/03/2011
ELA	60	768	3236	03/04/2011	Controle	120	740	3235	27/03/2011
ELA	60	769	3236	03/04/2011	Controle	120	742	3235	27/03/2011
ELA	60	770	3224	12/04/2011	Controle	120	743	3235	27/03/2011
ELA	60	771	3224	12/04/2011	ELA	120	720	3232	29/03/2011
ELA	60	776	3224	12/04/2011	ELA	120	721	3232	29/03/2011
ELA	60	779	3224	12/04/2011	ELA	120	722	3232	29/03/2011
Controle	90	780	3230	21/04/2011	ELA	120	729	3223	26/03/2011
Controle	90	781	3230	21/04/2011	ELA	120	731	3223	26/03/2011
Controle	90	784	3230	21/04/2011	ELA	120	736	3235	27/03/2011
Controle	90	787	3230	21/04/2011	ELA	120	737	3235	27/03/2011
Controle	90	4B	714	08/05/2011	ELA	120	739	3235	27/03/2011
Controle	90	5B	714	08/05/2011	ELA	120	741	3235	27/03/2011
Controle	90	6B	714	08/05/2011					
Controle	90	8B	714	11/05/2011					
Controle	90	11B	714	11/05/2011					

Baseados nos trabalhos de [Matsumoto et al. \(2006\)](#) e [Thonhoff et al. \(2007\)](#) os animais foram pesados e tiveram seus movimentos avaliados duas vezes por semana a partir dos  $\approx 35$  dias de vida.

O método de avaliação da capacidade motora dos animais apresenta uma pontuação de 5 a 0, sendo 5- peso normal e movimentos normais e 0 perda acentuada de peso, perda do movimento dos membros superiores e inferiores e ausência do reflexo de endireitamento. Segundo os autores, o ponto 4 (perda de peso, comprometimento de algum membro inferior, o animal começa a mancar ou arrastar a pata, mas consegue

permanecer sobre os membros inferiores) é o momento do início dos sintomas. É certo que, no geral, os parâmetros avaliados focam principalmente no tipo de sintomas resultantes da degeneração dos neurônios motores no tronco cerebral e na medula espinhal, contudo o comprometimento dos neurônios motores superiores do córtex motor não pode ser desprezado. Por esta razão, o estudo dos produtos de interesse no córtex motor é tão importante.

Os animais sintomáticos foram pesados e avaliados duas vezes por semana até começarem a perder peso. Após o início da perda de peso os animais foram monitorados diariamente. Os animais ELA foram eutanasiados quando apresentaram uma perda de  $\approx$  20% do peso máximo e comprometimento do movimento dos membros superiores ou inferiores. Para cada animal ELA foi selecionado um animal controle correspondente que foi sacrificado no mesmo momento.

O animal controle correspondente foi escolhido de acordo com os seguintes princípios: não ser portador da SOD mutada; ser irmão do animal ELA correspondente ou ter a mesma idade. Os pares de animais ELA vs controle foram selecionados desde o início do acompanhamento dos animais.

Durante o período de avaliação, os animais de 60 e 90 dias apresentaram um ganho de peso constante e não apresentaram nenhuma anormalidade dos movimentos (Figura 25 – A e B).

Já os animais ELA selecionados para o grupo de 120 dias, foram na verdade eutanasiados quando apresentaram perda de peso corporal igual a 20% do peso máximo acompanhada de atrofia/paralisia (Figura 26). A maioria dos animais sintomáticos apresentou atrofia/paralisia dos membros traseiros.

O estudo do espaço de tempo entre a idade com a qual foi atingido o peso máximo, na qual se iniciaram os sintomas e na data da eutanásia fornece indícios da

severidade da doença. No geral, em cerca de  $21 \pm 6$  dias após terem atingido o pico máximo de peso corporal, os animais atingiram o estágio descrito como *end point* do experimento.

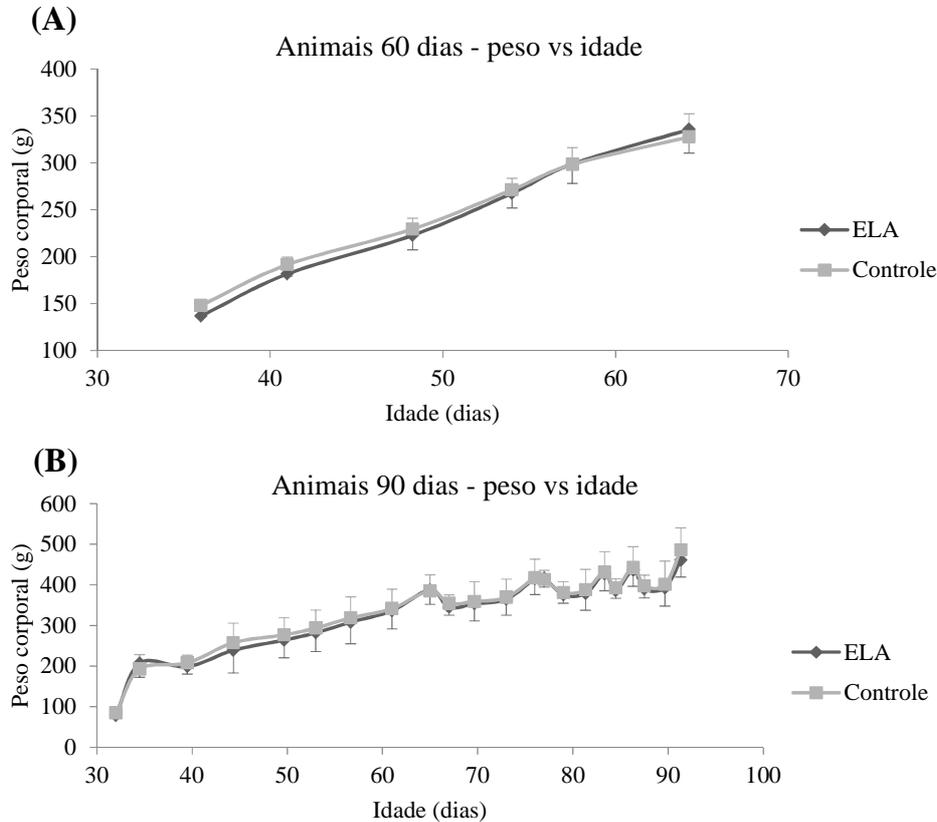


Figura 25: Análise do peso corporal dos animais ELA e respectivos controles do grupo de animais pressintomáticos com 60(A) e 90(B) dias de vida

De acordo com [Matsumoto et al. \(2006\)](#), o peso corporal máximo foi observado em torno de 108 dias, período em que se inicia a perda neuronal motora nos animais ([Howland et al., 2002](#)). Os animais avaliados no presente trabalho apresentaram peso máximo com cerca de  $117 \pm 9$  dias (Figura 26).

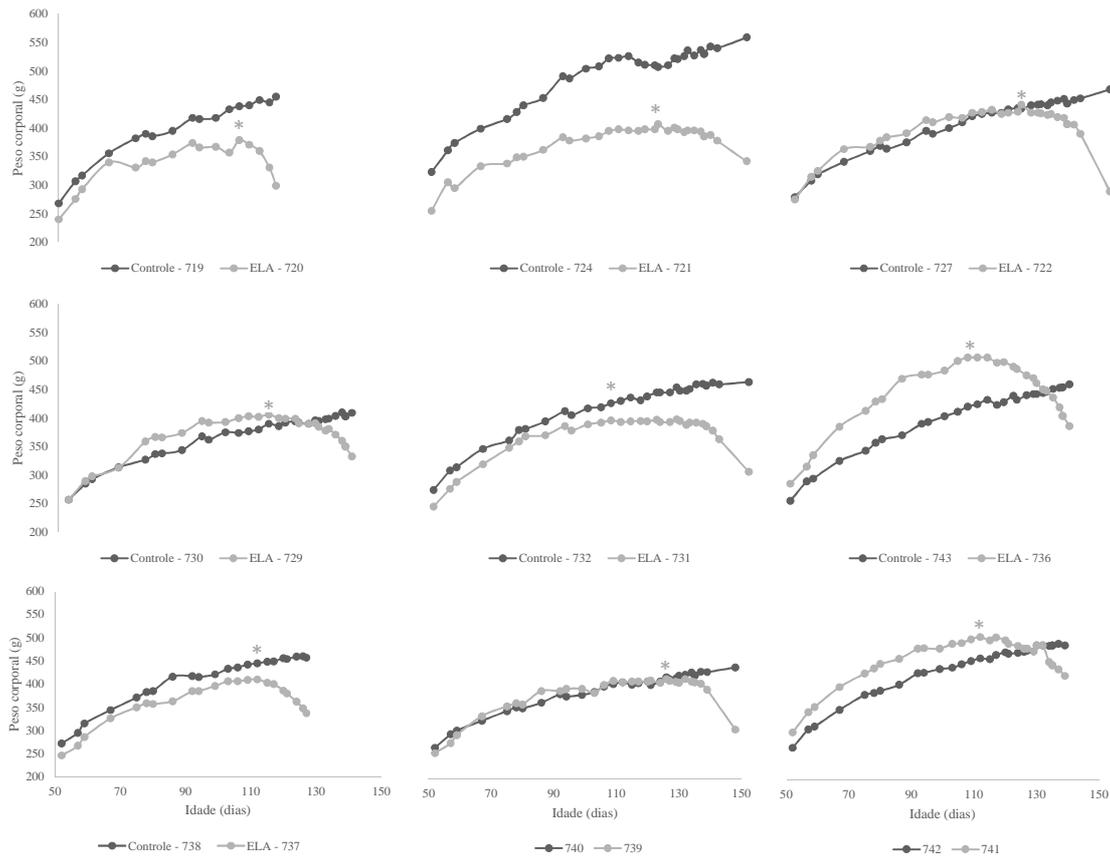


Figura 26: Análise do peso corporal dos animais ELA sintomáticos e respectivos controles. \* idade em que os sintomáticos apresentaram o peso máximo.

#### 4.2.3 - Análise dos produtos de oxidação dos ácidos graxos araquidônico, docosahexaenoico e linoleico

A perda de neurônios motores do corno ventral da medula espinal, de seus análogos do tronco cerebral e as células de Betz<sup>6</sup> do córtex motor representam as características patológicas principais da esclerose lateral amiotrófica (Festoff, 2001). Por este motivo, foram isolados os córtex motores dos animais para a análise dos produtos de oxidação lipídicos de interesse do presente trabalho.

<sup>6</sup> Células de Betz - neurônios piramidais de grande diâmetro, descritos pela primeira vez por Vladimir Alekseyevich Betz em 1874;

Os homogenatos de córtex motor foram extraídos de acordo com o 3.2.5.1.2 - Método 2 e analisados de acordo com o item 3.2.3.2 - Análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro de massas triplo quadrupolo – armadilha de íons (Qtrap – do inglês triple-quadrupole – ion trap)

A Figura 27 representa o resultado obtido para tais homogenatos. Durante os 25 minutos de aquisição todos os analitos que eluíram pela coluna foram monitorados primeiramente pelo DAD e posteriormente no espectrometro de massas através do monitoramento por SRM.

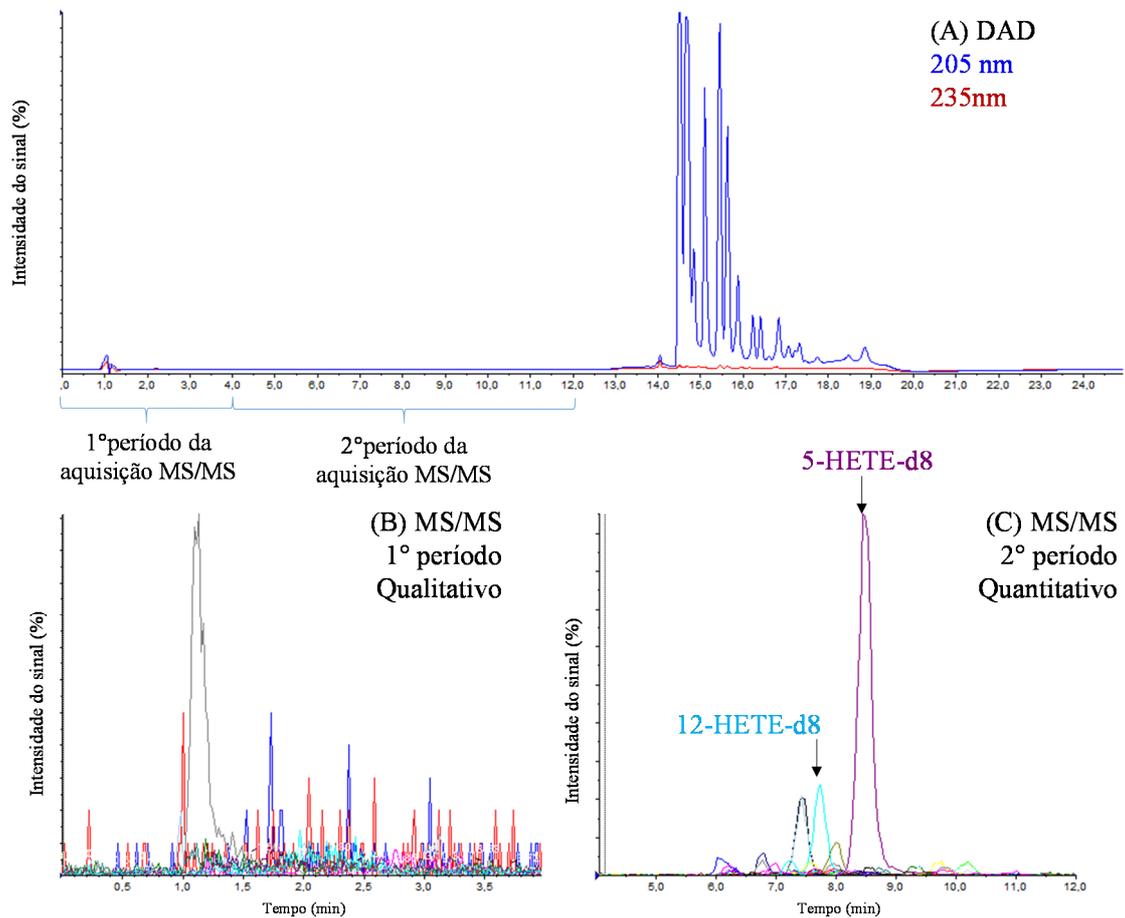


Figura 27: Cromatograma representativo da análise por LC- ESI/MS/MS das amostras de homogenato de cérebro utilizando o método 2 de extração e as condições de análise descritas no item 3.2.3.2 - . (A) cromatograma obtido pela análise de LC-DAD selecionando os comprimentos de onda 205nm e 235nm; (B) de 0 a 4 minutos os analitos com menor afinidade pela coluna como resolvinas, neuroprostano foram analisados qualitativamente através do monitoramento por SRM; (C) a partir dos 4 minutos, os analitos cujo método de quantificação está descrito no item 3.2.3.2.1 - foram monitorados e quantificados. Em destaque, estão descritos no cromatograma os dois padrões deuterados utilizados no presente estudo.

Pelo número reduzido de amostras para cada grupo foi selecionado o método estatístico de Kruskal-Wallis chi-squared que compara a mediana dos dados, considerando nível de significância de 10%.

A detecção e quantificação foram possíveis para todos os isômeros com a exceção dos produtos especificamente formados pela oxidação mediada pelo  $^1\text{O}_2$  do DHA e do AA (Figura 28, Figura 29 e Figura 30). O 10-HODE, produto da oxidação por  $^1\text{O}_2$  do LA seguida de redução, foi detectado e quantificado (Figura 30).

O método utilizado permitiu não só a detecção dos hidróxidos como descrito anteriormente (vide item 3.2.3.1.2 - ), mas também dos respectivos hidroperóxidos. Desta forma foram detectados e quantificados 30 isômeros.

Altos níveis dos produtos de oxidação da 12-LOX (12-HETE, 14-HDoHE e 11-HDoHE) foram observados, corroborando com a alta expressão desta enzima no cérebro ([Hambrecht et al., 1987](#); [Bendani et al., 1995](#)).

Não foi observada qualquer diferença significativa para a dosagem os diferentes isômeros dos HpDoHE. Foi possível observar uma maior variação dos dados observados para os animais controle em relação aos respectivos ELA. Fato este que pode estar associado, por exemplo para o grupo controle 120 dias, à heterogeneidade da idade no dia da eutanásia.

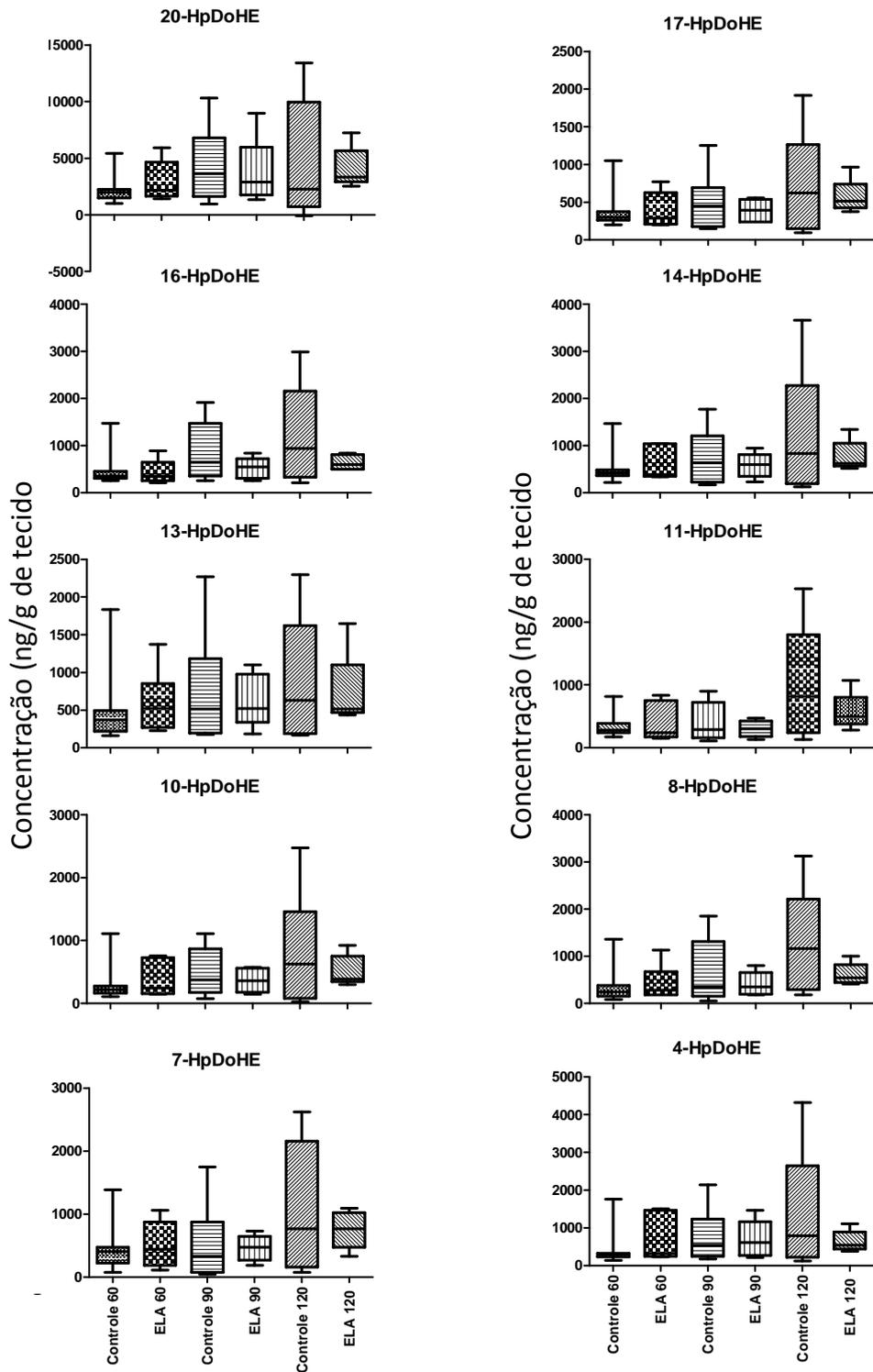


Figura 28: Dosagem dos HpDoHE nos homogenatos de córtex motor nos animais ELA e respectivos controles, com 60, 90 e 120 dias de vida (box-plot). Grupos de animais: Controle 60 (n= 10); ELA 60 (n=9); Controle 90 (n=8), ELA 90 (n=7), Controle 120 (n=7) e ELA 120 (n=5).

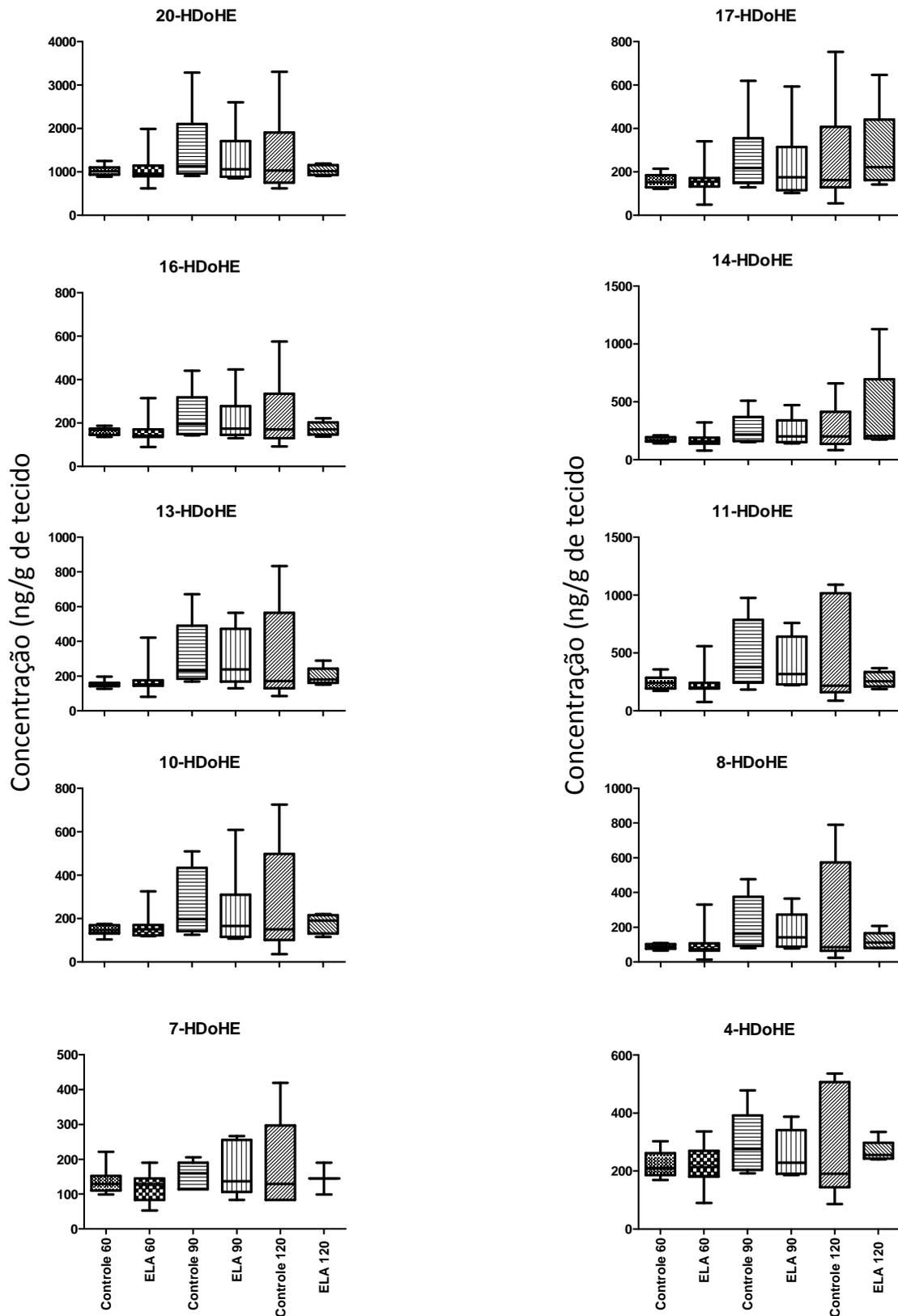


Figura 29: Dosagem dos HDoHE nos homogenatos de córtex motor nos animais ELA e respectivos controles, com 60, 90 e 120 dias de vida (box-plot). Grupos de animais: Controle 60 (n= 10); ELA 60 (n=9); Controle 90 (n=8), ELA 90 (n=7), Controle 120 (n=7) e ELA 120 (n=5).

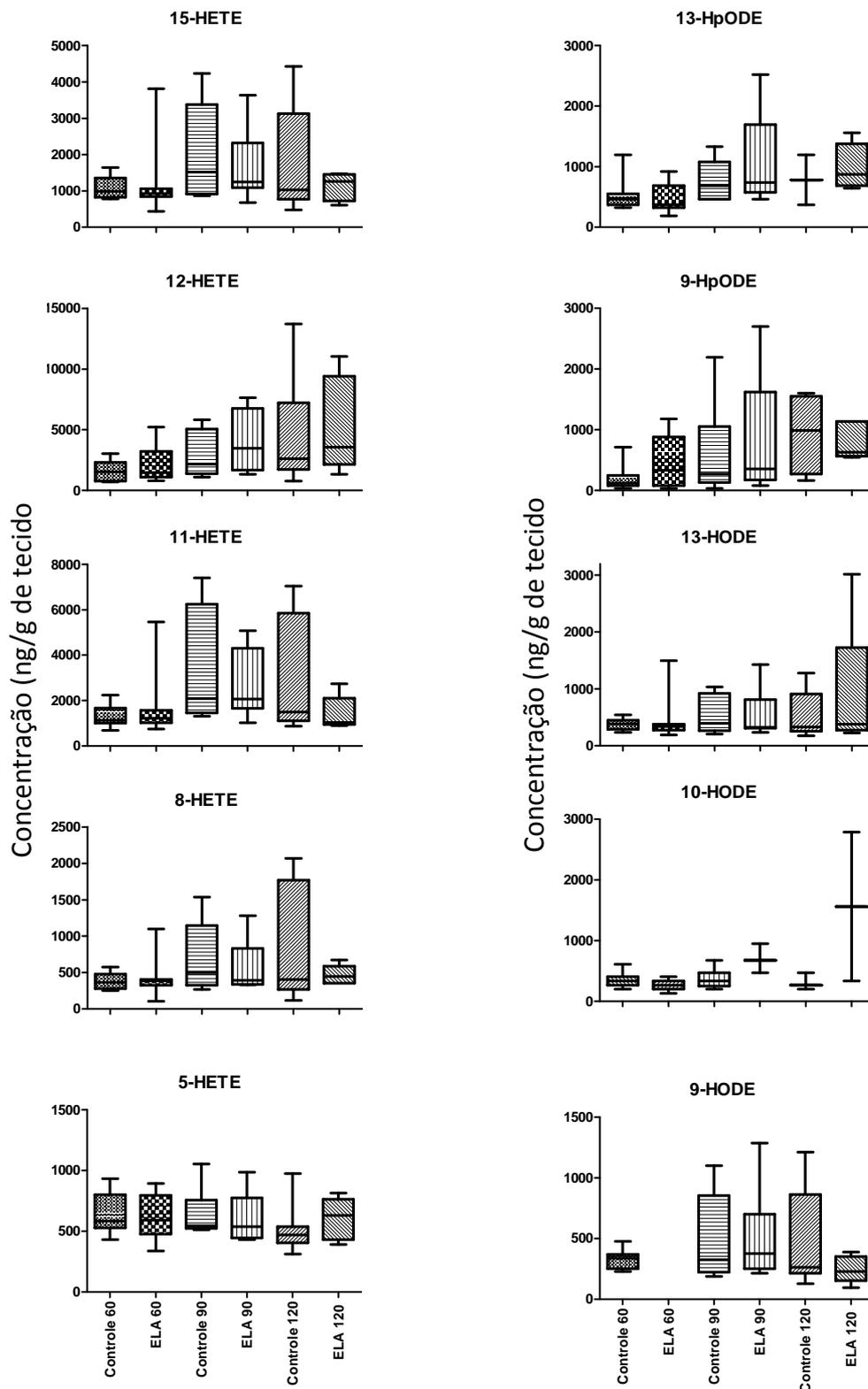


Figura 30: Dosagem dos produtos de AA e LA nos homogenatos de córtex motor nos animais ELA e respectivos controles, com 60, 90 e 120 dias de vida (box-plot). Grupos de animais: Controle 60 (n= 10); ELA 60 (n=9); Controle 90 (n=8), ELA 90 (n=7), Controle 120 (n=7) e ELA 120 (n=5).

Entre todos os hidróxidos analisados foi possível observar diferença nos níveis do 13-HDoHE entre os controles com 60 e 90 dias, e entre ELA 60 dias e o controle com 90 dias (Figura 31). Tais diferenças estão associadas ao incremento da idade e não necessariamente à doença visto que, entre os pares ELA vs controle com a mesma idade, não foi possível observar qualquer diferença estatística.

O 13-HDoHE é descrito apenas como produto de oxidação não-enzimática do DHA (Figura 4). O aumento observado vai de acordo com a teoria dos radicais livres associada ao envelhecimento descrita por [Harman \(1956\)](#), que considera o envelhecimento como um processo progressivo e inevitável que se está amplamente ligado ao acúmulo de produtos de oxidação de biomoléculas ([Mariani et al., 2005](#); [Farooqui e Farooqui, 2009](#)).

Associando a doença com a progressão da idade foram observados incrementos nos níveis de 13-HpODE e 9-HpODE dos animais ELA 60 dias e ELA 120 dias (Figura 31). Este aumento pode ser justificado por: aumento de reações de lipoperoxidação associadas ao envelhecimento; e, possivelmente também, ao aumento da expressão e atividade de enzimas envolvidas em processos inflamatórios.

[Almer et al. \(2001\)](#), descrevem claramente que eventos associados a processos inflamatórios estão associados à progressão da degeneração dos neurônios motores na ELA. Eles demonstraram uma ativação da COX-2 tanto em camundongos quanto em humanos portadores da ELA. Baseados nos achados do seu trabalho eles chegaram a sugerir a inibição da COX-2 como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da ELA.

O processo inflamatório associado às doenças neurodegenerativas é complexo, como descreve ([Philips e Robberecht, 2011](#)). Tais autores descrevem ainda que é

importante identificar os processos que geram a neuroinflamação associada à ELA, para definir a respectiva importância clínica e identificar alvos terapêuticos.

O 12-HETE produto da oxidação mediada pela 12-LOX, enzima prevalente no cérebro, mostrou-se aumentado nos animais ELA com 120 dias em relação aos animais controle com 60 dias (Figura 31). (Li *et al.*, 1997), descreveram uma relação da 12-LOX e a toxicidade neuronal mediada pelo glutamato. Esta toxicidade tem sido descrita como o fator de maior relevância na morte celular do sistema nervoso (Khanna *et al.*, 2003).

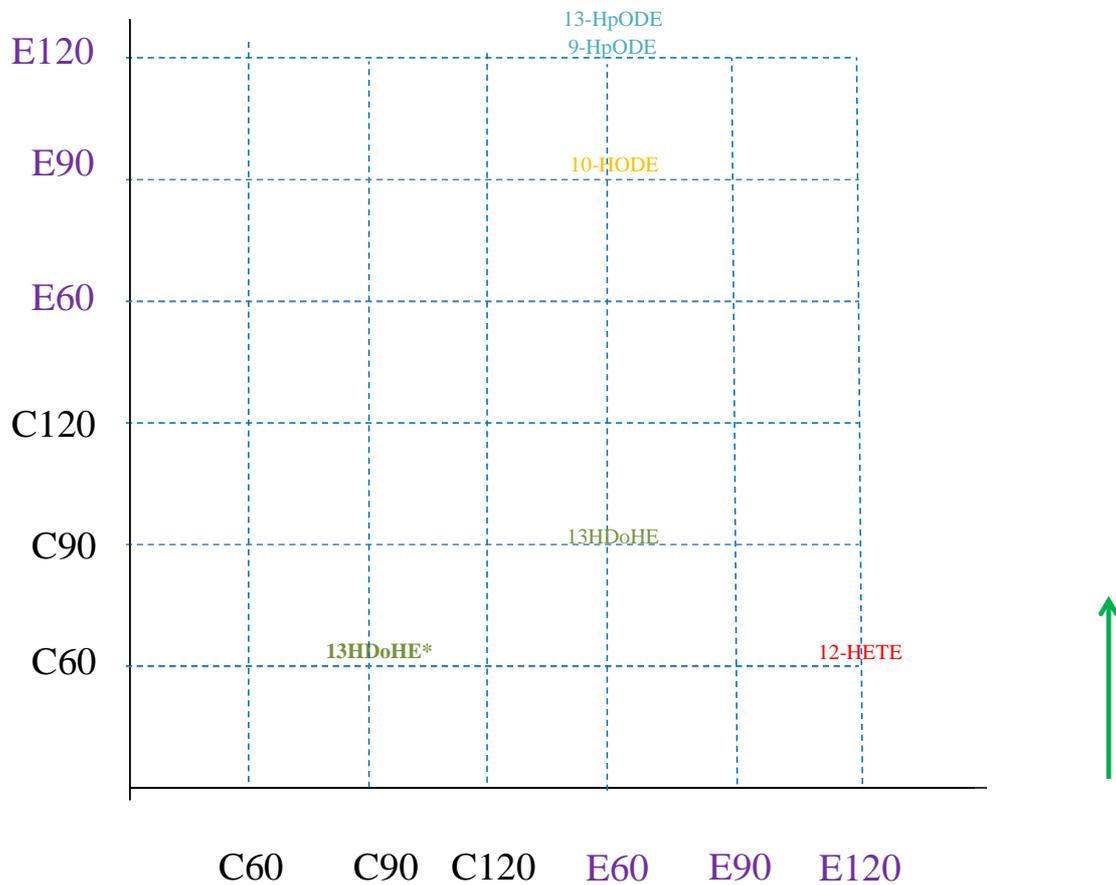


Figura 31: Representação gráfica da análise estatística realizada para os dados de dosagem dos níveis dos produtos de oxidação dos ácidos graxos nos homogenatos de córtex cerebral dos animais Controle (C) e ELA (E), com 60, 90 e 120 dias de vida. Os analitos cujos níveis diferenciaram 10% estão representados no ponto de intersecção entre os grupos avaliados. A leitura é realizada de baixo para cima conforme seta verde representada. (\*) diferença estatística de 5%.

[Howland et al. \(2002\)](#) descreveram um aumento extracelular de glutamato em ratos Sprague-dawley SOD1<sup>G93A</sup>. Este aumento associado a uma elevação da atividade da 12-LOX sugerida pelo incremento do nível do 12-HETE nos animais estudados podem explicar a diferença encontrada nos animais ELA 120 vs controle 60.

Eram ainda esperados, aumento dos níveis dos produtos de oxidação da 5-LOX ([West et al., 2004](#)) e da 15-LOX ([Pratico et al., 2004](#)), contudo provavelmente devido ao reduzido número de animais utilizado não foi possível determinar tal diferença.

Por fim, foram ainda determinados por GC-FID os níveis dos diferentes ácidos graxos nos mesmos homogenatos utilizados para o monitoramento dos produtos de oxidação. Foram quantificados os ácidos graxos saturados: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido lignocérico (C24:0). Os ácidos graxos insaturados quantificados foram: ácido oleico (C18:1n9); ácido vacênico (C18:1n7); LA (C18:2n6); ácido 11-eicosenóico (C20:1n9); AA (C20:4n6); DHA (C22:6n3); e, ácido nervônico (C24:1). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos avaliados.

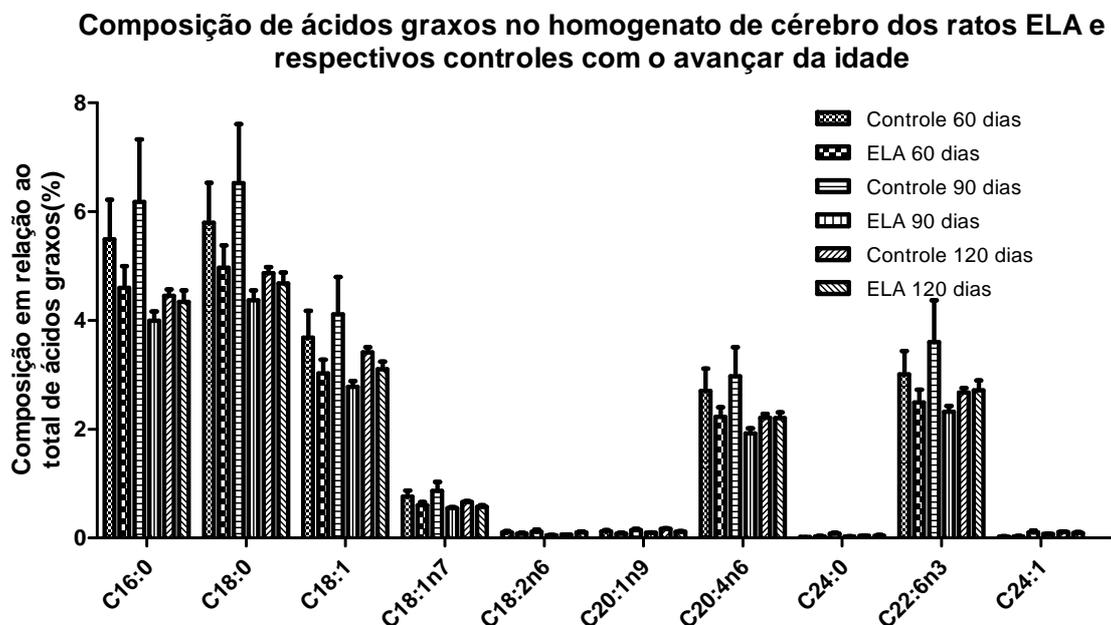


Figura 32: Perfil dos ácidos graxos dos homogenatos de cérebro, nomeadamente do córtex motor, dos animais ELA e respectivos controles com o avançar da idade obtido através da análise por cromatografia gasosa. Ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) ácido oleico (C18:1n9); ácido vacênico (C18:1n7); LA (C18:2n6); ácido 11-eicosenóico (C20:1n9); AA (C20:4n6); ácido lignocérico (C24:0); DHA (22:6n3); e, ácido nervônico (C24:1).

### 4.3 - ANÁLISE DO METABOLISMO LIPÍDICO

Estudos recentes têm correlacionado o metabolismo anormal de lipídeos à esclerose lateral amiotrófica. Neste sentido, em parceria com a aluna Andressa Bolsoni-Lopes, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, desenvolvemos um estudo inicial sobre o metabolismo lipídico no tecido adiposo branco e o perfil de ácidos graxos plasmático nos animais ELA vs respectivos controles.

Até há alguns anos atrás o tecido adiposo branco era definido como sendo um simples reservatório de energia. Contudo, a definição mais correta é a que descreve o tecido adiposo como um tecido complexo, essencial, altamente ativo metabolicamente e que atua também como um órgão endócrino ([Kershaw e Flier, 2004](#)).

O tecido adiposo branco é composto por matriz de tecido conjuntivo, células do sistema imune, inervações simpáticas e parassimpáticas, células tronco e pré-adipócitos, além de capilares e fibras de colágeno que formam uma rede de suporte ao redor de sua célula principal, o adipócito. Os adipócitos são células grandes, esféricas e especializadas na captação, armazenamento e mobilização de gordura, dessa forma, são totalmente preenchidas com uma única grande gota lipídica de triacilgliceróis que comprime todo o citosol e o núcleo em uma fina camada contra a membrana plasmática ([Nelson e Cox, 2011](#)).

O tecido adiposo tem um papel notável no controle da homeostase energética do organismo. Em períodos de elevada demanda por energia, as lipases dos adipócitos promovem uma hidrólise sequencial dos triacilgliceróis armazenados (lipólise), liberando o glicerol e ácidos graxos livres que podem se deslocar pela corrente sanguínea para o músculo esquelético e o coração. De forma oposta, durante os períodos de elevada

captação de carboidratos o fenômeno conhecido como lipogênese, isto é a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis que são armazenados subsequentemente no tecido adiposo, é favorecido ([Nelson e Cox, 2011](#)).

Na esclerose lateral amiotrófica, o balanço energético encontra-se prejudicado ([Dupuis \*et al.\*, 2011](#)). Contudo, apesar das evidências, pouco se sabe especificamente sobre o metabolismo de lipídeos na doença. Neste sentido, avaliamos alguns parâmetros do metabolismo do triacilglicerol no tecido adiposo branco, incluindo: a taxa de incorporação de glicose marcada radioativamente em triacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (lipogênese) induzida por insulina; a lipólise em resposta ao estímulo com isoproterenol e a composição de ácidos graxos nos tecidos adiposos de animais ELA e respectivos controles, com 70 dias e sintomáticos.

Os animais foram separados em 2 grupos (ELA e Controle) de acordo com o resultado da genotipagem. Estes foram subdivididos em 2 grupos: 70 dias e sintomáticos (Tabela 20).

Para o acompanhamento desta nova ninhada de animais foi desenvolvido um método mais amplo de acompanhamento dos animais. Baseados na escala de avaliação de lesão medular de [Basso \*et al.\* \(1995\)](#), nos trabalhos de [Thonhoff \*et al.\* \(2007\)](#), [Filali \*et al.\* \(2011\)](#), [Seo \*et al.\* \(2011\)](#) e [Mancuso \*et al.\* \(2011\)](#) construímos, em colaboração com o aluno de doutorado Florêncio Porto Freitas, orientado pela professora Marisa Medeiros, uma ficha de avaliação com os seguintes itens: identificação/avaliação do animal (número do animal e marcação da caixa), peso corporal, tempo de suspensão, levantamento do corpo na caixa, inclinação e tempo em plano inclinado, arraste do corpo e da cauda, torção da cauda, extensão corporal e avaliação dos movimentos do quadril, joelho, tornozelo, ombro, cotovelo e punho dos lados direito e esquerdo.

Tabela 20: Animais nascidos entre março e abril de 2013 divididos em 2 subgrupos (ELA e Controle), subdivididos de acordo com a idade no momento da eutanásia (70 dias e sintomáticos)

<b>Pai</b>	<b>Animal</b>	<b>Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>	<b>Nascimento</b>
<b>3300</b>	106	Controle	Sintomático	18/03/2013
	107	Controle	Sintomático	18/03/2013
	109	Controle	Sintomático	18/03/2013
<b>3301</b>	148	ELA	70 dias	31/03/2013
	149	ELA	70 dias	31/03/2013
<b>3302</b>	110	Controle	Sintomático	16/03/2013
	111	Controle	Sintomático	16/03/2013
	112	Controle	Sintomático	16/03/2013
	113	Controle	Sintomático	16/03/2013
	115	ELA	Sintomático	16/03/2013
<b>3303</b>	134	Controle	70 dias	19/03/2013
	135	Controle	70 dias	19/03/2013
	136	Controle	70 dias	19/03/2013
	137	ELA	70 dias	19/03/2013
	138	ELA	70 dias	19/03/2013
	139	ELA	70 dias	19/03/2013
<b>3304</b>	116	ELA	Sintomático	18/03/2013
	117	ELA	Sintomático	18/03/2013
	118	ELA	Sintomático	18/03/2013
	119	ELA	Sintomático	18/03/2013
<b>3305</b>	120	ELA	Sintomático	18/03/2013
	121	ELA	Sintomático	18/03/2013
	122	Controle	Sintomático	18/03/2013
	123	ELA	Sintomático	18/03/2013
	124	Controle	Sintomático	18/03/2013
	125	ELA	Sintomático	18/03/2013
	126	ELA	Sintomático	18/03/2013
<b>3306</b>	150	ELA	70 dias	13/04/2013
	151	Controle	70 dias	13/04/2013
	152	Controle	70 dias	13/04/2013
	153	ELA	70 dias	13/04/2013
	154	Controle	70 dias	13/04/2013
	155	ELA	70 dias	13/04/2013
	156	ELA	70 dias	13/04/2013
	157	Controle	70 dias	13/04/2013
<b>3307</b>	142	Controle	70 dias	21/03/2013
	144	Controle	70 dias	21/03/2013
	145	Controle	Sintomático	21/03/2013
	147	Controle	Sintomático	21/03/2013
<b>3308</b>	127	Controle	Sintomático	16/03/2013
	129	Controle	Sintomático	16/03/2013
	130	Controle	Sintomático	16/03/2013
	131	Controle	Sintomático	16/03/2013

Os animais com 70 dias ganharam peso da mesma forma que os respectivos controles. O perfil do peso corporal para os animais sintomáticos, como seria de se esperar varia após o peso máximo. A Figura 33 demonstra o comportamento típico de um par de animais.

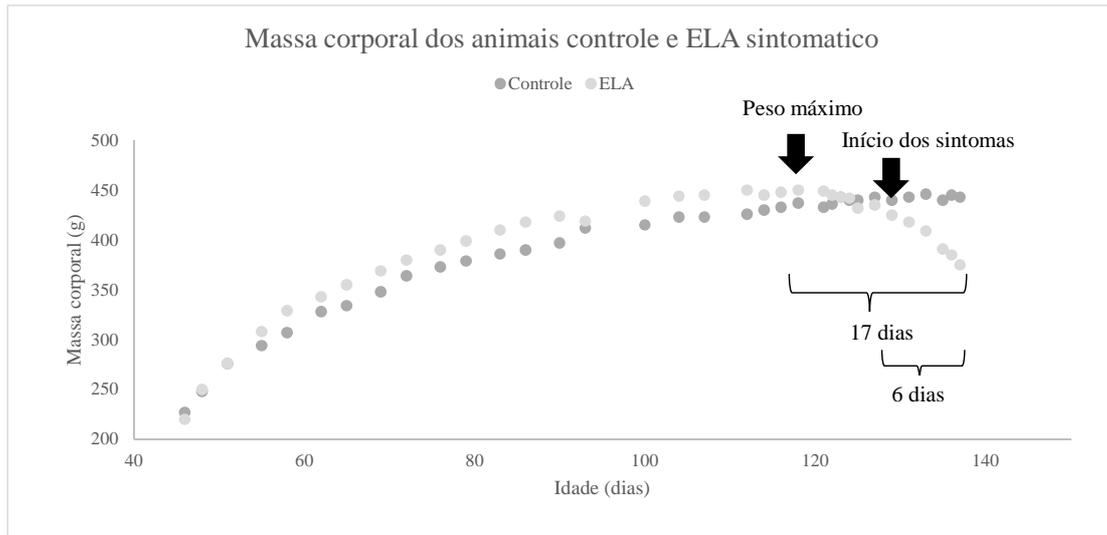


Figura 33: Acompanhamento do peso corporal do animal ELA sintomático e respectivo controle. São destacados os pontos chave deste tipo de monitoramento onde são definidas as idades em que o animal atinge o peso máximo e inicia os sintomas. O último ponto da curva é o “end point” do experimento definido com o momento em que animal perdeu 20% de peso em relação ao peso máximo e apresenta atrofia/paralisia de algum dos membros.

[Thonhoff et al. \(2007\)](#) descrevem  $143,5 \pm 12,9$  dias como a idade em que os animais, da mesma linhagem que foi utilizada no presente trabalho, atingem o peso máximo. Entre 138 e 187 eles observaram alterações motoras, e com 165 a 207 dias os animais atingiram o “end-point”. O estágio final descrito por [Thonhoff et al. \(2007\)](#) muito mais severo que o utilizado no presente trabalho.

Segundo [Howland et al. \(2002\)](#), em torno de 120 dias os animais apresentam fraqueza muscular ou até mesmo paralisia.

[Matsumoto et al. \(2006\)](#), utilizaram outro modelo de ratos também SOD1G93A, contudo o acompanhamento dos sintomas foi mais elaborado. O que pode ser responsável

pelas variações nas idades descritas nas quais os animais atingiram o peso máximo ( $113,6 \pm 4,8$  dias), apresentaram os primeiros sintomas da doença ( $126,5 \pm 7,1$  dias) e “end-point” ( $137,8 \pm 7,1$  dias). Os autores descreveram ainda uma diferença ( $\Delta$ ) de tempo entre o peso máximo e o “end-point” de  $24,3 \pm 6,5$  dias, estes dados corroboram com os dados obtidos no nosso estudo (Tabela 21).

Entre os animais ELA sintomáticos a atrofia dos membros posteriores foi prevalente, assim como descrito por [Matsumoto et al. \(2006\)](#) (Tabela 21).

Tabela 21: Acompanhamento dos animais ELA sintomáticos e respectivos controles.

Número do animal	Tipo	Idade quando atingiu o peso máximo (dias)	Idade no início dos sintomas (dias)	Delta peso máximo e eutanásia (dias)	Atrofia/paralisia
120	ELA	119	130	17	traseira
106	Controle	132			
116	ELA	114	133	25	traseira
122	Controle	136			
125	ELA	116	130	23	traseira
111	Controle	141			
118	ELA	119	127	22	dianteira
127	Controle	141			
121	ELA	114	109	32	traseira
107	Controle	146			
119	ELA	127	119	22	dianteira
145	Controle	151			
126	ELA	127	123	27	traseira
130	Controle	156			

#### 4.3.1 - Coleta do tecido adiposo

A perda expressiva do peso dos animais acompanhada da atrofia muscular nos levou a buscar entender como estão o metabolismo e o perfil de ácidos graxos no tecido adiposo desses animais ao longo do tempo (Figura 34). Para isso foram escolhidos 3

diferentes depósitos de tecido adiposo: subcutâneo (região inguinal) (SC), retroperitoneal (RP) e epididimal (EPI) (Figura 35). Sendo os dois últimos representantes da chamada gordura visceral. Alguns autores já classificam a gordura epididimal como sendo um terceiro tipo tecido adiposo branco, contudo a maior parte das referências ainda caracterizam este depósito como visceral.

Anatomicamente cada um dos tecidos foi coletado de uma dada região, no intuito de variações de peso, ou estrutura, serem relativas ao próprio estado metabólico do tecido e não ao erro na coleta.

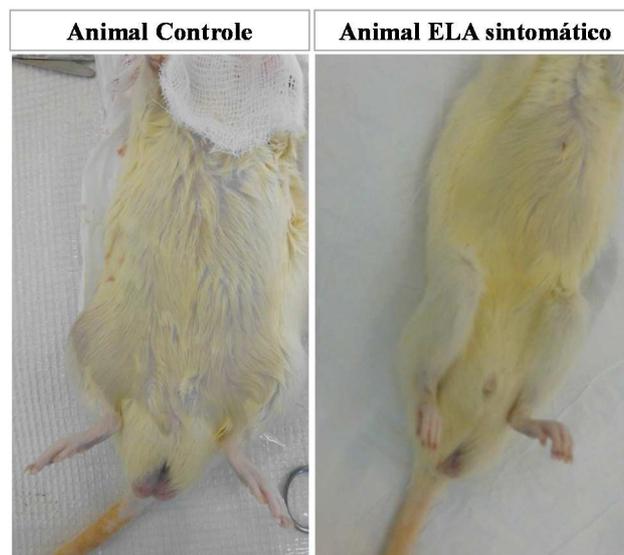


Figura 34: Animais ELA e controle sintomáticos no dia da eutanásia.



Figura 35: Coleta dos 3 diferentes tecidos adiposos: (A) subcutâneo-inguinal; (B) epididimal; e, (C) retroperitoneal.

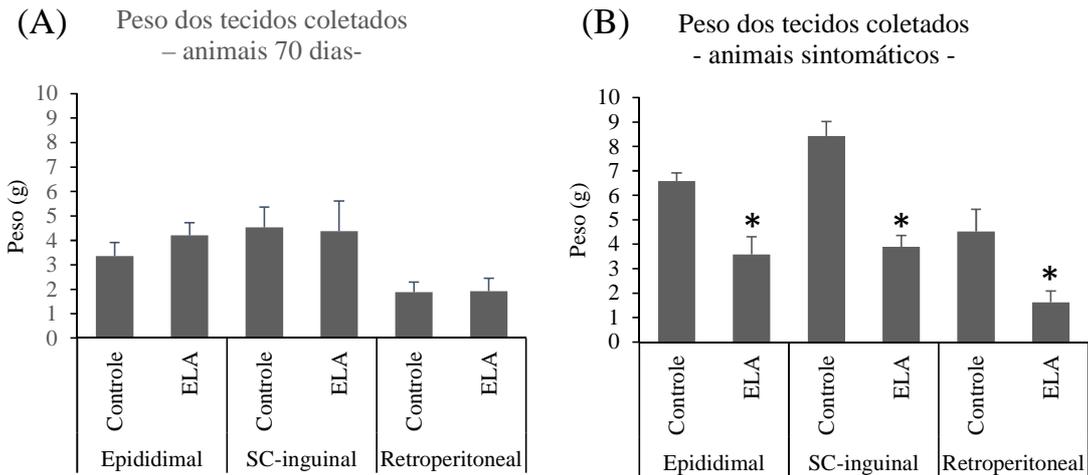


Figura 36: Análise do peso dos tecidos adiposos epididimal, subcutâneo-inguinal (SC inguinal) e retroperitoneal coletados nos animais ELA ( $n=6$ ) e respectivos controles ( $n=6$ ), com (A) 70 dias e (B) sintomáticos. Dados estatisticamente diferentes controle vs ELA (\*  $P < 0,001$  (ANOVA, Bonferroni)).

Para o peso dos tecidos dos animais com 70 dias constatou-se o mesmo comportamento que o observado para o peso corporal dos animais, isto é, não há diferença entre os grupos de animais ELA e seus respectivos controles (Figura 36 - A). Analisando o peso dos tecidos coletados dos animais que atingiram o *end point* do estudo ficou claro que a diminuição do peso do tecido adiposo nos animais ELA em relação aos controles acontece de forma generalizada (Figura 36 - B). Tal diminuição da massa do tecido adiposo também foi observada pelos pesquisadores [Dupuis et al. \(2004\)](#) ao analisarem os tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal de um modelo transgênico de camundongos para a ELA. Destes tecidos foram isolados os adipócitos (Figura 37) os quais foram sujeitos aos ensaios de lipólise, lipogênese e perfil lipídico.

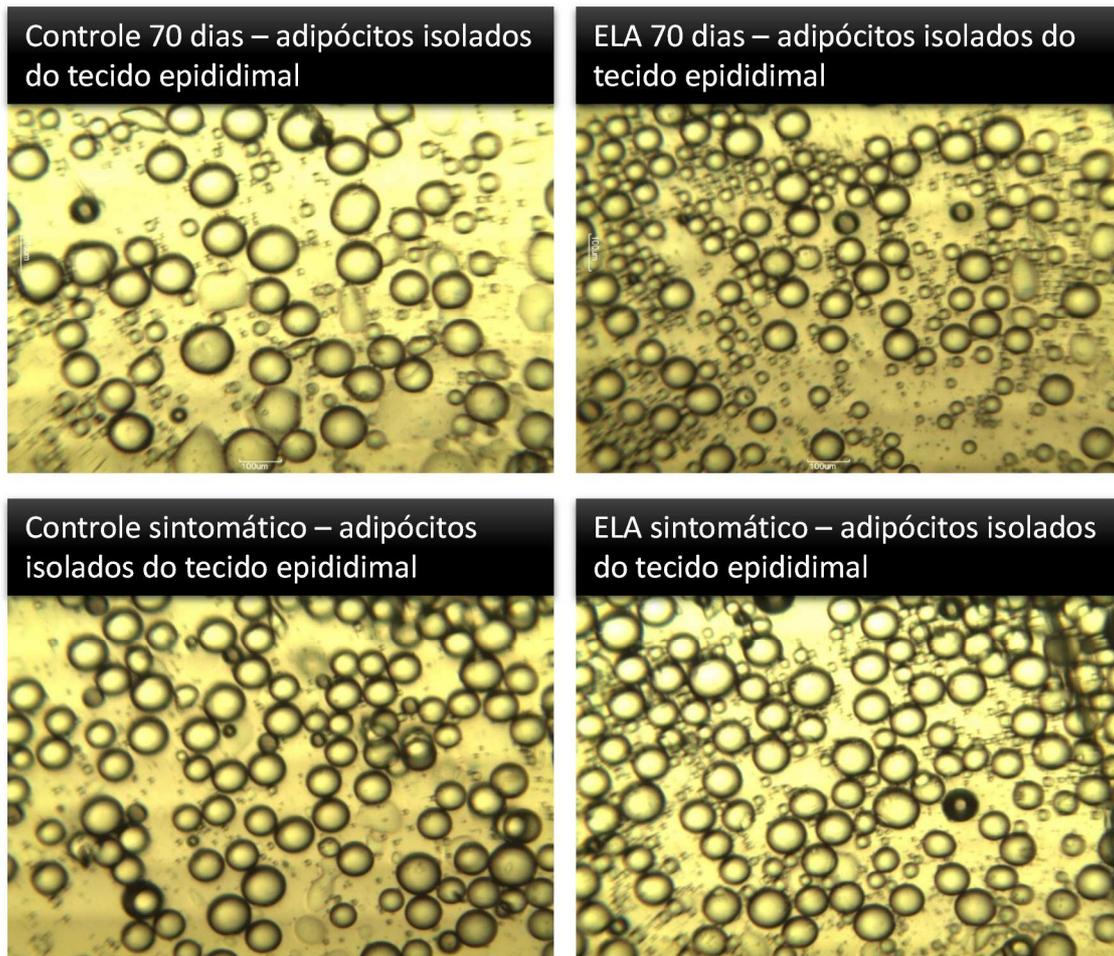


Figura 37: Análise morfológica dos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal.

Não foram observadas diferenças no diâmetro dos adipócitos.

#### 4.3.2 - Lipólise

A lipólise, como descrito anteriormente, é um fenômeno de mobilização dos ácidos graxos, que se encontram esterificados na forma de triacilgliceróis nos adipócitos, em resposta a baixos níveis de glicose no sangue. Este processo consiste na hidrólise sequencial da molécula de TAG, formando subsequentemente diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e três ácidos graxos livres, processos estes catalisados respectivamente pelas enzimas *lipase de triglicerídeos do adipócito* (ATGL), *lipase*

*hormônio sensível* (HSL) e *lipase de monoglicerídeos*. Além disso, esta mobilização é regulada positivamente por uma série de hormônios tais como: adrenalina e glucagon ([Lafontan et al., 1997](#); [Morimoto et al., 2001](#)). Estes se ligam aos receptores de membrana e assim estimulam a adenilil-ciclase a produzir AMPc. A proteína-cinase dependente de AMPc (PKA) fosforila a HSL que induz o seu deslocamento do citosol para a superfície da gotícula de lipídeo, onde ela participa importantemente da hidrólise dos triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Além disso, a PKA promove a fosforilação da perilipina A (principal proteína que envolve a gota de lipídeos nos adipócitos brancos) e esta sofre subsequentemente um rearranjo de sua posição sobre a gota lipídica facilitando a hidrólise do triacilglicerol promovida pelas lipases. Os ácidos graxos, então liberados do adipócito, se ligam a albumina sérica e são transportados até o miócitos onde sofrem uma série de reações que resultam na formação de CO<sub>2</sub> e energia (ATP). O glicerol, por sua vez, sofre uma série de reações até ser convertida a glicose ([Coppack et al., 1994](#); [Nelson e Cox, 2011](#)).

Além da adrenalina outras catecolaminas também podem ser usadas na indução deste processo, são elas: norepinefrina e isoproterenol ([Van Liefde et al., 1992](#)). Por este motivo, a atividade lipolítica foi avaliada em condições basais (não-estimulada) e maximamente estimulada com isoproterenol. A lipólise foi determinada de acordo com a produção de glicerol. Os adipócitos possuem em baixas concentrações a glicerol-quinase responsável pela metabolização do glicerol durante a degradação dos triacilglicéris e por isso é possível fazer a medida da atividade lipolítica através da concentração de glicerol presente no meio de incubação.

Os adipócitos, isolados dos 3 tecidos adiposos coletados dos animais ELA e respectivos controles com 70 dias, demonstraram um aumento significativo nos níveis de glicerol em resposta ao estímulo induzido pelo isoproterenol (Figura 38 – A, B e C).

O tecido visceral, aqui representado pelos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, de uma forma geral apresenta uma maior atividade lipolítica ([Wajchenberg, 2000](#)). Este aumento está intimamente ligado ao aumento do número de receptores beta-adrenérgicos.

O nível de lipólise dos adipócitos isolados de animais ELA 70 dias tratadas com isoproterenol mostrou-se significativamente menor em relação ao seu respectivo controle nos três tecidos. Não obstante, quando calculada a diferença na geração de glicerol estimulada por isoproterenol em relação à basal (Figura 38 - D), a resposta dos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal dos animais ELA foi menos intensa que a dos controles. Para os demais tecidos não foi observada diferença do delta calculado (Figura 38 - D).

Com a idade adipócitos isolados dos animais controle deixam de responder significativamente ao estímulo induzido pelo isoproterenol, com a exceção dos adipócitos isolados do tecido subcutâneo-inguinal (Figura 39). A menor resposta associada à idade ( $143 \pm 6$  dias de vida) vai ao encontro dos achados descritos por [Lonnqvist et al. \(1990\)](#) e [Jolly et al. \(1980\)](#).

A Figura 39 mostra ainda que os tecidos viscerais (epididimal e retroperitoneal) nos animais ELA sintomáticos (idade =  $144 \pm 7$  dias) aumentam a liberação de glicerol quando estimulados, diferentemente do que é observado nos animais controle. Além disso, a taxa lipolítica basal no tecido adiposo subcutâneo-inguinal é maior para os animais ELA sintomáticos em detrimento dos respectivos controles.

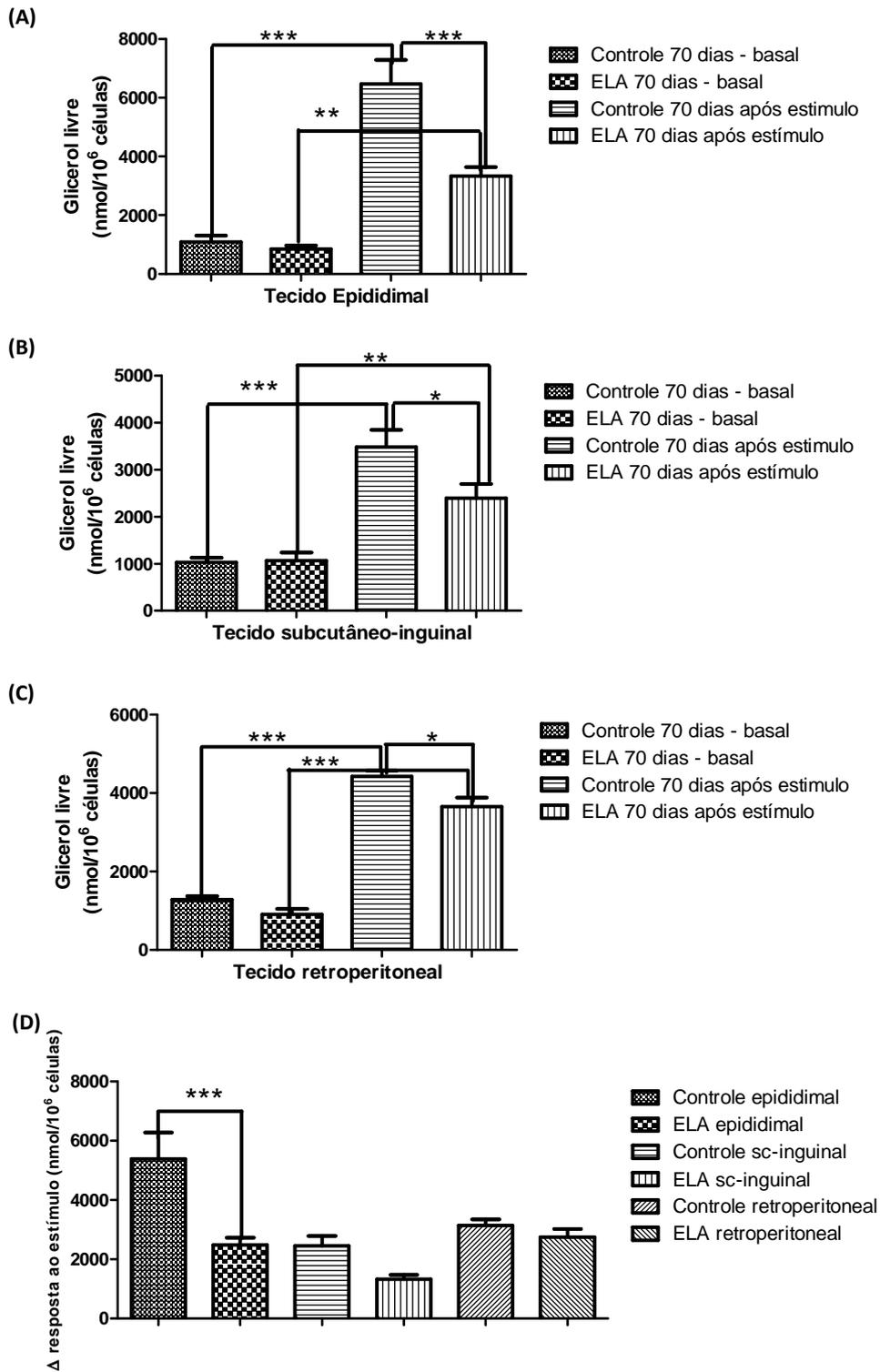


Figura 38: Análise da indução da lipólise em resposta ao estímulo com isoproterenol nos diferentes tecidos nos animais ELA e respectivos controles com 70 dias: (A) adipócitos isolados do tecido adiposo branco epididimal; (B) adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo-inguinal; (C) adipócitos isolados do tecido adiposo branco retroperitoneal, e (D) Diferença na resposta basal vs estímulo para os diferentes tecidos. Dados expressos como média  $\pm$  erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n = 6$  para cada grupo).

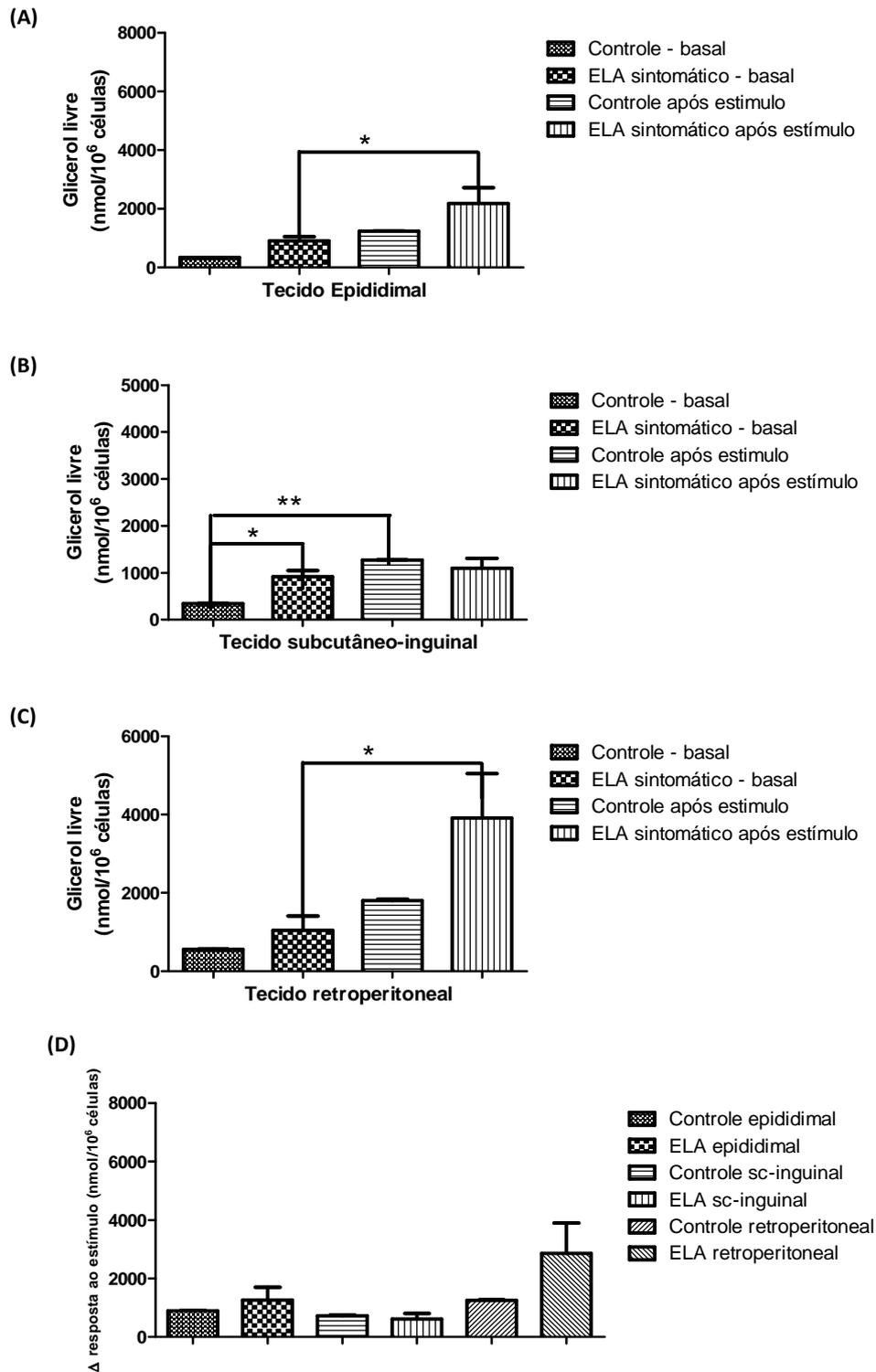


Figura 39: Análise da indução da lipólise em resposta ao estímulo com isoproterenol nos diferentes tecidos nos animais ELA sintomáticos e respectivos controles: (A) adipócitos isolados do tecido adiposo branco epididimal; (B) adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo-inguinal; (C) adipócitos isolados do tecido adiposo branco retroperitoneal, e (D) Diferença na resposta basal vs estímulo para os diferentes tecidos. Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n = 6$  para cada grupo).

Os dados obtidos vão ainda de encontro com as observações de [Dupuis et al. \(2004\)](#) que observaram: aumento da atividade lipolítica em gorduras viscerais de camundongos ELA SOD<sup>G86R</sup>; e, diminuição da expressão dos genes que codificam a síntese de proteínas envolvidas nos processos de liberação ou captação dos ácidos graxos no tecido adiposo epididimal, tais como perilipina, proteína ligadora de ácidos graxos e lipase de lipoproteína.

Mais recentemente, o grupo da Genzyme Corporation, [Dodge et al. \(2013\)](#) e [Fidler et al. \(2011\)](#), demonstraram em camundongos transgênicos SOD 1 G93A uma diminuição dos níveis de triacilgliceróis circulantes, diminuição da quantidade de gordura, aumento dos níveis de glucagon e corticoesterona, diretamente relacionados à lipólise, e diminuição do hormônio lipogênico a insulina.

Todos os dados corroboram com a hipótese de que com a progressão da doença o sistema nervoso central fica cada vez mais dependente de fontes alternativas de energia.

#### 4.3.3 - Lipogênese

A síntese de ácidos graxos e consequente armazenamento na forma de triacilgliceróis em resposta a um excesso de nutrientes advindos da dieta é denominada como lipogênese. A lipogênese caracteriza-se por um série de reações enzimáticas finamente regulada ([Ameer et al., 2014](#)).

Os ácidos graxos sintetizados ou ingeridos, através da dieta, possuem principalmente dois destinos: a incorporação em triacilgliceróis ou a incorporação nos componentes fosfolipídicos da membrana. Quando um organismo dispõe de suprimento abundante de alimento e não está crescendo ativamente, o primeiro destino descrito é o de escolha ([Nelson e Cox, 2011](#)).

A glicose é convertida a diidroxiacetona-fosfato, através da via glicolítica. Esta é então convertida glicerol-3-fosfato pela ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase. Ao glicerol-3-fosfato são então esterificados as 3 cadeias de ácidos graxos pela ação conjunta das enzimas acil-CoA-sintetase e aciltransferase. Neste sentido, a glicose é utilizada de duas formas: na síntese dos ácidos graxos e na síntese do glicerol-3-fosfato ([Nelson e Cox, 2011](#); [Ameer et al., 2014](#)).

A biossíntese dos triacilgliceróis é regulada pela ação de diversos hormônios. A insulina, por exemplo, promove a captação e conversão de carboidratos em triacilgliceróis. A captação de glicose promovida por este hormônio ocorre graças ao estímulo para: translocação de proteínas transportadoras de glicose, nomeadamente o GLUT 4, para a membrana celular aumentando (de 10 a 20 vezes) o transporte de glicose para o interior dos adipócitos; ademais, a insulina estimula a síntese *de novo* de ácidos graxos (formação de ácidos graxos a partir de moléculas não lipídicas como, por exemplo, a glicose) e também estimula a ação de enzimas envolvidas na esterificação destes ácidos em triacilglicerol. Neste sentido, 3 modelos foram selecionadas no intuito de mensurar a atividade lipogênica através da análise da incorporação da glicose em triacilgliceróis, em ácidos graxos (síntese de novo) e em glicerol.

Para os adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal dos animais mais jovens, após o estímulo dado pela incubação com insulina, foi possível observar um aumento da incorporação da glicose nos triacilgliceróis, nos ácidos graxos e no próprio glicerol (Figura 40). Com a idade observou-se um aumento pouco significativo na taxa de incorporação de glicose em ácidos graxos e em glicerol, mas este fenómeno só foi observado para os animais controle.

**Análise da lipogênese induzida por insulina no tecido adiposo epididimal**

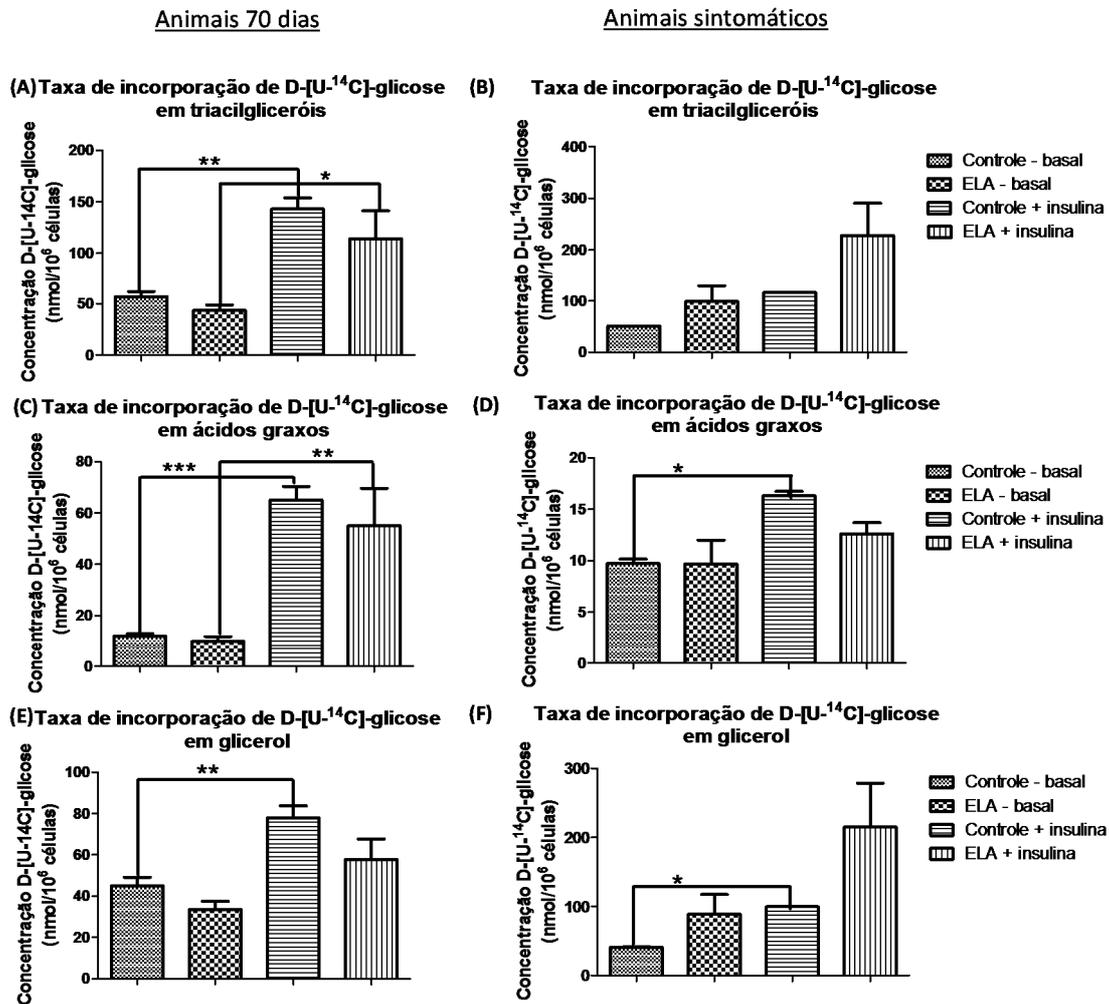


Figura 40: Análise da taxa lipogênica em resposta ao estímulo com insulina para os adipócitos isolados do tecido adiposo branco epididimal dos animais ELA e respectivos controles. Foram realizadas medidas da taxa de incorporação da D-[U<sup>14</sup>C]-glicose em: triacilgliceróis nos adipócitos (A, animais com 70 dias e B, animais sintomáticos); em ácidos graxos (C, animais com 70 dias e D, animais sintomáticos); e, em glicerol (E, animais com 70 dias e F, animais sintomáticos). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, \*P<0.01, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.001. (n=6)

Para o tecido subcutâneo inguinal independentemente da idade do animal não foram observadas diferenças significativas com relação ao estímulo à lipogênese induzido pela insulina (Figura 41). Os dados obtidos vão de encontro com a literatura que associa o tecido subcutâneo à resistência à insulina (Kelley *et al.*, 2000).

Para os adipócitos isolados do tecido adiposo retroperitoneal dos animais mais jovens, após o estímulo dado pela incubação com insulina, foi possível observar um

aumento da incorporação da glicose nos triacilgliceróis, nos ácidos graxos e no próprio glicerol (Figura 42). Com a idade não se observou nenhum aumento significativo da incorporação da glicose.

**Análise da lipogênese induzida por insulina no tecido adiposo subcutâneo-inguinal**

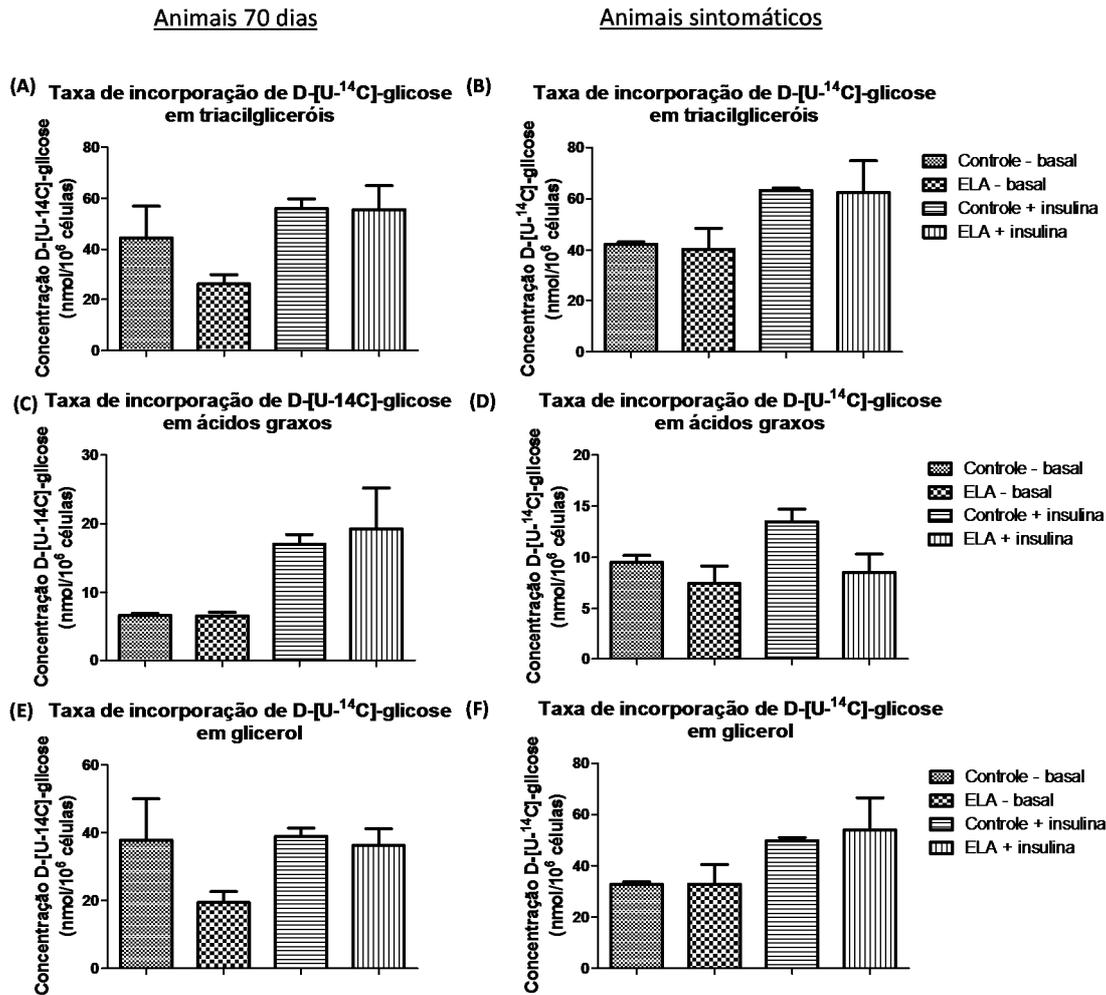


Figura 41: Análise da taxa lipogênica em resposta ao estímulo com insulina para os adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo-inguinal dos animais ELA e respectivos controles. Foram realizadas medidas da taxa de incorporação da D-[U<sup>14</sup>C]-glicose em: triacilgliceróis nos adipócitos (A, animais com 70 dias e B, animais sintomáticos); em ácidos graxos (C, animais com 70 dias e D, animais sintomáticos); e, em glicerol (E, animais com 70 dias e F, animais sintomáticos). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, \*P<0.01, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.001. (n=6)

**Análise da lipogênese induzida por insulina no tecido adiposo retroperitoneal**

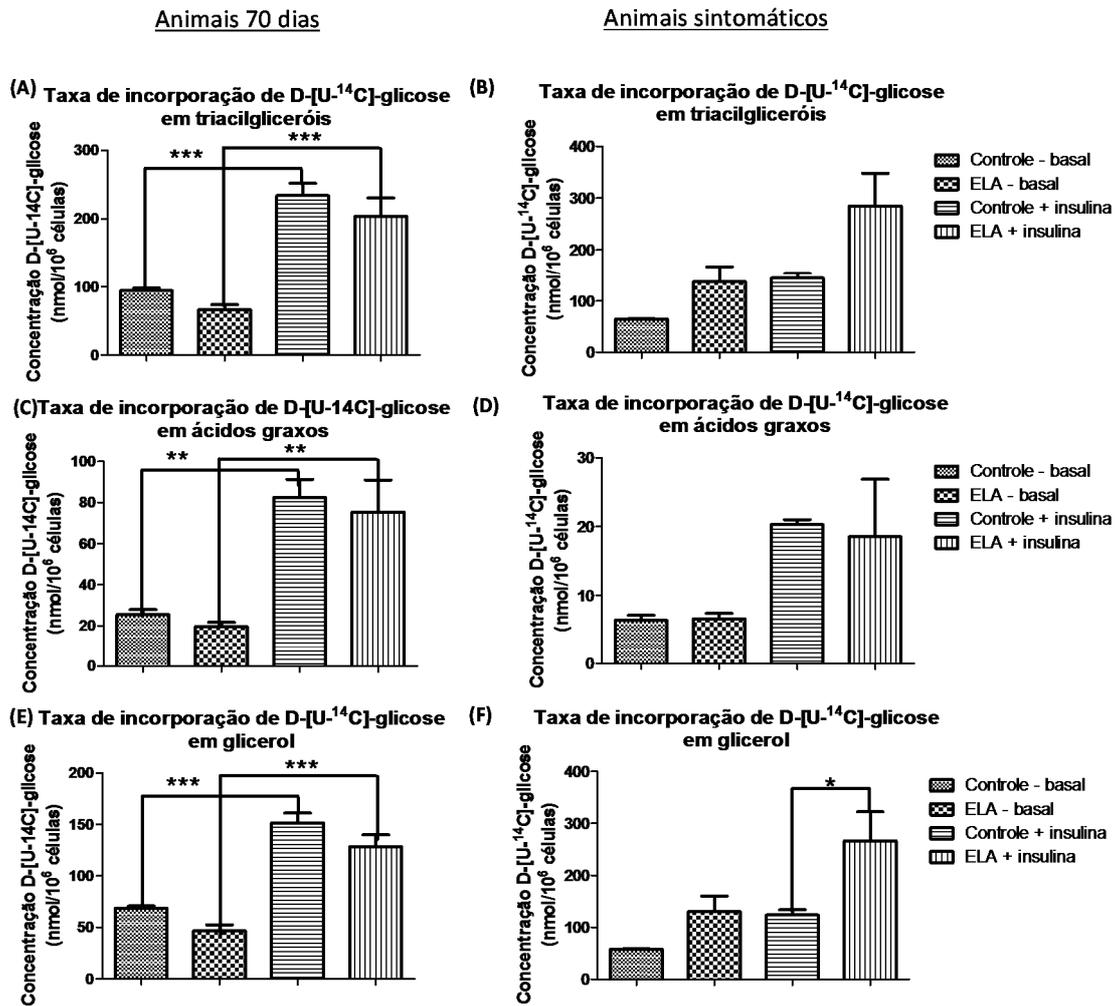


Figura 42: Análise da taxa lipogênica em resposta ao estímulo com insulina para os adipócitos isolados do tecido adiposo branco retroperitoneal dos animais ELA e respectivos controles. Foram realizadas medidas da taxa de incorporação da D-[U<sup>14</sup>C]-glicose em: triacilgliceróis nos adipócitos (A, animais com 70 dias e B, animais sintomáticos); em ácidos graxos (C, animais com 70 dias e D, animais sintomáticos); e, em glicerol (E, animais com 70 dias e F, animais sintomáticos). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, \*P<0.01, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.001. (n=6)

Com a idade e o desenvolvimento dos sintomas os animais passaram a apresentar uma resposta de resistência ao estímulo para a incorporação da glicose, induzido pela insulina. Esta informação associada ao aumento da atividade lipolítica observada, corroboram com a premissa defendida por [Dupuis et al. \(2004\)](#), [Dodge et al. \(2013\)](#) e [Fidler et al. \(2011\)](#) que dita que os ácidos graxos para os animais ELA com o avançar da idade/doença passam a ser utilizados prevalentemente como fonte de energia. Fato este

que é compatível com o aumento da quantidade de corpos cetônicos observada pelos dois grupos.

A redução da sinalização da insulina no processo de lipogênese observada também nos animais controle para os tecidos viscerais (tecido adiposo epididimal e retroperitoneal) pode ser justificada pela elevação peso corporal (peso no *end point*  $486 \pm 31\text{g}$ ) que acontece não só pelo crescimento dos animais mas também pelo acúmulo de gordura. Existe uma relação direta entre a resistência à insulina e o aumento da idade e peso ([Ryan, 2000](#); [Wajchenberg, 2000](#)).

A redução dessa sinalização da insulina foi também observada nos animais ELA sintomáticos e em um grupo de pacientes no trabalho de [Reyes et al. \(1984\)](#). Contudo provavelmente a justificativa não se resume ao peso corporal inferior (peso no *end point*  $453 \pm 27\text{g}$ ) mas a um conjunto de alterações metabólicas que é característica da ELA ([Dupuis et al., 2004](#); [Dupuis et al., 2011](#); [Schmitt et al., 2014](#)).

#### 4.3.4 - Análise da composição de ácidos graxos nos tecidos adiposos estudados

Dada as diferenças observadas para os 3 tecidos surgiu a dúvida de como estaria o perfil de ácidos graxos nos respectivos tecidos. Em se tratando de um “órgão endócrino” ([Kershaw e Flier, 2004](#)), será que a composição de ácidos graxos é diferente entre os tecidos e será que tem correlação com a doença?

O perfil de ácidos graxos foi realizado através de um método clássico que consiste na transesterificação dos ácidos graxos seguida de análise por GC-FID. Foram construídas curvas de calibração com diluição seriada para os 37 ácidos graxos presentes no padrão de referência (Supelco 37). O conteúdo total de ácidos graxos foi calculado

pelo somatório do conteúdo de cada ácido graxo e foi normalizado pela quantidade de proteína (Figura 43).

Observa-se que com o avançar da idade o conteúdo total de ácidos graxos aumenta nos tecidos adiposo epididimal (tanto no controle quanto em ELA) e subcutâneo-inguinal (apenas no controle). Porém para o animal ELA sintomático observa-se uma queda no conteúdo total de ácidos graxos no tecido adiposo subcutâneo inguinal. Este fato pode estar associado diretamente com a liberação de ácidos graxos como fonte de energia.

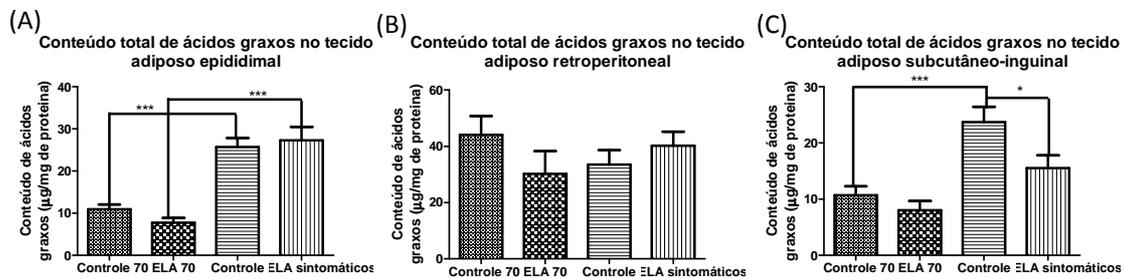
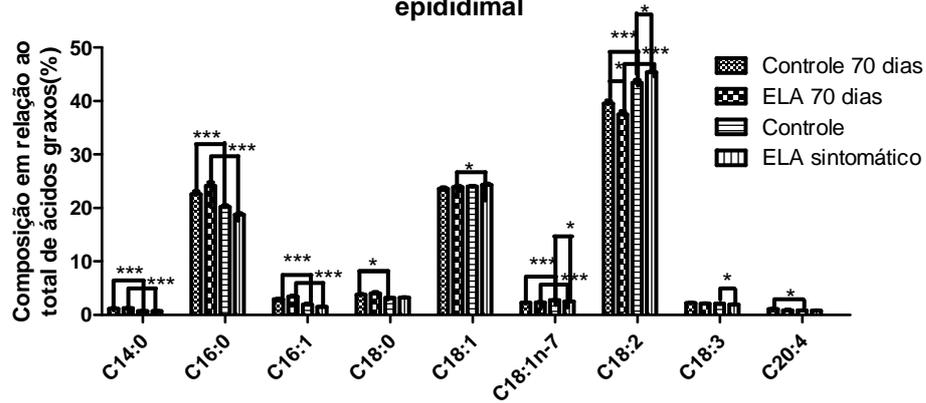


Figura 43: Conteúdo total de ácidos graxos para os 3 tecidos analisados (A) tecido epididimal, (B) tecido retroperitoneal e (C) subcutâneo-inguinal. Dados expressos como média  $\pm$  erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . ( $n = 6$ )

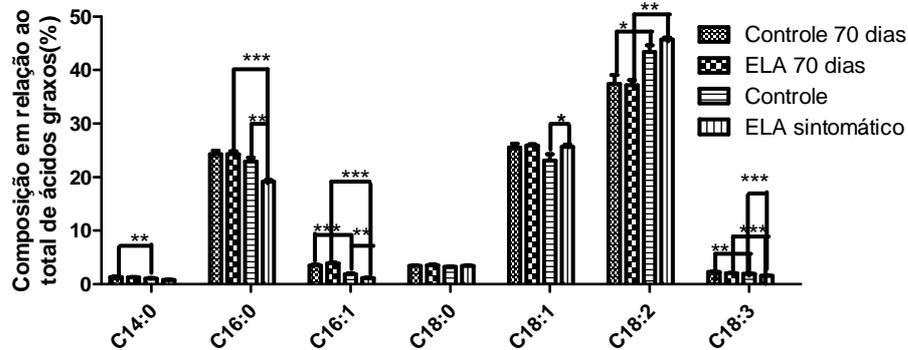
O conteúdo específico de cada ácido graxo foi expresso em % relativa ao total de ácidos graxos. A composição de ácidos graxos para cada tecido está representada na Figura 44. Os ácidos graxos cuja % relativa foi inferior a 1% não estão representados na figura. Para os 3 tecidos avaliados observou-se uma diminuição do ácido palmítico e palmitoleico nos animais sintomáticos frente aos animais com 70 dias. Diminuição esta acompanhada de um aumento significativo dos níveis de ácido linoleico.

O ácido palmitoleico é descrito como sendo um marcador da síntese *de novo* de ácidos graxos (Cao *et al.*, 2008; Amengual *et al.*, 2012). Por este motivo, é simples correlacionar a baixa incorporação de glicose marcada em ácidos graxos aos baixos níveis do ácido palmitoleico.

(A) Composição de ácidos graxos nos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal



(B) Composição de ácidos graxos nos adipócitos isolados do tecido adiposo retroperitoneal



(C) Composição de ácidos graxos nos adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo-inguinal

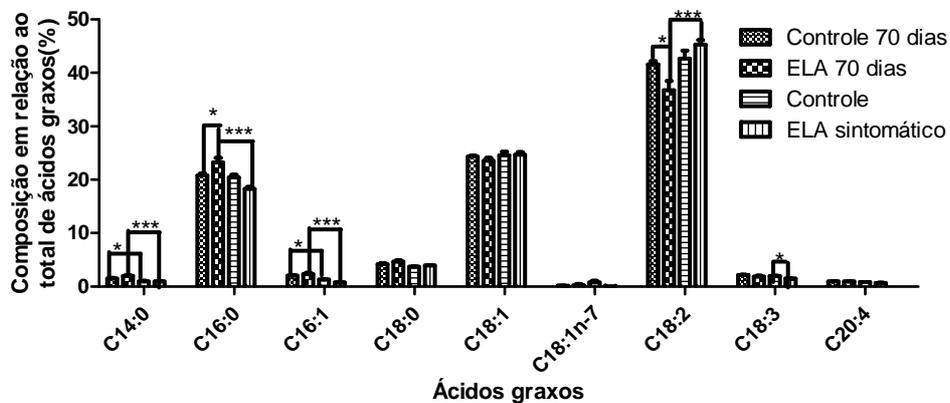


Figura 44: Análise da composição de ácidos graxos dos adipócitos isolados dos tecidos adiposos (A) epididimal, (B) retroperitoneal e (C) subcutâneo. Ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido vecênico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) ácido linolênico (C18:3) e ácido araquidônico (C20:4). Dados expressos como média ± erro médio. ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (n=6)

Em conjunto, considerando que o conteúdo de ácidos graxos obtido através da dieta não sofreu alteração, visto que os animais foram alimentados sempre com a mesma

dieta, os dados sugerem as alterações no conteúdo de ácidos são decorrentes de adaptações metabólicas relativas à idade (controle 70 vs controle dos animais sintomáticos) e à própria doença.

## 5. CONCLUSÃO

A síntese, purificação e caracterização dos produtos de oxidação dos ácidos graxos, não é uma tarefa trivial dado o elevado número de isômeros que podem ser formados.

A análise dos hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos por LC-MS/MS é vantajosa no sentido de que une a ausência de métodos de derivatização dos compostos à separação e identificação dos diferentes isômeros de forma específica, seletiva e altamente sensível.

Análises isobáricas específicas para hidroperóxidos e hidróxidos lipídicos foram realizadas através do monitoramento das fragmentações desses compostos através do modo de SRM em LC-MS/MS. Este monitoramento permitiu aumentar a especificidade e sensibilidade da análise. São descritos, no presente trabalho, 3 possíveis abordagens para o monitoramento dos analitos de interesse usando equipamentos do tipo triplo-quadrupolo, quadrupolo-ion trap e q-Tof. Os três métodos em conjunto resultaram em uma biblioteca confiável para o monitoramento destes compostos.

O estudo lipidômico e mais especificamente oxi-lipidômico com animais transgênicos ELA é uma importante estratégia a ser explorada no intuito de entender o papel do DHA, LA e AA e de seus produtos de oxidação na doença.

Apesar do número reduzido de animais foi possível observar um aumento significativo dos níveis de 13-HpODE, 9-HpODE e 12-HETE no córtex motor dos animais avaliados. Estando estes produtos intimamente correlacionados com importantes enzimas que participam da cadeia inflamatória. Estes dados estão de acordo com a literatura que correlacionam as doenças neurodegenerativas a processos inflamatórios.

A ELA é uma síndrome que é caracterizada por uma série de fenótipos variados ([Schmitt et al., 2014](#)). As alterações no metabolismo de lipídeos descrita por [Dupuis et](#)

[al. \(2004\)](#), em um modelo animal diferente do que utilizamos, sendo compatíveis com os nossos achados ilustram claramente a íntima relação entre o metabolismo energético e a ELA. E principalmente ilustram que a doença não se restringe única e exclusivamente aos neurônios motores. Neste sentido foram observadas aumento da atividade lipolítica e diminuição da lipogênese que vão de encontro com os dados obtidos em outros modelos animais para a ELA. Em conjunto os dados obtidos corroboram com a hipótese que os ácidos graxos são uma fonte de energia de crucial importância com a progressão da doença.

Todos os dados corroboram com a hipótese de que com a progressão da doença o sistema nervoso central fica cada vez mais dependente de fontes alternativas de energia.

Adicionalmente foi observada uma diminuição do conteúdo dos ácidos graxos palmitico e palmitoléico nos adipocitos que podem estar sendo direcionados diretamente para as reações de metabolização de lipídeos, nomeadamente a beta-oxidação.

Por todos estes motivos, a análise lipidômica de diferentes tecidos no modelo utilizado poderá vir a contribuir para a descoberta de possíveis alvos terapêuticos para uma doença tão devastadora quanto a esclerose lateral amiotrófica.

## 6. REFERÊNCIAS

ALMER, G. *et al.* Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 49, n. 2, p. 176-85, Feb 2001. ISSN 0364-5134 (Print)

0364-5134 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11220737](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11220737) >.

ALONSO-VALE, M. I. *et al.* Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 4, p. 422-9, Nov 2008. ISSN 1600-079X (Electronic)

0742-3098 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18662218> >.

AMEER, F. *et al.* De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895-902, Jul 2014. ISSN 1532-8600 (Electronic)

0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814684> >.

AMENGUAL, J. *et al.* Induction of carnitine palmitoyl transferase 1 and fatty acid oxidation by retinoic acid in HepG2 cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 2019-2027, 11// 2012. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272512002762> >.

BADWEY, J. A.; KARNOVSKY, M. L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 695-726, 1980. ISSN 0066-4154 (Print)

0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6250449> >.

BARBER, S. C.; SHAW, P. J. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 629-41, Mar 1 2010. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19969067](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19969067) >.

BARBOSA-SICARD, E. *et al.* Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, n. 4, p. 1275-1281, 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227886300015 >.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, Feb 1995. ISSN 0897-7151 (Print)

0897-7151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783230> >.

BAZAN, N. G.; MOLINA, M. F.; GORDON, W. C. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. **Annual Review of Nutrition**, v. 31, p. 321-51, Aug 21 2011. ISSN 1545-4312 (Electronic)

0199-9885 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21756134> >.

BENDANI, M. K. *et al.* Localization of 12-lipoxygenase mRNA in cultured oligodendrocytes and astrocytes by in situ reverse transcriptase and polymerase chain reaction. **Neuroscience Letters**, v. 189, n. 3, p. 159-62, Apr 21 1995. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542757> >.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-7, Aug 1959. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13671378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13671378) >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=942051](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=942051) >.

BRASH, A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23679-23682, Aug 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://000082110900001 >.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 829-836, 2000. ISSN 0009-9147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087682500007 >.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=672633](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=672633) >.

BUTOVICH, I. A.; HAMBERG, M.; RADMARK, O. Novel oxylipins formed from docosahexaenoic acid by potato lipoxygenase-10(S)-hydroxydocosahexaenoic acid and 10,20-dihydroxydocosahexaenoic acid. **Lipids**, v. 40, n. 3, p. 249-257, Mar 2005. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <Go to ISI>://000228819300002 >.

CALDER, P. C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6 Suppl, p. 1505S-1519S, Jun 2006. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16841861> >.

CAO, H. *et al.* Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 933-44, Sep 19 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking).

CAPDEVILA, J. H.; FALCK, J. R.; HARRIS, R. C. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. **Journal of Lipid Research**, v. 41, n. 2, p. 163-181, Feb 2000. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <Go to ISI>://000085510200001 >.

CHANG, D. J. *et al.* Therapeutic Potential of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Experimental Stroke. **Cell Transplantation**, Oct 3 2012. ISSN 1555-3892 (Electronic)

0963-6897 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23044029> >.

CHENG, Z.; LI, Y. What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: an update. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 3, p. 748-66, Mar 2007. ISSN 0009-2665 (Print)

0009-2665 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17326688](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17326688) >.

CHOW, C. K. **Fatty acids in foods and their health implications**. 3. Lexington: CRC Press, 2007.

CLARIA, J. *et al.* Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 5, p. 2597-605, Sep 1 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844113> >.

COLAS, R. *et al.* Increased Lipid Peroxidation in LDL from Type-2 Diabetic Patients. **Lipids**, v. 45, n. 8, p. 723-731, 2010. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-010-3453-9> >.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 171S-5S, Jan 2000. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617967> >.

COPPACK, S. W.; JENSEN, M. D.; MILES, J. M. In vivo regulation of lipolysis in humans. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 2, p. 177-93, Feb 1994. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8169522> >.

COTMAN, C. *et al.* Lipid composition of synaptic plasma membranes isolated from rat brain by zonal centrifugation. **Biochemistry**, v. 8, n. 11, p. 4606-4612, Nov 1969. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4311035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4311035) >.

DAWSON, J. H. J.; GUILHAUS, M. Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 3, n. 5, p. 155-159, 1989. ISSN 1097-0231. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1290030511> >.

DEROGIS, P. B. M. C. *et al.* The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy- and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77561, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24204871> >.

DMITRIEV, L. F.; TITOV, V. N. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 200-210, Apr 2010. ISSN 1568-1637. Disponível em: < <Go to ISI>://000276978300011 >.

DODGE, J. C. *et al.* Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 26, p. 10812-7, Jun 25 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23754387> >.

DUPUIS, L. *et al.* Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11159-64, Jul 27 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15263088> >.

DUPUIS, L. *et al.* Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet Neurology**, v. 10, n. 1, p. 75-82, Jan 2011. ISSN 1474-4465 (Electronic)

1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21035400> >.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 779S-785, May 1, 1993 1993. Disponível em: < <http://www.ajcn.org/cgi/content/abstract/57/5/779S> >.

FAHY, E. A comprehensive classification system for lipids (vol 46, pg 839, 2005). **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 6, p. 1618-1618, Jun 2005. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <Go to ISI>://000277564700038 >.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 4, p. 203-15, Apr 2009. ISSN 1872-6216 (Electronic)

0047-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19071157> >.

FER, M. *et al.* Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 471, n. 2, p. 116-125, Mar 2008. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://000253929300003 >.

FERRANTE, R. J. *et al.* Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 5, p. 2064-74, Nov 1997. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349552> >.

FESTOFF, B. W. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**. *Encyclopedia of Life Sciences*: John Wiley & Sons, Ltd.: 1-4 p. 2001.

FIDLER, J. A. *et al.* Disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: the influence of chronic stress and corticosterone. **FASEB J**, v. 25, n. 12, p. 4369-77, Dec 2011. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876068> >.

FILALI, M.; LALONDE, R.; RIVEST, S. Sensorimotor and cognitive functions in a SOD1(G37R) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Behavioural brain research**, v. 225, n. 1, p. 215-21, Nov 20 2011. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816178> >.

FINE, J. B.; DIGIROLAMO, M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 21, n. 9, p. 764-8, Sep 1997. ISSN 0307-0565 (Print)

0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9376888> >.

FRANKEL, E. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 12, p. 1908-1917, 1984. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02540830> >.

FUJIMOTO, Y.; YONEMURA, T.; SAKUMA, S. Role of linoleic Acid hydroperoxide preformed by cyclooxygenase-1 or -2 on the regulation of prostaglandin formation from arachidonic Acid by the respective enzyme. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 65-8, Sep 2008. ISSN 0912-0009 (Print)

0912-0009 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818754> >.

GAMOH, S. *et al.* Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. **Neuroscience**, v. 93, n. 1, p. 237-41, 1999. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430487> >.

GAO, H. M.; HONG, J. S. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. **Trends in immunology**, v. 29, n. 8, p. 357-65, Aug 2008. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599350> >.

GARSCHA, U.; NILSSON, T.; OLIW, E. H. Enantiomeric separation and analysis of unsaturated hydroperoxy fatty acids by chiral column chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 872, n. 1-2, p. 90-98, Sep 2008. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://000259764800011 >.

GIBIAN, M. J.; VANDENBERG, P. Product yield in oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: the value of the molar extinction coefficient in the spectrophotometric assay. **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 2, p. 343-9, Jun 1987. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3116881> >.

GIROTTI, A. W.; KRISKA, T. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 6, n. 2, p. 301-10, Apr 2004. ISSN 1523-0864 (Print)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15025931> >.

GOGUS, U.; SMITH, C. n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 417-436, Mar 2010. ISSN 0950-5423. Disponível em: < <Go to ISI>://000274438900001 >.

GOMOLKA, B. *et al.* Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 94, n. 3-4, p. 81-7, Apr 2011. ISSN 1098-8823 (Print)

1098-8823 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21236358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21236358) >.

GORDON, W. C.; BAZAN, N. G. Docosahexaenoic acid utilization during rod photoreceptor cell renewal. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 2190-202, Jul 1990. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2142959> >.

GUICHARDANT, M.; LAGARDE, M. Analysis of biomarkers from lipid peroxidation: A comparative study. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n.

1, p. 75-82, 2009. ISSN 1438-7697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263323800007 >.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x> >.

HAMBERG, M.; SU, C.; OLIW, E. Manganese lipoxygenase - discovery of a bis-allylic hydroperoxide as product and intermediate in a lipoxygenase reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13080-13088, May 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://000073768500057 >.

HAMBRECHT, G. S. *et al.* Brain 12-HETE formation in different species, brain regions, and in brain microvessels. **Neurochemical Research**, v. 12, n. 11, p. 1029-33, Nov 1987. ISSN 0364-3190 (Print)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3120027> >.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, Jul 1956. ISSN 0022-1422 (Print)

0022-1422 (Linking).

HONG, S. *et al.* Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells - Autacoids in anti-inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 17, p. 14677-14687, Apr 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://000182516100014 >.

HONG, S. *et al.* Resolvin D1, protectin D1, and related docosahexaenoic acid-derived products: Analysis via electrospray/low energy tandem mass spectrometry based on spectra and fragmentation mechanisms. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 1, p. 128-144, Jan 2007. ISSN 1044-0305. Disponível em: < <Go to ISI>://000243712200016 >.

HONG, S. *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 78, n. 1-4, p. 107-16, Dec 2005. ISSN 1098-8823 (Print)

1098-8823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16303609> >.

HORROCKS, L. A.; YEO, Y. K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological Research**, v. 40, n. 3, p. 211-225, 1999. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WP9-45FCR6X-1C/2/208945026b5c17ffe905e0712b1cb29c> >.

HOWLAND, D. S. *et al.* Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1604-9, Feb 5 2002. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818550> >.

HUR, H. *et al.* Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 1, p. 44-54, Nov 6 2013. ISSN 1791-2423 (Electronic)

1019-6439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135628> >.

INNIS, S. M.; DYER, R. A. Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 9, p. 1529-1536, Sep 2002. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <Go to ISI>://000178252900020 >.

IULIANO, L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, n. 6, p. 457-68, Sep 2011. ISSN 1873-2941 (Electronic)

0009-3084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703250> >.

JIRA, W. *et al.* Strong increase in hydroxy fatty acids derived from linoleic acid in human low density lipoproteins of atherosclerotic patients. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 91, n. 1, p. 1-11, Jan 1998. ISSN 0009-3084. Disponível em: < <Go to ISI>://000071941200001 >.

JIRA, W.; SPITELLER, G.; SCHRAMM, A. Increase in hydroxy fatty acids in human low density lipoproteins with age. **Chemistry and Physics of Lipids** v. 84, n. 2, p. 165-173, 1996. ISSN 0009-3084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T2N-3W31DR9-9/2/4f67f4b6118ea16cea517d9e950d14b7> >.

JOLLY, S. R. *et al.* Effect of aging and cellularity on lipolysis in isolated mouse fat cells. **Journal of Lipid Research**, v. 21, n. 1, p. 44-52, Jan 1980. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6243688> >.

KANOFSKY, J. R. Singlet Oxygen Production by Biological-Systems. **Chemico-Biological Interactions**, v. 70, n. 1-2, p. 1-28, 1989. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989AD51900001 >.

KANOFSKY, J. R. *et al.* Singlet oxygen production by human eosinophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9692-6, Jul 15 1988. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2838476> >.

KARANIAN, J. W. *et al.* Smooth muscle effects of hydroxylated docosahexaenoates produced from human platelet. **Biomedica Biochimica acta**, v. 47, n. 10-11, p. S79-82, 1988. ISSN 0232-766X (Print)

0232-766X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2977725](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2977725) >.

KELLEY, D. E. *et al.* Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 278, n. 5, p. E941-8, May 2000. ISSN 0193-1849 (Print)

0193-1849 (Linking).

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-56, Jun 2004. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181022> >.

KERWIN, J. L.; TORVIK, J. J. Identification of monohydroxy fatty acids by electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry **Analytical Biochemistry**, v. 237, n. 1, p. 56-64, May 1996. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://A1996UK95500008 >.

KHANNA, S. *et al.* Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43508-15, Oct 31 2003. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917400> >.

KIAEI, M. *et al.* Integrative role of cPLA with COX-2 and the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, n. 2, p. 403-11, Apr 2005. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816863> >.

KIERNAN, M. C. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet**, v. 377, n. 9769, p. 942-55, Mar 12 2011. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21296405](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21296405) >.

KIM, H. Y. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 26, p. 18661-18665, Jun 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://000247475300002 >.

\_\_\_\_\_. Biochemical and biological functions of docosahexaenoic acid in the nervous system: modulation by ethanol. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 153, n. 1, p. 34-46, May 2008. ISSN 0009-3084. Disponível em: < <Go to ISI>://000256654200005 >.

KIM, H. Y. *et al.* Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 45, p. 35215-23, Nov 10 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903316> >.

KIM, H. Y. *et al.* Stereochemical analysis of hydroxylated docosahexaenoates produced by human platelets and rat brain homogenate. **Prostaglandins**, v. 40, n. 5, p. 473-90, Nov 1990. ISSN 0090-6980 (Print)

0090-6980 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2147773](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2147773) >.

KOHLI, P.; LEVY, B. D. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 960-971, 2009. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00290.x> >.

KORECKA, M. *et al.* Simultaneous HPLC-MS-MS quantification of 8-iso-PGF(2alpha) and 8,12-iso-iPF(2alpha) in CSF and brain tissue samples with on-line cleanup. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 878, n. 24, p. 2209-16, Aug 15 2010. ISSN 1873-376X (Electronic)

1570-0232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643588> >.

KURATKO, C. N.; SALEM, N. Biomarkers of DHA status. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 2-3, p. 111-118, Aug-Sep 2009. ISSN 0952-3278. Disponível em: < <Go to ISI>://000270467600004 >.

LAFONTAN, M. *et al.* Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 12 Suppl 1, p. 6-20, Oct 1997. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking).

LANDS, B. Consequences of essential fatty acids. **Nutrients**, v. 4, n. 9, p. 1338-57, Sep 2012. ISSN 2072-6643 (Electronic)

2072-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23112921> >.

LI, Y.; MAHER, P.; SCHUBERT, D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. **Neuron**, v. 19, n. 2, p. 453-63, Aug 1997. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292733> >.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 294-303, 2001.

LIU, W. *et al.* Ex vivo oxidation in tissue and plasma assays of hydroxyoctadecadienoates: Z,E/E,E stereoisomer ratios. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 986-95, May 17 2010. ISSN 1520-5010 (Electronic)

0893-228X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20423158](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20423158) >.

LONG, E. K. *et al.* Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 3, p. 714-24, May 2008. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18194211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18194211) >.

LONNQVIST, F. *et al.* Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue of the elderly. **The Journal of clinical investigation**, v. 85, n. 5, p. 1614-21, May 1990. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2159025> >.

LU, Y. *et al.* Mediator-lipidomics: databases and search algorithms for PUFA-derived mediators. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 4, p. 790-802, April 1, 2005 2005. Disponível em: < <http://www.jlr.org/cgi/content/abstract/46/4/790> >.

LUKIW, W. J.; BAZAN, N. G. Docosahexaenoic Acid and the Aging Brain. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2510-2514, Dec 2008. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://000261038300034 >.

LYBERG, A. M.; ADLERCREUTZ, P. Monitoring monohydroperoxides in docosahexaenoic acid using high-performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 41, n. 1, p. 67-76, Jan 2006. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <Go to ISI>://000235634800008 >.

MACMILLAN, D. K.; MURPHY, R. C. Analysis of lipid hydroperoxides and long-chain conjugated keto acids by negative ion electrospray mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 6, n. 12, p. 1190-1201, 1995. ISSN 1044-0305. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TH2-3YYTMSX-7/2/2c00c3ea00383502ae5c3333fa5c6f79> >.

MAHONEY, D. J. *et al.* Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. **Muscle Nerve**, v. 33, n. 6, p. 809-16, Jun 2006. ISSN 0148-639X (Print)

0148-639X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16583367](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16583367) >.

MANCUSO, R. *et al.* Evolution of gait abnormalities in SOD1(G93A) transgenic mice. **Brain Research**, v. 1406, p. 65-73, Aug 11 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733494> >.

MARAI, I.; MASSALHA, S. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D on cardiovascular diseases. **The Israel Medical Association journal**, v. 16, n. 2, p. 117-21, Feb 2014. ISSN 1565-1088 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24645234> >.

MARIANI, E. *et al.* Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 827, n. 1, p. 65-75, Nov 15 2005. ISSN 1570-0232 (Print)

1570-0232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183338> >.

MARNETT, L. J. Cyclooxygenase mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 545-552, 2000. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VRX-417MKGV-F/2/722ff7f22378056830f67eb5846ffb4a> >.

MARTIN, C. A. *et al.* Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 761-770, 2006. ISSN 1415-5273. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732006000600011&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000600011&nrm=iso) >.

MASOOD, A.; STARK, K. D.; SALEM, N., JR. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 10, p. 2299-305, Oct 2005. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061957> >.

MASOODI, M. *et al.* Comprehensive lipidomics analysis of bioactive lipids in complex regulatory networks. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 19, p. 8176-85, Oct 1 2010. ISSN 1520-6882 (Electronic)

0003-2700 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20828216](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20828216) >.

MASOODI, M. *et al.* 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 Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 2, p. 75-83, 2008. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <Go to ISI>://000252678200001 >.

MASOODI, M.; NICOLAOU, A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 20, p. 3023-3029, 2006. ISSN 1097-0231. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.2697> >.

MATSUMOTO, A. *et al.* Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. **Journal of neuroscience research**, v. 83, n. 1, p. 119-33, Jan 2006. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16342121> >.

MCGAHON, B. M. *et al.* Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids. **Neuroscience**, v. 94, n. 1, p. 305-14, 1999. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613520> >.

MIYAMOTO, S. *et al.* Direct evidence of singlet molecular oxygen production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite. **Journal of the American**

**Chemical Society**, v. 125, n. 15, p. 4510-4517, 2003. ISSN 0002-7863. Disponível em: < [http://pubs3.acs.org/acs/journals/doi/lookup?in\\_doi=10.1021/ja029262m](http://pubs3.acs.org/acs/journals/doi/lookup?in_doi=10.1021/ja029262m) >.

MIYAMOTO, S. *et al.* Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the russell mechanism: studies using 18(O)-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 20, p. 6172-9, May 21 2003. ISSN 0002-7863 (Print)

0002-7863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12785849> >.

MORGAN, A. H. *et al.* Quantitative assays for esterified oxylipins generated by immune cells. **Nature Protocols**, v. 5, n. 12, p. 1919-31, Dec 2010. ISSN 1750-2799 (Electronic)

1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127486> >.

MORIGUCHI, T.; GREINER, R. S.; SALEM, N. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 6, p. 2563-2573, Dec 2000. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <Go to ISI>://000165298900037 >.

MORIMOTO, C. *et al.* Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 1, p. 120-7, Jan 2001. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160373> >.

MULLIEZ, E. *et al.* 5-Lipoxygenase from potato tubers. Improved purification and physicochemical characteristics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 916, n. 1, p. 13-23, 1987. ISSN 0167-4838. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T21-47RSCGN-BR/2/11fd0eb1d5a66788bd42e16528606a01> >.

MULUGETA, S. *et al.* Identification and absolute configuration of dihydroxy-arachidonic acids formed by oxygenation of 5S-HETE by native and aspirin-acetylated COX-2. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 3, p. 575-85, Mar 2010. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752399> >.

MURPHY, R. C.; FIEDLER, J.; HEVKO, J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 2, p. 479-526, 2001. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr9900883> >.

NAKAMURA, T.; BRATTON, D. L.; MURPHY, R. C. Analysis of epoxyeicosatrienoic and monohydroxyeicosatetraenoic acids esterified to phospholipids in human red blood cells by electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, n. 8, p. 888-896, Aug 1997. ISSN 1076-5174. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997XQ56400012 >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. São Paulo: Sarvier, 2011.

NEURINGER, M.; ANDERSON, G. J.; CONNOR, W. E. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. **Annual Review of Nutrition**, v. 8, p. 517-41, 1988. ISSN 0199-9885 (Print)

0199-9885 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3060176> >.

NIKI, E. *et al.* Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4GX6G45-F/2/1b098364fcb005eeaadd6508ace145f> >.

O'BRIEN, J. S.; SAMPSON, E. L. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. **Journal of Lipid Research**, v. 6, n. 4, p. 545-551, Oct 1965. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5865383](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5865383) >.

OLIW, E. H. *et al.* Payne rearrangement during analysis of epoxyalcohols of linoleic and alpha-linolenic acids by normal phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 1, p. 111-26, Jul 1 2006. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16712763> >.

OLIW, E. H. *et al.* Analysis of novel hydroperoxides and other metabolites of oleic, linoleic, and linolenic acids by liquid chromatography mass spectrometry with ion trap MSn. **Lipids**, v. 33, n. 9, p. 843-852, Sep 1998. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <Go to ISI>://000076063400001 >.

OSTER, T.; PILLOT, T. Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, n. 8, p. 791-8, Aug 2010. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211757> >.

PACE-ASCIAK, C. R.; ASOTRA, S. Biosynthesis, catabolism, and biological properties of HPETEs, hydroperoxide derivatives of arachidonic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, n. 4, p. 409-33, 1989. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2514125> >.

PAGANONI, S. *et al.* Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 1, p. 20-4, Jul 2011. ISSN 1097-4598 (Electronic)

0148-639X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607987> >.

PHILIPS, T.; ROBBERECHT, W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. **Lancet Neurology**, v. 10, n. 3, p. 253-63, Mar 2011. ISSN 1474-4465 (Electronic)

1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349440> >.

PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 2, p. 201-43, Sep 2006. ISSN 0165-0173 (Print)

0165-0173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647138> >.

PICQ, M. *et al.* DHA Metabolism: Targeting the Brain and Lipoxygenation. **Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 1, p. 48-51, Aug 2010. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <Go to ISI>://000279371500008 >.

PORTER, N. A. *et al.* Unified mechanism for polyunsaturated fatty acid autoxidation. Competition of peroxy radical hydrogen atom abstraction, .beta.-scission, and cyclization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 21, p. 6447-6455, 1981. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja00411a032> >.

PRATICO, D. *et al.* 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1655-62, May 2004. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111312> >.

QIU, X. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 68, n. 2, p. 181-6, Feb 2003. ISSN 0952-3278 (Print)

0952-3278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538082> >.

REICH, E. E. *et al.* Brain regional quantification of F-ring and D-/E-ring isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 1, p. 293-297, Jan 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <Go to ISI>://000166325800033 >.

REVERBERI, M. *et al.* Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1935-1946, Feb 2010. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <Go to ISI>://000273978400028 >.

REYES, E. T. *et al.* Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, v. 63, n. 3, p. 317-24, Mar 1984. ISSN 0022-510X (Print)

0022-510X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6374040> >.

REYNAUD, D.; THICKITT, C. P.; PACEASCIAK, C. R. FACILE PREPARATION AND STRUCTURAL DETERMINATION OF MONOHYDROXY DERIVATIVES OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (HDOHE) BY ALPHA-TOCOPHEROL-DIRECTED AUTOXIDATION. **Analytical Biochemistry**, v. 214, n. 1, p. 165-170, Oct 1993. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://A1993MA04200025 >.

RIEDIGER, N. D. *et al.* A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 4, p. 668-679, Apr 2009. ISSN 0002-8223. Disponível em: < <Go to ISI>://000264729200013 >.

RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, p. 375-80, Feb 1964. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14169133> >.

RODRIGUEZ DE TURCO, E. B. *et al.* Systemic fatty acid responses to transient focal cerebral ischemia: influence of neuroprotectant therapy with human albumin. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 3, p. 515-24, Nov 2002. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390513> >.

ROWLAND, L. P.; SHNEIDER, N. A. Amyotrophic lateral sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 22, p. 1688-700, May 31 2001. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11386269](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11386269) >.

RUSSELL, G. A. Deuterium-Isotope Effects in the Autoxidation of Alkyl Hydrocarbons - Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 14, p. 3871-3877, 1957. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1957WB81300068 >.

RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 937-46, Mar 15 2009. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022225> >.

RYAN, A. S. Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 30, n. 5, p. 327-46, Nov 2000. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking).

SCHMITT, F. *et al.* A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 25, 2014. ISSN 1662-5102 (Electronic) 1662-5102 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600344> >.

SCHNEIDER, C. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 3, p. 315-321, 2009. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200800131> >.

SCHNEIDER, C. *et al.* Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 5, p. 473-88, May 2007. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524979> >.

SCOTT, B. L.; BAZAN, N. G. MEMBRANE DOCOSAHEXAENOATE IS SUPPLIED TO THE DEVELOPING BRAIN AND RETINA BY THE LIVER. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 8, p. 2903-2907, Apr 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://A1989U231400081 >.

SEAL, J. R.; PORTER, N. A. Liquid chromatography coordination ion-spray mass spectrometry (LC-CIS-MS) of docosahexaenoate ester hydroperoxides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 2, p. 1007-13, Sep 2004. ISSN 1618-2642 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15338093](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15338093) >.

SEO, J. S. *et al.* SK-PC-B70M alleviates neurologic symptoms in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. **Brain Research**, v. 1368, p. 299-307, Jan 12 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971081> >.

SERHAN, C. *et al.* Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. **Lipids**, v. 39, n. 11, p. 1125-1132, 2004. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-004-1339-7> >.

SERHAN, C. N. *et al.* Resolvins. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 8, p. 1025-1037, October 21, 2002. Disponível em: < <http://jem.rupress.org/content/196/8/1025.abstract> >.

SERHAN, C. N. *et al.* Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 15-23, Jan 16 2008. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103881> >.

SHIBATA, N. *et al.* Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Research Reviews**, v. 1019, n. 1-2, p. 170-7, Sep 3 2004. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306251> >.

SHINDE, D. D. *et al.* LC-MS/MS for the simultaneous analysis of arachidonic acid and 32 related metabolites in human plasma: Basal plasma concentrations and aspirin-induced changes of eicosanoids. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 911, p. 113-21, Dec 12 2012. ISSN 1873-376X (Electronic)

1570-0232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217314> >.

SIDDIQUI, R. A.; HARVEY, K.; STILLWELL, W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 153, n. 1, p. 47-56, May 2008. ISSN 0009-3084. Disponível em: <<Go to ISI>://000256654200006 >.

SMITH, W. L.; MURPHY, R. C. Oxidized lipids formed non-enzymatically by reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15513-15514, Jun 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://000256332500001 >.

SPECTOR, A. A. Essentiality of fatty acids. **Lipids**, v. 34, p. S1-S3, 1999. ISSN 0024-4201. Disponível em: <<Go to ISI>://000081389000001 >.

STOLKER, A. A. *et al.* Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 4, p. 955-63, Feb 2004. ISSN 1618-2642 (Print). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14564445> >.

STRATTON, S. P.; LIEBLER, D. C. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol. **Biochemistry**, v. 36, n. 42, p. 12911-12920, 1997. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/bi9708646> >.

SUN, Y. *et al.* Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9323-9334, March 30, 2007 2007. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/282/13/9323.abstract> >.

SURETTE, M. E. The science behind dietary omega-3 fatty acids. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 2, p. 177-80, 2008. Disponível em: <<http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/18195292> >.

SVENNERHOLM, L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. **Journal of Lipid Research**, v. 9, n. 5, p. 570-9, 1968. ISSN 0022-2275. Disponível em: <<Go to ISI>://A1968B737200004 >.

TAGUCHI, R. *et al.* Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 823, n. 1, p. 26-36, 2005. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6X0P-4GH49WP-7/2/ebef12682b059f07eca8f5522682d144> >.

TERAO, J.; MATSUSHITA, S. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty-acid esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 54, n. 6, p. 234-238, 1977. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<Go to ISI>://A1977DJ79600020 >.

THONHOFF, J. R. *et al.* Identification of early disease progression in an ALS rat model. **Neuroscience Letters**, v. 415, n. 3, p. 264-8, Mar 30 2007. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17280785](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17280785) >.

TRAUB, R.; MITSUMOTO, H.; ROWLAND, L. P. Research advances in amyotrophic lateral sclerosis, 2009 to 2010. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 11, n. 1, p. 67-77, Feb 2011. ISSN 1534-6293 (Electronic)

1528-4042 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21080240](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21080240) >.

TURNER, M. R. *et al.* Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 1, p. 94-109, Jan 2009. ISSN 1474-4422 (Print)

1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19081518> >.

UMENO, A. *et al.* Singlet oxygen induced products of linoleates, 10- and 12-(Z,E)-hydroxyoctadecadienoic acids (HODE), can be potential biomarkers for early detection of type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63542, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23691063> >.

VAN LIEFDE, I.; VAN WITZENBURG, A.; VAUQUELIN, G. Multiple beta adrenergic receptor subclasses mediate the 1-isoproterenol-induced lipolytic response in rat adipocytes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 262, n. 2, p. 552-8, Aug 1992. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1323652> >.

VANROLLINS, M.; MURPHY, R. C. Autooxidation of docosahexaenoic acid - analysis of 10 isomers of hydroxydocosahexaenoate. **Journal of Lipid Research**, v. 25, n. 5, p. 507-517, 1984. ISSN 0022-2275. Disponível em: <<Go to ISI>://A1984SS25500010 >.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 6, p. 697-738, Dec 2000. ISSN 0163-769X (Print)

0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133069> >.

WALL, R. *et al.* Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 280-289, May 2010. ISSN 0029-6643. Disponível em: <<Go to ISI>://000277168900003 >.

WENK, M. R. The emerging field of lipidomics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 7, p. 594-610, July 1, 2005 2005. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052242> >.

WEST, M. *et al.* The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 1, p. 133-43, Oct 2004. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15379894](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15379894) >.

WILSON, R. *et al.* Quantitative gas chromatography-mass spectrometry isomer-specific measurement of hydroxy fatty acids in biological samples and food as a marker of lipid peroxidation. **Analytical Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 76-85, 1997. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6W9V-45MH24Y-8S/2/33ba381cc095e350e9ee8dee1fab01d> >.

WU, G. S.; RAO, N. A. Activation of NADPH oxidase by docosahexaenoic acid hydroperoxide and its inhibition by a novel retinal pigment epithelial protein. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 40, n. 5, p. 831-9, Apr 1999. ISSN 0146-0404 (Print)

0146-0404 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102279> >.

XU, L.; DAVIS, T. A.; PORTER, N. A. Rate constants for peroxidation of polyunsaturated fatty acids and sterols in solution and in liposomes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 36, p. 13037-13044, 2009. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja9029076> >.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944-72, Oct 12 2011. ISSN 1520-6890 (Electronic)

0009-2665 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21861450](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21861450) >.

YOSHIDA, Y. *et al.* Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid, hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols

from physiological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 105-15, Aug 1 2008. ISSN 1096-0309 (Electronic)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18482573](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18482573) >.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40421998000600020&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000600020&nrm=iso) >.

ZHANG, B.; SAKU, K. Control of matrix effects in the analysis of urinary F2-isoprostanes using novel multidimensional solid-phase extraction and LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 3, p. 733-44, Mar 2007. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215547> >.

## **7. ANEXOS**



Universidade de São Paulo  
Instituto de Química

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "LIPÍDEOS MODIFICADOS E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS: ESTUDO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO", desenvolvido sob responsabilidade da **Profa. Dra. Sayuri Miyamoto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA), do IQ-USP, em 22/12/2009.

We attest that the project entitled "LIPÍDEOS MODIFICADOS E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS: ESTUDO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO", developed under the responsibility of **Dra. Sayuri Miyamoto**, is agreement with the Ethical Principals in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 12/22/2009.

São Paulo, 22 de dezembro de 2009

---

Profa. Dra. Nadja C. de Souza P. Lardner  
Coordenadora CECUA



Universidade de São Paulo  
Instituto de Química

## CERTIFICADO Nº 14/2013

Certifico que o Projeto "*Lipídeos modificados e implicações biológicas: estudo dos produtos de oxidação do ácido docosahexaenóico*", desenvolvido sob responsabilidade da **Profa. Dra. Sayuri Miyamoto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 16/05/2013.

We attest that the project entitled "*Lipídeos modificados e implicações biológicas: estudo dos produtos de oxidação do ácido docosahexaenóico*", developed under the responsibility of Dr. **Sayuri Miyamoto**, is in agreement with the National Council for Control of Animal Experimentation and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, on 05/13/2013.

São Paulo, 16 de maio de 2013

---

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto  
Coordenadora CEUA

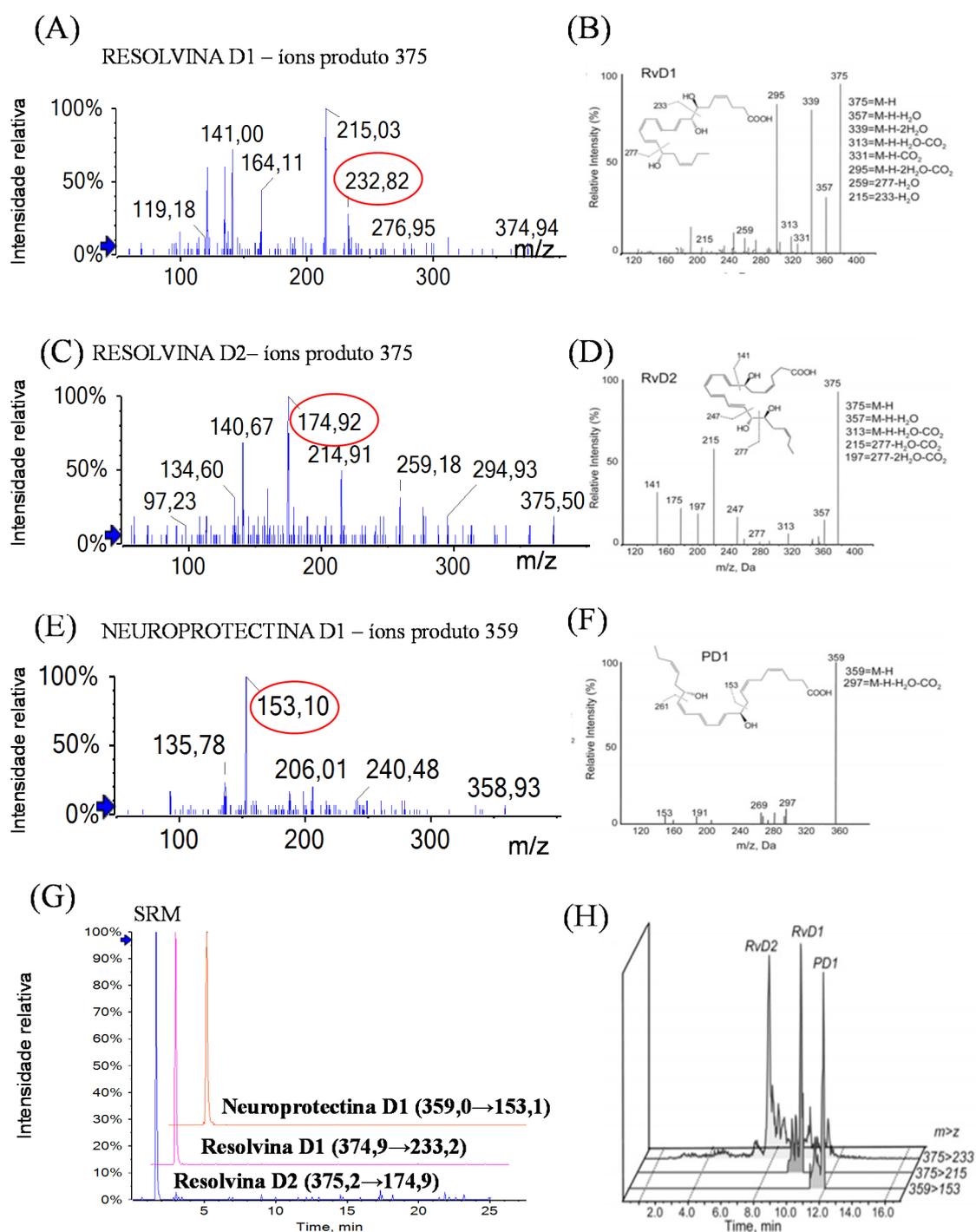
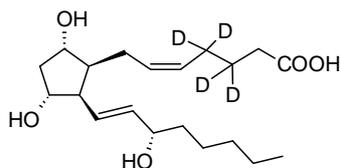


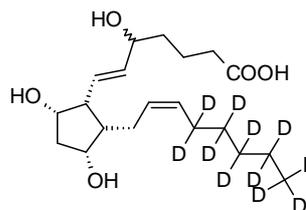
Figura A 1: Desenvolvimento do método de monitoramento SRM das resolvinas D1 e D2 e da neuroprotectina D1, conhecidos produtos de oxidação enzimática do DHA. Cada um dos analitos foi sujeito à fragmentação do íon precursor. A fragmentação obtida para (A) resolvina D1, (C) resolvina D2 e (E) neuroprotectina D1 foi comparada com a fragmentação já descrita na literatura, (B), (D) e (F) respectivamente. Através da análise dos espectros as melhores transições foram selecionadas para a montagem do método de monitoramento por SRM. Fonte de (B, D, F e H): FONTE: [\(Claria et al., 2012\)](#)

(A) estrutura



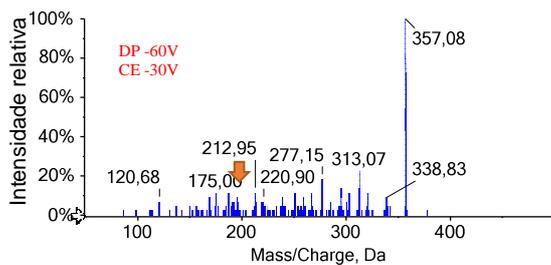
8-iso Prostaglandin F<sub>2α</sub>-d<sub>4</sub>

(B) estrutura

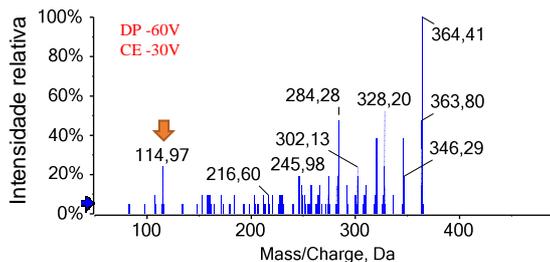


8,12-iso-isoprostane F<sub>2α</sub>-VI-d<sub>11</sub>

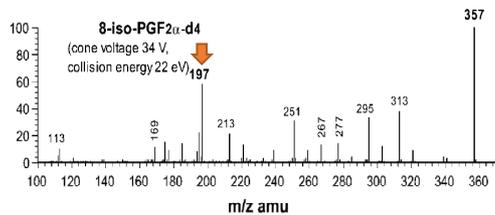
(C) ions produto de 357



(D) ions produto de 364

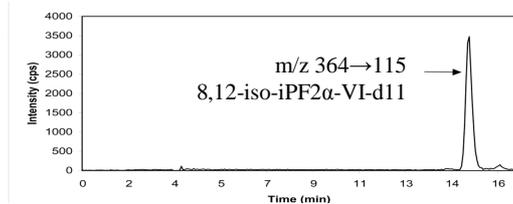


(E) referências



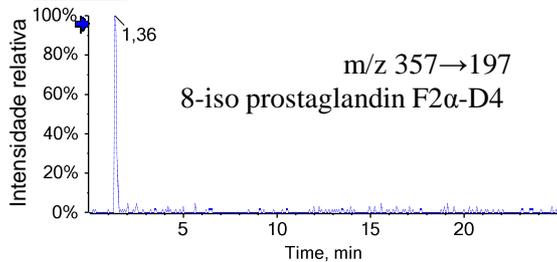
Fonte: ZHANG, B; SAKU, K. Control of matrix effects in the analysis of urinary F<sub>2</sub>-isoprostanes using novel multidimensional solid phase extraction and LC-MS/MS. J. Lipid Res. 2007, 48:733-744

(F) referências



Fonte: KORECKA, M.; CLARK, C. M.; LEE, V. M.-Y.; TROJANOWSKI, J. Q.; SHAW, L. M. Simultaneous HPLC-MS-MS quantification of 8-iso-PGF<sub>2α</sub> and 8,12-iso-iPF<sub>2α</sub> in CSF and brain tissue samples with on-line cleanup. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 August 15; 878(24): 2209-2216.

(G) SRM



(H) SRM

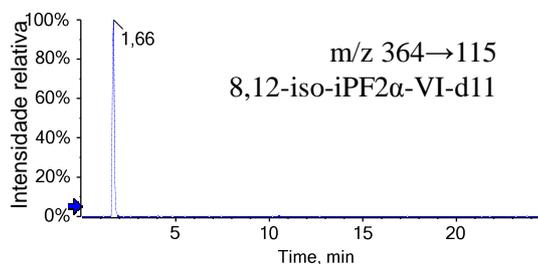


Figura A 2: Desenvolvimento do método de monitoramento SRM das isoprostanos: 8-isoprostaglandina F<sub>2α</sub>-d<sub>4</sub> e 8,12-iso-iPF<sub>2α</sub>-d<sub>11</sub>. As transições escolhidas seguiram as transições já descritas na literatura (Zhang e Saku, 2007; Korecka et al., 2010)

Tabela A 1: Parâmetros otimizados para a análise dos compostos do primeiro período do monitoramento no 4000Qtrap.

Composto	Q1	Q3	Dwell time (mseg)	DP	CE	CXP
Resolvina D1	374.9	141.2	150	-60	-20	-39
Resolvina D1	374.9	214.9	150	-65	-26	-3
Resolvina D2	375.2	174.9	150	-50	-32	-11
Resolvinas	375.2	233.2	150	-70	-22	-3
Neuroprotectina D1	359.0	153.1	150	-70	-24	-3
8-iso-PGF2alfa	353.0	193.0	150	-75	-38	-13
8,12-iso-IPF2alfa	353.1	115.1	150	-70	-32	-5
8-iso-PGF2alfa-d4	357.0	197.0	150	-75	-38	-13
8,12-iso-IPF2afa-d11	364.1	115.0	150	-70	-32	-5

Q1 – massa do íon precursor; Q3 – massa do ion produto selecionado para o método de SRM; *dwell time* – tempo de aquisição da transição por ciclo de análise; DP (“*declustering potential*” – diferença de potencial aplicado entre o Q0 e a orifice plate que auxilia na dessolvatação do spray e formação dos íons), CE - energia de colisão e CXP - potencial de colisão na saída da cela de colisão.

Tabela A 2: Parâmetros otimizados para a análise dos compostos do segundo período do monitoramento no 4000Qtrap (HpDoHE)

Composto	Q1	Q3	Dwell time (mseg)	DP	CE	CXP
20-HpDoHE	359.0	70.9	25	-55	-30	-11
20-HpDoHE (KDoHE)	341.0	70.9	25	-85	-30	-11
19-HpDoHE	359.0	83.0	25	-65	-22	-19
19-HpDoHE (KDoHE)	341.0	83.0	25	-80	-20	-1
17-HpDoHE	359.0	111.0	25	-65	-14	-3
17-HpDoHE (KDoHE)	341.0	111.0	25	-75	-14	-3
16-HpDoHE	359.0	232.9	25	-65	-20	-7
16-HpDoHE (KDoHE)	341.0	232.9	25	-85	-20	-7
14-HpDoHE	359.0	151.0	25	-60	-30	-9
14-HpDoHE (KDoHE)	341.0	151.0	25	-90	-18	-9
13-HpDoHE	359.0	121.1	25	-65	-14	-3
13-HpDoHE (KDoHE)	341.0	121.1	25	-85	-20	-1
11-HpDoHE	359.0	242.8	25	-65	-24	-1
11-HpDoHE	359.0	149.0	25	-70	-24	-1
10-HpDoHE	359.0	161.0	25	-60	-16	-9
10-HpDoHE (KDoHE)	341.0	161.0	25	-85	-16	-9
8-HpDoHE	359.0	171.1	25	-60	-18	-7
8-HpDoHE	359.0	108.0	25	-65	-18	-7
7-HpDoHE	359.0	201.1	25	-65	-18	-3
7-HpDoHE (KDoHE)	341.0	201.1	25	-85	-18	-3
5-HpDoHE	359.0	68.6	25	-40	-16	-5
5-HpDoHE	359.0	99.0	25	-60	-16	-5
4-HpDoHE	359.0	115.0	25	-55	-16	-3
4-HpDoHE (KDoHE)	341.0	115.0	25	-75	-16	-3

Tabela A 3: Parâmetros otimizados para a análise dos compostos do segundo período do monitoramento no 4000Qtrap (HDoHE)

Composto	Q1	Q3	Dwell time (mseg)	DP	CE	CXP
20-HDoHE	343.0	285.0	25	-40	-20	-23
20-HDoHE	343.0	241.0	25	-40	-20	-23
19-HDoHE	343.0	228.9	25	-80	-20	-1
19-HDoHE	343.0	272.9	25	-90	-20	-1
17-HDoHE	343.0	245.0	25	-80	-20	-5
17-HDoHE	343.0	201.9	25	-55	-20	-5
16-HDoHE	343.0	233.0	25	-75	-20	-5
16-HDoHE	343.0	260.9	25	-70	-20	-5
14-HDoHE	343.0	205.0	25	-70	-18	-15
14-HDoHE	343.0	161.0	25	-65	-18	-15
13-HDoHE	343.0	192.8	25	-85	-24	-5
13-HDoHE	343.0	221.1	25	-85	-24	-5
11-HDoHE	343.0	149.0	25	-65	-18	-7
11-HDoHE	343.0	165.0	25	-75	-18	-7
10-HDoHE	343.0	153.0	25	-70	-24	-1
10-HDoHE	343.0	161.0	25	-85	-26	-1
8-HDoHE	343.0	189.0	25	-70	-18	3
8-HDoHE	343.0	109.0	25	-80	-22	-5
7-HDoHE	343.0	113.0	25	-70	-18	-3
7-HDoHE	343.0	141.0	25	-70	-22	-5
5-HDoHE	343.0	281.0	25	-65	-14	-7
5-HDoHE	343.0	93.0	25	-65	-20	-3
5-HDoHE	343.0	85.0	25	-65	-18	-5
4-HDoHE	343.0	101.0	25	-75	-20	-5
4-HDoHE	343.0	115.0	25	-75	-20	-5

Tabela A 4: Parâmetros otimizados para a análise dos compostos do segundo período do monitoramento no 4000Qtrap (HpETE e HETE)

Composto	Q1	Q3	Dwell time (mseg)	DP	CE	CXP
15-HpETE	335.0	113.1	25	-70	-18	-5
14-HpETE	335.0	125.1	25	-65	-18	-1
12-HpETE	335.0	179.2	25	-70	-20	-5
11-HpETE	335.0	167.1	25	-70	-22	-5
9-HpETE	335.0	219.2	25	-70	-14	-1
9-HpETE	335.0	219.1	25	-70	-16	-3
8-HpETE	335.0	163.1	25	-90	-28	-1
8-HpETE (KETE)	317.0	163.1	25	-90	-28	-1
6-HpETE	335.0	191.1	25	-65	-16	-5
6-HpETE	335.0	233.0	25	-70	-16	-9
5-HpETE	335.0	203.1	25	-70	-18	-1
5-HpETE (KETE)	317.0	203.1	25	-90	-28	-3
15-HETE	319.0	219.0	25	-90	-20	-3
14-HETE	319.0	207.0	25	-85	-22	-5
12-HETE	319.0	179.0	25	-75	-20	-9
11-HETE	319.0	167.0	25	-85	-22	-1
9-HETE	319.0	151.0	25	-75	-22	-1
8-HETE	319.0	155.0	25	-80	-22	-9
6-HETE	319.0	191.0	25	-90	-24	-3
5-HETE	319.0	115.0	25	-85	-22	-9
HETE -H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub>	319.0	257.0	25	-85	-22	-5
5-HETE-d8	327.0	116.0	25	-80	-22	-3
12-HETE-d8	327.0	184.0	25	-75	-22	-5

*Tabela A 5: Parâmetros otimizados para a análise dos compostos do segundo período do monitoramento no 4000Qtrap (HpETE e HETE)*

Composto	Q1	Q3	Dwell time (mseg)	DP	CE	CXP
13-HpODE	311.0	113.0	25	-65	-24	-5
11-HpODE	311.0	165.0	25	-65	-22	-1
10-HpODE	311.0	153.0	25	-70	-24	-1
9-HpODE	311.0	185.0	25	-65	-22	-11
13-HODE	295.0	195.0	25	-95	-26	-3
12-HODE	295.0	111.0	25	-100	-30	-5
12-HODE	295.0	211.0	25	-95	-30	-3
10-HODE	295.0	113.0	25	-95	-32	-5
10-HODE	295.0	155.0	25	-95	-30	-7
9-HODE	295.0	171.0	25	-95	-26	-9

Tabela A 6: Avaliação da precisão e exatidão intra- e interdia para os HpDoHE.

Isômero	Concentração esperada (ng/μL)	Intradia (n=3)		Interdia (n=9)	
		Precisão (CV%)	Exatidão (%)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
<b>20-HpDoHE</b>	39,3	24,0	18,6	21,3	17,1
	13,1	6,1	25,9	33,1	19,4
<b>19-HpDoHE</b>	15,2	11,0	22,9	10,5	23,0
	5,1	12,8	29,7	32,6	24,8
<b>17-HpDoHE</b>	9,5	8,7	23,6	17,5	22,0
	3,2	9,0	30,4	38,3	21,6
<b>16-HpDoHE</b>	15,2	18,3	21,1	18,0	19,5
	5,1	11,5	29,5	58,6	18,9
<b>14-HpDoHE</b>	11,4	8,4	25,0	14,0	23,0
	3,8	6,7	29,3	33,9	23,3
<b>13-HpDoHE</b>	11,4	23,1	20,5	20,2	18,9
	3,8	11,5	27,1	31,0	20,4
<b>11-HpDoHE</b>	9,5	36,6	22,2	23,6	21,0
	3,2	10,0	33,5	29,1	25,6
<b>10-HpDoHE</b>	9,5	19,8	22,7	15,3	21,6
	3,2	15,7	35,8	34,6	26,7
<b>8-HpDoHE</b>	9,5	24,7	20,7	14,8	21,8
	3,2	14,4	30,5	29,8	25,5
<b>7-HpDoHE</b>	12,6	18,7	19,6	25,0	17,6
	4,2	12,3	39,8	59,1	23,3
<b>5-HpDoHE</b>	2,9	19,7	20,4	19,9	23,2
	1,0	44,2	27,2	59,5	21,5
<b>4-HpDoHE</b>	3,8	16,4	22,8	9,8	22,8
	1,3	3,5	29,5	29,0	26,1

Exatidão = concentração obtida\*100/concentração esperada (%); Precisão = desvio padrão relativo dos valores obtidos (%)

Tabela A 7: Avaliação da precisão e exatidão intra- e interdia para os HDoHE.

Isômero	Concentração esperada (ng/μL)	Intradia (n=3)		Interdia (n=9)	
		Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
20-HDoHE	24,1	3,0	43,4	12,1	48,2
	12,0	8,6	51,8	5,7	52,8
19-HDoHE	10,7	0,4	45,6	11,7	50,1
	5,3	13,7	56,3	8,4	56,2
17-HDoHE	5,2	5,8	69,5	11,5	76,5
	2,6	12,9	79,0	9,2	80,7
16-HDoHE	5,2	2,3	58,1	11,1	63,3
	2,6	16,8	66,3	9,6	68,8
14-HDoHE	5,2	1,9	64,9	11,0	70,2
	2,6	16,6	73,9	7,4	77,0
13-HDoHE	5,2	0,6	64,3	11,7	70,5
	2,6	12,7	72,6	8,8	75,7
11-HDoHE	10,3	0,4	68,9	10,1	75,0
	5,2	17,3	75,8	9,4	77,4
10-HDoHE	8,6	4,9	66,0	8,3	69,6
	4,3	14,2	73,7	8,1	75,3
8-HDoHE	3,4	3,9	66,8	12,9	74,5
	1,7	13,4	72,6	8,9	75,0
7-HDoHE	5,2	4,7	62,5	12,3	69,0
	2,6	11,0	72,1	6,8	72,3
5-HDoHE	0,8	5,1	54,1	14,1	60,0
	0,4	20,8	53,3	14,8	58,9
4-HDoHE	2,4	0,0	70,8	12,8	78,8
	1,2	12,8	83,3	6,9	86,2

Tabela A 8: Avaliação da precisão e exatidão intra- e interdia para os produtos de oxidação do LA.

Isômero	Concentração esperada (ng/μL)	Intradia (n=3)		Interdia (n=9)	
		Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
13-HpODE	31,2	19,4	3,6	70,5	6,0
	3,9	24,5	5,5	56,6	8,0
12-HpODE	31,2	41,0	14,4	56,6	25,3
	3,9	22,5	11,9	52,3	15,2
10-HpODE	31,2	36,3	18,9	54,3	34,6
	3,9	54,9	5,5	100,1	15,9
9-HpODE	31,2	30,7	3,3	73,1	6,8
	3,9	25,1	12,47	141,9	4,5
13-HODE	5,9	0,0	35,0	0,0	35,0
	0,7	0,0	35,0	0,0	35,0
12-HODE	2,1	4,2	473,7	17,6	399,7
	0,3	14,4	359,2	32,5	261,1
10-HODE	2,1	12,4	378,0	33,7	284,6
	0,3	20,5	323,4	39,7	220,7
9-HODE	2,1	13,2	504,7	38,4	366,4
	0,3	15,3	454,8	39,9	307,2

Tabela A 9: Avaliação da precisão e exatidão intra- e interdia para os produtos de oxidação do AA.

Isômero	Concentração esperada (ng/μL)	Intradia (n=3)		Interdia (n=9)	
		Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
15-HETE	0,6	9	114	8	106
	0,1	13	93	19	82
12-HETE	0,6	6	167	8	155
	0,1	7	101	14	108
11-HETE	0,6	7	130	8	121
	0,1	12	79	15	78
8-HETE	0,6	9	141	9	132
	0,1	18	86	16	76
5-HETE	0,6	5	103	7	100
	0,1	17	56	24	63