



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Evaluación de isoprostanos como indicador del efecto
antioxidante de selenio en rumiantes**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:
GABRIELA RODRÍGUEZ PATIÑO

TUTOR: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO (FESC-UNAM)

COMITÉ TUTORAL:
DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA (FESC-UNAM)
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE (IIB- UNAM)

CUAUTITLÁN IZCALLI; ESTADO DE MÉXICO, SEPTIEMBRE

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo del proyecto PAPIIT clave IN218115 cuyo título es "Evaluación de isoprostanos como indicador de estrés oxidativo y de deficiencias de selenio" y a la beca 349129 otorgada por CONACyT

Gracias a DIOS, a mi familia, amigos y colegas.

*Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras
sobran.*



ÍNDICE

	Pág.
Índice de Tablas.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
I.-Marco teórico.....	10
I.1 Isoprostanos.....	10
I.1.1 Formación.....	10
I.1.2 Técnicas para cuantificar isoprostanos	16
I.2 Selenio.....	19
I.2.1 Metabolismo del Selenio.....	22
I.2.2 Deficiencia de selenio en rumiante.....	25
I.2.3 Suplementación de selenio en rumiantes.....	28
II. Hipótesis.....	30
III. Objetivos.....	31
IV. Desarrollo experimental.....	32
V. Resultados y discusión.....	40
VI. Conclusiones.....	62
VII. Perspectivas.....	63
VIII. Referencias.....	64
IX. Anexos.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.- Principales características de isoprostanos 8-iso-PGF 2α y la prostaglandina PGF 2α	11
Tabla 2.- Principales Isoprostanos evaluados en muestras biológicas.....	14
Tabla 3.- Se muestran los niveles de isoprostanos (8-iso-PGF 2α en fluidos biológicos en diversas especies.....	17
Tabla 4.- Principales selenoproteínas y su función.....	21
Tabla 5.- Gradiente de elución optimizado	35
Tabla 6.- Formulación de bolos de liberación modificada, se muestra en porcentaje la cantidad de componente	37
Tabla 7.- Evaluaciones físicas de los bolos elaboraos vía granulación por fusión.....	40
Tabla 8.- Parámetros MS optimizados para cada analito	41
Tabla 9.- Variables que se estudiaron para la optimización de las condiciones cromatografías en la cuantificación de 8-iso-PGF 2α	42
Tabla 10.- Porcentajes de recobro de plasmas adicionados con estándar.....	47
Tabla 11.- Resultados de la evaluación de la precisión y exactitud del método.....	54
Tabla 12.- Comparación de métodos para cuantificar 8-iso-PGF 2α	55
Tabla 13.- Áreas de estándares de 8-isoPGF α en la evaluación de adecuabilidad del sistema.....	71
Tabla 14.- Estándar de 1050 pg/ml a diferentes condiciones se reporta el promedio de áreas relacionando las áreas con un estándar recién preparado (n=3).....	71
Tabla 15.- Resultados de la evaluación de linealidad del sistema.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Extraída de Yin et al., 2005, Se muestra el mecanismo de formación de isoprostanos.....	12
Figura 2.- Extraída de Yin et al., 2005. Se muestran las cuatro familias de los F ₂ IsoP, serie 5, 8, 12, 15 en base al sitio del radical hidroxilo.....	13
Figura 3.- Ciclo catalítico de Glutación peroxidasa (GSH-PX) (figura obtenida de Huijun Yu et al., 2005).....	19
Figura 4.- Ruta metabólica de selenio. Figura basada y adaptada de: (Driscoll & Copeland, 2003; Salinas, 2010).....	23
Figura 5.- Radiografía de cabra después de 30 días de administración.....	40
Figura 6.- Cromatogramas de PGF ₂ α, 8-isoPGF ₂ α y mezcla, los tres primeros utilizando la columna CORTECS de 2,7 μm y los siguientes tres ACQUITY BEH UPLC® de 1,7μm.....	43
Figura 7.- Cromatogramas de mezcla de estándares de PGF ₂ α y 8-isoPGF ₂ α, en diferentes mezclas de dilución	43
Figura 8.- Cromatogramas de estándares (A) mezcla de PGF ₂ α y 8-iso-PGF ₂ α (1ng/mL), (B) PGF ₂ α, (C) 8-iso-PGF ₂ α y (D) 8-iso-PGF ₂ α-d4.....	44
Figura 9.- Estructura de los cartuchos Oasis ® MAX.....	45
Figura 10.- Diagrama de tratamiento de muestra de plasma.	45
Figura 11.-Esquema del proceso de extracción en fase solida (SPE) y variables evaluadas para la optimización en la cuantificación de 8-iso-PGF ₂ α.....	46
Figura 12.- Protocolo para la extracción de 8-iso-PGF ₂	48
Figura 13.- Cromatogramas de muestras de plasma de pequeño rumiante, (A) muestra plasma de ovino, (B) muestra plasma de cabra gestante, (C) muestra plasma cabra joven ** número de iones detectados del pico más alto.....	49
Figura 14.- Cromatogramas de muestras de plasma de diferentes pequeños rumiantes para la evaluación de selectividad (A-G) y blanco de solvente (H).....	50
Figura 15.- Cromatograma de 8-iso-PGF ₂ α 10 pg/mL, cálculo del límite de detección con la relación (S/N signal/noise).....	51

Figura 16.- Cromatograma de 8-iso-PGF2 α 20 pg/mL, cálculo del límite de cuantificación con la relación (S/N signal/noise)..... 52

Figura 17.-.- Curvas de calibración se presenta la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de determinación (R^2) 8-iso-PGF2 α estándar en mezcla de elución (A) y 8-iso-PGF2 α en plasma de pequeño rumiante..... 53

Figura 18.- Concentraciones plasmáticas promedio +/- error estándar de 8-isoPGF2 α en los grupos experimentales..... 56

Figura 19.- Análisis estadístico de la concentración de 8-isoPGF2 α en plasma de cabra en los tres diferentes grupos experimentales: No Tratados (NT), Bolo (B) y Parenteral (P)..... 56

Figura 20.- Concentraciones promedio de selenio en paquete globular en los grupos experimentales. 58

Figura 21.- Análisis estadístico de la concentración de selenio en paquete globular de cabra en los tres diferentes grupos experimentales: No Tratados (NT), Bolo (B) y Parenteral (P). 58

Figura 22.- Correlación de la cantidad de selenio vs cantidad de isoprostanos..... 60

ABREVIATURAS

COX1	Ciclooxigenasa 1
COX2	Ciclooxigenasa 2
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
EROs	Especies Reactivas del Oxígeno
ESeH	Selenol
ESeOH	Ácido selénico
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSH-PX	Glutación Peroxidasa
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ Se	Seleniuro
LOP	Lipoperoxidación
NADPH	Adenina-Dinucleótido-Fosfato reducido
NADP	Adenina-Dinucleótido-Fosfato oxidado
Redox	Oxido reducción
ROH	Alcohol
ROOH	Hidroperóxido
UGA	Codón Uracilo-Guanina-Adenina
GS-Se-SG	Selenodiglutación
CH ₃ SeH	Metioselenol
(CH ₃) ₂ Se	Dimetilselenol
(CH ₃) ₃ Se ⁺	Trimetilselenol
Sec	Selenocisteína
Ser	Serina
tARN	Ácido Ribonucleico de transferencia
DMH	Duchenne Muscular Dystrophy
BMD	Becker Muscular Dystrophy
DOX	Doxorubicin
TBHP	Terbutil-hidroperóxido
SPE	Extracción en Fase Sólida
UPLC-MS/MS	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas en tándem

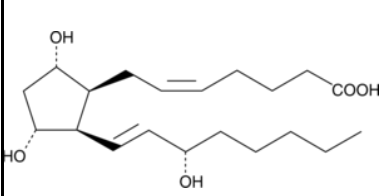
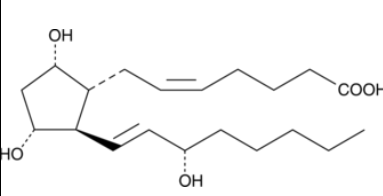
RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue evaluar los niveles plasmáticos de isoprostanos y compararlos con respecto a las concentraciones de selenio en cabras en el supuesto de que si las cabras eran tratadas con un suplemento de selenio, la concentración de isoprostanos en plasma presentaría cambios significativos con respecto a las cabras no tratadas. Para lo cual primero se desarrolló y validó un método para la cuantificación de 8-iso-PGF 2α , utilizando micro extracción en fase sólida con placas Oasis®MAX μ Elution y cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS/MS), se realizó una curva de calibración de muestras de plasma fortificadas con estándares de 5 niveles de concentración en un rango de 49-639 pg/mL. La recuperación media fue de 89% con una desviación estándar de 10.73%, se evaluó la precisión inter-día obteniendo un CV menor al 15% el límite de cuantificación fue de 20 pg/mL y el límite de detección fue de 10 pg/mL, el método desarrollado es preciso, exacto y confiable. Para la suplementación de selenio se elaboraron bolos de liberación modificada vía granulación por fusión y se adquirió una solución de selenio inyectable, se utilizaron 20 cabras raza Alpina de cinco meses de edad, se distribuyeron de forma aleatoria en tres grupos y se administró el tratamiento (Grupo-bolo, Grupo parenteral y Grupo testigo) se tomaron muestras de sangre por punción de la vena yugular en un periodo de nueve semanas, se cuantificó la concentración de selenio en paquete globular utilizando espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros. Los resultados mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y los grupos con suplemento de selenio de la semana 2, 3, 7 y 8. Con respecto a la evaluación isoprostanos, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la semana 2 de estudio en los tres diferentes grupos experimentales, en la semana 3, 4 y 6 se observa diferencia de los grupos testigo y bolo con respecto al grupo parenteral en la semana 0 y 8 se observa diferencia del grupo bolo con respecto a los grupos testigo y parenteral. Al comparar las concentraciones de isoprostanos con respecto a las de selenio no se encontró una correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Palabras Clave: Selenio, pequeños rumiantes, lipoperoxidación, isoprostanos, LC-MS

En la Tabla 1 se presentan las principales características de la prostaglandina $\text{PGF}_2\alpha$ y el isoprostano $8\text{-iso-PGF}_2\alpha$, se observa que las principal diferencias entre la prostaglandina y el isoprostano además de su vía de formación es la conformación de su estructura, en la prostaglandina las cadenas laterales al ciclopentano están orientadas en forma *cis*, en cambio en el isoprostano las cadenas están orientadas en forma *trans*.

Tabla 1.- Principales características de isoprostanos $8\text{-iso-PGF}_2\alpha$ y la prostaglandina $\text{PGF}_2\alpha$.

	$8\text{-iso-PGF}_2\alpha$	$\text{PGF}_2\alpha$
Estructura		
No. CAS	27415-26-5	38562-01-5
Formula molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5 \cdot \text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$
Peso molecular	354.5	354.5
Solubilidad	100 mg/mL en etanol, DMSO, dimetil formamida	Agua, metanol
Formación	In Situ, en los fosfolípidos de la membrana celular por radicales libres	Vía enzimática

Los isómeros que se forman son específicamente de las series D, E y F de las prostaglandinas^[4-6], siendo la serie F2-Isoprostanos la más abundante, es decir los isómeros de las prostaglandinas F2. Los F2-Isoprostanos son moléculas estables y robustas detectables en tejidos y fluidos biológicos como plasma, orina, fluido cerebroespinal y bilis^[7].

En la Figura 1 se muestra el mecanismo de formación de los isoprostanos. El mecanismo inicia con la captación de un átomo de hidrogeno bis-alilo, seguido de la adición de una molécula de oxígeno al acido araquidónico para formar un radical peroxi, después la endociclación de los radicales ocurre seguido de la adición de otra molécula de hidrogeno, se forman endoperóxidos y estos son reducidos a F, D, E isoprostanos^[8,9].

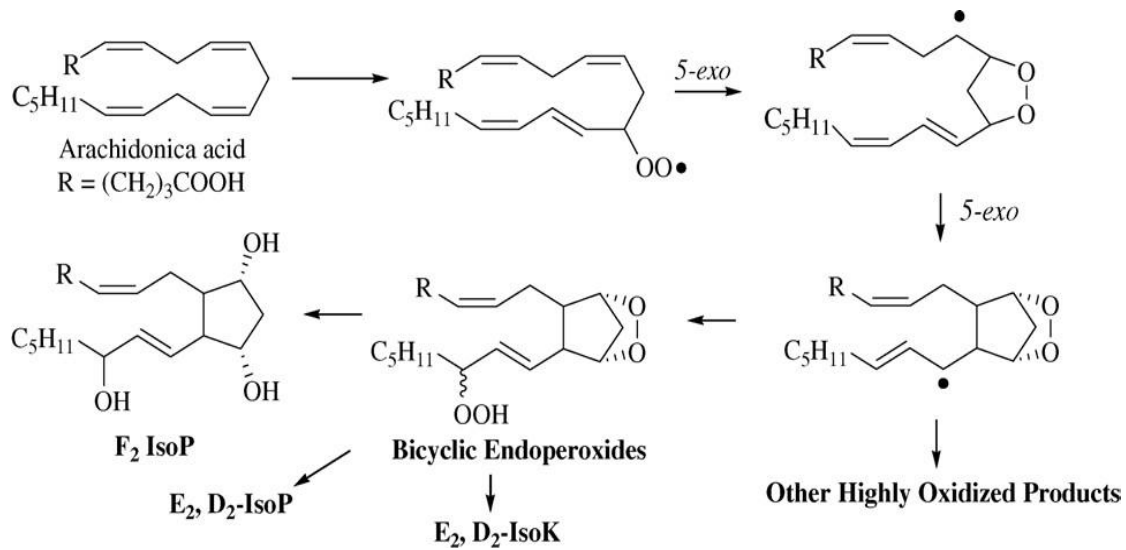


Figura 1.- Extraída de Yin et al.,2005^[10], Se muestra el mecanismo de formación de isoprostanos.

Los F₂-Isoprostanos se dividen en cuatro grupos, con base a la ubicación del grupo hidroxilo de su cadena lateral (Figura 2), cada uno de estos cuatro grupos, teóricamente tiene ocho diastereómeros por lo tanto pueden existir 64 isómeros de F₂-Isoprostanos en los que predominan las formas *cis* sobre los *trans*^[11]. Los F₂-Isoprostanos son moléculas estables y robustas detectables en tejidos y fluidos biológicos como plasma, orina, fluido cerebroespinal y bilis^[7]. Sin embargo, el iPF₂a-III (8-iso-PGF₂α, 15-F₂t-IsoP) es el isómero más comúnmente cuantificado (Tabla 2) debido a que es una de las especies predominantes, es considerado un excelente biomarcador validado para estrés oxidativo y deficiencia de antioxidantes in vivo^[4,12-14]. Muchos autores han utilizado el 8-iso-PGF₂α como biomarcador específico para estrés oxidativo al considerar que la única vía de formación de 8-iso-PGF₂α es por la peroxidación del ácido araquidónico en presencia de radicales libres (peroxidación lipídica química)^[4,12-15].

El 8-iso- PGF 2α también posee actividad biológica, puede participar como mediador de lesión oxidante^[16] actuar como mediador de lípidos en vasoconstricción y agregación plaquetaria, puede participar en señalización intracelular a través de la activación de receptores prostanoideos,^[17] aumentar la permeabilidad vascular, constricción del musculo liso gastrointestinal, traqueobronquial y uterino^[18], mitógeno de células de músculo liso, mediador de edema pulmonar, tromboxano plaquetario débil y agonista del receptor de endoperóxido^[19].

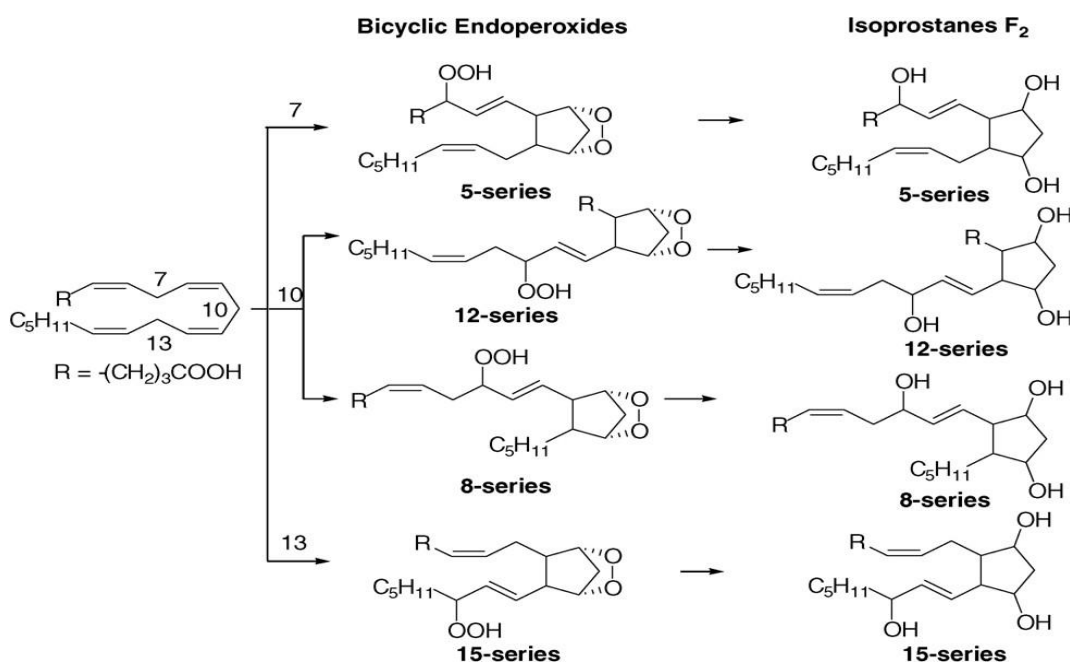
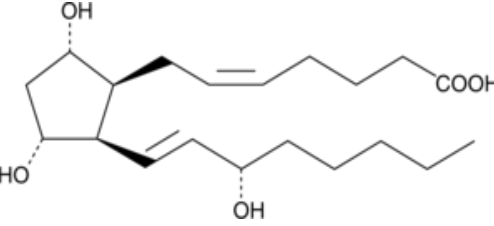
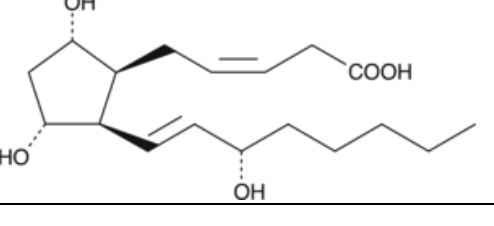
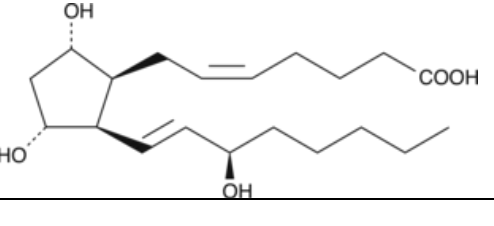


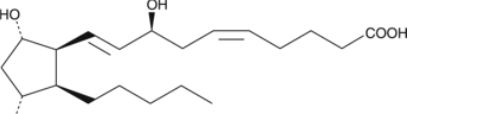
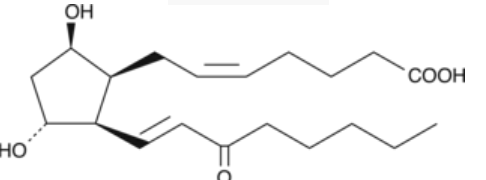
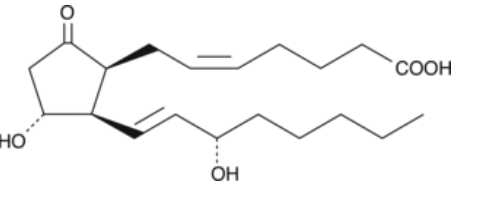
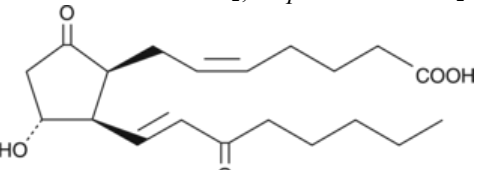
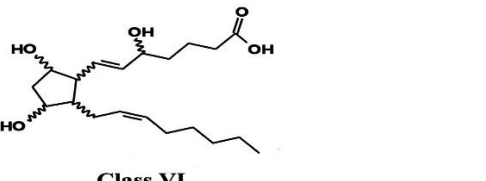
Figura 2.- Extraída de Yin et al., 2005 ^[10]. Se muestran las cuatro familias de los F₂IsoP, serie 5, 8, 12, 15, en base al sitio del radical hidroxilo.

El principal metabolito urinario de iPF_{2a}-III es el 2,3-dinor, 5,6-dihidro y es también un potente vasoconstrictor el 2,3-dinor-5,6-dihidro-8-iso-PGF es otro metabolito sin embargo el primero es el más abundante^[11].

Este metabolito cuantificado en orina ha mostrado ser una herramienta útil para evaluar la producción global de iPF2a-III más exactamente, la cuantificación de metabolitos en orina tiene varias ventajas 1) es una muestra no invasiva, 2) la preparación de la muestra es más simple comparada con tejidos y fluidos que contienen lípidos donde puede haber formación artificial^[14].

Tabla 2.- Principales Isoprostanos evaluados en muestras biológicas.

ISOPROSTANO	MUESTRA	TÉCNICA	REFERENCIA
<p style="text-align: center;">8-iso-PGF2α 15-F2t-isoprostane; 8-Isoprostane; 8-epi PGF2α; iPF2α-III (CAS 27415-26-5)</p> 	<p>Suero, plasma, orina, eritrocitos, sangre completa, tejido (hígado, pulmón, cerebro) Sangre seca, fluido espinal Placenta Aliento</p>	<p>Immunoensayo LC-MS GC-MS</p>	<p style="text-align: center;">[5,12-14,20-50]</p>
<p style="text-align: center;">2,3-dinor- 8-iso-PGF2α 2,3-dinor-8-iso Prostaglandin F2α 2,3-dinor-8-iso PGF2α; 2,3-dinor-iPF2α-III (CAS 221664-05-7)</p> 	<p style="text-align: center;">Orina</p>	<p style="text-align: center;">LC-MS GC-MS</p>	<p style="text-align: center;">[5,11,14,20,25,27,42,51]</p>
<p style="text-align: center;">2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-IsoP (15-F2t-IsoP-M)</p>	<p style="text-align: center;">Orina</p>	<p style="text-align: center;">LC-MS</p>	<p style="text-align: center;">[11]</p>
<p style="text-align: center;">2,3-dinor-8-iso-PGF1a</p>	<p style="text-align: center;">Orina</p>	<p style="text-align: center;">LC-MS</p>	<p style="text-align: center;">[28]</p>
<p style="text-align: center;">8-iso-15(R) -PGF2α 8-iso-15(R) Prostaglandin F2α F2α8-iso-15-epi PGF2α</p> 	<p style="text-align: center;">Plasma Orina Placenta</p>	<p style="text-align: center;">LC-MS</p>	<p style="text-align: center;">[5,21,24,33,34,41,52]</p>

<p style="text-align: center;">iPF_{2α}-IV</p> <p>(S),9α,11α-trihydroxy-1α,1β,1γ-trihomo-18,19,20-trinor-8β-prosta-2Z,6E-dien-1-oic acid</p> 	Plasma Placenta	LC-MS	[21,34,41]
<p>8-iso-15-keto Prostaglandin F_{2β}</p> <p>9β,11α-dihydroxy-15-oxo-(8β)-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid</p> 	Tejido plasma orina	LC-MS	[48]
<p style="text-align: center;">8-iso-PGE₂</p> <p style="text-align: center;">8-<i>epi</i> PGE₂; 8-<i>iso</i> PGE₂</p> 	Tejido plasma orina	LC-MS	[48]
<p style="text-align: center;">8-iso-15-keto PGE₂</p> <p style="text-align: center;">8-<i>iso</i>-15-keto PGE₂; 8-<i>epi</i>-15-keto PGE₂</p> 	Tejido plasma	LC-MS	[48]
<p style="text-align: center;">8,12-<i>iso</i>-iPF₂-VI</p>	Orina, Tejido Hígado, cerebro, Liquido espinal	LC-MS	[20,21,25,32,42,50]
<p style="text-align: center;">iPF(2α)-VI</p>  <p style="text-align: center;">Class VI</p>	Orina	LC-MS	[20,21,25]

El descubrimiento de los isoprostanos como productos no enzimáticos de la lipoperoxidación abrió una nueva era de investigación con respecto al rol de los agentes oxidantes en las patologías humanas, la cuantificación de isoprostanos como marcador exacto del estatus de estrés oxidativo in vivo [16]. La cuantificación de isoprostanos en fluidos biológicos es representativa de su producción endógena y por lo tanto da una alta precisión del grado de estrés oxidativo in vivo [7].

Se considera la medición de isoprostanos como el estándar de oro para la evaluación del daño oxidativo in vivo [53]. Además la evaluación de los isoprostanos puede ser aplicada al estudio de la eficacia de los alimentos, fármacos y antioxidantes [54].

I.1.2 Técnicas para cuantificar isoprostanos

Hasta el momento se han reportado tres técnicas para cuantificar isoprostanos (Tabla 2): 1) Inmunológicos, 2) Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS/MS) y 3) Cromatografía de líquidos acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS/MS).

1) Técnica inmunológica

Basada en la reacción específica antígeno-anticuerpo [3] son fáciles de preparar pero relativamente inespecíficos con más del 40% de variación y la reactividad cruzada con moléculas endógenas similares hace que la técnica tenga desventajas significativas [13,51]. Esta técnica no es aplicable para la evaluación simultánea de varios metabolitos [48].

2 y 3) Técnicas de espectrometría de masas

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos los iones se separan de acuerdo con su masa carga y detectado.

El proceso de la espectrometría de masas se fundamenta en:

- a) Ionización de la muestra
- b) Aceleración de la muestra por un campo eléctrico
- c) Dispersión de los iones según su masa/carga
- d) Detección de los iones y producción de la señal eléctrica

Plasma humano	Diabetes Mellitus tipo 2 310 pg/mL Control 237 pg/mL	[58]
Líquido amniótico	Control 73.8±36.6 pg/mL Subsecuente preclamsia 123.1±57.6 pg/mL	[59]
Plasma seminal	Normozoospermicos 6.95±2.10 ng/mL Astenozoospermicos 14.66±4.10 ng/mL Asthenoteratozoospermico 16.71±5.58 ng/mL Oligoasthenoteratozoospermico 3.42±8.36 ng/mL	[60]
Condensado de aliento	Trabajadores en minas 5 pg/mL Testigo 3 pg/mL	[35]
Plasma	Niños con autismo 103.27 ± 12.56 (pg/mL) Control 24.03 ± 2.65 (pg/mL)	[40]
Plasma	Ovinos 155.3 ± 67.2 (pg/mL) Ovinos daño pulmonar 1113.3 ± 645.2 (pg/mL)	[43]
Plasma ratón	Testigo 130 pg/mL CCl4 4520 pg/mL	[61]

En la tabla 3 se muestran los niveles de isoprostanos específicamente el 8-iso-PFG2α en diversas especies, se puede observar una diferencia entre especies así como una diferencia entre la misma especie dependiendo su estado de salud.

I.2. SELENIO

El selenio es un oligoelemento esencial, participa en una serie de funciones metabólicas vitales^[62]. En 1973 se especificó el rol biológico del selenio, con el descubrimiento de la primera Selenoproteína, se identificó al Selenio como centro activo de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px EC.1.11.1.9)^[63,64]. Actualmente es bien conocido que esta enzima funciona como antioxidante, catalizando la reducción de peróxidos, protegiendo los lípidos que constituyen las membranas y de otros componentes celulares contra el daño oxidativo^[65]. La GSH-Px, es una enzima homotetramérica que tiene cuatro subunidades idénticas con cuatro átomos de Selenio en forma de selenocisteína por cada molécula.

La GSH-Px actúa protegiendo las membranas celulares destruyendo agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos, los cuales pueden causar la desnaturalización irreversible de lípidos de membrana y proteínas celulares esenciales, dando lugar a degeneración y necrosis celular^[66].

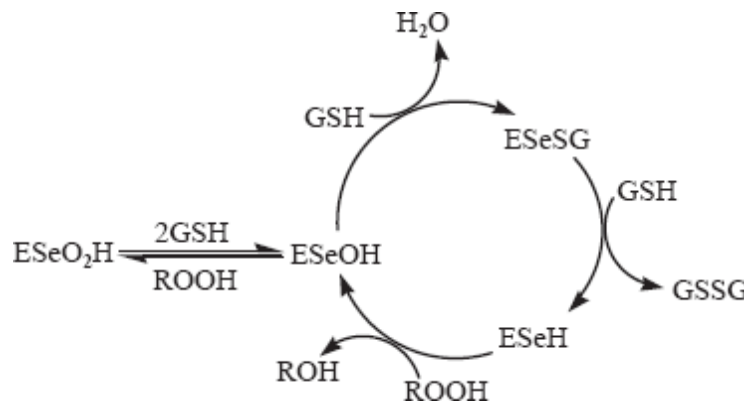


Figura 3.- Ciclo catalítico de Glutatión peroxidasa (GSH-PX) (figura obtenida de Huijun Yu et al., 2005)^[65].

La GSH-Px interviene en la oxidación del glutatión reducido hasta disulfuro de glutatión, utilizando los equivalentes reductores resultantes para convertir los hidroperóxidos en alcoholes que provocan lesiones menores.

En el ciclo catalítico de la GSH-PX, (Figura 3) el selenol (ESeH) de la selenocisteína es oxidado por peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos a ácido selénico (ESeOH) el cual reacciona con glutatión reducido (GSH) para formar el aducto selenenyl-sulfuro (ESeSG). Finalmente el ataque de un segundo equivalente de glutatión reducido a ESeSG regenera la actividad de la enzima y simultáneamente se produce glutatión oxidado (GSSG). En general en todo el ciclo catalítico, dos equivalentes de glutatión son oxidados a disulfuro y agua, mientras que el hidroperóxido es reducido al correspondiente alcohol. Aunque el ácido selénico podría también formarse en presencia de altas concentraciones de hidroperóxido ^[65].



Hasta el momento ha sido descrito un número creciente de selenoproteínas las cuales cumplen funciones catalíticas, estructurales y de transporte, implicadas en diferentes procesos metabólicos ^[67-69]. Las selenoproteínas son una familia de proteínas que tienen la característica en común de contener selenocisteína el aminoácido 21, la incorporación de selenocisteína ocurre durante la traducción de selenoproteínas por el codón UGA, el cual normalmente es específico para la terminación de la traducción ^[70].

Tabla 4.- Principales selenoproteínas y su función (Stoytcheva et al., 2009; Kasaikina 2012; Grundner, 2001) ^[71-73]

SELENOPROTEÍNAS	RESIDUOS DE SELENOCISTEÍNA	FUNCIONES
GSH-PX ₁ (citósolica) GSH-PX ₂ (gastrointestinal) GSH-PX ₃ (plasmática) GSH-PX ₄ (hidroperoxidasa Fosfolípido.) GSH-PX ₆ (olfato)	4	Eliminan hidroperóxidos
GSH-PX ₅ GSH-PX ₇	2	Eliminan hidroperóxidos
Selenoproteínas de la cápsula mitocondrial del esperma	4	Protege el desarrollo de las células espermáticas de daño oxidativo.
Iodotironina-desiodinasa Tipo I(plasma, membrana), II(retículo endoplásmico), III(plasma, membrana)	1	Producción y regulación de la conversión de T3 a partir de T4.
Tioredoxina-reductasa 1(citosol),2(mitocondria),3	2	Control redox de grupos tioles
Selenofosfato-sintetasa SPS2	1	Síntesis del selenofosfato precursor de la selenocisteína
Selenoproteína P	10-17	Proteína de transporte y Protege las células endoteliales frente al ataque de Peroxinitritos.
Selenoproteína S		Producción de citoquinas
Selenoproteína W	1	Antioxidante (Músculo esquelético corazón cerebro)
Selenoproteína K		Modula Ca ²⁺ en la afluencia de la función inmune celular

Desde los descubrimientos de las propiedades biológicas del selenio, se ha centrado la atención principalmente en su valor nutritivo como elemento esencial, debido a que este es esencial para el funcionamiento normal del sistema inmune, de la glándula tiroides, en los procesos antioxidantes y es necesario para el crecimiento, desarrollo, metabolismo y defensa del organismo^[67].

I.2.1 Metabolismo del Selenio

Existen diversos factores que influyen en el metabolismo del Selenio sus formas químicas, Azufre, Arsénico, metales, microorganismos, vitamina E y la ingesta previa de Selenio.

La fuente orgánica o inorgánica de Selenio es transformada en selenuro de hidrogeno (H_2Se). El Selenato, primero es reducido a Selenito, el cual es reducido a seleniuro vía glutatión, la selenometionina puede transformarse en selenuro de hidrogeno mediante γ -liasa, incorporarse a proteínas como selenometionina o ser transformado a selenocisteína mediante transulfuración y la selenocisteína es transformada a seleniuro por β -liasa. El H_2Se , es transformado por la selenofosfato sintetasa a selenofosfato para la síntesis de selenocisteína, que ocurre sobre su ARNt, este es inicialmente aminoacilado con serina por la serina sintetasa, formando Seril-RNAt^{sec} este residuo de serina proporciona el esqueleto de carbono de selenocisteína, la Seril-RNAt^{sec} es fosforilada a fosfoseril-RNAt^{sec} por la enzima PSTK (fosfoseril- RNAt^{sec} quinasa), después en una reacción que implica la adición de selenofosfato en presencia de Selenocisteína sintetasa fosfoseril-RNAt^{sec} es convertido a Sec-RNAt^{Sec}, este es incorporado a las selenoproteínas de acuerdo con el codón UGA^[74-76] (Figura 4).

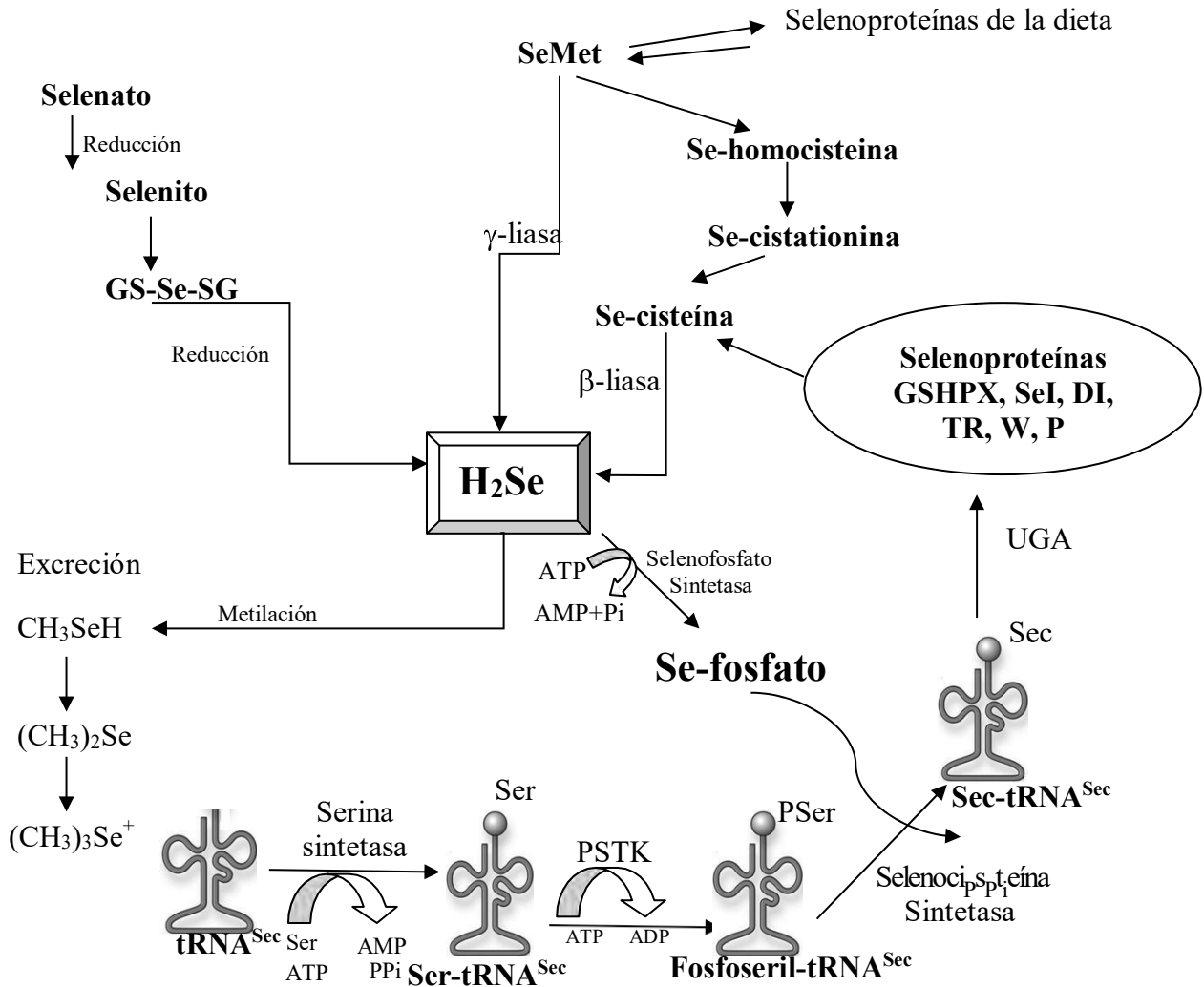


Figura 4.- Ruta metabólica de selenio. Figura basada y adaptada de: Valadez, 2005; Salinas 2010; Driscoll y Copeland 2003. ^[74,75,77]

Absorción

La absorción del selenio ocurre en el duodeno y el íleon. La selenometionina es absorbida por la vía de la metionina (transporte activo), la selenocisteína unida a una proteína y las sales inorgánicas se absorben por difusión pasiva^[64,78], lo que más afecta la absorción de estas sales, es su forma química (selenato, selenito) el selenato comparte mecanismo de absorción con el molibdato y el sulfato y por ello puede presentar antagonismos, estas sales tienen biodisponibilidad limitada en rumiantes por las condiciones anaerobias del rumen. Por el contrario, las formas orgánicas (seleno-aminoácidos), generalmente sobrepasan el rumen.

Los selenio-aminoácidos son absorbidos y el selenio es retenido y utilizado en forma efectiva, pero su conversión a selenocisteína para la síntesis de proteínas es lenta^[79].

En los rumiantes gran parte del Selenio ingerido en la dieta es reducido a su forma insoluble (selenio elemental y seleniuros), un mayor porcentaje de la forma inorgánica que de la forma orgánica, por bacterias del rumen^[80,81], Serra., 1996 reportó que las bacterias del rumen son capaces de incorporar selenio dentro de sus células y Whagner encontró que las bacterias ruminales de ovejas adultas, tenían en promedio una concentración de Se cuarenta y seis veces mayor, que la de la dieta que estaban consumiendo los animales, sobre base de materia seca, este selenio microbiano, debería ser de alta digestibilidad para el rumiante, como selenometionina^[82]. La levadura de selenio (selenometionina) en el rumen está expuesta a hidrólisis, esta convierte la selenometionina a formas insolubles de selenio^[80].

Distribución

Después de la absorción el selenio es utilizado en la síntesis de selenoproteínas, almacenado o excretado. La distribución del elemento depende de su forma química y la cantidad en la dieta^[83], la selenometionina puede ser incorporada dentro de proteínas en forma no específica, en lugar de metionina o ser transformada a selenuro y las sales inorgánicas son convertidas a selenuro. Independientemente de la fuente de selenio, este es transformado a selenuro para la síntesis de selenocisteína, el selenuro es excretado después de tener un proceso de metilación^[64,76].

con las pérdidas embrionarias, la infertilidad dependiente del Se es más común en ovejas que en otros rumiantes domésticos [100].

Desmedro

Se ha observado que en animales deficientes de selenio hay una disminución en ganancia de peso y pobre apariencia corporal. Generalmente, los signos de deficiencia de selenio son más notables en las hembras y en sus crías [103].

Respuesta inmune comprometida

Kumar et al., [104] en sus investigaciones encontró que al suplementar ovejas con selenio y después exponerlas a un agente bacteriano, la respuesta inmune humoral aumenta significativamente con respecto al grupo control. El selenio es requerido para el desarrollo y expresión de la respuesta inmune humoral.

Los macrófagos contienen glutatión peroxidasa ($GSHP_x$) localizada en los lisosomas y un déficit nutricional de Se resulta en la declinación de la actividad de la $GSHP_x$ en macrófagos, se conoce que con terapias de Se y vitamina E, existe efecto sinérgico sobre la producción de anticuerpos. Algunos experimentos han demostrado que animales seleno-deficientes presentan una depleción de la cantidad de linfocitos-B, más que una simple reducción de anticuerpos producidos por aquellas células.

La óptima función de células-B, particularmente la síntesis de IgG, es dependiente del funcionamiento óptimo de macrófagos y células-T; por ello, se infiere que algunos efectos del Se sobre inmunidad humoral pueden ser secundarios al efecto sobre células-T y macrófagos, así el selenio es requerido para el desarrollo y la expresión de la respuesta inmune [104,105].

I.2.3 Suplemento de selenio en rumiantes

La suplementación de selenio puede ser de dos formas: sales minerales inorgánicas (Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 , $BaSeO_4$, K_2SeO_3) o formas orgánicas (levadura enriquecida, Selenometionina) [106].

Existen diversas formas y fuentes para contrarrestar la deficiencia nutricional de selenio: [84]

- ⌘ La aplicación de Se al suelo (fertilización con selenio), aunque no resulta eficiente en términos de la cantidad precisa para cubrir las necesidades en los animales.
- ⌘ Adicionar en el alimento sales de selenio y/o pre-mezclas para alimentos concentrados, aunque es un procedimiento de bajo costo, puede variar considerablemente por los consumos individuales.
- ⌘ Selenio en agua, al igual que en el alimento depende de los consumos individuales para contrarrestar la deficiencia.
- ⌘ Implantando en la base de la oreja, núcleos que liberan Se con lentitud.
- ⌘ La administración intravenosa, subcutánea, dosificación del selenito de sodio oral y administración de comprimidos intrarruminales, permite administrar cantidades conocidas y deseadas de Se.
- ⌘ Bolos intrarruminales son una forma de dosificación: aseguran la administración de la cantidad de selenio necesarias en el rumiante, dichos bolos tienen la ventaja de proporcionar cantidades de selenio por periodos más prolongados de tiempo que cuando se suplementa en forma parenteral, por lo que se puede proporcionar mayor seguridad en la prevención de deficiencia de selenio.

II. HIPÓTESIS





Los niveles de isoprostanos se verán modificados por los niveles de selenio y su cuantificación permitirá identificar la presencia de estrés oxidativo en rumiantes.

I. OBJETIVOS

Objetivo General

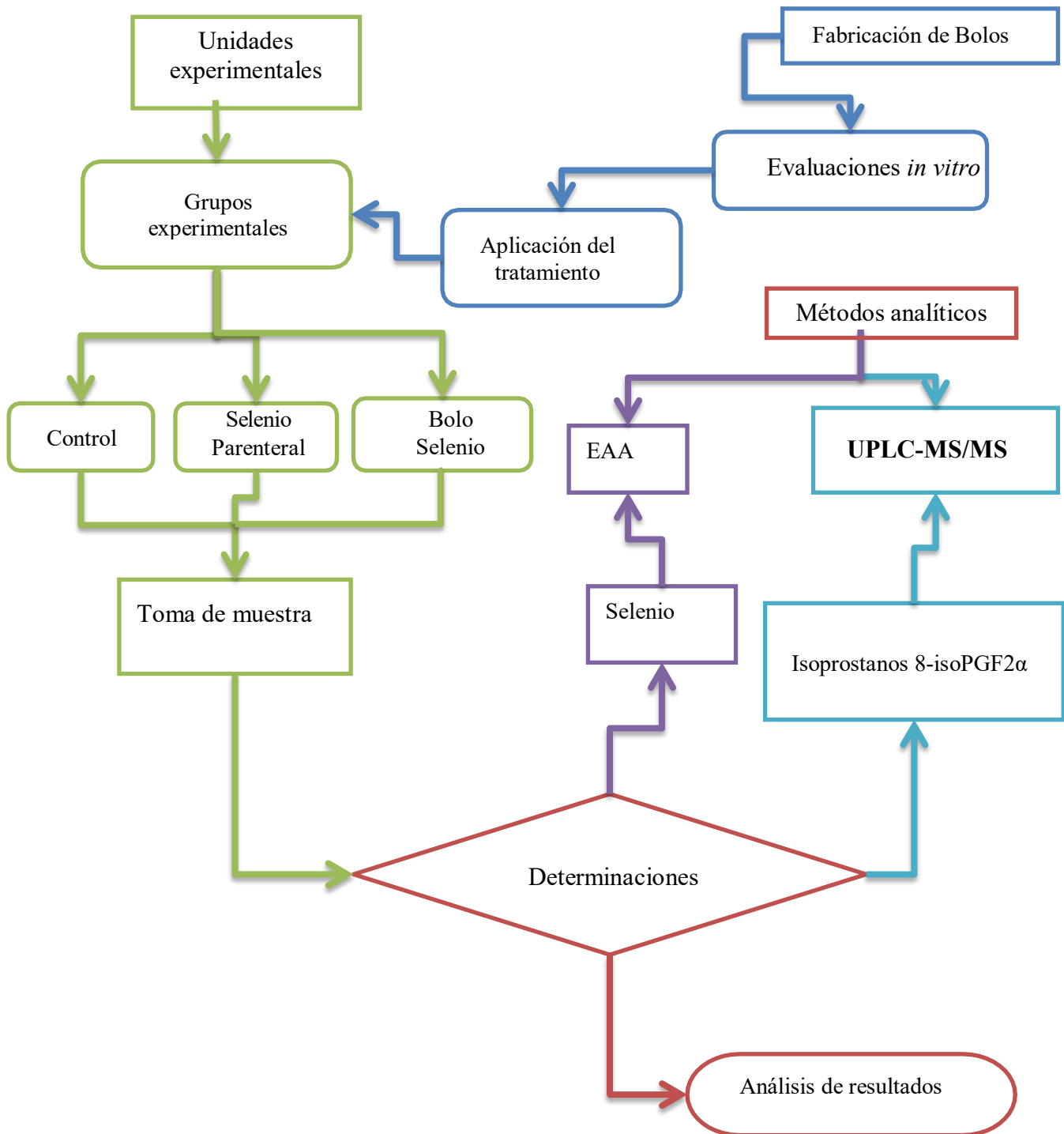
Evaluar los niveles plasmáticos de isoprostanos para determinar el efecto antioxidante del selenio en rumiantes.

Objetivos particulares

-  Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de isoprostanos en plasma de rumiante utilizando UPLC-MS/MS.
-  Elaborar bolos intra-ruminales de selenito de sodio de liberación modificada vía granulación por fusión para la suplementación de selenio en cabra.
-  Cuantificar los niveles sanguíneos de selenio en cabras suplementadas y no suplementadas con selenio utilizando espectrofotometría de absorción atómica.
-  Evaluar los cambios en los niveles plasmáticos de isoprostanos para medir su modificación por el suplemento de selenio en cabras.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Diagrama de flujo del desarrollo experimental



IV.1 Localización

El desarrollo del proyecto de investigación, se realiza en los laboratorios de: La Unidad de Investigación Multidisciplinaria en el Laboratorio 5 de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, en el laboratorio de métodos analíticos L-1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1. La unidad de experimentación del posgrado de Ciencias de la Salud y Producción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, cada una de las unidades conto con la infraestructura y los medios para llevar a cabo el desarrollo experimental.

IV.2 Unidades experimentales

Se utilizaron 20 cabras de la unidad de producción de ovinos y caprinos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de raza alpina con peso promedio de 22kg, con una edad de 6-8 semanas, las unidades fueron aisladas en los corrales de la unidad de experimentación del posgrado de Ciencias de la Salud y Producción Animal de la Facultad de Estudios superiores Cuautitlán. Los animales utilizados en el estudio no presentaron signos clínicos de ninguna enfermedad, ellos se manejaron con la aprobación del comité interno para el cuidado y uso de animales experimentales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México. CICUAE- FESC C15_03.

IV.2.1 Tratamiento

Las unidades experimentales se agruparon de forma aleatoria en 3 grupos experimentales:

Grupo Se-Bolo: se administró por vía oral un bolo de Selenio (selenito de sodio).

Grupo control: unidades experimentales sin tratamiento.

Grupo Se parenteral: se administró por vía subcutánea Selenio (selenito de sodio).

IV.2.2 Ubicación de las unidades experimentales una vez asignadas en los tres diferentes grupos

Las unidades fueron ubicadas en jaulas metabólicas cada unidad en una jaula, para controlar y observar la posible regurgitación del bolo así como el consumo de alimento.

IV.2.3 Alimentación

Todas las unidades experimentales fueron alimentadas alrededor de las 10 de la mañana durante toda la experimentación con alfalfa achicalada molida la cual contenía: materia seca 94.3%, humedad 5.87%, extracto etéreo 2.95%, cenizas 13.73%, proteína cruda 19.55%, fibra cruda 19.8%, extracto libre de nitrógeno 38.10%, fibra detergente neutro 30%, fibra detergente ácido 25.41%, lignina 5.81%, hemicelulosa 4.59%. Agua a libre acceso.

IV.2.4 Toma de muestra

Las muestras de sangre, se tomaron por punción de la vena yugular utilizando agujas estériles BD Vacutainer® calibre 20G- X 38mm y tubos al vacío de 6 mL con Heparina Vacutainer® BD. Se almacenaron a 4°C inmediatamente después del muestreo, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min., el plasma obtenido se separó en microtubos y se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su análisis.

IV.3. Desarrollo y validación de método para la determinación de 8-iso-PGF2 α en plasma sanguíneo

V.3.1 Materiales

Los estándares de 8-iso-PGF2 α y 8-iso-PGF2 α -d4 (estándar interno) fueron adquiridos de Cayman Chemicals, el estándar de PGF2 α fue de Sigma Aldrich, el acetonitrilo y el metanol (grado HPLC) fueron adquiridos de J.T.Baker, agua Milli-Q (sistema Millipore), Ácido fórmico (grado reactivo 95%) Sigma Aldrich, Hidróxido de Amonio (grado reactivo 29.60%) de J.T.Baker, Hidróxido de potasio de J.T.Baker, Isopropanol (grado masas) de Sigma Aldrich. Para la micro extracción en fase solida (SPE) se utilizaron cartuchos de 96 pozos Oasis® MAX μ Elution que contiene un polímero de modo mixto, de fase reversa intercambio amónico fuerte, humectable con agua, que es selectivo para los ácidos y estable en eluyentes orgánicos, también se utilizó un procesador Positive Pressure-96 adquiridos de Waters.

IV.3.2 Cromatografía

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de ultraeficiencia ACQUITY UPLC® con una columna C18 1.7 μ m 2.1x100mm ACQUITY BEH UPLC® de Waters, manteniéndose a 30°C. Las fases móviles fueron (A) ácido fórmico 0.1%, (B) acetonitrilo a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. La separación se logró con un

gradiente lineal con optimización (Tabla 5). El volumen de inyección fue de 30 μL y la temperatura en el automuestreador se mantuvo a 20 $^{\circ}\text{C}$.

Tabla 5. Gradiente de elución optimizado.

Tiempo (min)	% solvente A	% solvente B	Curva ^a
0.0	70	30	6
1.0	70	30	6
1.8	50	50	6
3.0	50	50	6
3.5	50	50	6
4.0	70	30	6
5.0	70	30	6

^aSe utilizó la curva de gradiente lineal para optimizar la resolución de los analitos.

VI.3.3 Espectrometría de masas

Se utilizó un espectrómetro de masas en tándem XEVO™ TQ, fue operado con ionización por electrospray en modo negativo (ESI⁻). Para encontrar las condiciones de detección se infundieron en el equipo soluciones de 1000 ng/mL de estándares de PGF2 α , 8-iso-PGF2 α y 8-iso-PGF2 α -d4. Se aplicó el método de monitorización de múltiples reacciones (MRM) utilizando un tiempo dwell de 0.150 s, el voltaje fue de 3kV para el capilar y 30 V para el cono, temperatura de solvatación 439 $^{\circ}\text{C}$.

IV.3.4 Procedimiento de extracción de 8-iso-PGF2 α para plasma

Alícuotas de 500 μL de plasma sanguíneo de caprinos fueron transferidas a viales de 2 mL se adicionaron 100 μL del estándar interno y 500 μL de la solución de hidrolisis KOH (15% en agua). Los viales se mezclaron y fueron incubados en un baño ultrasónico 30 min 40 $^{\circ}\text{C}$. Después fueron enfriados a temperatura ambiente, se adicionaron 225 μL de ácido fórmico 6M se mezclaron y se centrifugaron a 15000 rpm 10min 4 $^{\circ}\text{C}$. A los sobrenadantes se aplicó la micro extracción en fase sólida, utilizandouna placa de extracción Oasis® MAX $\mu\text{Elution}$ de 96 pozos, acondicionados con 500 μL de metanol y con 500 μL de ácido fórmico 20mM., después se cargó la muestra 350 μL . Los pozos fueron lavados con 350 μL de NH₄OH 2%, las muestras fueron eluidas con 50 μL de una mezcla de AF 5% en ACN: Isopropanol 40:60, diluyéndose con 150 μL de agua Milli-Q; las alícuotas de 30 μL fueron inyectadas sistema UPLC-MS/MS.

IV.3.5 Exactitud y precisión

En base a la guía de validación de métodos bioanalíticos de la Food and Drug Administration^[107] se determinó la exactitud y precisión. El método fue evaluado con muestras de plasma sanguíneo, se utilizó una mezcla de plasma sanguíneo de 20 cabras, adicionado con 4 diferentes niveles de concentración 196, 490, 640 y 786 pg/mL (n=5 por concentración) en dos días diferentes y se evaluaron los coeficientes de variación y las desviaciones estándar.

IV.3, 6 Efecto matriz y Selectividad

El efecto matriz fue evaluado después de la extracción, adicionando una cantidad conocida de estándar a las muestras después de realizar el proceso de extracción. La selectividad fue evaluada analizando un blanco de solvente y muestras de plasma sanguíneo de ovinos y caprinos de 7 diferentes fuentes^[107]. Para identificar si existe interferencia de la matriz con el analito de interés al comparar los diferentes cromatogramas y el tiempo de retención del 8-iso- PGF2 α en las muestras en el blanco de solventes y el estándar.

IV.3.7 Curvas de calibración

La construcción de la curva de calibración se realizó con 7 niveles de concentración del estándar de 8-iso-PGF2 α en un rango de 40-760 pg/ mL y 400 pg/ mL para el estándar interno (8-iso-PGF2 α -d4), se realizó otra curva utilizando una mezcla de plasma de 20 cabras y se adicionando el estándar de 8-iso-PGF2 α en un rango de 49-639 pg/mL. Se evaluaron los coeficientes de determinación, correlación y los intervalos de confianza para el intercepto y la ordenada al origen utilizando Microsoft Excel 2010.

IV.3.8 Límites de detección y cuantificación

Se prepararon soluciones de 5 a 50 pg/mL y utilizó el software MassLynx V4.1 para evaluar la relación señal ruido S/R considerando una proporción de 3 para el límite de detección y 10 para el límite de cuantificación.



IV.4 Elaboración de Bolos intra-ruminales

La elaboración de los bolos de selenio se realizó mediante granulación por fusión^[103]. Se fabricó un lote de bolos en base a la formulación de la Tabla 6, para la fuente de selenio se utilizó selenito de sodio, el excipiente lipídico es el que controla la liberación, el agente densificador para lograr una densidad 2-3.5g/mL para evitar la regurgitación.

Tabla 6.- Formulación de bolos de liberación modificada, se muestra en porcentaje la cantidad de componente.

Componente	%	g/bolo
Selenito de sodio	0.625	0.05
Cutina	25	2
Hierro	73.37	5.87
Estearato de Mg	0.5	0.04
Talco	0.5	0.04

 **IV 4.1 Evaluación de los bolos fabricados, vía granulación por fusión.**

- a) Dimensiones: Con un micrómetro digital Mitutoy modelo CD-6 CS medir el largo, ancho y espesor de 10 bolos de cada lote.
- b) Densidad: Utilizando una probeta graduada de 25mL, la cual se llena con agua, el bolo es previamente pesado, es colocado en la probeta y se mide el volumen desplazado de agua.
- c) Dureza: Utilizando el durómetro Vankel para determinar la dureza a 10 bolos de cada lote.

 **IV 5. Cuantificación de selenio**

Para la cuantificación de selenio se optimizo el procedimiento de digestión ácida ^[108] y se empleó el siguiente procedimiento:

Digestión ácida

- 1.- Descongelar las muestras, utilizar una micropipeta de capacidad 100-1000µL para tomar la muestra y pesar 0.5g en un vaso de teflón para microondas.
- 2.- Colocar en el vaso de teflón 5 mL de agua Milli Q, después adicionar 2.5 mL de Ácido nítrico concentrado y después 1mL de H₂O₂ al 30%.
- 3.- Dejar reposar por 30 minutos, transcurrido el tiempo de reposo tapar los vasos.
- 4.- Montar los vasos en las chaquetas que están colocadas en el carrusel para Horno de microondas.
- 5.- Colocar el carrusel con los vasos en el horno.
- 6.- Someter a digestión ácida en el horno de microondas MARS-digestión CEM, con el método de acuerdo a la muestra cargado en el horno.
- 7.- Sacar el carrusel del horno, posteriormente sacar los vasos y dejar enfriar y vaciar las muestras a matraces de 25mL y llevar a la marca de aforo con HCl 7M.

8.- Leer las muestras y la curva de referencia en el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros Varian®.

IV.6 Diseño experimental

Los tratamientos fueron asignados a las unidades experimentales mediante un diseño completamente al azar. Se hicieron comparaciones de las medias por cada nivel de tratamiento con el fin de encontrar diferencias entre ellas y para evaluar el efecto del tiempo sobre la concentración de Se e Isoprostanos, los datos se analizaron mediante un diseño de mediciones repetidas de cada respuesta en el tiempo. Las variables independientes fueron el tipo de tratamiento, el tiempo de muestreo y el valor inicial de cada respuesta. Las variables dependientes (respuesta) fueron la concentración de Se en paquete globular ($\mu\text{g/g}$ muestra), la concentración plasmática de isoprostanos (pg/mL muestra). Las unidades experimentales dentro del tratamiento fueron usadas como termino de error.

IV.6.1 Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_k + X_{ij} + (\tau\alpha)_{ik} + \xi_{ijk}$$

Y_{ijk} = j-ésima observación de la variable de respuesta tomada bajo el i-ésimo tratamiento a tiempo k.

$i = 1, 2, \dots, \tau$

$j = 1, 2, \dots, n$

$k = 1, 2, \dots, t$

μ = media generada de la respuesta medida.

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento

α_k = efecto de k-ésimo tiempo.

X_{ij} = efecto aleatorio asociado al j-ésima unidad experimental en el tratamiento i. $(\tau\alpha)_{ik}$ = efecto de la interacción i-ésimo tratamiento por el k-ésimo tiempo.

ξ_{ijk} = error aleatorio asociado a j-ésima unidad experimental i a tiempo k.

IV.6.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron usando el programa Statgraphis Centurion XV versión 15.2.05 (2007). Como un diseño completamente al azar, con el mismo programa se analizó la correlación entre la concentración de Selenio y la concentración de isoprostanos. Para comparar el efecto de los diferentes tratamientos con respecto al tiempo se hizo un análisis de varianza y prueba de comparación de medias utilizando intervalos de confianza con errores estándar. La significancia estadística se declara a $p < 0.05$ para todas las comparaciones.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Evaluación de Bolos intrarruminales.

Tabla 7.- Evaluaciones físicas de los bolos elaboraos vía granulación por fusión.

	Peso (g)	Densidad(g/mL)	Dureza (kp)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Promedio	8	3	25	19	15

Los bolos fabricados vía granulación por fusión, cumplieron con las características de densidad, esto con base a lo reportado en la literatura ^[109] las densidades entre 2-3.5 g/mL evitan la regurgitación. Los valores promedio de densidad obtenidos experimentalmente fueron 3 g/mL, además de evaluar la densidad de los bolos para evitar la regurgitación se administró un bolo placebo (excipientes sin selenio) a una cabra alpina y después de 30 días de la administración, se tomó una placa radiográfica para observar si el bolo no había sido regurgitado, la radiografía se muestra en la figura 5 y se observa que el bolo aún permanecía en el rumen. Las dimensiones y la forma geométrica fueron adecuadas para la administración en cabritos, para evitar daño a la mucosa del rumen, el bolo tiene una geometría tal que evita partes agudas, los bolos presentan puntas redondas y una superficie lisa, con lo que respecta a la dureza, se estima que con la dureza obtenida los bolos no se fracturaran durante la administración de estos a las unidades experimentales.



Figura 5.- Radiografía de cabra después de 30 días de administración.

V.2 Desarrollo y validación del método para la determinación de 8-iso- PGF2α en plasma

El primer paso para desarrollar el método de cuantificación fue optimizar y establecer las condiciones de detección del 8-iso-PGF2α y del estándar interno, los criterios considerados para seleccionar el estándar interno fueron: un compuesto de naturaleza similar al analito a determinar pero que no pudiera estar presente en la muestra y que fuera estable.

Se utilizó el 8-iso-PGF2α-d4 como estándar interno, ambos estándares y el estándar de la prostaglandina PGF2α fueron infundidos en el espectrómetro MS/MS para hallar los valores de medición del ion precursor y el ion hijo más abundante. Las transiciones y los parámetros optimizados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros MS optimizados para cada analito.

Analito	Transición (m/z)	VC ^a	EC ^b
PGF2α	353.28→193.16	34	24
8-iso-PGF2α	353.34→193.16	34	24
8-iso-PGF2α-d4	357.40→197.20	36	24

^aVoltaje de cono ^bEnergía de colisión, se optimizaron utilizando MRM

Se observó que la relación masa carga (m/z), del fragmento más abundante y las condiciones de detección para la prostaglandina (PGF2α) y el isoprostano (8- iso-PGF2α) fueron las mismas, debido a que el isoprostano de interés es el isómero de la prostaglandina, estas moléculas presentan la misma composición atómica pero difieren en su conformación estructural. La prostaglandina presenta las cadenas laterales al ciclopentano orientadas en forma *trans*, y para el isoprostano las cadenas están orientadas en forma *cis*. Bajo las mismas condiciones, el detector no distinguió una de otra, por lo que se trabajó en la optimización de las condiciones cromatográficas para separar los isómeros PGF2α y 8-iso-PGF2α. Para esto se evaluaron diferentes viables. En la Tabla 9 se muestra cada una de las variables estudiadas.

Tabla 9.- Variables que se estudiaron para la optimización de las condiciones cromatografías en la cuantificación de 8-iso-PGF 2α .

Variable	Observación
Fase móvil Ácido Fórmico al 0.01, 0.1 y 0.5 %, Acetonitrilo, Metanol Ácido acético 0.1% Hidróxido de amonio 0.01% Acetato de amonio 2.29 mM	En base al pH de la fase y las características del analito.
Velocidad de Flujo 0.3 mL/min, 0.35 mL/min, 0.4 mL/min, 0.25 mL/min	Modifica el tiempo de retención de las moléculas.
Volumen de inyección 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 7.5 μ L, 30 μ L, 40 μ L	Efecto en la respuesta
Temperatura columna 20,30,35,40 °C	Modifica tiempos de análisis y cambios en la selectividad de la separación.
Columna C18 2.7 μ m, C8 1.7 μ m, C18 1.7 μ m	Tiempo de análisis resolución interacción con analito.

En la Figura 6 se observan los cromatogramas de los analitos estudiados utilizando dos diferentes tipos de columnas cromatográficas. También se evaluaron diferentes mezclas de soluciones, con el fin de encontrar el mejor medio de dilución es decir con cual presenta la mejor respuesta. En la figura 7 se muestran ejemplos de cromatogramas de algunos ensayos.

Las condiciones óptimas fueron; ácido fórmico y acetonitrilo en la fase móvil, una velocidad de flujo de 0.3 mL/min, 30 μ L de volumen de inyección y una columna ACQUITY BEH UPLC® C18 1.7 μ m. La Figura 8 muestra los cromatogramas de forma individual para PGF 2α , 8-iso-PGF 2α , 8-iso-PGF 2α -d4 y la mezcla de la prostaglandina con el isoprostano, se observa la separación de los analitos con una buena resolución. El resultado fue la diferenciación de estos analitos y se evitaron la presencia de falsos positivos, debido a que las muestras de plasma sanguíneo tuvieron ambos analitos.

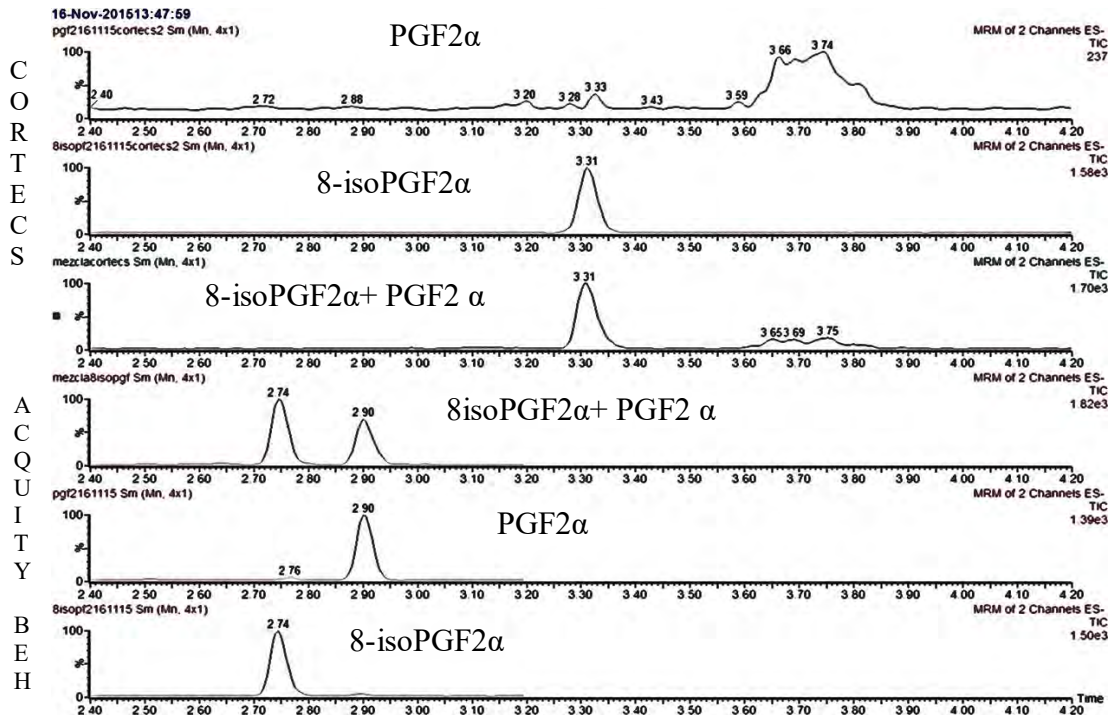


Figura 6. Cromatogramas de PGF2 α , 8-isoPGF2 α y mezcla, los tres primeros utilizando la columna CORTECS de 2,7 μ m y los siguientes tres ACQUITY BEH UPLC® de 1,7 μ m.

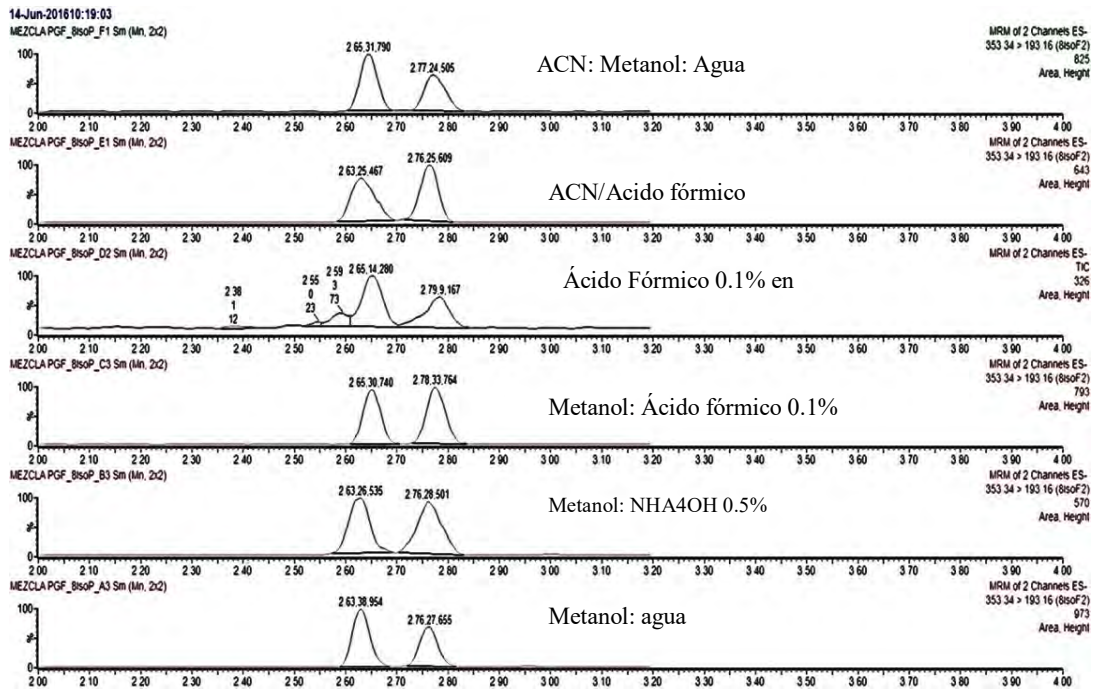


Figura 7. Cromatogramas de mezcla de estándares PGF2 α y 8-isoPGF2 α , en diferentes mezclas de dilución.

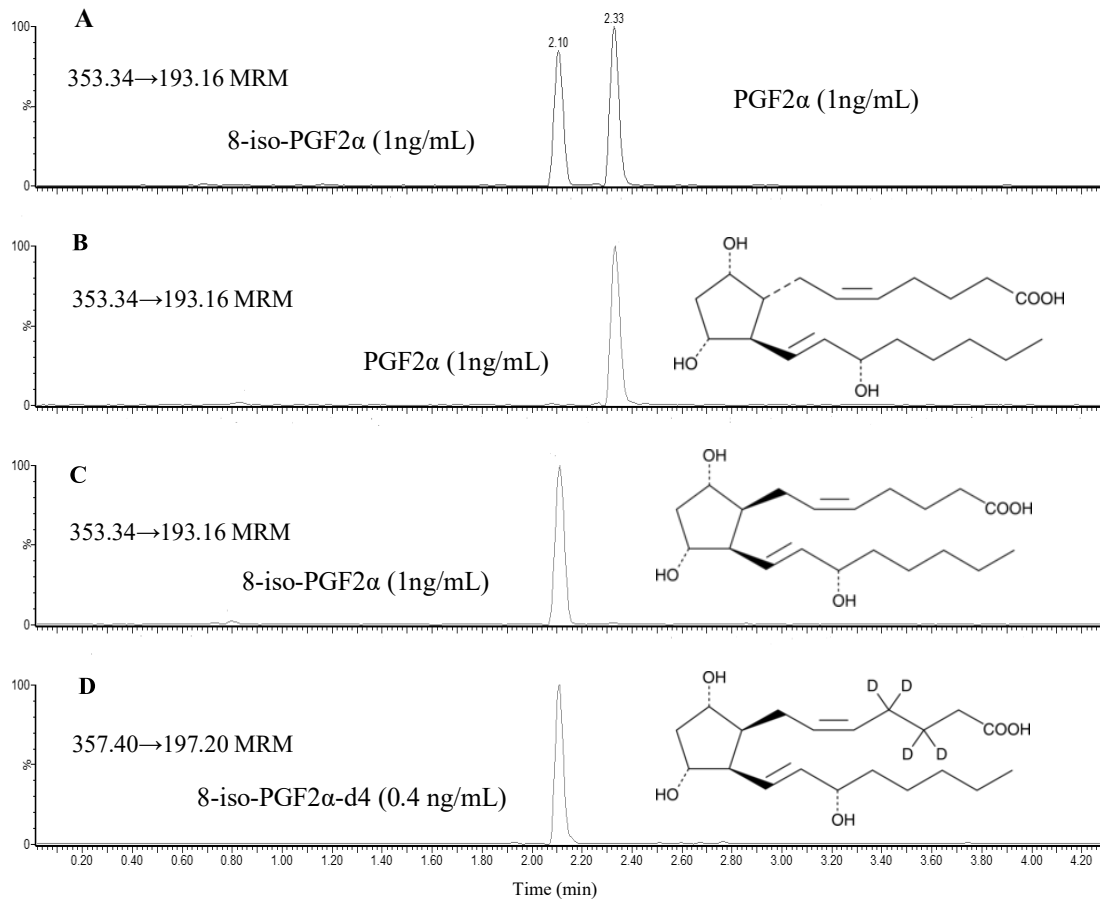


Figura 8.- Cromatogramas de estándares (A) mezcla de PGF2α y 8-iso-PGF2α (1 ng/mL), (B) PGF2α, (C) 8-iso-PGF2α y (D) 8-iso-PGF2α-d4.

El resultado fue la diferenciación de PGF2α y 8-iso-PGF2α, se evitaron la presencia de falsos positivos.

Después de establecer las condiciones cromatográficas y de detección, se desarrolló y optimizó el proceso de extracción en fase sólida, utilizando cartuchos Oasis® MAX. La elección del tipo de cartucho se basó en lo reportado por^[30,110] y en las características del analito.

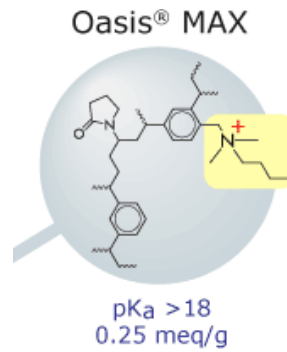


Figura 9.- Estructura de los cartuchos Oasis® MAX

Los cartuchos Oasis®MAX contienen un polímero de modo mixto (fase reversa/intercambio aniónico fuerte) es selectivo para los ácidos y estable en eluyentes orgánicos, a diferencia de los estudios reportados por los anteriores autores en nuestro método utilizamos placas de micro elución Oasis®MAX, para este tipo de placa no es necesario evaporar y reconstituir, se utilizan volúmenes de 50 a 500 µL, esto hace que el método sea más eficiente reduciendo pasos en el proceso y disminución en el consumo de solventes y reactivos.

Las variables estudiadas para el tratamiento de la muestra fueron: preparación de KOH en agua y en metanol, cantidad de ácido fórmico (AF) y cambio de AF por HCl. Las condiciones óptimas en el tratamiento de la muestra antes de la extracción en fase sólida son las siguientes (Figura 10)

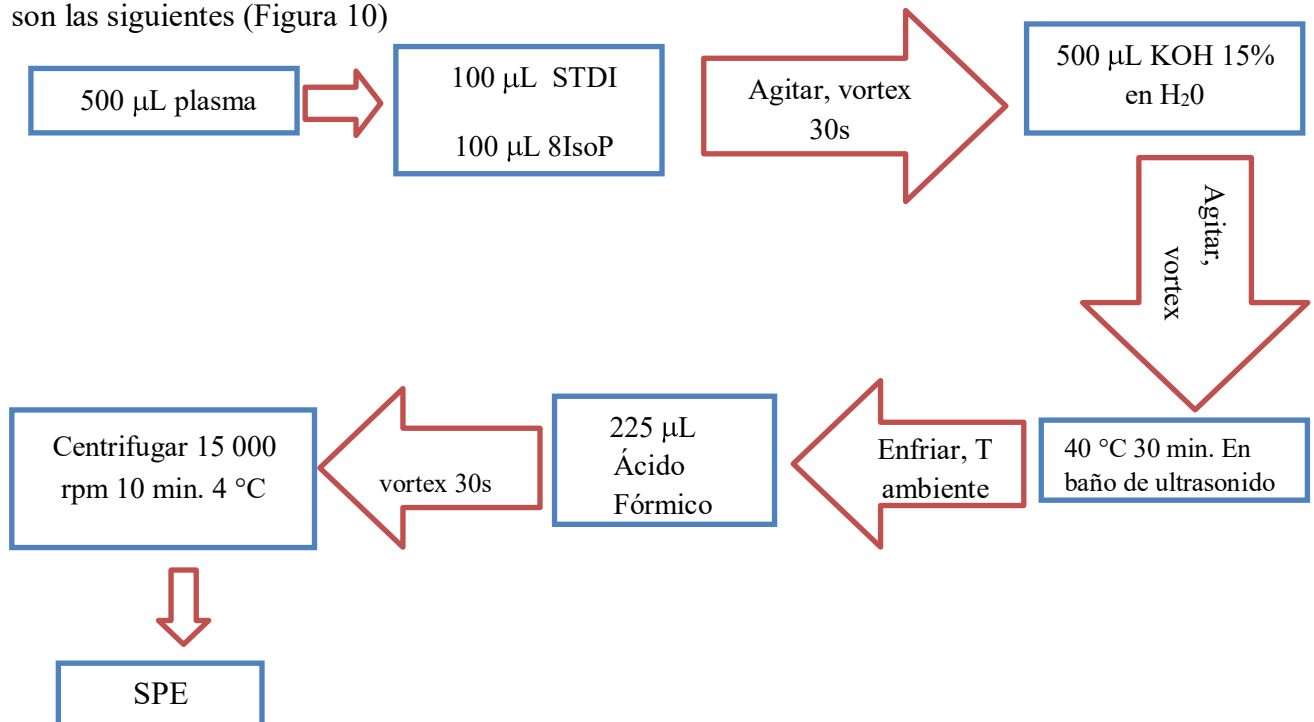


Figura 10.- Diagrama de tratamiento de muestra de plasma.

En la optimización del proceso de extracción, se realizaron ensayos para establecer las condiciones de acondicionado y equilibrado del cartucho, la carga de la muestra, el lavado y la elución del 8-iso-PGF 2α (Figura 11).

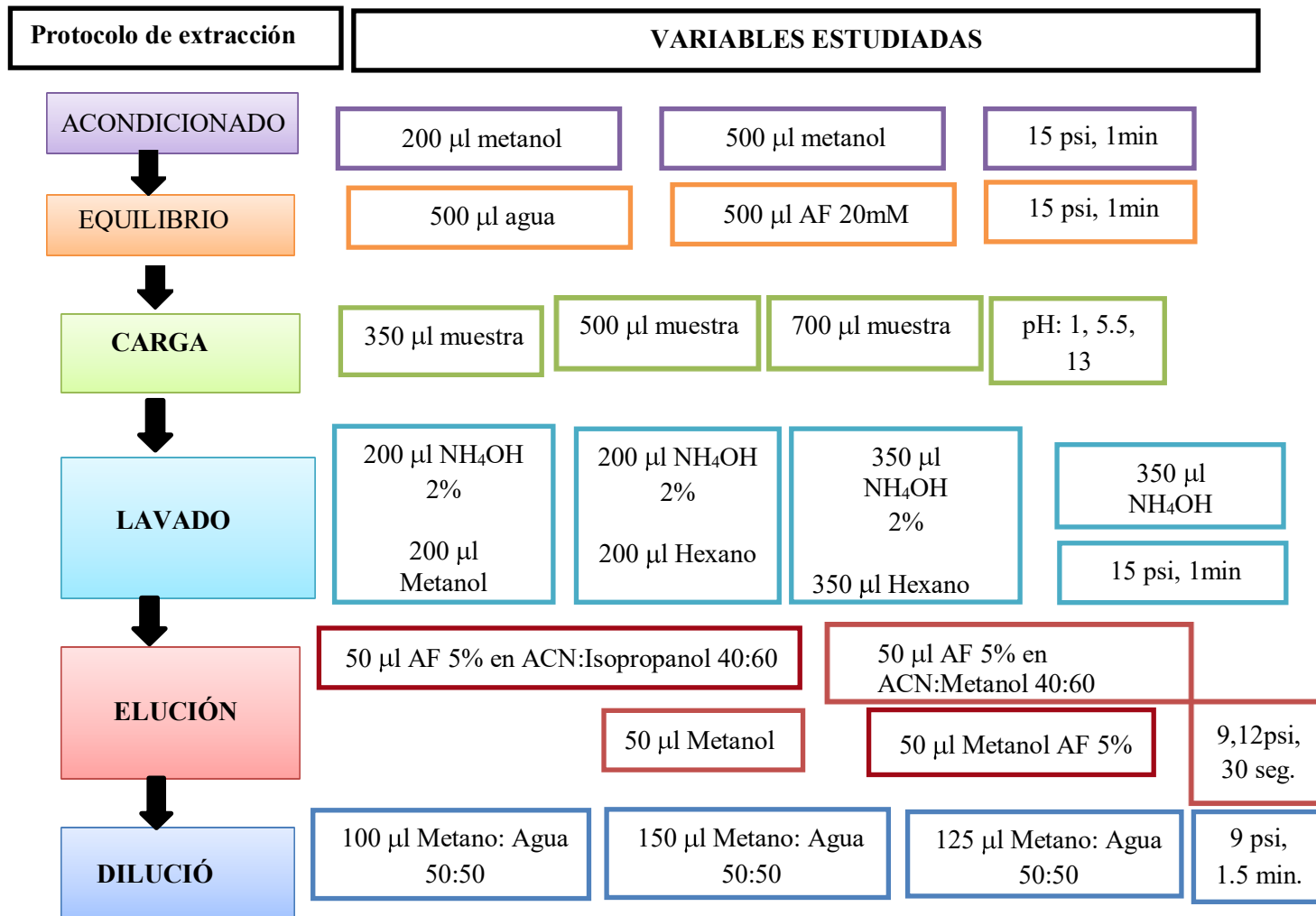


Figura 11.- Esquema del proceso de extracción en fase solida (SPE) y variables evaluadas para optimización en la cuantificación de 8-iso-PGF 2α .

En la Figura 11 se muestran las variables estudiadas, en la optimización del proceso de extracción, se realizaron ensayos por triplicado y se modificó de una en una cada variable es decir no se aplicaron dos variables en un mismo ensayo. El acondicionar el cartucho a pH ácido, se activaría mejor el cartucho y retendría más. Al cambiar el pH del sobrenadante, teóricamente el analito se encontraría ionizado y por lo tanto se retendría más en el cartucho. Variando el volumen en la carga de la muestra, el analito se concentraría más en el cartucho. Lavado con hexano, eliminar componentes que puedan interferir. Cambio en la mezcla de elución, evitar que se retuviera el analito. Con base al esquema de la Figura 11 se realizaron los ensayos en tres grupos: grupo S=estándares sometidos a las mismas condiciones que las muestras de plasma, grupo Pi=plasma con estándar interno y grupo P plasma cargado con estándar 8-iso-PGF2 α y estándar interno, para calcular los porcentajes de recuperación de las muestras cargadas con estándar, se calcularon las concentraciones de 8-iso-PGF2 α intrínsecas del plasma utilizando el factor de respuesta, el cual fue calculado con las áreas de los estándares del grupo S y la concentración intrínseca se restó a la concentración calculada el plasma cargado con 8-iso-PGF2 α , y se calcularon los porcentajes de recobro.

A continuación se presentan los porcentajes de recobro de los ensayos más representativos.

Tabla 10.- Porcentajes de recobro de plasmas adicionados con estándar.

	Ensayo 17D3	Ensayo 17D2	Ensayo 21D	Ensayo 24D	Ensayo 17D	Ensayo 26D
	11.402	77.471	82.789	106.833	73.149	93.841
	13.992	82.861	66.439	67.283	108.886	88.404
	17.412	78.731	98.694	73.181	79.814	104.285
Promedio	14.269	79.688	82.641	82.432	87.283	95.510
DESV	3.014	2.819	16.128	21.336	19.004	8.071
CV	21.126	3.538	19.516	25.883	21.772	8.450

Con base a los resultados obtenidos de cada ensayo se obtuvieron las mejores condiciones de extracción en fase sólida a continuación se presenta el protocolo de extracción en fase sólida para la cuantificación de 8-iso-PGF2 α en plasma sanguíneo (Figura 12).

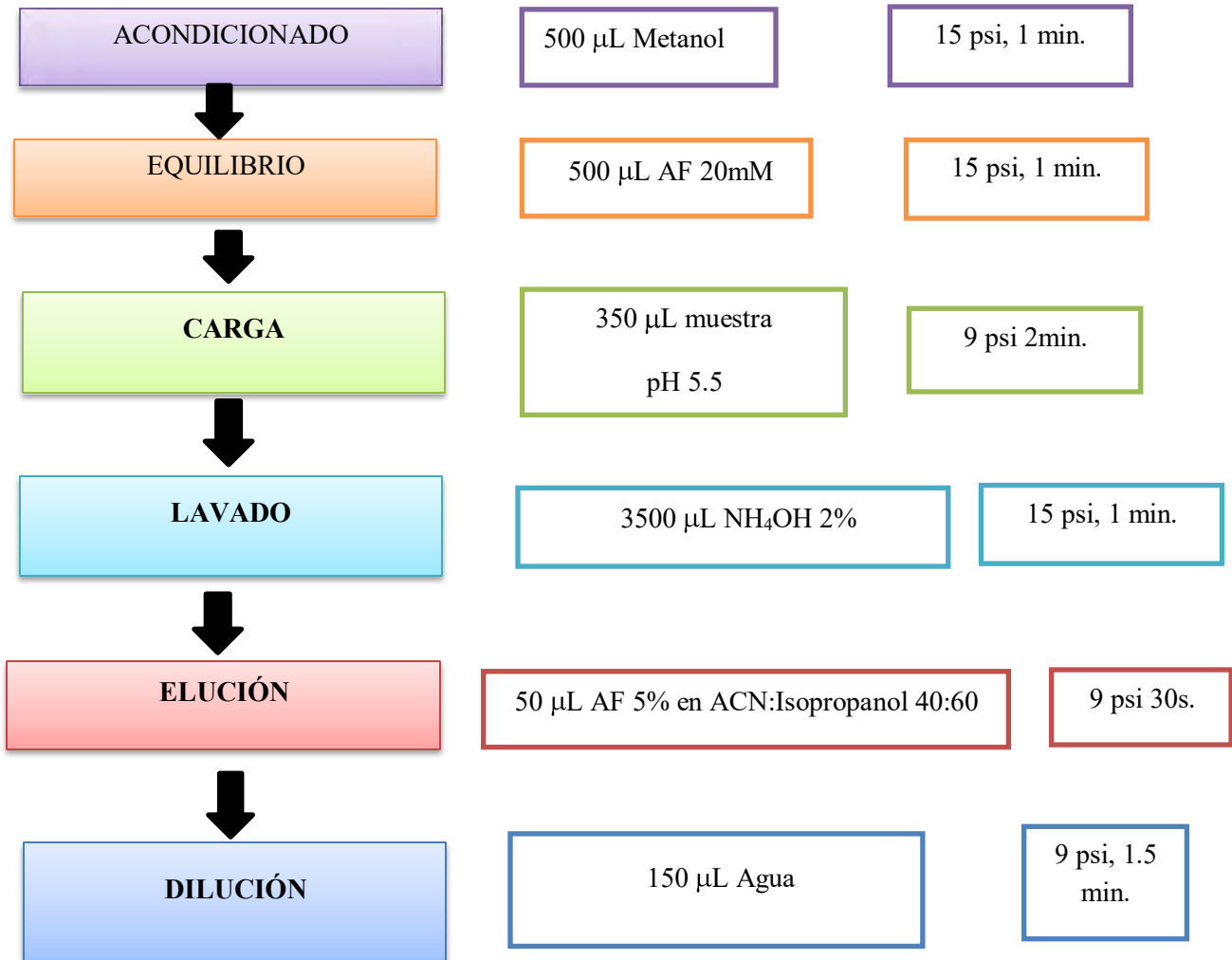


Figura 12.- Condiciones óptimas para la extracción de 8-iso-PGF₂ α en micro placa Oasis®MAX.

La Figura 13 muestra los cromatogramas representativos de plasma de una cabra, un ovino y de una cabra gestante. Las 3 muestras presentan la señal tanto del isoprostano como la prostaglandina y específicamente en la muestra de la cabra gestante presenta la señal de 8-iso-PGF₂ α y una elevada señal al tiempo de retención de la PGF₂ α .

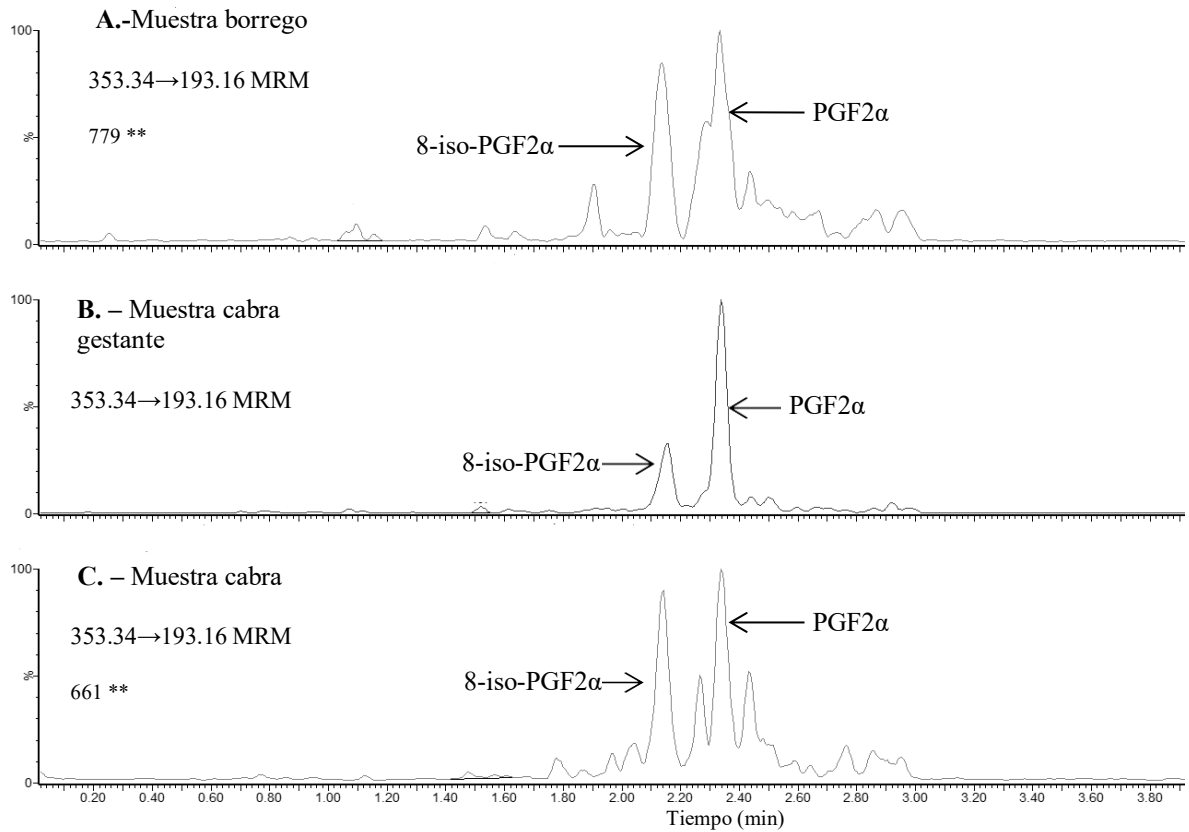


Figura 13.- Cromatogramas de muestras de plasma de pequeño rumiante, (A) muestra plasma de ovino, (B) muestra plasma de cabra gestante, (C) muestra plasma cabra joven ** número de iones detectados del pico más alto.

Después de la optimización de las condiciones de extracción se evaluaron los siguientes parámetros de validación del método:

Efecto matriz y selectividad

El efecto matriz se utilizó para identificar un aumento o una disminución en la respuesta del analito de interés, que pudiera producirse por la coelución de otros compuestos presentes en la matriz. Se realizó el proceso de extracción en fase sólida y después se adicionó una concentración conocida del estándar de 8-iso-PGF2α y se inyectó en el UPLC-MS/MS. En los cromatogramas no se observaron modificaciones de la señal del analito al compararlo con el estándar. La selectividad fue evaluada con 7 diferentes muestras de plasma sanguíneo, estas se compararon con el estándar y el blanco de solventes. La Figura 14 muestra los cromatogramas del blanco de solventes, el estándar y las muestras de plasma sanguíneo, en estas se detectó de forma endógena 8-iso-PGF2α.

Al analizar las 7 diferentes muestras (correspondientes a 7 unidades experimentales diferentes) con la transición y el tiempo de retención se logra diferenciar el analito de interés en cada una de las muestras, el blanco de solvente no presentó señal en el tiempo de retención del analito.

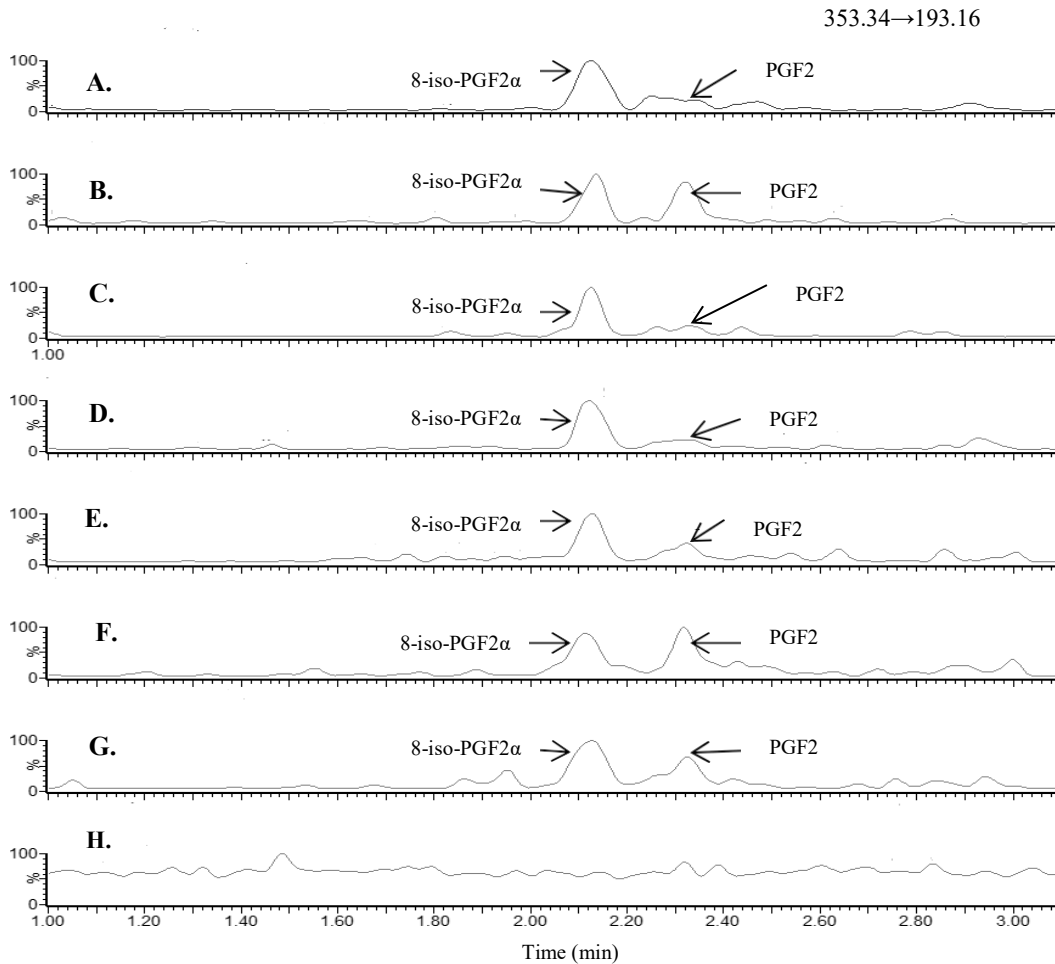


Figura 14.- Cromatogramas de muestras de plasma de diferentes pequeños rumiantes para la evaluación de selectividad (A-G) y blanco de solvente (H).

Tabla 11- Resultados de la evaluación de la precisión y exactitud del método.

Precisión Intra-día (n=5)					Precisión Inter-día (n=10)				
Concentración					Concentración				
Adicionada pg/mL	Recuperada pg/mL	% Exactitud	SD	CV %	Adicionada pg/mL	Recuperada pg/mL	% Exactitud	SD	CV %
196	190.40	96.90	7.80	8.05	196	172.98	88.04	11.10	12.60
491	442.38	90.06	5.27	5.51	491	448.21	91.24	6.16	6.57
639	530.29	83.04	9.75	11.07	639	548.53	85.90	10.92	12.37
786	752.50	95.74	6.13	6.04	786	750.05	95.43	7.31	7.45

SD= Desviación estándar CV%= Coeficiente de variación

En el presente estudio se simplificó el método de cuantificación de 8-iso-PGF2 α al utilizar la placa de micro extracción se pueden analizar hasta 96 muestras en aproximadamente 12 horas, considerando la hidrolisis alcalina, la extracción en fase sólida y el análisis en el UPLC-MS/MS, incrementamos la velocidad de análisis y disminución del consumo de solventes. En la tabla 12 se compara el método desarrollado con respecto a otros métodos reportados en la literatura, se puede observar que el método desarrollado en la presente tesis es el que utiliza la menor cantidad de solventes por muestra y menor tiempo del análisis cromatográfico. Se evaluaron los niveles de 8-iso-PGF2 α en plasma de 14 ovejas Hampshire y de 6 cabras alpinas de 24 meses de edad con 60 días de gestación. En el grupo de ovejas se tomó una muestra de sangre, mientras que a cada cabra preñada se extrajeron 4 muestras de sangre consecutivas a intervalos de 14 días. La concentración media de 8-iso-PGF2 α en plasma de ovino macho fue de 122.9 \pm 49.1 pg/mL (Rango: 70-159 pg/mL) la concentración media en plasma de ovino hembra 130.9 \pm 41.4 (Rango: 83-220 pg/mL) en cabras gestantes fue de 214.7 \pm 79.5 pg/mL (Rango 109-375 pg/mL). Estas muestras únicamente se utilizaron para evaluar la robustez del método desarrollado, en todas las muestras se logró cuantificar 8-iso-PGF2 α , por lo que se consideró que el método es robusto.

Tabla 12.- Comparación de métodos para cuantificar 8-isoPGF₂ α

Referencia	Equipo	Técnica	Volumen de solventes por muestra (mL)	LOD/LOQ	Tiempo de corrida cromatografica (min.)
Método desarrollado	UPLC- MS/MS XEVO™ TQ	Extracción en fase solida Placa μ elución Oasis® MAX	2.275	10 pg./mL / 20 pg./mL	5
[21]	LC-MS/MS QTRAP	Extracción liquido- liquido	8.800	10.6 pg./mL / 16.1 pg./mL	12
[111]	HPLC-MS/MS triple-cuádruplo	Extracción Liquido- liquido	29.225	NR	20
[30]	GC-MS-NCI	Extracción en fase solida	9.92	NR	15
[110]	HPLC-MS/MS	Extracción en fase solida cartuchos OASIS MAX 60mg	15	1.95 ng/mL / 3.91 ng/mL	20
[47]	HPLC-MS/MS	Extracción en fase solida (100 mg C18 EC)	Aproximado 5.65	3 pg./mL / 9 pg./mL	25
[24]	HPLC-MS/MS	Extracción en fase solida Oasis HLB 10 mg	Aproximado 7.7	12 pg./mL / 40 pg./mL	10
[48]	HPLC-MS/MS	Extracción en fase solida	Aproximado 117.6	0.5 pg. / 5 pg.	20
[112]	CG-MS	Extracción en fase solida C18 Sep-Pak	Aproximado 55	NR	6
[12]	LC-MS/MS Q TRAP	Extracción en fase solida	5.15	1.5 pg. / 6 pg	25
[50]	HPLC-MS/MS	Extracción liquido liquido	3.2	NR	18
[31]	HPLC-MS/MS	Extracción fase solida Strata-X/liquido-liquido	41.7	NR	18

V.3 Cuantificación de 8-iso-PGF2 α en plasma de cabra

El método desarrollado y validado para la cuantificación de 8-isoPGF2 α se aplicó a las muestras de plasma de cabra. Se procesaron y cuantificaron las muestras de plasma de las 9 semanas de estudio del grupo suplementado con bolos de selenio, grupo testigo y grupo parenteral.

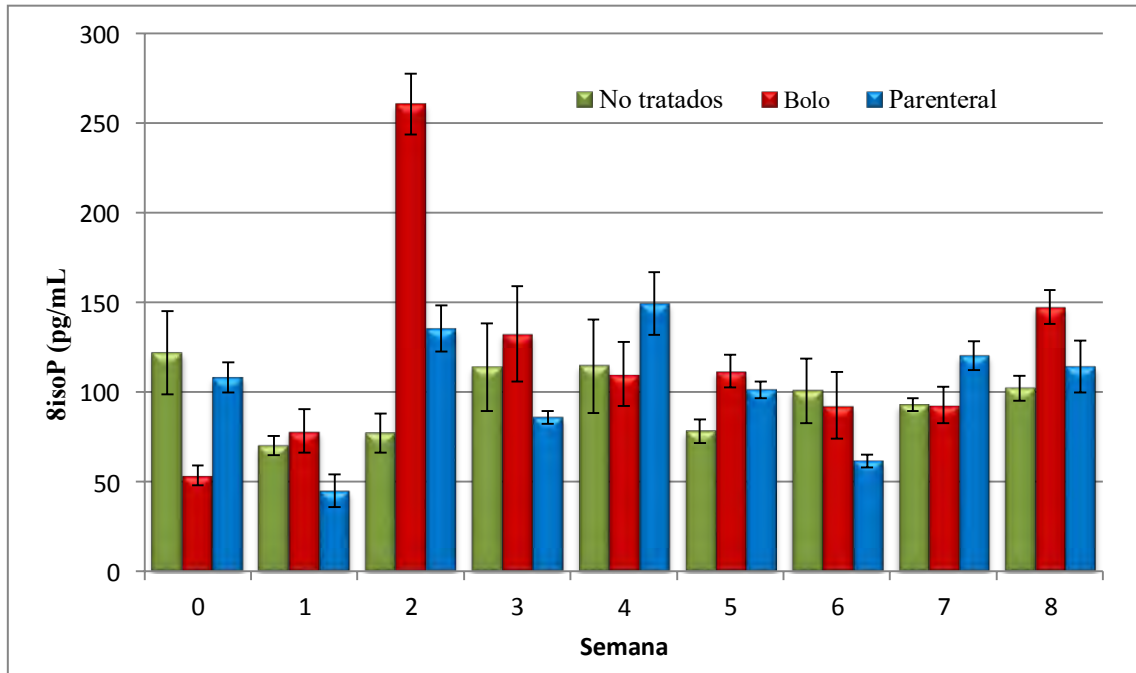


Figura 18.- Concentraciones plasmáticas promedio de 8-isoPGF2 α en los grupos experimentales.

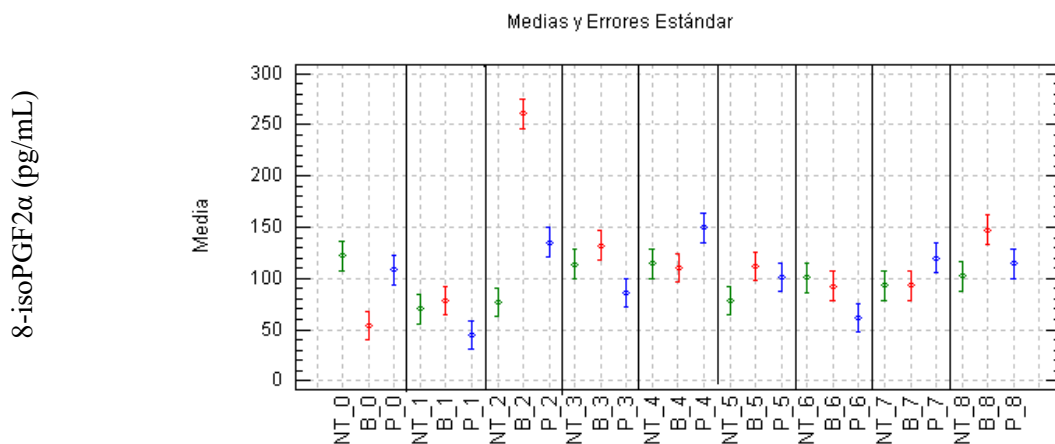


Figura 19. Análisis estadístico de la concentración de 8-isoPGF2 α en plasma de cabra en los tres diferentes grupos experimentales: No Tratados (NT●), Bolo (B●) y Parenteral (P●)

Se evaluaron las concentraciones plasmáticas de 8-isoPGF 2α para determinar el grado de lipoperoxidación en cabras. En cabras los factores como; el peri parto ^[113], la lactancia, la dieta de selenio ^[85], la presencia de patologías, por exposición a un tóxico o administración de un fármaco, pueden influir en el incremento de lipoperoxidación. Las unidades experimentales utilizadas en el presente estudio se reportaron sanas y su dieta no era deficiente de selenio (concentración de Selenio en alimento 1.115 $\mu\text{g Se/g}$ de muestra), por lo que las únicas causas de incremento de lipoperóxidos sería el hábitat, el estrés que sufrían en el manejo y en la toma de muestra de sangre, en los gráficos 18 y 19 se puede observar una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la semana dos de estudio en los tres diferentes grupos experimentales en la semana 3,4 y 6 se observa diferencia de los grupos NT y B con respecto al grupo P en la semana y en la semana 8 la diferencia se observa de NT y P con respecto a B. En promedio las concentraciones más elevadas de 8-isoPGF 2α se encontraron en la semana 2 en el grupo bolo, comparando los resultados obtenidos en el presente estudio con respecto a los estudios reportados en la literatura para la evaluación de isoprostanos en rumiantes, por ejemplo; Ono y colaboradores ^[43] ellos reportan concentraciones de $155.3 \pm 67.2 \text{ pg/mL}$ en ovinos en condiciones basales y concentraciones de $1113.3 \pm 645.2 \text{ pg/mL}$ después de inducir una lesión pulmonar aguda, reportando una correlación entre el aumento de la concentración de isoprostanos y la hipoxemia en ovejas. Los resultados en el presente estudio en el grupo bolo de la segunda semana experimental fueron $260.73 \pm 16.1 \text{ pg/mL}$ están aproximadamente cien unidades por arriba de los reportados como basales según lo reportado por Ono, con lo que podríamos suponer para ese grupo en la segunda semana un grado de lipoperoxidación.

V.4 Cuantificación de selenio en paquete globular de cabra

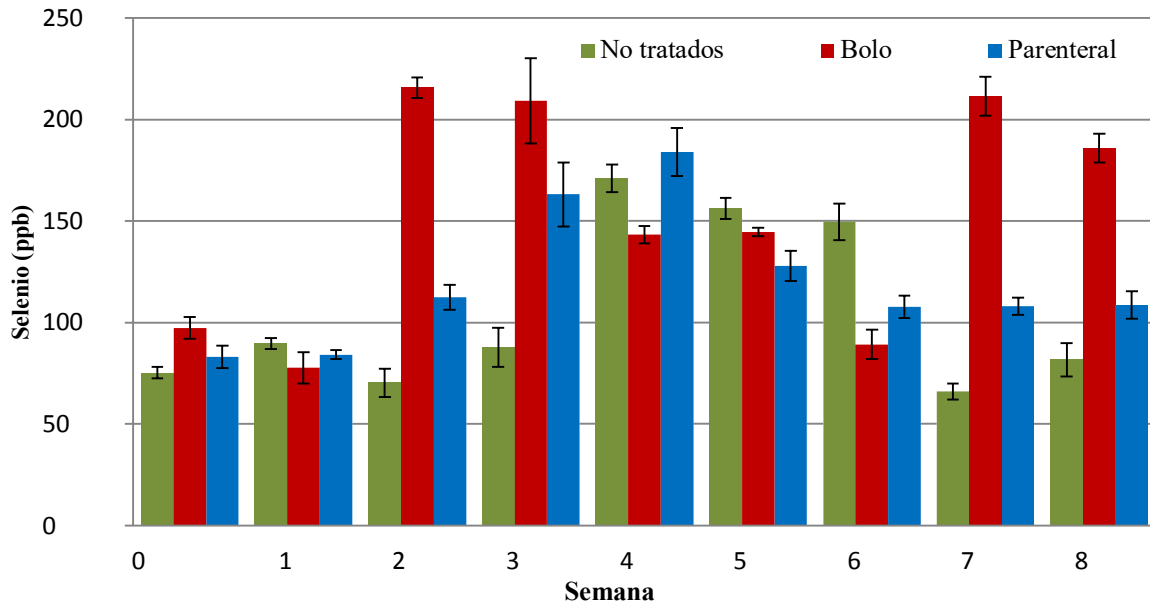


Figura 20.- Concentraciones promedio de selenio en paquete globular en los grupos experimentales.

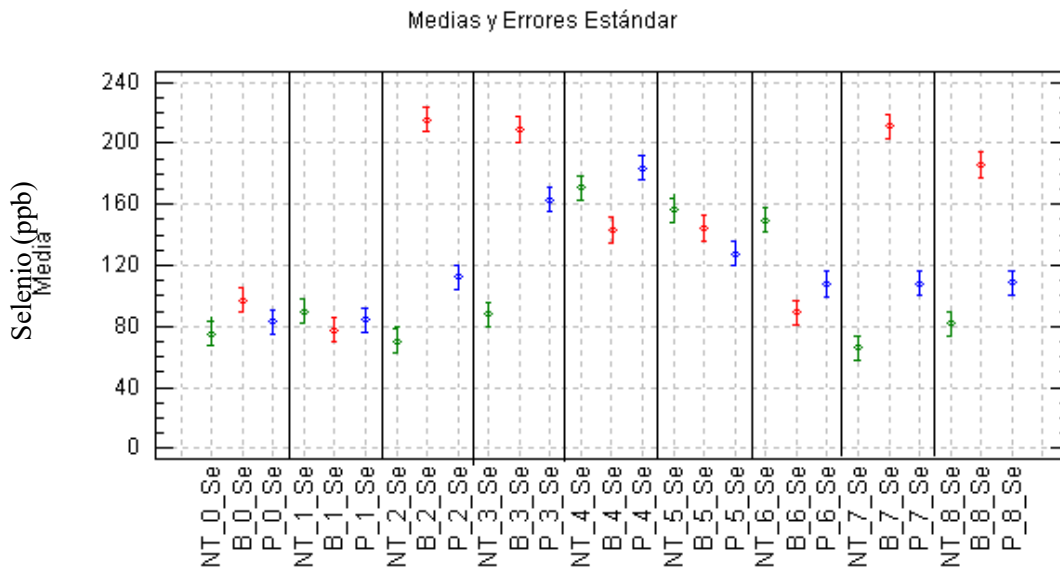


Figura 21. Análisis estadístico de la concentración de selenio en paquete globular de cabra en los tres diferentes grupos experimentales: No Tratados (NT ●), Bolo (B ●) y Parenteral (P ●).

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las medias de concentración de selenio, se observa en la Figura 20 y 21, la diferencia entre el grupo control y los grupos con suplemento de selenio de la semana 2, 3, 7 y 8. Los niveles mayores de selenio en el grupo tratado con bolos intra-ruminales se presentaron en la semana 2, 3, 7 y 8. Se observa que la liberación del selenio desde la forma farmacéutica (bolo) es modificada por el tipo de formulación del bolo el cual fue elaborado con una matriz lipídica, la liberación se produce por difusión. En el otro grupo suplementado con selenio vía parenteral, la administración subcutánea de selenio fue la semana 1 y 3 de experimentación, se observa que la concentración de selenio más elevada en este grupo se presentó en las semanas 3 y 4, para las últimas tres semanas de experimentación las concentraciones de selenio se mantuvieron constantes. La cantidad de selenio en las muestras también dependió de la alimentación, las cabras de los diferentes grupos fueron alimentadas con alfalfa la cual contenía 1.115 mg/Kg (ppm) las recomendaciones de Selenio en dieta para pequeños rumiantes considerada como adecuada es de 0.40-1.00 ppm, niveles altos de 3-5 ppm y niveles tóxicos de 5-25 ppm ^[114], específicamente para cabras se reportan niveles de 0.5 mg/kg (ganancia de peso vivo/coeficiente de absorción) ^[115] por lo que la cantidad de selenio disponible en el alimento de las cabras fue el adecuado y los niveles en el grupo control dependió únicamente de la cantidad consumida por cada unidad experimental. Los niveles de selenio en el paquete globular en los tres grupos experimentales se encuentran como adecuados según lo reportado por Puls ^[114] niveles adecuados 0.150-0.500 ppm y De Lazaro ^[116] reporta concentraciones deficientes de 50 ppb y concentraciones marginales de 50-75 ppb y de 100-200 ppb como adecuado, analizando la figura 20 se observa que en todos los grupos experimentales las concentraciones de selenio fueron adecuadas durante toda la experimentación, sin llegar a niveles tóxicos Khanal ^[117] reporta niveles de 1.5 µg/mL (1500 ppb) como indicativos de toxicidad ^[117].

V.5 Correlación selenio/8-isoPGF2 α

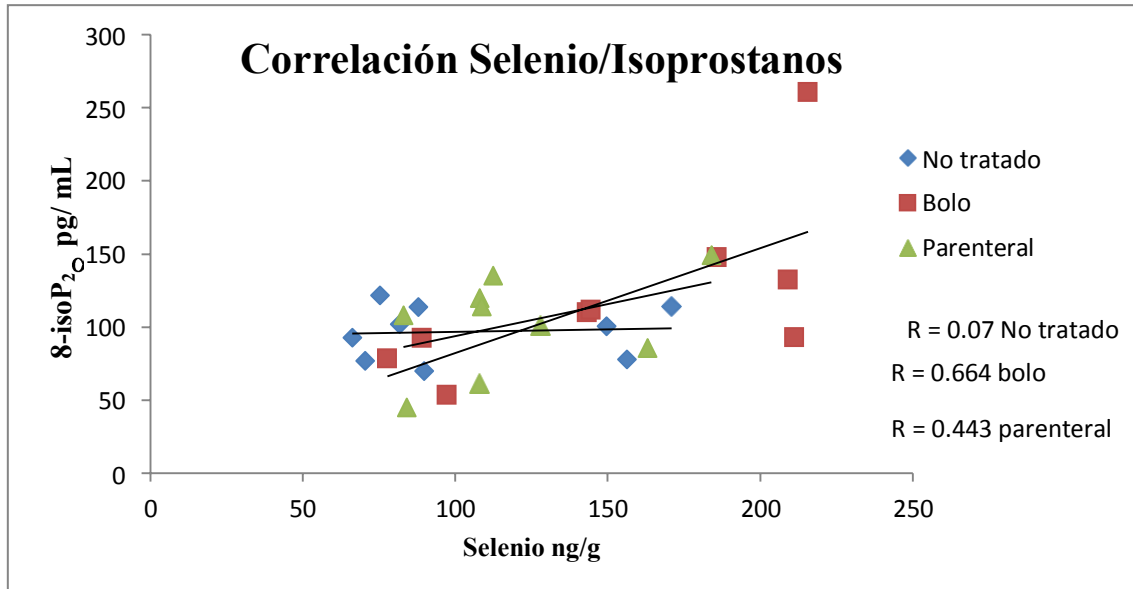





Figura 22. Correlación de la cantidad de selenio vs cantidad de isoprostanos


Se observa en el gráfico 22 que la correlación entre la cantidad de selenio y la cantidad de isoprostanos es positiva para los tres grupos evaluados, los grupos suplementados con selenio presentaron coeficientes de correlación de: $r = 0.664$ para el grupo suplementado con bolos, $r = 0.443$ para el grupo suplementado vía parenteral, dichos valores indican una correlación positiva moderada, en cambio el grupo testigo presenta un valor de $r = 0.07$ lo cual indica una correlación positiva muy baja. Sin embargo al realizar el análisis estadístico el resultado mostro un valor de $P > 0.05$, por lo tanto la correlación encontrada entre cada grupo experimental no es estadísticamente significativa. Helmersson reporta^[118] correlación negativa, indicando que elevados niveles de selenio relacionado con niveles bajos de estrés oxidativo, existen varias reportes en los que no se encuentra una correlación entre la cantidad de selenio e isoprostanos aun cuando se experimenta con animales deficientes de selenio, únicamente se encuentra una correlación negativa, es decir baja cantidad de selenio y altos niveles de isoprostanos cuando la deficiencia de selenio es de tal grado que comienza a causar daño en el tejido o cuando se administra un agente hepatotxico (Diquat) a los animales deficientes de selenio^[119-122] resaltando la importancia del selenio como protector de la hepatotoxicidad. En estos estudios los autores que no

VI. CONCLUSIONES

- 

El método desarrollado para la cuantificación de isoprostanos en plasma de rumiante demostró sensibilidad, precisión, exactitud, linealidad, menor tiempo de análisis, tiene la ventaja de utilizar baja cantidad de solventes, comparado con la extracción en fase solida convencional. El método es susceptible para ser aplicable con precisión, de forma rápida y rentable a muestras de plasma y poder evaluar lipoperoxidación como biomarcador del estatus de estrés oxidativo *in vivo*.
- 

Se evaluaron los niveles plasmáticos de isoprostanos en 3 grupos de cabras jóvenes alpinas, un grupo suplementado con bolos de selenio, otro grupo suplementado con selenio vía parenteral y un grupo testigo encontrando niveles de 53.64-260.72 pg/mL, 44.93-149.34 pg/mL y 70.05-121.85 pg/mL respectivamente.
- 

La concentración de selenio en los grupos con tratamiento presentó diferencias significativas con respecto al grupo testigo las semanas 2, 3, 7 y 8 de experimentación.
- 

Al evaluar los niveles plasmáticos de isoprostanos y la concentración de selenio en los diferentes grupos experimentales, no se encontró una correlación significativa entre ambos analitos.

VII. PERSPECTIVAS


Actualmente en México ningún laboratorio cuenta con un método de micro-extracción en fase sólida y UPLC-MS/MS que sea específico para evaluar lipoperoxidación, por lo tanto el presente trabajo da la pauta para abrir una nueva línea de investigación en LEDEFAR-FESC y brindar un servicio para apoyar otros proyectos que desean incluir en sus investigaciones la evaluación específica de un biomarcador de estrés oxidativo, este estrés puede afectar la salud de los animales y la calidad de sus productos. El método ya fue aplicado para evaluar estrés oxidativo en mujeres embarazadas y recién nacidos expuestos a contaminantes ambientales, en muestras de plasma de rata tratadas con diferentes fuentes de clenbuterol y en muestras de cerdos tratados con alquinal. El método puede ser aplicado en el área humana y veterinaria. También se puede iniciar una investigación para desarrollar y validar el método en otro tipo de muestra como orina y tejidos.

Ecuaciones para calcular el factor de respuesta (F):

$$\text{concentración muestra} = \frac{\text{señal de muestra}}{(\text{señal } 8\text{isoP} - d4)(f)} (\text{concentración } 8\text{isoP} - d4)$$

RESEARCH ARTICLE

Development of a method for the determination of 8-iso-PGF2 α in sheep and goat plasma using solid-phase microextraction and ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Gabriela Rodríguez Patiño¹ | Miriam Aide Castillo Rodríguez¹ |
Jacinto Efren Ramírez Bribiesca² | Patricia Ramírez Noguera¹ |
María Eugenia Gonsebatt Bonaparte³ | Raquel López-Arellano¹ 

¹National Autonomous University of Mexico, Cuautitlán Multidisciplinary Research Unit, Cuautitlán Izcalli, Edo. Mexico, Mexico CP 54714

²Postgraduate College, Livestock Program, Montecillo, Texcoco, Edo. Mexico, Mexico CP 56230

³National Autonomous University of Mexico, Institute of Biomedical, Genomic Medicine and Environmental Toxicology Research, University City, Coyoacán, Mexico City, Mexico CP 04510

Correspondence

R. López-Arellano, Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, FES Cuautitlán Campo 4, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio 5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, MX 54714

Email: lopezar@unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; PAPIIT IN218115 project of DGAPA-UNAM; PAPIIT, Grant/Award Number: IN218115; CONACyT, Grant/Award Number: 349129

Rationale: Isoprostane 8-iso-PGF2 α is a biomarker of lipid peroxidation in cell membranes. The method developed to measure plasma total levels (esterified + free) of 8-iso-PGF2 α must be reproducible and be able to reduce the use of solvents in solid phase extraction. It should be useful to evaluate oxidative stress due to the excess of free radicals that are generated by some disorder or disease.

Methods: The method was developed using solid-phase microextraction with Oasis@MAX μ Elution plates and ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS). Electrospray ionization was performed in the negative mode (ESI⁻); the multiple reaction monitoring mode (MRM) was used. The development of the method included the optimization of the chromatographic conditions to achieve the separation of PGF2 α and 8-iso-PGF2 α as well as the optimization of the microextraction conditions of the analyte of interest in ovine and goat plasma.

Results: The developed method was validated with a calibration curve of plasma samples fortified with standards at five concentration levels in the range 49–639 pg/mL. The average recovery was 89% with a standard deviation of 10.73%. The inter-day precision was evaluated, obtaining a coefficient of variance (CV) less than 15%. The limit of quantification was 20 pg/mL and the limit of detection was 10 pg/mL. 8-iso-PGF2 α was determined in the plasma of 14 sheep and 20 goats of 5 months of age and 6 goats of 24 months of age. The concentrations found were 50–300 pg/mL.

Conclusions: The method developed is precise, accurate and reliable with low reagent consumption compared with conventional solid-phase extraction. The analysis time was decreased because, with the use of the microextraction plate, the step of the evaporation and reconstitution of the analyte was avoided. The method is applicable to quantify the plasma total levels (esterified + free) of 8-iso-PGF2 α .

1 | INTRODUCTION

F2-Isoprostanes are compounds similar to prostaglandins-F. These are classified by the location of the hydroxyl group, found in the side chain of series 5, 12, 8 and 15.^{1,2} Isoprostane 8-iso-PGF2 α (also known as 15-F2 t-isoprostane, 8-isoprostane, 8-epi PGF2 α , iPF2 α -III) is the isomer with better quantification and predominance. Several authors have used this biomarker in oxidative stress, due to its participation in the peroxidation of arachidonic acid in the presence of free radicals.³⁻⁶ However, the formation of 8-iso-PGF2 α occurs through lipid and enzymatic peroxidation pathways with the action of cyclooxygenases.⁷⁻⁹ To distinguish the formation pathways of isoprostane 8-iso-PGF2 α , it is necessary to know the ratio between this isomer and PGF2 α .⁷ 8-iso-PGF2 α also possesses biological activities: it mediates oxidative damage,⁸ modulates lipids in vasoconstriction and platelet aggregation, activates the prostanoid receptors involved in intracellular signaling,¹⁰ increases vascular permeability and constriction in the smooth muscles of the gastrointestinal, tracheobronchial and uterine tissues,¹¹ is a mediator of pulmonary edema and a endoperoxide receptor agonist,⁹ among various recognized functions.

There are three methodologies reported to quantify isoprostanes. These are (1) an immunological method, based on a specific antigen-antibody reaction¹² which is easy to perform but relatively nonspecific, with greater than 40% variation and cross-reactivity with similar endogenous molecules, indicating that the technique has significant disadvantages.^{4,13} In addition, this technique is not applicable for the simultaneous evaluation of several metabolites.¹⁴ (2) Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and (3) liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). Mass spectrometry is based on obtaining ions from organic molecules in the gas phase, and once the ions are separated, they are detected according to their mass/charge ratio.¹² The technique with GC/MS requires a derivatization to make the compounds volatile so that they can elute from the column, but, during the process, there may be the loss of the analyte of interest because the derivatization reactions are not carried out with 100% efficiency, and thus, the derivatization must be previously optimized.^{4,13-15} The LC/MS technique is highly specific and sensitive, allowing the simultaneous quantification of several metabolites. The preparation of the sample is faster compared with the GC/MS technique because it is not necessary to derivatize the sample.^{4,13-15} The main objective of the present study was to develop and establish a method for the quantification of 8-iso-PGF2 α in the plasma (esterified + free) of sheep and goats. The advantages of this technique include a decrease in the use of solvents, a reduced analysis time and the use of a solid-phase extraction microplate (to avoid the step of the evaporation and reconstitution of the analyte).

2 | EXPERIMENTAL

2.1 | Experimental animals and sampling

The animals available were the following: Fourteen 5-month-old Hampshire sheep (10 non-pregnant female and 4 male) weighing

25 kg. Twenty 5-month-old Alpine non-pregnant goats weighing 22 kg and six Alpine goats of 24 months of age with 60 days of gestation and weighing 42 kg. In the groups of sheep and non-pregnant goats only one blood sample was taken, while 4 consecutive blood samples were extracted from each pregnant goat at intervals of 14 days. All blood samples were taken by puncture of the jugular vein using BD Vacutainer® 20G-X 38 mm sterile needles and 6 mL vacuum tubes with Heparin Vacutainer® BD. They were stored at 4°C immediately after sampling. The samples were then centrifuged at 3500 rpm for 15 min. The obtained plasma was separated in microtubes and stored at a temperature of -80°C until analysis. The animals used in the study did not show clinical signs of any disease, and they were handled with the approval of the internal committee for the care and use of experimental animals of the Cuautitlán School of Higher Studies of the National Autonomous University of Mexico (CICUAE-FESC C15_03).

2.2 | Materials

The standards for 8-iso-PGF2 α and 8-iso-PGF2 α -d4 (internal standard) were purchased from Cayman Chemicals, while the standard for PGF2 α was from Sigma Aldrich. Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were purchased from J.T. Baker. Milli-Q water (Millipore system) was used throughout the experiments. Formic acid (FA: 95% reactive grade) and isopropanol (grade masses) were purchased from Sigma Aldrich. Ammonium hydroxide (NH₄OH reactive grade 29.60%) and potassium hydroxide (KOH) were purchased from J.T. Baker. For solid-phase microextraction (micro-SPE), 96-well Oasis® MAX μ Elution cartridges containing a water-wettable reversed-phase strong ammonium exchange mixed-mode polymer, which is selective for acids and stable in organic eluents, were used. A Positive Pressure-96 processor purchased from Waters was also used.

2.3 | Chromatography

An ACQUITY UPLC® ultra-performance liquid chromatography instrument with a C18 ACQUITY BEH UPLC® column (1.7 μ m 2.1 \times 100 mm) from Waters was used and maintained at 30°C. The mobile phases were (A) 0.1% FA in water and (B) acetonitrile at a flow

TABLE 1 Optimized elution gradient^a

Time (min)	Solvent, %	
	A	B
0.0	70	30
1.0	70	30
1.8	50	50
3.0	50	50
3.5	50	50
4.0	70	30
5.0	70	30

^aThe linear gradient was used to optimize the resolution of the analytes.

TABLE 2 Optimized MS parameters for each analyte

Analyte	Transition (<i>m/z</i>)	CV (V) ^a	CE (V) ^b
PGF2 α	353.28 \rightarrow 193.16	34	24
8-iso-PGF2 α	353.34 \rightarrow 193.16	34	24
8-iso-PGF2 α -d4	357.40 \rightarrow 197.20	36	24

^{a,b} Cone voltage (CV) and collision energy (CE) were optimized using MRM.

rate of 0.3 mL/min. The separation was achieved with an optimized linear gradient (Table 1). The injection volume was 30 μ L, and the temperature in the autosampler was maintained at 20°C.

2.4 | Mass spectrometry

We used a XEVO™ TQ mass spectrometer in tandem; it was operated with an electrospray ionization source in the negative mode (ESI⁻). To find the detection conditions, standard solutions of 1000 ng/mL PGF2 α , 8-iso-PGF2 α and 8-iso-PGF2 α -d4 were infused into the equipment. The multiple reaction monitoring (MRM) method was applied using a dwell time of 0.150 s. The voltage was 3 kV for the capillary and 30 V for the cone, while the desolvation temperature was 439°C. The other measurement parameters of the transitions found for each analyte are shown in Table 2.

2.5 | Procedure for the extraction of 8-iso-PGF2 α from plasma

For the extraction of iso-PGF2 α (esterified + free), aliquots of 500 μ L of sheep and goats plasma were transferred to 2 mL vials; 100 μ L of the internal standard (solution 4 ng/mL of 8-iso-PGF2 α -d4) and

500 μ L of the hydrolysis solution (KOH 15% in water) were added to liberate 8-iso-PGF2 α -esterified. The vials were mixed and incubated in an ultrasonic bath for 30 min at 40°C. After the vials had been cooled to room temperature, 225 μ L of 6 M FA was added and mixed, followed by centrifugation at 15,000 rpm for 10 min at 4°C. Solid-phase microextraction was applied to the supernatants using a 96-well Oasis® MAX μ Elution plate conditioned with 500 μ L of methanol and 500 μ L of 20 mM FA. After 350 μ L of the sample had been loaded, wells were washed with 350 μ L of 2% NH₄OH, and the samples were eluted with 50 μ L of a mixture of 5% FA in acetonitrile and isopropanol (40:60) diluted with 150 μ L of Milli-Q water (Figure 1).

2.6 | Accuracy and precision

Based on the validation guide of bioanalytical methods of the Food and Drug Administration (FDA),¹⁶ the accuracy and precision were determined. The method was evaluated with plasma samples from a pool of plasma of 20 goats, with four different concentration levels of 196, 490, 640 and 786 pg/mL added ($n = 5$ per concentration) on two different days. The coefficients of variation and standard deviations were evaluated.

2.7 | Matrix effect and selectivity

The matrix effect was evaluated after the extraction by adding a known amount of standard to the samples after carrying out the extraction process. The selectivity was evaluated by analyzing a solvent blank and seven random plasma samples of sheep and goats¹⁶ to identify whether there is interference from the matrix with the analyte of interest when comparing the different chromatograms and the retention time of 8-iso-PGF2 α in the samples in the target solvent and the standard.

2.8 | Calibration curves

The construction of the calibration curve was performed with seven standard concentration levels of 8-iso-PGF2 α in a range of 40–760 pg/mL and 400 pg/mL for the internal standard (8-iso-PGF2 α -d4). Another curve was made using a plasma pool of 20 goats and the standard of 8-iso-PGF2 α in the range 49–639 pg/mL. The coefficients of determination, correlation and confidence intervals for the intercept as well as the ordinate of origin were evaluated using Microsoft Excel 2010.

2.9 | Detection and quantification limits

Solutions from 5 to 50 pg/mL were prepared, and the MassLynx V4.1 software was used to evaluate the signal-to-noise ratio (S/N) considering a ratio of 3¹⁴ and 10¹⁷ for the limit of detection and quantification, respectively.

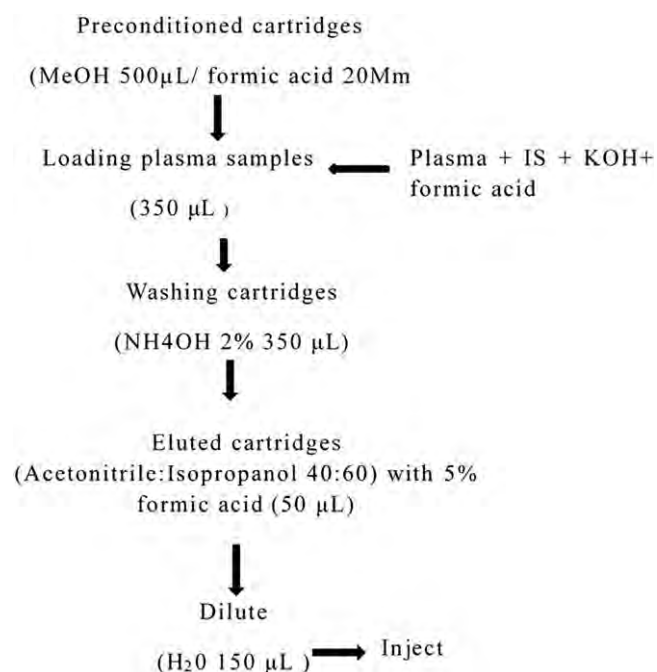


FIGURE 1 Schematic representation of the micro-SPE of 8-iso-PGF2 α using Oasis® MAX μ Elution plates

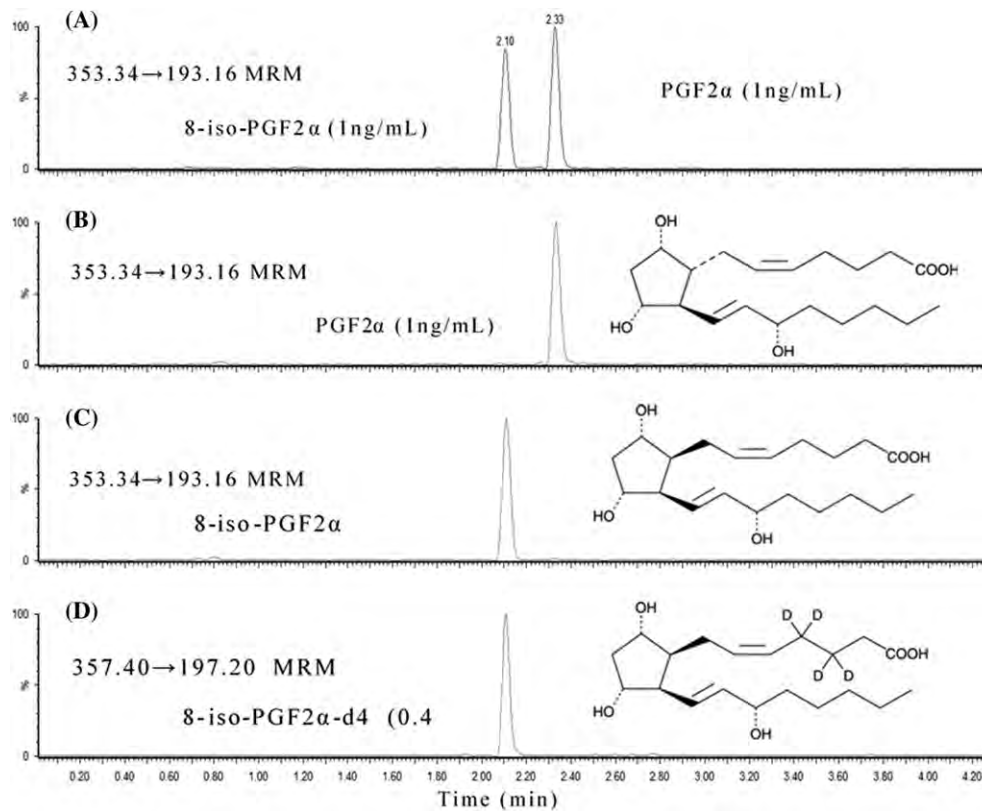


FIGURE 2 Chromatograms of standards: (A) mix of PGF2α and 8-iso-PGF2α (1 ng/mL), (B) PGF2α, (C) 8-iso-PGF2α, and (D) 8-iso-PGF2α-d4

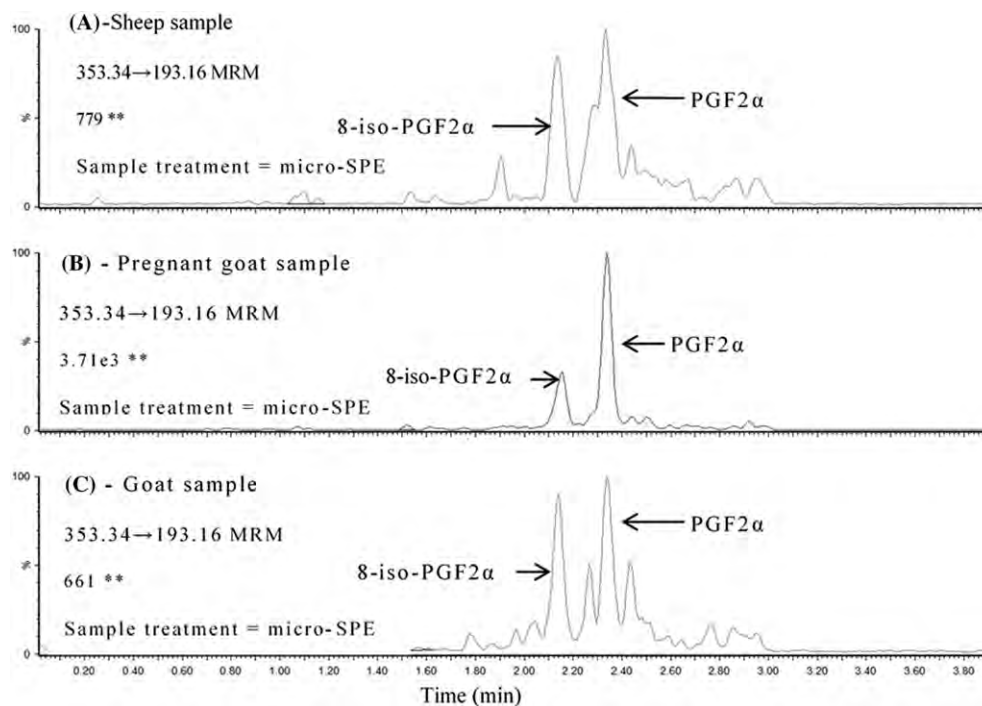


FIGURE 3 Chromatograms of 8-iso-PGF2α and PGF2α in plasma samples after applying the micro-SPE method: (A) sheep sample, (B) pregnant goat sample, and (C) goat sample. ** = Number of ions detected at largest peak

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Development of the method

The first step to develop the quantification method was to optimize and establish the detection conditions of 8-iso-PGF2 α and the internal standard 8-iso-PGF2 α -d4. These standards (including PGF2 α) were infused in the MS/MS spectrometer to find the measurement values of the precursor and most abundant ions. The transitions and optimized parameters are shown in Table 2. The mass, m/z ratio, most abundant fragment and detection conditions for PGF2 α and 8-iso-PGF2 α were the same. Because the isoprostane of interest is the isomer of prostaglandin, these molecules have the same atomic composition but differ in their structural conformation. Prostaglandin has the cyclopentane side chains oriented in the *trans* form, and for isoprostane, the chains are oriented in the *cis* form. Under the same conditions, the detector cannot distinguish them from one another, and, thus, we worked on optimizing the chromatographic conditions to separate the isomers PGF2 α and 8-iso-PGF2 α . For this, different mobile

phases were evaluated including FA, acetonitrile, methanol, acetic acid, ammonium hydroxide and ammonium acetate. The following were also evaluated: the flow rate in a range of 0.3 to 0.4 mL/min; the injection volume in a range of 5 to 40 μ L; and various types of columns including C18 2.7 μ m, C8 1.7 μ m and C18 1.7 μ m (see supporting information). The optimal conditions were FA and acetonitrile in the mobile phase, a flow rate of 0.3 mL/min, a 30 μ L injection volume and a C18 1.7 μ m column. Figure 2 shows the individual chromatograms for PGF2 α , 8-iso-PGF2 α , 8-iso-PGF2 α -d4 and the mixture of PGF2 α and 8-iso-PGF2 α ; the separation of the analytes with good resolution is observed. The result was the differentiation of these analytes, and the presence of false positives was avoided because the plasma samples had both analytes PGF2 α and 8-iso-PGF2 α . After establishing the chromatographic and detection conditions, the solid-phase extraction process was developed and optimized using Oasis@MAX μ Elution cartridges. The choice of cartridge type was based on information reported by Dupuy et al¹⁸ and Lee et al,¹⁹ as well as on the characteristics of the analyte. The Oasis@MAX cartridges contain a mixed-mode polymer (reversed-phase/strong anion

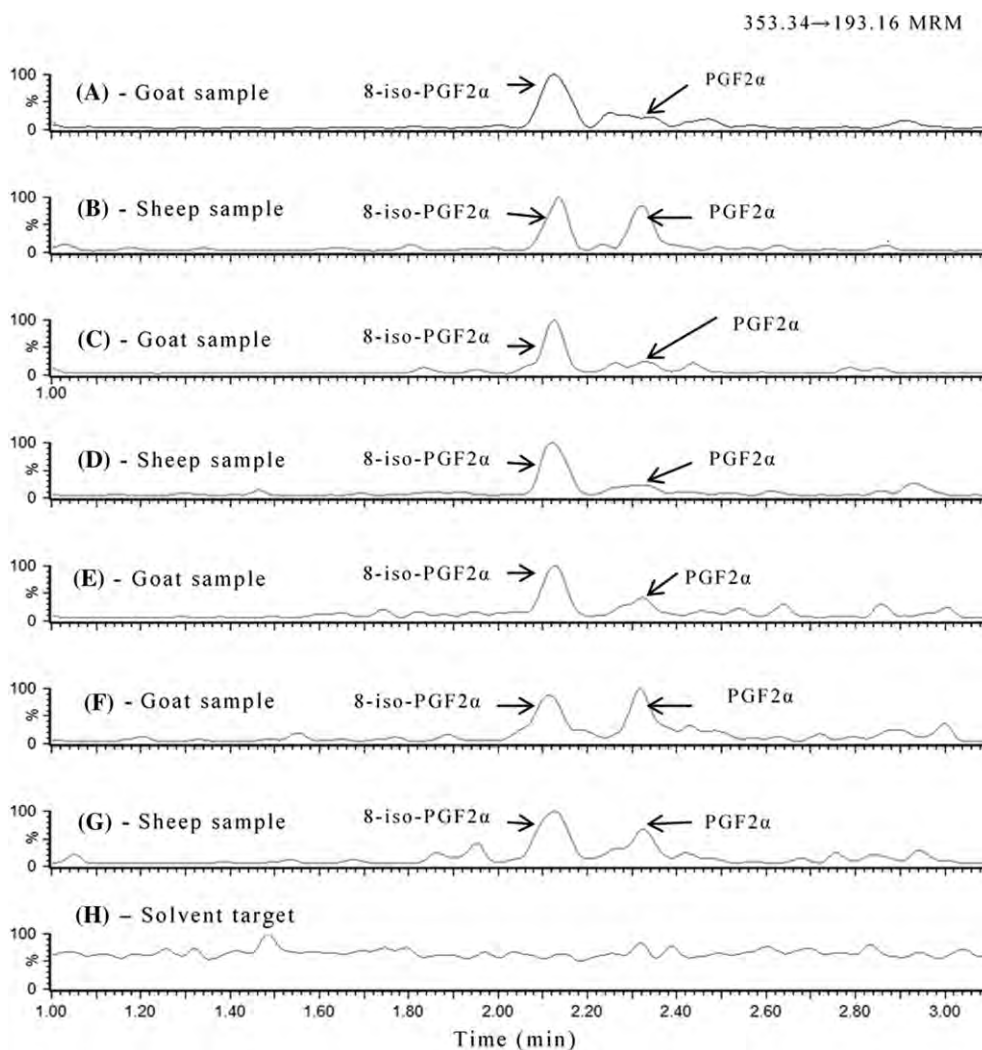


FIGURE 4 Chromatograms of plasma samples for the selectivity analysis: (A) goat ID 68, (B) sheep ID 37, (C) goat ID 18, (D) sheep ID 1, (E) goat ID 2, (F) goat ID 10, (G) sheep ID 9, and (H) solvent target

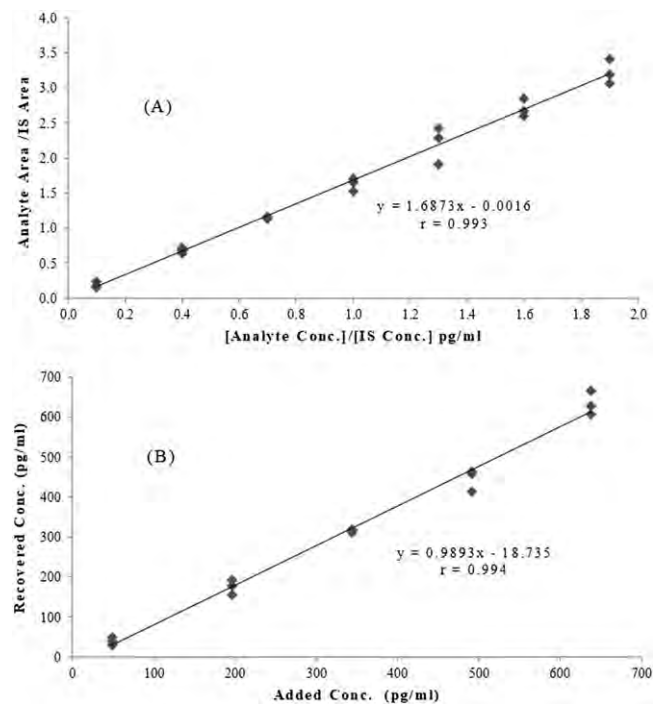


FIGURE 5 Calibration curves presenting the linear regression equation and correlation coefficient (r) of the 8-iso-PGF2 α standard in the elution mixture (A) and 8-iso-PGF2 α (B) in plasma

exchange), are selective for acids and stable in organic eluents. Unlike the studies reported by the previous authors, in our method, we use Oasis® MAX micro-elution plates. For this type of plate, it is not necessary to evaporate and reconstitute, and volumes of 50 to 500 μ L are used. This makes the method more efficient by reducing the number of steps in the process and decreasing the consumption of solvents and reagents. In the optimization of the extraction process, tests were carried out to establish the conditions of conditioning and balancing the cartridge, loading the sample, and washing and eluting 8-iso-PGF2 α . Figure 3 shows a representative chromatogram of a sample from each group of animals. All showed signals in the retention time of 8-iso-PGF2 α and PGF2 α , the pregnant goat sample had the highest signal compared with the other two samples. After the optimization of the extraction conditions, various parameters of the method were evaluated.

3.2 | Validation of the method

The matrix effect was used to identify an increase or decrease in the response of the analyte of interest, which could be produced by the co-elution of other compounds present in the matrix. The solid-phase extraction process was carried out, and, then, a known concentration of 8-iso-PGF α was injected into the UPLC/MS/MS system. In the chromatograms, no changes in the analyte signal were observed when compared with the standard. The selectivity was evaluated with seven different samples of plasma, and these were compared with the standard and the target solvents.

Figure 4 shows the chromatograms of the standard and of the seven plasma samples analyzed. The endogenous 8-iso-PGF2 α was detected by the transition and retention time. Meanwhile, the target solvent showed a low signal in the retention time. The linearity of the system was evaluated with a correlation coefficient of 0.99, considered as acceptable. The coefficient of determination was 0.98, the confidence interval for the ordinate to the origin includes zero, and the confidence interval for the slope includes the unit. Subsequently, the recovery percentages of the added concentrations were calculated. The correlation coefficient was 0.99, the coefficient of determination was 0.988, the average of the recovery percentages was 89.96% and the coefficient of variation was 11.93. The values obtained met the acceptance criteria. Figure 5 shows the graphs for the calibration curves of the system and the method. The limit of detection and quantification were recorded from 10 μ g/mL and 20 μ g/mL, respectively. The precision of an analytical method is related to the dispersion of the measurements around their average value and corresponds to the degree of agreement or degree of dispersion. Samples prepared with known quantities of analyte were evaluated. Table 3 shows the results of the coefficients of variation for the determination of the precision. The values of the inter-day evaluation have coefficients of variation less than 15% (Table 3), and the recovery values were from 83 to 96.9%, indicating good results in the evaluation of the accuracy.

3.3 | Application of the method

In the present study we simplified the quantification method of 8-iso-PGF2 α by using a micro-extraction plate, and up to 96 samples can be analyzed in approximately 12 h. Considering alkaline hydrolysis, solid-phase extraction and analysis by UPLC/MS/MS,

TABLE 3 Results of the evaluation of the precision and accuracy of the method

Intra-day precision (n = 5)					Inter-day precision (n = 10)				
Added pg/mL	Recovered pg/mL	% Accuracy	SD	CV%	Added pg/mL	Recovered pg/mL	% Accuracy	SD	CV%
196	190.40	96.90	7.80	8.05	196	172.98	88.04	11.10	12.60
491	442.38	90.06	5.27	5.51	491	448.21	91.24	6.16	6.57
639	530.29	83.04	9.75	11.07	639	548.53	85.90	10.92	12.37
786	752.50	95.74	6.13	6.04	786	750.05	95.43	7.31	7.45

SD: standard deviation; CV%: coefficient of variation

TABLE 4 Concentration of 8-iso-PGF2 α in small ruminants (Sample*Days of pregnancy)

SHEEP				GOATS				
Male		Female not pregnant		Male		Female pregnant		
ID	(pg/mL)	ID	(pg/mL)	ID	(pg/mL)	ID	Sample*	(pg/mL)
OV11	92.452	OV1	154.086	C1	137.505	5	60	204.508
OV12	170.306	OV10	107.31	C2	165.006		74	168.899
OV4	70.216	OV13	83.463	C3	96.763		88	117.796
OV6	158.901	OV14	128.01	C4	95.003		102	115.396
mean \pm SD	122.9 \pm 49.1	OV2	162.196	C5	61.473	8	60	212.688
		OV3	127.288	C6	55.002		74	170.15
		OV5	75.251	C7	291.996		88	134.702
		OV7	219.573	C8	253.342		102	191.836
		OV8	121.248	C9	281.356	64	60	226.264
		OV9	131.088	C10	130.63		74	322.97
		mean \pm SD	130.9 \pm 41.4	C11	65.315		88	270.694
				C12	216.215		102	154.682
				C13	143.693	1BS	60	109.071
				C14	91.149		74	274.436
				C15	90.197		88	158.807
				C16	157.588		102	115.356
				C17	117.666	4BS	60	190.467
				C18	93.701		74	334.629
				C19	109.144		88	375.331
				C20	157.168		102	349.026
				mean \pm SD	140.5 \pm 70.5	9BS	60	177.24
							74	221.675
							88	268.658
							102	288.648
							mean \pm SD	214.7 \pm 79.5

SD: Standard deviation

we increased the analysis speed and decreased the solvents per analysis. This method was used to investigate the levels of 8-iso-PGF2 α in plasma of small ruminants (Table 4). The aim of this study was to quantify only 8-iso-PGF2 α in plasma. However, the detection of PGF2 α gave the guideline to carry out future studies and quantify 8-iso-PGF2 α and PGF2 α at the same time. The ratio of both analytes can indicate the amount of 8-iso-PGF2 α formed by free radicals (lipid peroxidation) and used be as specific biomarker. Another innovation of the method was robust. The developed method can be applied to different types of plasma, including that from humans.

4 | CONCLUSIONS

The developed method demonstrates sensitivity, precision, accuracy, linearity, a shorter analysis time, and low solvent use compared with conventional solid-phase extraction. The method can be applied with precision, quickly and at low cost, to plasma samples and to evaluate lipid peroxidation as a biomarker of the oxidative stress status *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CONACyT for doctoral grant number 349129 and the funding obtained by the PAPIIT IN218115 project of DGAPA-UNAM.

ORCID

Raquel López-Arellano  <http://orcid.org/0000-0002-2050-6119>

REFERENCES

- Musiek ES, Yin H, Milne GL, Morrow JD. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids*. 2005;40(10):987-994. <https://doi.org/10.1007/s11745-005-1460-7>
- Talati M, Meyrick B, Peebles RS, et al. Oxidant stress modulates murine allergic airway responses. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(7):1210-1219. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.012>
- Bastani NE, Gundersen TE, Blomhoff R. Dried blood spot (DBS) sample collection for determination of the oxidative stress biomarker 8-epi-PGF2 α in humans using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2012;26(6):645-652. <https://doi.org/10.1002/rcm.6149>
- Teng Y-H, Wang C-W, Liao Y-T, Yang M-W, Liu T-Y. Quantification of urinary 8-iso-prostaglandin F2 α using liquid chromatography-tandem mass spectrometry during cardiac valve surgery. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(4):237-245. <https://doi.org/10.1002/jcla.20392>
- Guichardant M, Lagarde M. Analysis of biomarkers from lipid peroxidation: A comparative study. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2009;111(1):75-82. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800069>
- Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, et al. Biomarkers of oxidative stress study II. Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2005;38(6):698-710. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.017>
- Van't Erve TJ, Lih FB, Jelsema C, et al. Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-prostaglandin F2 α /prostaglandin F2 α ratio shows complex origins of lipid peroxidation biomarkers in animal models. *Free Radic Biol Med*. 2016;95(6):65-73. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.001>

8. Roberts LJ, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab.* 1997;1345(2):121-135. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(96\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(96)00162-2)
9. Watkins MT, Patton GM, Soler HM, et al. Synthesis of 8-epi-prostaglandin F2alpha by human endothelial cells: role of prostaglandin H2 synthase. *Biochem J.* 1999;344(3):747-754. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3440747>
10. Chen SP, Chung YT, Liu TY, Wang YF, Fuh JL, Wang SJ. Oxidative stress and increased formation of vasoconstricting F2-isoprostanes in patients with reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2013;61(8):243-248. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.022>
11. Wen S-H, Ling Y-H, Liu W-F, et al. Role of 15-F_{2t}-isoprostane in intestinal injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Free Radic Res.* 2014;48(8):907-918. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.926010>
12. Lawson JA, Fitzgerald GA. Analysis of isoprostanes. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2002;104(7):429-435. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200207\)104:7<429::AID-EJLT429>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200207)104:7<429::AID-EJLT429>3.0.CO;2-O)
13. Zhang H, Il'yasova D, Sztaray J, Young SP, Wang F, Millington DS. Quantification of the oxidative damage biomarker 2,3-dinor-8-isoprostaglandin-F2α in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2010;399(2):302-304. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.024>
14. Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(20):3023-3029. <https://doi.org/10.1002/rcm.2697>
15. Winnik WM, Kitchin KT. Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;233(1):100-106. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.05.003>
16. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*; 2001. doi:<http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>
17. Bastani NE, Gundersen TE, Blomhoff R. Determination of 8-epi PGF2 α concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009;23(18):2885-2890. <https://doi.org/10.1002/rcm.4197>
18. Dupuy A, Le Faouder P, Vigor C, et al. Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanooids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples. *Anal Chim Acta.* 2016;921(20):46-58. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.024>
19. Lee C-YJ, Jenner AM, Halliwell B. Rapid preparation of human urine and plasma samples for analysis of F2-isoprostanes by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(3):696-702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.015>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Rodríguez Patiño G, Castillo Rodríguez MA, Ramírez Bribiesca JE, Ramírez Noguera P, Gosebatt Bonaparte ME, López-Arellano R. Development of a method for the determination of 8-iso-PGF2α in sheep and goat plasma using solid-phase microextraction and ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2018;32:1675-1682. <https://doi.org/10.1002/rcm.8224>