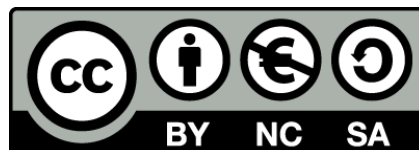




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Noves eines per a la detecció de disruptors lipídics i obesògens ambientals**

Anna Marqueño Bassols



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



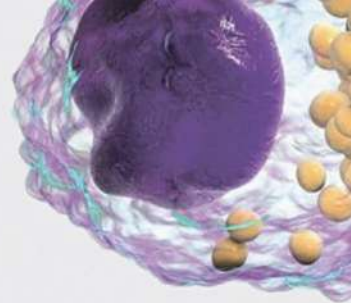
UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# **Noves eines per a la detecció de disruptors lipídics i obesògens ambientals**

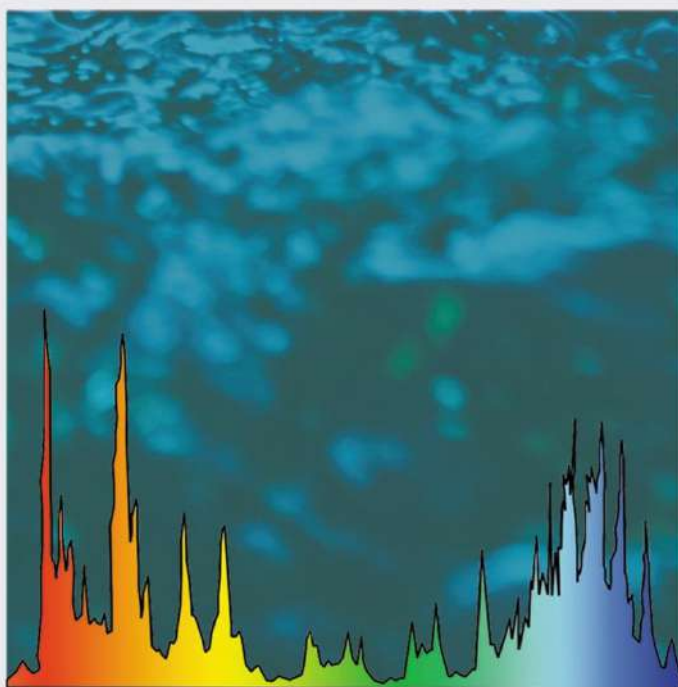
Anna Marqueño Bassols



# Noves eines per a la detecció de disruptors lipídics i obesògens ambientals



Anna Marqueño Bassols







**FACULTAT DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA I QUÍMICA ANALÍTICA**

Programa de Doctorat:

**Química Analítica i Medi Ambient**

---

**Noves eines per a la detecció de disruptors lipídics i obesògens ambientals**

---

Memòria presentada per

**Anna Marqueño Bassols**

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Directora:

**Dra. Cinta Porte Visa**

Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l'Aigua (IDAEA)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Tutora:

**Dra. Encarnación Moyano Morcillo**

Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica

Universitat de Barcelona (UB)



La Dra. **Cinta Porte Visa**, professora d'investigació del Departament de Química Ambiental de l'Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l'Aigua adscrit al Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

FA CONSTAR,

Que la present memòria titulada, "**Noves eines per a la detecció de disruptors lipídics i obesògens ambientals**", ha estat realitzada sota la seva direcció per la Sra. **Anna Marqueño Bassols** i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades per la citada doctoranda en el Departament de Química Ambiental de l'Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l'Aigua adscrit al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

I per tal de que així consti expedeix el present certificat.

Barcelona, Juliol de 2020

Dra. Cinta Porte Visa



*A la meva família,*

*“Els impossibles d’avui seran possibles demà”*

Konstantin Tsiolkovsky



## AGRAÏMENTS

Són moltes les persones que m'han acompanyat i consellat al llarg d'aquest camí que ha estat la realització de la Tesi que avui sosteniu entre les mans, i no vull perdre l'ocasió d'agrair-los-ho.

M'agradaria començar per la meva directora de Tesi, la Dra. Cinta Porte Visa, gràcies a la teva guia, constància i suport, per haver-me transmès els coneixements per a la realització d'aquesta Tesi i les bones pràctiques en investigació. Gràcies també a la meva tutora, Encarnación Moyano, per la seva ajuda durant aquests anys, per estar sempre disponible i els seus comentaris sempre tan interessants.

Uno de los pilares más importantes habéis sido vosotras, mis compañeras de lab, Alejandra, Eli y María, porque habéis sido a veces amigas, a veces profes, a veces alumnas, a veces consejeras, un apoyo imprescindible, porque al vivir la misma experiencia, siempre habéis encontrado las palabras justas para motivarme. Agradecer también al resto del grupo de toxicología ambiental, Melisa, Laia, Claudia, Francisco, Carlos y Benjamí, y en especial a Inma, Marta y Rubén, por el buen rollo, las interesantísimas charlas y la calidad humana que me habéis mostrado estos cuatro años, y a los que un día estuvieron, pero la vida los ha llevado lejos, Denise, Rita, Cesare, Piere-Giorgio, de cada uno de vosotros he aprendido algo.

I would like to give many thanks to Dr. Nancy Denslow and Dr. John A. Bowden for acceptin me to their lab during my stay in Florida, I learned a lot from both of you! Y sobretodo a vosotros, Kuri, Maite y Alex, con vosotros en el lab mi experiència en Gainesville no podria haber sido mejor, mucha suerte en vuestra tesis y en vuestra vida, ¡espero que la vida nos vuelva a juntar algún día!

La llista d'amistats als qui vull agrair el seu suport és llarga, però m'agradaria començar per aquells qui van viure amb mi l'experiència dels anys universitaris, sobretot a vosaltes Laia i Dani, però també a vosaltres Miriam, Ivanna, Mercè, Pablo (i algun més) amb vosaltres hem viscut una de les etapes més dolces de la vida que ens ha permès arribar on som ara. Gràcies pròxima fermata per ser tant genials, que les quedades anuals durin per molts anys!! Thank you Daria, for the short trips, and quick



lunches, for being by my side and for having such a good energy! A la colla de salsa, però sobretot a les floretes Elena i Celia, espero que la vida ens depari molts més *cross-bodies* juntes!! Gràcies a tu Meritxell, la meva cosina, pels bons moments, llargues xerrades, caminates, moments surrealistes i comprensió! London was one of the greatest experience in my life, and you both, Anna and Jazmin are the best part of it. I per últim gràcies a vosaltres, trobades i birres, Rocío, Mireia, Helena, Júlia, Yas (i respectivos), sou les meves amigues, confidents, en resum, la meva família!

M'agradaria fer-te una especial menció a tu, Garci, gràcies per ajudar-me sempre que pots, per fer-me feliç i estimar-me. A més, t'haig d'agrair la teva implicació en la materialització de la portada d'aquesta Tesi, gràcies per compartir amb mi els teus coneixements i el teu temps. Com sempre dius, no podríem ser més diferents, així que crec que vas aparèixer a la meva vida per complementar-me!

Una menció a la família, sobretot a les tietes i a l'avi Josep, i a vosaltres, iaia Lluisa, avi Miguel i sobretot a tu, iaia Carmeta, exemple de vitalitat, que ja no hi sou però us porto al cor!

I els més importants, els que han estat al meu costat des de sempre mama, papa i Jordi, gràcies per creure en mí quan ni jo ho feia, heu estat sempre una mostra de superació i constància. Si avui sóc qui sóc és gràcies a vosaltres, us estimo!

Oh, benvinguts, passeu passeu, ara ja no falta ningú,  
o potser sí, ja me n'adono que tan sols hi faltes tu!

## ÍNDEX

<b>RESUM</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>ABREVIATURES I ACRÒNIMS</b> .....	<b>VII</b>
<b>OBJECTIUS I ESTRUCTURA</b> .....	<b>IX</b>
<b>INFORME FACTOR D'IMPACTE I GRAU D'IMPLICACIÓ</b> .....	<b>IXIII</b>
<b>CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b> <b>LIPIDÒMICA A L'ERA DE LES ÒMIQUES</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2</b> <b>LÍPIDS: FUNCIÓ I METABOLISME</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3</b> <b>ANÀLISI DE LÍPIDS</b> .....	<b>12</b>
1.3.1    Extracció de lípids de mostres biològiques .....	13
1.3.2    Anàlisi instrumental .....	14
1.3.2.1  Analitzadors dels espectròmetres de masses .....	21
1.3.3    Tractament de dades .....	24
1.3.4    Interpretació biològica .....	26
<b>1.4</b> <b>NOMENCLATURA DELS LÍPIDS</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5</b> <b>OBESÒGENS I DISRUPTORS LIPÍDICS</b> .....	<b>29</b>
1.5.1    Bisfenol A i derivats .....	30
1.5.2    Tributil d'estany .....	33
1.5.3    Àcid retinòic .....	34
1.5.4    Progestàgens: Drospirenona .....	35
<b>1.6</b> <b>SISTEMES BIOLÒGICS</b> .....	<b>36</b>
1.6.1    Línies cel·lulars .....	36
1.6.1.1  Cèl·lules de placenta humana .....	39
1.6.1.2  Cèl·lules hepàtiques de peix.....	40

1.6.1.3	Assajos.....	41
1.6.2	Espècies sentinella .....	43
<b>CAPÍTOL 2. TREBALL EXPERIMENTAL I RESULTATS.....</b>		<b>45</b>
<b>2.1</b>	<b>DISRUPCIÓ LIPÍDICA EN MODELS HUMANS .....</b>	<b>46</b>
2.1.1	Article científic I.....	47
<b>2.2</b>	<b>DISRUPCIÓ LIPÍDICA EN MODELS AMBIENTALS .....</b>	<b>63</b>
2.2.1	Article científic II.....	65
2.2.2	Article científic III.....	95
2.2.3	Article científic IV .....	129
<b>2.3</b>	<b>ESTUDI DE CAMP PER A LA DETECCIÓ DE DISRUPCIÓ LIPÍDICA AL MEDI AQUÀTIC.....</b>	<b>141</b>
2.3.1	Article científic V .....	143
<b>CAPÍTOL 3. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS .....</b>		<b>163</b>
<b>3.1</b>	<b>METODOLOGIES ANALÍTIQUES UTILITZADES PER ALS ESTUDIS LIPIDÒMICS .....</b>	<b>164</b>
<b>3.2</b>	<b>MECANISMES D'ACCIÓ DELS XENOBIÒTICS ESTUDIATS.....</b>	<b>179</b>
<b>3.3</b>	<b>EMPREMTES LIPÍDIQUES DE CONTAMINACIÓ AMBIENTAL DETECTADES MITJANÇANT ESTUDI DE CAMP .....</b>	<b>187</b>
<b>3.4</b>	<b>IMPLEMENTACIÓ DELS ESTUDIS LIPIDÒMICS EN PROCESSOS D'AVALUACIÓ DEL RISC QUÍMIC .....</b>	<b>191</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>		<b>195</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>		<b>199</b>
<b>REFERÈNCIES.....</b>		<b>203</b>

## RESUM

La lipidòmica és una de les ciències òmiques més recents, que s'ha aplicat amb èxit en estudis mèdics per el descobriment de biomarcadors i d'alteracions en vies metabòliques associades a malalties. La seva aplicació en ciències ambientals està adquirint rellevància a causa de l'important paper dels lípids en el desenvolupament, creixement i reproducció dels metazous. A nivell cel·lular, els lípids estan implicats en l'emmagatzematge d'energia, la senyalització i presenten funcions estructurals. Els organismes contenen milers d'espècies de lípids diferents amb estructures bastant semblants. Els darrers avenços en l'espectrometria de masses han impulsat el camp de la lipidòmica, permetent una millor anotació de les espècies lipídiques de diferents matrius biològiques (cèl·lules, biofluids, teixits), però també la detecció d'alteracions com a resposta a l'exposició a contaminació química.

En el marc d'aquesta tesi, s'han utilitzat tres tècniques analítiques diferents basades en espectrometria de masses d'alta resolució per a la caracterització del perfil lipídic de diferents models biològics. El primer mètode, *anàlisi per injecció en flux acoblat a l'espectrometria de masses d'alta resolució*, representa una eina molt potent ja que, en només dos minuts, proporciona el cribratge del perfil lipídic dels lípids cel·lulars. Els altres dos mètodes, que incorporen una *cromatografia de líquids d'ultra alta eficàcia* per a la separació prèvia dels lípids, han permès la detecció d'espècies minoritàries, i l'aplicació de l'espectrometria de masses en tàndem juntament amb un enfocament no dirigit per al processament de dades va proporcionar un perfil de lípids més exhaustiu, juntament amb la confirmació de la identitat dels lípids.

Aquestes tècniques analítiques s'han utilitzat per a l'estudi de l'impacte de diversos contaminants ambientals, sobre el metabolisme de lípids tant en cèl·lules humanes com de peix. Entre els compostos químics estudiats s'inclouen additius de plàstics i els seus derivats (BPA, BPF, BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O, BADGE·2HCl), el compost obesogènic tributil d'estany, *all-trans* àcid retinoic, el progestagen sintètic drospirenona i una mescla complexa de contaminants ambientals (estudi de camp). Els models cel·lulars utilitzats en aquesta Tesi són cèl·lules de placenta humana (JEG-3), cèl·lules hepàtiques de peix zebra (ZFL) i/o en carcinoma hepatocel·lular de *Poeciliopsis lucida* (PLHC-1), mentre que per a la mescla complexa, es van mostrejar dues espècies de peixos sentinella en un riu seguint un gradient de contaminació. La lipidòmica, juntament amb la realització d'alguns assaigs toxicològics i l'ús de reacció en cadena de la polimerasa en temps real han permès traçar un escenari més complet dels efectes toxicològics dels productes químics estudiats. En general, aquesta Tesi pretén contribuir a la implementació de la lipidòmica en investigació mediambiental proposant models biològics útils i fluxos de treball per a la caracterització del mecanisme d'acció de contaminants ambientals amb la capacitat d'actuar com a disruptors lipídics.

## ABSTRACT

Lipidomics is one of the newest omics sciences, which has proven their utility in medical research for the discovery of biomarkers and altered metabolic pathways related to disease. Its application in environmental sciences is becoming relevant due to the important role of lipids in development, maintenance, and reproduction of metazoans. At the cellular level, lipids are involved in energy storage, signaling, and exhibit structural functions. Organisms contain thousands of different lipid species with rather similar structures. The latest advances in mass spectrometry have prompted the field of lipidomics, allowing a better annotation of the lipid species of different biological matrices (cells, biofluids, tissues), but also the detection of alterations as a response to chemical pollution exposure.

Within the context of this thesis, three different analytical techniques based on high-resolution mass spectrometry have been used for the characterization of the lipid profile of different biological models. The first method, *flow injection analysis coupled to high-resolution mass spectrometry* represents a powerful tool since, just in two minutes, it provides a quick screening of the lipid profile of cellular lipids. The other two methods, which incorporate *ultra-high performance liquid chromatography* for the previous separation of the lipids, have allowed the detection of minority species, and the application of tandem mass spectrometry together with an untargeted approach for data processing provided a more comprehensive lipid profile, together with the confirmation of lipid identities.

These analytical techniques have been used for the study of the impact of several widespread environmental pollutants on the lipid metabolism of both

human and fish cell models. The chemical compounds studied comprise plastic additives and their derivatives (BPA, BPF, BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O, BADGE·2HCl), the obesogenic compound tributyltin, *all-trans* retinoic acid, the synthetic progestin drospirenone and a complex mixture of environmental pollutants (field study). The cellular models used in this thesis comprise human placenta cells (JEG-3), zebrafish liver cells (ZFL) and/or *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma cells (PLHC-1), while for the field study, two sentinel fish species were sampled in a river following a pollution gradient. Lipidomics, together with some toxicological assays and the use of real-time polymerase chain reaction have allowed drawing a more complete scenario of the toxicological effects of the chemicals under study. Overall, this dissertation aims to contribute to the use of lipidomics in environmental research by proposing useful biological models and workflows for the characterization of the mode of action of environmental pollutants with the capability to act as lipid disruptors.

## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AcCar	Acilcarnitina, <i>acylcarnitine</i>
AO	Resposta adversa, <i>adverse outcome</i>
AOP	Via de resposta adversa, <i>adverse outcome pathway</i>
ATRA	All-trans-RA , <i>all-trans-RA</i>
BADGE	Bisfenol A diglicidil èter, <i>bisphenol A diglycidyl ether</i>
BADGE-2HCl	Bisfenol A bis (3-cloro-2-hidroxipropil) èter, <i>bisphenol A bis(3-chloro-2-hydroxypropyl) ether</i>
BADGE-H <sub>2</sub> O	Bisfenol A (2,3-dihidroxipropil) glicidil èter, <i>bisphenol A (2,3-dihydroxypropyl) glycidyl ether</i>
BPA	Bisfenol A, <i>bisphenol A</i>
BPF	Bisfenol F, <i>bisphenol F</i>
CE	Èster de colesterol, <i>cholesteryl ester</i>
Cer	Ceramida, <i>ceramide</i>
ddMS2	Fragmentació depenent de les dades, <i>data-dependent fragmentation</i>
DESI	Ionització per desorció per electroesprai, <i>desorption electrospray ionization</i>
DG	Diacilglicèrid, <i>diacylglyceride</i>
DRO	Drospirenona, <i>drospirenone</i>
ER	Receptor d'estrògens, <i>estrogen receptor</i>
FA	Àcid grass, <i>fatty acid</i>
FIA	Anàlisi per injecció en flux, <i>flow injection analysis</i>
GC	Cromatografia de gasos, <i>gas chromatography</i>
GL	Glicerolípid, <i>glycerolipid</i>
GP	Glicerofosfolípid, <i>glycerophospholipid</i>
HILIC	Cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica, <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta eficàcia, <i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució, <i>high-resolution mass spectrometry</i>
KE	Esdeveniment clau, <i>key event</i>
LPC	Liso-fosfatidilcolina, <i>lyso-phosphatidylcholine</i>
LXR	Receptor X de fetge, <i>liver X receptor</i>
<i>m/z</i>	Relació massa càrrega, <i>mass-to-charge ratio</i>
MALDI	Ionització per desorció per làser assistida per la matriu, <i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MG	Monoacilglicèrid, <i>monoacylglyceride</i>
MIE	Esdeveniment d'inici molecular, <i>molecular initiating event</i>



## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

---

MRM	Monitorització de reaccions múltiples, <i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Espectrometria de masses, <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem, <i>tandem mass spectrometry</i>
MS <sup>n</sup>	Espectrometria de masses en etapes múltiples, <i>multistage mass spectrometry</i>
NR	Receptor nuclear, <i>nuclear receptor</i>
PA	Àcid fosfatídic, <i>phosphatidic acid</i>
PC	Fosfatidilcolina, <i>phosphatidylcholine</i>
PE	Fosfatidiletanolamina, <i>phosphatidylethanolamine</i>
PG	Fosfatidilglicerol, <i>phosphatidylglycerol</i>
PI	Fosfatidilinositol, <i>phosphatidylinositol</i>
PK	Policètid, <i>poliketide</i>
PPAR	Receptor activat per proliferadors de peroxisomes, <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PR	Prenol, <i>prenol</i>
PS	Fosfatidilserina, <i>phosphatidylserine</i>
PUFA	Àcid gras poliinsaturat, <i>polyunsaturated fatty acid</i>
QqQ	Triple quadrupol, <i>triple quadrupole</i>
RA	Àcid retinòic, <i>retinoic acid</i>
RAR	Receptor d'àcid retinoic, <i>retinoic acid receptor</i>
R <sub>t</sub>	Temps de retenció, <i>retention time</i>
RXR	Receptor X de retinoides, <i>retinoid X receptor</i>
SIM	Monitorització d'ió seleccionat, <i>selected ion monitoring</i>
SL	Sacarolípid, <i>sacrolipid</i>
SM	Esfingomielines, <i>sphingomyeline</i>
SML	Límit de migració específic, <i>specific migration limit</i>
SP	Esfingolípid, <i>sphingolipid</i>
SRM	Monitorització de reacció seleccionada, <i>selected reaction monitoring</i> ,
ST	Esterol, <i>sterol</i>
TBT	Tributil d'estany, <i>tributyltin</i>
TDI	Ingesta diària tolerable, <i>tolerable daily intake</i>
TG	Triacilglicèrid, <i>triacylglyceride</i>
TLC	Cromatografia en capa fina, <i>thin layer chromatography</i>
ToF	Temps de vol, <i>time-of-flight</i>
UHPLC	Cromatografia de líquids d'ultra alta eficàcia, <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
XCMS	Vàries formes de cromatografia (X) acoblada a l'espectrometria de masses, <i>various forms (X) of chromatography coupled to mass spectrometry</i>

## OBJECTIUS I ESTRUCTURA

### Objectius

Entendre els mecanismes implicats en les respostes biològiques dels organismes exposats a xenobiòtics i a les seves mescles és un aspecte fonamental de la Toxicologia Ambiental. El ràpid desenvolupament de les tecnologies d'anàlisi ha obert la possibilitat d'utilitzar aproximacions -òmiques per investigar la complexitat molecular dels sistemes biològics i les alteracions que pateixen com a conseqüència de l'exposició a xenobiòtics. En aquest context, els objectius principals d'aquesta Tesi són:

- L'aplicació d'una aproximació lipidòmica, basada en l'espectrometria de masses d'alta resolució, per avaluar els efectes dels contaminants, tant en salut humana –model cel·lular de placenta– com en models cel·lulars i organismes aquàtics.
- Investigar l'efecte sobre el lipidoma d'un nombre preseleccionat de compostos químics, reconeguts com a disruptors endocrins o obesògens, juntament amb l'ús de tècniques toxicològiques tradicionals amb la finalitat de caracteritzar la complexitat de les respostes biològiques.

Per assolir aquests objectius principals, aquesta Tesi presenta els següents **objectius específics**:

**I:** Investigar la capacitat del bisfenol A diglicidil èter (BADGE) i dels seus derivats d'actuar com a disruptors endocrins i alterar el metabolisme de lípids en cèl·lules de placenta humana JEG-3.

**II:** Avaluar la utilitat dels models cel·lulars PLHC-1 i ZFL com a eines per el cribratge de compostos capaços d'alterar-ne el lipidoma mitjançant la detecció d'empremtes lipídiques com a resposta de l'exposició a compostos models – TBT, àcid retinoic–, additius plàstics i al progestàgen sintètic drospirenona.

**III:** Detecció d'empremtes lipídiques diferencials, en peixos exposats a mescleres complexes de contaminants mitjançant la realització d'un estudi de camp en el riu Ripoll, afectat per abocaments d'origen urbà i industrial.

## Estructura de la Tesi

La present memòria es troba dividida en tres capítols principals.

I. El primer capítol consta d'una introducció general en la que es posa en context el treball de la Tesi; es fa una breu introducció de les tècniques òmiques i en especial de la lipidòmica, s'expliquen les principals metodologies de treball, es presenten els compostos químics estudiats, i els models biològics escollits.

II. En el segon capítol es mostren el treball experimental i els resultats obtinguts, recopilats com a compendi d'articles científics. Aquest capítol, es troba dividit en tres seccions diferents:

A) Caracterització i utilització d'un model biològic *in vitro* de placenta humana, per avaluar la capacitat dels monòmers BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O i BADGE·2HCl d'induir disrupció endocrina i produir alteracions lipídiques.

**Artícle científic I:** A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, C. Flores, E. Moyano, C. Porte, 2019. Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells. *Environmental Pollution* 244, 513–521.

B) Caracterització del lipidoma dels models cel·lulars hepàtics de peix, ZFL i PLHC-1 i de les alteracions produïdes per exposició a additius plàstics, tributil d'estany, àcid retinòic i drospirenona; així com canvis en l'expressió de gens involucrats en el metabolisme dels lípids i de retinoides en la línia ZFL. Els resultats es reporten en tres articles científics.

**Artícle científic II:** A. Marqueño, C. Flores, M. Casado, C. Porte. Dysregulation of lipid metabolism in PLHC-1 and ZFL cells exposed to tributyltin and *all-trans* retinoic acid. Enviat a *Ecotoxicology and environmental safety*.

**Artícle científic III:** A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, N. Denslow, J.A. Bowden, C. Porte. Untargeted lipidomics shows the ability of bisphenol A and derivatives to alter lipid metabolism in zebrafish liver cells (ZFL). Enviat a *Environmental Science and Technology*.

**Artícle científic IV:** A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, C. Porte, 2019. Drospirenone induces the accumulation of triacylglycerides in the fish hepatoma cell line, PLHC-1. *Science of the total environment* 692, 653–659.

C) Estudi de camp en el que es caracteritza el lipidoma del teixit muscular de dos espècies de peixos autòctons dels rius mediterranis i s'apliquen els coneixements adquirits en les seccions prèvies per comparar el lipidoma dels individus mostrejats en zones de referència i en zones impactades per abocaments industrials i de plantes de depuració.

**Artícle científic V:** A. Marqueño, M. Blanco, A. Maceda-Veiga, C. Porte, 2019. Skeletal muscle lipidomics as a new tool to determine altered lipid

homeostasis in fish exposed to urban and industrial wastewaters. *Environmental Science and Technology* 53, 8416–8425.

III. El capítol 3 conté la discussió de la Tesi on es tracten transversalment totes les publicacions incloses en aquesta memòria. Es discuteixen les metodologies analítiques utilitzades per als estudis lipídòmics, els modes d'acció dels xenobiòtics estudiats, l'estudi d'empremtes lipídiques de contaminació ambiental mitjançant estudi de camp i la implimentació dels estudis lipídòmics en processos d'avaluació del risc químic.

Per últim, s'exposen les conclusions extretes dels resultats obtinguts en aquesta Tesi i es llisten les referències citades en tots els capítols.

## INFORME FACTOR D'IMPACTE I GRAU D'IMPLICACIÓ

Cinta Porte Visa, directora de la Tesi doctoral presentada per l'Anna Marqueño Bassols, exposa que la doctoranda ha participat activament en la realització de tots els articles presentats en aquesta memòria, tal i com queda reflectit en la distribució dels autors, com a primera autora en totes els articles presentats. En general, ha participat en la discussió del disseny experimental i ha contribuït de manera significativa en l'anàlisi de mostres, l'elaboració i la redacció dels treballs.

A continuació es detallen els articles que formen part de la Tesi, el grau de participació de la doctoranda i el factor d'impacte (F.I.) de les revistes en les quals s'han publicat els articles o han estat enviats per a la seva publicació.

1. **A. Marqueño**, E. Pérez-Albaladejo, C. Flores, E. Moyano, C. Porte, 2019. Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells. *Environmental Pollution* 244, 513–521. **F.I.: 6.792**  
**Grau de participació:** Realització de tot el treball experimental. Realització del tractament de dades. Discussió dels resultats. Elaboració del manuscrit.
2. **A. Marqueño**, C. Flores, M. Casado, C. Porte. Dysregulation of lipid metabolism in PLHC-1 and ZFL cells exposed to tributyltin an *all-trans* retinoic acid. Enviat a *Ecotoxicology and environmental safety*. **F.I.: 4.872**  
**Grau de participació:** Realització de tot el treball experimental. Realització del tractament de dades. Discussió dels resultats. Elaboració del manuscrit.

3. **A. Marqueño**, E. Pérez-Albaladejo, N. Denslow, J.A. Bowden, C. Porte. Untargeted lipidomics shows the ability of bisphenol A and derivatives to alter lipid metabolism in zebrafish liver cells (ZFL). Enviat a *Environmental Science and Technology*. **F.I.: 7.270**

**Grau de participació:** Realització de tot el treball experimental excepte assajos de citotoxicitat del compost bisfenol A. Realització del tractament de dades. Discussió dels resultats. Elaboració del manuscrit.

4. **A. Marqueño**, E. Pérez-Albaladejo, C. Porte, 2019. Drospirenone induces the accumulation of triacylglycerides in the fish hepatoma cell line, PLHC-1. *Science of the total environment* 692, 653–659. **F.I.: 6.551**

**Grau de participació:** Realització de tot el treball experimental excepte assajos d'estrès oxidatiu de la drospirenona. Realització del tractament de dades. Discussió dels resultats. Elaboració del manuscrit.

5. **A. Marqueño**, M. Blanco, A. Maceda-Veiga, C. Porte, 2019. Skeletal muscle lipidomics as a new tool to determine altered lipid homeostasis in fish exposed to urban and industrial wastewaters. *Environmental Science and Technology* 53, 8416–8425. **F.I.: 7.270**

**Grau de participació:** Realització del tractament de dades. Discussió dels resultats. Elaboració del manuscrit.

# Capítol 1

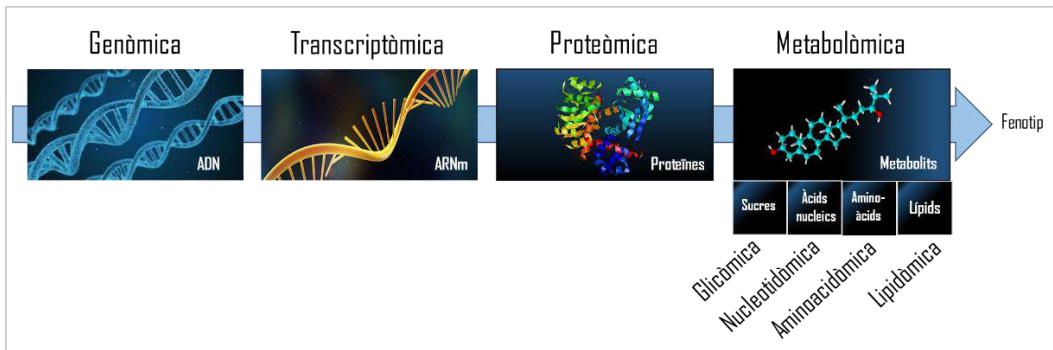
## INTRODUCCIÓ



### 1.1 LIPIDÒMICA A L'ERA DE LES ÒMIQUES

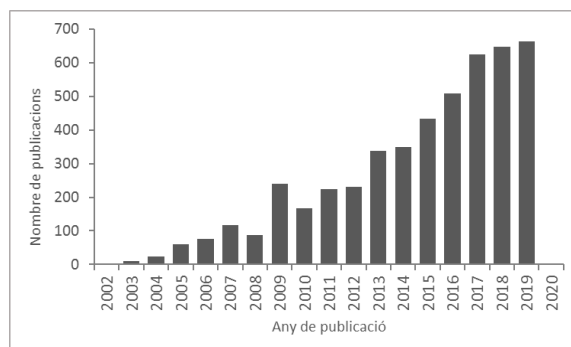
Les ciències òmiques, neologisme que prové del sufix en llatí “ome” que significa “conjunt de”, es centren en l’exploració simultània d’un gran nombre d’analits, ja siguin gens, transcrits, proteïnes o metabòlits, adoptant una visió holística dels analits que conformen les cèl·lules, els teixits o els organismes (Horgan and Kenny, 2011). Aquesta aproximació holística permetent l’anàlisi global de les dades i pot conduir a a formulació de noves hipòtesis, a diferència dels estudis previs, que acostumaven a tenir per objectiu donar resposta a una hipòtesis prèviament preconcebuda des d’una perspectiva reduccionista. El conjunt de ciències òmiques s’ha denominat *systems biology*, i pretén definir els mecanismes bioquímics i biològics presents en els organismes vius. Les ciències òmiques més tradicionals són la genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica i la metabolòmica, que, en aquest ordre constitueixen la cascada òmica, des de la codificació genètica fins a l’obtenció d’un fenotip determinat. El darrer eslavó de la cascada òmica és la metabolòmica, que estudia el conjunt de metabòlits presents en una determinada mostra biològica en unes condicions concretes i s’ha proposat que el següent pas en l’evolució de les òmiques vindria donada per l’obtenció d’un mapa minuciós de tots els metabòlits que conformen les cèl·lules (Jurowski et al., 2017). Sent el ventall de metabòlits tant ampli, incloent diferents famílies amb propietats fisicoquímiques molt diverses com els carbohidrats, els aminoàcids, els àcids nucleics o els lípids, no és d’estranyar que hagin sorgit subdisciplines de la metabolòmica orientades a l’anàlisi d’un tipus de metabòlit en exclusiu. Així, han sorgit disciplines com la glicòmica, que pretén definir o quantificar el

conjunt de glicans i glicoconjugats de la mostra biològica (Hart and Copeland, 2010), o la lipidòmica, dedicada a l'estudi dels lípids (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Conjunt de les ciències òmiques principals que conformen la cascada òmica. A les quatre òmiques principals, genòmica, transcriptòmica, proteòmica i metabolòmica s'hi afegeix algunes de les subdisciplines principals de la metabolòmica, entre les quals es troba la lipidòmica.

Així doncs, tot i que la lipidòmica va sorgir com a una subdisciplina dins la metabolòmica, degut a l'elevada rellevància biològica dels lípids i l'elevat nombre d'espècies lipídiques, aquesta ha emergit com a una branca independent de la metabolòmica. Sent una de les ciències òmiques més recents, els primers estudis lipidòmics daten de 2003 i el nombre d'articles científics en aquest camp no ha deixat de créixer des de llavors (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Nombre de publicacions en el camp de la lipidòmica ordenades per any. Dades obtingudes de la base de dades *Web of Science* sota la cerca "lipidomics" [14 d'octubre de 2019].

De manera anàloga a les altres ciències òmiques, la lipidòmica s'ha definit com la caracterització completa de les espècies lipídiques (lipidoma) i de les seves funcions biològiques, així com la seva interacció amb altres molècules (Spener et al., 2003). És a dir, la lipidòmica és l'estudi a gran escala de les vies metabòliques i funcions dels lípids cel·lulars en sistemes biològics (Yang and Han, 2016) i té l'objectiu d'obtenir un *perfil lipídic*, que contingui informació sobre la composició i l'abundància de les espècies de lípids presents al material de partida (cèl·lules, teixits o fluids biològics). Tot i que tradicionalment la majoria d'estudis s'han dut a terme dins el camp de la medicina humana i ciències clíniques, per al descobriment de biomarcadors i pertorbacions de vies associades a malalties, els estudis lipidòmics estan prenent importància en besants més ambientals, ja que la homeòstasis dels lípids és vital per a un correcte desenvolupament, manteniment i reproducció dels metazous (Capitão et al., 2017).

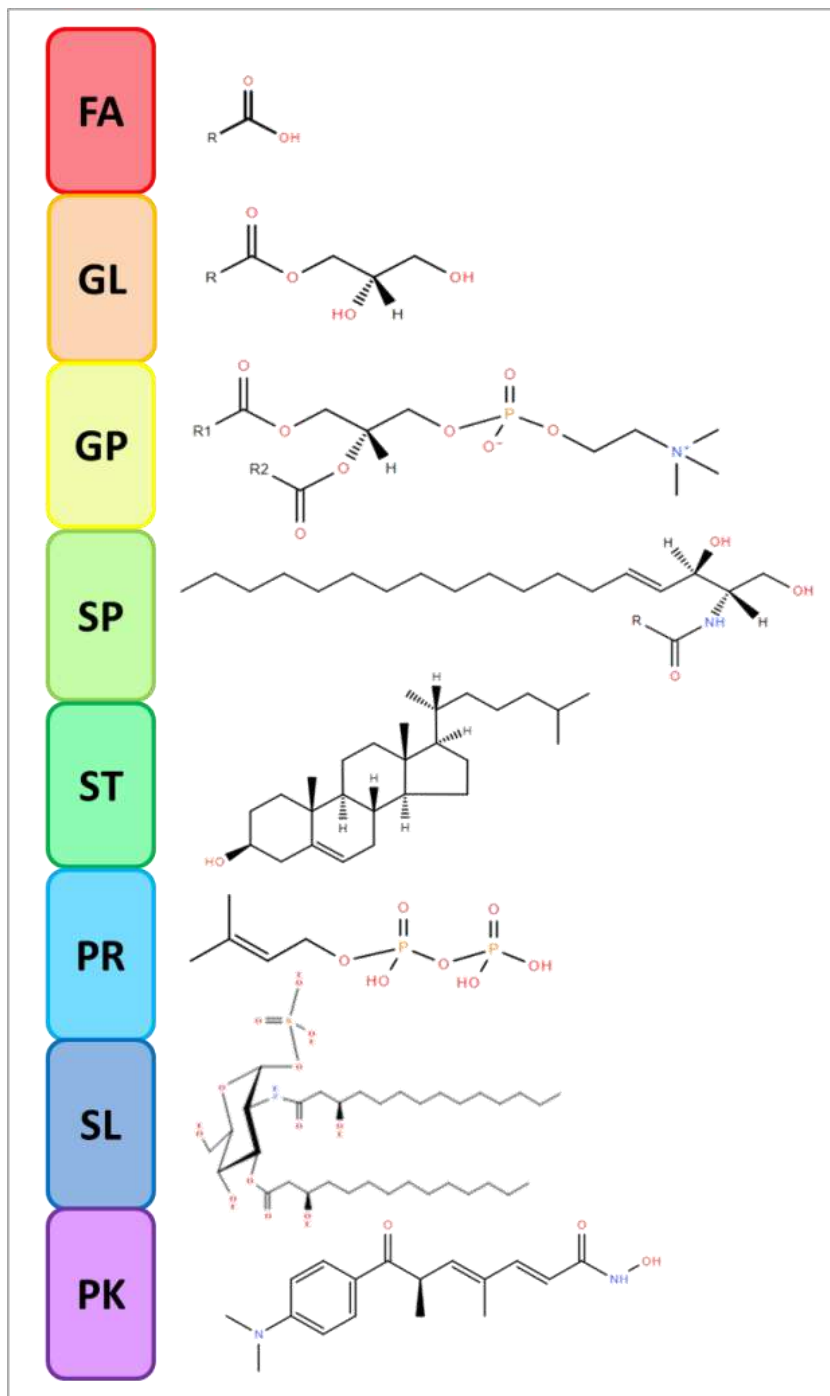
### 1.2 LÍPIDS: FUNCIO I METABOLISME

L'etimologia de la paraula lípid prové del mot grec "lípos", que vol dir "greix", i del sufix "eidos", que fa referència a "aparença". Els lípids han rebut diferents classificacions al llarg de la història, per exemple catalogant-los de saponificables o insaponificables, en funció de si tenien àcids grassos o no, i dins dels primers, de simples, formats per àcids grassos i un alcohol, o complexes, formats a més per una tercera molècula que pot ser de diferent naturalesa (glicerina, àcid fosfòric, glúcids o esfingosines entre altres). Amb la voluntat de facilitar la comunicació internacional i degut al creixent nombre d'estudis lipidòmics, el comitè internacional de classificació i nomenclatura de lípids (*The International Lipid Classification and Nomenclature Committee*),

sota el patrocini del consorci LIPID MAPS, va crear i establir una nova forma de classificació recollida al "*Comprehensive Classification System for Lipids*", publicada al 2005 (Fahy et al., 2005), on es classifiquen els lípids en vuit categories, àcids grassos (FA), glicerolípid (GL), glicerofosfolípid (GP), esfingolípid (SP), esterols (ST), prenols (PR), sacarolípid (SL) i policètid (PK), i que cobreix tant fonts eucariotes com procariotes, naturals i sintètics (Figura 1.3). Des d'aquesta primera catalogació, el sistema de classificació s'ha revisat en diverses ocasions fins a publicar l'article titulat "*Update of the LIPID MAPS comprehensive classification System for lipids*" al 2009 (Fahy et al., 2009), el qual inclou revisions de la nomenclatura suggerida dels lípids i recomanacions a l'hora de dibuixar-ne les estructures.

Aquestes vuit categories generals (classe lipídica) estan al seu torn dividides jeràrquicament en subcategories anomenades *subclasse lipídica* [<https://www.lipidmaps.org/data/classification/>]. A dia d'avui LIPID MAPS recull informació de més de 40.000 lípids. Les classes de lípids que han estat majoritàriament analitzades en aquesta Tesi són els FA, GL, GP, SP i ST, i les seves estructures s'expliquen a continuació.

Els **FAs** són molècules formades per un grup carboxil (-COOH) i una cadena alifàtica o cadena hidrocarbonada lineal. El seu grau d'insaturació pot ser molt divers, des d'àcids grassos saturats fins a presentar varis graus d'insaturació que es poden trobar en diferents posicions al llarg de la cadena alifàtica. Els àcids grassos més comuns en vertebrats són de cadena parell, especialment els que contenen 16 i 18 àtoms de carboni. Els àcids grassos són constituents importants d'un gran nombre de lípids més complexes.



**Figura 1.3** Sistema de classificació dels lípids en 8 categories d'acord amb ILCNC (Fahy et al., 2005) i exemple d'estructura molecular per cada classe. Estructures obtingudes de [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org).

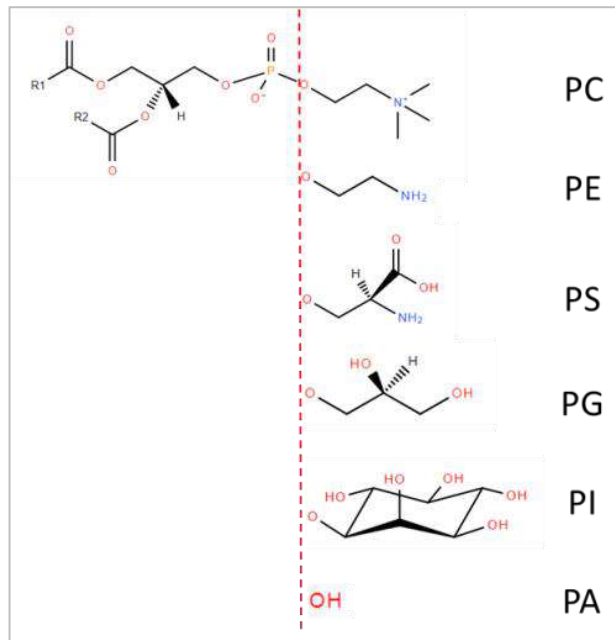
Els **GLs** són lípids que contenen un grup glicerol i els més comuns poden incorporar un, dos o tres àcids grassos a la seva estructura: monoacilglicerol (MG), diacilglicerol (DG), triacilglicerol (TG) (Fahy et al., 2005, 2009). Però també poden estar substituïts per alcohols grassos, amb o sense enllaç vinílic (ex. TG-P o TG-O, respectivament). Els GLs també poden tenir un o més sucres units per enllaços glicosídics a la columna vertebral del glicerol que s'anomenen gliceroglicolípid.

Els **GPs** són una classe de lípids formada per un glicerol amb un grup fosfat a la posició *sn-3*. A les posicions *sn-1* i *sn-2* contenen dos acils grassos. Si l'estructura no conté un dels dos grups acils, aleshores el lípid s'anomena "liso" (Fahy et al., 2005). Tanmateix, les diferents subclasses de GPs es diferencien en el grup polar enllaçat al grup fosfat: colina (PC), etanolamina (PE), serina (PS), glicerol (PG), inositol (PI) o sense cap grup com a àcid fosfatídic (PA) (Figura 1.4). A més, en la posició *sn-1* hi pot haver un enllaç èter o èter vinílic en lloc de l'enllaç èster ("O-" (alquil o plasmanil) o "P-" (alquenil, plasmenil o plasmalogen)), respectivament.

Els **SPs** contenen una base esfingoide de cadena llarga com a estructura principal. Les principals bases esfingoides en mamífers són la dihidroesfingosina i l'esfingosina. Hi ha moltes addicions potencials a les bases esfingoides que inclouen un fosfat (esfingosina-1-fosfat), un àcid gras relacionat amb l'amida (ceramida, Cer), un àcid gras i fosfat relacionat amb amida (Cer- 1-fosfat), un àcid gras relacionat amb l'amida i un grup fosfocolina (esfingomielina) i variacions més complexes com els gangliòsids (Fahy et al., 2005, 2009).

Els **STs** inclouen el colesterol i els seus derivats. Els èsters de colesterol (CE) són un tipus de lípid esterol amb un nucli de colesterol unit a un àcid gras

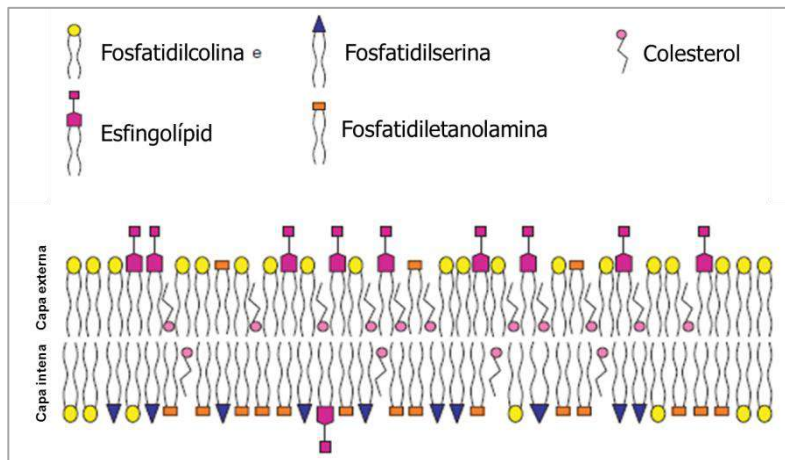
mitjançant un enllaç èster substituït pel grup hidroxil carboni-3. Altres derivats dels ST són els esteroides C18 (estrògens), els esteroides C19 (andrògens), els esteroides C21 (progestògens, glucocorticoides i mineralocorticoides), variants de la vitamina D i derivats oxidats (àcids biliars).



**Figura 1.4** Estructura bàsica dels glicerofosfolípids (GP), indicant alguns dels grups polars que formen les diferents subclases de GP. R1 i R2 corresponen a les cadenes hidrocarbonades dels àcids grassos. Estructures extretes de [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org).

Aquesta breu descripció de les classes majoritàries dels lípids deixa de manifest l'elevat nombre d'espècies lipídiques existents que a més, estaran dotades de propietats fisicoquímiques molt diverses. No és d'estranyar doncs, que els lípids estiguin involucrats en multitud de **funcions biològiques**, tant a nivell cel·lular, com de teixit i d'organisme. Una de les seves funcions més reconegudes és la de **components estructurals de la bicapa lipídica** de les membranes cel·lulars, model que es va formular per primera vegada al 1925 i que encara segueix vigent. La distribució dels lípids a la bicapa no és aleatòria;

la capa externa està majoritàriament formada per PCs i SPs, la capa interna per PSs i PEs, mentre que les molècules de colesterol estan incorporades de manera aleatòria a les dues capes, creant, juntament amb els SP, microdominis que modulen el comportament de les proteïnes de membrana (Figura 1.5) (Pande, 2000). Així doncs, diferents balanços de lípids aportaran diferent permeabilitat, fluïdesa i curvatura a les membranes.



**Figura 1.5** Representació de la bicapa lipídica i predicció d'una distribució típica dels lípids, adaptada de Pande (2000).

A més, els lípids són la principal forma d'**emmagatzematge energètic** en la cel·lula. Els TGs són els principals lípids utilitzats per a l'emmagatzematge d'energia en gotetes de lípids (*lipid droplets*), generant energia en forma d'ATP mitjançant la oxidació  $\beta$  dels àcids grassos (Tocher, 2003).

Els lípids amb activitat biològica juguen un paper important en **processos de senyalització** (Hannun and Obeid, 2008). Així, s'ha descrit que la hidròlisi de PI-4,5-bifosfat genera DG i inositol-1,4,5-bifosfat, dos missatgers secundaris que regulen l'activació de la proteïna-kinasa C i l'alliberament de  $\text{Ca}^{+2}$ , respectivament (Wymann and Schreiner, 2008). Els eicosanoides i les liso-PA són molècules clau de senyalització inter- i intra-cel·lular, que participen en



respostes inflammatòries (Hannun and Obeid, 2008; Wymann and Schneider, 2008). Les Cer i esfingosines són lípids que tenen propietats proapoptòtiques i antiproliferatives. Tanmateix, quan és fosforilada, l'esfingosina es converteix en esfingosina-1-fosfat que promou el creixement i la proliferació cel·lular. D'altra banda, la concentració de Cer augmenta en resposta a l'estrès cel·lular, com ara danys en l'àcid desoxiribonucleic (ADN), o exposició a estímuls apoptòtics (Wymann and Schneider, 2008). A més, l'activació de cascades de senyalització pot estar causada per alteracions del balanç de lípids que formen els microdominis de les membranes plasmàtiques, afavorint interaccions específiques proteïna-proteïna (Simons and Toomre, 2000). Els desequilibris d'aquestes vies de senyalització contribueixen a la progressió de diferents malalties (inflamatòries, autoimmunes, al·lèrgia, càncer, metabòliques i degeneratives, entre altres).

Degut a la importància de les funcions biològiques dels lípids, els seus nivells han d'estar ben regulats. L'**homeòstasi dels lípids** es pot definir com l'equilibri entre la captació, el transport, l'emmagatzematge, la biosíntesis, el metabolisme i el catabolisme de lípids (Tocher, 2003). Tots aquests processos es poden regular (a) per l'acció de diversos factors de transcripció entre els quals trobem receptors nuclears (NR), com el receptor X de retinoides (RXR), els receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPARs) o el receptor X de fetge (LXR), (b) per modificacions posteriors a la traducció activant/desactivat l'enzim o (c) per control al·lostèric de l'activitat de l'enzim al llarg d'una via metabòlica mitjançant la unió d'un activador (Capitão et al., 2017). Com a factors de transcripció, els receptors nuclears es basen en la unió específica de la seqüència de l'àcid desoxiribonucleic (DNA) per transactivar els

seus gens diana. A continuació s'expliquen tres dels receptors més rellevants involucrats en la homeòstasi dels lípids:

- ✚ El **PPAR**, amb tres isoformes diferents ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ), s'activa per àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) i eicosanoids, entre altres (Chawla et al., 2001). Cadascuna de les isoformes exerceix una funció específica en la homeòstasi dels àcids grassos. Mentre que el PPAR $\alpha$  regula enzims implicats en la captació, esterificació i oxidació  $\beta$  dels àcids grassos en teixits amb un elevat índex de catabolisme de àcids grassos com són el fetge, el ronyó, el cor i el múscul, el PPAR $\beta$  regula la seva oxidació al múscul, i el PPAR $\gamma$  s'expressa al teixit adipós jugant un paper essencial en l'adipogènesi, contribuint així a l'emmagatzematge energètic (Feige et al., 2006; Capitão et al., 2017). Els PPARs formen heterodímers amb RXR, al qual es poden unir lligands d'ambdós NRs.
- ✚ El **RXR** és el NR orfe més estudiat i del qual també se'n coneixen tres isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) fins al moment. El seu principal lligant natural és el 9-*cis*-àcid retinoic. S'ha vist que els RXRs funcionen tant com a homodímers, com a heterodímers amb altres NRs, com el receptor d'àcid retinoic (RAR) i el PPAR. De fet, que es conegui a dia d'avui, tots els receptors involucrats en senyalització lipídica són RXR heterodímers. Alguns heterodímers RXR són permissius a l'activació per part de lligands de RXR, fet que constata que potents agonistes de RXR tenen efectes dramàtics sobre l'homeòstasi dels lípids (Chawla et al., 2001).
- ✚ El **LXR** és un NR amb un paper important en el control transcripcional del metabolisme de lípids, que forma un heterodímer obligat amb RXR $\alpha$ . La seva transcripció és induïda com a resposta a nivells elevats de colesterol i regula gens que codifiquen proteïnes involucrades en l'absorció, el

transport, l'èflux, l'excreció i la conversió del colesterol a àcids biliars. A més, LXR regula gens que codifiquen proteïnes implicades en elongació i dessaturació d'àcids grassos i la seva activació porta a la incorporació de PUFAs als GPs (Wang and Tontonoz, 2018).

### 1.3 ANÀLISI DE LÍPIDS

Des del naixement de la lipidòmica l'anàlisi de lípids ha patit una gran evolució, i una elecció de procediments i tècniques analítiques adequada és crucial, ja que s'ha de seguir un procediment analític i un flux de treball ben fonamentats (Figura 1.6). Amb la voluntat d'harmonitzar l'anàlisi de lípids i crear unes directrius clares en els principals fluxos de treball de la lipidòmica, al 2018 neix la *Lipidomics Standards Initiative* [<https://lipidomics-standards-initiative.org/>], a mans dels doctors K. Ekroos i G. Liebisch, on es poden trobar recomanacions de recollida de mostra, emmagatzematge, processos d'extracció de lípids, així com de desconvolució de dades i generació d'informes.

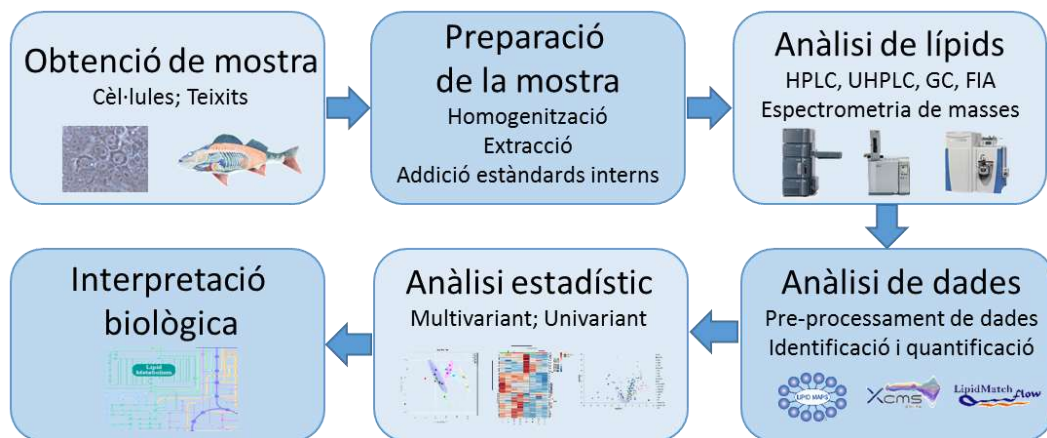


Figura 1.6 Flux de treball en els estudis lipidòmics

### 1.3.1 Extracció de lípids de mostres biològiques

Segons l'objectiu de l'estudi, l'anàlisi d'una classe específica de lípid o l'anàlisi del total de lípids, s'emprarà un tipus d'extracció o un altre. Lipidmaps recopila els mètodes d'extracció més adients per a cada classe lipídica [<http://www.lipidmaps.org/resources/tutorials/index.html>]. En general, com l'objectiu dels estudis lipidòmics és l'anàlisi del màxim d'espècies lipídiques possible per tal d'obtenir un perfil lipídic representatiu del lipidoma del teixit, del fluid o de les cèl·lules, interessa extreure a la vegada tant els lípids apolars (MGs, DGs, TGs i STs) com els lípids més polars (àcids grassos lliures, GPs i SPs), i per tant, és important controlar el procés d'extracció incorporant solvents de diferents polaritats per tal de solubilitzar el màxim d'espècies lipídiques. Tanmateix, l'extracció amb dissolvents orgànics no polars proporciona nivells baixos de metabòlits polars, proteïnes i sals, la qual cosa redueix la complexitat de les mostres i el posterior anàlisi de l'espectre de masses. D'entre els protocols més emprats s'hi troben el mètode Folch (Folch et al., 1957) i el Bligh and Dyer (Bligh, E.G. and Dyer, 1959). El mètode Folch consisteix en una mescla cloroform:metanol (2:1) per la fase d'extracció i una fase de rentat amb aigua (proporcionalment, 0.2). Per obtenir una millor eficiència, la mescla de solvents ha de ser 20 vegades el volum de la mostra (p. ex. per 1 mL de mostra, 20 mL de solvents). Per altra banda, el mètode Bligh and Dyer és un sistema ternari que utilitza una mescla de cloroform:metanol:aigua (1:2:0.8) (si el teixit conté aigua, aproximadament en un 80%, aquesta no s'afegeix). Posteriorment s'addiciona cloroform i aigua obtenint una distribució final corresponent a 2:2:1.8 cloroform:metanol:aigua. Ambdós mètodes proporcionen molt bona recuperació en l'extracció de lípids, ja que la mescla de la mostra amb el metanol ajuda en la separació dels lípids de les proteïnes de la mostra, i la

posterior addició de cloroform genera dues fases ben diferenciades que faciliten l'obtenció de la fracció més lipofílica de l'extracte.

Tot i els bons resultats que donen aquests tipus d'extraccions, s'ha qüestionat l'ús indiscriminat del cloroform, ja que és un agent carcinogen i s'han començat a emprar mètodes alternatius. Un d'aquests mètodes és el Bligh and Dyer modificat (Smedes, 1999), que consisteix en la substitució del metanol per propan-2-ol i del cloroform per ciclohexà. A part de reduir la toxicitat dels solvents, aquest mètode presenta l'avantatge que el ciclohexà és menys dens que el cloroform i roman a la capa superior de l'extracció, facilitant-ne la obtenció. El mètode MTBE, que incorpora metil-tert-butilèter i metanol (Matyash et al., 2008) s'ha proposat com a una bona alternativa per mostres molt riques en lípids, donant factors de recuperació dels lípids més abundants semblants a aquells obtinguts mitjançant el mètode Folch. Un altre extracció líquid-líquid amb resultats similars als obtinguts amb el mètode Folch és la mescla d'acetat d'etil:etanol (1:1 o 2:1, v/v). Per últim, l'extracció amb el mètode soxhlet es recomana per l'extracció de lípids de mostres sòlides (Manirakiza et al., 2001).

A més, l'addició d'agents estabilitzadors, com el butil-hidroxitoluè o l'hidroxitobutilanisol, és una pràctica comú per evitar l'oxidació no desitjada dels lípids durant el procés d'extracció.

### **1.3.2 Anàlisi instrumental**

Els avenços de les tècniques de separació i sobretot de l'espectrometria de masses han comportat un progrés notable en el camp de la lipidòmica, ja que aquesta necessita de l'ús de tècniques molt robustes i fiables per l'anàlisi dels lípids ja que com s'ha vist, els lípids són una família de metabòlits amb un gran

nombre de molècules amb estructures molt semblants. Així, en aquest subapartat es dona una visió de les principals tècniques de separació aplicades en l'anàlisi de lípids i s'expliquen en quins casos s'han emprat alguns dels analitzadors de masses existents en el mercat.

Les **tècniques de separació** per excel·lència en el camp de la lipidòmica són les tècniques cromatogràfiques. La més clàssica, la cromatografia en capa fina (TLC), és una tècnica ràpida, econòmica i que, amb l'elecció d'estàndards adients pot ser emprada per anàlisis quantitius (Jurowski et al., 2017), no obstant, només proporciona informació de la suma de les classes lipídiques. Per l'obtenció del perfils d'àcids grassos, tradicionalment s'ha utilitzat la cromatografia de gasos (GC), tant per l'anàlisi dels àcids grassos lliures, com els que es troben integrats en lípids complexes. En aquest darrer cas, per tal d'analitzar els àcids grassos d'una única classe lipídica, abans de l'anàlisi mitjançant GC, es requereix d'una fase de fraccionament de la mostra (separació en fase sòlida (SPE), TLC o cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC)) per separar les classes de lípids, i la hidròlisi o trans-esterificació dels lípids per obtenir àcids grassos lliures. En GC, la derivatització de la mostra mitjançant agents alquilants ajuda a millorar la volatilització dels àcids grassos i a obtenir una millor cromatografia. És interessant remarcar que mitjançant aquest tipus de tècnica és possible separar isòmers geomètrics i posicionals dels àcids grassos insaturats, p. ex. amb una correcta elecció de la columna (fases estacionàries poc polars) i de la programació de temperatura s'obté una elevada resolució cromatogràfica que facilita la separació de regioisòmers. També es poden emprar etapes prèvies de purificació (p. ex. SPE amb sílice impregnada amb ions d'argent) per tal de fraccionar isòmers *cis* i *trans* (Quehenberger et al., 2011). Altres tècniques s'han emprat amb èxit en la

separació de lípids, com l'electroforesi capil·lar, tècnica on la força motora de la separació és la mobilitat que els ions en el solvent electroforètic experimenten al aplicar un camp elèctric intens (Otieno and Mwangela, 2008), o la cromatografia de fluids supercrítics, tècnica on la fase mòbil és un fluid supercrític (p. ex. diòxid de carboni supercrític) amb propietats que són a mig camí entre un gas i un líquid (baixa viscositat i elevada difusió) (Bamba et al., 2012).

Però la tècnica de separació més àmpliament utilitzada en els darrers anys és l'HPLC. Aquesta tècnica es pot automatitzar fàcilment i és igualment vàlida tan per anàlisis qualitatives com quantitatives. Durant aquesta darrera dècada, el desenvolupament de la cromatografia de líquids d'ultra alta eficàcia (UHPLC) ha desbancat en gran mesura l'ús del HPLC més clàssic, ja que l'UHPLC permet desenvolupar separacions cromatogràfiques amb temps d'anàlisis més curts i amb una major resolució cromatogràfica.

En quan a les fases estacionàries de cromatografia de líquids emprades en el camp de la lipidòmica, la cromatografia de fase normal i la seva variant, cromatografia de líquids d'interacció hidrofòbica (HILIC) (fases estacionàries polars) separen els lípids en funció de la seva polaritat, separant-los, per tant, per subclasses lipídiques. En canvi, en la cromatografia de fase inversa (fases estacionàries hidrofòbiques) el mecanisme de retenció dels lípids es basa en la polaritat/hidrofobicitat general, la llargada dels àcids grassos, així com en el grau d'insaturació dels mateixos (Sandra and Sandra, 2013). Els dos tipus de fases estacionàries s'han combinat per fer possible el desenvolupament de separacions cromatogràfiques multidimensionals 2D, que ajuden a incrementar la detecció de lípids minoritaris en mesclades complexes, però

l'acoblament dels dos tipus de columna de manera *online* segueix sent una tasca complexa a dia d'avui.

L'**espectrometria de masses** (MS) es pot utilitzar de forma individual o acoblada amb una de les tècniques de separació mencionades al paràgraf anterior. En el primer cas, els extractes de lípids s'introdueixen a l'espectròmetre de masses per infusió directe o injecció en flux (FIA), generalment emprant electrosprai com a font de ionització (ESI), metodologia anomenada *shotgun lipidomics*. Aquesta tècnica, presenta l'avantatge de ser una metodologia amb temps d'anàlisi molt curts i és altament utilitzada en la generació de perfils lipídics, però amb l'inconvenient de que tots els compostos arriben a la vegada a la font d'ionització i per tant, si s'està utilitzant ESI, la supressió iònica és bastant elevada. Tot i així, el fet de que estàndards interns (en molts casos marcats isotòpicament) i analits s'ionitzin a la vegada proporciona anàlisis quantitatives fiables. La seva aplicabilitat es pot comprovar en estudis recents com el de Grzybek et al. (2019), que mitjançant *shotgun lipidomics* emprant un quadrupol-Orbitrap com a espectròmetre de masses, obté un perfil lipídic característic del teixit adipós de ratolins obesos. En aquest tipus d'anàlisi, es pot utilitzar l'estratègia addicional d'ionització selectiva; gràcies a les diferents estructures dels lípids aquests presenten càrregues diferents en solució, característica que permet, mitjançant diferents condicions, realitzar una separació a dins de la font d'ionització, semblant a l'electroforesis (Wang et al., 2019).

Però l'acoblament més comú i versàtil és el d'HPLC-MS i l'UHPLC-MS. La separació cromatogràfica prèvia a l'anàlisi de masses presenta alguns avantatges. La separació cromatogràfica dels lípids en temps de retenció ( $R_t$ ) diferents redueix la supressió iònica i l'efecte matriu que s'observa en la infusió



directe ja que els analits arriben seqüencialment (separats) al detector. A part, facilita la separació d'espècies isobàriques i isomèriques, que són difícils de resoldre per espectrometria de masses d'alta resolució, i garanteix enormement la qualitat de resultats qualitius i quantitius perquè cada pic cromatogràfic es troba en un espai 2D amb un  $R_t$  característic enfront d'una relació massa càrrega ( $m/z$ ) específica (Yang and Han, 2016; Jurowski et al., 2017).

Alternativament, seccions de teixit poden ser directament analitzats per tècniques com la ionització per desorció per làser assistida per matriu (MALDI) i la desorció per *electrosprai* (DESI) (Goto-Inoue et al., 2011), que permet anàlisi *in situ* dels lípids. Tanmateix, els lípids es poden analitzar mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN), donant lloc a dades inherentment quantitatives i altament reproduïbles, però amb límits de detecció molt elevats (Melvin et al., 2019).


Els estudis lipidòmics es poden dur a terme des de diferents enfocos:

- ✚ **L'anàlisi dirigida** (*targeted*) es centra en una ruta metabòlica concreta o en l'estudi d'una classe de lípids en particular. Pretén corroborar una hipòtesis preconcebuda mitjançant la determinació de les seves concentracions o abundàncies relatives (Yang and Han, 2016). Aquests tipus d'estudis s'acostumen a dur a terme amb instruments de baixa resolució com el triple quadrupol (QqQ) o l'instrument híbrid quadrupol-ion trap lineal. Els modes d'adquisició més comuns en aquests instruments són la monitorització d'ió seleccionat (SIM), monitorització de reacció seleccionada (SRM) o monitorització de múltiples reaccions (MRM). Aquests mètodes d'adquisició presenten una gran especificitat i proporcionen una elevada sensibilitat. Per exemple, Patterson et al. (2011)

analitza 8 espècies de LPCs mitjançant UHPLC-MS/MS emprant un Xevo TQ com a analitzador en mode MRM per l'estudi del metabolisme de lípids de carcinoma hepatocel·lular. Wang et al. (2019) emprà un mètode UHPLC-MS/MS amb un analitzador SCIEX QTrap 6500 en mode MRM per analitzar 26 PCs per estudiar l'acció que exerceix el policlorobifenil PCB153 sobre el metabolisme dels GPs de les cèl·lules PC12. Cal tenir en compte que el desenvolupament d'aquests mètodes requereix d'un coneixement previ de les relacions  $m/z$  de tots els lípids que es volen estudiar i del seu patró de fragmentació. A part és una metodologia que no permet el descobriment de nous biomarcadors ja que totes les  $m/z$  que no s'inclouen en el mètode d'adquisició no s'analitzaran. Aquests estudis s'acostumen a centrar en un nombre reduït d'analits (lípids), però hi ha hagut estudis dirigits que han abastat un gran nombre de lípids, com és el cas de l'estudi de Lee et al. (2017), que mitjançant UHPLC-MS/MS en mode MRM emprant un triple quadrupol com a analitzador, van aconseguir detectar 523 espècies lipídiques (25 subclasses) en la línia cel·lular RAW264.7, amb la finalitat de detectar inflamació com a resposta a l'exposició a lipopolisacàrids.

- ✚ **L'anàlisi no-dirigida o global (*untargeted*)**, analitza de forma exhaustiva el lipidoma cel·lular complet o parcial i té com a objectiu detectar totes les espècies de lípids presents a la mostra. Representa una eina molt potent en l'estudi del metabolisme lipídic, mecanismes moleculars i descobriment de nous biomarcadors (Wenk, 2010). A més, quan es desconeixen les possibles alteracions que poden patir els lípids per efecte d'un factor estressant, serveixen com a mètode exploratori. Aquests mètodes han de tenir una gran precisió i resolució de masses, així, els analitzadors que

s'utilitzen en aquests tipus d'aproximacions són el temps de vol (ToF) i l'Orbitrap, tot i que s'ha proposat que una resolució de massa superior a 75.000 FWHM (*full width at half maximum*) (a  $m/z$  800) és aconsellable per aconseguir una identificació acurada de les espècies lipídiques (Yang and Han, 2016), i com es veurà en el següent apartat, el ToF no arriba a aquests valors de resolució de massa. A mode d'exemple, Criscuolo et al. (2019) han desenvolupat un mètode LC-MS/MS emprant un Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ com a analitzador en mode *data-dependent MS/MS* (ddMS2), que és capaç d'analitzar més de 600 lípids pertanyents a 18 subclasses diferents en mostres de sang. Actualment hi ha una gran varietat de mètodes, que reporten des de centenars fins a milers d'espècies lipídiques, així doncs, quan més lípids es cobreixin, major serà la informació que es tindrà a l'hora d'interpretar el metabolisme lipídic.

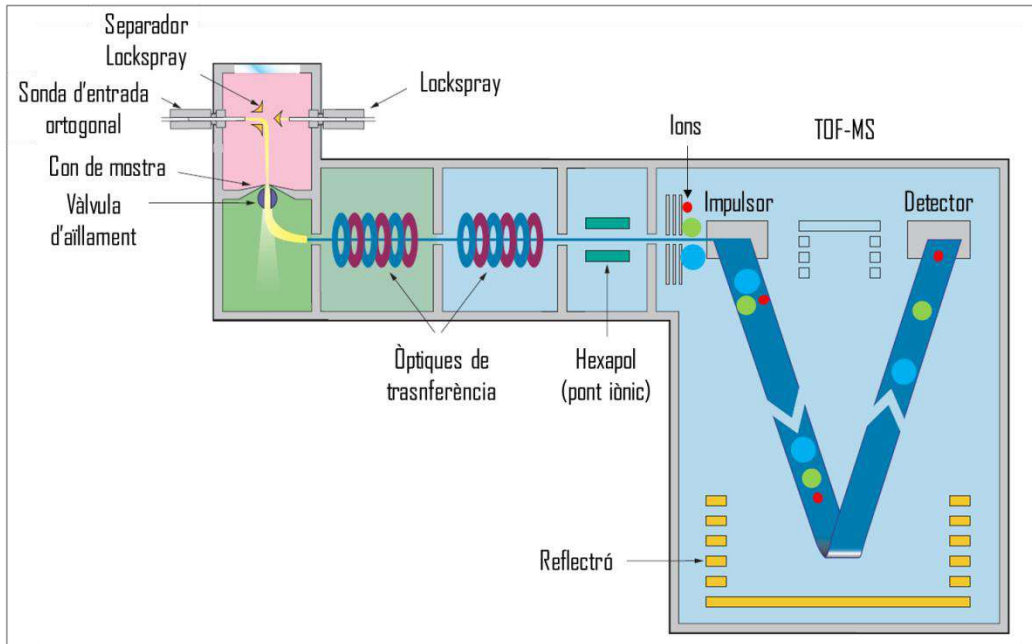
 L'**anàlisi de sospitosos** (*suspected screening*) és una aproximació en la que l'anàlisi de dades es du a terme de forma retrospectiva. En aquests estudis, les dades s'adquireixen com en un anàlisi no dirigit, però es processen com en un estudi dirigit. Per tant, s'empren espectròmetres de masses d'alta resolució (HRMS) per l'anàlisi dels analits, però enlloc d'utilitzar estàndards de referència, com es faria en un anàlisi dirigit, s'utilitzen característiques intrínseques del compost, com són la precisió de massa, el patró isotòpic o el  $R_t$  per determinar-ne la presència a la mostra.

### 1.3.2.1 Analitzadors dels espectròmetres de masses

Els espectròmetres de masses estan formats per tres mòduls, la font d'ionització, l'analitzador de masses i el detector. En aquesta Tesi, la font d'ionització utilitzada per l'anàlisi de lípids ha estat sempre l'electrosprai (ESI), ja que com a font d'ionització "tova", manté pràcticament intacte els ions moleculars o pseudomoleculars que posteriorment són seleccionats com a ions precursor. Pel que fa a l'analitzador, la funció del qual és la de separar els ions en funció de la seva relació  $m/z$ , s'han utilitzat tres tipus d'analitzadors diferents, en aquest apartat s'explicaran les principals característiques de cadascun d'ells.

- ✚ L'analitzador de **temps de vol** (ToF) es basa en el temps que necessiten els ions d'una determinada  $m/z$  per a recórrer la distància entre la font d'ionització i el detector al aplicar un camp elèctric. Un cop accelerats, la velocitat dels ions es manté constant, ja que la distància que han de recórrer fins al sistema de detecció es troba lliure de camp, per tant, l'ordre d'arribada dels ions al detector serà en funció del seu valor  $m/z$ , de més petits a més grans. El desenvolupament de la tecnologia d'acceleració ortogonal i dels sistemes de reflectró han millorat considerablement tant la resolució com l'exactitud de massa d'aquests analitzadors; els ions són accelerats enviats en paquets cap al reflectró que es troba a mig camí per invertir la direcció de vol dels ions i focalitzar aquests ions amb igual  $m/z$  amb una petita dispersió d' energies cinètiques (Figura 1.7). Així, les principals característiques dels analitzadors ToF són les de proporcionar un rang de masses gairebé il·limitat, permetre mesures de massa exacta amb errors relatius inferiors a 1-5 ppm treballant a

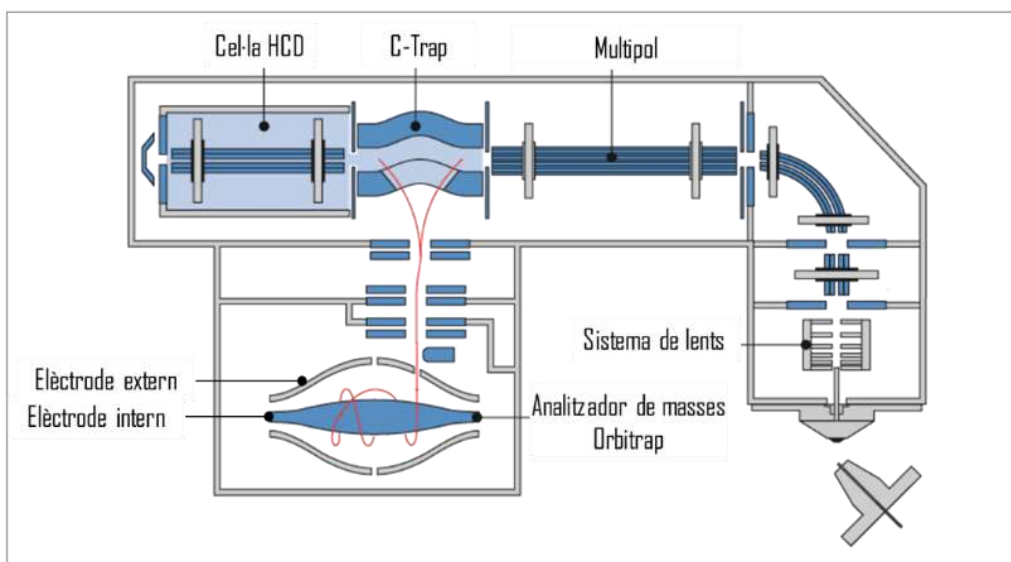
elevada resolució (5.500 FWHM a  $m/z$  500), proporcionar una elevada velocitat d'adquisició (20-500 espectres) i una elevada sensibilitat (màxima transmissió dels ions formats).



**Figura 1.7** Representació esquemàtica de l'analitzador Waters/LTC Premier XE i de la separació dels ions en un analitzador ToF ortogonal.

- ✚ L'analitzador **Orbitrap** consta d'un elèctrode central amb forma de fus i un elèctrode extern (Figura 1.8). Els ions són transferits des de la font d'ionització a una trampa d'ions (*C-Trap*) on són emmagatzemats i estabilitzats. Els ions són injectats tangencialment dins d'un camp elèctric generat entre els dos elèctrodes mencionats on queden atrapats, i per contrarestar l'atracció electrostàtica que exerceix l'elèctrode central, els ions realitzen un moviment oscil·latori harmònic al seu voltant, la freqüència axial dels quals permet determinar el valor  $m/z$  dels ions. A més, la presència d'una cel·la de dissociació (HCD) permet realitzar la fragmentació de tots els ions

generats a la font d'ionització (*all-ion fragmentation, AIF*). L'analitzador Orbitrap, tot i ser un dels més recents, proporciona prestacions molt bones ja que permet treballar en un gran interval de masses (50-6000  $m/z$ ), proporciona elevada exactitud de massa ( $\text{error}_{\text{calibratge extern}} < 3 \text{ ppm}$ ;  $\text{error}_{\text{calibratge intern}} < 1 \text{ ppm}$ ), treballa a elevada resolució (140.000 FWHM, a  $m/z$  200) i té una elevada sensibilitat.



**Figura 1.8** Representació esquemàtica de l'analitzador Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific).

- ✚ L'analitzador híbrid **Q-Exactive Orbitrap**, és un sistema MS/MS que combina la selecció d'ions precursors al quadrupol amb la detecció de massa exacte d'alta resolució a l'Orbitrap. La seva configuració és la mateixa que s'observa a la Figura 1.8, substituint el multipol per un quadrupol, característica que permet l'anàlisi de les mostres en mode *data-dependent MS2* (ddMS2). Les especificacions que mostra la casa comercial coincideixen amb les descrites en el paràgraf anterior per l'analitzador Orbitrap.

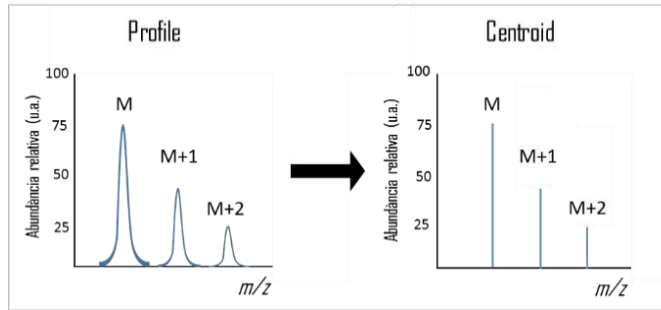
### 1.3.3 Tractament de dades

Els estudis dirigits habitualment fan servir el *software* integrat en el mateix instrument (com Xcalibur o Tracefinder en instruments Thermo Fisher Scientific, o MassLynx en instruments Waters) per el tractament de les dades, ja que s'analitzen un nombre limitat d'anàlits i de mostres. Mitjançant aquests programes no es pot analitzar el gran volum d'informació generat en els estudis no dirigits. Per tant, en els darrers anys s'han desenvolupat un llarg llistat de programes, tant d'accés lliure com amb llicència, que permeten la identificació i/o quantificació dels lípids presents en mostres biològiques d'una manera més o menys automatitzada. Tot i que alguns dels programaris permeten l'anàlisi de dades obtingudes per FIA, la gran majoria només és capaç d'analitzar dades obtingudes per LC-MS com és el cas de *lipid data analyzer* (LDA) (Hartler et al., 2011), que crea un objecte 3D on descriu l'espectre de masses en la dimensió  $m/z$ , el  $R_t$  i la distribució isotòpica teòrica dels composts; o el LIMSA (Haimi et al., 2006) que relaciona els pics amb una llista de possibles lípids que ha de ser proporcionada per l'usuari. A diferència dels dos *softwares* anteriors, que generen el llistat de lípids després d'uns processos de desconvolució i alineament dels cromatogrames, LipID (Hübner et al., 2009) realitza l'anotació de lípids a partir d'un llistat de  $m/z$  que l'usuari ha d'haver generat prèviament i només cobreix GPs, SPs i àcids grassos. Altres programaris van un pas més enllà en la confirmació de les identitats i permeten el tractament tant de dades obtingudes en *full scan* com de *product ion scan*, és el cas del programari amb llicència de Thermo lipidSearch, que és capaç d'analitzar dades de fragmentació en etapes successives ( $MS^n$ ) adquirida emprant *data-dependent* anàlisis. Per altra banda, MS-DIAL (Tsugawa et al., 2015), d'accés lliure, està dissenyat específicament per l'anàlisi de *data-*

*independent* LC-MS/MS i utilitza la base de dades lipidBlast (Kind et al., 2013), una llibreria *in silico* d'espectres de masses en tàndem, per l'anotació dels lípids. Altres programes d'accés lliure són capaços d'analitzar dades d'ions producte/fragment, obtingudes emprant *data-dependent* o *all ion fragmentation* (AIF), respectivament, com és el cas de lipidMatch (Koelmel et al., 2017), que incorpora una base de dades de fragmentacions típiques *in silico* de més de 500.000 espècies (60 subclasses) per a la identificació temptativa dels lípids i a més admet llibreries creades per l'usuari. Altres programaris menys específics per lípids, però amb gran rellevància al món de la metabolòmica es poden emprar per a una identificació temptativa, com és el cas de l'MZmine 2 (Pluskal et al., 2010) o del XCMS, tant en la versió de R com *online* (Gowda et al., 2014). Aquest darrer, proporciona un llistat de *features*, que poden ser agrupades per perfil isotòpic i adductes en compostos amb el paquet de R CAMERA (Kuhl et al., 2012), i emprant la base de dades METLIN per l'anotació en la versió *online*.

Tot i que alguns dels programaris mencionats suporten els formats dels arxius dels venedors, la gran majoria d'ells necessiten una conversió prèvia a formats d'accés obert com són .mzML o .mzXML, els quals es poden obtenir amb el programa MSConvert de Proteowizard (Adusumilli and Mallick, 2017). A més, molts dels programes només poden treballar amb espectres de masses adquirits en mode *centroid*, per tant, tots aquells fitxers que s'hagin adquirit en mode *profile* han de ser transformats (Figura 1.9), procés que també es pot dur a terme mitjançant MSConvert.





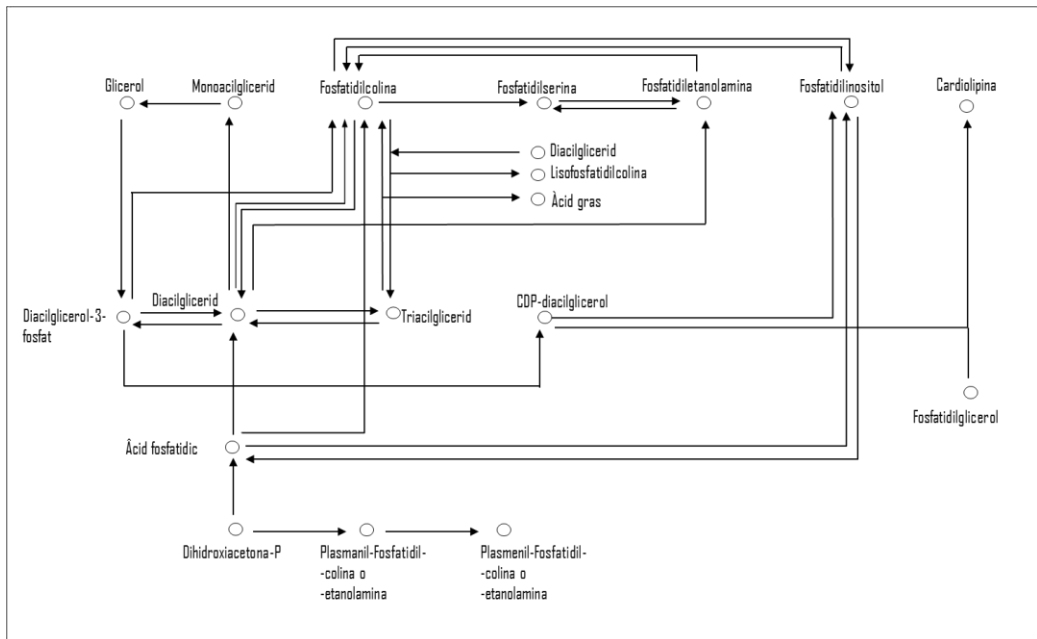
**Figura 1.9** Representació d'un espectre de masses adquirit en mode *profile* i en mode *centroid*.

### 1.3.4 Interpretació biològica

Una vegada analitzats i identificats els lípids que pateixen una desregulació sota un factor estressant (com pot ser la presència d'un xenobiòtic), el següent pas és elaborar una hipòtesis i donar-li un significat biològic a l'alteració. Això és particularment difícil ja que les concentracions mesurades reflecteixen múltiples escales dinàmiques i espacials, que van des de la composició de membranes fins a reaccions bioquímiques o de senyalització. Tot i així, sabent els lípids que es troben desregulats es poden identificar temptativament les rutes metabòliques afectades. La base de dades KEGG proporciona informació detallada de moltes rutes metabòliques en diferents organismes, entre elles, s'hi poden trobar les vies implicades en el metabolisme de lípids. Però aquests no són de fàcil visualització ja que les diferents classes lipídiques poden aparèixer en rutes diferents. A la [Figura 1.10](#), es mostra una proposta d'esquema de les principals rutes metabòliques dels lípids d'interès en aquesta Tesi, creada a partir de la base de dades KEGG.

Tot i que l'esquema proposat té algunes mancances, com per exemple que no contempla el grau d'insaturació o la llargada dels àcids grassos, els lípids pertanyents a una mateixa classe estan, en part, regulats per els mateixos

enzims, per tant s'esperarà un elevat grau de coregulació dins de cada classe lipídica (Yetukuri et al., 2011).



**Figura 1.10** Proposta d'esquema del metabolisme dels lípids a partir d'informació extreta de la base de dades KEGG ([www.kegg.jp](http://www.kegg.jp)). Els cercles s'han inclòs per generar un codi de colors, per indicar acumulació o reducció del contingut de cada classe lipídica en la mostra biològica analitzada al patir un factor estressant i veure la relació de les vies metabòliques alterades.

## 1.4 NOMENCLATURA DELS LÍPIDS

La nomenclatura dels lípids dependrà del grau d'identificació de l'espècie lipídica en concret, i aquesta estarà condicionada per la instrumentació utilitzada.

La manera més general de referir-se als lípids segueix la següent estructura: 'Classe lipídica' 'nombre d'àtoms de carboni' ':' 'nombre de dobles enllaços'. Per exemple, una PC 36:1 seria una PC amb 36 àtoms de carboni i un doble enllaç. En aquest cas només es coneix la suma final d'àtoms de carboni i de dobles enllaços, però no quins són els àcids grassos que la formen. Aquest

tipus d'informació s'obté a partir de l'anàlisi de lípids utilitzant un instrument d'alta resolució en mode *full scan*. Si és possible identificar els àcids grassos que conformen la molècula lípídica però no en quin ordre van units al glicerol, aleshores, els dos àcids grassos van separats per “\_” i la nomenclatura correcte seguint amb l'exemple anterior, seria PC-[16:0\_20:1]. Si es coneix l'ordre d'unió dels àcids grassos al glicerol aleshores aquests van separats per “/”, i quedaria PC-[16:0/20:1], indicant que l'àcid gras 16:0 va en posició *sn-1* i el 20:1 en posició *sn-2*. Aquests dos escenaris s'assoleixen aplicant fragmentació; amb un analitzador híbrid es poden obtenir dades adquirides en mode *data-dependentMS2*, mentre que el mode *data-independentMS2* podria ser d'utilitat sempre que la cromatografia prèvia presentés baixa coel·lució dels analits. Per últim, per tenir una identificació inequívoca de l'espècie lipídica, caldria conèixer la posició del doble enllaç dins de l'àcid gras; si aquest es trobés en posició 7 contant des del carboxil, s'indicaria com PC-[16:0/20:1,n-7]. Alternativament, es pot indicar la posició del doble enllaç començant a contar des del carboni terminal de la cadena alifàtica, aquest s'indica com a omega ( $\omega$ ). A diferència dels estereoisòmers, els regioisòmers, que es diferencien en la posició de l'enllaç doble, són més complicats de diferenciar, però s'han desenvolupat diversos mètodes per distingir-los; com ara l'aplicació de diferents energies de col·lisió per fragmentar els àcids grassos i establir-ne la linearitat, o la dissociació induïda per ozó (OzID), ja que la reacció selectiva entre l'ozó i els dobles enllaços carboni-carboni poden generar espectres de masses en tàndem específics (Li et al., 2014). En aquesta Tesi no s'han arribat a diferenciar regió-isòmers i la nomenclatura usada correspon als dos primers casos (*p. ex.* PC 36:1 i PC-[16:0\_20:1] o PC-[16:0/20:1]).

## 1.5 OBESÒGENS I DISRUPTORS LIPÍDICS

Un dels principals objectius dels estudis lipidòmics és la identificació de canvis en els perfils lipídics en un determinat sistema biològic per acció d'un factor extern estressant. Aquests poden ser de caràcter molt divers, des de canvis en les propietats fisicoquímiques de l'entorn de l'organisme (p. ex. pH, salinitat, exposició solar, temperatura), com canvis alimentaris, reproductius, envelliment o presència de contaminants ambientals.

Va ser al 2002, quan Baillie-Hamilton va suggerir per primera vegada que l'epidèmia d'obesitat actual podria estar associada a l'augment exponencial de la producció de productes químics. Partint d'aquesta hipòtesis va aconseguir relacionar l'augment de pes amb l'exposició a contaminants ambientals, inclosos alguns pesticides, dissolvents, plàstics, retardants de flama i metalls pesants (Baillie-Hamilton, 2002). Però van ser Grün i Blumberg (2006) els que van encunyar el terme "obesògen" en el seu ja clàssic estudi. Molts d'aquests obesògens han estat classificats prèviament com a disruptors endocrins. De fet, el teixit adipós és també un òrgan endocrí i la seva alteració pot tenir conseqüències a nivell sistèmic, amb implicacions en malalties com la diabetis o l'obesitat (Janesick and Blumberg, 2016). Val a dir, però, que la gran majoria d'estudis lipidòmics realitzats fins al moment responen a un objectiu de recerca biomèdica, i tot i la gran implicació que tenen els lípids en la fisiologia dels metazous, la lipidòmica ambiental encara és un camp a explorar i amb un gran potencial.

D'entre els contaminants ambientals, en aquesta Tesi s'han seleccionat alguns compostos model, com ara alguns additius plàstics, el tributil d'estany (TBT), l'àcid retinòic (RA) i el progestàgen sintètic drospirenona (DRO).

### 1.5.1 Bisfenol A i derivats

Els objectes fets de plàstic contenen additius per dotar-los de diferents propietats, com poden ser flexibilitat, propietats ignífugues, color, resistència o durabilitat. Un dels principals additius de la indústria del plàstic és el bisfenol A (BPA), emprat en la producció de plàstics epoxi i policarbonats, en recobriments d'envasos d'aliments, papers tèrmics, electrodomèstics i adhesius (Lv et al., 2019). El BPA actua com a disruptor endocrí, imitant les funcions del 17- $\beta$ -estradiol i actuant com a lligant del receptor d'estrògens (ER) (Srivastava et al., 2015). Són nombrosos els estudis que atribueixen alteracions en el desenvolupament del sistema reproductiu tant de vertebrats com d'organismes aquàtics deguts a l'exposició a BPA. El BPA indueix l'expressió de vitelogenina en carpes juvenils (Mortazavi et al., 2019), redueix la maduració dels ovaris en femelles (Wang et al., 2019) i la qualitat de l'esperma en mascles de carpí daurat (Hatef et al., 2012). Tanmateix, l'exposició a BPA també produeix efectes transgeneracionals alterant la fertilitat de peix zebra (Santangeli et al., 2019), provocant danys histològics en testicles de ratolins (S. Zhang et al., 2019) i estrès oxidatiu en testicles de rates (Olukole et al., 2019). En humans, l'exposició a BPA s'ha associat amb malalties cardiovasculars, diabetis i disfuncions sexuals en treballadors exposats (Schechter et al., 2010).

Al 2010, Canadà es converteix en el primer país en prohibir la utilització de plàstics que continguin BPA en la producció de biberons i tot seguit, al 2011 l'EFSA publica una re-avaluació on manté la ingesta diària tolerable (TDI) en 50  $\mu\text{g}/\text{Kg bw}/\text{dia}$  i el límit de migració específic (SML) en 0.6  $\text{mg}/\text{Kg}$  menjar, però amb la restricció de que el BPA no es pot emprar en la fabricació de biberons. Posteriorment, al 2015, el TDI es redueix a 4  $\mu\text{g}/\text{Kg bw}/\text{dia}$  temporalment, fins a la següent re-avaluació, que va començar al 2018 i es preveu que finalitzi al

2020 (<https://www.efsa.europa.eu/>). Arran de la prohibició en la utilització del BPA, s'han introduït compostos anàlegs com el bisfenol F (BPF), el bisfenol AF (BPAF), el bisfenol B (BPB) i el bisfenol S (BPS) en la producció de plàstics. Tot i que en un principi aquests composts haurien de representar alternatives més segures al BPA, s'ha descrit que el BPF és igual d'actiu que el BPA a nivell de disrupció endocrina (Rochester and Bolden, 2015). L'exposició a BPF produeix despigmentació, neurotoxicitat i alteracions en el desenvolupament cardíac en embrions de peix zebra (Mu et al., 2019). També actua com a un compost estrogènic en la línia de càncer de mama MCF-7 causant proliferació mitjançant unió al receptor d'estrògens ER $\alpha$  (Lei et al., 2018).

En l'indústria alimentària, el BPA s'utilitza com a reactiu en la producció de resines per aïllar la cara interna d'envasos de menjar i llaunes, creant una capa protectora per evitar la degradació tant del menjar com del propi envàs (Poole et al., 2004). El bisfenol A diglicidil èter (BADGE) és el monòmer resultant en la producció d'aquestes resines que, igual que el BPA, acaba migrant als aliments envasats ja que no estan units covalentment a la resina. El BADGE conté dos grups epoxi, èters cíclics altament reactius, que s'hidrolitzen fàcilment en contacte amb matrius aquoses, produint diferents compostos derivats.

A nivell toxicològic aquests compostos han estat molt menys estudiats que el BPA, però hi ha indicis que assenyalen que el BADGE pot actuar com a disruptor endocrí ja que s'ha associat positivament el nivell de BADGE en sèrum d'homes adults amb l'hormona fol·liculostimulant (FSH) i negativament amb el contingut d'estradiol (Kim et al., 2015).

A diferència del que s'ha reportat per BPA i BPF, BADGE i els seus clorohidroxyderivats, tot i desencadenar la proliferació cel·lular en cèl·lules T47D de càncer de mama humanes, no mostren afinitat pel ER (Nakazawa et

al., 2002). BADGE i BADGE·2HCl tampoc van mostrar activitat agonista amb el receptor d'andrògens (Sato et al., 2004).

A nivell de metabolisme lipídic, el BPA s'ha classificat com a obesògen en mamífers, promovent l'adipogènesi, la desregulació de lípids i glucosa i la inflamació de teixit adipós (Legeay and Faure, 2017). Aquest efecte obesogènic observat en mamífers també és patent en peixos, ja que l'exposició a BPA va produir acumulació de lípids en el fetge de juvenils de *Sparus aurata* (Maradonna et al., 2015). En peix zebra, però, l'efecte en els lípids hepàtics exercit pel BPA va seguir una tendència no monotònica, promovent la síntesi d'àcids grassos i TGs a dosis baixes i induint la lipogènesi *de novo* i colesterogènesi a concentracions més elevades (Santangeli et al., 2018).

Recentment, també s'ha estudiat l'acció del BPF sobre el metabolisme dels lípids. Exposició a BPF va induir apoptosi en macròfags de ratolí per mitjà de l'activació de vies de senyalització d'esfingomielines (SM) i de Cer (Zhao et al., 2019). En teixits renals de ratolí, l'exposició a BPF va desregular nivells de GP i GL, produint alteracions en les seves membranes i en la seva funcionalitat (Zhao et al., 2018). També s'ha descrit una disminució de GL i GP, incloent plasmalògens, que són lípids que exerceixen un paper protector enfront d'estrès oxidatiu, en cèl·lules de fetge de peix (PLHC-1) exposades a BPF (Pérez-Albaladejo et al. dades no publicades).

Fins ara, l'únic estudi mostrant alteració lipídica causada per el BADGE reporta inducció d'adipogènesi en pre-adipòcits de ratolí (Chamorro-García et al., 2012). Pel que fa als derivats del BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O i BADGE·2HCl, a dia d'avui no hi ha cap estudi que n'hagi investigat l'efecte sobre el metabolisme lipídic.

### 1.5.2 Tributíl d'estany

El tributíl d'estany (TBT) és un compost organometàl·lic que consisteix en tres grups butíl units covalentment a un àtom d'estany (IV) ((C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn). El TBT va ser introduït al mercat al voltant dels anys 60 i ha estat àmpliament utilitzat durant les darreres dècades com a desinfectant en sistemes de refrigeració industrial, en el control de la proliferació de floridura en la indústria paperera, en preservació de materials com la fusta i com a agent antiincrustant en pintures de vaixells (Antizar-Ladislao, 2008). La seva aplicació en els cascs dels vaixells per prevenir l'acumulació de mol·luscs, va comportar l'entrada del compost en la columna d'aigua, sediments i biota. L'exposició a TBT ha comportat nombrosos problemes de reproducció, majoritàriament en mol·luscs (Morcillo and Porte, 1999; Morcillo et al., 1999), al induir el fenomen d'*imposex*, que consisteix en l'aparició de caràcters sexuals masculins en femelles de gasteròpode, les quals desenvolupen òrgans sexuals masculins (penis i vasos deferents) i pot conduir a l'esterilització de l'espècie. Per això, al 2003, *The International Maritime Organization* (IMO) (imo.org) demanà una prohibició global de l'aplicació de compostos organotins que actuen com a biocides en pintures antiincrustants als vaixells i una prohibició total a 2008. No obstant, el TBT segueix sent emprat com a biocida i conservant de diversos materials com la fusta, especialment en països en vies de desenvolupament i en aquells que no pertanyen a l'IMO (Antizar-Ladislao, 2008).

Recentment, el TBT torna a estar en el punt de mira ja que s'ha catalogat com a un potent obesògen ambiental (Grün and Blumberg, 2006). En mamífers, l'exposició prenatal a TBT produeix una alteració del comportament de les cèl·lules mare, sensibilitzant les cèl·lules estromals multipotents per diferenciar-se en adipòcits, un efecte que podria augmentar la massa adiposa



en l'organisme adult (Kirchner et al., 2010); i s'ha descrit que la inducció de l'adipogènesis succeeix via activació del PPAR $\gamma$  (Li et al., 2011). Per tant, l'exposició a TBT pot ser considerat com un factor de risc en el desenvolupament d'obesitat. Tanmateix, a causa de la seva gran distribució en el medi aquàtic, l'efecte del TBT sobre el metabolisme de lípids en organismes aquàtics també ha estat estudiat. En peix zebra s'ha observat el mateix efecte que en mamífers; individus adults exposats al compost durant la fase larval, presentaven un nombre d'adipòcits superior a aquells individus que no havien estat prèviament exposats (Broeder et al., 2017). A més, l'exposició d'individus de peix zebra adults va causar un increment de l'acumulació de lípids al fetge, juntament amb un increment en l'expressió de gens implicats en el transport i emmagatzematge de lípids (Zhang et al., 2016).

### 1.5.3 Àcid retinòic

L'àcid retinoic (RA) és un metabòlit actiu de la vitamina A essencial en el desenvolupament embrionari però que en excés, pot causar defectes en el naixement (Pennimpede et al., 2010). Per això, els organismes han desenvolupat un seguit de mecanismes per ajudar a mantenir els nivells de vitamina A i RA estables. En vertebrats, els nivells endògens de RA estan regulats per receptors nuclears. El 9-cis-RA és el lligant natural de l'RXR i tant el 9-cis-RA com l'*all-trans*-RA (ATRA) presenten afinitat per el RAR. Entre les moltes funcions atribuïdes als retinoides, es reconeix el seu paper en el control del metabolisme de lípids i energia amb possibles implicacions en trastorns crònics com l'obesitat, la diabetis, l'esteatosi hepàtica i l'aterosclerosi (Bonet et al., 2012). A més, el fetge i el teixit adipós, que són òrgans importants en l'emmagatzematge i el metabolisme dels retinoides, també estan implicats en

l'homeòstasi lipídica (Bonet et al., 2012). No obstant, els efectes d'ATRA sobre el metabolisme de lípids no es troben exempts de controvèrsia. Si bé es cert que ATRA s'ha descrit com un compost supressor d'obesitat en mamífers (Bonet et al., 2000; Berry and Noy, 2009; Manolescu et al., 2010) mitjançant la unió al receptor PPAR $\beta/\delta$  i per l'activació de RARs (Berry and Noy, 2009) arribant a proposar-se com a agent en la prevenció de la síndrome metabòlica, altres estudis mostren que el tractament amb RA exogen promou l'acumulació intracel·lular de lípids i la diferenciació de preadipòcits humans AML-I en adipòcits (Morikawa et al., 2013) i indueix l'adipogènesi en peix zebra (Li et al., 2010).

#### 1.5.4 Progestàgens: Drospirenona

La drospirenona (DRO; 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimetilen-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-ene-21,17-carbo-lactona) és un progestagen sintètic derivat de la 17- $\alpha$ -espirolactona que mostra un perfil farmacològic molt semblant a la progesterona, amb propietats antiminerlocorticoides i antiandrogèniques (Krattenmacher, 2000; Palacios et al., 2006). La DRO forma part dels progestàgens de quarta generació i s'utilitza en anticonceptius orals en combinació amb estrògens com l'estradiol o l'etinilestradiol. La DRO entra al medi aquàtic mitjançant els efluent de les plantes de tractament d'aigües residuals, on la seva presència s'ha reportat a concentracions en el rang de ng·L<sup>-1</sup> (Avar et al., 2016; Golovko et al., 2018; Šauer et al., 2018), concentracions que poden suposar un risc per biològic per els organismes aquàtics (Maasz et al., 2017). De fet, s'ha descrit que la DRO pot actuar com un disruptor endocrí en organismes aquàtics. Entre els estudis que suporten aquesta hipòtesi trobem els de Blanco et al. (2016) reportant un augment dels nivells plasmàtics de 17-hidroxipregnenolona, 17-

hidroxiprogesteroa i androstenediona en juvenils de llobarro i un increment de l'expressió de *cyp17a1* en ovaris; o el de Zucchi et al. (2014) que descriu inhibició de l'ARNm i de la proteïna vitelogenina, alteracions histològiques als ovaris i alteracions transcripcionals de gens involucrats en les vies del ritme circadià i de l'activitat de receptors d'hormones esteroïdals.

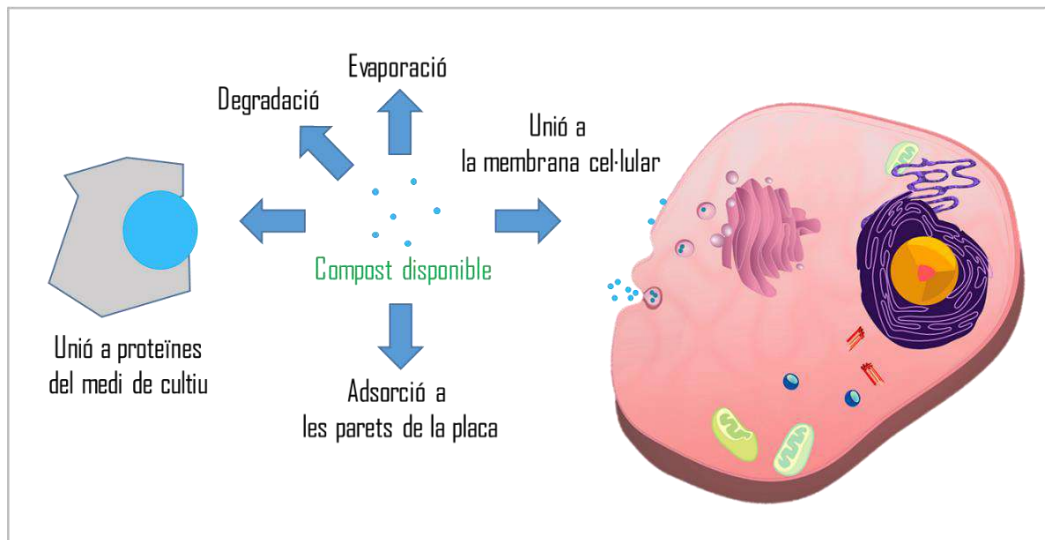
## 1.6 SISTEMES BIOLÒGICS

### 1.6.1 Línies cel·lulars

Els cultius cel·lulars són models que consisteixen en mantenir entitats d'un organisme fora del cos viu en un entorn artificial (Schirmer, 2006). Les cèl·lules s'obtenen a partir d'un teixit o òrgan d'un organisme viu obtenint així cultius primaris. Si aquestes són capaces de reproduir-se indefinidament, bé perquè hagin estat extretes de teixit cancerigen o hagin estat immortalitzades, esdevenen una línia cel·lular. A dia d'avui, hi ha disponibles més de 4000 tipus de línies cel·lulars diferents a l'*American Type Culture Collection* (ATCC) incloent línies humanes, d'animals, d'insectes, de peixos i cèl·lules mare. Comparats amb els assajos *in vivo*, els cultius cel·lulars són mètodes que permeten un major control dels paràmetres, disminuint la variabilitat individual. Són mètodes més econòmics que permeten testar un major nombre de condicions (ex. més contaminants a més concentracions) i a nivell ètic responen a la voluntat social de reduir l'experimentació animal.

Els cultius cel·lulars són sistemes ideals per a l'estudi de mecanismes d'acció dels xenobiòtics, ja que qualsevol pertorbació exercida per un factor estressant s'iniciarà a nivell cel·lular, sovint, provocant efectes adversos a nivells més elevats d'organització biològica (organisme < població < ecosistema) (Fent, 2001).

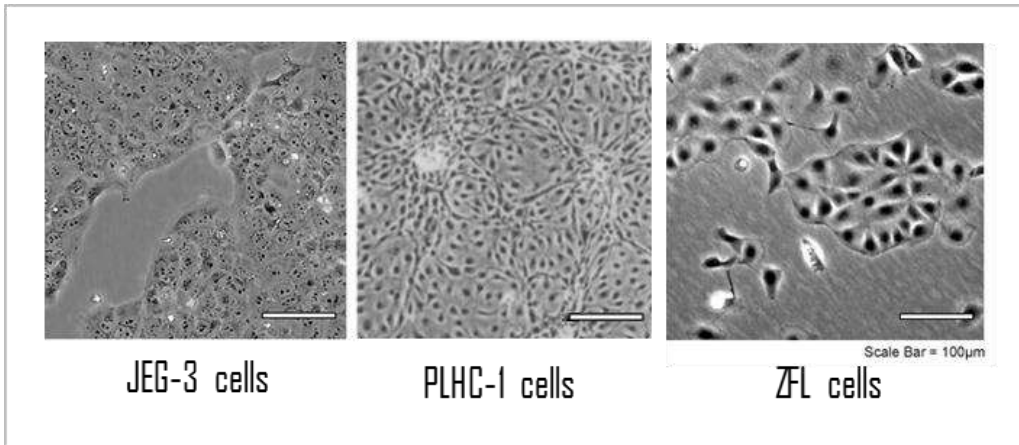
Amb l'objectiu de que els efectes que s'observen en assajos *in vitro* siguin comparables i extrapolables a nivells més elevats d'organització biològica, és recomanable utilitzar la concentració al lloc diana ja que és aquesta la dosi que exerceix l'efecte, però tradicionalment en els estudis toxicològics s'ha utilitzat la concentració nominal dels compostos estudiats per a l'obtenció de la relació concentració-efecte. Per compostos que es transporten per processos de difusió, la concentració biodisponible al medi és una bona aproximació de la concentració al lloc diana (Groothuis et al., 2015). Però la biodisponibilitat dels compostos químics en un sistema *in vitro* es pot veure afectada per diferents processos, com l'evaporació dels compostos més volàtils, la baixa solubilitat dels compostos hidrofòbics, adsorció dels compostos tant a les parets de la placa com a la superfície de les membranes cel·lulars, conjugació dels compostos amb components del medi de cultius utilitzat (p. ex. proteïnes del sèrum boví fetal) o fins i tot degradació dels mateixos durant el temps d'exposició (Figura 1.11) (Heringa et al., 2004; Groothuis et al., 2015). Tots aquests processos poden conduir a una disminució de la biodisponibilitat del compost, trobant-se a concentracions molt inferiors a la concentració nominal, i per tant, acabar subestimant els efectes dels compostos estudiats. Per tant, la pràctica de mesurar la concentració d'exposició real en el medi de cultiu és clau per incrementar la fiabilitat i precisió de les dades toxicològiques obtingudes en els assajos *in vitro*.



**Figura 1.11** Representació esquemàtica dels diversos processos que disminueixen la disponibilitat en el medi de cultiu dels compostos en els assajos *in vitro*. Il·lustracions similars es poden trobar a Heringa et al. (2004) i a Groothuis et al. (2015).

Els cultius cel·lulars també s’han utilitzat amb èxit al camp de la lipídica per l’estudi d’alteracions del perfil lipídic des d’una perspectiva toxicològica. Per exemple, models com els preadipòcits 3T3-L1, les cèl·lules de rata PC12, o les cèl·lules humanes HeLa, L02 i HepG2 s’han utilitzat per dilucidar l’activitat biològica de diversos fàrmacs, agents microbians i altres xenobiòtics (Rebollo-Ramirez et al., 2018; H. Zhang et al., 2019; T. Zhang et al., 2019; X. Wang et al., 2019).

En aquesta Tesi, s’han utilitzat diferents models cel·lulars: la línia cel·lular JEG-3 de placenta humana, s’ha emprat com a model de disrupció endocrina en toxicologia humana, mentre que les línies de fetge de peix PLHC-1 i ZFL s’han emprat com a models d’espècies aquàtiques (Figura 1.12).



**Figura 1.12** Imatge de les diferents línies cel·lulars emprades en aquesta Tesi. (Escala gràfica=100 µm)

### 1.6.1.1 Cèl·lules de placenta humana

Les cèl·lules JEG-3 són derivades d'un càncer de placenta, obtingudes al American Type Culture Collection (ATCC HTB-36). Han estat extensament utilitzades com a model per estudiar l'activitat endocrina en la placenta i la seva alteració per factors exògens degut a l'elevada activitat aromatasas que presenten. L'aromatasa placentar està codificada per l'enzim CYP19, que catalitza l'aromatització d'andrògens, tant fetals com materns, en estrògens, sent essencial en un embaràs saludable (Lephart and Simpson, 1991). A més, la placenta regula el transport de nutrients de la mare al fetus, fonamentalment aminoàcids essencials i no essencials, proteïnes i lípids (com els PUFAs de cadena llarga). El contingut en lípids de la placenta és bastant reduït (~1% del pes total) i a diferència d'altres òrgans com el fetge o el teixit adipós té una capacitat limitada de sintetitzar-los (Delhaes et al., 2018). Tanmateix, s'ha vist que aquesta és capaç de sintetitzar alguns àcids grassos com els àcids palmitolèic (16:1,  $\omega$ -7), palmític (16:0) i oleic (18:1,  $\omega$ -9) i en menor mesura làuric (12:0), mirístic (14:0) i esteàric (18:0), ja sigui a partir de glicerofosfolípids o mitjançant síntesi *de novo* (Coleman and Haynes, 1987). Els

àcids grassos que arriben al citoplasma del trofoblast de la placenta s'uneixen a proteïnes citosòliques per tal de ser eliminats, oxidats o esterificats. A més, els microsomes de la placenta contenen els enzims necessaris per la síntesi de glicerolípidis a partir de glicerol-3-fosfat, àcids grassos lliures i altres precursors (Gude et al., 2004). S'ha vist que en casos d'excés d'àcids grassos, com podria ser en un cas d'obesitat materna durant l'embaràs, la placenta tendeix a acumular elevats nivells de TGs, dificultant el transport i el metabolisme de lípids i generant, com a conseqüència, un augment de lípids en la circulació fetal, produint un desenvolupament fetal indegut amb alteracions en l'emmagatzematge de greix fetal (Delhaes et al., 2018).

No només l'estil de vida de la mare, o la predisposició genètica, sinó també l'exposició a diversos xenobiòtics poden conduir al desenvolupament d'obesitat o a l'alteració de l'homeòstasi dels lípids i afectar la funcionalitat de la placenta. Per motius ètics la informació que hi ha fins al moment sobre l'efecte que aquests xenobiòtics poden tenir sobre la placenta és limitada, per tant l'ús de les cèl·lules de placenta humanes JEG-3 com a model biològic pot oferir informació útil per el descobriment dels contaminants que poden actuar como a disruptors lipídics.

### **1.6.1.2 Cèl·lules hepàtiques de peix**

L'elecció de línies cel·lulars provinents de fetge de peix per a la detecció de disruptors lipídics en el medi aquàtic ha estat basada en la importància que té el fetge en el manteniment de la homeòstasi sistèmica dels lípids en els vertebrats. El fetge és el principal òrgan on té lloc la lipogènesi *de novo*, sintetitzant àcids grassos els quals són esterificats mitjançant glicerol-3-fosfat per format TGs, que abandonaran el fetge formant part de lipoproteïnes i

seran transportats al múscul (on s'oxiden per obtenir energia) o al teixit adipós (on són re-esterificats i emmagatzemats en forma de TGs) (Bonet et al., 2012). A més, l'alteració de la composició lipídica en hepatòcits pot desencadenar el desenvolupament d'obesitat, dislipidèmia i esteatosis hepàtica, tres condicions íntimament relacionades amb la patologia de la síndrome metabòlica (Torres et al., 2006; Bonet et al., 2012).

En aquesta Tesi s'ha treballat amb la línia cel·lular ZFL (ATCC CRL-2643), cèl·lules epitelials extreteres del fetge de peix zebra (*Danio rerio*) i la línia cel·lular PLHC-1 (ATCC CRL-2406), que deriven d'un càncer hepatocel·lular de *Poeciliopsis lúcida*. El peix zebra ha estat àmpliament usat com a model de desenvolupament d'espècies vertebrades així com per a l'estudi de diferents malalties, sent també un bon model en toxicologia ambiental. Al no tractar-se de cèl·lules d'origen tumoral es preveu una bona conservació tant del metabolisme lipídic com de detoxificació de xenobiòtics. Tanmateix, les cèl·lules PLHC-1 presenten una activitat CYP1A elevada, activitat o proteïna àmpliament utilitzada com a biomarcador en estudis de toxicologia ambiental.

### **1.6.1.3 Assajos**

#### **Avaluació de la citotoxicitat**

La citotoxicitat dels compostos seleccionats s'ha estudiat mitjançant dos assajos complementaris:

- A) El mètode AlamarBlue està dissenyat per mesurar proliferació cel·lular i per determinar la citotoxicitat d'una gran varietat de compostos químics (Page et al., 1993). Es tracta d'un mètode fluorimètric/colorimètric que incorpora un indicador REDOX. El compost resazurin (no fluorescent i blau) s'addiciona a les cèl·lules i el seu metabolisme el redueix a resorufin



(fluorescent i rosa). Una disminució en la fluorescència mesurada (o canvi en el color) equival a la disminució de l'activitat metabòlica de les cèl·lules. L'AlamarBlue és una solució aquosa ja preparada, que presenta una gran estabilitat si es guarda a la foscor. Com és soluble en aigua, no requereix els passos de rentat i fixació, permetent la reutilització de les cèl·lules per altres assajos (Figura 1.13A).

- B) La viabilitat cel·lular també s'ha mesurat com a activitat enzimàtica i integritat de la membrana cel·lular mitjançant el substrat d'esterases 5-carboxifloresceïna diacetat acetoximetil èster (CFDA-AM; no fluorescent) (Schreer et al., 2005). Les membranes cel·lulars són permeables al substrat, i un cop dins la cèl·lula és hidrolitzat per esterases intracel·lulars a carboxifloresceïna (fluorescent). Les cèl·lules no viables perden l'enzim esterasa, i es detecta una disminució de la fluorescència (Figura 1.13B).

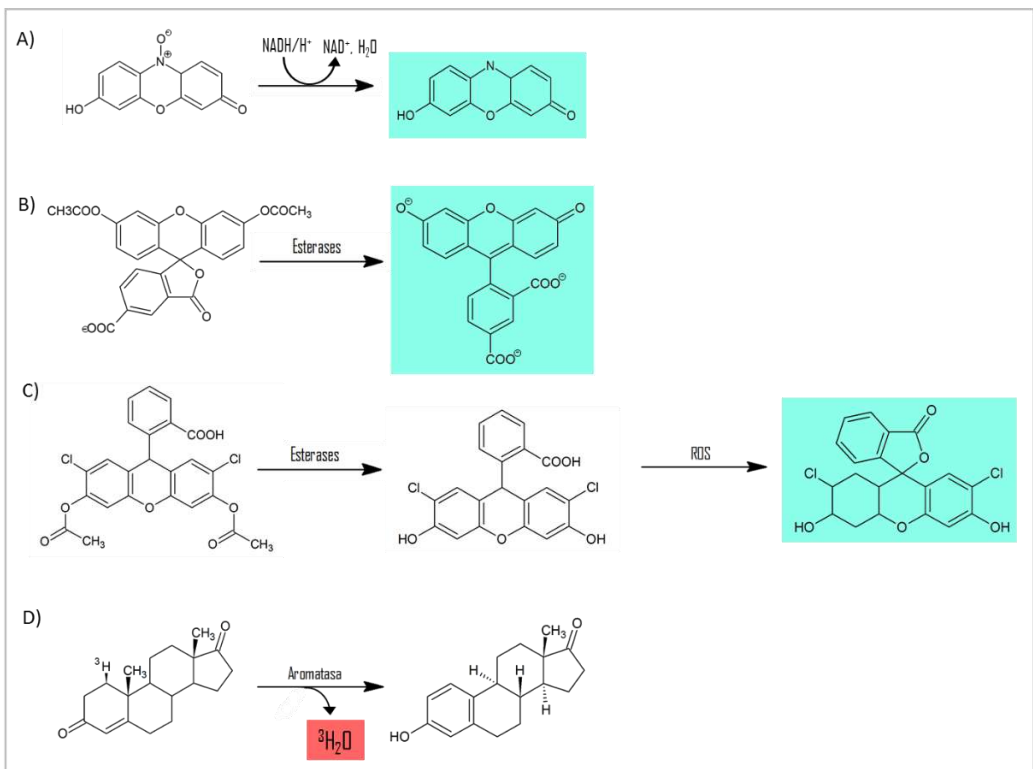
### **Generació d'estrès oxidatiu (ROS)**

L'habilitat dels compostos estudiats de generar ROS s'ha avaluat mitjançant el reactiu 2',7'-diclorodihidrofluoresceïna diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) (Keston et al., 1964). Aquest difon a l'interior de la cèl·lula on és desacetilat per mitjà de les esterases cel·lulars i es forma 2',7'-diclorodihidrofluoresceïna compost no fluorescent que en presència d'hidroxil, peroxil i d'altres espècies reactives d'oxigen és oxidat a 2',7'-diclorofluoresceïna (DCF), compost altament fluorescent (Figura 1.13C).

### **Avaluació de l'activitat CYP19**

La capacitat dels compostos d'actuar com a disruptors endocrins s'ha estudiat mitjançant la seva habilitat d'inhibir l'activitat CYP19. El gen *cyp19* codifica

l'activitat aromatasas i juga un paper important en el balanç hormonal i en la conversió irreversible d'andrògens a estrògens. En aquesta Tesi s'ha treballat amb un substrat marcat amb triti, [1 $\beta$ -3H]androstenediona ( $^3\text{H-AD}$ ) que s'addiciona a les cèl·lules, on l'activitat aromatasas catalitza la seva metabolització a estrona, alliberant aigua tritiada durant la reacció, la qual pot ser posteriorment mesurada (Lephart and Simpson, 1991) (Figura 1.13D).



**Figura 1.13** Reaccions químiques monitoritzades en les cèl·lules per mesurar la citotoxicitat dels xenobòtics A) AlamarBlue, i B) CFDA-AM; C) la generació de ROS i D) l'activitat CYP19. Els productes de reacció mesurats estan pintats; els que emeten fluorescència estan marcats en blau i el producte tritiat està marcat en vermell.

## 1.6.2 Espècies sentinella

Una espècie sentinella o indicadora és un organisme que permet realitzar el seguiment biològic (monitorització) de la qualitat del seu hàbitat. Es tracta

d'espècies considerades sensibles a les pertorbacions ambiental, i per tant, són capaces de donar una senyal d'alarma o resposta primerenca a un perill, com per exemple la presència de contaminants ambientals. Aquests organismes han de complir un seguit de requisits; han de ser espècies comuns a l'àrea de monitorització, que no estiguin en perill d'extinció, fàcils de censar i capturar, de fàcil maneig i que responguin de manera consistent als factors estudiats.

L'ús d'espècies sentinella en estudis de camp permet tenir en compte la influència de múltiples paràmetres presents al medi que intervenen en condicions naturals afectant la toxicitat dels compostos, com factors abiòtics (la temperatura, la salinitat, el pH, o les condicions d'oxigenació), l'alimentació, les interaccions entre espècies, l'heterogeneïtat en la interacció de les poblacions amb els contaminants i possibles interaccions entre contaminants.

# Capítol 2

## TREBALL EXPERIMENTAL I RESULTATS

## 2.1 DISRUPCIÓ LIPÍDICA EN MODELS HUMANS

S'ha investigat la capacitat dels derivats epoxi- del bisfenol A (bisfenol A diglicidil éter (BADGE), bisfenol A (2-3-dihidroxiopropil) glicidil éter (BADGE-H<sub>2</sub>O) i bisfenol A bis(3-cloro-2-hidroxiopropil) éter (BADGE-2HCl)) d'actuar com a disruptors endocrins i alterar el metabolisme dels lípids en cèl·lules de placenta humana JEG-3. Mitjançant la tècnica analítica FIA-ESI(+/-)-HRMS emprant un Orbitap-Exactive com a analitzador, aplicada per primera vegada en aquest tipus d'estudis, s'han identificat 93 espècies lipídiques en només dos minuts de temps d'adquisició, permetent així desenvolupar una metodologia ràpida i robusta que pot ser aplicada per al cribratge de compostos sospitosos d'actuar com a disruptors endocrins i alteradors del metabolisme dels lípids. Els resultats de l'estudi es troben publicats a l'article I sota el títol "*Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells*" (Apartat 2.1.1).

### **2.1.1 Article científico I**

*Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells.*

A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, C. Flores, E. Moyano, C. Porte

*Environmental Pollution* 244 (2019), 513–521





Contents lists available at ScienceDirect

## Environmental Pollution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envpol](http://www.elsevier.com/locate/envpol)

## Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells<sup>☆</sup>



Anna Marquero<sup>a</sup>, Elisabet Pérez-Albaladejo<sup>a</sup>, Cintia Flores<sup>a</sup>, Encarnación Moyano<sup>b</sup>, Cinta Porte<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Environmental Chemistry Department, IDAEA, CSIC, Jordi Girona 18-26, Barcelona, 08034, Spain

<sup>b</sup> Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Av Diagonal 645, Barcelona, 08028, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 June 2018

Received in revised form

8 October 2018

Accepted 9 October 2018

Available online 12 October 2018

## Keywords:

Bisphenol A diglycidyl ether

JEG-3 cells

Cytotoxicity

CYP19

Lipidome

## ABSTRACT

BADGE (bisphenol A diglycidyl ether) is a synthesis product of bisphenol A (BPA), which, like other plasticizers, can cross the human placenta and reach the foetus. However, compared to BPA, there is almost no toxicological information. This work investigates the toxicity, endocrine and lipid disruption potential of BADGE and its hydrolysed and chlorinated derivatives (BADGE·H<sub>2</sub>O and BADGE·2HCl) in human placental JEG-3 cells. The analysis of culture medium by HPLC-ESI(+)-QQQ evidenced a good bioavailability of BADGE·2HCl and BADGE·H<sub>2</sub>O, but low stability of BADGE. Regardless, BADGE·2HCl and BADGE showed higher cytotoxicity than BADGE·H<sub>2</sub>O, which was the only compound that significantly inhibited CYP19 activity (IC<sub>50</sub> 49 ± 5 μM). JEG-3 cells lipidome analyzed by FIA-ESI(+)-Orbitrap was significantly altered by exposure to BADGE·2HCl and BADGE at concentrations at the low μM range. BADGE·2HCl lead to a strong decrease of diacyl- and triacyl-glycerides (DGs,TGs) together with some membrane lipids, while BADGE lead to an accumulation of TGs. The results evidence the ability of BADGE and derivatives to affect placental lipid handling and to modulate placental CYP19 activity (BADGE·H<sub>2</sub>O) and highlights the need to monitor human exposure to these compounds, at least as intensely as BPA is monitored.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) is an epoxy resin produced through the reaction of bisphenol A (BPA) and epichlorohydrin. It has been used in the industry for over 50 years as an internal lacquer to prevent degradation of canned food and beverages, but also in paints and adhesives (Poole et al., 2004). During the manufacturing process, residual BADGE remains unbound to the epoxy-resin and can easily migrate from the container and contaminate food and beverages. BADGE can be easily hydrolysed in contact with aqueous and acidic matrices, leading to the formation of hydrolysed derivatives (BADGE·H<sub>2</sub>O and BADGE·2H<sub>2</sub>O). In addition, the presence of hydrochloric acid in the organosol lacquers (PVC-based) promotes the formation of chlorohydroxy derivatives, namely BADGE·2HCl, BADGE·HCl and BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl (Hammarling et al., 2000).

BADGE migration in canned beverages is rather low in comparison to canned food, due to much milder sterilization conditions. Thus, BADGE·2H<sub>2</sub>O was the only compound detected in soft drinks (5 μg kg<sup>-1</sup>), but the predominant in aqueous matrix food (up to 675 μg kg<sup>-1</sup>), followed by BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl (up to 274 μg kg<sup>-1</sup>) (Gallart-Ayala et al., 2011). BADGE has been detected in oil preserved tuna (24–90 μg kg<sup>-1</sup>), but it was below detection limit in natural tuna cans (Fattore et al., 2015). Generally, human exposure to BADGE and derivatives is almost exclusive from can coatings. Several biomonitoring studies have reported the presence of BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O and BADGE·2H<sub>2</sub>O in urine samples at concentrations up to 18.7 ng mL<sup>-1</sup>, being BADGE·2H<sub>2</sub>O the predominant compound accounting for 45–80% of the total BADGEs concentration (Wang et al., 2012, 2015; Asimakopoulos et al., 2014). Besides, the presence of BADGE·2H<sub>2</sub>O was reported in blood samples at concentrations up to 304 ng mL<sup>-1</sup>, followed by

<sup>☆</sup> This paper has been recommended for acceptance by Charles Wong.

\* Corresponding author.

E-mail address: [cinta.porte@cid.csic.es](mailto:cinta.porte@cid.csic.es) (C. Porte).



BADGE·H<sub>2</sub>O and BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl at a concentrations up to 9.5 and 1.4 ng mL<sup>-1</sup> respectively (Chang et al., 2014; Wang et al., 2015). Interestingly, a positive correlation between concentrations of BPA and BADGE in urine has been reported, which indicates similar sources of human exposure. Moreover, the concentration of BADGE in urine of adults volunteers from United States was 3–4-fold higher than the corresponding concentrations of BPA, indicating the need of BADGEs monitoring in future studies (Wang et al., 2012).

While the toxicity of BPA has been widely studied, current information on toxicological effects of BADGE is still scarce, and most of the studies do not consider BADGE derivatives (Poole et al., 2004). BADGE (200 μM) has been reported to decrease cell proliferation and to induce morphological changes and cell detachment in human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells after 24 h of exposure (Ramilo et al., 2006). BADGE and chlorohydroxy-derivatives triggered proliferation in human breast cancer T47D cells, but no affinity for the estrogen receptor was observed (Nakazawa et al., 2002). Satoh et al. (2004) reported no androgen agonistic activity for BADGE and BADGE·2HCl, although the latter exhibited some androgen antagonist effect. More recently, Kim et al. (2015) observed a positive association between the amount of BADGE in serum (0.44–0.63 ng mL<sup>-1</sup>) and the levels of follicle-stimulating hormone, and an inverse relationship between BADGE·2H<sub>2</sub>O and estradiol, in adult Korean men, suggesting that BADGE was able to act as endocrine disruptor.

Plasticizers, including BPA, can cross human placenta and reach the foetus (Vandenberg et al., 2007; Balakrishnan et al., 2010). Although, there is no information for BADGE and derivatives, BADGE·2H<sub>2</sub>O has been detected in cord blood samples (Chang et al., 2014). The human placental choriocarcinoma JEG-3 cell line is a good model for investigating possible endocrine disruptors, since it expresses the steroidogenic enzymes found in placenta and has a very high aromatase activity, which is a target for endocrine disruptors (Vinggaard et al., 2000; Samson et al., 2009). Placental aromatase, encoded by CYP19, catalyses the aromatization of fetal and maternal androgens into estrogens, which are essential for a healthy pregnancy. Moreover, oxidative stress, a state often induced by exposure to certain pollutants and characterized by an imbalance between pro-oxidant molecules, has been associated to inhibition of placental aromatase, reproductive failure and decreased fertility (Mathieu-Denoncourt et al., 2015; Pérez-Albaladejo et al., 2017).

Additionally, lipid metabolism in placental cells ensures the correct progress of pregnancy, since the placenta plays an active role in the transport of lipids and other nutrients from the mother to the foetus (Delhaes et al., 2018). Lipids play an essential role in the maintenance of cell structure and organization, signalling events and protein regulation and trafficking. Therefore, aberrant lipid metabolism is directly linked to many physiological and pathological conditions and diseases, such as obesity, diabetes, cancer and related metabolic diseases (Wenk, 2005). Chamorro-García et al. (2012) reported that BADGE induced adipogenesis in mouse 3T3-L1 preadipocytes and in human mesenchymal stromal stem cells at low nanomolar concentrations.

Human exposure to BADGE and derivatives is comparable to that of BPA, however, toxicological effects are poorly described. Thus, the aim of this study was the evaluation of the cytotoxicity and ability of BADGE and two of its derivatives, BADGE·H<sub>2</sub>O and BADGE·2HCl to disrupt CYP19 activity, to produce oxidative stress and to disrupt lipid composition in the human placental choriocarcinoma cell line JEG-3. Moreover, concentration of BADGE and its derivatives in culture medium were monitored right after dosing (t<sub>0</sub>) and after 24 h (t<sub>24</sub>) of exposure in order to evaluate their stability over the exposure period, and to improve the sensitivity and accuracy of the in-vitro tests.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

JEG-3 cells (ATCC HTB-36) derived from a human placental carcinoma were cultured in Eagle's MEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5 g L<sup>-1</sup> sodium bicarbonate, 50 U/mL penicillin and 50 μg mL<sup>-1</sup> streptomycin (Gibco, UK) as described in Pérez-Albaladejo et al. (2017). Experiments were carried out on confluent cell monolayers from passages 4 to 23.

### 2.2. Cell viability

Cells were seeded in 96-well plates (2.5 × 10<sup>4</sup> cells per well) and allowed to attach overnight, before the addition of BADGE and its derivatives (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) at concentrations ranging from 5 to 200 μM dissolved in DMSO (0.5% v/v). Cell viability was assessed using the fluorescent dyes Alamar Blue (AB) (Biosource, Solingen, Germany) and 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester (CFDA-AM) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in three different plates (seven replicates per plate) after 24 h exposure (Pérez-Albaladejo et al., 2017). Fluorescence was measured at 530/590 nm for AB, and 485/530 nm for CFDA-AM and cell viability was expressed as a percentage of control cells (0.5% DMSO).

### 2.3. ROS generation

The production of ROS in JEG-3 cells was determined as described in Lebel et al. (1992), with some modifications (Pérez-Albaladejo et al., 2017). Briefly, cells were seeded at 4 × 10<sup>4</sup> cells/well in 96-well plates, allowed to attach overnight and incubated with 20 μM H<sub>2</sub>DCF-DA (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in 1:10 DPBS and 10 mM glucose for 30 min, washed and exposed to BADGE and derivatives for 1 h. 3-Morpholinisodionimine (SIN-1; 5 μM) (Sigma Aldrich) was used as a positive control. The fluorescence of oxidized DCF was measured at 485/528 nm, and results were expressed as percentage of fluorescence in control wells.

### 2.4. CYP19 activity

CYP19 activity was determined by measuring the amount of <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O formed during the aromatization of 1β-<sup>3</sup>H-androst-4-ene-3,17-dione (<sup>3</sup>H-AD) (PerkinElmer, USA) (Pérez-Albaladejo et al., 2017). Cells were seed in a 24-well plate (10<sup>5</sup> cells/well). After 24 h exposure, cells were rinsed with PBS and incubated for 30 min with 40 nM <sup>3</sup>H-AD in DPBS-glucose. <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O was determined in an aliquot of the culture medium previously extracted with dichloromethane (Tri-Carb 2100TR, Packard). Cell proteins were determined with fluorescamine using bovine serum albumin (BSA) as standard (Lorenzen and Kennedy (1993). CYP19 activity was expressed in fmol/min/mg protein or as percentage of activity respect to control cells.

### 2.5. Analysis of BADGEs in culture medium

JEG-3 cells seeded in 96-well plates were exposed to BADGE and derivatives at concentrations of 10, 20, 50 and 100 μM dissolved in culture medium (0.5% DMSO). An aliquot of the culture medium (90 μL) was analyzed after dosing (t<sub>0</sub>) and 24 h after (t<sub>24</sub>). Each sample consisted in a pool of three wells, and three samples (different plates and passages) were analyzed per time and dose. Samples were extracted with ethyl acetate (x3), evaporated to dryness, and reconstituted in 500 μL of MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (Merck,

Darmstadt, Germany). All extractions were performed right before instrumental analysis to reduce sample degradation.

The chromatographic system consisted of an Accela 1250 Pump and a self-injection system supplied by AS Accela Open House commercial Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA) and a Hypersil Gold C18 column (50 × 2.1 mm; 3 μm) (Thermo Fisher Scientific). The mobile phase was (A) 25 mM formic acid: ammonium formate (1:1) and (B) methanol at a flow rate of 300 μL min<sup>-1</sup>, at a column temperature of 25 °C. Gradient elution started at 50% of B (1 min), followed by a lineal gradient up to 75% B in 2.5 min which was kept for 5.5 min, and a second gradient up to 100% B in 1 min, before going back to the initial conditions. The injection volume was 10 μL. The analysis was carried out in a triple quadrupole mass analyzer (TSQ Quantum Ultra AM, Thermo Fisher Scientific) using electrospray in positive mode (+ESI) as ionization source. The ammonium adducts [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> generated in the ionization source were used as precursor ions in tandem mass spectrometry and acquisition was performed in SRM (selected reaction monitoring) mode, using two transitions (precursor to product ion) for each compound, one for quantitative analysis and the other for confirmatory purposes. Elution time, collision energy, MS/MS transitions, tube lens, as well as limits of detection of the method and limits of quantification are shown in Table S1 (supplementary information). Standard curves of BADGE, BADGE·2H<sub>2</sub>O, BADGE·E·H<sub>2</sub>O, BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl, BADGE·HCl and, BADGE·2HCl prepared in sample matrix were used to quantify the concentrations of the compound in culture medium.

## 2.6. Analysis of cellular lipids

JEG-3 cells seeded in 24-well plates (2.5·10<sup>4</sup> cells/well) were allowed to attach overnight before exposure to BADGE and derivatives at concentrations below the EC<sub>10</sub> and close to the EC<sub>50</sub> value for cytotoxicity, namely, 20–40 μM for BADGE and BADGE·2HCl and 40–80 μM for BADGE·H<sub>2</sub>O. After 24 h of exposure, the culture medium was removed, cells were rinsed with PBS, trypsinized, centrifuged (6000-g, 10 min), and the cell pellets stored at -80 °C under argon atmosphere until extraction. The experiment was carried out in quadruplicate using cells from different passages.

Lipids were extracted three times with ethyl acetate in an ultrasonic bath for 2 min. The extracts were evaporated to dryness and stored at -20 °C under argon atmosphere. FIA-Orbitrap-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) was used to analyse the samples as described in Vichi et al. (2012), with some modifications. Samples were reconstituted in methanol and 5 μL injected to a continuous flow rate set at 50 μL min<sup>-1</sup>. The mobile phase was methanol:dichloromethane 80:20 (Merck, Darmstadt, Germany). Mass spectra were alternately acquired in full scan positive and negative ionization modes in an only run. The instrument was daily calibrated in both ionization modes. Capillary and heater temperatures were set at 400 and 30 °C, respectively. A mass range of m/z 200–2000 was selected, and the total analysis time was 2 min. Mass accuracy in all mass range (m/z 200–2000) was <5 ppm. So a maximum of ±5 ppm extraction window was allowed for peak identification.

Identification of the lipids was performed by matching their molecular formulae, experimental mass and isotopic profile with the theoretical one generated by Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Heuristic criteria based on accuracy in mass measurement (error < 5 ppm), the number of ring plus double bond equivalents (RDBE), the charge, the adducts formed ([M+Na]<sup>+</sup> and [M-H]<sup>-</sup> in positive and negative ionization mode, respectively) and the elements in use were applied. Lipid quantification was performed through comparison of ion peak intensities to that of representative internal standards (200 pmol) of

each lipid family: 1,2,3–17:0 triacylglycerol, 1,3-17:0D5 diacylglycerol, 16:0D31–18:1 phosphatidylcholine, 16:0D31–18:1 phosphatidylethanolamine, 16:0D31–18:1 phosphatidylserine, 16:0D31–18:1 phosphatidylinositol (Avanti Polar Lipids, USA). Repeatability expressed as intra-day relative standard deviation (RSD) was calculated for all lipid standards relative intensity in the samples. RSD values were lower than 30% in all cases (triacylglyceride (TG): 26%, diacylglyceride (DG): 23%, phosphatidylcholine (PC): 17%, phosphatidylethanolamine (PE): 15%, phosphatidylinositol (PI): 18%, phosphatidylserine (PS): 13%).

## 2.7. Statistical analysis

Dose-response curves and concentrations which caused a 50% decline of cell viability (EC<sub>50</sub>) and inhibition of enzymatic activity (IC<sub>50</sub>) were calculated by using Sigmaplot 11.0 software. One-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test were used to detect significant differences from control in ROS assays (SPSS 15.0 software package, Chicago, IL). Level of significance was set at *p* < 0.05. For the analysis of lipids, multivariate an univariate analysis were carried out using the online software Metaboanalyst 3.5 (Xia and Wishart, 2016). Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) was applied to identify discriminant lipids in control and exposed groups, and VIP (variable importance in the projection) values higher than 1 were selected. Volcano plots were applied to visualize the significance and the magnitude of the changes detected in the cell lipidome (fold change ≥ 1.5; *p* < 0.05, Student *t*-test).

## 3. Results

### 3.1. Cytotoxicity and ROS generation

BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O and BADGE·2HCl showed significant cytotoxicity in JEG-3 cells after 24 h exposure. Dose-response curves and the concentrations leading to 50% decline in cell viability (EC<sub>50</sub>) are shown in Fig. 1 and Table 1, respectively. BADGE·2HCl and BADGE were the most cytotoxic compounds, with EC<sub>50</sub> in the range of 32–43 μM, whilst BADGE·H<sub>2</sub>O was less cytotoxic (81–101 μM).

BADGE and BADGE·H<sub>2</sub>O weakly induced ROS generation at a nominal concentration of 100 μM (below 1.4-fold), while BADGE·2HCl did not have a significant effect (Fig. 2). 3-Morpholinopyridone (5 μM; SIN-1), which was used as a positive control, lead to 10-fold increase of ROS production after 60 min exposure.

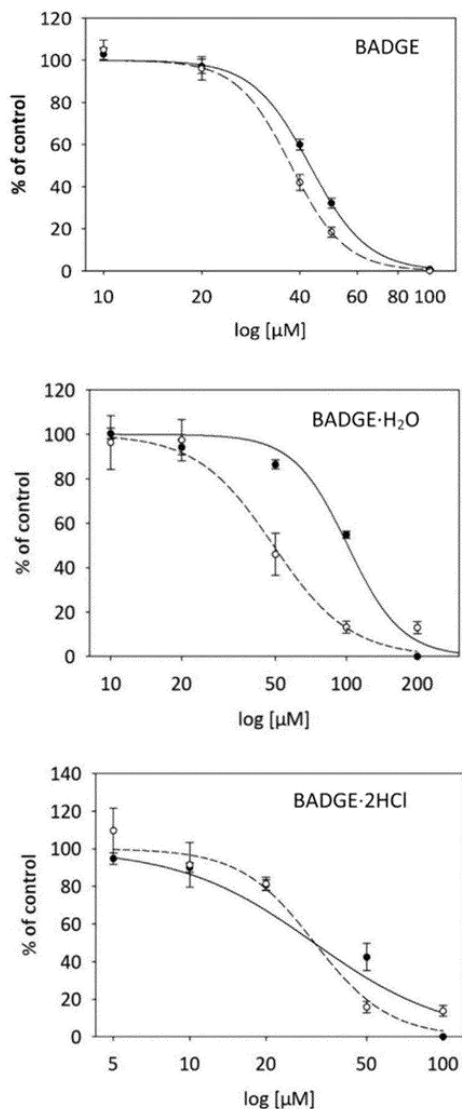
### 3.2. CYP19 activity

Human placental JEG-3 cells exposed to BADGE, BADGE·2HCl and BADGE·H<sub>2</sub>O at the concentration range of 10–200 μM for 24 h showed a dose-dependent decrease of CYP19 activity. The inhibitory effect was similar for the three compounds, with IC<sub>50</sub> of 31–49 μM (Table 1). For BADGE and BADGE·2HCl, dose response curves of cytotoxicity and inhibition of CYP19 activity were closely related, and the inhibition of placental CYP19 was mostly attributed to cytotoxicity (Fig. 1, Table 1).

### 3.3. Analysis of BADGE and derivatives in culture medium

Experimental concentrations of BADGE and derivatives detected in culture medium right after dosing (t<sub>0</sub>) and after 24 h (t<sub>24</sub>) of exposure are shown in Fig. 3. Blank samples, which consisted on medium taken from solvent control cells (0.5% DMSO), were analyzed; the concentration of the analytes was below LOQ (limit of





**Fig. 1.** Dose-response curves of cytotoxicity (solid line) and CYP19 activity (dotted line) in JEG-3 cells exposed to BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O and, BADGE·2HCl for 24 h. Results are expressed as percentage of activity in control cells (mean  $\pm$  SEM of at least three different assays). Specific activity of CYP19 in control cells was  $137 \pm 24$  fmol/min/mg of protein.

**Table 1**

Concentrations which caused 50% cytotoxicity (EC<sub>50</sub>) and 50% inhibition of CYP19 activity (IC<sub>50</sub>) in JEG-3 cells exposed to BADGE and its derivatives for 24 h. AB and CFDA-AM are the toxicity probes used. Results are expressed in  $\mu$ M as mean  $\pm$  SEM of at least 3 assays.

Compound	Cytotoxicity		CYP19
	AB	CFDA-AM	
BADGE	$43 \pm 2$	$38 \pm 3$	$39 \pm 6$
BADGE·H <sub>2</sub> O	$101 \pm 6$	$81 \pm 6$	$49 \pm 5$
BADGE·2HCl	$32 \pm 6$	$39 \pm 5$	$31 \pm 4$

quantification). Experimental concentration of BADGE right after dosing ( $t_0$ ) was  $64 \pm 3\%$  of nominal concentration, but it drastically decreased to  $\sim 5\%$  after 24 h ( $t_{24}$ ), when a mixture of hydrolysed and chlorinated derivatives (BADGE·2H<sub>2</sub>O, BADGE·H<sub>2</sub>O, BADGE·E·H<sub>2</sub>O·HCl, BADGE·HCl and BADGE·2HCl) was detected at concentrations of 0.2–3.5  $\mu$ M (Fig. 3A). The presence of chloride salts in the culture medium may have promoted the chlorination of BADGE. Similarly, the experimental concentration of BADGE·H<sub>2</sub>O right after dosing was very close to nominal concentration ( $92 \pm 7\%$ ), but drastically decreased to  $16 \pm 2\%$  after 24 h. At  $t_{24}$ , the hydrolysis and chlorination of the epoxy group of BADGE·H<sub>2</sub>O occurred and a significant amount of BADGE·2H<sub>2</sub>O and BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl ( $29 \pm 3$   $\mu$ M and  $21 \pm 2$   $\mu$ M, respectively) was detected in culture medium of cells exposed to 100  $\mu$ M BADGE·H<sub>2</sub>O (Fig. 3B). In contrast, BADGE·2HCl remained stable in culture medium (70% of nominal concentration, both at  $t_0$  and  $t_{24}$ ), although small amounts of BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl and BADGE·HCl (1.41–2.98  $\mu$ M) were detected after 24 h of exposure (Fig. 3C).

### 3.4. Analysis of cellular lipids

The flow injection analysis of lipid extracts allowed the identification of 73 different lipids in JEG-3 cells, including 18 PCs, 19 plasmalyl/plasmalogen phosphatidylcholines (PC-O/PC-Ps), 10 TGs and 9 DGs in positive ionization mode (ESI<sup>+</sup>) and 11 PEs, 2 PSs and 4 PIs in negative ionization mode (ESI<sup>-</sup>). PCs represented 59% of the total lipids, being the most abundant class, followed by PC-O/PC-Ps (18%) and TGs (12%) (for details on the lipid species analyzed see Table S2, Supplementary Information). In addition, 12 fatty acids (FA 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 22:0, 24:0) were identified.

PLS-DA scores plot revealed differences between the lipidic patterns of control cells and those exposed to non-toxic concentrations of the compounds ( $< EC_{10}$ ). 20  $\mu$ M BADGE (48.3% of the covariance explained with two components;  $R^2 = 0.901$ ;  $Q^2 = 0.625$ ) and 40  $\mu$ M BADGE·H<sub>2</sub>O (48.7% of the covariance explained;  $R^2 = 0.938$ ;  $Q^2 = 0.744$ ); 28 and 29 VIPs  $> 1.0$  were generated. After exposure to BADGE, mainly membrane lipids (PCs, PC-O/PC-Ps) and DGs were down-regulated, while TGs (48:2, 50:2) were up-regulated. A higher predictive power was obtained for the BADGE·2HCl model ( $R^2 = 0.987$ ;  $Q^2 = 0.914$ ), with 41 VIPs ( $> 1.0$ ) generated (Fig. 4). The lipidome of cells exposed to 20  $\mu$ M BADGE·2HCl was characterized by a general decrease of both, membrane lipids, mostly PCs (32:0, 36:2-3, 38:2-5, 40:4-7), several PC-O/PC-Ps, PSs (34:1, 36:2), and neutral lipids, such as TGs (48:1-2, 50:0-1-2, 52:2-3-4, 54:3-4) and DGs (32:0-1, 34:1-2-3, 36:1-2-3); whereas PC 36:5 and 38:5 were slightly accumulated (Fig. 4C).

Volcano plots (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) were applied to highlight those lipids species that were significantly altered in JEG-3 cells as a consequence of exposure to BADGE and derivatives and to visualize the magnitude of the change (Fig. 5). The univariate analysis evidenced a significant decrease of PCs (38:2-3, 40:7) in cells exposed to 20  $\mu$ M BADGE in comparison to control cells, while a higher effect was evidenced in cells exposed to 40  $\mu$ M BADGE, a concentration close to its EC<sub>50</sub>: decrease of some PCs (38:3-4) and DGs (34:1, 34:3, 36:2) and accumulation of TGs (48:2, 50:2). In contrast, no significant changes were detected in cells exposed to 40  $\mu$ M BADGE·H<sub>2</sub>O, while those exposed to a concentration close to the EC<sub>50</sub> of the compound (80  $\mu$ M) were characterized by a depletion of DGs (1.5 to 3-fold change), PC 32:0, and some PC-Os, while TG 48:2 (1.5 fold) and some PEs (3–4 fold change) were increased. A large number of lipids were significantly depleted after exposure to 20–40  $\mu$ M BADGE·2HCl, including TGs (2–9 fold), DGs (2–4 fold), PC-O/PC-Ps (2–4 fold), PCs and PSs (1.5–2 fold).

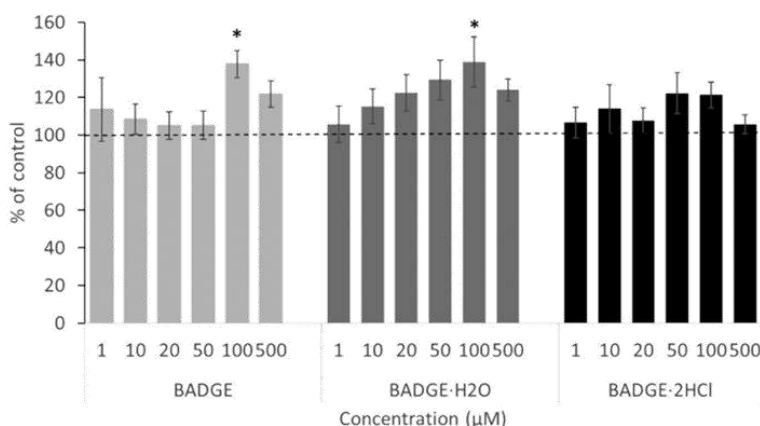


Fig. 2. ROS production in JEG-3 cells after 60 min of exposure to BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O and BADGE·2HCl. Values are expressed as percentage of control cells as mean ± SEM of at least six different plates assayed. Black line is control value (100%). \*Statistically significant differences from control ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

This study highlights the higher cytotoxicity of BADGE and BADGE·2HCl ( $EC_{50}$ : 30–40 μM) in comparison to BADGE·H<sub>2</sub>O ( $EC_{50}$ : 100 μM) in JEG-3 cells. Epoxy groups are particularly reactive with cellular macromolecules; therefore, the compounds with epoxy groups (BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O) were expected to be more toxic (Suárez et al., 2000). However, BADGE·2HCl (no epoxy groups) showed a toxicity comparable to BADGE in placental cells, probably due to the higher stability of the compound in culture medium and its higher availability to the cells. In fact, one important limitation of in vitro studies is the often poor bioavailability of the compounds in culture medium, due to low aqueous solubility, low stability or volatility (Pérez-Albaladejo et al., 2017). The analysis of free concentrations of BADGEs in culture medium evidenced significant discrepancies between the theoretical/nominal concentrations and the experimental ones, with the exception of BADGE·2HCl, for which the experimental and nominal concentrations were fairly close (~70%). When cells were exposed to BADGE·H<sub>2</sub>O, a mixture of BADGE·H<sub>2</sub>O, BADGE·2H<sub>2</sub>O and BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl was detected in culture medium after 24 h. Consequently, the toxicity of BADGE·H<sub>2</sub>O cannot be directly associated to the compound itself, but to the mixture of derivatives that together reached a concentration of ~65% of the nominal one. By contrast, BADGE showed the lowest stability in the culture medium, since many different hydrolysed and chlorinated derivatives were detected after 24 h exposure, but the sum of all them only reached ~13% of the nominal concentration. Thus, the hydrolysis and chlorination of epoxy groups of BADGE and BADGE·H<sub>2</sub>O is favoured in aqueous medium. Additionally, the reaction of the compounds with other components (e.g. glucose, amino acids and proteins) or even its metabolism by placenta cells, can also occur (Bentley et al., 1988; Petersen et al., 2008; Coulier et al., 2010).

Therefore, the toxicological effects detected for BADGE and BADGE·H<sub>2</sub>O should be attributed to the mixture of compounds present in culture medium instead of the concentration of the parental compound. In addition,  $EC_{50}$  values based on nominal concentrations underestimate the toxicity of these compounds. When the experimental concentrations were used to calculate the cytotoxicity, BADGE was the most toxic compound ( $EC_{50}$ : ~25-fold lower than the nominal one, considering the sum of derivatives) followed by BADGE·2HCl ( $EC_{50}$ :  $26 \pm 3$  (Alamar Blue);  $22 \pm 5$  μM

(CFDA-AM)) and BADGE·H<sub>2</sub>O ( $EC_{50}$ : ~1.5-fold lower than the nominal one considering the sum of derivatives). Similarly, recalculated  $IC_{50}$  for CYP19 inhibition for BADGE·H<sub>2</sub>O based on experimental concentrations decreased to  $-18 \pm 1$  μM.

Consequently, taking into account the experimental concentrations of the compounds instead of the nominal ones, BADGE and derivatives showed a much higher cytotoxicity and a greater ability to inhibit CYP19 activity (BADGE·H<sub>2</sub>O) in JEG-3 cells than the precursor BPA ( $EC_{50}$ : 138–218 μM;  $IC_{50}$ :  $71 \pm 7$  Pérez-Albaladejo et al., 2017).

In addition to the endocrine function, placental cells play a key role in lipid metabolism and transfer of lipids, which is essential for a healthy pregnancy and for foetal growth (Herrera et al., 2006). Dysregulation of lipid metabolism in the placenta of pregnant women has been associated to different diseases and pathologies, such as preeclampsia and recurrent miscarriages (Baig et al., 2013). Therefore, this work explores the use of JEG-3 cells as a tool for the detection of contaminants that can interfere with lipid metabolism and alter the cell lipidome, giving rise to specific lipidic fingerprints, which may eventually be associated with pathologies. The analysis of the lipid extracts by FIA-Orbitrap allowed the identification of 85 lipid species and obtaining a fingerprint of JEG-3 cell lipids in only 2 min acquisition time. Although human placental lipidome has been previously investigated (Dunn et al., 2012; Brown et al., 2016), to the best of our knowledge, this is the first study showing alterations in placenta cell lipids after exposure to BADGE derivatives. BADGE·2HCl was the most active compound, at a concentration of 20 μM caused a significant reduction of DGs (1.5–4-fold), and PC-O/PC-P (1.5-fold), PC 32:0, but particularly TGs with a relatively low number of carbons and double bonds (TG 48:1, 50:0, 50:1, 52:2, 52:3, 54:3, 54:4) that decreased up to 10-fold, without any significant alteration of cell viability (~90% of control cells). Placental TGs are considered FA depots that act as intermediate pools in the transfer of FA across the placenta from mother to foetus (Lewis and Desoye, 2017). Thereby, a depletion of TG depots can have harmful consequences during pregnancy. Increased hydrolysis of TGs in cells exposed to BADGE·2HCl can be anticipated; however, the intracellular increase in FA seems too small to support the hypothesis (see supplementary info; Fig. S1). Other mechanisms, such as increased lipoprotein formation and transfer of TGs to the developing foetus, should be further investigated.

In contrast, exposure to 20–40 μM BADGE lead to a significant

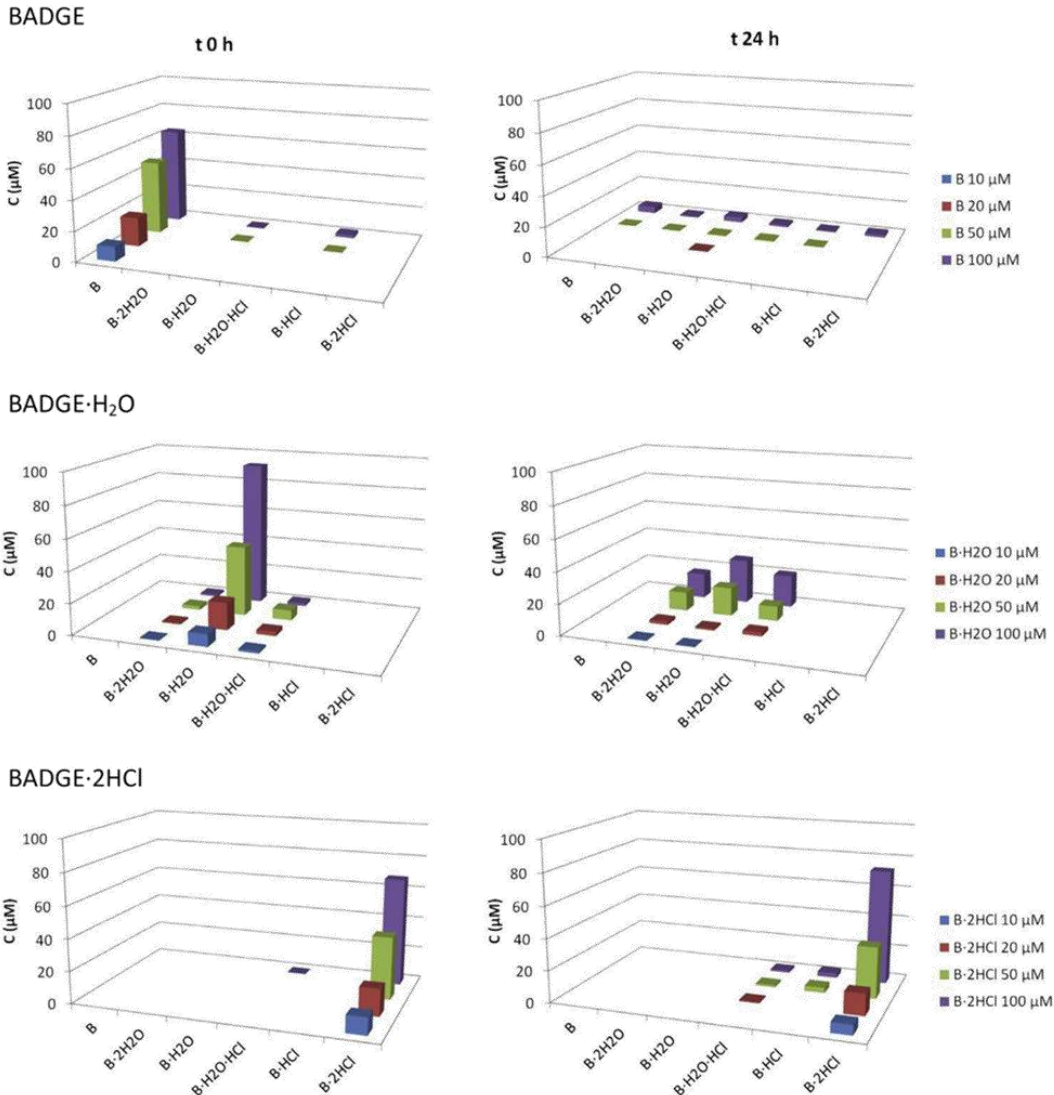


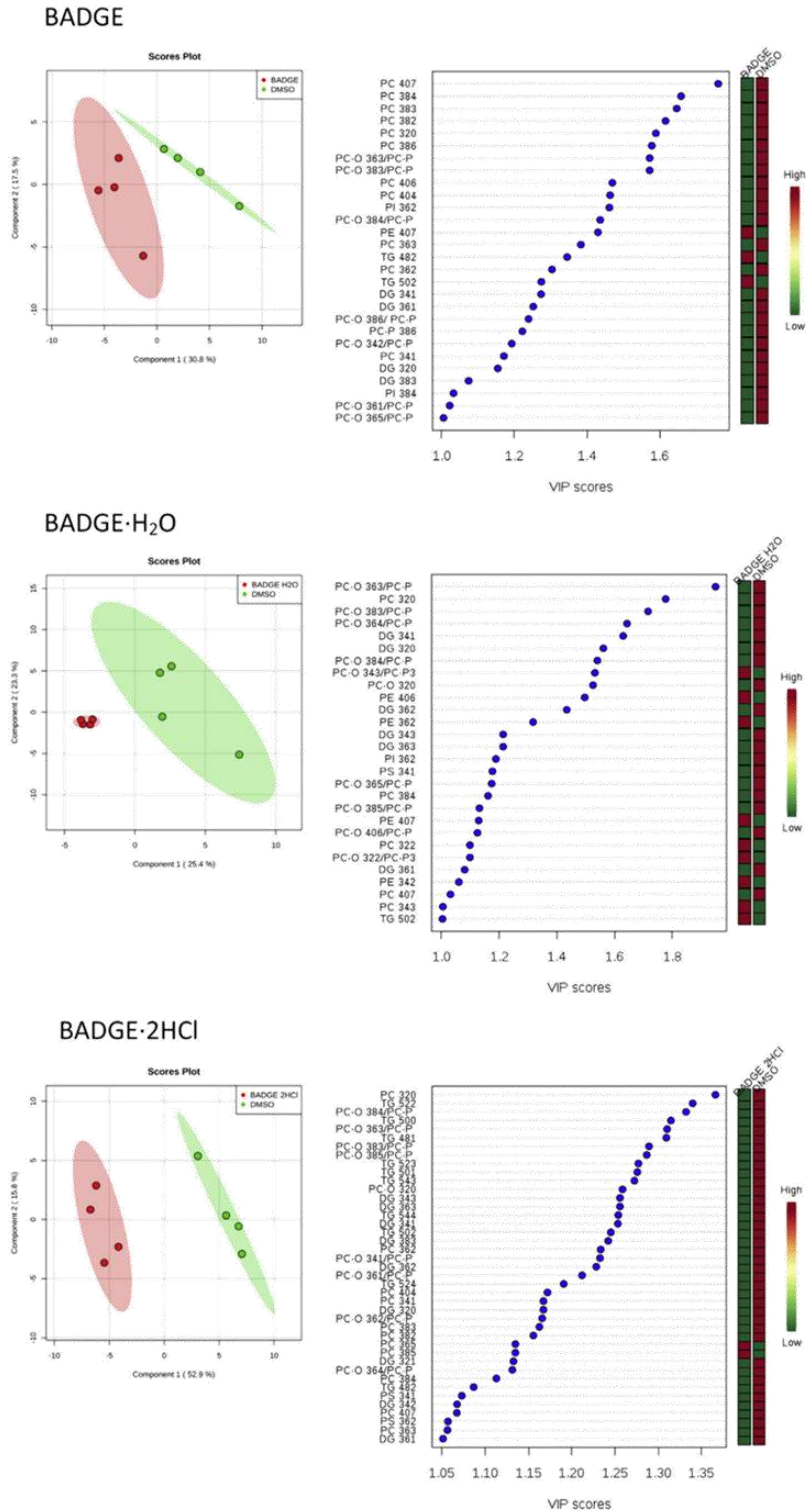
Fig. 3. Concentrations of BADGE and derivatives detected in culture medium right after dosing ( $t_0$ ) and 24 h ( $t_{24}$ ) after exposure to BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O and, BADGE·2HCl. Concentrations are expressed in  $\mu\text{M}$ , as mean of three replicates.

decrease of some long chain unsaturated PC 38:2, 38:3, 40:7, together with an accumulation of TG 48:2, 50:2 (1.5-fold change;  $p < 0.05$ ) and a depletion of DGs (34:1, 34:3, 36:2). Likewise, Chamorro-García et al. (2012) reported the ability of BADGE at nanomolar concentrations to induce adipogenesis in both, multipotent mesenchymal stromal stem cells MSCs and 3T3-L1 preadipocytes, after 14 days of exposure. Elevated placental triglyceride storage has been reported in maternal diabetes and obesity, but also in placentas with preeclampsia (Brown et al., 2016). It is important to stress that the observed lipidic changes occurred at experimental concentrations of BADGE well below 1  $\mu\text{M}$ , and they are likely to affect placental nutrient handling and ultimately, induce pro-adipogenic changes in the foetus (Lewis and Desoye, 2017).

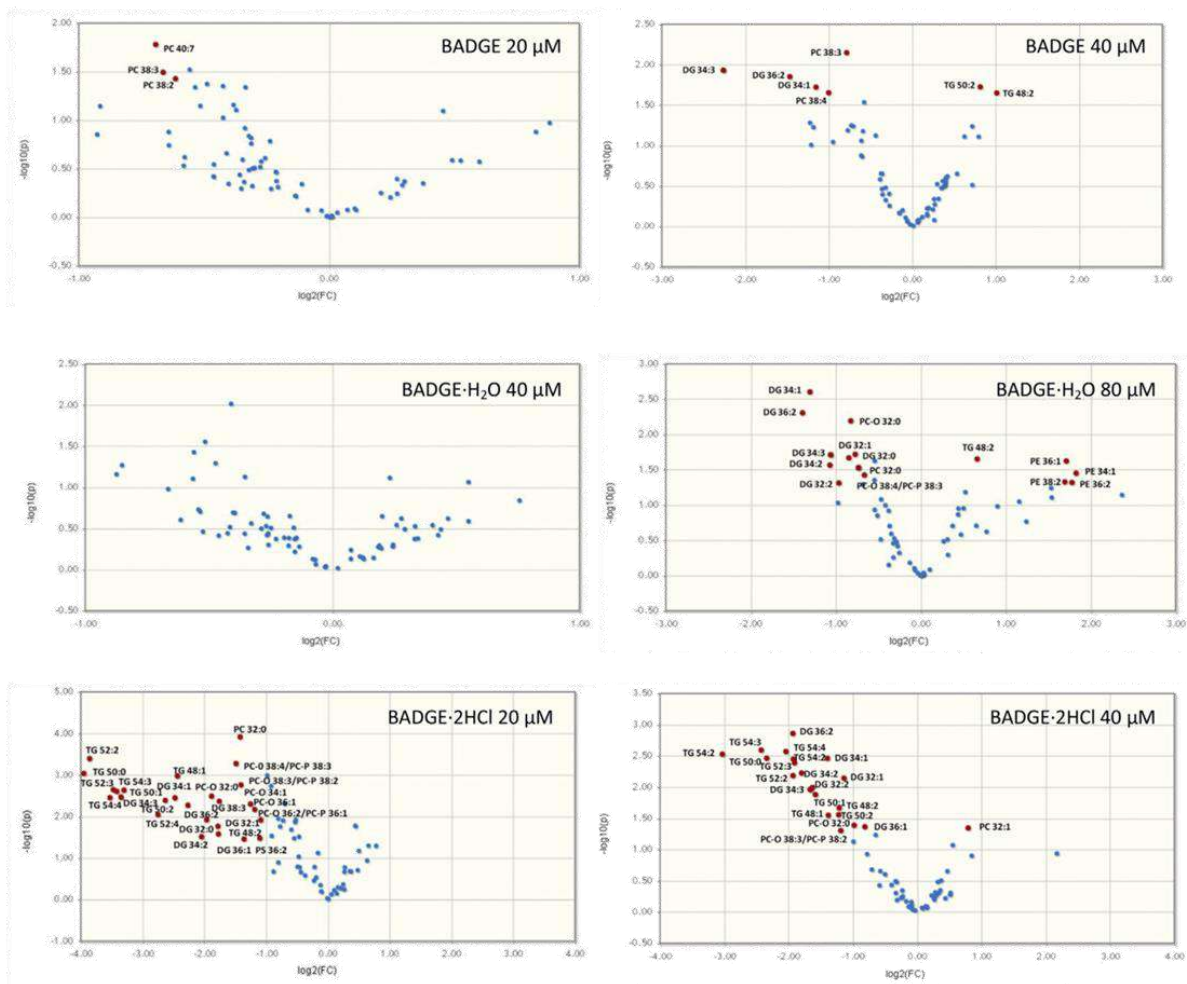
Comparatively, BADGE·H<sub>2</sub>O was the less effective compound in

terms of inducing alterations of intracellular lipids. A depletion of DGs (1.5 to 3 fold change), PC-O 32:0, PC-O 38:4/PC-P 38:3 and PC 32:0 (1.5 fold) was observed, while TG 48:2 (1.5 fold) and some PEs (3–4 fold) increased. The alterations were observed at a nominal concentration of 80  $\mu\text{M}$  (~50  $\mu\text{M}$  experimental concentration, as sum of hydrolysed derivatives) that corresponded to the EC<sub>50</sub> for cytotoxicity. The strong increase of PEs (inner membrane lipids) and consequently, the altered ratio PCs/PEs (1.5-fold decrease) is an indication of altered membrane functionality (Li et al., 2006). PEs can be directly synthesized from DGs through the action of the enzyme CEPT1 (choline/ethanolamine phosphotransferase) that catalyses the incorporation of an activated alcohol to DGs (Carrasco and Mérida, 2007) and this was supported by the observed decrease in DGs (34:1, 36:2), and the concomitant increase in the same PEs (Fig. 5).





**Fig. 4.** PLS-DA score plot and Heatmap generated from VIP >1.0 show differences in the lipidome of control cells and cells exposed to concentrations of BADGE (20 μM), BADGE-H<sub>2</sub>O (40 μM) and, BADGE-2HCl (20 μM) below the EC<sub>10</sub> for cytotoxicity. VIP scores plot: red (up regulation), green (down regulation). Lipid species are annotated as lipid class followed by 3 digits that indicate the number of carbons (2 digits) and number of double bonds (1 digit). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Fig. 5.** Differences in the lipid profile of exposed vs. control cells evidenced with the volcano plots. Significantly altered lipids (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) are coloured in red. Left panels show exposure concentrations below the  $EC_{10}$ ; right panel correspond to concentrations close to the  $EC_{50}$  value for cytotoxicity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Additionally, PC-O/PC-Ps were among the down-regulated VIPs detected after exposure of JEG-3 cells to BADGE, BADGE-H<sub>2</sub>O and BADGE-2HCl. The decrease was quantitatively significant after exposure to BADGE-2HCl. Among other functions, PC-Ps act as endogenous antioxidants, protecting other lipids from oxidative stress because the vinyl ether bond is preferably oxidized, while protecting from oxidation the polyunsaturated fatty acids present in the sn-2 position (da Silva et al., 2012; Braverman and Moser, 2012). However, accurate mass measurements did not allow discerning PC-Ps from isobaric alkyl ether lipids (PC-Os), both ether-lipids whose involvement in different human diseases has recently been described. Thus, a lipidomic study on breast cancer patients identified increased PC-Os as a diagnostic marker for breast cancer (Chen et al., 2016). Also, altered PC-P levels are often reported in cancer patients, although the mechanisms that lead to these changes are not yet understood (Messias et al., 2018).

Apart from the ability of BADGE and derivatives to disrupt placenta cells lipidome, this work evidences the comparatively higher toxicity and endocrine disruption potential of these

chemicals in comparison to BPA ( $EC_{50}$ : 138–218  $\mu\text{M}$   $IC_{50}$ :  $71 \pm 7 \mu\text{M}$ ; Pérez-Albaladejo et al., 2017). During the last years, the hazardous effects of BPA in human health have been deeply investigated. Consequently, EFSA fixed a tolerable daily intake (TDI) of  $4 \text{ mg kg}^{-1}$  of body weight per day and specific migration limits (SML) of  $0.6 \text{ mg kg}^{-1}$  of food (EFSA supporting publication 2015:EN-740). Moreover, due to the potential toxicity of BADGE and its derivatives, the European Commission has established a TDI of  $150 \mu\text{g kg}^{-1}$  of body weight per day and a SML of  $9 \text{ mg kg}^{-1}$  of food for the sum of BADGE and its hydrolysed derivatives (BADGE-H<sub>2</sub>O, BADGE-HCl), whereas for the sum of the chlorinated derivatives (BADGE-HCl, BADGE-2HCl, BADGE-HCl-H<sub>2</sub>O) a SML of  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  has been established (EC regulation No. 1895/2005). This limits are lower ( $\sim 0.5$ – $2.5 \mu\text{M}$ ) than the  $EC_{50}/IC_{50}$  found in this study based on nominal concentrations of the compounds in culture medium ( $32$ – $100 \mu\text{M}$ ). However, when experimental concentrations are taken into account ( $EC_{50}$  for BADGE:  $\sim 1.7 \mu\text{M}$ ) some concern is raised. Moreover, considering that the concentrations of BADGEs reported in urine, plasma and adipose tissue (up to  $1500 \text{ ng}$



$\text{mL}^{-1}$ ,  $65 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $45 \text{ ng g}^{-1}$  respectively) are in the range or even higher than those reported for BPA ( $40 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $20 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Wang et al., 2015; Xue et al., 2015), and taking into account the higher toxicity of BADGE and derivatives in comparison to BPA, the present study evidences the need to review TDI and SML limits for BADGE and its derivatives and to monitor human exposure to these compounds, at least as intensely as BPA is monitored.

## Acknowledgements

Anna Marquero acknowledges a pre-doctoral fellowship BES-2015-074842. Work financed by Ministerio de Ciencia e Innovación, under the project ref. CGL2014-52144-P.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.045>.

## References

- Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S., Kannan, K., 2014. Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1243–1249.
- Baig, S., Lim, J.Y., Fernandis, A.Z., Wenk, M.R., Kale, A., Su, L.L., Biswas, A., Vasoo, S., Shui, G., Choolani, M., 2013. Lipidomic analysis of human placental Syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. *Placenta* 34, 436–442.
- Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E.B., Ponnampalam, A.P., Mitchell, M.D., 2010. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202 <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.025>, 393.e1-7.
- Bentley, P., Bieri, F., Kuster, H., Muakkassah-Kelly, S., Sagelsdorff, P., Stäubli, W., Waechter, F., 1988. Hydrolysis of bisphenol A diglycidylether by epoxide hydrolases in cytosolic and microsomal fractions of mouse liver and skin: inhibition by bis epoxycyclopentylether and the effects upon the covalent binding to mouse skin DNA. *Carcinogenesis* 10, 321–327.
- Braverman, N.E., Moser, A.B., 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1442–1452.
- Brown, S.H.J., Eather, S.R., Freeman, D.J., Meyer, B.J., Mitchell, W., 2016. A lipidomic analysis of placenta in preeclampsia: evidence for lipid storage. *PLoS One* 9, 1–13.
- Carrasco, S., Mérida, I., 2007. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* 32, 27–36.
- Chamorro-García, R., Kirchner, S., Li, X., Janesick, A.C., Casey, S., Chow, C., Blumberg, B., 2012. Bisphenol A diglycidyl ether induces adipogenic differentiation of multipotent stromal stem cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism. *Environ. Health Perspect.* 120, 984–989.
- Chang, Y., Nguyen, C., Paranjpe, V.R., Gilliland, F., Zhang, J.J., 2014. Analysis of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its hydrolytic metabolites in biological specimens by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 965B, 33–38.
- Chen, X., Chen, H., Dai, M., Ai, J., Li, Y., Mahon, B., Dai, S., Deng, Y., 2016. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget* 7, 36622–36631.
- Coulter, L., Bradley, E.L., Bas, R.C., Verhoeckx, K.C.M., Driffield, M., Harner, N., Castle, L., 2010. Analysis of reaction products of food contaminants and ingredients: bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) in canned foods. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4873–4882.
- Delhaes, F., Giza, S.A., Koreman, T., Eastabrook, G., McKenzie, C.A., Bedell, S., Regnault, T.R.H., de Vrijer, B., 2018. Altered maternal and placental lipid metabolism and fetal fat development in obesity: current knowledge and advances in non-invasive assessment. *Placenta* 69, 118–124.
- da Silva, T.F., Sousa, V.F., Malheiro, A.R., Brites, P., 2012. The importance of ether-phospholipids: a view from the perspective of mouse models. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1501–1508.
- Dunn, W.B., Brown, M., Worton, S.A., Davies, K., Jones, R.L., Kell, D.B., Heazell, A.E.P., 2012. The metabolome of human placental tissue: investigation of first trimester tissue and changes related to preeclampsia in late pregnancy. *Metabolomics* 8, 579–597.
- EFSA, 2015. Report on the Two-phase Public Consultation on the Draft EFSA Scientific Opinion on Bisphenol A. EFSA supporting publication 2015:EN-740. [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/740e](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/740e). (Accessed 26 February 2018). EC regulation No. 1895/2005.
- Fattore, M., Russo, G., Barbato, F., Grumetto, L., Albrizio, S., 2015. Monitoring of bisphenols in canned tuna from Italian markets. *Food Chem. Toxicol.* 83, 68–75.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., 2011. Fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A-diglycidyl ether, bisphenol F-diglycidyl ether and their derivatives in canned food and beverages. *J. Chromatogr.* 1218A, 1603–1610.
- Hammarling, L., Gustavsson, H., Svensson, K., Oskarsson, A., 2000. Migration of bisphenol-A diglycidyl ether (BADGE) and its reaction products in canned foods. *Food Addit. Contam.* 17, 937–943.
- Herrera, E., Amusquivar, E., López-Soldado, I., Ortega, H., 2006. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm. Res.* 65, 59–64.
- Kim, S., Yang, Y., Hong, Y., Myung, S., Kim, S., 2015. Distribution of serum bisphenol A diglycidyl ether and its metabolite in Korean adult men and its association with reproductive hormone levels. *Mol. Cell. Toxicol.* 11, 71–78.
- Lebel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231.
- Lewis, R.M., Desoye, G., 2017. Placental lipid and fatty acid transfer in maternal overnutrition. *Ann. Nutr. Metab.* 70, 228–231.
- Li, Z., Agellon, L.B., Allen, T.M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., Vance, D.E., 2006. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabol.* 3, 321–331.
- Lorenzen, A., Kennedy, S.W., 1993. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* 214, 346–348.
- Mathieu-Denoncourt, J., Wallace, S.J., Solla, S.R., De, Langlois, V.S., 2015. Plasticizer endocrine disruption: highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 219, 74–88.
- Messias, M.C.F., Mecatti, G.C., Priolli, D.G., Carvalho, P.O., 2018. Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Lipids Health Dis.* 17, 41.
- Nakazawa, H., Yamaguchi, A., Inoue, K., Yamazaki, T., Kato, K., Yoshimura, Y., Makino, T., 2002. In vitro assay of hydrolysis and chlorohydroxy derivatives of bisphenol A diglycidyl ether for estrogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1827–1832.
- Pérez-Albaladejo, E., Fernandes, D., Lacorte, S., Porte, C., 2017. Comparative toxicity, oxidative stress and endocrine disruption potential of plasticizers in JEG-3 human placental cells. *Toxicol. Vitro* 38, 41–48.
- Petersen, H., Biereichel, A., Burség, K., Simat, T.J., Steinhart, H., 2008. Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) migrating from packaging material 'disappears in food': reaction with food components. *Food Addit. Contam.* 25, 911–920.
- Poole, A., van Herwijnen, P., Weideli, H., Thomas, M.C., Ransbotyn, G., Vance, C., 2004. Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE). *Food Addit. Contam.* 21, 905–919.
- Ramillo, G., Valverde, I., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2006. Cytotoxic effects of BADGE (bisphenol A diglycidyl ether) and BFDGE (bisphenol F diglycidyl ether) on Caco-2 cells in vitro. *Arch. Toxicol.* 80, 748–755.
- Samson, M., Labrie, F., Luu-The, V., 2009. Specific estradiol biosynthetic pathway in choriocarcinoma (JEG-3) cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 116, 154–159.
- Satoh, K., Ohyama, K., Aoki, N., Iida, M., Nagai, F., 2004. Study on anti-androgenic effects of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food Chem. Toxicol.* 42, 983–993.
- Suárez, S., Sueiro, R.A., Garrido, J., 2000. Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutat. Res.* 470, 221–228.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139–177.
- Vichi, S., Cortés-francisco, N., Caixach, J., 2012. Ultrahigh resolution mass spectrometry and accurate mass measurements for high-throughput food lipids profiling. *J. Mass Spectrom.* 47, 1177–1190.
- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. Vitro* 14, 227–234.
- Wang, L., Wu, Y., Zhang, W., Kannan, K., 2012. Widespread occurrence and distribution of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in human urine from the United States and China. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12968–12976.
- Wang, L., Xue, J., Kannan, K., 2015. Widespread occurrence and accumulation of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives in human blood and adipose fat. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3150–3157.
- Wenk, M.R., 2005. The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev.* 4, 594–610.
- Xia, J., Wishart, D.S., 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* 55 <https://doi.org/10.1002/cpb1.11>, 14.10.1-14.10.91.
- Xue, J., Wu, Q., Sakthivel, S., Pavithran, P.V., Vasukutty, J.R., Kannan, K., 2015. Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children. *Environ. Res.* 137, 120–128.





**Informació suplementària de l'article "Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells"**

A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, C. Flores, E. Moyano, C. Porte

*Environmental Pollution* 244 (2019), 513–521

**Table S1.** Quality parameters for the BADGE derivatives analysed, elution time, SRM monitored transitions, optimized tube lens and collision energies.

Compound	Elution time (min)	Transition	Collision energy (eV)	Tube lens (V)	LOD <sup>a</sup> (ppb)	LOQ <sup>a</sup> (ppb)
BADGE·2H <sub>2</sub> O	2.21	394>209*	13	63	13	41
		394>135 <sup>#</sup>	31			
BADGE·H <sub>2</sub> O	3.23	376>209	16	63	13	41
		376>135	27			
BADGE·H <sub>2</sub> O·HCl	3.48	412>227	14	70	9	28
		412>135	33			
BADGE	3.81	358>191	16	65	7	22
		358>135	29			
BADGE·HCl	4.02	394>227	16	70	10	33
		394>135	31			
BADGE·2HCl	4.24	430>227	16	70	25	81
		430>135	31			

\*Quantification transition.

<sup>#</sup> Identification transition.

<sup>a</sup> Limit of detection and limit of quantification for quantification transitions.

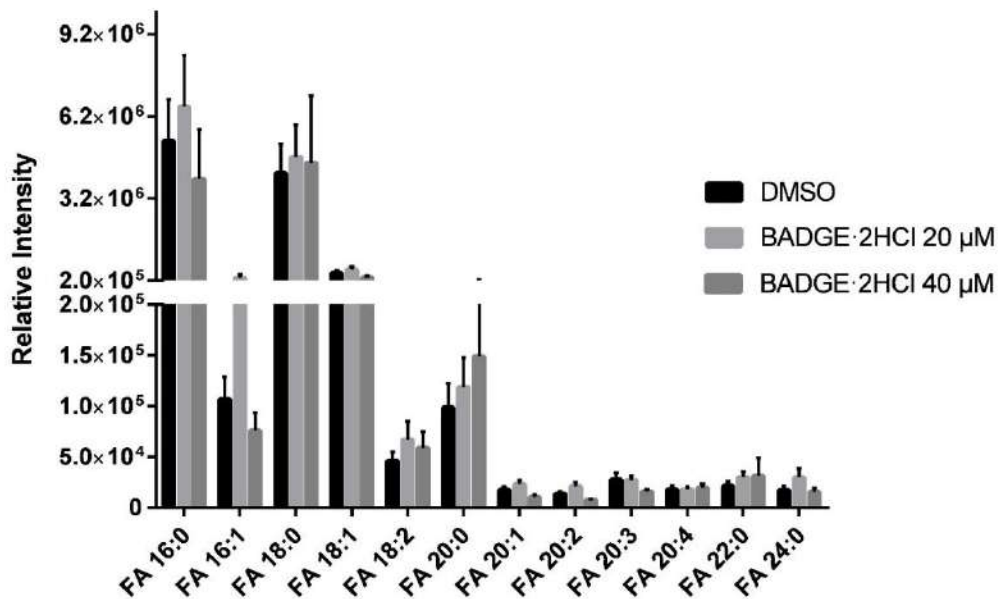
**Table S2.** Lipid species identified in human placental choriocarcinoma JEG-3 cells using an Orbitrap-Exactive system. PCs, TGs, DGs and PC-O/PC-Ps were mainly ionized in ESI(+) as adducts of [M+Na]<sup>+</sup>, whilst PEs, PSs and PIs in ESI(-) as [M-H]<sup>-</sup>. All identified lipids in accordance to criteria of a maximum permissible mass error of 4 ppm and  $0.5 \leq \text{RDB} \leq 15$ . RDB: rings plus double bonds.

Lipid specie	Molecular Formula	Theoretical mass (Da)	Measured mass (Da)	RDB	$\Delta$ ppm	pmol/10 <sup>5</sup> cells	% lipid class	% total lipids
PC 32:0	C40H80NO8PNa	756.5514	756.5508	1.5	-0.75	949 ± 67	5.3	3.1
PC 32:1	C40H78NO8PNa	754.5357	754.5348	2.5	-1.27	2992 ± 263	16.8	9.9
PC 32:2	C40H76NO8PNa	752.5201	752.5189	3.5	-1.54	549 ± 62	3.1	1.8
PC 34:1	C42H82NO8PNa	782.5676	782.5658	2.5	-1.57	5701 ± 382	32.0	18.8
PC 34:2	C42H80NO8PNa	780.5514	780.5503	3.5	-1.39	2078 ± 246	11.7	6.8
PC 34:3	C42H78NO8PNa	778.5357	778.5344	4.5	-1.72	209 ± 15	1.2	0.7
PC 36:2	C44H84NO8PNa	808.5827	808.5814	3.5	-1.58	3264 ± 139	18.3	10.8
PC 36:3	C44H82NO8PNa	806.5670	806.5660	4.5	-1.29	581 ± 55	3.3	1.9
PC 36:4	C44H80NO8PNa	804.5514	804.5505	5.5	-1.1	231 ± 20	1.3	0.8
PC 36:5	C44H78NO8PNa	802.5357	802.5345	6.5	-1.53	75 ± 6	0.4	0.2
PC 38:2	C46H88NO8PNa	836.6140	836.6129	3.5	-1.26	156 ± 11	0.9	0.5
PC 38:3	C46H86NO8PNa	834.5983	834.5977	4.5	-0.75	209 ± 20	1.2	0.7
PC 38:4	C46H84NO8PNa	832.5827	832.5814	5.5	-1.49	362 ± 24	2.0	1.2
PC 38:5	C46H82NO8PNa	830.5670	830.5662	6.5	-0.96	75 ± 6	0.4	0.2
PC 38:6	C46H80NO8PNa	828.5514	828.5511	7.5	-0.39	133 ± 10	0.7	0.4
PC 40:4	C48H88NO8PNa	860.6140	860.6120	5.5	-2.27	69 ± 6	0.4	0.2
PC 40:6	C48H84NO8PNa	856.5832	856.5841	7.5	1.62	75 ± 5	0.4	0.2
PC 40:7	C48H82NO8PNa	854.5670	854.5660	8.5	-1.17	103 ± 9	0.6	0.3
<b>TOTAL PCs</b>						<b>17811 ± 1447</b>		<b>58.7</b>
PC-O 30:0	C38H78NO7PNa	714.5408	714.5395	0.5	-1.81	139 ± 19	2.6	0.5
PC-O 32:0	C40H82NO7PNa	742.5721	742.5713	0.5	-1.07	434 ± 65	8.0	1.4
PC-O 32:1	C40H80NO7PNa	740.5565	740.5555	1.5	-1.35	656 ± 50	12.1	2.2
PC-O 32:2/PC-P 32:1	C40H78NO7PNa	738.5408	738.5400	2.5	-1.06	174 ± 16	3.2	0.6
PC-O 34:1	C42H84NO7PNa	768.5878	768.5868	1.5	-1.24	1370 ± 167	25.2	4.5
PC-O 34:2/PC-P 34:1	C42H82NO7PNa	766.5721	766.5712	2.5	-1.23	429 ± 39	7.9	1.4
PC-O 34:3/PC-P 34:2	C42H80NO7PNa	764.5565	764.5554	3.5	-1.41	99 ± 3	1.8	0.3
PC-O 36:1	C44H88NO7PNa	796.6191	796.6188	1.5	-0.33	101 ± 11	1.9	0.3
PC-O 36:2/PC-P 36:1	C44H86NO7PNa	794.6034	794.6023	2.5	-1.45	304 ± 41	5.6	1.0
PC-O 36:3/PC-P 36:2	C44H84NO7PNa	792.5878	792.5870	3.5	-0.97	294 ± 19	5.4	1.0
PC-O 36:4/PC-P 36:3	C44H82NO7PNa	790.5721	790.5710	4.5	-1.44	188 ± 21	3.5	0.6
PC-O 36:5/PC-P 36:4	C44H80NO7PNa	788.5565	788.5554	5.5	-1.37	84 ± 14	1.6	0.3
PC-O 38:3/PC-P 38:2	C46H88NO7PNa	820.6191	820.6186	3.5	-0.54	125 ± 14	2.3	0.4
PC-O 38:4/PC-P 38:3	C46H86NO7PNa	818.6034	818.6025	4.5	-1.11	274 ± 25	5.0	0.9
PC-O 38:5/PC-P 38:4	C46H84NO7PNa	816.5878	816.5863	5.5	-1.79	341 ± 25	6.3	1.1

TREBALL EXPERIMENTAL I RESULTATS

PC-O 38:6/PC-P 38:5	C46H82NO7PNa	814.5721	814.5707	6.5	-1.76	204 ± 19	3.7	0.7
PC-P 38:6	C46H80NO7PNa	812.5565	812.5566	7.5	0.12	49 ± 5	0.9	0.2
PC-O 40:6/PC-P 40:5	C48H86NO7PNa	842.6034	842.6043	6.5	0.99	73 ± 9	1.3	0.2
PC-P 40:6	C48H84NO7PNa	840.5878	838.5745	7.5	2.85	102 ± 13	1.9	0.3
<b>TOTAL PC-O + PC-Ps</b>						<b>5441 ± 574</b>		<b>17.9</b>
PE 34:1	C39H75NO8P	716.5225	716.5240	3.5	2.05	425 ± 63	19.7	1.4
PE 34:2	C39H73NO8P	714.5068	714.5081	4.5	1.79	174 ± 39	8.1	0.6
PE 36:2	C41H77NO8P	742.5381	742.5396	4.5	1.99	468 ± 135	21.7	1.5
PE 36:3	C41H75NO8P	740.5225	740.5239	5.5	1.96	142 ± 29	6.6	0.5
PE 36:4	C41H73NO8P	738.5068	738.5079	6.5	1.46	96 ± 14	4.4	0.3
PE 38:4	C43H77NO8P	766.5381	766.5398	6.5	2.22	256 ± 21	11.9	0.8
PE 38:5	C43H75NO8P	764.5225	764.5237	7.5	1.58	302 ± 24	14.0	1.0
PE 38:6	C43H73NO8P	762.5068	762.5079	8.5	1.39	87 ± 15	4.1	0.3
PE 40:5	C45H77NO8P	790.5381	790.5405	8.5	3.01	59 ± 4	2.7	0.2
PE 40:6	C45H75NO8P	788.5225	788.5226	9.5	0.2	73 ± 13	3.4	0.2
PE 40:7	C45H73NO8P	786.5068	786.5069	10.5	0.05	75 ± 5	3.5	0.2
<b>TOTAL PEs</b>						<b>2157 ± 362</b>		<b>7.1</b>
PI 34:1	C43H80O13P	835.5331	835.5348	4.5	1.99	66 ± 17	14.1	0.2
PI 36:2	C45H82O13P	861.5488	861.5505	5.5	1.98	92 ± 16	19.9	0.3
PI 38:3	C47H84O13P	887.5644	887.5665	6.5	2.32	170 ± 8	36.5	0.6
PI 38:4	C47H82O13P	885.5488	885.5507	7.5	2.16	137 ± 32	29.5	0.5
<b>TOTAL PIs</b>						<b>465 ± 74</b>		<b>1.5</b>
PS 34:1	C40H75NO10P	760.5123	760.5129	4.5	0.75	103 ± 16	55.4	0.3
PS 36:2	C42H77NO10P	786.5280	786.5291	5.5	1.41	83 ± 16	44.6	0.3
<b>TOTAL PSs</b>						<b>187 ± 32</b>		<b>0.6</b>
DG 32:0	C35H68O5Na	591.4959	591.4951	1.5	-1.31	39 ± 8	6.3	0.1
DG 32:1	C35H66O5Na	589.4802	589.4796	2.5	-1.16	87 ± 19	13.9	0.3
DG 34:1	C37H70O5Na	617.5115	617.5107	2.5	-1.32	175 ± 31	28.1	0.6
DG 34:2	C37H68O5Na	615.4959	615.4950	3.5	-1.41	79 ± 21	12.6	0.3
DG 34:3	C37H66O5Na	613.4802	613.4797	4.5	-0.89	26 ± 5	4.1	0.1
DG 36:1	C39H74O5Na	645.5428	645.5435	2.5	0.98	30 ± 7	4.8	0.1
DG 36:2	C39H72O5Na	643.5272	643.5266	3.5	-0.99	110 ± 20	17.6	0.4
DG 36:3	C39H70O5Na	641.5115	641.5116	4.5	0.02	26 ± 5	4.1	0.1
DG 38:3	C41H74O5Na	669.5428	669.5410	4.5	-2.79	52 ± 8	8.4	0.2
<b>TOTAL DGs</b>						<b>622 ± 123</b>		<b>2.0</b>
TG 48:1	C51H96O6Na	827.7099	827.7089	3.5	-1.17	233 ± 25	6.3	0.8
TG 48:2	C51H94O6Na	825.6943	825.6929	4.5	-1.7	193 ± 37	5.3	0.6
TG 50:0	C53H102O6Na	855.7412	855.7413	3.5	0.14	300 ± 45	8.2	1.0
TG 50:1	C53H100O6Na	855.7412	855.7424	3.5	1.42	595 ± 105	16.2	2.0
TG 50:2	C53H98O6Na	853.7256	853.7258	4.5	0.26	219 ± 40	6.0	0.7
TG 52:2	C55H102O6Na	881.7569	881.7554	4.5	-1.47	732 ± 97	20.0	2.4
TG 52:3	C55H100O6Na	879.7412	879.7395	5.5	-1.7	478 ± 86	13.0	1.6
TG 52:4	C55H98O6Na	877.7256	877.7238	6.5	-1.76	157 ± 34	4.3	0.5
TG 54:3	C57H104O6Na	907.7725	907.7709	5.5	-1.59	535 ± 98	14.6	1.8
TG 54:4	C57H102O6Na	905.7569	905.7556	6.5	-1.22	223 ± 45	6.2	0.8
<b>TOTAL TGs</b>						<b>3668 ± 100</b>		<b>12.1</b>
<b>TOTAL LIPIDS</b>						<b>30351 ± 2711</b>		<b>100 %</b>

**Figure S1.** Relative intensity of identified fatty acids (FA) in control and cells exposed to 20 and 40µM BADGE·2HCl. Levels are expressed as mean ± SEM (n=4).



## 2.2 DISRUPCIÓ LIPÍDICA EN MODELS AMBIENTALS

Durant les darreres dècades, hi ha hagut un creixement exponencial en la producció i l'ús de compostos químics, i l'alliberament d'aquests compostos al medi aquàtic està ocasionant un augment de la contaminació aquàtica a nivell mundial. S'ha descrit que alguns compostos són capaços d'alterar la síntesi i el metabolisme de lípids induint-ne l'acumulació intracel·lular promovent processos d'obesogènesis. En aquest apartat, s'avalua l'ús de línies cel·lulars hepàtiques de peix com a mètodes de cribratge per detectar els xenobiòtics que poden alterar el metabolisme de lípids en organismes aquàtics.

En aquest context, s'ha dut a terme la descripció del perfil lipídic de les cèl·lules PLHC-1 i ZFL utilitzant la tècnica FIA-HRMS i s'ha caracteritzat la seva resposta a l'exposició a dos compostos model, TBT, compost classificat com a obesògen en models humans, i ATRA, compost agonista del receptor RXR. Els resultats obtinguts es troben recollits a l'article II, titulat "*Dysregulation of lipid metabolism in PLHC-1 and ZFL cells exposed to tributyltin an all-trans retinoic acid*" (apartat 2.2.1).

Per altra banda, s'ha avaluat l'efecte de diversos additius plàstics sobre el lipidoma de les cèl·lules ZFL mitjançant la tècnica UHPLC-HRMS/MS i s'ha estudiat l'expressió d'alguns gens d'interès involucrats en el metabolisme dels lípids mitjançant reacció en cadena de la polimerasa en tems real (RT-PCR). Els resultats de l'estudi es troben recopilats en l'article III, titulat "*Untargeted lipidomics shows the ability of bisphenol A and derivatives to alter lipid metabolism in zebrafish liver cells (ZFL)*" (apartat 2.2.2).

Per últim, s'ha estudiat l'habilitat del progestagen sintètic drospirenona (DRO) d'alterar el lipidoma de les cèl·lules PLHC-1 a diferents temps

d'exposició, mitjançant la tècnica FIA-HRMS. Els resultats han estat publicats a l'article IV, titulat "*Drospirenone induces the accumulation of triacylglycerides in the fish hepatoma cell line, PLHC-1*" (apartat 2.2.3).

### **2.2.1 Article científico II**

*Dysregulation of lipid metabolism in PLHC-1 and ZFL cells exposed to tributyltin  
an all-trans retinoic acid*

A. Marqueño, C. Flores, M. Casado, C. Porte

Submitted to *Ecotoxicology and environmental safety*





## Dysregulation of lipid metabolism in PLHC-1 and ZFL cells exposed to tributyltin and all-trans retinoic acid

Anna Marqueño, Cintia Flores, Marta Casado, Cinta Porte

*Environmental Chemistry Department, IDAEA –CSIC-, C/ Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain*

### ABSTRACT

There is increasing awareness that exposure to endocrine disruptors interferes with lipid homeostasis in vertebrates, including fish. Many of these compounds exert their action by binding to nuclear receptors, such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoid X receptor (RXR). This work investigates the use of fish liver cells (PLHC-1 and ZFL cells) for the screening of metabolic and lipid disruptors in the aquatic environment by assessing changes in the cells lipidome after exposure to the model compounds, tributyltin chloride (TBT) and all-trans retinoic acid (ATRA). Lipid extracts, analyzed by FIA-ESI(+/-)Orbitrap, evidenced the accumulation of triglycerides (TG) and diglycerides (DG) in both cell models after exposure 100 and 200 nM TBT for 24 h. Exposure to 1  $\mu$ M ATRA led to a significant accumulation of TGs in PLHC-1 cells, while few TGs were accumulated in ZFL cells. Retinoic metabolism (*cyp26b1*, *cyp3a65*, *lrate*) and lipid metabolism related genes (*fasn*, *scd*, *elovl6*) were up-regulated by both TBT and ATRA exposure, but only ATRA up-regulated the expression of *cyp1a* and down-regulated *dgat1a*. This study (a) highlights the similar mode of action of TBT in both cell models and shows comparable sensitivity and responses to those previously reported in mammalian models, and (b) proposes the use of fish liver cell lines as an alternative model for the screening of lipid and metabolic disruptors in aquatic organisms.

**Keywords:** fish cells, liver, lipid metabolism, gene expression, triglycerides.

### 1. Introduction

Currently, there is increasing awareness that environmental pollutants can interfere with lipid homeostasis in wildlife populations. A growing number of studies have reported alterations in the metabolism and accumulation of lipids in aquatic organisms caused by external stressors, including herbicides, organotins, pharmaceuticals and others (Lyssimachou et al., 2009; Jordão et al., 2016; Tang et al., 2019). Increased lipid and TG content, increased adiposity and altered body weight are among the effects reported in fish exposed to the well-known obesogenic compound, TBT (Meador et al., 2011; Lyssimachou et al.,

2015; Ouadah-Boussouf and Babin, 2016; Zhang et al., 2016, 2017). Exposure to warfarin, a PXR agonist, up-regulated genes involved in lipid metabolism in zebrafish embryos (Granadeiro et al., 2019), while exposure to diesel water-accommodated fraction down-regulated the transcription of genes involved in cholesterol and fatty acid (FA) synthesis and lead to decreased levels of several lipids, including cholesteryl esters (CE), FAs, diglycerides (DG) and triglycerides (TG) (Mu et al., 2018). Field studies have also evidenced alterations of lipid homeostasis in organisms inhabiting polluted environments. Thus, high

abundance of lipids associated to energy storage, including TGs, were reported in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) collected in metal and metalloid-contaminated wetlands (Melvin et al., 2019). The skeletal muscle of fish collected in polluted areas showed a dysregulation of cholesterol homeostasis and a lipid signature which was characteristic of oxidative stress, with decreased levels of plasmalogen phosphatidylcholine species (PC-P) and hydrolysis of PCs containing PUFAs with the concomitant formation of lyso-PCs (LPCs) (Marqueño et al., 2019a).

In fish, as in other vertebrates, lipid homeostasis is tightly regulated by complex networks involving transcription factors (e.g. nuclear receptors), enzymes, hormones and nutrients. The liver plays a central role in the maintenance of lipid homeostasis (Postic et al., 2004), and alterations of its lipid composition can have harmful consequences, leading to the development of metabolic syndrome and other disorders. Thus, we hypothesize that hepatic fish cell lines may represent a valuable model for the detection of environmental lipid disrupters through a lipidomic approach. In fact, hepatic fish cell lines, namely PLHC-1, derived from a topminnow (*Poeciliopsis lucida*), and ZFL cells, derived from zebrafish (*Danio rerio*), have been extensively used in ecotoxicology studies (Yang and Chan, 2015; Blanco et al., 2018), obtaining comparable results with those detected *in vivo* (Schirmer, 2006).

To test this hypothesis, tributyltin chloride (TBT) and *all-trans* retinoic acid (ATRA) were selected as model compounds. TBT is a well-known obesogen that alters lipid metabolism through interaction with the nuclear receptors PPAR $\gamma$ /RXR (Ouadah-Boussouf

and Babin, 2016). Primary cultures of rainbow trout preadipocytes differentiated into adipocytes in the presence of TBT (Lutfi et al., 2017). Accordingly, exposure of zebrafish to TBT at the low nM range stimulated adipocyte differentiation, together with an up-regulation of the expression of liver X receptor (*Ixr*) and a down-regulation of fatty acid binding protein 11a (*fabp11a*) (Broeder et al., 2017), and an accumulation of lipid droplets in the liver, consistent with steatosis, was observed in adult zebrafish after 90 days exposure (Zhang et al., 2016). *All-trans* retinoic acid (ATRA) is an endogenous active metabolite of vitamin A, which has a key role in lipid and energy metabolism. ATRA binds to RARs, and an excess of ATRA can isomerize to 9-*cis* retinoic acid *in vivo*, which binds both to RAR and RXR (Bonet et al., 2012). Evidence shows that retinoic acid reduce body fat by inhibiting lipid metabolism, but exogenous ATRA treatment increased adipocyte-related gene expression in zebrafish embryos (Li et al., 2010). In addition, ATRA has been found to induce intracellular lipid accumulation and promote differentiation in human AML-1 preadipocyte cells, together with up regulation of the expression of leptin, adipoleptin and lipoprotein lipase (*lpl*) (Morikawa et al., 2013). Retinoic acid influence on lipid metabolism has mostly been studied in human models, nevertheless, a study investigating the effect of ATRA in late zebrafish embryos found out over-representation of genes involved in sphingolipid metabolism (Navarro-Martín et al., 2018).

The aim of this study was to evaluate the use of PLHC-1 and ZFL cell lines as an alternative *in vitro* model for the detection of lipid disrupters in the aquatic environment by assessing

changes in the cell's lipidome after exposure to the model compounds, TBT and ATRA. Additionally, the expression of several genes involved in retinoid and lipid metabolism (Table S1, Supplementary material) related genes was measured in ZFL cells. This approach may be useful for feeding adverse outcome pathways and may help link cellular changes to effects at higher levels of biological organization in future studies.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals and reagents

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), fetal bovine serum, L-glutamine, sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin, streptomycin, phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's PBS (DPBS) and trypsin-EDTA were purchased from Gibco BRL Life Technologies (Paisley, Scotland, UK). TBT chloride and ATRA were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All stock solutions were prepared in 0.1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). LC-MS grade methanol and dichloromethane ( $\geq 99\%$ ) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Lipid standards, consisting of a mixture of 17:0 triacylglyceride, 1,3-17:0  $d_5$  diacylglyceride, 16:0  $d_{31}$ -18:1 phosphatidylcholine, 17:0 lysophosphatidylcholine, 16:0  $d_{31}$ -18:1 phosphatidylserine, 16:0  $d_{31}$ -18:1 phosphatidylethanolamine, and 16:0  $d_{31}$ -18:1 phosphatidylinositol were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

### 2.2 Cell culture and cell viability

ZFL and PLHC-1 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC® CRL-2643™ and CRL-2406™, respectively). They were grown in Eagle's MEM supplemented with 5%

fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5  $g \cdot L^{-1}$  sodium bicarbonate, 50 U/mL penicillin and, 50  $\mu g \cdot mL^{-1}$  streptomycin. Cells were routinely cultured in 75  $cm^2$  culture flasks (Corning; NY, USA) in a humidified incubator with 5%  $CO_2$  at 30°C. When confluence was reached, cells were dissociated with 0.25% (ZFL) or 0.05% (PLHC-1) trypsin. Experiments were carried out on confluent cell monolayers from passages 5 to 20.

For the assessment of cytotoxicity, cells were seeded at a density of  $7.5 \cdot 10^4$  cells per well (PLHC-1) and  $6 \cdot 10^4$  cells per well (ZFL) in 96 well-plates and exposed to TBT and ATRA for 24 hours. Each treatment was performed in three different plates with cells from different passages. Measurement of cytotoxicity was performed using AB (excitation/emission: 530/590 nm) and CFDA-AM (485/530 nm) as described in Pérez-Albaladejo et al. (2016).

### 2.3 Analysis of cellular lipids

Cells were seed in 24-well plates at a density of  $5 \cdot 10^5$  and  $6 \cdot 10^5$  cells per well (ZFL and PLHC-1, respectively) and allowed to attach overnight. Cells were exposed to TBT (50, 100 and 200 nM), and ATRA (0.2 and 1  $\mu M$ ). After 24 h of exposure, the culture medium was removed and cells were rinsed with PBS, trypsinized, centrifuged, and the pellets stored at -80 °C under argon atmosphere until extraction. Three experiments with cells from different passages were carried out and three replicates per experiment were analysed (n=9), except for 50 nM TBT, where only two replicates per experiment were analyzed (n=6).

Cell pellets were extracted with ethyl acetate (x3) in an ultrasonic bath and the lipid extracts were analyzed by FIA-

(+/- H-ESI) Orbitrap-Exactive as described in Marqueño et al. (2019). Briefly, 5  $\mu$ L of the reconstituted extract (methanol) were infused into the instrument at a flow rate of 50  $\mu$ L $\cdot$ min<sup>-1</sup>. The mobile phase was methanol:dichloromethane (80:20). The acquisition was performed in full scan mode. Positive identification of the lipids was based on the accurate mass measurement (error < 5 ppm), isotopic distribution, charge, adduct formation, number of rings plus double bonds (RDB=0.5-15) and elements in the molecular formula. Quantification of the lipids was performed by using an internal standard that consisted in a mixture of representative lipids for each lipid family, with the exception of plasmenyl/plasmanyl phosphatidylcholines (PC-P/PC-O), lysophosphatidylcholines (LPC) and sphingomyelins (SMs) that were calculated respect to the phosphatidylcholine (PC) standard; and plasmenyl/plasmanyl phosphatidylethanolamines (PE-P/PE-O), lysophosphatidylethanolamine (LPE) and phosphatidylglycerols (PG) referred to the phosphatidylethanolamine (PE) standard. Repeatability, expressed as intra-day relative standard deviation calculated for internal standards was satisfactory (TG: 17%, DG: 12%, PC: 8%, LPC: 12%, PE: 12%, PI: 12%, PS: 15%).

#### 2.4 Real-time PCR

ZFL cells were seeded in 6-well plates at a density of 106 cells per well and allowed to attach overnight. Cells were exposed to 100 nM of TBT and 1  $\mu$ M of ATRA using 0.1% (v/v) of DMSO. After 24 h of exposure, the culture medium was removed and total RNA was isolated by using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlberg, Denmark). Six biological replicates from

different cell passages (from 5 to 20) were used. The quantity and quality of isolated RNA were measured by spectrophotometric absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-8000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The obtained RNA was treated with DNaseI (Ambion, Austin, TX, USA) and retro-transcribed into cDNA using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), following manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted 1:2 and two aliquots were stored at -80 °C for qRT-PCR.

Primer sequences for genes involved in lipid metabolism (*elovl6*, *fasn*, *gpat2*, *gpat3*, *lpl*, *scd*, *abca1b*, *cd36*, *dgat1a*, *dgat2*), retinoic metabolism (*cyp26b1*, *lrata*, *rdh1*, *ugt1a1*), xenobiotic metabolism (*cyp3a65*, *cyp1a*) and nuclear receptors (*ppara*, *ppar $\beta$* , *ppary*, *lxr* (*nr1h3*)) were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantification of transcripts abundance was carried out in a LightCycler 480 Real-Time PCR System (F. Hoffmann- La Roche) with SYBR-Green Mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). PCR amplification efficiency for each gene was determined by the serial dilution method (Pfaffl, 2001). Primers accession number, sequences, amplicon lengths, and efficiency are described in Table S2 (Supplementary material). Housekeeping gene *ppiaa* was selected as reference gene due to the high stability of mRNA levels upon treatments.

Relative mRNA abundances of different genes were calculated from the second derivative maximum of their respective amplification curves (Cp, in duplicates). To minimize errors in RNA quantification among different samples,

Cp values of target genes (Cptg) were corrected to the correspondent Cp values of the reference ppia gene:  $\text{corrCptg} = \text{Cptg} - \text{Cp}_{\text{ppia}}$ . Changes in mRNA abundance in treated samples were calculated by the  $\Delta\Delta\text{Cp}$  method (Pfaffl, 2001) using corrected Cp values:  $\Delta\Delta\text{Cp} = \text{corr Cptg}_{\text{untreated}} - \text{Cptg}_{\text{treated}}$ .

### 2.5 Statistical analysis

Concentrations causing a 50% decline of cell viability (EC50) were calculated using Sigmaplot 13.0 software. Lipid profiles were analyzed with MATLAB R2016a (MathWorks, Natick, Massachusetts). Unsupervised principal component analysis (PCA) was performed to explore the differences of the lipid profiles within the datasets; loading plots described the relative importance of each variable to the model. Lipid profiles were analyzed by using the online software Metaboanalyst 4.0 (Xia and Wishart, 2016). Volcano plots were applied to visualize the significance and the magnitude of the changes detected in the cellular lipidomes (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ , Student t-test). Lipid concentrations expressed as pmol per mg of protein were autoscaled prior to statistical analysis. Lipid data obtained for PLHC-1 exposed to 200 nM TBT was autoscaled and normalized by the sum in order to minimize the effect of the decrease in cell viability. For gene expression, statistical significance was assessed using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test (SPSS Statistics v.21 Chicago, IL).  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

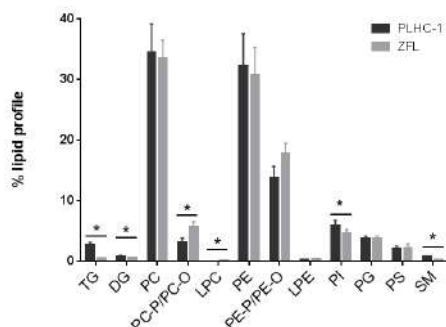
## 3. Results

### 3.1 Cell viability

TBT showed significant cytotoxicity in PLHC-1 and ZFL cells. Dose-response curves are shown in Figure S1 (Supplementary material). Concentration leading to 50% decline in cell viability (EC50) was  $0.16 \pm 0.01$  (AB) and  $0.24 \pm 0.01$   $\mu\text{M}$  (CFDA) in PLHC-1 cells and  $0.63 \pm 0.03$  (AB) and  $0.44 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$  (CFDA) in ZFL cells. No significant cytotoxicity was detected for ATRA at the selected concentrations (0.2 and 1  $\mu\text{M}$ ).

### 3.2 Lipid profiles of PLHC-1 and ZFL cells

About 156 (PLHC-1) and 120 (ZFL) lipid species, including TG, DG, PC, LPC, PC-O/PC-P, PE, LPE, PE-O/PE-P, PG, PI, PS, and SM, were identified (Fig. S2 & S3, supplementary material). The more abundant lipid subclasses were PCs (~35% of the analyzed lipids) and PEs (30-32%) in both cell lines, followed by PE-O/PE-Ps (14-18%), which were more abundant in ZFL cells. The other lipid subclasses accounted for less than 6% of the analyzed lipids in both cell lines. Comparatively, the lipid profile of PLHC-1 cells was significantly enriched in TGs, DGs, PIs, and SM, while a higher abundance of PC-P/PC-Os and LPCs was detected in ZFL cells (Fig. 1).



**Fig 1.** Percentage of each lipid subclass from the total of lipids analyzed, detected in PLHC-1 and ZFL cells (mean  $\pm$  SD; n=9). \*Indicates statistically significant differences ( $p < 0.05$ ; Student t-test).

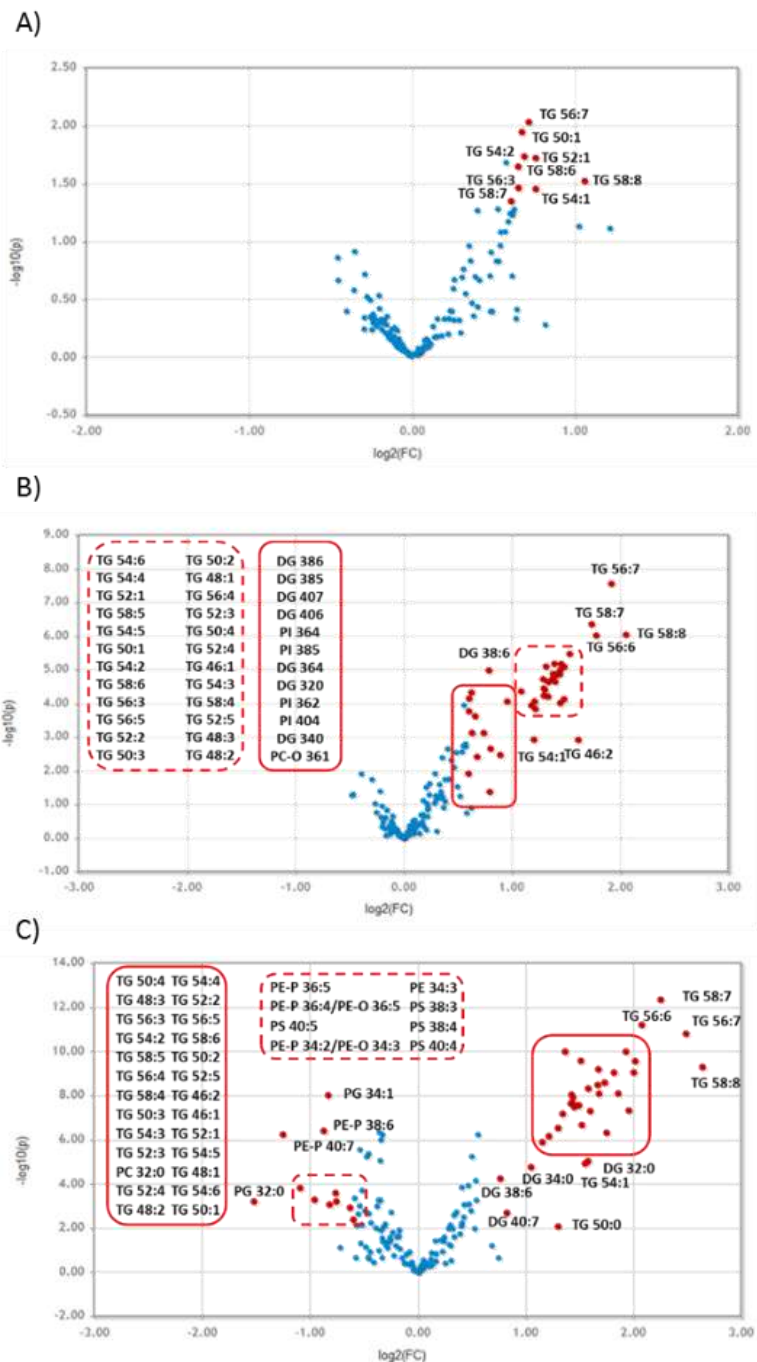
### **3.3 Changes in the lipid profile after exposure to TBT and ATRA.**

Unsupervised principal component analysis (PCA) scores plot of the lipid profile of control and TBT-exposed PLHC-1 cells and the corresponding loadings are shown in Supplementary material (Fig S4). No segregation between the lipid profile of control and exposed cells was detected after exposure to 50 nM TBT. Differences among control and exposed groups became clearer as the concentration of TBT increased. For PLHC-1 cells exposed to 100 nM TBT, the PCA model explained 66% of the variance among groups giving the higher segregation along principal component 2 (PC2), which accounted for 21% of the explained variance. The main variables responsible for the differential clustering of samples were TG and DG species. For cells exposed to the highest concentration of TBT (200 nM), the model explained 55% of the variance, the highest segregation of the samples was observed along principal component 1 (PC1), which accounted for 44% of the explained variance. Examination of the loadings plot revealed that the main variables responsible for the separation between groups were scattered in several subclasses, such as TGs, DGs, PC-P/PC-Os, positively correlated with PC1 space, while PE-P/PE-Os and PSs were negatively correlated. The volcano plots highlighted the accumulation of TG species in PLHC-1 cells exposed to TBT in a concentration-dependent manner (Fig. 2). The increase of TGs ranged from 2-fold at 50 nM TBT to 5-fold in cells exposed to 200 nM TBT.

An accumulation of DG species was observed at the two highest concentrations (up to 3-fold).

Additionally, a decrease of some phospholipids, mainly PE-P/PE-Os and PSs (up to 3-fold) was observed in cells exposed to the highest concentration of TBT, which was associated to a 50% decline in cell viability.

The PCA scores plots and the corresponding loadings for ZFL cells exposed to TBT are shown in Fig. S5 (supplementary material). The PCA did not display segregation among control and exposed cells at the lowest concentration tested (50 nM TBT). At higher concentrations (100 & 200 nM TBT), the PCA scores plot, build with a model considering two principal components, explained 65 and 71% of the variance within control and exposed cells. The mayor group segregation was obtained along PC2 in both cases, with exposed samples in the positive PC2 space and characterized by increased TG and DG –only at 200 nM TBT- species. These results are consistent with the univariate analysis -volcano plots that showed the accumulation of TGs in ZFL cells after exposure to low TBT concentrations (50, 100 nM), and the increase of some DGs in cells exposed to 100 nM TBT. ZFL cells exposed to the highest concentration of TBT showed changes in the lipid profile comparable to those observed in PLHC-1 cells: a strong accumulation of TGs (up to 9-fold), a moderate increase of DGs (up to 2-fold) and a concomitant decrease of membrane lipids, mainly PC-P/PC-Os.



**Fig. 2.** Volcano plots showing differences in the lipid profile of PLHC-1 cells exposed to 50 (A), 100 (B) and 200 nM of TBT (C) vs. control cells. The x-axis reflects the magnitude of the change ( $-\log(\text{fold change})$ ) whilst the y-axis reflects the significance of change ( $-\log(\text{p-value})$ ). Significantly altered lipids (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) are colored in red.



Nonetheless, the impact of TBT exposure in ZFL phospholipids was lower than the observed in PLHC-1 cells, which is in agreement with the low cytotoxicity of TBT in ZFL cells (15% decline in cell viability) in comparison to PLHC-1 (50% decline in cell viability after 24 h exposure to 200 nM TBT).

Regarding exposure to ATRA, only the highest concentration tested (1  $\mu$ M) induced significant changes in the lipid profile of PLHC-1 cells. The PCA scores plot displayed a moderate separation within samples, explaining 59% of the variance using two principal components (Fig. S6A, supplementary material). Sample segregation occurs along PC2, with the exposed samples in the positive part of the component. PC2 is strongly influenced by the variables corresponding to TGs and PEs, and poorly influenced by PC and PC-P/PC-O species. The univariate analysis volcano plot evidenced a strong increase of TGs (1.5 to 3-fold) in PLHC-1 cells exposed to ATRA (Fig. 4A). In contrast, ZFL cells were less responsive to ATRA exposure. At the highest dose tested (1  $\mu$ M), the PCA scores plot (Fig. S6B, supplementary material) did not show separation of the samples. Nevertheless, the univariate analysis was able to highlight the accumulation of some TGs in exposed cells (Fig. 4B).

### 3.5. Expression of mRNA of target genes in ZFL cells

Among the genes selected for the study, *ppar $\beta$* , *ppary*, *cd36*, *lpl* and *dgat2* were not further considered for gene expression analysis since *ppar $\beta$*  and *ppary* showed low expression in ZFL cells, while for *cd36*, *lpl* and *dgat2* good primer efficiency was not achieved either due to low expression in the cells or due to issues during primer design (Table S2, supplementary material). For

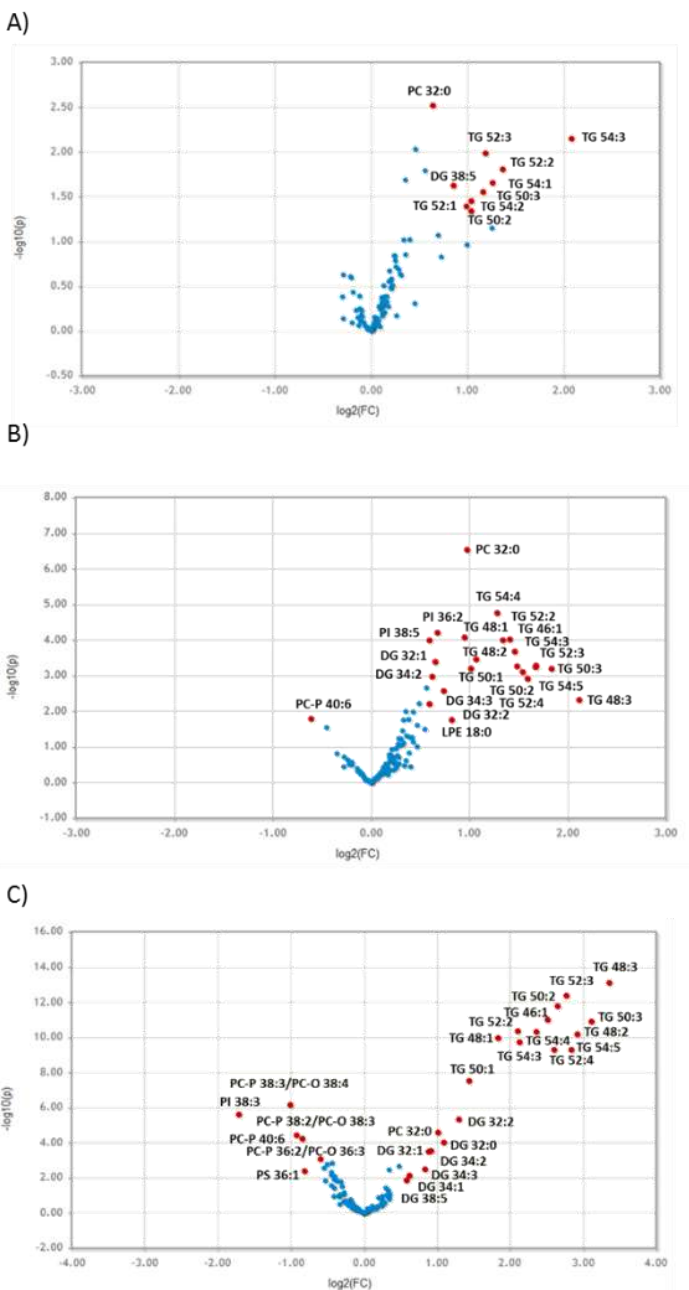
the rest of the genes, a detection range with cut-off at >37 cycles was adopted since negative controls were not interfering in this concentration range. Both, TBT (200 nM) and ATRA (1  $\mu$ M) altered the expression of some lipid metabolism related genes (Fig. 5).

Particularly, the expression of the ATP-binding cassette transporter *abca1b*, responsible for major regulation of cellular cholesterol and phospholipid homeostasis, was up-regulated after TBT exposure (2.1-fold). Both, TBT and ATRA, up-regulated the expression of genes encoding lipogenic enzymes, mainly (a) fatty acid synthase (*fasn*) (TBT: 3.3-fold; ATRA: 2.4-fold), which is responsible for the synthesis of palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA into long-chain saturated fatty acids; (b) stearoyl-CoA desaturase (*scd*) (TBT: 3.8-fold; ATRA: 4.0-fold), which catalyzes the conversion of 16:0-CoA to 16:1-CoA and 18:0-CoA to 18:1-CoA; and (c) elongase 6 (*elovl6*) (TBT: 1.6-fold; ATRA: 2.2-fold), which elongates 16:0, 16:1 and 18:1 to 18:0, 18:1 and 20:1, respectively. In addition, ATRA exposure significantly down-regulated the expression of diacylglycerol O-acyltransferase 1a (*dgat1a*), which catalyzes the conversion of DGs and fatty acyl-CoA to TGs (2.5-fold).

Regarding the expression of retinoic acid metabolism related genes, ATRA, but also TBT, up-regulated the expression of *cyp26b1* (397- and 5.1-fold, respectively) in ZFL cells. The enzyme encoded by this gene is involved in the specific inactivation of ATRA to oxidized forms, such as 4-oxo-, 4-hydroxy, and 18-hydroxy-ATRA. An up-regulation of the expression of *cyp3a65* (1.5-fold) and *cyp1a* (2.4-fold), both involved in the response to xenobiotic stimulus, was observed after exposure to ATRA, while TBT only up-regulated

*cyp3a65* expression. Lecithin retinol acyltransferase a (*lrata*), the encoded enzyme catalyzes the esterification of all-trans-retinol into all-trans-retinyl

ester was up-regulated by both TBT (2.0-fold) and ATRA (9.1-fold) (Fig. 6).

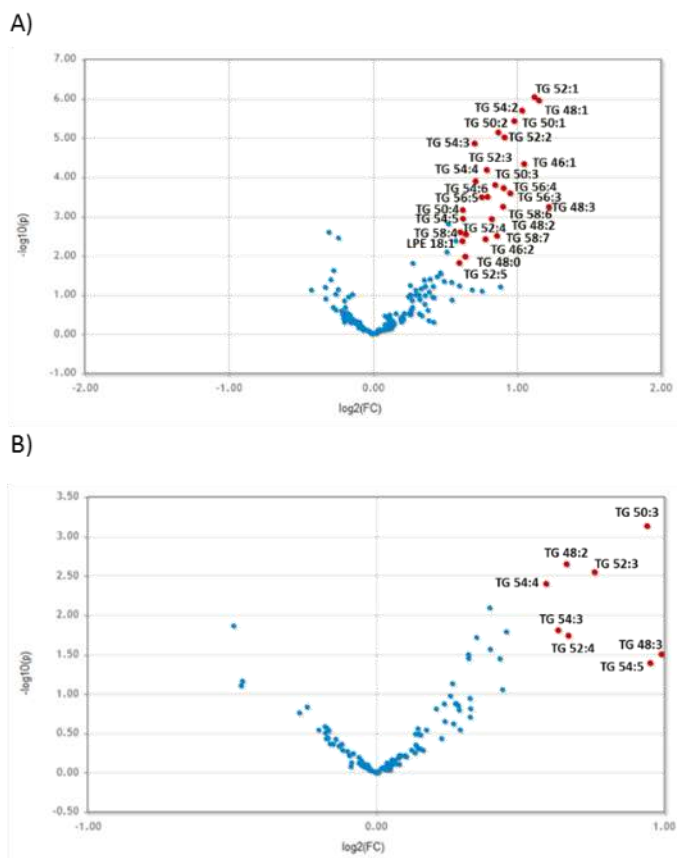


**Fig. 3.** Volcano plots showing differences in the lipid profile of ZFL cells exposed to 50 (A), 100 (B) and 200 nM of TBT (C) vs. control cells. The x-axis reflects the magnitude of the change ( $-\log(\text{fold change})$ ) whilst the y-axis reflects the significance of change ( $-\log(p\text{-value})$ ). Significantly altered lipids (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) are colored in red.

4. Discussion

In the present study, we have characterized the lipid signature of TBT and ATRA on the fish liver cell lines PLHC-1 and ZFL, together with changes in mRNA transcripts in ZFL. The lipidomic analysis evidenced differences between the two cell lines, mainly regarding the number and concentration of TG species: 29 TGs were identified in PLHC-1 (2.6% of detected lipids) while only 13 (0.5%) in ZFL. These differences can be attributed to inter-species differences, but also to

the carcinogenic origin of PLHC-1 cells, as cancer cells are enriched in triglycerides and cholesterol to satisfy the energy demands to proliferate and build new cell membranes (Santos and Schulze, 2012). In addition, TG species conformed by 56 or more carbons were only detected in PLHC-1 cells (Fig. S2-3), a characteristic also described in human metastatic cancer cell lines (Fhaner et al., 2012). (Fig. S2-3), a characteristic described in human metastatic cancer cell lines (Fhaner et al., 2012).

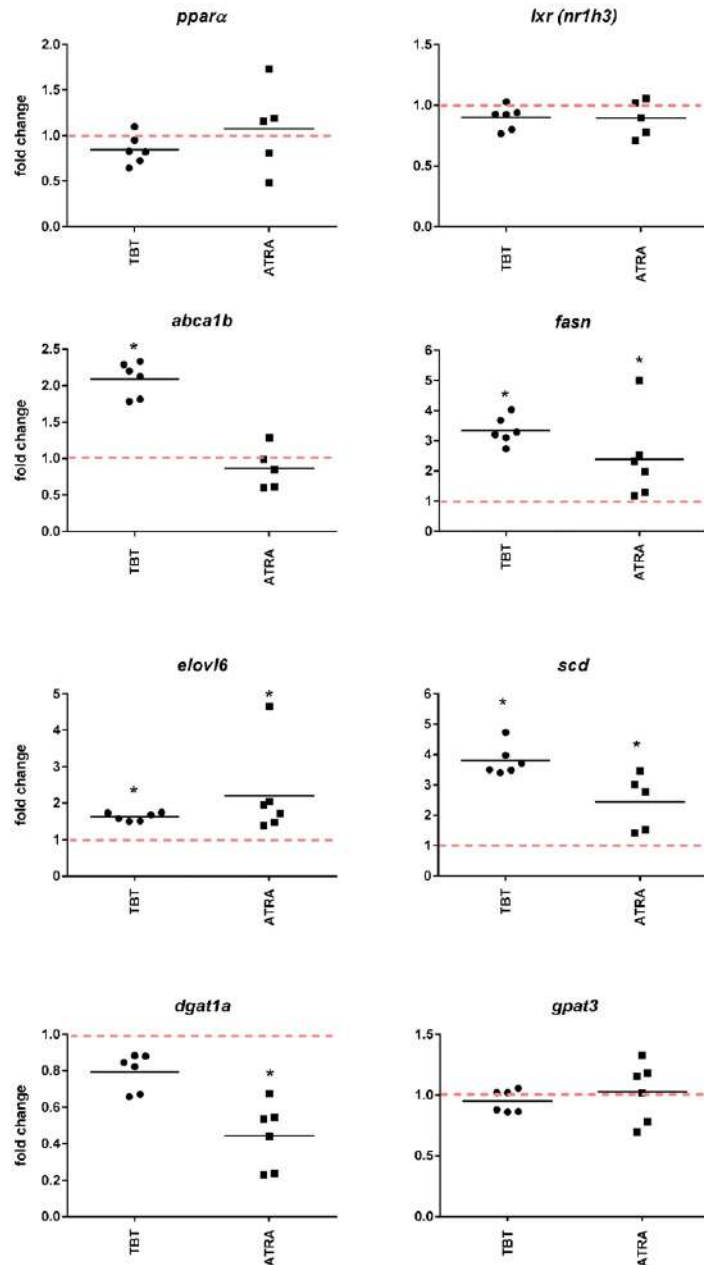


**Fig. 4.** Volcano plots showing differences in the lipid profile of A) PLHC-1 and B) ZFL cells exposed to 1 μM ATRA vs. control cells. The x-axis reflects the magnitude of the change (–log(fold change)) whilst the y-axis reflects the significance of change (–log(p-value)). Significantly altered lipids (fold change ≥ 1.5; p < 0.05) are colored in red.

Regardless of the different origin of PLHC-1 (derived from hepatocellular carcinoma) and ZFL (immortalized from a healthy liver) cells and its different lipid composition, exposure to TBT led to a dose-dependent accumulation of TGs and a concomitant increase of DGs at the medium and high exposure concentrations (100 and 200 nM TBT) in both cell models. The intracellular accumulation of TGs is in agreement with previous works that reported the accumulation of TGs in lipid droplets in fish and mammalian models through the activation of the peroxisome proliferator activated receptor PPAR $\gamma$  and retinoid X receptor (Kanayama et al., 2004; Grün and Blumberg, 2006; Capitão et al., 2017). DGs are small size lipids present in biological membranes, which act as intermediates in lipid metabolism (e.g. synthesis of THs), but also play a role in signaling processes as second messengers (Carrasco and Mérida, 2007). The intracellular accumulation of TGs is in agreement with previous works that reported the accumulation of TGs in lipid droplets in both fish and mammalian models by the activation of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) $\gamma$  and retinoid X receptor (Kanayama et al., 2004; Grün and Blumberg, 2006; Capitão et al., 2017).

Another common feature detected in both cell lines after exposure to the highest concentration of TBT (200 nM) was a significant decrease of ether-

glycerophospholipids (PC-P/PC-O, PE-P/PE-O). The analytical approach used did not allow differentiating between plasmanyl- (PC-O, PE-O) and plasmenyl-/plasmalogen (PC-P, PE-P) isomeric species. Nevertheless, a large proportion of PC-P/-O species, particularly the highly unsaturated ones were tentatively annotated as PC-Ps after derivatization of PLHC-1 lipid extracts with iodine (Pérez-Albaladejo et al., unpublished results). Similarly, the lipid profile of ZFL cells has been analysed by UHPLC-HRMS/MS identifying a larger number of ether-GPs as plasmalogens (56 plasmalogens vs 37 plasmanyls)(Marqueño et al., unpublished results). Plasmalogens act as scavengers by protecting unsaturated phospholipids from oxidation (Braverman and Moser, 2012). We have observed a strong decrease of PE-P/PE-Os in PLHC-1 and PC-P/PC-Os in ZFL cells after exposure to 200 nM TBT, probably due to oxidation of the vinyl-ether bond of plasmalogens, which is particularly susceptible to oxidative attack. Moreover, the relatively higher abundance of PC-P/-Os in ZFL cells (5.6%) in comparison to PLHC-1 (3.2%) may have conferred protection of membrane lipids against oxidative stress, and consequently, few glycerolipids were altered in ZFL cells after exposure to the highest concentration of TBT.



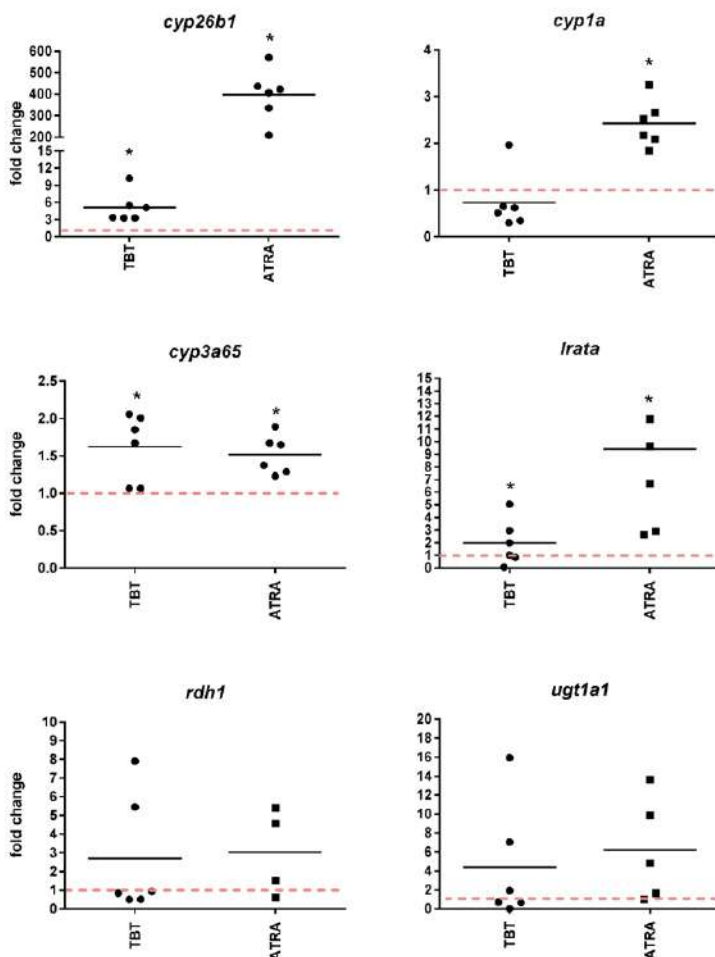
**Fig. 5.** Expression induction of hepatic genes related to lipid metabolism pathway in response to TBT and ATRA exposure in ZFL cells. The red dotted line indicates control value. \*Statistically significant differences from control ( $p < 0.05$ ).

Similar to TBT, ATRA disturbed the lipidome of PLHC-1 cells by greatly inducing the accumulation of TGs. The same effect was observed in ZFL cells, but less strong. The down regulation of *dgat1a*

expression by ATRA may have contributed to the relatively low accumulation of TGs in exposed cells. The effect of retinoic acid on lipid homeostasis is controversial since, typically, ATRA induces the loss of body fat

with the concomitant reduction in circulating TG levels in mammals (Bonet et al., 2012). RA induced lipid accumulation in zebrafish embryos, but it inhibited adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 fibroblasts (Fraher et al., 2015) However,

increased amount of intracellular lipid droplets were detected in human AML-1 preadipocytes exposed to ATRA for 4 to 6 days and Ob1771 cells that acquired an adipocyte-like phenotype (Safonova et al., 1994; Morikawa et al., 2013).



**Fig. 6.** Expression induction of hepatic genes related to retinol metabolism pathway in response to TBT and ATRA exposure in ZFL cells. The red dotted line indicates control value. \*Statistically significant differences from control ( $p < 0.05$ ).

Metabolic regulation of lipid homeostasis can occur through different mechanisms, such as allosteric control of enzyme activity, post-translational modifications and transcriptional regulation (Capitão et al., 2017). TBT activates RXR $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in mammals, and the corresponding orthologues in fish (Lyssimachou et al., 2015). While ATRA binds to RAR and PPAR  $\beta/\delta$  both of them forming a heterodimer with retinoic X receptor (RXR). Thus, several genes involved in lipid metabolism are regulated at the transcriptional level by RAR-dependent pathways (Bonet et al., 2012; Samarut et al., 2015). Regarding nuclear receptors, TBT and ATRA exposure did not modulate the expression of ppar $\alpha$  or lxr, while ppar $\beta$  and ppar $\gamma$  were almost not expressed in ZFL cells.

Nevertheless, we hypothesize that ligand activation of the RXR receptor by TBT and ATRA induced the transcription of genes encoding lipogenic enzymes, such as fasn, scd and elovl6 in ZFL cells, as previously described in other models (Weiss et al., 2011). The expression of fasn and abca1 were also significantly up-regulated in RTL-W1 cells exposed to 100 nM TBT (Dimastrogiovanni et al., 2015). Comparable responses were observed in-vivo, increased expression of the genes encoding lipogenic enzymes, fas (9.4-fold) and scd1 (3-fold) were found in the liver of zebrafish exposed to 100 ng·L<sup>-1</sup> TBT for 90 days together, and a concomitant increase in hepatic TG synthesis and development of steatosis (Zhang et al., 2016). On the other hand, the expression of genes involved in retinoic acid metabolism (cyp26b1, lrata) was highly up-regulated, indicating RAR activation by TBT and ATRA. Similarly, an up-regulation of cyp26b1, lrata, rdh1 and ugt1a1 was reported in zebrafish embryos exposed to ATRA (Navarro-Martín et al., 2018).

However, basal expression of rdh1 and ugt1a1 in ZFL cells was very low, and even though some replicates showed an up-regulation, a high variability was observed. Interestingly, exposure to TBT increased the expression of the same genes in the present study, which suggests its ability to interfere with retinoids homeostasis.

The up-regulation of cyp1a expression by ATRA was also detected in-vivo in juvenile Atlantic salmon exposed to a mixture of ATRA and 9-cis RA, and suggests an interaction between retinoids and the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Arukwe and Nordbø, 2008). On the contrary, cyp1a expression was not altered TBT, which acts as a CYP1A inhibitor in fish cells by direct inhibition of the enzyme activity without altering CYP1A synthesis (Brüschweiler et al., 1996). The expression of cyp3a65, which is under regulation of Pxr and Ahr2 (Kubota et al., 2019), was only slightly up-regulated by TBT and ATRA exposures. This is in contrast with the down-regulation detected in the liver of rare minnow exposed to TBT (Zhang et al., 2017b) and in zebrafish embryos exposed to RAs (Navarro-Martín et al., 2018). Eide et al. (2014) reported that Pxr signaling pathway was expressed in ZFL cells, but exposure to clotrimazole, a zebrafish Pxr ligand, did not change cyp3a65 expression in these cells, whereas a significant up-regulation was detected in primary hepatocytes.

Overall, PLHC-1 and ZFL cells showed comparable responses to TBT and ATRA to those previously reported in vivo in different fish models, both in terms of lipidomic signatures (accumulation of DGs and TGs) and changes in gene expression (up-regulation of lipid transcripts, scd, fasn, and elovl6). These findings support the use of the two fish models in combination with lipidomic techniques as alternative models for the screening of lipid disruptors in

aquatic organisms, particularly considering that the liver is the main organ involved in lipid metabolism and homeostasis. Additionally, these results show the usefulness of the ZFL cell line as a tool to study retinoid (cyp26b1, Irata) and xenobiotic metabolic processes (cyp1a) and for the identification of underlying mechanisms.

### Acknowledgments

Anna Marqueño acknowledges a pre-doctoral fellowship BES-2015-074842. Work financed by Ministerio de Ciencia e Innovación, under the projects CGL2014-52144-P and PGC2018-097513-B-I00.

### References

- Arukwe, A., Nordbø, B., 2008. Hepatic biotransformation responses in Atlantic salmon exposed to retinoic acids and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB congener 77). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 147, 470–482.
- Beloribi-Djefaflija, S., Vasseur, S., Guillaumond, F., 2016. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. 5, e189.
- Blanco, M., Pérez-Albaladejo, E., Piña, B., Kušpilić, G., Milun, V., Lille-Langøy, R., Karlsen, O.A., Goksøyr, A., Porte, C., 2018. Assessing the environmental quality of sediments from Split coastal area (Croatia) with a battery of cell-based bioassays. *Sci. Total Environ.* 624, 1640–1648.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Palou, A., 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 177–189.
- Braverman, N.E., Moser, A.B., 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1822, 1442–1452.
- Broeder, M.J. Den, Moester, M.J.B., Kamstra, J.H., Ceniñ, P.H., Legler, J., 2017. Altered Adipogenesis in Zebrafish Larvae Following High Fat Diet and Chemical Exposure Is Visualised by Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 894.
- Brüschweiler, B.J., Würzler, F.E., Fent, K., 1996. Inhibition of cytochrome P4501A by organotins in fish hepatoma cells PLHC-1. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 728–735.
- Capitão, A., Lyssimachou, A., Filipe, L., Castro, C., Santos, M.M., 2017. Obesogens in the aquatic environment: an evolutionary and toxicological perspective. *Environ. Int.* 106, 153–169.
- Carrasco, S., Mérida, I., 2007. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* 32, 27–36.
- Dimastrogiovanni, G., Córdoba, M., Navarro, I., Jáuregui, O., Porte, C., 2015. Alteration of cellular lipids and lipid metabolism markers in RTL-W1 cells exposed to model endocrine disrupters. *Aquat. Toxicol.* 165, 277–285.
- Eide, M., Rusten, M., Male, R., Helge, K., Jensen, M., Goksøyr, A., 2014. A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish ( *Danio rerio* ). *Aquat. Toxicol.* 147, 7–17.
- Fhaner, C.J., Liu, S., Ji, H., Simpson, R.J., Reid, G.E., 2012. Comprehensive lipidome profiling of isogenic primary and metastatic colon adenocarcinoma cell lines. *Anal. Chem.* 84, 8917–8926.
- Fraher, D., Ellis, M.K., Morrison, S., McGee, S.L., Ward, A.C., Walder, K., Gibert, Y., 2015. Lipid abundance in zebrafish embryos is regulated by complementary actions of the endocannabinoid system and retinoic acid pathway. *Endocrinology* 156, 3596–3609.
- Granadeiro, L., Dirks, R.P., Ortiz-Delgado, J.B., Gavaia, P.J., Sarasquete, C., Laizé, V., Cancela, M.L., Fernández, I., 2019. Warfarin-exposed zebrafish embryos resembles human warfarin embryopathy in a dose and developmental-time dependent manner – From molecular mechanisms to environmental concerns. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 181, 559–571.
- Grün, F., Blumberg, B., 2006. Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147, 50–55.
- Jordão, R., Garreta, E., Campos, B., Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Tauler, R., Barata, C., 2016. Compounds altering fat storage in *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.* 545-546, 127–136.
- Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishu, T., Nishikawa, J., 2004. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  / retinoid X receptor (RXR) pathway. *Molecular Pharmacology* 67, 766-774.
- Kubota, A., Kawai, Y.K., Yamashita, N., Lee, J.S., Kondoh, D., Zhang, S., Nishi, Y., Suzuki, K., Kitazawa, T., Teraoka, H., 2019. Transcriptional profiling of cytochrome P450 genes in the liver of adult zebrafish, *Danio rerio*. *J. Toxicol. Sci.* 44, 347–356.
- Li, N., Kelsh, R.N., Croucher, P., Roehl, H.H., 2010. Regulation of neural crest cell fate by the retinoic acid and Pparg signalling pathways. *Development* 137, 389–394.
- Lutfi, E., Riera-Heredia, N., Córdoba, M., Porte, C., Gutiérrez, J., Capilla, E., Navarro, I., 2017. Tributyltin and triphenyltin exposure promotes in vitro adipogenic differentiation but alters the



- adipocyte phenotype in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 188, 148–158.
- Lyssimachou, A., Navarro, J.C., Bachmann, J., Porte, C., 2009. Triphenyltin alters lipid homeostasis in females of the ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. *Environ. Pollut.* 157, 1714–1720.
- Lyssimachou, A., Santos, J.G., André, A., Soares, J., Lima, D., Guimarães, L., Almeida, C.M.R., Teixeira, C., Castro, L.F.C., Santos, M.M., 2015. The mammalian “obesogen” tributyltin targets hepatic triglyceride accumulation and the transcriptional regulation of lipid metabolism in the liver and brain of zebrafish. *PLoS One* 10, 1–22.
- Marqueño, A., Blanco, M., Maceda-Veiga, A., Porte, C., 2019a. Skeletal Muscle Lipidomics as a New Tool to Determine Altered Lipid Homeostasis in Fish Exposed to Urban and Industrial Wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* 53, 8416–8425.
- Marqueño, A., Pérez-Albaladejo, E., Flores, C., Moyano, E., Porte, C., 2019b. Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells. *Environ. Pollut.* 244, 513–521.
- Meador, J.P., Sommers, F.C., Cooper, K.A., Yanagida, G., 2011. Tributyltin and the obesogen metabolic syndrome in a salmonid. *Environ. Res.* 111, 50–56.
- Melvin, S.D., Lanctôt, C.M., Doriean, N.J.C., Bennett, W.W., Carroll, A.R., 2019. NMR-based lipidomics of fish from a metal(loid) contaminated wetland show differences consistent with effects on cellular membranes and energy storage. *Sci. Total Environ.* 654, 284–291.
- Morikawa, K., Hanada, H., Hirota, K., Nonaka, M., Ikeda, C., 2013. All-trans retinoic acid displays multiple effects on the growth, lipogenesis and adipokine gene expression of AML-I preadipocyte cell line. *Cell Biol. Int.* 37, 36–46.
- Mu, X., Liu, J., Yang, K., Huang, Y., Li, X., Yang, W., Qi, S., Tu, W., Shen, G., Li, Y., 2018. 0# Diesel water-accommodated fraction induced lipid homeostasis alteration in zebrafish embryos. *Environ. Pollut.* 242, 952–961.
- Navarro-Martín, L., Oliveira, E., Casado, M., Barata, C., Piña, B., 2018. Dysregulatory effects of retinoic acid isomers in late zebrafish embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 3849–3859.
- Ouah-Boussouf, N., Babin, P.J., 2016. Pharmacological evaluation of the mechanisms involved in increased adiposity in zebrafish triggered by the environmental contaminant tributyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 294, 32–42.
- Pérez-Albaladejo, E., Rizzi, J., Fernandes, D., Lille-Langø, R., Karlsen, O.A., Goksøyr, A., Oros, A., Spagnoli, F., Porte, C., 2016. Assessment of the environmental quality of coastal sediments by using a combination of in vitro bioassays. *Mar. Pollut. Bull.* 108, 53–61.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Postic, C., Dentin, R., Girard, J., 2004. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 30, 398–408.
- Rehberger, K., Kropf, C., Segner, H., 2018. In vitro or not in vitro: a short journey through a long history. *Environ. Sci. Eur.* 30, 23.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., Shroot, B., 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104, 201–211.
- Samarut, E., Fraher, D., Laudet, V., Gibert, Y., 2015. ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 73–83.
- Santos, C.R., Schulze, A., 2012. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 279, 2610–2623.
- Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224, 163–183.
- Tang, C.H., Shi, S.H., Lin, C.Y., Li, H.H., Wang, W.H., 2019. Using lipidomic methodology to characterize coral response to herbicide contamination and develop an early biomonitoring model. *Sci. Total Environ.* 648, 1275–1283.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107–184.
- Villeneuve, D.L., Larkin, P., Knoebel, I., Miracle, A.L., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Durhan, E.J., Carter, B.J., Denslow, N.D., Ankley, G.T., 2007. A graphical systems model to facilitate hypothesis-driven ecotoxicogenomics research on the teleost brain-pituitary-gonadal axis. *Environ. Sci. Technol.* 41, 321–330.
- Weiss, K., Mihály, J., Liebisch, G., Marosvölgyi, T., Schmitz, G., Decsi, T., Rühl, R., 2011. Effect of synthetic ligands of PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ , RAR, RXR and LXR on the fatty acid composition of phospholipids in Mice. *Lipids* 46, 1013–1020.
- Xia, J., Wishart, D.S., 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 55, 14.10.1–14.10.91.
- Yang, J., Chan, K.M., 2015. Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol a (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquat. Toxicol.* 159, 138–147.
- Zhang, J., Sun, P., Kong, T., Yang, F., Guan, W., 2016. Tributyltin promoted hepatic steatosis in zebrafish (*Danio rerio*) and the molecular pathogenesis involved. *Aquat. Toxicol.* 170, 208–215.
- Zhang, J., Zhang, C., Ma, D., Liu, M., Huang, S., 2017a. Lipid accumulation, oxidative stress and immune-

- related molecules affected by tributyltin exposure in muscle tissues of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Fish Shellfish Immunol.* 71, 10–18.
- Zhang, J., Zhang, C., Sun, P., Huang, M., Fan, M., Liu, M., 2017b. RNA-sequencing and pathway analysis reveal alteration of hepatic steroid biosynthesis and retinol metabolism by tributyltin exposure in male rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquat. Toxicol.* 188, 109–118.
- Ouadah-Boussouf, N., Babin, P.J., 2016. Pharmacological evaluation of the mechanisms involved in increased adiposity in zebrafish triggered by the environmental contaminant tributyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 294, 32–42.
- Pereira-Fernandes, A., Demaegdt, H., Vandermeiren, K., Hectors, T.L.M., Jorens, P.G., Blust, R., Vanparrys, C., 2013. Evaluation of a Screening System for Obesogenic Compounds: Screening of Endocrine Disrupting Compounds and Evaluation of the PPAR Dependency of the Effect. *PLoS One* 8, 1–17.
- Pérez-Albaladejo, E., Rizzi, J., Fernandes, D., Lille-Langøy, R., Karlsen, O.A., Goksøyr, A., Oros, A., Spagnoli, F., Porte, C., 2016. Assessment of the environmental quality of coastal sediments by using a combination of in vitro bioassays. *Mar. Pollut. Bull.* 108, 53–61.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Postic, C., Dentin, R., Girard, J., 2004. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 30, 398–408.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., Shroot, B., 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104, 201–211.
- Samarut, E., Fraher, D., Laudet, V., Gibert, Y., 2015. ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 73–83.
- Santos, C.R., Schulze, A., 2012. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 279, 2610–2623.
- Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224, 163–183.
- Weiss, K., Mihály, J., Liebisch, G., Marosvölgyi, T., Garcia, A.L., Schmitz, G., Decsi, T., Rühl, R., 2014. Effect of high versus low doses of fat and vitamin A dietary supplementation on fatty acid composition of phospholipids in mice. *Genes Nutr.* 9, 368.
- Xia, J., Wishart, D.S., 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 55, 14.10.1-14.10.91.
- Yang, J., Chan, K.M., 2015. Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol a (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquat. Toxicol.* 159, 138–147.
- Zhang, F., Du, G., 2012. Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J. Biol. Chem.* 3, 167–174.
- Zhang, J., Sun, P., Kong, T., Yang, F., Guan, W., 2016. Tributyltin promoted hepatic steatosis in zebrafish (*Danio rerio*) and the molecular pathogenesis involved. *Aquat. Toxicol.* 170, 208–215.
- Zhang, J., Zhang, C., Ma, D., Liu, M., Huang, S., 2017a. Lipid accumulation, oxidative stress and immune-related molecules affected by tributyltin exposure in muscle tissues of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *fish Shellfish Immunol.* 71, 10–18.
- Zhang, J., Zhang, C., Sun, P., Huang, M., Fan, M., Liu, M., 2017b. RNA-sequencing and pathway analysis reveal alteration of hepatic steroid biosynthesis and retinol metabolism by tributyltin exposure in male rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquat. Toxicol.* 188, 109–118.



**Informació suplementària de l'article “Dysregulation of lipid metabolism in PLHC-1 and ZFL cells exposed to tributyltin an all-trans retinoic acid”**

A. Marqueño, C. Flores, M. Casado, C. Porte

Submitted to *Ecotoxicology and environmental safety*

**Table S1.** Symbol and name of the genes selected in the study for gene expression analysis, classified by metabolic pathway.

Metabolic pathway	Gene symbol	Gene name
lipid metabolism	<i>abca1b</i>	ATP-binding cassette, sub-family A member 1b
	<i>fasn</i>	Fatty acid synthase
	<i>elovl6</i>	Long chain fatty acid elongase 6
	<i>scd</i>	Stearoyl-CoA desaturase
	<i>dgat1a</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 1a
	<i>dgat2</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 2
	<i>lpl</i>	Lipoprotein lipase
	<i>gpat3</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3
Retinoic metabolism	<i>cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1
	<i>lrata</i>	Lecithin retinol acyltransferase a
	<i>rdh1</i>	Retinol dehydrogenase 1
Receptors	<i>ugt1a1</i>	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1
	<i>cyp1a</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A
	<i>cyp3a65</i>	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 65
	<i>ppara</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
	<i>pparβ</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor beta
	<i>pparγ</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
	<i>cd36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
<i>lxr(nr1h3)</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	

**Table S2.** Zebrafish primer sequences for quantitative RT-PCR analysis and primer efficiency. Amplicon length is of 81 bp for all the studied genes.

Gene	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Efficiency (%)
<i>abca1b</i>	NM_001114586.2	FW: AGCTCAATCAGCCGTAAGGG RV: GGGCTTCTCCAGGCTGTCTT	101
<i>fasn</i>	XM_021472581.1	FW: CGACCCTACGTTCCCACT RV: CCATCTCCGACTCGCTGCT	91
<i>elovl6</i>	NM_199532.1	FW: CTATGCTCTTCGGGAGCC RV: ACCATCTGGGTGATCTGTGTCA	104
<i>scd</i>	NM_198815.2	FW: CACCACACGTTCCCTACGA RV: CATGGTGTCCACGAAGATGG	97
<i>dgat1a</i>	NM_199730.1	FW: CTGGGCGTTTCTGGGTATGA RV: GCGTTGCCATAGTTACCCCTC	94
<i>dgat2</i>	NM_001030196.1	FW: ACCCGCTTCGGTCTGAATG RV: TTCAGAGTGTTTCGTTGGACA	65
<i>lpl</i>	NM_131127.1	FW: TCCAGATCGTAGCATTGGGAT RV: CAGCCAGTTGGAAGGTCC	-
<i>gpat3</i>	NM_001002685.1	FW: TGACATTGCATCTTGCGGAA RV: CTCTGGATGACCCCATGAG	93
<i>cyp26b1</i>	AY321366.1	FW: GCTGTCAACCAGAACATTCCC RV: GGTCTGATTGGAGTCGAGGC	100
<i>lrata</i>	NM_001204131.2	FW: TTTTGTGGATGGCTGGTTGA RV: GTTGGACCGATGCATTTGAA	102
<i>rdh1</i>	NM_198069.1	FW: CGCACTTTCTGCACGTCATC RV: TGTCCACTACACAGTGGGC	86
<i>ugt1a1</i>	NM_001037428.2	FW: CGTTTGATTCTTGTCTGCTTG RV: AACCACTGGAGTAGCGAGGC	95
<i>cyp1a</i>	NM131879.2	FW: GGTAAAGTTCACCGGGATGC RV: CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG	96
<i>cyp3a65</i>	NM_001037438.1	FW: CGGAGAGCTTCAAACCGA RV: CCGACCGAACGGCATGTAC	91
<i>ppara</i>	DQ839548.1	FW: ATCCAAGCACGAACCATCC RV: TGGCCACAAATGTCTGTTCTG	107

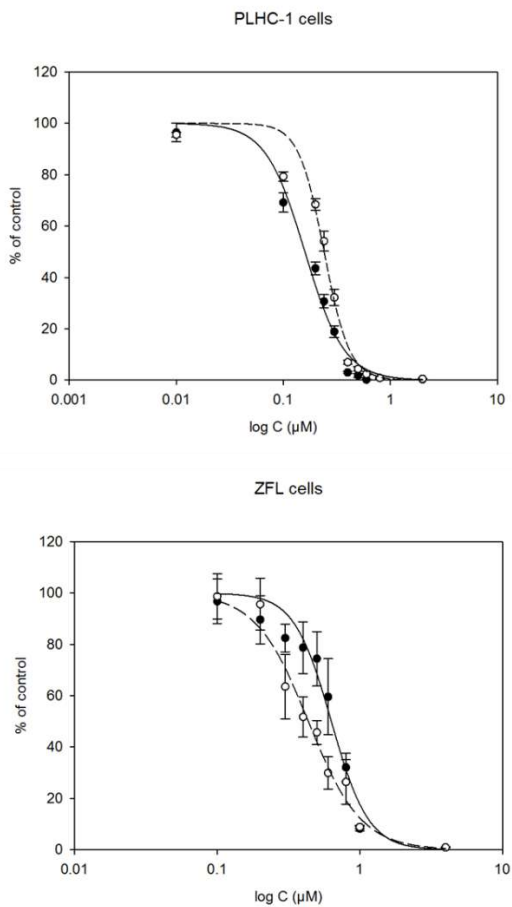
## TREBALL EXPERIMENTAL I RESULTATS

---

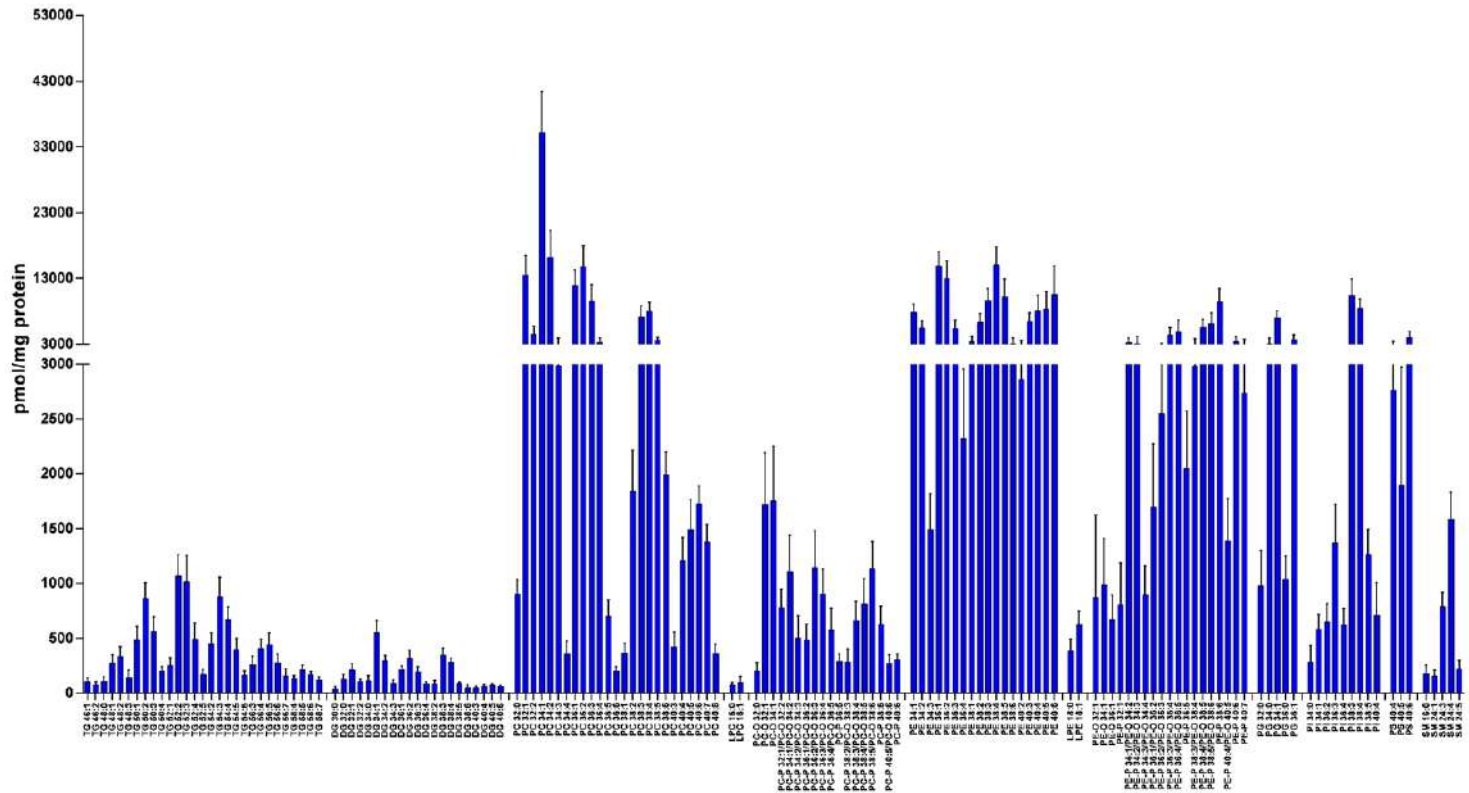
<i>pparβ</i>	AF342938.1	FW: GCGTAAGCTAGTCGCAGGTC RV: TGCACCAGAGAGTCCATGTC	-
<i>ppary</i>	NM_131467.1	FW: TCCCTCTGACCAAAGCCAAG RV: CTCGCCTTCCACCAGAGACT	-
<i>cd36</i>	NM_001002363.1	FW: TGAGGCCACTGTGAACCTGA RV: TTGGAAACTGGAGAAGCCAGA	-
<i>lxr(nr1h3)</i>	NM_001017545.3	FW: GACTAGGCCAAATGAGAGCAATTTG RV: AACCTGAATTGTGCATGCTCAC	95

---

**Figure S1.** Cytotoxicity measured with Alamar blue (solid line) and CFDA-AM (dotted line) in PLHC-1 and ZFL cells exposed to TBT for 24 h. Results are expressed as the percentage of viability in control cells (mean  $\pm$  SEM of three different assays).



**Figure S2.** Lipid profile of PLHC-1 cells indicating the total amount of the different lipid species detected. Values are mean  $\pm$  SD (n= 9). Lipid species are annotated as lipid class followed by 3 digits that indicate the number of carbons (2 digits) and number of double bonds (1 digit).

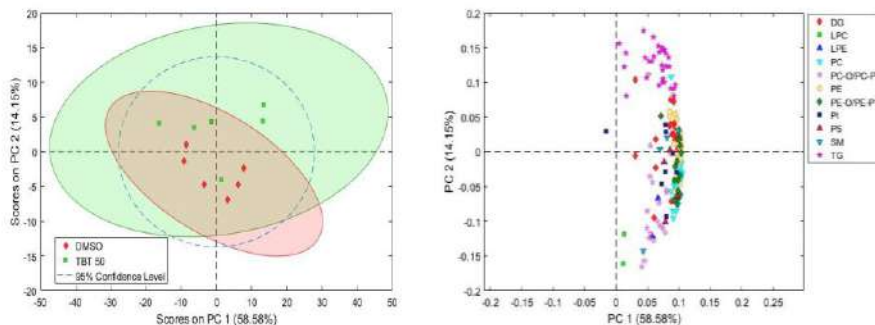




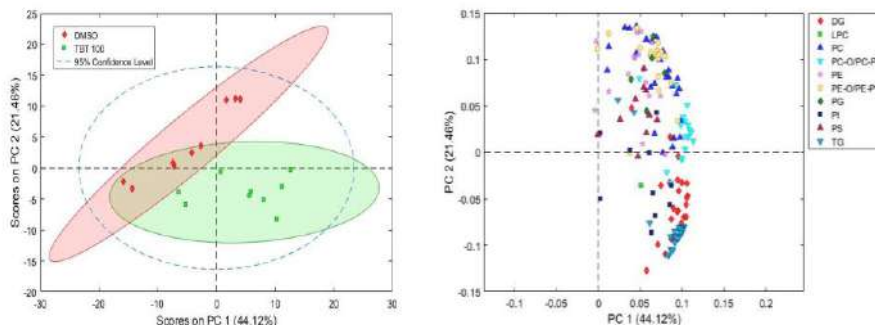


**Figure S4.** Principal component analysis (PCA) and loading plots of the variables generated (PC1 versus PC2) comparing the lipid profiles of PLHC-1 cells untreated and exposed to A) 50 B) 100 and C) 200 nM TBT.

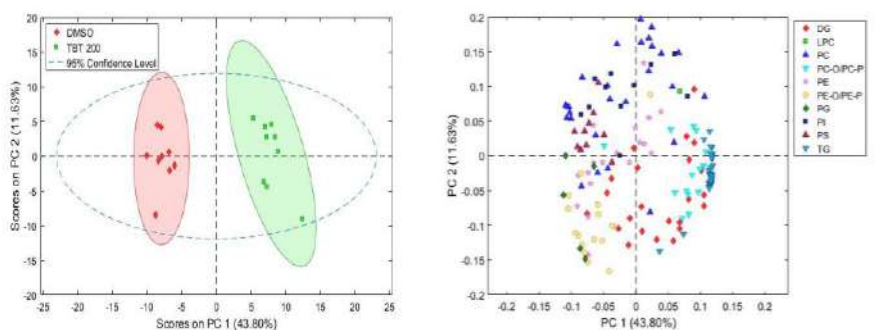
A)



B)

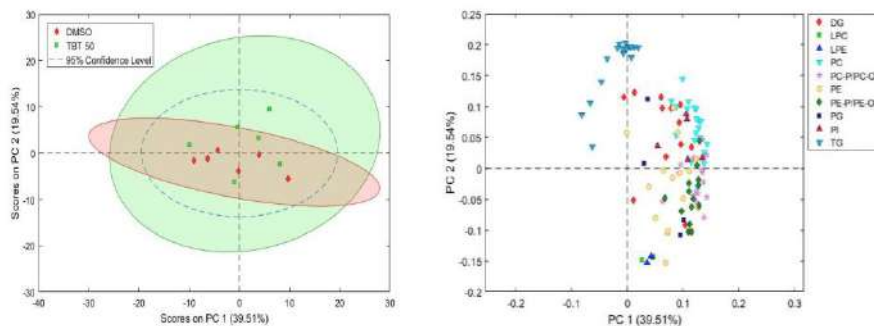


C)

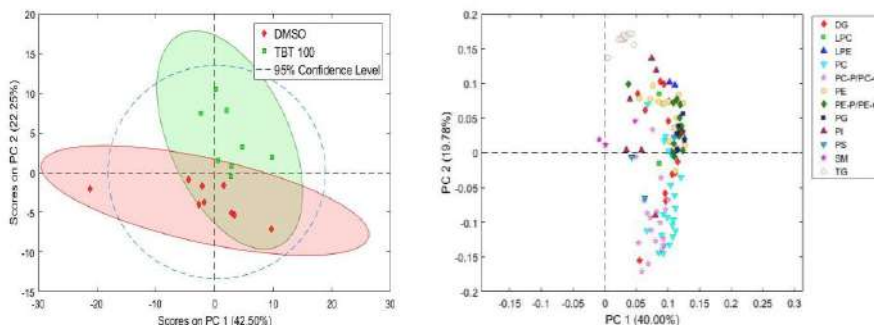


**Figure S5.** Principal component analysis (PCA) and loading plots of the variables generated (PC1 *versus* PC2) comparing the lipid profiles of ZFL cells untreated and exposed to A) 50 B) 100 and C) 200 nM TBT.

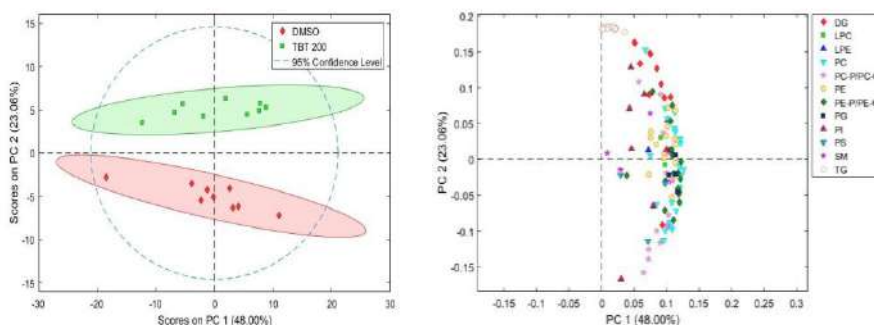
A)



B)

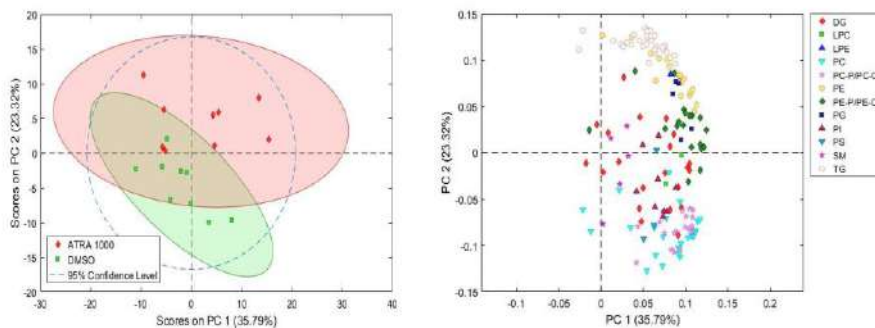


C)

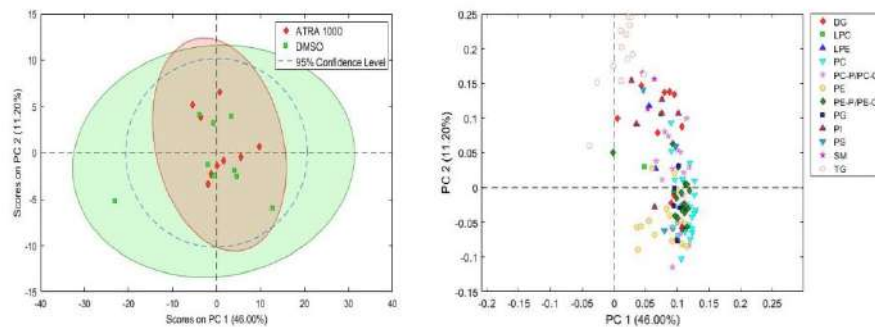


**Figure S6.** Principal component analysis (PCA) and loading plots of the variables generated (PC1 *versus* PC2) comparing the lipid profiles of control cells and cells exposed to 1 $\mu$ M ATRA in the cellular models A) PLHC-1 and B) ZFL.

A)



B)





### **2.2.2 Article científico III**

*Untargeted lipidomics shows the ability of bisphenol A and derivatives to alter lipid metabolism in zebrafish liver cells (ZFL)*

A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, N. Denslow, J.A. Bowden, C. Porte

Submitted to *Environmental Science & Technology*



## Untargeted lipidomics shows the ability of bisphenol A and derivatives to alter lipid metabolism in zebrafish liver cells (ZFL)

Anna Marqueño<sup>1</sup>, Elisabet Pérez-Albaladejo<sup>1</sup>, Nancy D. Denslow<sup>2</sup>, John A. Bowden<sup>2</sup>, Cinta Porte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Environmental Chemistry Department, IDAEA –CSIC-, C/ Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Department of Physiological Sciences, Center for Environmental and Human Toxicology, College of Veterinary Medicine, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

### ABSTRACT

Zebrafish liver (ZFL) cells are used as an alternative *in vitro* method to detect the ability of bisphenol A (BPA) and its derivatives bisphenol F (BPF) and bisphenol A bis(3-chloro-2-hydroxypropyl) ether (BADGE-2HCl) to alter hepatic lipid homeostasis in fish. Marine organisms are widely exposed to these compounds, however, there is limited information about their lipid disruptive effect in aquatic organisms. A lipidomics approach was applied to decipher the effect of these compounds in ZFL cells. As a common feature, all three compounds increased intracellular levels of dihydroceramides and ether-triacylglycerols (TGs). However, while BPA and BADGE-2HCl caused the increase of saturated and lower unsaturated TGs, BPF decreased a large number of TGs containing polyunsaturated fatty acids (PUFAs). On the other hand, BPA and BPF generated significant levels of reactive oxygen species (ROS) in ZFL cells and led to an increase of lysophosphatidylcholines (LPCs) and lysophosphatidylethanolamines (LPEs) in culture medium. Analysis by qPCR highlighted the up-regulation of the lipogenic genes *scd* and *elov16* by BPA and BPF. This study shows the ability of BPA, BPF and BADGE-2HCl at the low  $\mu\text{M}$  range to target lipid homeostasis of ZFL through different mechanisms.

**Keywords:** BPA, BPF, BADGE-2HCl, plastic additives, qPCR, lipidomics

### 1. Introduction

The world plastic production almost reached 350 million tons in 2017, 64 million tones in Europe, from which only 8.4 million tons were collected in order to be recycled (PlasticsEurope, 2018). These plastic products contain complex mixtures of chemicals, including residual or unreacted monomers, and different plastic additives that confer flexibility, elasticity, color, resistance or durability to polymers, and often make up a large proportion of the plastic product. They are not chemically bound to the polymer and once in the aquatic environment, they can easily leach out

and contaminate water and biota. Flame retardants, phthalates, alkylphenols and bisphenol A (BPA) are among the most common plastic additives found in the aquatic environment (Ludovic et al., 2017).

BPA occurrence in aquatic systems has been documented at concentrations in the range of  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (Lv et al., 2019; Yang et al., 2014). BPA is an endocrine disrupting chemical (EDC) with adverse effects on fish reproduction. BPA altered male germ cell maturation and reduced ovarian maturation in goldfish (Wang et al., 2019). It decreased sperm quality (motility and velocity) through modifications of testicular



steroidogenesis in exposed male goldfish (Hatef et al., 2012), and down-regulated oocyte maturation-promoting signals and caused apoptosis in mature follicles in female zebrafish (Santangeli et al., 2016). Moreover, BPA has been classified as an obesogenic compound in mammalian models (Legeay and Faure, 2017), it induced hepatic lipid accumulation and steatosis in *Sparus aurata* juveniles after 3 weeks exposure (Maradonna et al., 2015), and dysregulated lipid metabolism following a non-monotonic trend, it promoted fatty acid (FA) synthesis and triacylglycerides (TGs) storage at low doses, and induced *de novo* lipogenesis and cholesterogenesis at the highest concentration in zebrafish liver (Santangeli et al., 2018).

Due to toxicological concerns, the use of alternative BPA analogs (e.g. BPF) has increased in the last years. BPF has been detected in waste water treatment plant effluents and in seawater at concentrations slightly higher than BPA itself (Xue and Kannan, 2019; Zhao et al., 2019). The presence of both, BPA and BPF has been registered in marine organisms, specifically in molluscs and fish at the low  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  level (Xue and Kannan, 2019). BPF is as hormonally active as BPA, causing endocrine disrupting-effects, viz. it induced uterine growth and an increment of the testis weight in rats (Rochester and Bolden, 2015). As other endocrine disrupting compounds, BPF is able to disrupt lipid homeostasis. Zhao et al. (2018) showed the ability of BPF to perturbate the biosynthesis and the degradation of glycerophospholipids (GPs) and glycerolipids (GLs) in the kidney of mice subcutaneously implanted with breast cancer cells, altering membrane homeostasis and cellular function. BPF did not alter the lipid content of mature

adipocytes but mice treated through the diet with BPF gained less weight than controls (Drobna et al., 2019). BPF induced a strong decrease in GLs and GPs, including plasmalogens, lipids involved in cell protection against oxidative stress in PLHC-1 cells (Pérez-Albaladejo et al. Data not published).

Xue and Kannan (2016) reported the accumulation of BPA derivatives in marine mammal, particularly bisphenol A bis(3-chloro-2-hydroxypropyl) ether (BADGE-2HCl), which was detected at levels up to  $\sim 3000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  in found in the liver of a sea otter from Kachemak Bay, Alaska. Its high abundance in the marine ecosystem can be explained due to the use of epoxy-based resins in marine infrastructures, as paints used on ships and oil platforms, and the reaction of BADGE with chloride ions present in seawater. BADGE-2HCl was shown to interfere with lipid metabolism by significantly decreasing diacylglycerides (DGs) and TGs together with some membrane lipids (GPs) in the human placental *in vitro* model JEG-3 (Marqueño et al., 2019). A strong depletion of TGs was observed in the fish cell model PLHC-1 (Pérez-Albaladejo et al. Data not published).

*In vitro* methods have been described as suitable alternatives to *in vivo* assays to discover key events within adverse outcome pathways (AOP), which are conceptual frameworks that organize biologically plausible and empirically supported knowledge, linking molecular-level perturbations (key events) of a biological system with adverse outcomes (Villeneuve et al., 2014). As an example, the AOP for chemical-induced liver steatosis shows as a key event the accumulation of TGs within the molecular effects (Vinken, 2013), an effect that could easily be screened using *in vitro* models. In *in*

*vitro* lipidomics, both cellular lipids and lipids present in the culture medium can potentially be analyzed. Alterations of cellular lipids mainly provide information on changes in cell membrane conformation and energy storage lipids, while the analysis of the lipids excreted into the culture medium could provide additional information, giving insights into the catabolism and signaling pathway of lipids. Similarly, the content of glycerol in the culture medium has been used as a measure to evaluate lipolytic activity in adipocytes, linking the decrease on TGs in the cells with a concomitant increase of free glycerol in the medium (Lee et al., 2011).

The zebrafish liver cell line ZFL has been successfully used to assess the cytotoxicity and changes in gene transcription associated to xenobiotic exposure. The election of this cell line for the study of lipid disruption is supported by the fact that liver is a key organ for lipid homeostasis, where *de novo* lipogenesis takes place (Bonet et al., 2012).

Within this context, the aim of this work was to evaluate the ability of BPA and derivatives (BPF and BADGE-2HCl) to alter the lipid homeostasis of fish hepatic cells by using the zebrafish liver cell line ZFL as a model. A lipidomic approach was used to characterize the cellular lipid profile, and several transcripts involved in lipid and xenobiotic metabolism were measured as a complementary tool. The analysis of lipids in culture medium was performed to assess lipid catabolism and signaling events.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Cell culture

ZFL cells, obtained from American Type Culture Collection (ATCC HTB- 36), were grown in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 5 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5 g·L<sup>-1</sup> sodium bicarbonate, 50 U/mL penicillin and, 50 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin (Gibco, UK). Cells were routinely cultured in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning; NY, USA) in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 30°C. When confluence was reached, cells were dissociated with 0.25% (w/v) trypsin. Experiments were carried out on confluent cell monolayers from passages 10 to 35. Exposure to xenobiotics was done in serum free medium (SFM). Control cells received 0.5% DMSO, which was used as a carrier in exposed cells.

### 2.2 Cytotoxicity and ROS generation assays

For the assessment of cytotoxicity, ZFL cells were seeded at a density of 6·10<sup>4</sup> cells per well in 96-well plates and allowed to attach overnight. Cells were exposed to different doses of BPA, BPF, and BADGE-2HCl (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) for 24 hours. Each treatment was performed in three different plates with cells from different passages. Measurement of cytotoxicity was performed using Alamar Blue (AB; excitation/emission: 530/590 nm) (Biosource, Solingen, Germany) and 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester (CFDA-AM; ex/em: 485/530 nm) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

For measuring the production of reactive oxygen species (ROS) in ZFL cells, cells were seeded at a density of 8·10<sup>4</sup> cells per well in 96-well plates, allowed to attach overnight and

incubated with 20 mM H<sub>2</sub>DCF-DA (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in 1:10 DPBS and 10 mM glucose for 30 min, washed and exposed to different doses of BPA, BPF and BADGE·2HCl for 15 min. 3-Morpholinopyridone (SIN-1; 5 mM) (Sigma Aldrich) was used as a positive control. The fluorescence of oxidized DCF was measured at ex/em 485/528 nm, and results were expressed as fold change of fluorescence respect to control wells.

### 2.3 Cells exposure for lipid analysis

Cells were seed in 24-well plates at a density of  $9 \cdot 10^5$  cells per well in complete growth medium and allowed to attach overnight. Cells were exposed to three non-cytotoxic concentrations of each compound, namely, 5, 20 and 50  $\mu$ M of BPA and BPF and 1, 5 and 10  $\mu$ M of BADGE·2HCl. After 24 h of exposure, the culture medium was collected and cells were rinsed with PBS, trypsinized and collected. Cell pellets and medium were stored at -80 °C under argon atmosphere until extraction. The experiment was carried out using eight replicates with cells from four different passages.

Lipids from both, culture medium and cells, were extracted using the Folch method (methanol:chloroform (1:2 v/v) + 0.01% butylated hydroxytoluene) (Folch et al., 1957). An internal standard mixture, containing 17:0 triacylglycerol (TG), 1,3-17:0 d<sub>5</sub> diacylglycerol (DG), 17:0 lysophosphatidylcholine (LPC), 16:0 d<sub>31</sub>-18:1 phosphatidylcholine (PC), 16:0 d<sub>31</sub>-18:1 phosphatidylserine (PS), 16:0 d<sub>31</sub>-18:1 phosphatidylethanolamine (PE), 16:0 d<sub>31</sub>-18:1 phosphatidylinositol (PI), 16:0 d<sub>31</sub> sphingomyelin (SM) and 17:0 cholesteryl ester (CE) prepared in methanol, was added to the samples (at concentrations between 100 and 200

pmol, depending on the cellular abundance of the lipid subclasses) pre-extraction (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). The extracts were evaporated to dryness and stored at -20 °C under argon atmosphere and reconstituted in isopropanol for analysis.

### 2.4 Analysis of cellular lipids

Cellular lipids were analyzed by an ultra-high pressure liquid chromatograph (UHPLC) coupled to a high resolution orbitrap mass spectrometer (MS; Q-Exactive, Thermo Fisher) operating with heated electrospray ionization operating in both positive and negative polarity modes. Extracts were injected onto a Waters Acquity BEH C18 column (50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters, Milford, MA, USA) maintained at 30 °C. The mobile phases employed were A) 60:40 acetonitrile:water, volume fraction; and B) 90:10 isopropanol:acetonitrile (volume fraction), both containing 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid. The programmed gradient was: 40% B at 0 min, 55% B at 7 min, 65% B at 8 min, 65% B at 12 min, 95% B at 20 min, 100% B at 22 min, 100% B at 27 min, 40% B from 27 to 30 min. at 27.1 min and stay at 40 % B until 30 min. The flow rate was set to 400  $\mu$ L·min<sup>-1</sup>. Spray voltage was set to 3.5 and 2.5 kV for positive and negative polarities, respectively; and the capillary temperature was 320 °C and 350 °C (+/-), sheath gas was set to 50 arbitrary units (a.u.) and auxiliary gas was set to 12 a.u. in both polarities. Acquisition of mass spectra was performed in *full scan* mode for all samples with a mass resolution of 70,000 FWHM, (*m/z* 200) and data dependent tandem mass spectrometry (ddMS2-top10) was performed with pooled samples

representative of each different treatment, in both positive and negative polarities with a mass resolution of 35.000 FWHM, ( $m/z$  200). For ddMS2-top10, iterative exclusion was also applied. In brief, an exclusion list containing lipids selected for fragmentation in the first ddMS2 injection were iteratively included in the acquisition method for subsequent injections. In this study, two iterations beyond the first ddMS2 analysis were performed, leading to MS/MS spectra for the top-30 lipids. The exclusion lists were generated using the open-source software IE-Omics (Koelmel et al., 2017a).

Instrument performance over time was evaluated by including technical quality controls (internal standard mix solution) every 20 samples. Extraction quality controls (National Institute of Standards and Technology Standard Reference Material (SRM) 1950, Metabolites in Frozen Human Plasma) were injected every 20 samples and the final quantification of lipids in the SRM extracts was compared with consensus values available via literature in a previous community-based interlaboratory comparison exercise using an open-source program called LipidQC (Ulmer et al., 2017). Sample acquisition was randomized to reduce variability occurring from injection sequence.

Putative identification of lipids was performed using LipidMatch Flow software (Koelmel et al., 2017b). The workflow includes MSConvert that converts .RAW files into an .mzXML format, MZmine for peak picking, and LipidMatch for identification using the most comprehensive open-source in-silico MS/MS library to date, which combines resulting lipid adducts and polarities into a single file.

Quantification of the lipids was performed using internal standards representative for each lipid subclass (see SI for details)..

## 2.5 Lipid analysis in the culture medium

Lipids present in the culture medium were analyzed using the method described elsewhere (Marqueño et al., 2019). Briefly, flow injection analysis (FIA) was used to introduce five  $\mu\text{L}$  of sample (extract reconstituted in methanol) into the mass spectrometer (Orbitrap-Exactive) at a flow rate of  $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  using methanol:dichloromethane (80:20) (Merck, Darmstadt, Germany) as mobile phase. The acquisition was performed in *full scan* mode using polarity switching. Positive identification of the lipids was based on the accurate mass measurement (error < 5 ppm), its characteristic isotopic distribution, charge, adduct formation, number of rings plus double bonds ( $\text{RDB}=0.5-15$ ) and elements in the molecular formula. Quantification of the lipids was performed by using the internal standard, which consisted in a mixture of representative lipids for each lipid subclass.

## 2.6 Real-time PCR

ZFL cells were seeded in 6-well plates at a density of  $1.6\cdot 10^6$  cells per well and allowed to attach overnight. Cells were exposed to 20  $\mu\text{M}$  BPA, 20  $\mu\text{M}$  BPF and 5  $\mu\text{M}$  BADGE-2HCl. After 24 h of exposure, the culture medium was removed and total RNA was isolated by using the TRIzol reagent protocol (Invitrogen Life Technologies, Carlberg, Denmark). Six biological replicates from different cell passages were used.

The quantity and quality of isolated RNA were measured by

spectrophotometric absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-8000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The obtained RNA was treated with DNaseI (Ambion, Austin, TX, USA) and retro-transcribed into cDNA using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), following the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted 1:2 and two aliquots were stored at -80 °C for qRT-PCR.

Primer sequences for *liver X receptor* (*lxr*; *nr1h3*), *fatty acid synthase* (*fasn*), *stearoyl-CoA desaturase* (*scd*), *long chain fatty acid elongase 6* (*elovl6*), *diacylglycerol O-acyltransferase 1a* (*dgat1a*), *glycerol-3-phosphate acyltransferase 3* (*gpat3*), *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*  (*ppar $\alpha$* ), *ATP-binding cassette, sub-family A member 1b* (*abca1b*), *cytochrome P450 family 1 subfamily A* (*cyp1a*) and, *cytochrome P450 family 3 subfamily A polypeptide 65* (*cyp3a65*) were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers accession number, sequences, amplicon lengths and efficiency are described in Table S1 (Supporting Information, SI). Quantification of transcripts abundance was carried out in a LightCycler 480 Real-Time PCR System (F. Hoffmann-La Roche) with SYBR-Green Mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Housekeeping gene *ppiaa* was selected as reference gene due to the high stability of mRNA levels upon treatments. A detection range with a cut-off at >37 cycles was adopted since negative controls were not interfering in this concentration range.

Relative mRNA abundances of different genes were calculated from the second derivative maximum of their

respective amplification curves (Cp, in duplicates). To minimize errors in RNA quantification among different samples, Cp values of target genes (Cptg) were corrected to the correspondent Cp values of the reference *ppia* gene:  $\text{corrCptg} = \text{Cptg} - \text{Cpppia}$ . Changes in mRNA abundance in treated samples were calculated by the  $\Delta\Delta\text{Cp}$  method (Pfaffl, 2001) using corrected Cp values:  $\Delta\Delta\text{Cp} = \text{corr Cptg}_{\text{untreated}} - \text{Cptg}_{\text{treated}}$ .

## 2.7 Statistical analysis

Dose-response curves and concentrations causing a 50% decline in cell viability ( $\text{EC}_{50}$ ) were generated by using Sigmaplot 13.0 software. One-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test was used to detect significant differences from control in ROS assays and gene expression (SPSS 25.0 software package, Chicago, IL). The level of significance was set at  $p < 0.05$ . Lipid profiles were analyzed by using the *online* software Metaboanalyst 4.0 (Xia and Wishart, 2016). Lipid concentrations detected in culture medium were autoscaled prior to univariate analysis, and volcano plot was obtained to visualize the lipids that significantly changed after exposure (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ , Student *t*-test).

## 3. Results

### 3.1 Cytotoxicity and oxidative stress

Dose-response curves for BPA, BPF, and BADGE-2HCl and the concentrations leading to 50% decline in cell viability ( $\text{EC}_{50}$ ) are shown in Table 1 and Fig. S1 (SI). Among the tested plasticizers, BADGE-2HCl was the most cytotoxic as it induced a 50% decline in cell viability at a concentration of 15.7-16.0  $\mu\text{M}$ . BPA

was the less cytotoxic ( $EC_{50}$ : 132  $\mu$ M), followed by BPF ( $EC_{50}$ : 343-387  $\mu$ M).

**Table 1.** Concentrations leading to a 50% decline in cell viability ( $EC_{50}$ ) in ZFL cells exposed to BPA, BPF and BADGE-2HCl for 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of six replicates in three different plates. AB: Alamar Blue assay. CFDA-AM: 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester assay.

Compound	AB	CFDA-AM
BPA	132 $\pm$ 6	132 $\pm$ 12
BPF	387 $\pm$ 13	343 $\pm$ 15
BADGE-2HCl	16.0 $\pm$ 0.2	15.7 $\pm$ 0.4

Even though BPF was the less cytotoxic compound, it significantly induced the generation of ROS after 15 min exposure at the range of concentrations tested (5-500  $\mu$ M); the maximum induction was of 3.2-fold at 50  $\mu$ M BPF. BPA weakly induced ROS generation (up to 1.4-fold) from 20 to 200  $\mu$ M, while BADGE-2HCl did not produce a significant increase of ROS in exposed cells (Fig. 1).

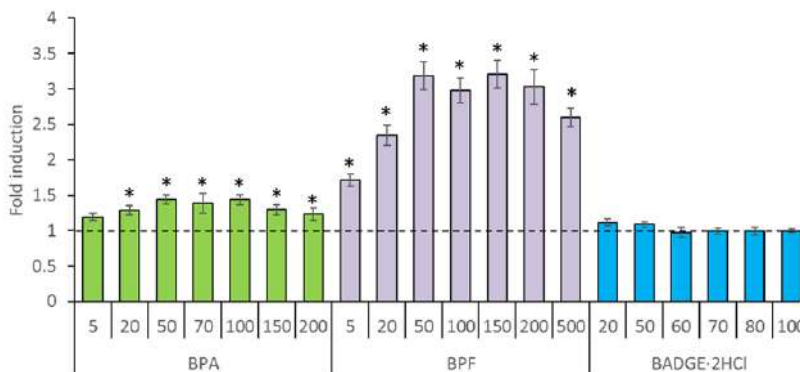
### 3.2 Cellular lipids

The lipidomic analysis identified 553 lipid species across 27 lipid subclasses in the ZFL cell line. The molecular formula of each lipid species is listed in the supplementary material (Table Excel S2), which includes an ID ranked, with the selected identity and the other alternative identifications of the lipids, albeit less likely and/or intense.

The unsupervised principal component analysis (PCA) showed an evident segregation among lipid profiles of control cells and those exposed to the highest concentration of each of the compounds (50  $\mu$ M BPA, 50  $\mu$ M BPF and 10  $\mu$ M BADGE-2HCl), explaining between 54.2% and 57.6% of the

variance with two principal components (Fig. S2).

Even though the multivariate analysis only showed a differential lipid profile in cells exposed to the highest concentration of the tested compounds, the univariate analysis was able to highlight some lipid species being dysregulated at the highest exposure concentrations (50  $\mu$ M BPA and BPF; 10  $\mu$ M BADGE-2HCl; Figure 2). In addition, even though the multivariate analysis did not show segregation of samples at lower concentrations, the univariate analysis highlighted some significantly dysregulated lipids (5-10  $\mu$ M BPA and BPF; 1-5  $\mu$ M BADGE-2HCl; Figure S3, S4 and S5). Annotations of the dysregulated lipid species are reported in SI (Table S3). Cellular TGs were significantly up-regulated from 2- to 5-fold after exposure to BPA (5 and 50  $\mu$ M), although this effect was not observed after exposure to 20  $\mu$ M BPA. Interestingly, TGs that accumulated after 5 and 50  $\mu$ M BPA exposure were enriched in saturated and monounsaturated FAs, and specially TGs containing the FA 24:1 showed the highest fold change. In addition, a concentration dependent accumulation of ether-link TGs (both plasmanyl- and plasmenyl-species; TG-O, TG-P) (3 to 9-fold) was detected in ZFL cells after exposure to BPA. At the highest concentration tested (50  $\mu$ M BPA), an additional increment of Cer-NDS with the saturated alkyl chain 18:0 as one of the FA substitutes, and accumulation of LPCs and LPEs, which are involved in lipid mediated signaling, was observed (Table S2, SI). On the other hand, only at the highest dose of BPA, a significant decrease of TGs containing PUFAs and some GPs were detected.



**Figure 1.** ROS production in ZFL cells after 15 min of exposure to different concentrations of BPA, BPF, and BADGE-2HCl ( $\mu\text{M}$ ) expressed as fold induction  $\pm$  SEM of six replicates per plate and three different plates. The dotted line represents levels of ROS in solvent control cells. 5  $\mu\text{M}$  SIN-1 was used as positive control leading to  $2.5 \pm 0.3$ -fold induction. \*Statistically significant differences from control ( $p < 0.05$ ).

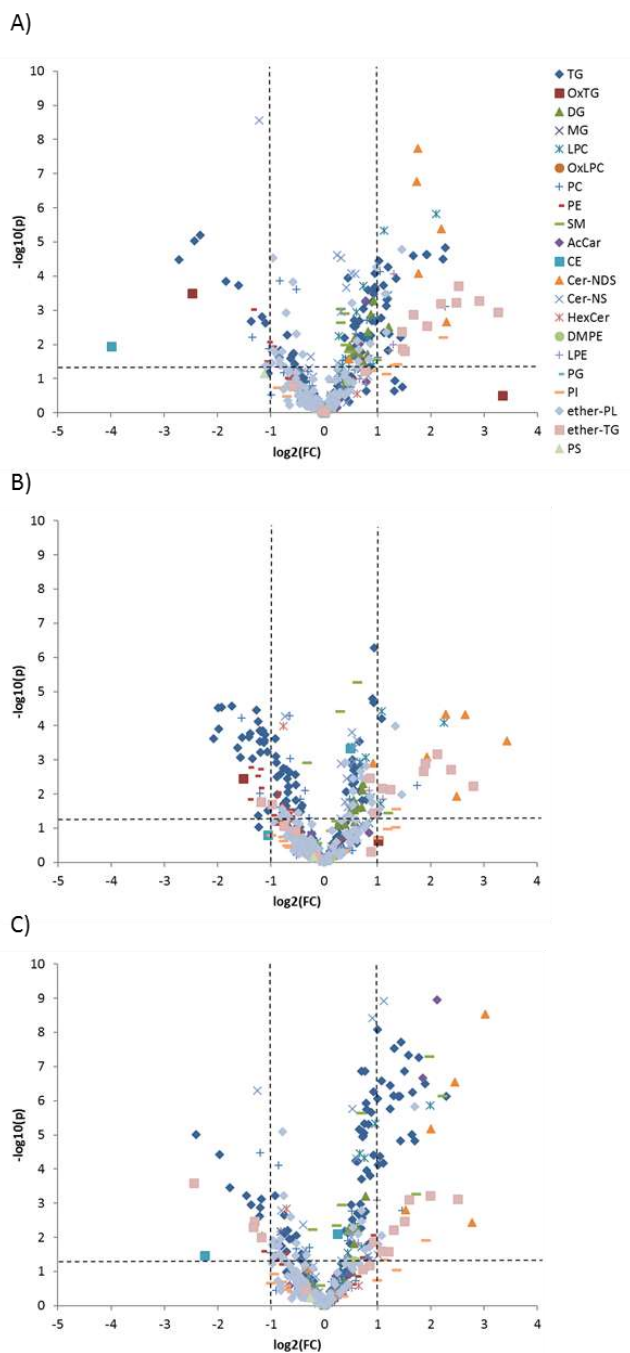
Exposure to BPF resulted in a concentration dependent decrease of TGs containing PUFAs (up to 3-/4-fold at 20 and 50  $\mu\text{M}$ , respectively) and an accumulation of Cer-NDS 2-/10-fold at 20 and 50  $\mu\text{M}$  BPF, respectively). At the highest concentration (50  $\mu\text{M}$  BPF), a decrease of PCs and PEs ( $\sim 2.5$ -fold) and a concomitant increase of ether-TGs (9-fold) and LPCs (4-fold) was also observed.

Exposure to BADGE-2HCl altered cellular lipids in a concentration-dependent manner. At the lowest concentration (1  $\mu\text{M}$ ), an increment of some TGs (2.6-fold) was observed. Exposure to 5  $\mu\text{M}$  BADGE-2HCl lead to an accumulation of TGs (3-fold) together with the accumulation of saturated or poorly unsaturated ether-TGs (2.5-fold). While at the highest concentration (10  $\mu\text{M}$  BADGE-2HCl), an accumulation of TGs (up to 5-fold), ether-TGs (up to 6-fold), Cer-NDS (up to 8-fold), AcCar (4-fold), SM (5-fold), with a concomitant decrease of PC

containing PUFAs (2-fold) and ether-TG containing PUFAs (2-fold) was observed.

### 3.3 Lipids in culture medium

The lipid composition of the culture medium after 24 h of exposure of the cells to the selected compounds was also analyzed. The medium incubated with cells for 24 h was characterized by a higher content of membrane lipids, mainly PCs, and to a lesser extent PEs, LPCs, LPEs and PC-O/PC-Ps, indicating that cells secreted these lipids to the extracellular environment. The low and medium concentrations of BPA (5 and 20  $\mu\text{M}$ ), BPF (5 and 20  $\mu\text{M}$ ) and BADGE-2HCl (1 and 5  $\mu\text{M}$ ) did not alter the lipid composition of the culture medium after 24 h exposure, however, the high concentration of all three compounds (50  $\mu\text{M}$  for BPA and BPF and 10  $\mu\text{M}$  for BADGE-2HCl) produced significant alterations of the lipid composition of the medium (Fig. S6).

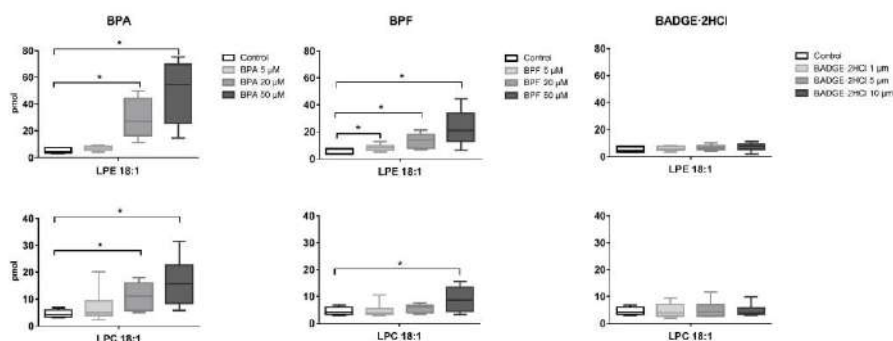


**Figure 2.** Volcano plots color-coded by lipid class showing differences in the lipid profile of ZFL cells exposed to A) 50  $\mu$ M BPA, B) 50  $\mu$ M BPF and C) 10  $\mu$ M BADGE·2HCl compared to control cells. The x-axis reflects the magnitude ( $\log_2$ (fold change)) whilst the y-axis reflects the significance of change ( $-\log_{10}$ (p-value)). Dotted lines delimit significantly altered lipids (fold change  $\geq 2.0$ ;  $p < 0.05$ ).



Both, BPA and BPF (50  $\mu\text{M}$ ) resulted in a significant increase of LPE 18:1 and LPC 18:1 (Fig. 3). However, while exposure to 50  $\mu\text{M}$  BPF significantly reduced the levels of few DGs (36:1, 38:4) and GPs (PC 34:1, 36:1 and PE-P 36:4/PE-O 36:5) (Fig. 4; S6B), a higher number of lipids, including neutral lipids (TGs, DGs) and GPs (PE-P/PE-Os,

PC-P/PC-Os, PCs, PIs and PSs) were depleted in the culture medium of cells exposed to 50  $\mu\text{M}$  BPA (Fig. 4; S6A). Similarly, exposure to 10  $\mu\text{M}$  BADGE-2HCl significantly reduced the amount of lipids in culture medium (PE-P/PE-Os, PC-P/PC-Os, PCs, PEs, PSs, PIs, and DGs) (Fig. 4; S6C).



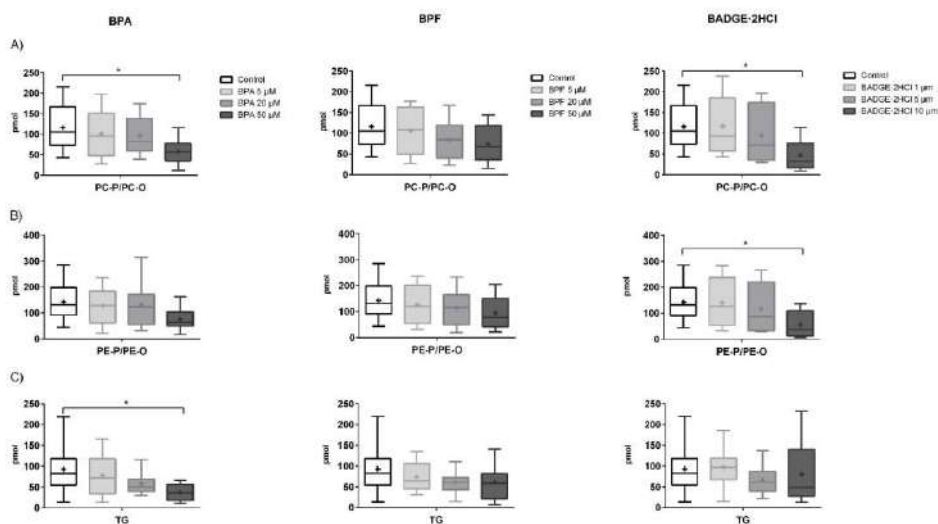
**Figure 3.** Amount of LPE 18:1 and LPC 18:1 in the culture medium of ZFL cells after exposure to BPA (5 ,20 ,50  $\mu\text{M}$ ), BPF (5 ,20 ,50  $\mu\text{M}$ ) and BADGE-2HCl (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. \*Indicates statistically significant differences ( $p < 0.05$ ; Student t-test).

### 3.4 Expression of mRNA of target genes in ZFL cells

Results from qPCR showed that 20  $\mu\text{M}$  BPA, 20  $\mu\text{M}$  BPF and 5  $\mu\text{M}$  BADGE-2HCl altered the expression of genes involved in lipid metabolism (Fig. 5). Both, BPA and BPF, significantly induced the expression of genes encoding lipogenic enzymes: *scd* (1.9 and 2.2-fold, respectively), which desaturates fatty acids 16:0 to 16:1 and 18:0 to 18:1; and *elov16* (1.3 and 1.5-fold), responsible for the elongation of fatty acids 16:0, 16:1 and 18:1 to 18:0, 18:1 and 20:1, respectively. The expression of *ppara* was significantly down-regulated after BPF (1.3-fold) and BADGE-2HCl (3.5-fold) exposure, while the expression of the *abca1b* transporter, involved in the regulation

of cellular cholesterol and GP homeostasis, was up-regulated after BPF exposure (1.4-fold) and down-regulated by BADGE-2HCl (1.5-fold). Transcript levels of *fasn* (responsible for the the synthesis of palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA, into long-chain saturated fatty acids), *lxr (nr1h3)*, involved in the metabolism of carbohydrates and lipids), *dgat1a*, which catalyzes the conversion of DGs and fatty acyl-CoA to TGs, and *gpat3*, which catalyzes the conversion of glycerol-3-phosphate to lysophosphatidic acid in the synthesis of TGs, were not altered after exposure to the tested compounds. In addition, BPF exposure produced a slight up-regulation of the expression of *cyp3a65* (1.3-fold), which is involved in response to xenobiotic stimulus, whereas BPA and BADGE-2HCl did not alter the

expression of *cyp1a* or *cyp3a65*) (Fig. 6).



**Figure 4.** Total amount of A) PC-P/PC-Os, B) PE-P/PE-Os and C) TGs in the culture medium of ZFL cells after exposure to BPA (5, 20, 50  $\mu$ M), BPF (5, 20, 50  $\mu$ M) and BADGE-2HCl (1, 5, 10  $\mu$ M) for 24 h. \*Indicates statistically significant differences ( $p < 0.05$ ; Student t-test).

#### 4. Discussion

The present study illustrates that BPA and its derivatives, BPF and BADGE-2HCl, interfere with lipid homeostasis in ZFL cells by modulating the lipid profile of exposed cells and the expression of genes involved in the regulation of lipid metabolism. A common effect for all three bisphenols was the increased concentration of dihydroceramides and ether-TGs, predominately plasmaloyl-TG species, in exposed ZFL cells. Non-hydroxy acyl dihydro-sphingosine ceramides (CER[NDS]) or dihydroceramides are converted to ceramides by dihydroceramide desaturases (DES1 and DES2) through *de novo* synthesis of sphingolipids. Thus, we hypothesize that an inhibition of DES by BPA, BPF and BADGE-2HCl would lead to an accumulation of endogenous CER[NDS] in ZFL cells. Actually, several studies have shown that compounds like

fenretinide, a synthetic retinoid derivative (Wang et al., 2008), resveratrol (Signorelli et al., 2009) and the anti-inflammatory drug celecoxib (Schiffmann et al., 2009), induced a dramatic increase of dihydroceramides content in mammalian cells by inhibiting DES activity. Even though dihydroceramides were once thought to be inert, recent studies have demonstrated their importance in some biological processes. Its function is different from that of ceramides (CER[NS]), which are known to mediate cellular stress response, with implications in apoptosis, survival, growth and anabolism. In contrast, dihydroceramides exert their action mainly on proliferation and autophagy processes (Siddique et al., 2015). Thus, the intracellular accumulation of dihydroceramides observed after exposure to the highest concentrations of all three compounds is suggestive of inhibited cell growth and possibly the induction of autophagy, which may be

a mechanism for ZFL cells to survive under the highest concentrations of bisphenols through recycling and degradation of cell organelles.

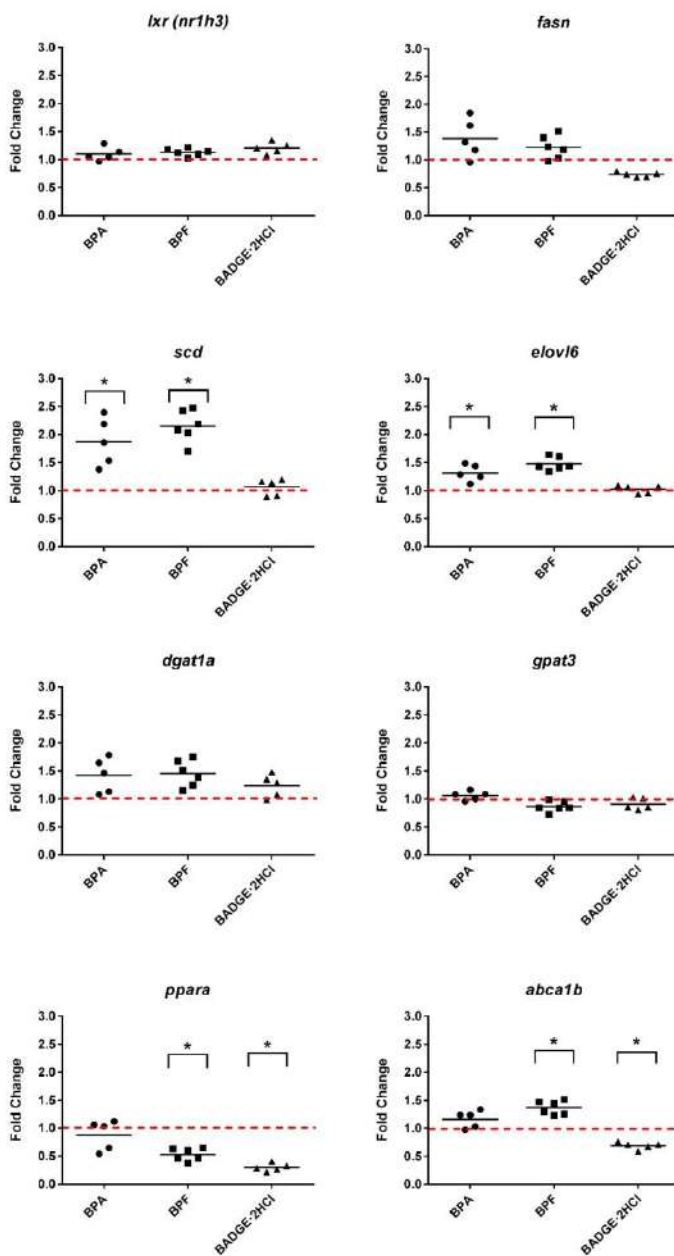
On the other hand, ether analogues of TGs, which represented 0.3 % of the detected neutral lipid fraction in ZFL cells, were up-regulated, particularly in cells exposed to the highest concentration of all three bisphenols. Ether-TGs are present at trace levels in most animal tissues, where they are important energy sources that can be metabolized to form ATP in high yields; while TGs are more relevant for processes requiring short-term energy, ether-TGs are useful for long-term events (e.g. overwintering, starvation) (Böer et al., 2007). Ether-TGs have also been described as bioactive lipids that may promote the inhibition of certain protein kinase C isoforms, presumably involved in tumour growth, and increased levels of plasmanyl- and plasmenyl-TGs (TG-O, TG-P) have been described in mammalian cancer cells (Magnusson and Haraldsson, 2011). Up-regulation of ether-TGs by all three bisphenols in ZFL cells and the consequences for cell functioning should be further investigated.

BPA and its monomer BADGE-2HCl induced the intracellular accumulation of TGs with a shift towards increased TGs saturation, while at the highest concentration tested, a concomitant decrease of some TGs containing PUFAs (20:4, 22:5 and 22:6) was observed. TGs act as buffers for cellular lipid homeostasis through hydrolysis and release of PUFAs that can be incorporated into other lipid types, such as PLs, or by sequestering monounsaturated oleate (C18:1), the principal product of stearoyl-CoA desaturase, in lipid droplets (Ackerman et al., 2018). Although different studies have reported alterations of the TG

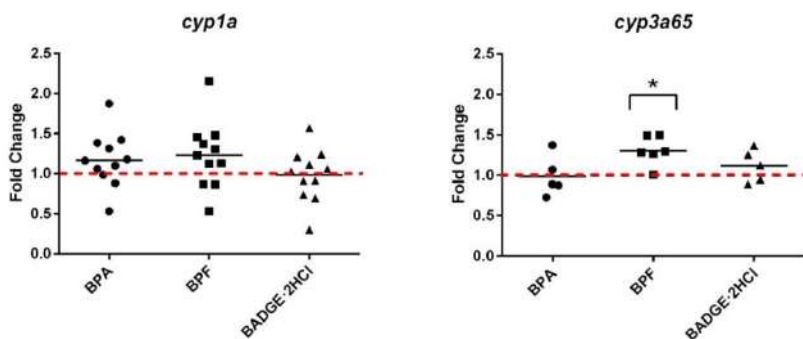
pool in the liver of various fish species exposed to BPA (Maradonna et al., 2015; Guan et al., 2016, 2019), detailed information on the specific TGs that are up- or down-regulated is still lacking. Often, controversial results are reported for BPA, which can both increase and decrease the total lipid content in the liver of zebrafish, depending on the exposure concentration and the balance between FA synthesis and oxidation (Santangeli et al., 2018). Likewise, our study shows a non-monotonic effect of BPA on ZFL cells, leading to a significant intracellular accumulation of TGs at low (5  $\mu$ M) and high (50  $\mu$ M) concentrations, and no response at 20  $\mu$ M. In fact, the expression of *fasn* after 20  $\mu$ M BPA was not up-regulated, supporting the absence of TG accumulation at this dose.

Although, the transcriptional analysis was carried out after exposure of the cells to a single concentration of the selected compounds, it was possible to detect that BPA and BPF up-regulated the expression of the lipogenic genes *scd* and *elovl6*, while *ppara* expression was down-regulated by BPF and BADGE-2HCl. This receptor functions as a lipid sensor in the liver, responding to the influx of FAs and controlling expression of genes involved in mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation, FA uptake, and lipoprotein assembly and transport (Contreras et al., 2013). Thus, among other factors, the down-regulation of *ppara* by BADGE-2HCl may have resulted in a reduced hydrolysis of TGs, and their consequent accumulation in ZFL cells. In fact, this is the first study that reports an effect of this BPA monomer in fish lipid homeostasis at concentrations in the range of those reported in the liver of marine

mammals (1- 2.5  $\mu$ M) (Xue and Kannan, 2016).



**Figure 5.** Changes in the expression of hepatic genes related to lipid metabolism pathway in response to BPA, BPF and BADGE-2HCl exposure in ZFL cells. The red dotted line indicates control value. \*Statistically significant differences from control ( $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Changes in the expression of hepatic *cyp1a* and *cyp3a65* genes in response to BPA, BPF and BADGE-2HCl exposure in ZFL cells. The red dotted line indicates control value. \*Statistically significant differences from control ( $p < 0.05$ ).

BPF induced the generation of ROS at levels higher than BPA in ZFL cells, and a lipid signature characteristic of oxidative stress, which was particularly evident after exposure to 50  $\mu$ M BPF (3.2-fold ROS induction). This lipid pattern consisted of (a) a significant decrease of highly unsaturated TGs, which can be a source of FAs for the synthesis of damaged/oxidized GPs to restore their basal levels, and (b) a significant increment of LPCs and LPEs and the concomitant decrease of highly unsaturated (3-9 double bounds) PCs and PEs (Fig. 2A, 2B; SI excel). This latter effect could also be depicted in cells exposed to the highest concentration of BPA and in the culture medium, where an increment of LPE 18:1 and LPC 18:1 was observed after BPA and BPF exposure. Although the role of extracellular LPCs and LPEs has not been elucidated, recent studies indicate that they are bioactive lipids that may regulate fundamental cellular activities by modulating multiple molecular targets. They act as signaling molecules in inflammatory processes, particularly LPC 18:1, which increases in anti-inflammatory signaling, but they also have an influence on different processes such as carcinogenesis,

immunity or regulation of metabolic diseases (Chen et al., 2008; Grzelczyk and Gendaszewska-Darmach, 2013). Additionally, the analysis of the lipids in culture medium evidenced a general inhibition of the synthesis/transport of lipids at the highest concentrations tested (50  $\mu$ M BPA and BPF; 10  $\mu$ M BADGE-2HCl), which can be observed in the volcano plots, where a shift towards the left side of most of the detected lipids was observed (Fig. S5). Moreover, lipids measured in culture medium probably include those of extracellular vesicles, like exosomes and apoptotic bodies (Skotland et al., 2017), whose excretion and lipidome has probably been altered by exposure.

The transporter *abca1b* was up-regulated by BPF and down-regulated by BADGE-2HCl. In processes of steatosis, *abca1b* activation can decrease lipid accumulation by modifying lipid transport, but also inhibiting FA synthesis in hepatocytes (Ma et al., 2014). Additionally, *abca1b* could be part of the cell's defense together with *cyp1a* and *cyp3a65*, examined in this study. The up-regulation of *abca1b*, *cyp1a* and *cyp3a65* by BPF may have contributed to BPF detoxification and to the

comparatively low toxicity and intracellular concentration of BPF in fish liver cells, while the down-regulation of *abca1b* by BADGE-HCl and no response of cytochrome P450 isoforms agrees with its highest toxicity and high bioconcentration in PLHC-1 cells in comparison to other bisphenols (Pérez-Albaladejo et al., unpublished results).

Overall, this study shows the ability of BPA, BPF and BADGE-2HCl to alter the lipid homeostasis of the zebrafish hepatic cell line ZFL. BPA and BADGE-2HCl produced similar alterations in ZFL lipids, mainly, accumulation of saturated and lesser unsaturated TGs, whilst BPF reduced the intracellular accumulation of TGs containing PUFAs and shows a clear pattern of oxidative stress, translated into the depletion of GPs containing PUFAs and concomitant formation of lyso-forms, also with direct implications in the cells bilayer thickness. In addition, the same trend of increasing dihydroceramides could signify that the three compounds are able to knockdown the *des* gene.

### Acknowledgments

Anna Marqueño acknowledges a pre-doctoral fellowship BES-2015-074842.

### References

- Böer, M., Graeve, M., Kattner, G., 2007. Exceptional long-term starvation ability and sites of lipid storage of the Arctic pteropod *Clione limacina*. *Polar Biol.* 30, 571–580.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Palou, A., 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 177–189.
- Chen, C., Shah, Y.M., Morimura, K., Krausz, K.W., Miyazaki, M., Richardson, T.A., Morgan, E.T., Ntambi, J.M., Idle, J.R., Gonzalez, F.J., 2008. Metabolomics Reveals that Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase 1 Downregulation Exacerbates Inflammation and Acute Colitis. *Cell Metab.* 7, 135–147.
- Contreras, A. V., Torres, N., Tovar, A.R., 2013. PPAR- $\alpha$  as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation. *Adv. Nutr.* 4, 439–452.
- Drobna, Z., Talarovicova, A., Schrader, H.E., Fennell, T.R., Snyder, R.W., Rissman, E.F., 2019. Bisphenol F has different effects on preadipocytes differentiation and weight gain in adult mice as compared with Bisphenol A and S. *Toxicology* 420, 66–72.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stranley, H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Guan, Y., Gao, J., Zhang, Y., Chen, S., Yuan, C., Wang, Z., 2016. Effects of bisphenol A on lipid metabolism in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 179, 144–149.
- Guan, Y., Zhang, T., He, J., Jia, J., Zhu, L., Wang, Z., 2019. Bisphenol A disturbed the lipid metabolism mediated by sterol regulatory element binding protein 1 in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Aquat. Toxicol.* 207, 179–186.
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Abdulfatah, A., Fontaine, P., Rodina, M., Linhart, O., 2012. Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 56–62.
- Koelmel, J.P., Kroeger, N.M., Gill, E.L., Ulmer, C.Z., Bowden, J.A., Patterson, R.E., Yost, R.A., Garrett, T.J., 2017a. Expanding Lipidome Coverage Using LC-MS/MS Data-Dependent Acquisition with Automated Exclusion List Generation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 908–917.
- Koelmel, J.P., Kroeger, N.M., Ulmer, C.Z., Bowden, J.A., Patterson, R.E., Cochran, J.A., Beecher, C.W.W., Garrett, T.J., Yost, R.A., 2017b. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 18, 331.
- Koizumi, S., Yamamoto, S., Hayasaka, T., Konishi, Y., Yamaguchi-Okada, M., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., Setou, M., Namba, H., 2010. Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain. *Neuroscience* 168, 219–225.
- Lee, M.S., Kim, C.T., Kim, I.H., Kim, Y., 2011. Effects of capsaicin on lipid catabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Phyther. Res.* 25, 935–939.
- Legeay, S., Faure, S., 2017. Is bisphenol A an

- environmental obesogen? *Fundam. Clin. Pharmacol.* 31, 594–609.
- Lin, H.J., Ho, F.C.S., Hing Lee, C.L., 1978. Abnormal Distribution of O-Alkyl Groups in the Neutral Glycerolipids from Human Hepatocellular Carcinomas. *Cancer Res.* 38, 946–949.
- Ludovic, H., Alexandre, D., Ika, P.-P., Camille, L., Ronan, J., Philippe, S., Guillaume, D., Duflos, G., 2017. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere* 182, 781–793.
- Lv, Y.Z., Yao, L., Wang, L., Liu, W.R., Zhao, J.L., He, L.Y., Ying, G.G., 2019. Bioaccumulation, metabolism, and risk assessment of phenolic endocrine disrupting chemicals in specific tissues of wild fish. *Chemosphere* 226, 607–615.
- Ma, D., Liu, W., Wang, Y., 2014. ApoA-I or ABCA1 expression suppresses fatty acid synthesis by reducing 27-hydroxycholesterol levels. *Biochimie* 103, 101–108.
- Maradonna, F., Nozzi, V., Santangeli, S., Traversi, I., Gallo, P., Fattore, E., Mita, D.G., Mandich, A., Carnevali, O., 2015. Xenobiotic-contaminated diets affect hepatic lipid metabolism: Implications for liver steatosis in *Sparus aurata* juveniles. *Aquat. Toxicol.* 167, 257–264.
- Marqueño, A., Pérez-Albaladejo, E., Flores, C., Moyano, E., Porte, C., 2019. Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells. *Environ. Pollut.* 244, 513–521.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- PlasticsEurope 2018. *Plastics – the Facts 2018: An analysis of European plastics production, demand and waste data.* Available on: <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/619-plastics-facts-2018>. Accessed on: 07/05/2020
- Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of bisphenol A substitutes. *Environ. Health Perspect.* 123, 643–650.
- Santangeli, S., Maradonna, F., Gioacchini, G., Cobellis, G., Piccinetti, C.C., Dalla Valle, L., Carnevali, O., 2016. BPA-Induced Deregulation of Epigenetic Patterns: Effects on Female Zebrafish Reproduction. *Sci. Rep.* 6, 1–11.
- Santangeli, S., Notarstefano, V., Maradonna, F., Giorgini, E., Gioacchini, G., Forner-Piquer, I., Habibi, H.R., Carnevali, O., 2018. Effects of diethylene glycol dibenzoate and Bisphenol A on the lipid metabolism of *Danio rerio*. *Sci. Total Environ.* 636, 641–655.
- Sargent, J.R., 1989. Ether-Linked Glycerides in Marine Animals, in: Ackman, R.G. (Ed.), *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils.* CRC Press, Boca Raton, pp. 175 – 197.
- Schiffmann, S., Sandner, J., Schmidt, R., Birod, K., Wobst, I., Schmidt, H., Angioni, C., Geisslinger, G., Grösch, S., 2009. The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis. *J. Lipid Res.* 50, 32–40.
- Siddique, M.M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V.A., Summers, S.A., 2015. Dihydroceramides: From bit players to lead actors. *J. Biol. Chem.* 290, 15371–15379.
- Signorelli, P., Munoz-Olaya, J.M., Gagliostro, V., Casas, J., Ghidoni, R., Fabriàs, G., 2009. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 282, 238–243.
- Snyder, F., Wood, R., 1969. Alkyl and Alk-1-enyl Ethers of Glycerol in Lipids from Normal and Neoplastic Human Tissues. *Cancer Res.* 29, 251–257.
- Snyder, F., Wood, R., 1968. The Occurrence and Metabolism of Alkyl and Alk-1-enyl Ethers of Glycerol in Transplantable Rat and Mouse Tumors. *Cancer Res.* 28, 972–978.
- Ulmer, C.Z., Ragland, J.M., Koelmel, J.P., Heckert, A., Jones, C.M., Garrett, T.J., Yost, R.A., Bowden, J.A., 2017. LipidQC: Method Validation Tool for Visual Comparison to SRM 1950 Using NIST Interlaboratory Comparison Exercise Lipid Consensus Mean Estimate Values. *Anal. Chem.* 89, 13069–13073.
- Villeneuve, D.L., Crump, D., Garcia-Reyero, N., Hecker, M., Hutchinson, T.H., LaLone, C.A., Landesmann, B., Lettieri, T., Munn, S., Nepelska, M., Ottinger, M.A., Vergauwen, L., Whelan, M., 2014. Adverse outcome pathway (AOP) development I: Strategies and principles. *Toxicol. Sci.* 142, 312–320.
- Vinken, M., 2013. The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. *Toxicology* 312, 158–165.
- Wang, H., Maurer, B.J., Liu, Y.Y., Wang, E., Allegood, J.C., Kelly, S., Symolon, H., Liu, Y., Merrill, A.H., Gouazé-Andersson, V., Jing, Y.Y., Giuliano, A.E., Cabot, M.C., 2008. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide increases dihydroceramide and synergizes with dimethylsphingosine to enhance cancer cell killing. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2967–2976.
- Wang, Q., Yang, H., Yang, M., Yu, Y., Yan, M., Zhou, L., Liu, X., Xiao, S., Yang, Y., Wang, Y., Zheng, L., Zhao, H.H., Li, Y., 2019. Toxic effects of bisphenol A on goldfish gonad development and the possible pathway of BPA disturbance in female and male fish

- reproduction. *Chemosphere* 221, 235–245.
- Xia, J., Wishart, D.S., 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 55, 14.10.1-14.10.91.
- Xue, J., Kannan, K., 2019. Mass flows and removal of eight bisphenol analogs, bisphenol A diglycidyl ether and its derivatives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. *Sci. Total Environ.* 648, 442–449.
- Xue, J., Kannan, K., 2016. Novel Finding of Widespread Occurrence and Accumulation of Bisphenol A Diglycidyl Ethers (BADGEs) and Novolac Glycidyl Ethers (NOGEs) in Marine Mammals from the United States Coastal Waters. *Environ. Sci. Technol.* 50, 1703–1710.
- Yang, Yunjia, Lu, L., Zhang, J., Yang, Yi, Wu, Y., Shao, B., 2014. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1328, 26–34.
- Zhao, C., Xie, P., Wang, H., Cai, Z., 2018. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics reveal toxicological mechanisms of bisphenol F in breast cancer xenografts. *J. Hazard. Mater.* 358, 503–507.
- Zhao, X., Qiu, W., Zheng, Y., Xiong, J., Gao, C., Hu, S., 2019. Occurrence, distribution, bioaccumulation, and ecological risk of bisphenol analogues, parabens and their metabolites in the Pearl River Estuary, South China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 43–52.





**Informació suplementària de l'article “*Untargeted lipidomics shows the ability of bisphenol A and derivatives to alter lipid metabolism in zebrafish liver cells (ZFL)*”**

A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, N. Denslow, J.A. Bowden, C. Porte

Submitted to *Environmental Science & Technology*

---

***Analysis of cellular lipids***

Quantification of the individual lipids was performed using internal standards representative for each lipid subclass. TG, oxTG, TG-O and TG-P were quantified using 17:0 TG; DG and MG using 1,3-17:0 d5 DG; PC, PC-O, PC-P, AcCar, Cer-NDS, Cer-NS, HexCer and Co using 16:0 d31-18:1 PC; PS and PS-P using 16:0 d31-18:1 PS; PE, LPE, PE-O, PE-P, PEtOH, DMPE, PG and LPE-P using 16:0 d31-18:1 PE; PI using 16:0-d31-18:1 PI; SM using 16:0 d31 SM; CEs using 17:0 CE; LPC, oxLPC, LPC-O and LPC-P using 17:0 LPC.

**Table S1.** Zebrafish primer sequences for quantitative RT-PCR analysis and primer efficiency. Amplicon length is of 81 bp for all the studied genes.

Gene	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Efficiency (%)
<i>abca1b</i>	NM_001114586.2	FW: AGCTCAATCAGCCGTAAGGG RV: GGGCTTCTCCAGGCTGTCTT	101
<i>fasn</i>	XM_021472581.1	FW: CGACCGCTACGTTCCCACT RV: CCATCTCCGTACTIONCGCTGCT	91
<i>elovl6</i>	NM_199532.1	FW: CTATGCTCTTCGGGCAGCC RV: ACCATCTGGGTGATCTGTGTCA	104
<i>scd</i>	NM_198815.2	FW: CACCACACGTTTCCCTACGA RV: CATGGTGTCCACGAAGATGG	97
<i>dgat1a</i>	NM_199730.1	FW: CTGGGCGTTTCTGGGTATGA RV: GCGTTGCCATAGTTACCCCTC	94
<i>gpat3</i>	NM_001002685.1	FW: TGACATTGTCATCTTGGCGAA RV: CTCTGGATGACCCCATGAG	93
<i>cyp1a</i>	NM131879.2	FW: GGTAAAGTTCACCGGGATGC RV: CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG	96
<i>cyp3a65</i>	NM_001037438.1	FW: CGGAGAGCTTCAAACCCGA RV: CCAGACCGAACGGCATGTAC	91
<i>ppara</i>	DQ839548.1	FW: ATCCAAAGCACGAACCATCC RV: TGGCCACAAATGTCTGTTCTG	107
<i>lxr(nr1h3)</i>	NM_001017545.3	FW: GACTAGGCAAATGAGAGCAATTTG RV: AACCTGAATTGTGCATGCTCAC	95

**Table Excel S2.** Lipids identified in the ZFL cells using UHPLC-HRMS/MS and LipidMatch flow for data treatment. (ID Ranked 1 = Data-Dependent (top 30) MS/MS fragment m/z match, 3 = Headgroup m/z match (class-ID))

**Available online:** <http://hdl.handle.net/10261/204413>

**Table S3.** Lipid species significantly dysregulated in ZFL cells after exposure to A) BPA (50, 20, 5  $\mu$ M), B) BPF (50, 20, 5  $\mu$ M) and C) BADGE-2HCl (10, 5, 1  $\mu$ M) obtained from volcano plots.

A)

Exposure	Decreased			Increased		
	Lipid species	Fold change	p value	Lipid species	Fold change	p value
BPA 50 $\mu$ M	CE(18:1)	0.06	1.1E-02	Cer-NDS(d18:0/16:0)	3.39	8.2E-05
	Cer-NS(d18:1/24:2)	0.43	2.7E-09	Cer-NDS(d18:0/18:0)	3.38	1.8E-08
	OxTG(18:0_18:0_9:0(CH O))	0.18	3.2E-04	Cer-NDS(d18:0/22:1)	3.33	1.7E-07
	PC(16:0_16:0)	0.49	1.4E-02	Cer-NDS(d18:0/24:1)	4.91	2.2E-03
	PC(16:0_18:0)	0.39	6.1E-03	Cer-NDS(d18:0/26:1)	4.59	4.1E-06
	PE(20:2_20:4)	0.46	3.1E-02	DG(16:1_18:1)	2.32	3.0E-03
	PE(20:3_20:3)	0.48	8.2E-03	LPC(14:0)	4.30	1.5E-06
	PE(39:3)	0.39	9.4E-04	LPC(16:1)	2.30	3.6E-04
	Plasmenyl-PE(P-18:0/22:3)	0.47	4.2E-02	LPC(20:1)	2.18	4.7E-06
	TG(10:0_10:0_8:0)	0.20	6.4E-06	LPE(16:0)	2.45	1.0E-02
	TG(10:0_8:0_8:0)	0.19	9.2E-06	LPE(18:0)	2.47	8.5E-05
	TG(16:0_20:4_22:5)	0.44	1.5E-03	LPE(18:2)	2.35	1.5E-02
	TG(16:1_18:3_22:5)	0.28	1.4E-04	PC(14:0_16:1)	4.81	7.7E-04
	TG(17:0_20:4_20:4)	0.47	2.4E-03	PC(14:0_18:2)	2.06	7.4E-05
	TG(18:0_18:0_22:6)	0.39	2.1E-03	PC(16:1_16:1)	2.00	2.3E-02
	TG(18:0_20:4_22:6)	0.33	1.9E-04	PI(16:0_18:1)	4.67	6.3E-03
	TG(8:0_8:0_8:0)	0.15	3.4E-05	PI(18:1_18:1)	2.47	4.1E-02
				PI(36:2)	2.58	3.8E-02
				Plasmany-PC(O-16:1/14:0)	2.74	1.7E-05
				Plasmany-PC(O-16:1/16:1)	2.25	4.3E-03
				plasmany-TG(O-16:0_16:0_18:1)	7.47	5.2E-04
				plasmany-TG(O-16:0_18:1_18:2)	3.18	1.3E-03
				plasmany-TG(O-16:1_18:0_18:0)	5.56	5.9E-04
				plasmany-TG(O-16:1_18:1_18:2)	2.73	4.3E-03
				plasmany-TG(O-18:0_14:0_16:0)	9.60	1.2E-03
				plasmany-TG(O-18:1_15:0_18:1)	2.77	1.3E-02
			plasmany-TG(O-18:1_16:0_16:1)	5.74	1.9E-04	
			plasmany-TG(O-20:1_16:1_18:1)	2.84	1.6E-02	
			Plasmenyl-PC(P-16:0/16:1)	2.21	3.3E-04	
			plasmenyl-TG(P-16:1_18:0_18:0)	4.56	6.5E-04	
			plasmenyl-TG(P-18:1_16:1_16:1)	3.81	2.9E-03	

CAPÍTOL 2

Exposure	Decreased			Increased		
	Lipid species	Fold change	p value	Lipid species	Fold change	p value
				TG(15:1_16:0_18:2)	2.10	1.7E-03
				TG(16:0_16:0_18:1)	2.54	1.2E-04
				TG(16:0_18:1_18:1)	2.17	4.5E-03
				TG(16:0_18:1_22:0)	2.04	3.6E-05
				TG(16:0_18:1_22:1)	3.19	2.6E-05
				TG(18:0_18:1_18:1)	2.29	1.5E-02
				TG(18:0_18:1_20:0)	2.17	1.9E-04
				TG(18:1_18:1_20:1)	2.24	7.5E-04
				TG(18:1_18:1_22:1)	3.76	2.3E-05
				TG(18:1_18:1_24:1)	3.81	2.3E-05
				TG(18:1_18:2_22:1)	2.27	4.9E-04
				TG(18:1_18:2_24:1)	4.68	3.2E-05
				TG(18:1_18:3_26:0)	2.33	5.0E-03
				TG(18:1_20:0_22:4)	2.70	6.2E-03
				TG(18:2_18:2_23:0)	2.30	5.4E-05
				TG(18:2_20:2_24:0)	4.82	1.5E-05
BPA 20 μM	CE(18:1)	0.27	4.5E-02	LPC(14:0)	2.40	6.4E-03
	OxTG(18:0_18:0_9:0(CH O))	0.50	2.6E-02	PC(14:0_16:1)	3.46	4.1E-03
	PE(39:3)	0.48	3.6E-03	Plasmanyln-PC(O-16:1/14:0)	2.05	1.5E-03
				Plasmanyln-PC(O-16:1/16:1)	2.14	2.0E-02
				plasmanyln-TG(O-16:0_16:0_18:1)	2.10	7.0E-03
				plasmanyln-TG(O-18:0_14:0_16:0)	3.02	1.6E-03
				plasmanyln-TG(O-18:1_16:0_16:1)	2.19	2.4E-03
				plasmeyln-TG(P-18:1_16:1_16:1)	2.25	1.2E-02
BPA 5 μM				plasmanyln-TG(O-18:0_14:0_16:0)	2.33	2.1E-03
				TG(15:0_16:0_24:0)	2.14	1.9E-04
				TG(15:1_16:0_18:2)	2.44	6.6E-03
				TG(16:0_16:0_18:1)	2.23	9.5E-03
				TG(16:0_16:1_18:1)	2.04	7.1E-04
				TG(16:0_18:0_22:0)	2.13	2.3E-04
				TG(16:0_18:0_25:0)	2.17	3.5E-04
				TG(16:0_18:1_22:0)	2.02	3.7E-04
				TG(16:0_18:1_22:1)	2.07	9.2E-04
				TG(18:0_18:0_20:3)	2.25	4.2E-02
				TG(18:0_18:1_23:0)	2.19	3.5E-04
				TG(18:0_18:1_24:0)	2.29	4.3E-04
				TG(18:0_20:4_24:0)	3.02	3.7E-03
				TG(18:1_18:1_18:2)	2.49	4.5E-02
				TG(18:1_18:1_25:0)	2.32	3.7E-04
				TG(18:1_18:2_24:0)	2.09	1.5E-03
				TG(18:1_19:0_20:2)	2.02	3.4E-03
				TG(18:1_20:1_24:0)	2.32	4.2E-04
				TG(18:2_18:2_23:0)	2.25	6.9E-04

B)

TREBALL EXPERIMENTAL I RESULTATS

Exposure	Decreased			Increased		
	Lipid species	Fold change	p value	Lipid species	Fold change	p value
BPF 50 μM	OxTG(18:0_18:0_9:0(CH O))	0.35	3.5E-03	Cer-NDS(d18:0/16:0)	3.81	8.2E-04
	PC(16:0_16:0)	0.43	9.5E-03	Cer-NDS(d18:0/18:0)	6.26	4.7E-05
	PC(17:0_20:4)	0.34	6.0E-05	Cer-NDS(d18:0/22:1)	4.86	4.6E-05
	PE(20:2_20:4)	0.37	1.4E-02	Cer-NDS(d18:0/24:1)	5.61	1.2E-02
	PE(20:3_20:3)	0.38	1.6E-03	Cer-NDS(d18:0/26:1)	10.81	2.7E-04
	PE(20:3_22:5)	0.43	6.5E-03	LPC(14:0)	4.75	8.2E-05
	PE(39:3)	0.43	1.8E-03	LPC(16:1)	2.09	1.9E-02
	PE(42:3)	0.42	1.6E-02	LPC(20:1)	2.11	3.8E-05
	PE(42:9)	0.41	2.9E-03	LPE(18:0)	2.14	1.4E-02
	plasmanyl-TG(O-18:0_20:3_20:3)	0.44	1.7E-02	PC(14:0_16:1)	3.36	5.5E-03
	TG(10:0_10:0_8:0)	0.30	2.7E-05	PI(36:2)	2.56	2.7E-02
	TG(10:0_8:0_8:0)	0.26	2.8E-05	Plasmanyl-PC(O-16:1/14:0)	2.53	1.0E-04
	TG(16:0_16:0_22:6)	0.38	2.1E-04	Plasmanyl-PC(O-16:1/16:1)	2.05	2.7E-02
	TG(16:0_16:1_20:5)	0.39	9.2E-04	Plasmanyl-PE(38:1)	2.74	1.0E-02
	TG(16:0_18:1_20:5)	0.43	2.9E-04	plasmanyl-TG(O-16:0_16:0_18:1)	5.22	1.9E-03
	TG(16:0_18:1_22:6)	0.44	1.5E-04	plasmanyl-TG(O-16:0_18:1_18:2)	2.11	6.7E-03
	TG(16:0_18:2_18:4)	0.42	4.3E-02	plasmanyl-TG(O-16:1_18:0_18:0)	3.64	2.1E-03
	TG(16:0_18:2_20:4)	0.43	1.4E-04	plasmanyl-TG(O-18:0_14:0_16:0)	6.98	5.8E-03
	TG(16:0_20:4_22:5)	0.34	2.2E-04	plasmanyl-TG(O-18:1_16:0_16:1)	4.34	6.8E-04
	TG(16:1_18:1_22:6)	0.41	3.5E-05	plasmanyl-TG(O-20:1_16:1_18:1)	2.36	7.3E-03
	TG(17:0_18:1_20:4)	0.46	3.1E-04	plasmeryl-TG(P-16:1_18:0_18:0)	3.71	1.3E-03
	TG(17:1_18:1_20:4)	0.34	8.3E-04	SM(42:1)	2.30	3.6E-02
	TG(18:0_18:2_20:4)	0.46	1.8E-04	TG(18:1_18:1_24:1)	2.12	6.2E-05
	TG(18:0_20:4_22:6)	0.25	3.0E-05	TG(18:2_18:2_23:0)	2.02	3.6E-02
	TG(18:0_20:4_24:0)	0.29	5.4E-05			
	TG(18:1_18:1_22:4)	0.42	7.6E-05			
	TG(18:1_18:1_22:5)	0.45	1.4E-04			
	TG(18:1_18:1_22:6)	0.44	5.9E-04			
	TG(18:1_18:2_20:4)	0.38	1.7E-04			
	TG(18:1_19:0_20:4)	0.48	3.0E-02			
	TG(18:1_20:3_20:4)	0.32	4.3E-04			
	TG(18:1_20:4_22:1)	0.48	5.9E-04			
	TG(18:2_20:2_22:4)	0.46	2.6E-04			
TG(8:0_8:0_8:0)	0.25	1.2E-04				
BPF 20 μM	OxTG(18:0_18:0_9:0(CH O))	0.20	3.9E-04	Cer-NDS(d18:0/16:0)	2.20	2.9E-02
	PC(17:0_20:4)	0.45	2.6E-03	Cer-NDS(d18:0/18:0)	3.03	4.5E-03
	PE(42:9)	0.46	5.2E-03	Cer-NDS(d18:0/22:1)	2.45	2.0E-03
	plasmanyl-TG(O-16:0_20:3_20:3)	0.43	7.7E-03	Cer-NDS(d18:0/24:1)	2.91	4.7E-02
	plasmanyl-TG(O-18:0_20:3_20:3)	0.38	5.5E-03	Cer-NDS(d18:0/26:1)	3.28	1.9E-03
	plasmanyl-TG(O-18:1_18:1_22:3)	0.43	7.6E-03	LPC(14:0)	2.90	3.2E-03

Exposure	Decreased			Increased		
	Lipid species	Fold change	p value	Lipid species	Fold change	p value
BPF 5 µM	TG(10:0_10:0_8:0)	0.47	1.6E-02	PC(14:0_16:1)	2.29	2.4E-02
	TG(16:0_16:0_22:6)	0.41	1.8E-03	plasmanyl-TG(O-16:0_16:0_18:1)	2.16	1.6E-02
	TG(16:0_18:1_22:6)	0.49	2.7E-03	plasmanyl-TG(O-18:0_14:0_16:0)	3.02	8.1E-03
	TG(18:0_18:0_22:6)	0.35	1.2E-03			
	TG(18:0_18:2_20:4)	0.46	1.8E-03			
	TG(18:0_20:4_22:6)	0.33	1.6E-04			
	TG(18:1_18:1_22:2)	0.46	3.7E-03			
	TG(18:1_18:1_22:4)	0.48	1.1E-03			
	TG(18:1_18:1_22:5)	0.47	6.2E-03			
	TG(18:1_20:2_22:5)	0.46	1.2E-02			
	TG(18:1_20:4_22:1)	0.48	9.5E-04			
	OxTG(18:0_18:0_9:0(CH O))	0.19	3.7E-04			
	TG(10:0_10:0_8:0)	0.19	6.9E-06			
	TG(10:0_8:0_8:0)	0.17	8.0E-06			
	TG(14:0_18:2_18:4)	0.47	4.3E-02			
	TG(8:0_8:0_8:0)	0.18	4.4E-05			

C)

Exposure	Decreased			Increased		
	Lipid species	Fold change	p value	Lipid species	Fold change	p value
BADGE-2HCl 10 µM	plasmanyl-TG(O-18:0_20:3_20:3)	0.18	2.5E-04	AcCar(16:0)	3.59	2.1E-07
	CE(18:1)	0.21	3.4E-02	AcCar(18:1)	4.34	1.1E-09
	Cer-NS(d18:1/24:2)	0.42	5.0E-07	Cer-NDS(d18:0/16:0)	2.88	1.6E-03
	PC(16:0_22:6)	0.50	2.8E-02	Cer-NDS(d18:0/18:0)	8.09	2.9E-09
	PC(18:1_22:6)	0.44	8.7E-03	Cer-NDS(d18:0/22:1)	5.47	2.9E-07
	PC(20:4_20:4)	0.43	3.4E-05	Cer-NDS(d18:0/24:1)	6.82	3.6E-03
	PE(20:2_20:4)	0.44	2.5E-02	Cer-NDS(d18:0/26:1)	3.99	6.6E-06
	plasmanyl-TG(O-16:0_20:3_20:3)	0.40	3.4E-03	Cer-NS(d18:1/22:0)	2.17	1.2E-09
	plasmanyl-TG(O-18:1_16:0_20:4)	0.44	9.9E-03	Cer-NS(d18:1/24:0)	2.02	3.2E-02
	plasmanyl-TG(O-18:1_18:1_22:3)	0.40	5.1E-03	LPC(14:0)	3.97	1.4E-06
	TG(10:0_10:0_8:0)	0.39	1.1E-03	PC(14:0_16:1)	2.75	1.7E-03
	TG(10:0_8:0_8:0)	0.36	6.0E-04	PI(16:0_18:1)	3.73	1.2E-02
	TG(16:0_20:4_22:5)	0.43	2.4E-03	PI(36:2)	2.19	4.4E-02
	TG(16:1_18:3_22:5)	0.44	1.3E-03	Plasmanyl-PC(O-16:1/14:0)	3.25	1.5E-06
	TG(17:0_20:4_20:4)	0.44	7.5E-04	Plasmanyl-PE(36:1)	2.01	1.6E-02
	TG(18:0_18:0_22:6)	0.26	3.8E-05	Plasmanyl-PE(38:1)	2.11	8.9E-03
	TG(18:0_20:4_22:6)	0.19	9.6E-06	plasmanyl-TG(O-16:0_16:0_18:1)	3.96	5.9E-04
	TG(8:0_8:0_8:0)	0.29	3.5E-04	plasmanyl-TG(O-16:1_18:0_18:0)	2.84	3.3E-03
				plasmanyl-TG(O-18:0_14:0_16:0)	5.65	7.6E-04
				plasmanyl-TG(O-	2.09	2.5E-02

TREBALL EXPERIMENTAL I RESULTATS

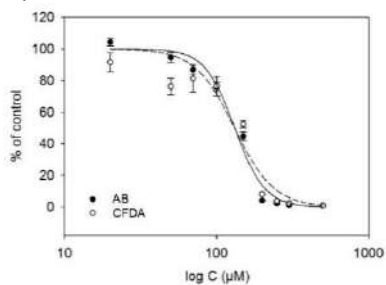
Exposure	Decreased			Increased		
	Lipid species	Fold change	p value	Lipid species	Fold change	p value
				18:1_15:0_18:1) plasmanyl-TG(O-18:1_16:0_16:1) plasmeryl-TG(P-16:1_18:0_18:0) plasmeryl-TG(P-18:1_16:1_16:1) SM(42:1) SM(d18:2/20:1) SM(d18:2/22:1) TG(16:0_16:0_18:1) TG(16:0_18:0_18:1) TG(16:0_18:1_18:1) TG(16:0_18:1_22:0) TG(16:0_18:1_22:1) TG(17:0_18:1_18:1) TG(17:1_18:1_20:1) TG(18:0_18:1_18:1) TG(18:0_18:1_20:0) TG(18:0_20:0_20:4) TG(18:1_18:1_19:0) TG(18:1_18:1_20:1) TG(18:1_18:1_22:1) TG(18:1_18:1_24:1) TG(18:1_18:2_21:0) TG(18:1_18:2_22:1) TG(18:1_18:2_24:1) TG(18:1_20:0_22:4) TG(18:2_18:2_22:0) TG(18:2_18:2_23:0) TG(18:2_20:2_24:0)	3.00 2.47 2.30 3.30 3.91 4.64 2.99 3.16 2.36 2.11 3.41 2.01 2.06 2.83 2.47 2.71 2.35 2.67 3.71 2.69 2.15 2.61 4.88 3.13 2.00 2.47 3.23	8.0E-04 6.0E-03 2.6E-02 5.4E-04 5.0E-08 7.2E-07 4.7E-08 5.7E-07 3.5E-07 2.6E-07 5.4E-08 7.6E-05 4.1E-05 1.3E-07 7.3E-07 1.9E-08 1.7E-06 7.3E-07 3.2E-07 1.5E-05 6.6E-05 7.3E-07 7.3E-07 9.9E-06 8.7E-07 3.0E-08 1.5E-05
BADGE-2HC 15 µM	plasmanyl-TG(O-18:0_20:3_20:3) TG(10:0_10:0_8:0) TG(10:0_8:0_8:0)  TG(8:0_8:0_8:0)	0.46 0.28 0.25  0.22	1.2E-02 1.3E-05 2.0E-05  7.0E-05	Cer-NDS(d18:0/18:0)  LPE(22:5) plasmanyl-TG(O-16:0_16:0_18:1) plasmanyl-TG(O-16:0_18:1_18:2) plasmanyl-TG(O-16:1_18:0_18:0) plasmanyl-TG(O-18:0_14:0_16:0) plasmanyl-TG(O-18:1_15:0_18:1) plasmanyl-TG(O-18:1_16:0_16:1) plasmeryl-TG(P-16:1_18:0_18:0) plasmeryl-TG(P-18:1_16:1_16:1) SM(d18:2/20:1) SM(d18:2/22:1) TG(16:0_18:0_18:1) TG(16:0_18:1_22:1) TG(17:1_18:1_20:1)	2.23  2.57 2.51 2.08 2.34 2.75 2.54 2.23 2.18 2.24 2.02 2.11 2.06 2.37 2.01	2.3E-04  1.2E-02 6.0E-03 7.2E-03 1.6E-02 2.1E-03 2.4E-03 4.3E-03 1.1E-02 8.6E-03 1.1E-06 5.1E-04 8.3E-05 1.4E-06 1.4E-04



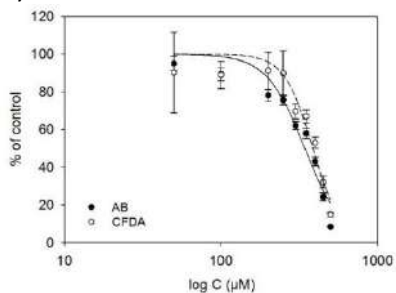
Exposure	Decreased			Increased		
	Lipid species	Fold change	p value	Lipid species	Fold change	p value
				TG(18:0_18:1_18:1)	2.40	6.4E-06
				TG(18:0_18:1_23:0)	2.03	1.0E-02
				TG(18:0_18:1_24:0)	2.02	2.3E-02
				TG(18:1_18:1_19:0)	2.04	1.4E-05
				TG(18:1_18:1_20:1)	2.26	1.8E-05
				TG(18:1_18:1_22:1)	2.54	3.7E-06
				TG(18:1_18:1_24:1)	2.21	1.2E-05
				TG(18:1_18:2_22:1)	2.31	6.8E-06
				TG(18:1_18:2_24:1)	2.98	2.8E-07
				TG(18:1_20:0_22:4)	2.55	2.8E-04
				TG(18:2_18:2_23:0)	2.24	1.7E-08
				TG(18:2_20:2_24:0)	2.50	1.1E-06
BADGE-2HC 1 µM	LPC(20:4)	0.49	1.1E-03	LPE(22:5)	2.52	6.9E-03
	MG(22:4)	0.45	4.7E-03	OxTG(18:1_18:1_18:1(OH) )	2.76	3.4E-02
	OxTG(18:0_18:0_9:0(CHO) )	0.43	1.1E-02	plasmanyl-TG(O- 18:1_15:0_18:1)	2.10	3.4E-02
	TG(10:0_10:0_8:0)	0.31	4.4E-05	plasmeryl-TG(P- 18:1_16:1_16:1)	2.03	4.8E-02
	TG(10:0_8:0_8:0)	0.31	6.5E-05	TG(16:0_18:1_22:1)	2.14	2.4E-03
	TG(8:0_8:0_8:0)	0.27	1.7E-04	TG(16:1_18:1_20:1)	2.67	8.0E-03
				TG(18:0_18:0_20:3)	2.19	4.3E-03
				TG(18:0_18:1_18:1)	2.31	5.4E-03
				TG(18:0_20:2_20:2)	2.20	2.8E-03
				TG(18:0_20:4_24:0)	2.33	3.5E-02
				TG(18:1_18:1_18:2)	2.30	3.5E-02
				TG(18:1_18:1_22:1)	2.12	1.7E-03
				TG(18:1_18:1_24:1)	2.06	2.9E-03
				TG(18:1_18:2_21:0)	2.01	4.9E-03
				TG(18:1_18:2_24:0)	2.37	2.3E-02
				TG(18:1_20:1_24:0)	2.00	7.1E-03
				TG(18:2_18:2_23:0)	2.48	4.7E-03
				TG(18:2_20:2_24:0)	2.09	2.8E-03

**Figure S1.** Cytotoxicity measured with Alamar Blue and CFDA-AM in ZFL cells exposed in serum-free medium to A) BPA, B) BPF and C) BADGE-2HCl for 24 h. Results are expressed as the percentage of viability in control cells (mean  $\pm$  SEM of six replicates in three different assays).

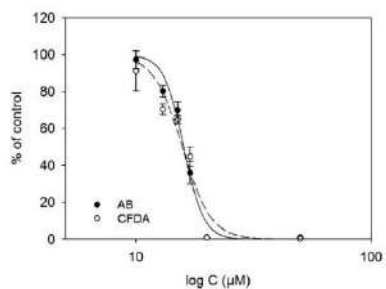
A)



B)

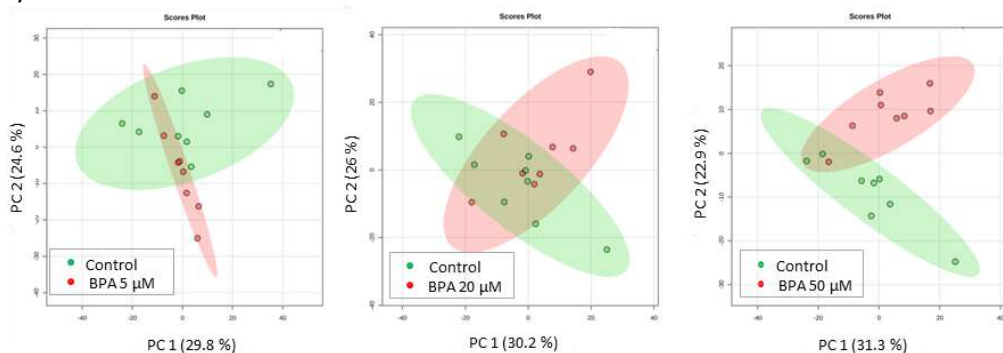


C)

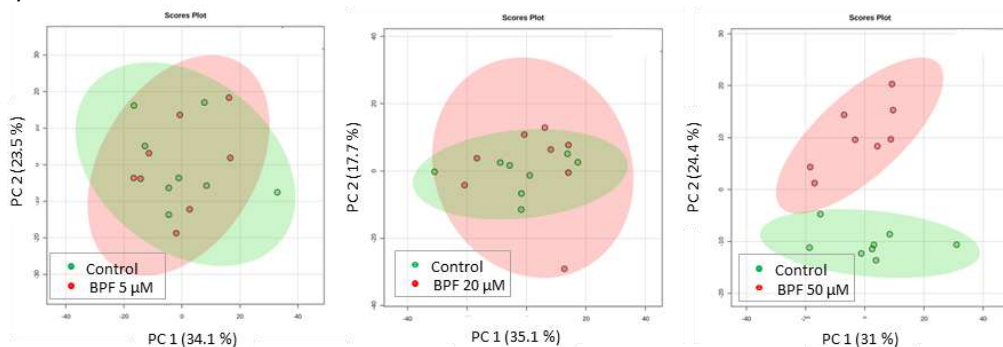


**Figure S2.** Principal component analysis (PCA) scores plot of the lipid profile of ZFL cells exposed to A) 5, 20, 50  $\mu$ M BPA, B) 5, 20, 50  $\mu$ M BPF and C) 1, 5, 10  $\mu$ M BADGE-2HCl compared to control cells.

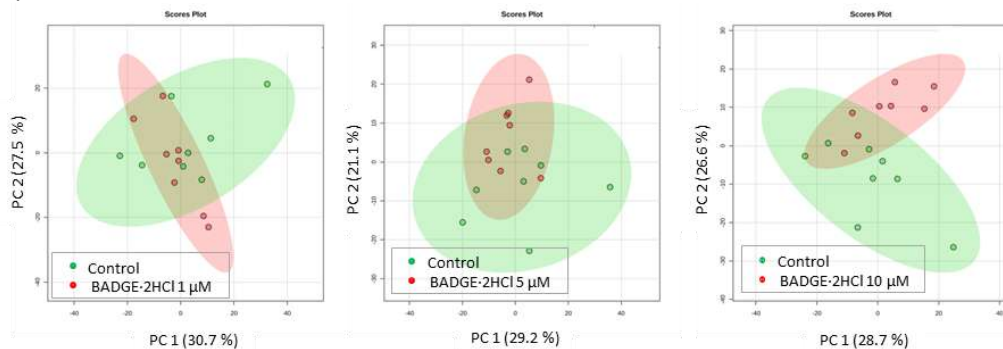
A)



B)

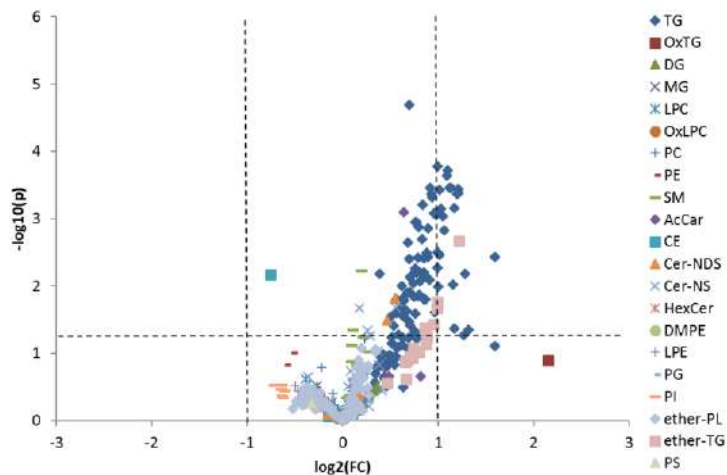


C)

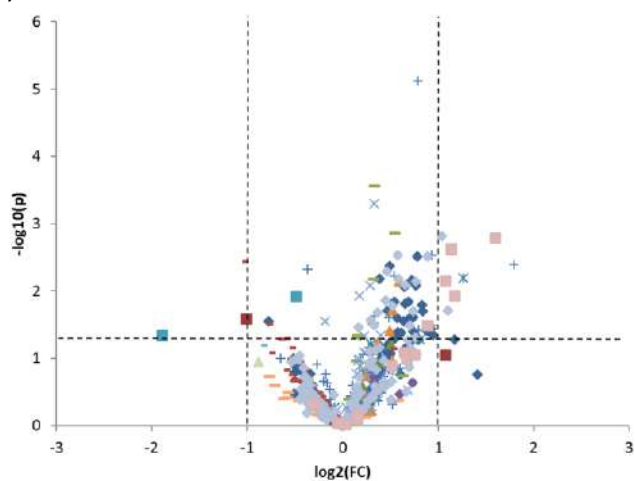


**Figure S3.** Volcano plots showing the altered cellular lipids after ZFL exposure to A) 5  $\mu$ M and B) 20  $\mu$ M of BPA. The x-axis reflects the magnitude of the change ( $-\log(\text{fold change})$ ) and the y-axis reflects the significance of change ( $-\log(p\text{-value})$ ). Dotted lines delimit significantly altered lipids (fold change  $\geq 2.0$ ;  $p < 0.05$ ).

A)

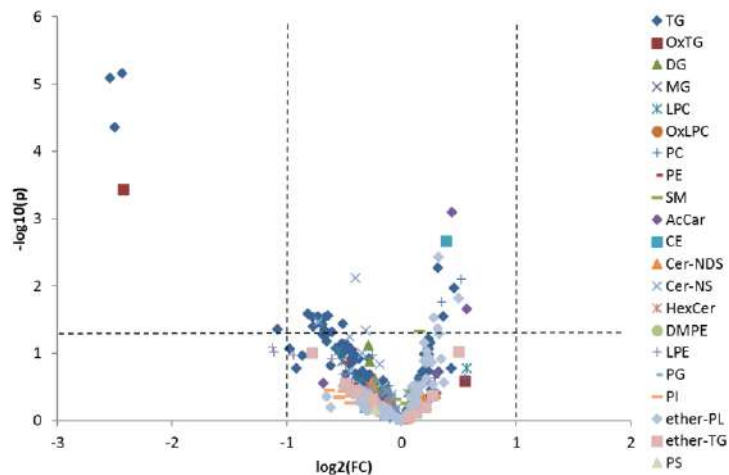


B)

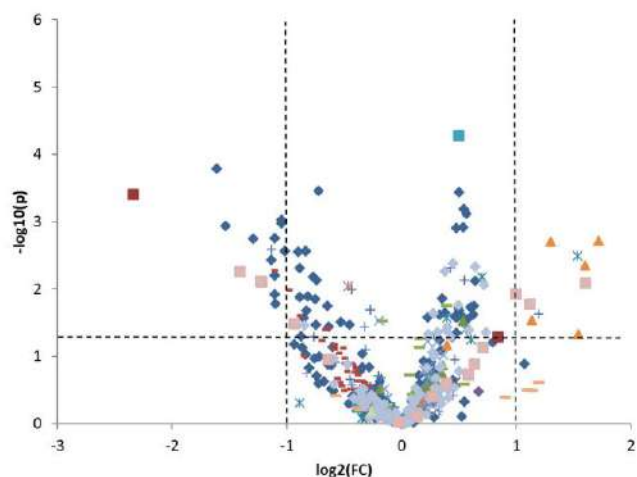


**Figure S4.** Volcano plots showing the altered cellular lipids after ZFL exposure to A) 5  $\mu$ M and B) 20  $\mu$ M of BPF. The x-axis reflects the magnitude of the change ( $-\log(\text{fold change})$ ) and the y-axis reflects the significance of change ( $-\log(p\text{-value})$ ). Dotted lines delimit significantly altered lipids (fold change  $\geq 2.0$ ;  $p < 0.05$ ).

A)

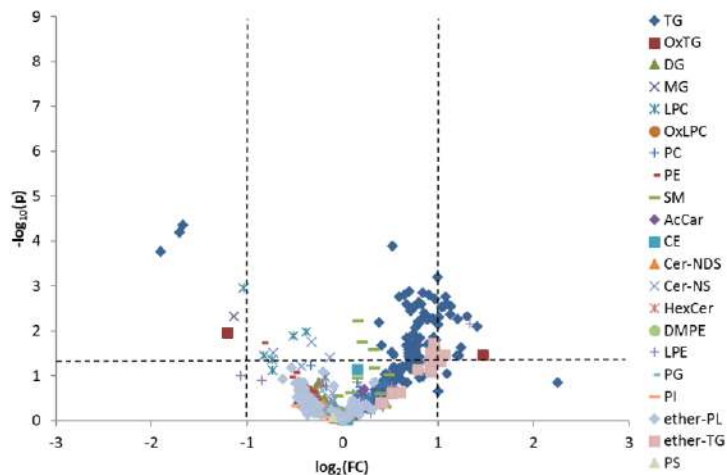


B)

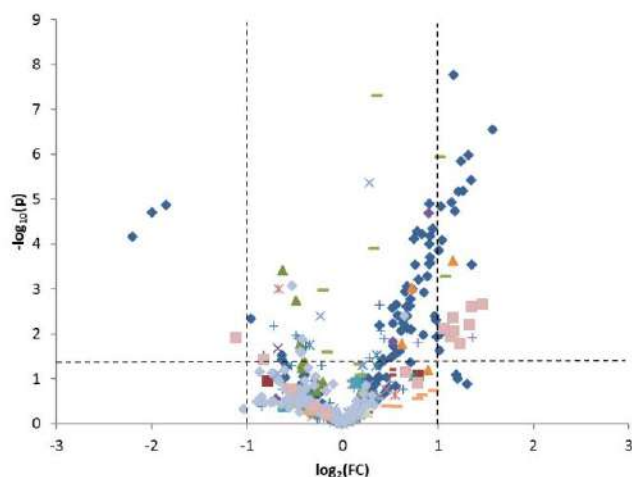


**Figure S5.** Volcano plots showing the altered cellular lipids after ZFL exposure to A) 1  $\mu\text{M}$  and B) 5  $\mu\text{M}$  of BADGE·2HCl. The x-axis reflects the magnitude of the change ( $-\log(\text{fold change})$ ) and the y-axis reflects the significance of change ( $-\log(p\text{-value})$ ). Dotted lines delimit significantly altered lipids (fold change  $\geq 2.0$ ;  $p < 0.05$ ).

A)

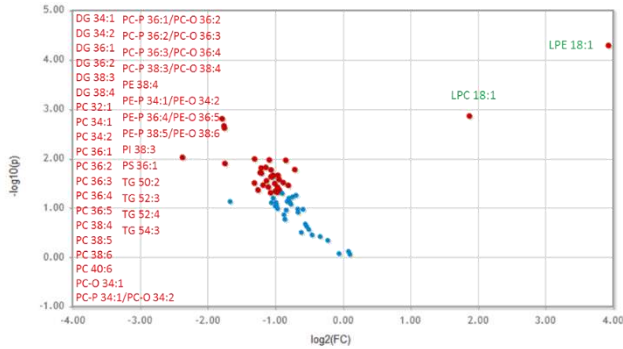


B)

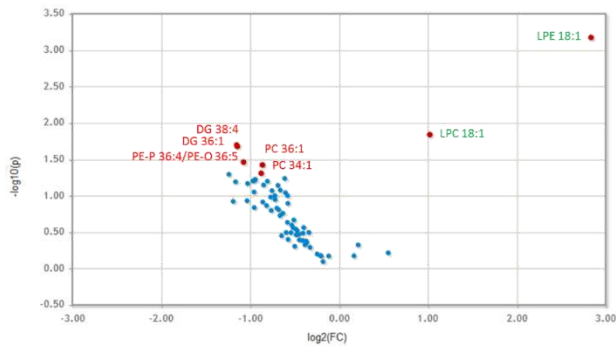


**Figure S6.** Volcano plots showing the changes in the lipids present in the culture medium after ZFL exposure to A) 50  $\mu$ M BPA, B) 50  $\mu$ M BPF and C) 10  $\mu$ M BADGE-2HCl. The x-axis reflects the magnitude of the change ( $-\log(\text{fold change})$ ) and y-axis reflects the significance of change ( $-\log(p\text{-value})$ ). Dots representing significantly altered lipids (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) are colored in red. Annotation in red refers to the decreased lipids while in green refer to the increased lipids.

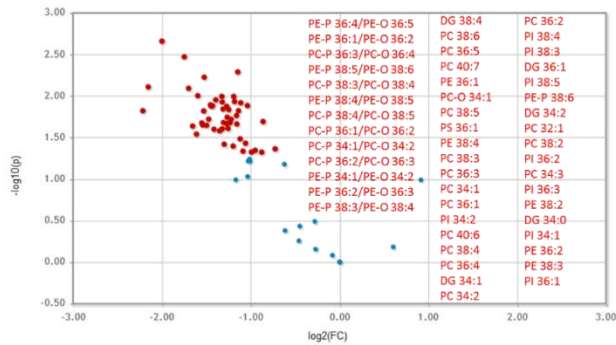
A)



B)



C)



### **2.2.3 Article científico IV**

*Drospirenone induces the accumulation of triacylglycerides in the fish hepatoma cell line, PLHC-1.*

A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, C. Porte

*Science of the total environment* 692 (2019), 653–659







Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

# Drospirenone induces the accumulation of triacylglycerides in the fish hepatoma cell line, PLHC-1

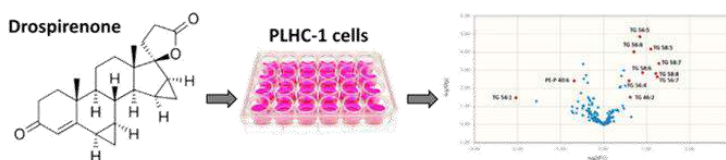
Anna Marqueno, Elisabet Pérez-Albaladejo, Cinta Porte \*

Environmental Chemistry Department, IDAEA-CSIC, C/ Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

## HIGHLIGHTS

- Drospirenone induces the accumulation of specific triglycerides in PLHC-1 cells.
- Increased TG/DG ratio was detected in cells exposed to drospirenone for 24 and 48 h.
- The lipidome was altered at a DRO internal concentration of  $8.3 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 6 May 2019  
 Received in revised form 19 July 2019  
 Accepted 21 July 2019  
 Available online 22 July 2019

Editor: Henner Hollert

### Keywords:

Drospirenone  
 Lipidomics  
 PLHC-1 cells  
 Mass spectrometry

## ABSTRACT

Drospirenone (DRO) is one of the most commonly used progestins reaching the aquatic environment through wastewater treatment plant effluents. It is a progesterone receptor agonist, and as such, can act primarily in the brain and reproductive organs of fish. In order to better understand and predict its effects, this work evaluates the lipidomic changes induced in PLHC-1 cells after exposure to drospirenone at concentrations below the  $EC_{10}$  (1 and  $10 \mu\text{M}$ ) by direct injection of the lipid extracts into a ESI(+/-) Orbitrap mass spectrometer. A significant accumulation of triacylglycerides, particularly long chain ones with unsaturated fatty acid moieties (TGs 46:2, 56:4-7; 58:5-8) and a concomitant decrease of diacylglycerides (DGs 32:1, 34:1-2, 36:1-2, 38:2-4) was observed after 48 h exposure to  $10 \mu\text{M}$  DRO, which corresponded to an intracellular concentration of  $8.3 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein. No significant alteration of PLHC-1 cell lipids was observed following exposure to  $1 \mu\text{M}$  DRO.  $EC_{50}$  for the cytotoxicity of DRO ranged from 105 to  $119 \mu\text{M}$  (24 h exposure) to  $51-58 \mu\text{M}$  (48 h exposure). The study evidences a dysregulation of neutral lipid metabolism and increased TG/DG ratio in fish hepatic cells exposed to DRO.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Drospirenone (DRO, 6,7,15,16-dimethylene-3-oxo-17-pregn-4-ene-21,17-carbolactone) is one of the most commonly used contraceptives of the so called fourth generation progestins, which were developed to bind with greater specificity to the progesterone receptor and, unlike previous generations, to lack androgenic or estrogenic actions (Sitruk-Ware, 2000; Fent, 2015). DRO is an analogue of  $17\alpha$ -spironolactone,

structurally related to testosterone and with a pharmacologic profile closely related to progesterone, which combines potent progestogenic and antiandrogenic activities. It is included in oral contraceptives and in hormonal replacement therapies in combination with ethinylestradiol or estradiol, respectively (Rapkin and Winer, 2007).

DRO reaches the aquatic environment through the effluents of waste water treatment plants. The number of studies that analyse the occurrence of this compound in the aquatic environment is still limited, but concentrations in the  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$  range have been reported in effluents and fresh water samples (Avar et al., 2016; Golovko et al., 2018; Sauer et al., 2018); the presence of DRO in sediments and biota is still poorly

\* Corresponding author.

E-mail address: [cpvqam@cid.csic.es](mailto:cpvqam@cid.csic.es) (C. Porte).

documented. Some studies have suggested that progestins at the low  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  may pose a biological risk to fish (Maasz et al., 2017). As a key initiating event, DRO transactivated the fathead minnow nuclear Progesterone Receptor (PR) and acted as a weak agonist of rainbowfish PR (Ellestad et al., 2014; Bain et al., 2015). Gene expression analyses in brain and ovary of female zebrafish showed a down-regulation of vitellogenin mRNA and an enrichment of genes involved in steroid hormone receptor activity and circadian rhythm (Zucchi et al., 2014). Increased plasma levels of 17-hydroxypregnenolone, 17-hydroxyprogesterone and androstenedione and an up-regulation of *cyp17a1* were detected in juvenile sea bass exposed to  $10\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  DRO through the food (Blanco et al., 2016). Zeilinger et al. (2009) reported reduced fertility of fathead minnow exposed to DRO ( $6.5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), while no effect on reproduction or alteration in plasma steroid concentrations was observed after 21 days exposure to  $100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  DRO (Runnalls et al., 2013).

Some progestins, particularly those with androgenic properties, are reported to alter blood levels of lipids and to diminish the beneficial effects of estrogens on lipoprotein metabolism (Jiang and Tian, 2017). The natural steroid progesterone was found to stimulate adipogenesis in 3T3-L1 cells (Rondinone et al., 1992). Progesterone also induced the up-regulation of lipogenic enzymes in adipose tissue and hyperplasia of the smooth endoplasmic reticulum (SER) in the liver of rats; SER participates in lipid biosynthesis, detoxification processes and calcium regulation, among other functions (Boada et al., 2002; Stelmanska and Swierczynski, 2013). Although DRO was developed to minimize the impact on lipids when used for hormonal replacement therapies, increased levels of TGs and  $\gamma$ -glutamyltransferase, a biomarker of oxidative stress, has been detected in the serum of healthy women using oral contraceptives containing estradiol and DRO (Kowalska et al., 2017). Other studies have reported a marked dose-dependent inhibition of adipose differentiation and TGs accumulation in 3T3-L1 cells through the antagonistic effect of DRO on the mineralocorticoid receptor (Caprio et al., 2011). Nevertheless, despite of these evidences, the role of progestins in the regulation of lipid metabolism is not well established, and so far, information for aquatic vertebrates is lacking.

In recent years, advances in mass spectrometry have accelerated the development of lipidomics and have allowed characterizing the entire lipid content or lipidome of cells and tissues. The application of lipidomics to study the interaction of progestins with cell lipid dynamics will be extremely powerful in detecting and quantifying changes not only in lipid classes (i.e. TGs), but also in individual lipid molecules, allowing the detection of subtle changes in lipid metabolism and the responsible molecular mechanisms (Han, 2016).

In this work, we applied a lipidomic-based approach to identify changes in the lipidome of the topminnow liver cells PLHC-1 exposed to non-cytotoxic concentrations of DRO for 24 and 48 h. The intracellular concentration of DRO and the concentration in culture medium were determined to improve the sensitivity and accuracy of the in-vitro approach, and to detect the minimum internal concentrations of DRO necessary to alter the lipidome of hepatic cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Drospirenone was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Alamar Blue (AB) and 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester (CFDA-AM) were from Invitrogen (Life Technologies; Eugene, OR, USA). Fluorescamine was obtained from Sigma (Steinheim, Germany). LC-MS grade water, methanol, dichloromethane and acetonitrile ( $\geq 99\%$ ) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid was from J.T. Baker® (Deventer, Netherlands). Nitrogen (purity  $>99.999\%$ ) was supplied by Air Liquide (Madrid, Spain). Lipid standards were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

### 2.2. Cell culture and cytotoxicity assays

PLHC-1 cells (*Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma; ATCC® CRL-2406™) were routinely cultured in supplemented Eagle's Minimum Essential Medium (Gibco, Paisley, UK) at  $30\text{ }^\circ\text{C}$  and  $5\%\text{ CO}_2$  as described in Pérez-Albaladejo et al. (2016). Experiments were performed in confluent cell monolayers (passage 7–26).

For the assessment of cytotoxicity, cells were seeded at a density of  $7.5\cdot 10^4$  and  $6\cdot 10^4$  cells per well in 96 well-plates and exposed to DRO for 24 and 48 h, respectively. For the 48 h experiments, the medium was replaced with freshly spiked medium after 24 h exposure. Each treatment was performed in three different plates (six replicates per plate) with cells from different passages. The cytotoxicity of DRO was measured using AB (excitation/emission: 530/590 nm) and CFDA-AM (485/530 nm) as described in Pérez-Albaladejo et al. (2016).

### 2.3. Analysis of DRO in culture medium and cells

Cells were seeded in 24 well-plates at a density of  $6\cdot 10^5$  cells per well, allowed to attach overnight, and exposed to  $10\ \mu\text{M}$  DRO for 24 h. For the 48 h exposure experiment, cell density at seeding was  $4.5\cdot 10^5$  cells per well, and cells were exposed to 1 and  $10\ \mu\text{M}$  DRO, replacing the medium after 24 h with freshly spiked medium. Each treatment was performed in three different plates (3 replicates per plate) with cells from different passages. Solvent control samples consisted in cells grown with culture medium containing 0.5% DMSO. After exposure, an aliquot of  $200\ \mu\text{L}$  of medium was taken from each well, and the three replicates from the same plate were pooled ( $n = 3$ ). Cells were washed with PBS, trypsinized, centrifuged, and the pellets stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  under argon atmosphere until extraction. One replicate per plate was used for intracellular analysis ( $n = 3$ ), while the other two wells were used for lipid analysis ( $n = 6$ ). Intracellular concentration of DRO was measured for cells exposed to the higher concentration ( $10\ \mu\text{M}$ ).

For the analysis of DRO in culture medium, samples were extracted with ethyl acetate (x3), evaporated to dryness and reconstituted in acetonitrile. DRO was analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). The chromatographic system consisted of an Agilent Technologies 1200 series equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 column ( $4.6\ \times\ 150\text{ mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ ) (Agilent, USA) protected with a guard column (C18,  $4.0\ \times\ 3.0\text{ mm}$ ) (Phenomenex, USA) at a flow rate of  $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The injection volume was  $20\ \mu\text{L}$ . The column was maintained at  $30\text{ }^\circ\text{C}$  and the mobile phase consisted of a gradient of water (A) and acetonitrile (B), which started at 50% of B and increased to 100% in 7 min, where was kept for 3 min, and reached initial conditions in 2 min, where it was maintained for 2 more minutes, with a total acquisition time of 14 min. Elution of DRO was monitored at 252 nm with a G1315D DAD model (Agilent 1200 series). Quantification was carried out by preparing external calibration curves in culture medium, which were extracted with ethyl acetate and reconstituted in acetonitrile. The extraction efficiency calculated with an external calibration curve prepared in acetonitrile was of  $84 \pm 2\%$  ( $n = 3$ ;  $5\ \mu\text{M}$  DRO).

The intracellular concentration of DRO after 24 and 48 h exposure was determined by UHPLC-MS/MS. Cells were extracted with ethyl acetate (x3) in an ultrasonic bath for 2 min, the extracts taken to dryness under nitrogen and reconstituted in acetonitrile for the analysis. The analysis was performed in an Ultra Acquity LC System, TQ Detector, (Waters, USA) using multiple reaction mode (MRM) as acquisition mode as described in Blanco et al. (2016). To determine the cells protein content, fluorescamine was added to each well and the fluorescence was read at the excitation/emission wavelengths of 360/460 nm as described by Lorenzen and Kennedy (1993). Bovine serum albumin was used as standard.



#### 2.4. Analysis of cell lipidome

Lipids from cells exposed to DRO as described above were extracted in an ultrasonic bath for 2 min using ethyl acetate ( $\times 3$ ). Extracts were dried and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  under argon atmosphere. Lipid extracts were analyzed by FIA-Orbitrap-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) as described in Marquero et al. (2019a). Briefly,  $5\ \mu\text{L}$  of the lipid extract conveniently diluted were infused to the instrument with a flow rate of  $50\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  of methanol:dichloromethane (80:20). Mass spectra were acquired in full scan alternating positive and negative ionization polarity in a single run. LIPID MAPS, exact mass, isotopic distributions, charge, adducts formed, number of ring plus double bond ( $\text{RDB} = 0.5\text{--}15$ ), and elements in molecular formula, were used for the identification of the lipid molecules with a maximum permitted mass error fixed at  $<5\ \text{ppm}$ . Mass spectra were processed using Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Lipid species were annotated as <lipid class> - <total fatty acyl chain>:<total number of double bonds>, and quantified ( $\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$ ) relative to an internal standard mix added to the samples before the analysis that consisted of 1,2,3-17:0 TG (100 pmol), 1,3-17:0D5 diacylglyceride (50 pmol), 16:0D31-18:1 phosphatidylcholine (200 pmol), 17:0 lysophosphatidylcholine (50 pmol), 16:0D31-18:1 phosphatidylethanolamine (200 pmol), 16:0D31-18:1 phosphatidylinositol (50 pmol), 16:0D31-18:1 phosphatidylserine (200 pmol). Repeatability, expressed as intra-day relative standard deviation calculated for all lipid standards, was satisfactory (TG: 26%, diacylglycerides (DG): 16%, phosphatidylcholines (PC): 19%, lysophosphatidylcholines (LPC): 24%, phosphatidylethanolamines (PE): 23%, phosphatidylinositol (PI): 17%, phosphatidylserines (PS): 21%).

#### 2.5. Statistical analysis

Dose-response curves and concentrations which caused a 50% decline of cell viability ( $\text{EC}_{50}$ ) were calculated using Sigmaplot 11.0 software. Lipid profiles were analyzed with the on-line software Metaboanalyst 4.0 (Xia and Wishart, 2016). Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) was applied to compare control and exposed samples, and to identify the discriminant lipids based on the variable importance in the projection (VIP) parameter. Volcano plots were applied to visualize the significance and the magnitude of the changes detected in the cellular lipidome (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ , Student  $t$ -test).

#### 3. Results

The cytotoxicity of DRO in PLHC-1 cells after 24 and 48 h exposure is shown in Fig. S1 (Supplementary info). Effective concentrations causing a 50% decline in cell viability ( $\text{EC}_{50}$ ) for CFDA-AM and Alamar Blue were  $119 \pm 3$  and  $102 \pm 2\ \mu\text{M}$ , respectively after 24 h exposure.  $\text{EC}_{50}$  significantly decreased after 48 h exposure to DRO ( $58 \pm 4$  and  $51 \pm 1\ \mu\text{M}$ , respectively). Estimated  $\text{EC}_{10}$  were of 42 and  $23\ \mu\text{M}$  after 24 and 48 h exposure, respectively. Concentrations below the  $\text{EC}_{10}$  (1 and  $10\ \mu\text{M}$ ) were selected to investigate the effect of DRO in cellular lipids.

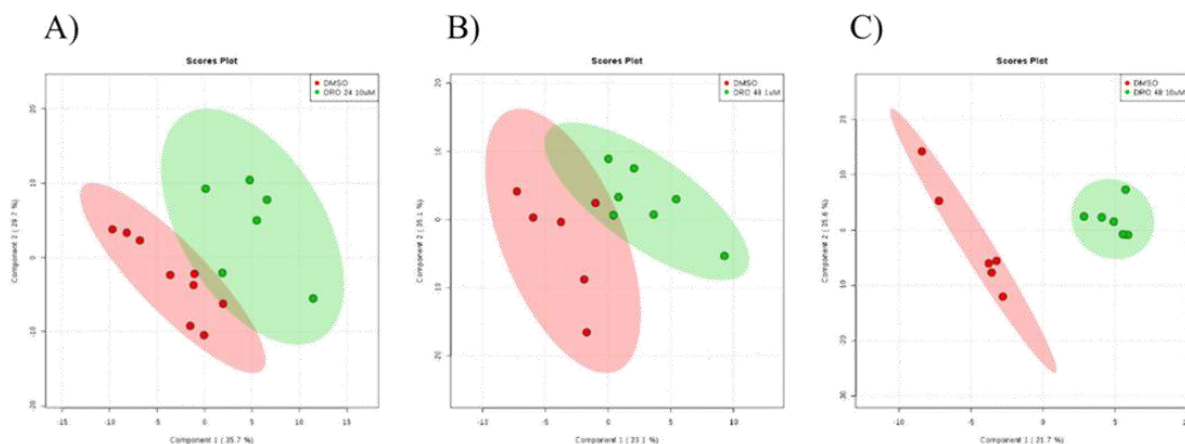
ROS production reached a maximum of 1.5-fold increase in cells exposed to  $200\ \mu\text{M}$  DRO for 15 min; no induction of ROS was observed at concentrations below  $10\ \mu\text{M}$  DRO. Basal levels of ROS were almost achieved after 120 min of exposure. (Fig. S2, Supplementary info).

The analysis of DRO in culture medium evidenced good stability and availability of the compound under the assay conditions. After 24 h exposure,  $9.1 \pm 0.2\ \mu\text{M}$  of DRO was detected dissolved in culture medium ( $10\ \mu\text{M}$  nominal concentration), while for the 48 h exposure experiment, concentrations of DRO of  $0.7 \pm 0.1$  and  $9.0 \pm 0.4\ \mu\text{M}$  were measured, which were well in agreement with the nominal concentrations (1 and  $10\ \mu\text{M}$ ). Consequently,  $\text{EC}_{50}$  values calculated using nominal and experimental concentrations were not significantly different.

The intracellular concentration of DRO was determined for cells exposed to  $10\ \mu\text{M}$  DRO. After 24 h exposure, intracellular concentration was  $9.5 \pm 2.4\ \text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$ , while a concentration of  $8.3 \pm 1.1\ \text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$  was measured after 48 h exposure. The bioconcentration factor (BCF) calculated as the ratio between the concentration of DRO in the cells (in  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; assuming a cellular volume of  $0.001\ \text{mL}$ ) and the concentration in the culture medium ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), was 0.23–0.25, after 24–48 h exposure, which indicates no significant bioaccumulation of DRO.

The analysis of lipids in PLHC-1 cells allowed the identification of 154 lipid species. The most abundant lipid subclasses were PCs (45%) followed by PEs (22%) and plasmalogen/plasmanlyl PEs (PE-P/PE-Os; 11%). Additionally, 17 fatty acids (FA 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 22:0, 22:2, 22:3, 22:4, 22:5, 22:6, 24:0) were identified.

Statistical analysis revealed differences between the lipid pattern of control and exposed cells. PLS-DA scores plot showed a segregation between the lipidome of control cells and those exposed to  $10\ \mu\text{M}$  DRO for 24 h (65.4% of variance explained,  $R^2 = 0.84$ ,  $Q^2 = 0.49$ ) and 48 h (57.3% of variance explained,  $R^2 = 0.97$ ,  $Q^2 = 0.81$ ) (Fig. 1A–C). A segregation



**Fig. 1.** PLS-DA score plots show the differences between the lipidome of exposed ( $n = 6\text{--}9$ ) and control cells ( $n = 6\text{--}7$ ). Cells exposed to A)  $10\ \mu\text{M}$  DRO for 24 h; B)  $1\ \mu\text{M}$  DRO for 48 h; C)  $10\ \mu\text{M}$  DRO for 48 h.

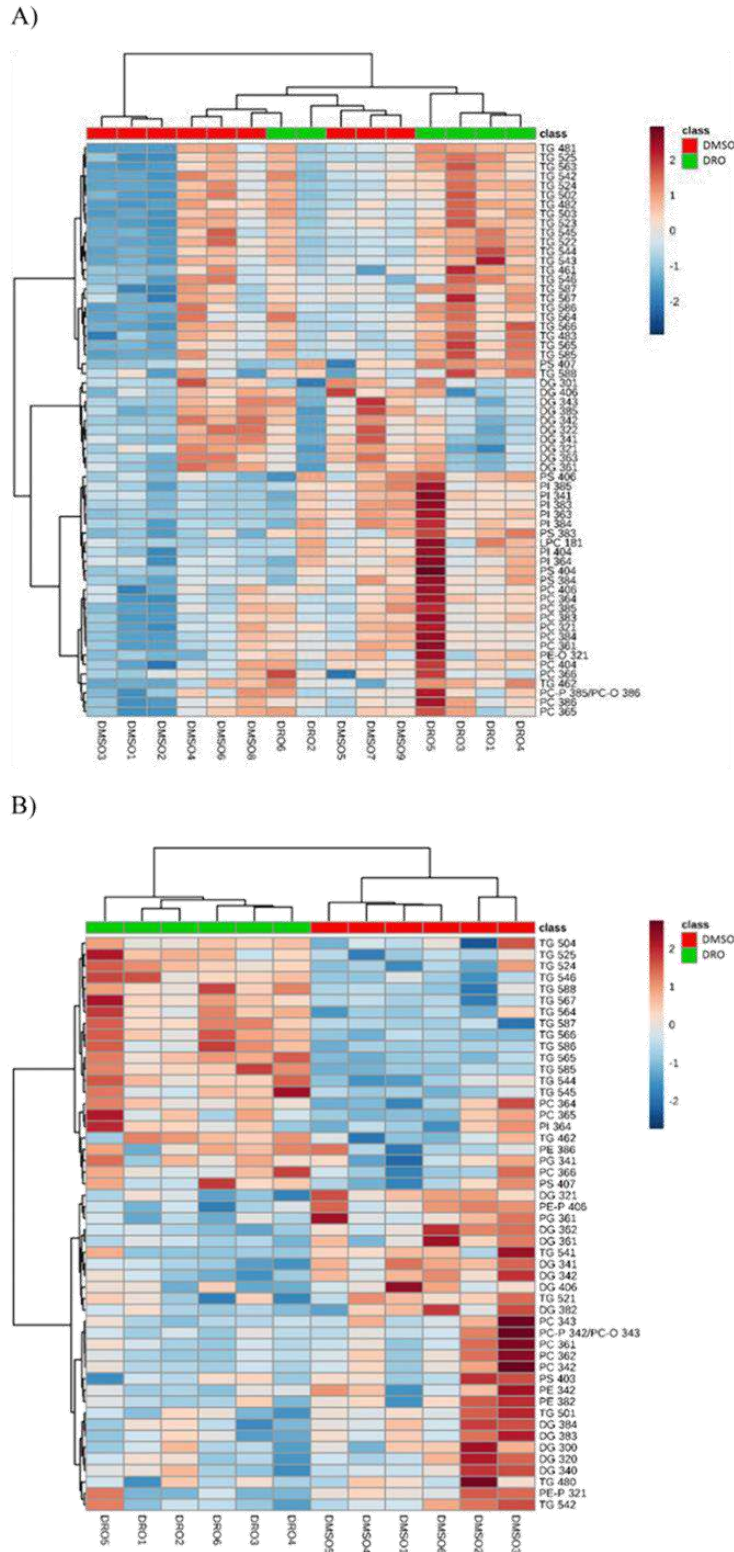


Fig. 2. Dendrograms depicting the clustering between samples and lipid species for cells exposed to 10 μM DRO for 24 h (A) and 48 h (B). Levels of the lipids are colour coded denoting up-regulation (red) or down-regulation (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

was also observed for the lipidome of cells exposed to 1  $\mu\text{M}$  DRO for 48 h and control cells ( $R^2 = 0.79$ ;  $Q^2 = 0.08$ ) (Fig. 1B). However, the large discrepancy between  $R^2$  and  $Q^2$  for this experimental condition clearly indicated an overfitting of the model and a low predictability. For cells exposed to 10  $\mu\text{M}$  DRO for 24 h, 61 VIPs  $>1.0$  were generated. The hierarchical cluster analysis showed an accumulation of TGs in the cells exposed to DRO (TGs 46:1-2, 48:1-3, 52:5, 54:3-4-5, 56:3-4-5-6, 58:5-6-7-8), but not a good grouping of the control and exposed samples (Fig. 2A). In contrast, when cells were exposed to 10  $\mu\text{M}$  DRO for 48 h, the PLS-DA analysis generated 51 VIPs  $>1.0$ ; and the hierarchical cluster analyses perfectly assembled the samples in two groups that corresponded to control and exposed cells (Fig. 2B). Cells exposed to DRO showed an accumulation of TGs (52:4-5, 54:4-5-6, 56:4-5-6-7) with a relatively high number of double bonds, and a down-regulation of some DGs (30:0, 32:0-1, 34:0-1-2, 36:1-2, 38:2-3-4). Consequently, the ratio TG/DG increased from  $29.5 \pm 3.5$  (control cells) to  $43.3 \pm 5.0$  after exposure to 10  $\mu\text{M}$  DRO.

In agreement with the PLS-DA results, volcano plots showed a significant accumulation of TGs of 46, 56 and 58 carbon atoms containing from 4 to 8 double bonds, after both, 24 and 48 h exposure (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 3). The magnitude of the changes is comparable in the two studied scenarios, ranging from 1.5 to 3-fold, but with greater significance after 48 h exposure. In addition, an increase of LPC 18:1, PSs (38:3, 40:7), and PI 40:4 were observed after 24 h exposure, while PE-P 40:6 decreased after 48 h exposure. Fig. 4 depicts the TG profile in PLHC-1 cells and the quantitative changes experienced after 48 h exposure to 10  $\mu\text{M}$  DRO. TGs of 56 and 58 carbon atoms and 4 to 8 double bonds were significantly increased. Overall, this represents a 20% increase in the total TG content of exposed cells.

#### 4. Discussion

This work evidences the potential of DRO to alter the lipid composition of liver cells and consequently, elicit biological impacts in fish

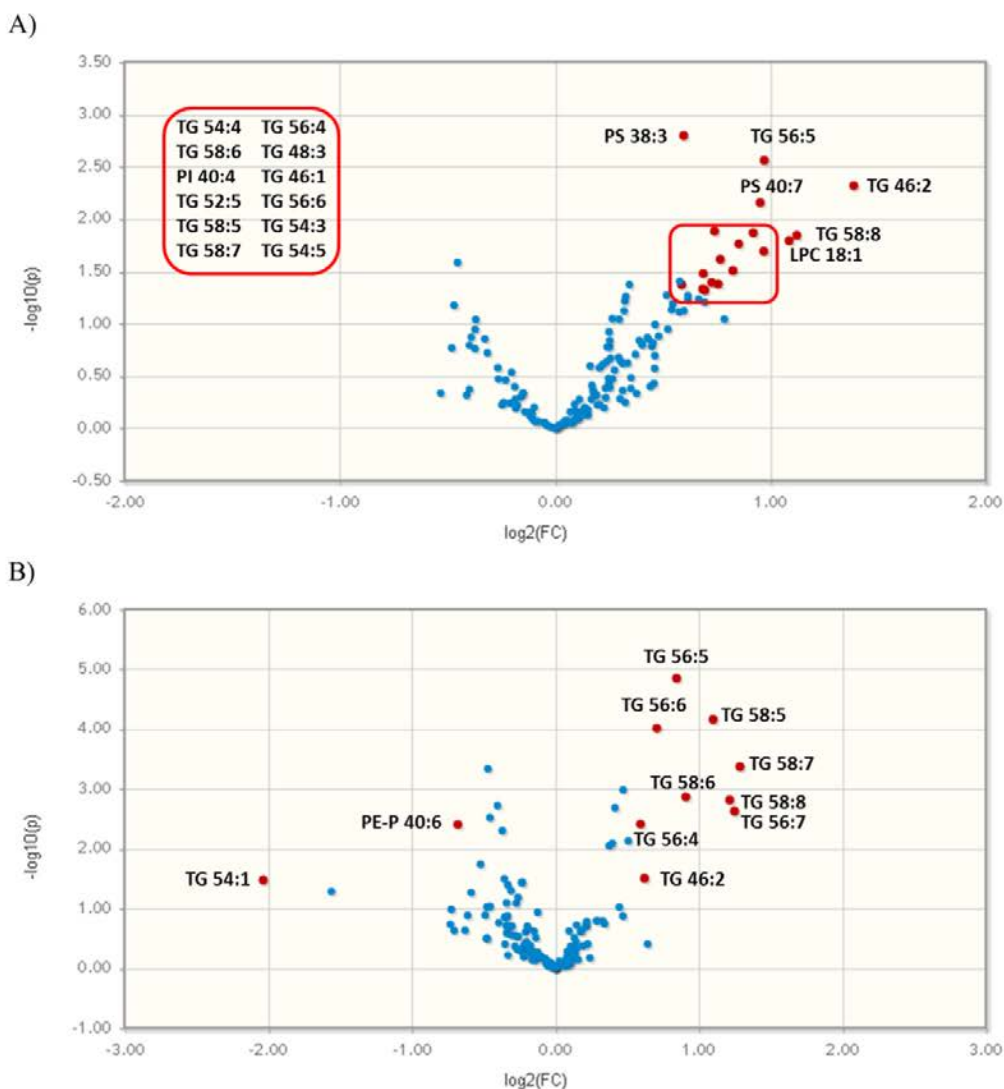


Fig. 3. Volcano plots evidencing differences in the lipid profile of control cells and cells exposed to 10  $\mu\text{M}$  DRO for 24 h (A) and 48 h (B). Significantly altered lipids (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) indicated in red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



beyond those previously described. DRO induced the accumulation of TGs, mostly long chain ones with a high number of double bonds, and a concomitant depletion of DGs in liver cells. From a quantitative point of view, total TG content increased from  $820 \pm 132$  to  $1225 \pm 128$  pmol/ $10^5$  cells after 24 h exposure; and from  $949 \pm 40$  to  $1122 \pm 36$  pmol/ $10^5$  cells after 48 h.

At present, it is uncertain whether the change in the lipid profile and the accumulation of TGs in liver cells is indicative of lipid associated toxicity or if, on the contrary, may play a beneficial role. Although, no information is available for fish, TG species with more than four double bonds were high in obesity resistance mice, showing that differences in the degree of saturation of TG species in the liver affect the individual response to high-fat-diet (Nam et al., 2015). Additionally, the increase of TGs could serve to store polyunsaturated FAs as a protective measure against peroxidation (Ackerman et al., 2018), but this is unlikely, considering the relatively low levels of ROS generated after 15 min exposure to DRO (Fig. 2S). On the other hand, the increase of the TG/DG ratio revealed increased metabolism of DGs to TGs in DRO exposed cells, and it is an index of hepatic steatosis (Puri et al., 2007). Liver steatosis, which is defined as an excessive accumulation of TGs and other fats inside liver cells, has been described in fish after handling stress and after dietary exposure to endocrine disruptors that can alter lipid homeostasis by interacting with nuclear receptors signaling pathways (Naour et al., 2017; Carnevali et al., 2017).

Although, an increasing number of studies report that xenobiotics, including organotins, alkylphenols, phthalates, fibrates and others, alter lipid homeostasis in fish (Capitão et al., 2017), no such information is available for progestins, apart from a laboratory study, where *Rutilus rutilus* exposed to  $500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  of a mixture of progestins (DRO, progesterone and levonorgestrel) for 42 days showed no significant changes in TG serum levels (Maasz et al., 2017). Thus, this is the first report of a lipid disruptive effect of DRO in fish liver cells. The functional consequences of an increase of only TGs with long chain highly unsaturated fatty acid moieties (TGs 56:4-7; 58:5-8) are unknown and should be further investigated.

The biological action of progestins is primarily determined by its interactions with steroid receptors, and although DRO is devoid of estrogenic, androgenic, glucocorticoid and mineralocorticoid activity, studies carried out in murine preadipocyte cell lines and primary cultures of human preadipocytes exposed to DRO reported an antiadipogenic effect that was attributed to the antagonistic effect of DRO on the mineralocorticoid receptor (Caprio et al., 2011). More recently, Louw-du Toit et al. (2016) showed that DRO modulates the synthesis of steroids in the human adrenocortical carcinoma cell line

H295R by increasing the synthesis of progesterone and 17-hydroxyprogesterone and reducing the synthesis of androgens and glucocorticoids. Similarly, exposure to DRO changes plasmatic levels of steroids in juvenile sea bass by decreasing the concentrations of 17-hydroxyprogesterone, 17-hydroxyprogesterone and androstenedione after 30 days exposure to  $10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  DRO through the diet (Blanco et al., 2016). Thus, although further research is needed, one may hypothesize that DRO and other endocrine disruptors, by modulating the synthesis of androgens and other endogenous steroids may interfere with lipid and TG homeostasis as described by Damsteegt et al. (2016), who revealed androgens as major regulators of TG physiology in eels.

Cytotoxic effects for DRO were observed at concentrations of  $102\text{--}119 \mu\text{M}$  and  $51\text{--}58 \mu\text{M}$  after 24 and 48 h exposure, respectively. These are high concentrations, with no environmental relevance. As no discrepancies between nominal and experimental concentrations of DRO in culture medium were observed, we can assure that no significant losses of the compound due to binding to serum proteins or plastic wells occurred, and that there was a good bioavailability of the compound to the cells. Moreover, our results evidenced the uptake of DRO by the cells, with no significant bioconcentration factor ( $\text{BCF} < 1$ ). In fact, only a 0.09 to 0.14% of the compound was detected in the cells under our assay conditions. These results are well in agreement with previous studies that showed no significant bioaccumulation of DRO in fish (Blanco et al., 2016).

Additionally, the alteration of the cells lipidome was observed at a concentration of  $9 \mu\text{M}$  DRO in culture medium ( $\sim 3.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), which is several orders of magnitude higher than the environmental concentrations (Avar et al., 2016; Golovko et al., 2018). Nonetheless, this exposure resulted in intracellular concentrations of 8.4 to  $9.5 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein. Considering that the entrance of DRO in the aquatic environment through waste water treatment plants is constant, it is likely that long-term exposures to low doses of DRO could lead to a similar internal concentration in the liver of exposed fish, and consequently, significant dysregulation of the lipidome of hepatic cells. However, in the aquatic environment, fish are not exposed to single compounds, but to mixtures of pollutants, and the alteration of liver lipidome of wild fish will be the result of a combination of different exposures to xenobiotics and natural factors (nutrition, reproduction). Thus, the very particular lipidic fingerprint detected for DRO in PLHC-1 cells will probably not be observed in wild fish. In a recent study, we analyzed the lipidome of the skeletal muscle of fish in a Mediterranean river and the lipid profiles of fish sampled at the polluted sites, exposed to complex mixtures of endocrine disruptors of urban and industrial origins, were indicative

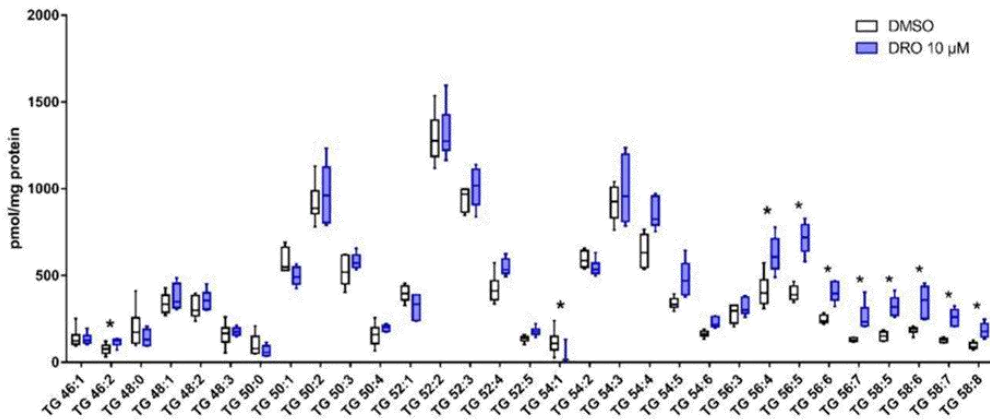


Fig. 4. Increased concentration of triacylglycerides ( $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein) in PLHC-1 cells after exposure to  $10 \mu\text{M}$  DRO for 48 h. The box extends from 25th to 75th percentiles; the horizontal bar within the box is the median and whiskers represent 5-95th percentiles. \*Significantly altered lipid species ( $p < 0.05$ ).

of oxidative stress and deregulation of cholesterol homeostasis, but could not be directly associated to a single contaminant or class of contaminants (Marqueño et al., 2019b).

Overall, this study shows a significant accumulation of TGs with a concomitant decrease of DGs in PLHC-1 cells, and detects the minimal internal concentration of DRO necessary to produce this alteration (low ng/mg protein range). These results contribute to better understand and predict the toxicity of DRO in fish.

### Acknowledgements

Anna Marqueño acknowledges a pre-doctoral fellowship BES-2015-074842. Work financed by Ministerio de Ciencia e Innovación, under the project CGL2014-52144-P.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.347>.

### References

- Ackerman, D., Tumanov, S., Qiu, B., Michalopoulou, E., Spata, M., Azam, A., Xie, H., Simon, C., Kamphorst, J.J., 2018. Triglycerides promote lipid homeostasis during hypoxic stress by balancing fatty acid saturation. *Cell Rep.* 24 (10), 2596–2605.e5.
- Avar, P., Maasz, G., Takács, P., Lovas, S., Zrinyi, Z., Svirghu, R., Takátsy, A., Tóth, L.G., Pirger, Z., 2016. HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Test. Anal.* 8, 124–128.
- Bain, P.A., Kumar, A., Ogino, Y., Iguchi, T., 2015. Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray-Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquat. Toxicol.* 163, 97–101.
- Blanco, M., Fernandes, D., Medina, P., Blázquez, M., Porte, C., 2016. Drospirenone intake alters plasmatic steroid levels and cyp17a1 expression in gonads of juvenile sea bass. *Environ. Pollut.* 213, 541–548.
- Boada, L.D., Zumbado, M., Del Río, I., Blanco, A., Torres, S., Monterde, J.G., Afonso, J.L., Cabrera, J.J., Díaz-Chico, B.N., 2002. Steroid hormone progesterone induces cell proliferation and abnormal mitotic processes in rat liver. *Arch. Toxicol.* 75, 707–716.
- Capitão, A., Lyssimachou, A., Castro, L.F., Santos, M.M., 2017. Obesogens in the aquatic environment: an evolutionary and toxicological perspective. *Environ. Int.* 106, 153–169.
- Caprio, M., Antelmi, A., Chetrite, G., Muscat, A., Mammi, C., Marzolla, V., Fabbri, A., Zennaro, M.C., Fève, B., 2011. Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology* 152, 113–125.
- Camevali, O., Notarstefano, V., Olivetto, I., Graziano, M., Gallo, P., Di Marco Pisciotano, I., Vaccari, L., Mandich, A., Giorgini, E., Maradonna, F., 2017. Dietary administration of EDC mixtures: a focus on fish lipid metabolism. *Aquat. Toxicol.* 185, 95–104.
- Damsteegt, E.L., Ozaki, Y., McCormick, S.P.A., Lokman, P.M., 2016. Triacylglyceride physiology in the short-finned eel, *Anguilla australis*—the effects of androgen. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310, R422–R431.
- Ellestad, L.E., Cardon, M., Chambers, I.G., Farmer, J.L., Hartig, P., Stevens, K., Villeneuve, D.L., Wilson, V., Orlando, E.F., 2014. Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors in vitro. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8179–8187.
- Fent, K., 2015. Progestins as endocrine disruptors in aquatic ecosystems: concentrations, effects and risk assessment. *Environ. Int.* 84, 115–130.
- Golovko, O., Šauer, P., Fedorova, G., Kroupová, H.K., Grabic, R., 2018. Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. *Sci. Total Environ.* 621, 1066–1073.
- Han, X., 2016. Lipidomics for studying metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 668–679.
- Jiang, Y., Tian, W., 2017. The effects of progestones on blood lipids in hormone replacement therapy. *Lipids Health Dis.* 16, 219.
- Kowalska, K., Ścisalska, M., Bizoń, A., Śliwińska-Mossoń, M., Milnerowicz, H., 2017. Influence of oral contraceptives on lipid profile and paraoxonase and commonly hepatic enzymes activities. *J. Clin. Lab. Anal.* 1–7.
- Lorenzen, A., Kennedy, S.W., 1993. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* 214, 346–348.
- Louw-du Toit, R., Perkins, M.S., Snoep, J.L., Storbeck, K.-H., Africander, D., 2016. Fourth-generation progestins inhibit 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and modulate the biosynthesis of endogenous steroids. *PLoS One* 11 (10), e0164170.
- Maasz, G., Zrinyi, Z., Takacs, P., Lovas, S., Fodor, I., Kiss, T., Pirger, Z., 2017. Complex molecular changes induced by chronic progestogens exposure in roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 9–17.
- Marqueño, A., Pérez-Albaladejo, E., Flores, C., Moyano, E., Porte, C., 2019a. Toxic effects of bisphenol A diglycidyl ether and derivatives in human placental cells. *Environ. Pollut.* 244, 513–521.
- Marqueño, A., Blanco, M., Maceda-Veiga, A., Porte, C., 2019b. Skeletal muscle lipidomics as a new tool to determine altered lipid homeostasis in fish exposed to urban and industrial wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* 53, 8416–8425.
- Nam, M., Choi, M.S., Jung, S., Jung, Y., Choi, J.Y., Ryu, D.H., Hwang, G.S., 2015. Lipidomic profiling of liver tissue from obesity-prone and obesity-resistant mice fed a high fat diet. *Sci. Rep.* 5, 1–11.
- Naour, S., Espinoza, B.M., Aedo, J.E., Zuloaga, R., Maldonado, J., Bastias-Molina, M., et al., 2017. Transcriptomic analysis of the hepatic response to stress in the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*): insights into lipid metabolism, oxidative stress and liver steatosis. *PLoS One* 12 (4), e0176447.
- Pérez-Albaladejo, E., Rizzi, J., Fernandes, D., Lille-Langøy, R., Karlsen, O.A., Goksøyr, A., Oros, A., Spagnoli, F., Porte, C., 2016. Assessment of the environmental quality of coastal sediments by using a combination of in vitro bioassays. *Mar. Pollut. Bull.* 108, 53–61.
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., Sanyal, A.J., 2007. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46, 1081–1090.
- Rapkin, A.J., Winer, S.A., 2007. Drospirenone: a novel progestin. *Drug evaluation. Expert Opinion. Pharmacotherapy* 8, 989–999.
- Rondinone, C.M., Baker, M.E., Rodbard, D., 1992. Progestins stimulate the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42, 795–802.
- Runnalls, T.J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A.P., Sumpter, J.P., 2013. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2077–2084.
- Šauer, P., Stará, A., Golovko, O., Valentová, O., Bořík, A., Grabic, R., Kroupová, H.K., 2018. Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water Res.* 137, 64–71.
- Sitruk-Ware, R., 2000. Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids* 65, 651–658.
- Stelmanska, E., Swierczynski, J., 2013. Up-regulation of lipogenic enzyme genes expression in inguinal white adipose tissue of female rats by progesterone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 134, 37–44.
- Xia, J., Wishart, D.S., 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 55 (14, 10.1-14.10.91).
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Länge, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2663–2670.
- Zucchi, S., Mirbahai, L., Castiglioni, S., Fent, K., 2014. Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 3523–3531.

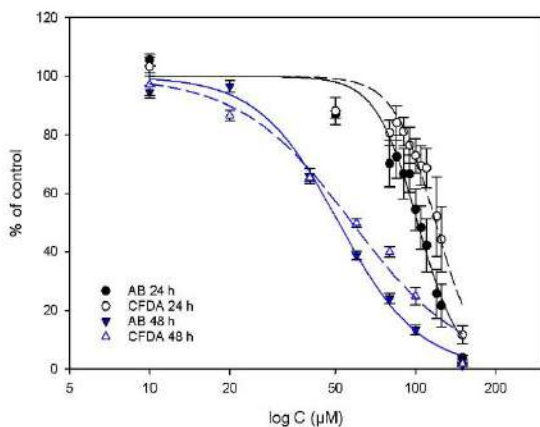


**Informació suplementària de l'article “*Drospirenone induces the accumulation of triacylglycerides in the fish hepatoma cell line, PLHC-1*”**

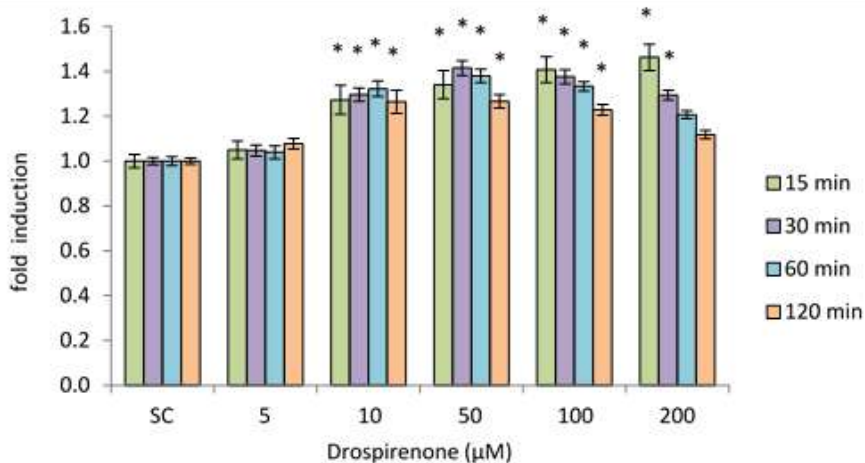
A. Marqueño, E. Pérez-Albaladejo, C. Porte

*Science of the total environment* 692 (2019), 653–659

**Figure S1.** Percentage of cell viability of PLHC-1 cells exposed to drospirenone in the range of 10 to 150  $\mu\text{M}$  (nominal concentration) for 24 h (black) and 48 h (blue). Results are mean  $\pm$  SEM of 6 replicates in 3 different plates.



**Figure S2.** Intracellular ROS production in PLHC-1 cells after 15, 30, 60 and 120 min of exposure to DRO at concentrations of 5 to 200  $\mu\text{M}$ . Results expressed as mean of fold induction  $\pm$  standard deviation (n=18). \*Statistically significant differences from control cells (SC) were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's test, using SPSS 23.0. Level of significance was set at  $p < 0.05$ .





## 2.3 ESTUDI DE CAMP PER A LA DETECCIÓ DE DISRUPCIÓ LIPÍDICA AL MEDI AQUÀTIC

En aquest apartat s'ha estudiat l'alteració del metabolisme de lípids d'organismes aquàtics, per exposició a mescles de contaminants ambientals mitjançant un estudi de camp. L'exposició a xenobiòtics pot afectar les reserves energètiques dels organismes aquàtics, i els peixos es troben entre els tàxons més afectats per l'activitat humana. A més, el teixit muscular representa un gran percentatge de la massa corporal dels peixos, i és l'òrgan principal per la deposició de lípids en algunes espècies. Així, s'ha analitzat el lipidoma del múscul de dues espècies de peixos autòctones dels rius mediterranis, el barb de riera o de muntanya (*Barbus meridionalis*) i la bagra catalana (*Squalius laietanus*), mostrejats en zones de referència i en zones afectades per descàrregues de depuradores, mitjançant la tècnica UHPLC-ESI(+)-HRMS amb un analitzador de temps de vol (ToF). Els resultats d'aquest estudi han estat publicats i es troben recollit a l'article V, titulat "*Skeletal muscle lipidomics as a new tool to determine altered lipid homeostasis in fish exposed to urban and industrial wastewaters*" (Apartat 2.3.1).



### **2.3.1 Article científico V**

*Skeletal muscle lipidomics as a new tool to determine altered lipid homeostasis in fish exposed to urban and industrial wastewaters.*

A. Marqueño, M. Blanco, A. Maceda-Veiga, C. Porte

*Environmental Science and Technology* 53 (2019), 8416–8425



## Skeletal Muscle Lipidomics as a New Tool to Determine Altered Lipid Homeostasis in Fish Exposed to Urban and Industrial Wastewaters

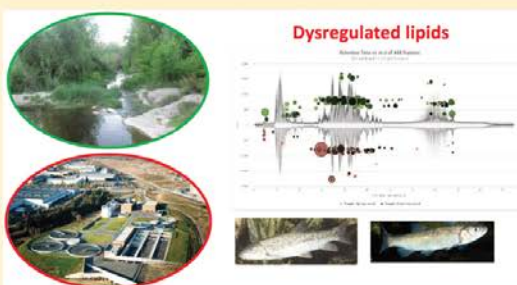
Anna Marqu e o,<sup>†</sup> Maria Blanco,<sup>†</sup> Alberto Maceda-Veiga,<sup>‡</sup> and Cinta Porte<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Environmental Chemistry Department, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

<sup>‡</sup>Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences - IRBio, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

### Supporting Information

**ABSTRACT:** This work applies ultrahigh performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) to characterize for the first time the lipidome of the skeletal muscle of two fish species (*Barbus meridionalis*, *Squalius laietanus*) collected in a Mediterranean River affected by urban and industrial wastewater outflows. The untargeted analysis allowed a clear separation of the lipidome of fish from polluted and reference sites; phosphatidylcholines (PCs), phosphatidylethanolamines (PEs), and their lyso and ether-linked forms were among the distinctive features. The targeted analysis consistently detected a decrease in PC-plasmalogens (36:4, 36:6, 38:6) and highly unsaturated PCs (36:5, 36:6, 38:6, 40:6, 40:7) and an increase in plasmanyl-PCs (36:5, 38:5), lyso-PCs (16:1, 18:1, 22:4) and cholesteryl esters (CEs) (16:0, 18:0, 20:4) in fish from polluted sites. These lipid profiles were indicative of oxidative stress and dysregulation of cholesterol homeostasis in fish from polluted sites. This methodology represents a promising tool for the development of novel noninvasive diagnostic methods based on muscle tissue biopsies to assess the effects of water pollution in wildlife.



### INTRODUCTION

Recent advances on mass spectrometry have allowed the characterization of complex lipidomes of tissues, cells, and biofluids and have been applied successfully in the investigation of human diseases and in the development of biomarkers of cancer, inflammation, and neuropathic diseases.<sup>1</sup> However, lipidomic profiling has rarely been applied to investigate environmental disturbances and the response to environmental stressors in aquatic organisms, where lipids are involved in many essential biological functions, including signal transduction, hormonal regulation, energy balance, and cell-signaling.<sup>2,3</sup> Natural factors, including temperature, nutrition, aging, reproduction, but also exposure to pollutants (e.g., endocrine disruptors) may alter lipid metabolism and, consequently, lipid composition.<sup>4</sup> Indeed, Gr un and Blumberg<sup>5</sup> pointed out at the existence of some chemicals, termed obesogens, which dysregulated lipid metabolism and promoted adipogenesis in murine preadipocytes. Since then, the obesogenic properties of tributyltin (TBT) and the ability of phthalates, bisphenol A (BPA), and BPA analogues, among others, to interfere with lipid metabolism in fish have been described.<sup>6</sup> However, these studies were performed in captive-reared animals or isolated tissues and cells exposed to single compounds, while evidences of lipid

disruption in wild organisms exposed to a combination of natural and anthropogenic stressors are still few.<sup>7</sup>

Freshwater scarcity affects two-thirds of the world's population, and half a billion people face severe water shortages throughout the year.<sup>8</sup> Rivers from semiarid regions, like many Mediterranean rivers, exemplify this problem by being aquatic ecosystems with low water flow and often poor water quality. During the dry seasons, these rivers receive urban and industrial effluents with a very low dilution factor and experience a significant reduction of water quality.<sup>9</sup> Fish, which are good indicators of river health, are among the most affected taxa. The decline of riverine fish diversity throughout the world and the decrease of native cyprinids in the northeast of Spain in particular are examples of this situation.<sup>10</sup> In a previous study, we investigated the health status of these two cyprinids (*Barbus meridionalis* and *Squalius laietanus*) in a Mediterranean river (Ripoll River) after a major investment in sewage treatment plants (STPs) and restoration policies. Although the water quality and ecological state of the river improved substantially,

Received: April 5, 2019

Revised: June 14, 2019

Accepted: June 17, 2019

Published: June 17, 2019



fish collected in areas affected by STP effluents showed exposure to metals, alkylphenols, and other organic pollutants, along with induction of liver enzymes, endocrine alterations, and genotoxic effects.<sup>9,11</sup> Certainly, urban and industrial wastewater effluents are a major source of endocrine disruptors in the aquatic environment; they cause significant alterations of the endocrine system in exposed organisms and often reproductive impairment.<sup>12</sup> The endocrine system plays a fundamental role in the regulation of the metabolism of lipids, carbohydrates, and proteins, and any alteration of the endocrine system can lead to an imbalance of these hormonally driven processes, including changes in the metabolome and lipidome of the exposed organisms.<sup>4,6</sup>

Here, we examine the lipid profile of a small portion of the white skeletal muscle of two native fish species (*B. meridionalis* and *S. laietanus*) collected along a highly impacted Mediterranean river by using both untargeted and targeted lipidomic approaches. By building on a previous study,<sup>11</sup> our main objective was to investigate if it is possible to discriminate between the lipidome of fish exposed to STP effluents from those collected at reference sites and, if so, to discuss the potential that lipidomics has for environmental wildlife monitoring, through the development of new biomarkers of fish health status.

## MATERIAL AND METHODS

**Chemicals.** LC-MS grade water ( $\geq 99\%$ ) and methanol ( $\geq 99\%$ ) were from Merck (Darmstadt, Germany). Nitrogen (purity  $> 99.999\%$ ) supplied by Air Liquide (Madrid, Spain) was used for the ESI source. Formic acid was purchased from J.T. Baker (Deventer, Netherland), and ammonium formate ( $\geq 99.0\%$ ) was from Sigma-Aldrich. Lipid standards, namely, 16:0 D31–18:1 phosphatidylcholine (16:0 D31–18:1 PC), 17:0 lyso-PC (17:0 LPC), 16:0 D31–18:1 phosphatidylethanolamine (16:0 D31–18:1 PE), 16:0 D31–18:1 phosphatidylserine (16:0 D31–18:1 PS), 16:0 D31–18:1 phosphatidic acid (16:0 D31–18:1 PA), 16:0 D31–18:1 phosphatidylinositol (16:0 D31–18:1 PI), 16:0 D31–18:1 phosphatidylglycerol (16:0 D31–18:1 PG), 1,2,3–17:0 triglyceride (1,2,3–17:0 TG), 1,3–17:0 D5 diglyceride (1,3–17:0 D5 DG), and 17:0 cholesteryl ester (17:0 CE), were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, U.S.A.).

**Sample Collection.** Sampling sites were selected following a pollution gradient to include upstream reference sites (R1, R2, R3) and downstream areas affected by urban and industrial wastewater effluents (P1, P2, P3) in the Ripoll River. Two STP, treating approximately 30000 m<sup>3</sup>·day<sup>-1</sup>, are located in P1 and P3 (Figure S1, Supporting Information). The maximum flow of the river is 4800 m<sup>3</sup>·day<sup>-1</sup> in the summer. Over the sampling period (July 2012), STP effluents mainly determined the river flow. Fish (*B. meridionalis* and *S. laietanus*) were sampled with a portable electrofishing unit by following an international standardized fish sampling method (CEN standards EN 14962 and EN 14011). Immediately after collection, a small piece of the white skeletal muscle (0.2–0.3 g) was dissected below the dorsal fin, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>11</sup>

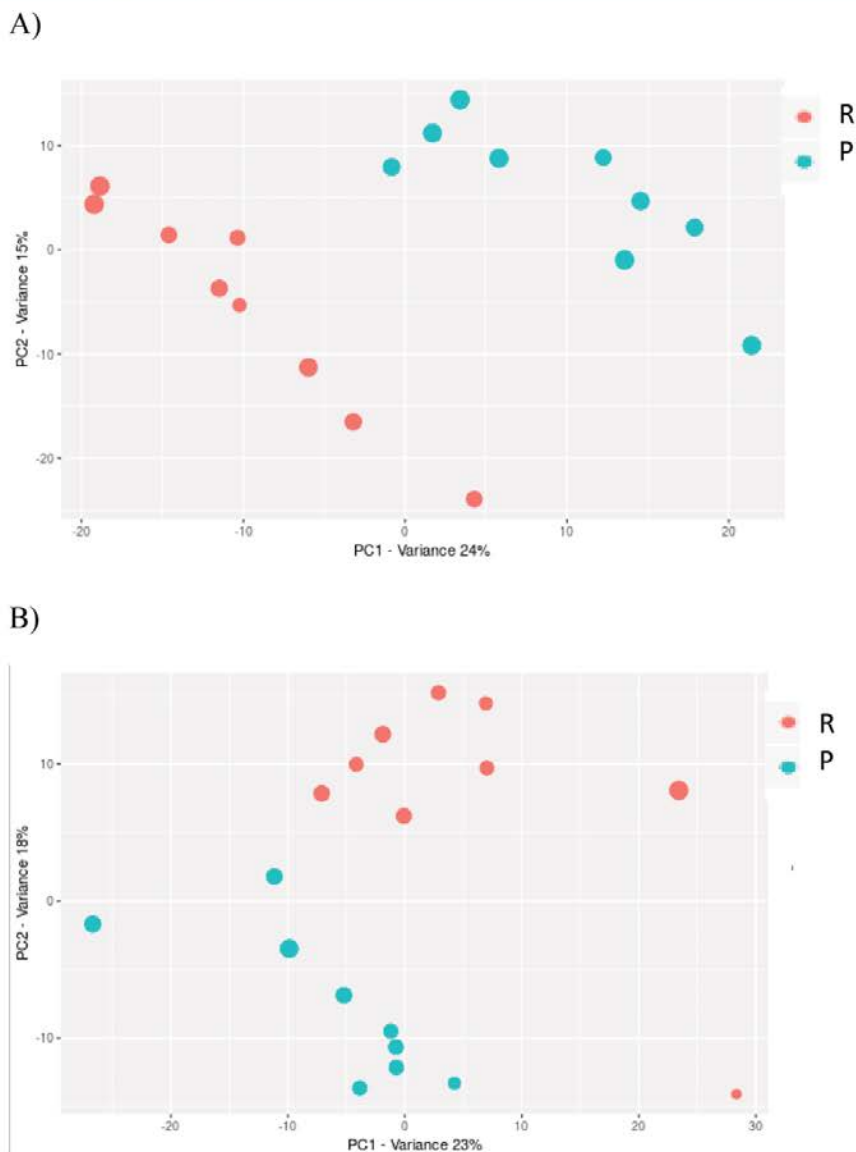
**Lipid Analysis.** The muscle sample was homogenized, and a subsample (20 mg) was taken per fish; four different individuals were pooled and freeze-dried. Three pools made of different fish were prepared per sampling site, so that 12 individuals per site were analyzed. Lipids were extracted (5 mg freeze-dried tissue) with methanol/chloroform (1:2) containing 0.01% of butylated hydroxytoluene (BHT) in an ultrasonic bath for 5 min ( $\times 2$ ) after the addition of 200 pmol of the internal standard mix.<sup>13</sup>

To identify plasmalogen-PC (PC-O) and plasmalogen-PC (PC-P) isomeric species, a group of extracts were derivatized right before analysis as described in Lydic et al.<sup>14</sup> Briefly, a daily prepared solution of 0.4 mM iodine in chloroform was mixed with 6 mM ammonium bicarbonate in methanol (2:1); 500  $\mu\text{L}$  of the resulting mixture were added to the dry lipid extracts and incubated for 5 min in an ice bath. The extracts were evaporated under nitrogen and reconstituted in methanol for injection. Under these conditions, the plasmalogen species containing an alkenyl double bond are hydrolyzed and only the alkyl forms are detected in the chromatograms of the derivatized samples.

Lipid extracts were injected in an ultrahigh performance liquid chromatography (UHPLC) Waters Acquity UHPLC system fitted with a 100 mm  $\times$  2.1 mm id, 1.7  $\mu\text{m}$  C8 Acquity UPLC BEH column (Waters, Ireland), which was coupled to a Waters LCT Premier XE Time of Flight Mass Spectrometer (Waters, Millford, MA), operated in positive electrospray ionization mode (ESI+).<sup>15</sup> Full scan spectra from 200 to 1000 Da were obtained. Mass accuracy and reproducibility were maintained by using an independent reference spray via LockSpray. The mass resolving power of the ToF-HRMS (determined from the  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ion of leucine at  $m/z$  556.2771) was 10000 fwhm (full width at half-maximum). The capillary voltage was 3.0 kV, with a desolvation temperature of 350  $^{\circ}\text{C}$  and a desolvation gas flow of 600 L·h<sup>-1</sup>. The mobile phases were 1 mM ammonium formate in methanol (phase A) and 2 mM ammonium formate in H<sub>2</sub>O (phase B), both phases were with 0.2% of formic acid. The programmed gradient was: 0 min, 80% A; 3 min, 90% A; 6 min, 90% A; 15 min, 99% A; 19 min, 99% A; 21 min, 80% A held for 2 min. The flow rate was 0.3 mL/min, and the injection volume was 8  $\mu\text{L}$ .

**Untargeted Analysis.** The data was processed with an untargeted approach using the XCMS online platform to detect the most dysregulated features between samples P and R. Raw data was converted to mzXML using MSConvert and further analyzed by using pairwise job on the web interface XCMS. CentWave was the algorithm used for feature detection using 30 ppm as the maximum  $m/z$  deviation tolerated and a range of 2 to 25 s for the chromatographic peak widths. As prefiltering, mass traces were only retained if they contained at least 3 peaks with intensities equal or greater than 1000, with a signal-to-noise threshold higher than 6. The *obiwarp* algorithm was chosen for retention time correction. For the alignment of the chromatograms, a deviation of 5 s in the retention time was allowed, while 0.025 amu was selected as width of overlapping in  $m/z$  slices, and 0.5 was the minimum fraction of samples necessary within a sampling class (P or R) to be a valid group.

**Targeted Analysis.** Data was also analyzed using suspected targeted screening. A homemade referential lipid database was built by obtaining theoretical exact masses using a spectrum simulation tool of MassLynx software and LIPID MAPS online database, obtaining an inventory of lipids, including PC, PC-O, PC-P, LPC, TG, DG, CE, and sphingomyelin (SM). Lipids were identified under the criteria of accurate mass measurement (error  $< 5$  ppm) and isotopic distribution. Individual peaks were isolated from full-scan MS spectra, and a list of candidates for that specific exact mass was generated by a formula determination tool (Micromass MassLynx software). Quantification was carried out using the corresponding extracted ion chromatograms; the linear dynamic range was determined by an injection of standard mixtures. Lipid species belonging to a specific lipid subclass were referred to different internal standards. Thus, TGs were referred to 1,2,3–17:0 TG; DGs to



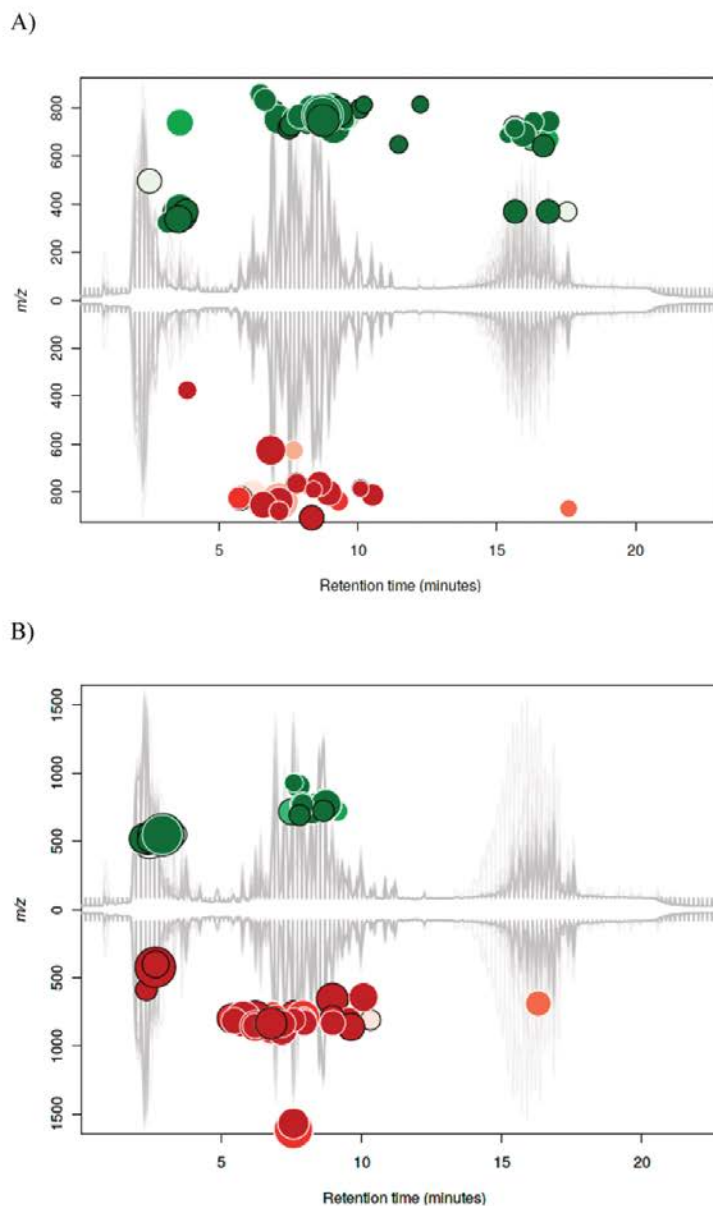
**Figure 1.** PCA score plot of the skeletal muscle lipid extracts of (A) *B. meridionalis* and (B) *S. laietanus* obtained with XCMS online platform after pairwise analysis comparing polluted and reference sites.

1,3–17:0 D5 DG; PCs, PC-Os, PC-Ps, and SMs to 16:0 D31–18:1 PC; CEs to 17:0 CE; and LPCs to 17:0 LPC. Repeatability, expressed as intraday relative standard deviation (RSD) calculated for all lipid standards relative abundance in the samples, was lower than 30% in all cases (TG: 26%, DG: 21%, PC: 13%, LPC: 12%).

**Statistical Analysis.** A multivariate statistical analysis was performed using the XCMS online platform<sup>16</sup> to study whether the muscle of fish from polluted sites presented a differential signature in their lipid profile. A principal component analysis (PCA) was first performed, followed by the generation of a cloud plot that shows data characteristics such as retention time, mass-

to-charge ratio, signal intensity of features, fold change, and *p*-value (Welch *t* test). This was used to visualize the ion features causing the group segregation. For the targeted analysis, multivariate and univariate approaches were applied using the online software Metaboanalyst 4.0.<sup>17</sup> Data was normalized by sum and autoscaled. First, unsupervised principal component analysis (PCA) of the data set was performed to explore differences of the lipid profiles between reference and polluted sampling sites. Thereafter, partial least-squares-discriminant analysis (PLS-DA) was performed in order to obtain the maximum segregation between lipid profiles of fish collected in the different stations. Heatmap cluster analysis for the lipids of





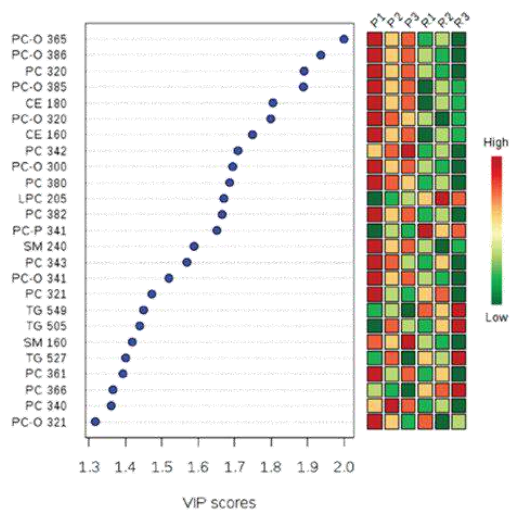
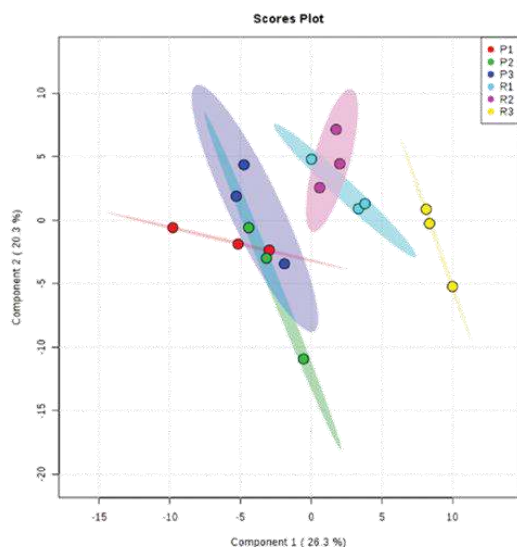
**Figure 2.** Cloud plot for (A) *B. meridionalis* and (B) *S. laietanus* displaying the dysregulated features ( $p \leq 0.01$ , fold change  $\geq 1.5$ ) in the skeletal muscle of fish from polluted sites compared to reference sites. The X axis represent retention time (min) while  $m/z$  is displayed in the Y axis. Up-regulated features in polluted samples are shown in green, and down-regulated features are shown in red. The size of the circles corresponds to the log-fold change of that feature, while the shade of color is proportional to changes in  $p$ -value (high contrast colors belong to lowest  $p$  and vice versa). Data was obtained using XCMS online platform (pairwise analysis).

interest (variables important in projection (VIPs)  $> 1.0$ ) was used to arrange lipids according to similarity and to retain the more contrasting variables. Finally, volcano plots were applied to visualize the significance and the magnitude of the changes detected in the lipidome of fish from P and R sites (fold change  $\geq 1.5/2.0$ ;  $p < 0.05$ , Student  $t$ -test).

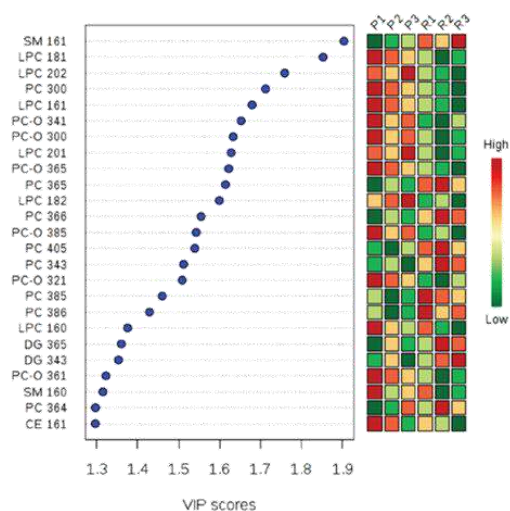
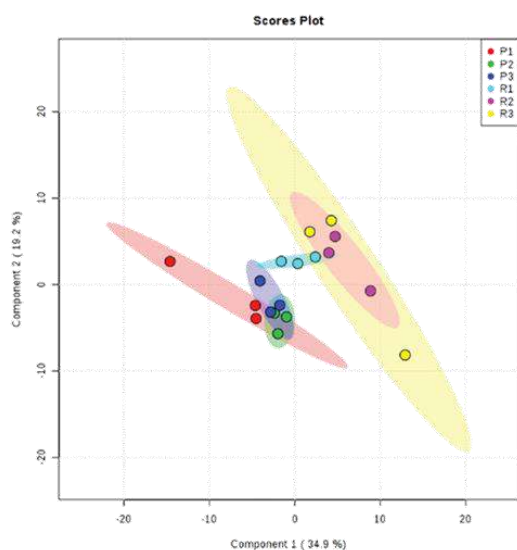
## ■ RESULTS AND DISCUSSION

**Differential Exposure.** Size, weight, and condition factor of the sampled individuals of *B. meridionalis* and *S. laietanus* are summarized in Table S1 (Supporting Information, SI). Water parameters (dissolved oxygen, temperature) were consistent across all the sampling sites; although, higher conductivity was detected in the P sites.<sup>11</sup> Biliary levels of organic pollutants (viz.,

A)



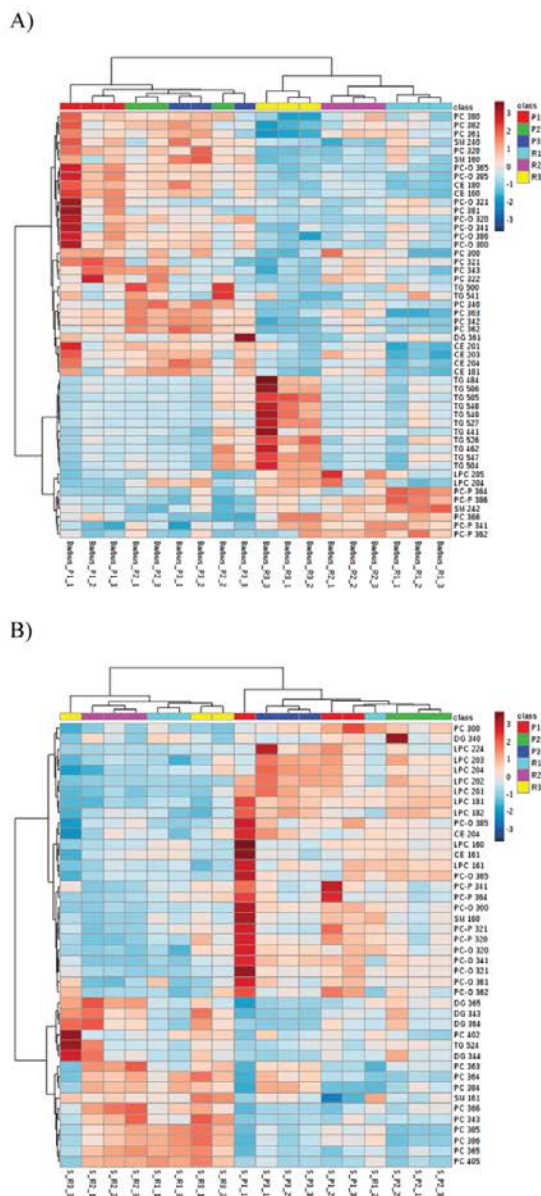
B)



**Figure 3.** PLS-DA scores plot and first 25 highest ranked VIPs > 1.0 for (A) *B. meridionalis* and (B) *S. laietanus* muscle lipidome comparing polluted sites (P1, P2, P3) from reference sites (R1, R2, R3).

naphthol, galaxolide, alkylphenols) and induction of the hepatic CYP1A and CYP3A catalyzed activities were detected in *B. meridionalis* and *S. laietanus* collected downstream of STPs, indicating significant exposure to urban and industrial pollutants together with metabolic and endocrine alterations and a differential exposure pattern in fish from P and R sites (Table S2, Supporting Information).

**Untargeted Analysis.** The preprocessing of chromatograms of *B. meridionalis* and *S. laietanus* lipid extracts using the XCMS online platform reported the detection of 659 and 641 features, respectively. PCA scores plot explained up to 39 and 41% of the variance, with good segregation of polluted and reference site samples (Figure 1A,B). Some features clearly differentiated samples from R and P sites, indicating a specific



**Figure 4.** Heatmap cluster analysis of the lipidome of (A) *B. meridionalis* and (B) *S. laietanus* from polluted sites (P1, P2, P3) vs reference sites (R1, R2, R3). The color of each section is proportional to the significance of the lipid change (red, increased levels; green, decreased levels).

lipidomic signature in the muscle of fish collected in those areas. The cloud plot highlighted 117 (*B. meridionalis*) and 104 (*S. laietanus*) features that were significantly different among the groups (fold change  $\geq 1.5$ ;  $p$ -value  $\leq 0.01$ ) (Figure 2). The major part of altered features were found between 3 and 12 min, the area of the chromatogram where phospholipids and lyso-phospholipids are eluted. For retention times between 14 and 20 min (region of the chromatogram where TGs, DGs, and CEs

elute), the number of dysregulated features was comparatively low. Some up-regulated features were detected in *B. meridionalis* (Figure 2A), while no features were observed in this region for *S. laietanus* (Figure 2B). This may indicate a low sensitivity of the XCMS platform for sterol lipids and triglycerides (low intensity ions) but also no significant alteration of these lipid subclasses, particularly in *S. laietanus*.

For further filtering of the selected features, only the lipids formed by fatty acids with an even number of carbons and the most probable adducts formed during ionization ( $[M + H]^+$ ,  $[M + NH_4]^+$ ), detected after analysis of the internal standards, were kept. The tentative identification of the different dysregulated features indicated PCs, PEs, PIs, PSs, PAs, PGs, CEs, SM, Cer (ceramides), and ether and lyso forms of the mentioned phospholipids as the compounds that allowed a significant differentiation of the skeletal muscle lipidome of fish from P and R sites (S1).

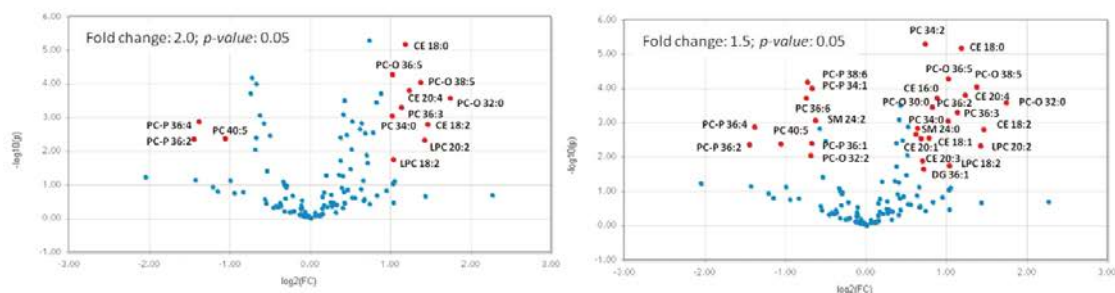
**Targeted Analysis.** Individual lipid species unresolved in the total ion chromatogram were successfully isolated when selecting their exact masses. PC, PC-O, PC-P, and SM were the first lipid subclasses to elute and appeared in the initial 10 min span of the chromatogram. These lipids were totally resolved from DG, TG, and CE which eluted in the subsequent 15–20 min. TG, DG, and CE were mainly detected as ammonium adducts  $[M + NH_4]^+$ , whereas the rest of the lipids were identified in the protonated form,  $[M + H]^+$ . About 119 lipids, including PC, PC-O, PC-P, LPC, CE, TG, DG, and SM were identified under the criteria of molecular formula, accurate mass with an error  $< 5$  ppm, retention time, and isotopic distribution (Table S3 Supporting Information). Quantitative analysis of the detected lipids evidenced that the most abundant lipids in muscle tissue of *B. meridionalis* from R sites were PCs representing 49% of the lipids analyzed, with PC 34:1, 36:5, 38:6 as the most abundant species. LPCs represented 22% of the lipids analyzed, with LPC 20:5 comprising half of the LPCs content. TGs were the third more abundant group (18%) with TG 50:2 as the most abundant species.

Likewise, PCs were the most abundant lipids in *S. laietanus* from R sites representing 39% of the lipids analyzed; the most abundant PC species were similar to those reported for *B. meridionalis*. TGs were also very abundant (31% of lipids analyzed), particularly TGs 52:2, 50:2, 52:3, and 50:1; followed by LPCs (20%), with LPC 20:5 and 18:1 being predominant. The rest of the lipid subclasses represented less than 5% of the lipids analyzed in both species (SI Table S3).

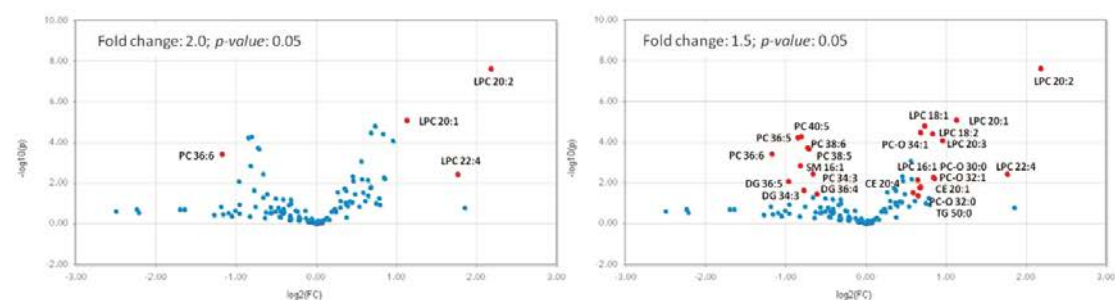
The PCA score plot of the lipidomic profile of *B. meridionalis* collected in the different sampling sites resulted in a model with 3 principal components, which explained 70% of the variance (SI, Figure S2A). The plot displayed a good separation between P and R sites by PC2, demonstrating the significant changes of lipids depending on the sampling site. Partial least-squares-discriminant analysis (PLS-DA) of the *B. meridionalis* lipidome explained 47% of the covariance ( $R^2$ : 0.89,  $Q^2$ : 0.79) within sampling sites (Figure 3A). The scores plot differentiated P sites, with no evident segregation among them from R sites. Within R sites, only R3, the most upstream station, was completely resolved. From the PLS-DA, 50 VIP scores  $> 1.0$  were generated. Among the up-regulated variables in P sites, PC-Os (30:0, 32:0/1, 34:1, 36:5, 38:5/6), some saturated and poorly unsaturated PCs (32:0–1, 34:0/2/3, 38:0/2, 36:1), and CEs (16/18:0) were found, while decreases in LPC 20:5, PC-P 34:1, and PC 36:6 were detected. On the basis of the selection of VIPs  $> 1.0$ , the heatmap cluster analysis grouped the reference and polluted sites



A)



B)



**Figure 5.** Volcano plots showing lipid significant differences between the lipidome of (A) *B. meridionalis* and (B) *S. laietanus* from P sites vs R sites with a fold change  $\geq 2.0$  and  $1.5$  and  $p < 0.05$  *t*-test. Significantly altered lipids are colored in red.

separately, despite no clear clustering within the polluted stations (Figure 4A). High levels of unsaturated TGs were observed in the lipidome of *B. meridionalis* from R3, while LPCs 20:4,5, PC 36:6, and SM 24:2 were accumulated in all reference sites.

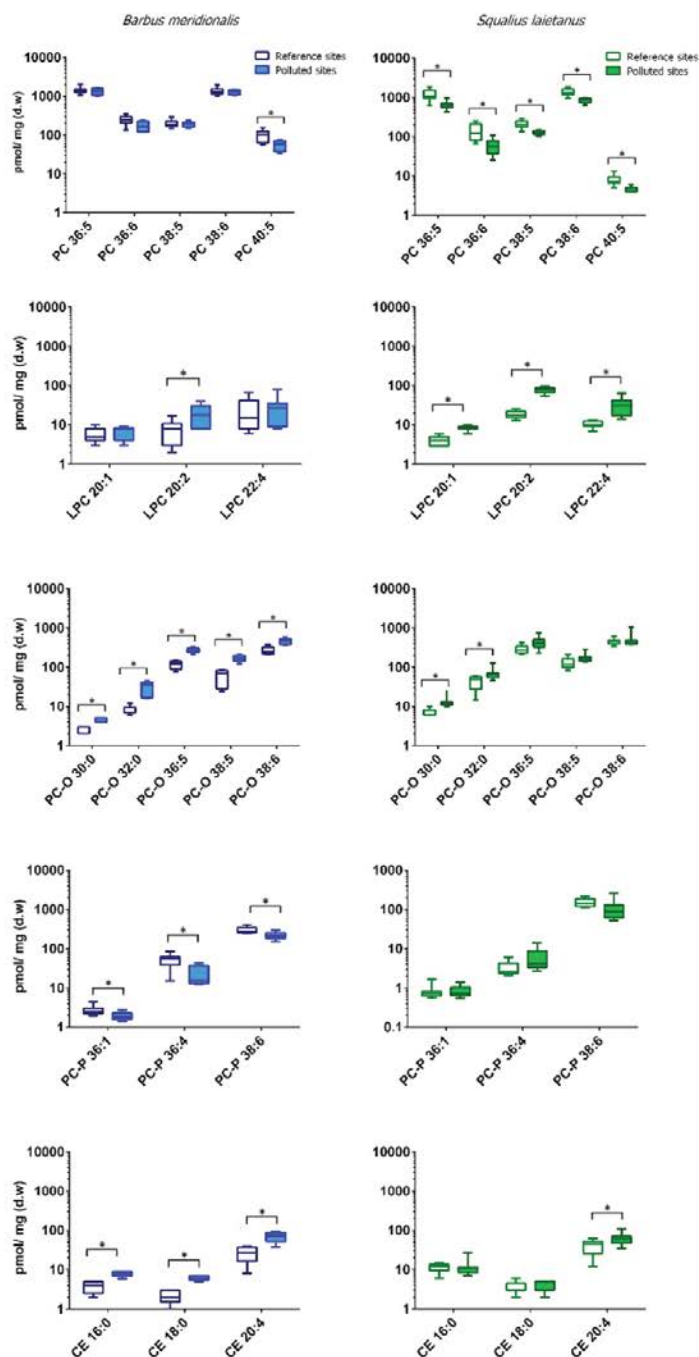
Similarly, the PCA score plot explained 71% of the variance with 3 principal components and showed a segregation of the lipid profile of *S. laietanus* with sampling sites (SI, Figure S2B). P sites were located in the upper quadrant of PC2 while most of the R samples were located in the lower quadrant. PLS-DA explained up to 54% of the covariance ( $R^2$ : 0.89,  $Q^2$ : 0.60) (Figure 3B) for *S. laietanus*. It showed a segregation between P and R sites, although P sites were not resolved between them, while for R sites, only R1 was successfully segregated from R2 and R3. R1 corresponds to the reference site located closer to P sites along the river, with it being the closest to the polluted sites in the PLS-DA. 41 VIP scores  $>1.0$  were generated from PLS-DA, evidencing high levels of PC 30:0, LPCs with low number of double bonds (16:1, 18:1/2, 20:1/2), PC-Os (30:0, 32:1, 34:1, 36:1/5, 38:5), and a decrease of SM 16:1 and unsaturated PCs (34:3, 36:4/5/6, 38:5/6, 40:5) in P stations. The heatmap cluster analysis allowed a clear observation of the dysregulated lipids; most samples were grouped into two differentiated clusters corresponding to R and P sites.

For both fish species, the cluster analysis separately arranged the polluted and reference areas; therefore, P and R sites were grouped for further analysis with a volcano plot (Figure 5). When setting a fold change  $\geq 2.0$  and  $p$ -value  $< 0.05$ , the lipidome of *B. meridionalis* from P sites was characterized by low levels of PC

40:5 and PC-P 36:2/4 and an accumulation of PC-O 32:0, 36:5, 38:5, LPC 18:2, 20:2, CE 18:0/2, 20:4, and PC 34:0, 36:3. When a lower fold change was set (fold change  $\geq 1.5$ ), the lipid subclasses suffering dysregulation did not vary but increased the number of lipid species.

In contrast, very few lipids showed a fold change  $>2.0$  ( $p$ -value  $< 0.05$ ) when comparing the lipidome of *S. laietanus* from P and R sites. Mainly, an accumulation of LPC 20:1/2, 22:4 and a reduction of PC 36:6 was observed in P sites. In order to observe the more subtle lipid changes, the fold change was set to  $\geq 1.5$ ; an increment of the number of LPC species up-regulated was detected together with an increase of PC-Os 32:0/1, 34:1, CEs 20:1/4, and TG 50:0 and a concomitant decrease of highly unsaturated PCs, DGs (34:3, 36:4/5) and SM 16:1.

The combined application of the untargeted and targeted approaches to investigate the lipidomes of the skeletal muscles of *B. meridionalis* and *S. laietanus* provided complementary information. The untargeted strategy evidenced a clear segregation of the lipidome of fish habitats impacted by wastewater effluents in comparison to individuals sampled at reference sites. Some of the down-regulated features were putatively identified as long chain highly unsaturated fatty acid phospholipids, while a number of features exhibiting up-regulation were identified as saturated or poorly unsaturated phospholipids (from one to four double bounds) (SI Excel). An alteration of the composition of the lipids conforming the cellular membranes can have harmful consequences, since polyunsaturated phospholipids confer higher melting point and fluidity to the membranes than saturated phospholipids,



**Figure 6.** Boxplot of lipids selected as potential biomarkers of urban and industrial pollutants exposure for *B. meridionalis* and *S. laietanus* showing levels in reference and polluted sites. The box extends from 25th to 75th percentile; the horizontal bar within box is the median; whiskers represent 5th to 95th percentiles. \*Significantly altered lipids ( $p < 0.05$ ).

altering their structure and functionality.<sup>18</sup> The targeted analysis confirmed a decrease of PCs with a high number of double bonds (5–9) in individuals collected in P sites; this decrease was more evident for *S. laietanus*. Reactive oxygen species (ROS),

generated as subproducts of normal metabolism, increased after exposure to different xenobiotics as pharmaceuticals, personal care products, and other contaminants were often detected in wastewater treatment plant effluents and induced



oxidative stress in fish.<sup>19,20</sup> In our study, 100 to 1000 fold higher levels of 2-naphthol, galaxolide, and alkylphenols were detected in fish collected in P sites in comparison to those from R sites (Table S2, Supporting Information). Thus, we hypothesize that a greater exposure to pollutants (urban/industrial origin) may lead to increased generation of ROS and consequently, a higher oxidation of phospholipids containing PUFAs, which are the most susceptible to peroxidation and ROS attack.<sup>21</sup> This hypothesis is further supported by previous results observed in vitro, where a general depletion of polyunsaturated lipids, namely, PCs (36:5, 38:5, 38:6), PC-Ps, and PEs/PE-Ps were detected both in PLHC-1 and JEG-3 cells exposed to compounds that significantly induced the generation of ROS.<sup>22</sup> However, an other hypothesis like the reduced biosynthesis of highly unsaturated lipids in fish from polluted sites cannot be discarded.

Despite the comparatively lower exposure to xenobiotics by *Squalius laietanus*,<sup>11</sup> the decrease of highly unsaturated PCs (36:5,6; 38:5,6; 40:5) was more significant than that in *B. mediterraneus* (PC 40:5). Interestingly, levels of PC-Ps were up to 1 order of magnitude higher in *B. meridionalis* than in *S. laietanus* (Figure 6). Plasmalogens act as endogenous antioxidants because the vinyl-ether bond at the sn-1 position of the glycerol moiety makes them more susceptible to oxidative attack than other phospholipids.<sup>23</sup> Thus, plasmalogens function as scavengers by protecting other phospholipids from oxidation,<sup>24</sup> and a deficiency of plasmalogens has been associated with increased lipid oxidation and an imbalance of the major lipid signaling pathways.<sup>23</sup> Consequently, the lower content of PC-Ps of *S. laietanus* led to a higher susceptibility to oxidative stress and a comparatively higher depletion of highly unsaturated PCs in polluted sites.

Linked to the decrease of highly unsaturated PCs, a significant increase of LPCs was detected in the skeletal muscle of *S. laietanus*. Although no previous data has been obtained in fish, increased levels of LPCs are indicative of (a) increased hydrolysis of PCs by phospholipases in different vertebrate models,<sup>25,26</sup> and/or (b) increased activity of the enzyme lecithin:cholesterol acyltransferase, which catalyzes the transfer of the fatty acid of position sn-2 of phosphatidylcholine to free cholesterol, with formation of cholesterol esters and lysophosphatidylcholine.<sup>27</sup> Accordingly to these hypotheses, another characteristic feature of the fish collected at P sites was the enrichment of the skeletal muscle lipidome in cholesteryl esters. Cholesterol regulates cell membrane properties by maintaining the sphingolipids rafts in a functional state, and it is a biosynthetic precursor of steroid hormones; therefore, levels of free cholesterol are tightly regulated through esterification and accumulation in cytosolic lipid droplets.<sup>28</sup> Exposure to metabolic disrupting compounds, including bisphenol A, phthalates, and perfluoro alkyl substances, significantly altered cholesterol homeostasis in the fish. Thus, bisphenol A upregulated mRNA expression of genes related to cholesterol metabolism, including acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase, in marine medaka and zebra fish.<sup>29,30</sup> Phthalates and flame retardants increased the concentration of total cholesterol and triglycerides in gilthead sea bream hepatocytes.<sup>31</sup> Similarly, transcripts involved in cholesterol metabolism and mitochondrial function were altered in fathead minnows exposed to perfluoro alkyl substances,<sup>32</sup> and exposure to perfluorononanoic acid increased cholesterol levels in the liver of zebra fish.<sup>33</sup> Also, tributyltin induced lipid accumulation and an increase in total cholesterol and triglycerides in muscles of rare minnows.<sup>34</sup> Accordingly to

these observations, the muscle lipidome of *B. meridionalis* and *S. laietanus* collected in sites affected by urban and industrial wastewater outflows was enriched in CEs. This increment of CEs is often accompanied by an induction of the synthesis of TGs.<sup>30,31</sup> However, in fish, adipose tissue is located in the intra-abdominal region and is not widely distributed throughout the body as in mammals;<sup>6</sup> thus, no significant enrichment of TGs was observed in the skeletal muscle of fish collected in P sites.

Additionally, the muscle lipidome of both *B. meridionalis* and *S. laietanus* collected in polluted areas was enriched in PC-Os. PC-Os and PC-Ps are isobaric species; the functional role of PC-Os is not well understood even though the function of the latter has been widely described. Increased levels of PC-Os have been reported in human tumor tissues.<sup>35</sup> While the accumulation of the PC-O selected species was present in the lipidome of both fish species from polluted sites, the increment was greater for *B. meridionalis*.

Overall, the number of significantly altered lipids highlighted by the volcano plots was higher for *B. meridionalis* than *S. laietanus*, suggesting a higher sensitivity of the former to endocrine and metabolic disruptors. This tendency was confirmed by the untargeted analysis, where a greater number of up-regulated features in P sites were obtained for *B. meridionalis*. This is in agreement with our previous study,<sup>11</sup> where *B. meridionalis* showed a greater exposure to pollutants and a higher sensitivity to estrogenic exposure than *S. laietanus*, an omnivorous water-column dweller, with greater resistance and adaptability to water pollution.<sup>36</sup>

Although the magnitude of the lipid changes was different for the two species examined, the fish collected at P sites showed some common alterations, which could be further investigated as potential biomarkers of exposure/impact of urban and industrial discharges, namely, an enrichment in PC-Os, CEs, and LPCs and a depletion of highly polyunsaturated PCs. Overall, this study demonstrates the potential of lipidomic approaches in toxicology and risk assessment studies to provide a specific signature of the impact of contaminants (e.g., oxidative stress, inflammation, metabolic disturbance). In addition, the applied methodology represents a promising tool for the development of novel noninvasive monitoring methods based on muscle tissue biopsies.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.est.9b02064.

Sampling (location and individuals), biliary levels of pollutants, a list of the lipid molecules detected in the skeletal muscle, and PCA analysis (PDF)

Putative identifications from the untargeted analysis (XLSX)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: cpvqam@cid.csic.es.

### ORCID

Anna Marqueño: 0000-0002-5914-2578

Cinta Porte: 0000-0002-3940-6409

### Notes

The authors declare no competing financial interest.



## ACKNOWLEDGMENTS

Anna Marquero acknowledges a predoctoral fellowship BES-2015-074842. This work was financed by Ministerio de Ciencia e Innovación, under the project CGL2014-52144-P.

## REFERENCES

- Hu, C.; van der Heijden, R.; Wang, M.; van der Greef, J.; Hankemeier, T.; Xu, G. Analytical Strategies in Lipidomics and Applications in Disease Biomarker Discovery. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877* (26), 2836–2846.
- Tocher, D. R. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev. Fish. Sci.* **2003**, *11* (2), 107–184.
- Tang, C.-H.; Shi, S.-H.; Lin, C.-Y.; Li, H.-H.; Wang, W.-H. Using lipidomic methodology to characterize coral response to herbicide contamination and develop an early biomonitoring model. *Sci. Total Environ.* **2019**, *648*, 1275–1283.
- Heindel, J. J.; Newbold, R.; Schug, T. T. Endocrine Disruptors and Obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 653.
- Grün, F.; Blumberg, B. Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology.* **2006**, *147* (6), 50–55.
- Capitao, A.; Lyssimachou, A.; Castro, L. F. C.; Santos, M. M. Obesogens in the Aquatic Environment: An Evolutionary and Toxicological Perspective. *Environ. Int.* **2017**, *106*, 153–169.
- Melvin, S. D.; Lanctôt, C. M.; Doriane, N. J. C.; Bennett, W. W.; Carroll, A. R. NMR-based lipidomics of fish from a metal(loid) contaminated wetland show differences consistent with effects on cellular membranes and energy storage. *Sci. Total Environ.* **2019**, *654*, 284–291.
- Mekonnen, M. M.; Hoekstra, A. Y. Four billion people facing severe water scarcity. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, No. e1500323.
- Maceda-Veiga, A.; Monroy, M.; Navarro, E.; Viscor, G.; de Sostoa, A. Metal Concentrations and Pathological Responses of Wild Native Fish Exposed to Sewage Discharge in a Mediterranean River. *Sci. Total Environ.* **2013**, *449*, 9–19.
- Maceda-Veiga, A. Towards the conservation of freshwater fish: Iberian Rivers as an example of threats and management practices. *Rev. Fish Biol. Fisheries* **2013**, *23*, 1–22.
- Blanco, M.; Rizzi, J.; Fernandes, D.; Colin, N.; Maceda-Veiga, A.; Porte, C. Assessing the Impact of Waste Water Effluents on Native Fish Species from a Semi-Arid Region, NE Spain. *Sci. Total Environ.* **2019**, *654*, 218–225.
- Petrie, B.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* **2015**, *72*, 3–27.
- Christie, W. W. Rapid Separation and Quantification of Lipid Classes by High Performance Liquid Chromatography and Mass (Light-Scattering) Detection. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 507–512.
- Lydic, T. A.; Townsend, S.; Adda, C. G.; Collins, C.; Mathivanan, S.; Reid, G. E. Rapid and Comprehensive “shotgun” Lipidome Profiling of Colorectal Cancer Cell Derived Exosomes. *Methods* **2015**, *87*, 83–95.
- Gorochategui, E.; Pérez-Albaladejo, E.; Casas, J.; Lacorte, S.; Porte, C. Perfluorinated chemicals: differential toxicity, inhibition of aromatase activity and alteration of cellular lipids in human placental cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *277* (2), 124–130.
- Gowda, H.; Ivanisevic, J.; Johnson, C. H.; Kurczy, M. E.; Benton, H. P.; Rinehart, D.; Nguyen, T.; Ray, J.; Kuehl, J.; Arevalo, B.; Westenskow, P. D.; Wang, J.; Arkin, A. P.; Deutschbauer, A. M.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (14), 6931–6939.
- Xia, J.; Wishart, D. S. Using Metaboanalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2016**, *55*, 14.10.1–14.10.91.
- Hashimoto, M.; Hossain, S. Fatty Acids: From Membrane Ingredients to Signaling Molecules. *In IntechOpen*. **2018**.
- Wu, M.; Xu, H.; Shen, Y.; Qiu, W.; Yang, M. Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30* (10), 2335–2341.
- Blaise, C.; Andre, C.; Gagne, F. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2006**, *64*, 329–336.
- Luczaj, W.; Gęgotek, A.; Skrzydlewska, E. Antioxidants and HNE in Redox Homeostasis. *Free Radical Biol. Med.* **2017**, *111*, 87–101.
- Pérez-Albaladejo, E.; Lacorte, S.; Porte, C. Differential Toxicity of Alkylphenols in JEG-3 Human Placental Cells: Alteration of P450 Aromatase and Cell Lipid Composition. *Toxicol. Sci.* **2019**, *167* (2), 336–346.
- Braverman, N. E.; Moser, A. B. Functions of Plasmalogen Lipids in Health and Disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822* (9), 1442–1452.
- Brites, P.; Waterham, H. R.; Wanders, R. J. A. Functions and Biosynthesis of Plasmalogens in Health and Disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2004**, *1636* (2–3), 219–231.
- Koizumi, S.; Yamamoto, S.; Hayasaka, T.; Konishi, Y.; Yamaguchi-Okada, M.; Goto-Inoue, N.; Sugiura, Y.; Setou, M.; Namba, H. Imaging Mass Spectrometry Revealed the Production of Lyso-Phosphatidylcholine in the Injured Ischemic Rat Brain. *Neuroscience* **2010**, *168* (1), 219–225.
- Kabrowski, J. H. G2A and LPC: Regulatory Functions in Immunity. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2009**, *89* (3–4), 73–81.
- Niu, J.; Liu, Y. J.; Tian, L. X.; Mai, K. S.; Yang, H. J.; Ye, C. X.; Zhu, Y. Effects of dietary phospholipid level in cobia (*Rachycentron canadum*) larvae: growth, survival, plasma lipids and enzymes of lipid metabolism. *Fish Physiol. Biochem.* **2008**, *34*, 9–17.
- Simons, K.; Ikonen, E. How Cells Handle Cholesterol. *Science.* **2000**, *290*, 1721–1727.
- Kim, B.; Jo, Y. J.; Lee, N.; Lee, N.; Woo, S.; Rhee, J.; Yum, S. Bisphenol A Induces a Distinct Transcriptome Profile in the Male Fish of the Marine Medaka *Oryzias javanicus*. *BioChip J.* **2018**, *12* (1), 25–37.
- Santangeli, S.; Notarstefano, V.; Maradonna, F.; Giorgini, E.; Gioacchini, G.; Forner-piquer, I.; Habibi, H. R.; Carnevali, O. Effects of Diethylene Glycol Dibenzoate and Bisphenol A on the Lipid Metabolism of *Danio rerio*. *Sci. Total Environ.* **2018**, *636*, 641–655.
- Cocci, P.; Mosconi, G.; Palermo, F. A. Changes in Expression of MicroRNA Potentially Targeting Key Regulators of Lipid Metabolism in Primary Gilthead Sea Bream Hepatocytes Exposed to Phthalates or Flame Retardants. *Aquat. Toxicol.* **2019**, *209*, 81–90.
- Rodríguez-Jorquera, I. A.; Colli-dula, R. C.; Kroll, K.; Jaysinghe, B. S.; Parachu Marco, M. V.; Silva-Sanchez, C.; Toor, G. S.; Denslow, N. D. Blood Transcriptomics Analysis of Fish Exposed to Perfluoro Alkyls Substances: Assessment of a Non-Lethal Sampling Technique for Advancing Aquatic Toxicology Research. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 1441–1452.
- Zhang, W.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Wang, J.; Cui, R.; Dai, J. Sex Differences in Transcriptional Expression of FABPs in Zebrafish Liver after Chronic Perfluorononanoic Acid Exposure. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 5175–5182.
- Zhang, J.; Zhang, C.; Ma, D.; Liu, M.; Huang, S. Lipid Accumulation, Oxidative Stress and Immune-Related Molecules Affected by Tributyltin Exposure in Muscle Tissues of Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*). *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *71*, 10–18.
- Smith, R. E.; Lespi, P.; Di Luca, M.; Bustos, C.; Marra, F. A.; De Alaniz, M. J. T.; Marra, C. A. A Reliable Biomarker Derived from Plasmalogens to Evaluate Malignancy and Metastatic Capacity of Human Cancers. *Lipids* **2008**, *43* (1), 79–89.
- Merciai, R.; Bailey, L. L.; Bestgen, K. R.; Fausch, K. D.; Zamora, L.; Sabater, S.; García-Berthou, E. Water Diversion Reduces Abundance and Survival of Two Mediterranean Cyprinids. *Ecol. Freshw. Fish.* **2018**, *27* (1), 481–491.

**Informació suplementària de l'article “*Skeletal muscle lipidomics as a new tool to determine altered lipid homeostasis in fish exposed to urban and industrial wastewaters*”**

A. Marqueño, M. Blanco, A. Maceda-Veiga, C. Porte

*Environmental Science and Technology* 53 (2019), 8416–8425

**Table Excel.** Putative identifications of the lipid species from muscle tissue of *Barbus meridionalis* and *Squalius laietanus* using an untargeted analysis (XCMS online).

The reader is referred to the web version of this article (<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.9b02064>).

**Table S1.** Biological parameters of *B. meridionalis* and *S. laietanus* collected in different stations: R1 to R3 (reference sites) and P1 to P3 (impacted sites) along the Ripoll river. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

Fish species	Site	N	Length (cm)	Weight (g)	CF <sup>1</sup>
<i>Barbus meridionalis</i>	R3	10	11.3 $\pm$ 9.1	21.0 $\pm$ 5.1	1.3 $\pm$ 0.03
	R2	10	13.5 $\pm$ 6.0	32.7 $\pm$ 3.9*	1.3 $\pm$ 0.02
	R1	10	11.4 $\pm$ 4.7	19.6 $\pm$ 2.8	1.3 $\pm$ 0.12
	P1	10	10.4 $\pm$ 5.3	15.7 $\pm$ 3.3	1.3 $\pm$ 0.05
	P2	10	11.0 $\pm$ 4.2	18.6 $\pm$ 2.6	1.3 $\pm$ 0.02
	P3	10	10.1 $\pm$ 2.9	15.0 $\pm$ 1.3	1.4 $\pm$ 0.03
<i>Squalius laietanus</i>	R3	6	11.4 $\pm$ 7.7	18.5 $\pm$ 4.6*	1.1 $\pm$ 0.10
	R2	10	13.8 $\pm$ 2.4	31.5 $\pm$ 1.5	1.2 $\pm$ 0.04
	R1	10	13.9 $\pm$ 7.4	33.6 $\pm$ 6.6	1.1 $\pm$ 0.03
	P1	10	12.5 $\pm$ 4.6	26.3 $\pm$ 2.8	1.3 $\pm$ 0.02
	P2	15	12.2 $\pm$ 9.0	31.7 $\pm$ 5.4	1.3 $\pm$ 0.07
	P3	10	12.6 $\pm$ 3.2	26.2 $\pm$ 2.1	1.3 $\pm$ 0.03

\* Significant differences ( $p < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Condition factor (CF) was calculated as (weight/length<sup>3</sup>) x 100

**Table S2.** Biliary levels of galaxolide (HHCB), hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (2-naphthol and 1-pyrenol) and alkylphenols (nonylphenol (4-NP) and octylphenol (OP)), together with selected biomarkers, EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase) and BFCOD (7-benzyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin O-debenzyloxylase) activities, determined in liver microsomal fraction in *B. meridionalis* and *S. laietanus* collected along the Ripoll River under the influence of urban and industrial effluents (P sites) and upstream (R sites). Concentrations of the compounds are reported as ng·g<sup>-1</sup> of bile; activities are reported in pmol/min/g of protein.

Fish species	Site	NP	OP	Naphtol	Pyrenol	HHCB	EROD	BFCOD
<i>Barbus meridionalis</i>	R3	18 ± 0.2	n.d*	n.d	6 ± 1.7	n.d	35 ± 6	181 ± 30
	R2	9 ± 0.4	n.d	n.d	4 ± 0.7	9 ± 0.4	20 ± 3	151 ± 36
	R1	33 ± 10	2.3 ± 1.5	3.2 ± 0.1	6 ± 1.4	44 ± 9	31 ± 5	144 ± 22
	P1	340 ± 151	67 ± 18	77 ± 29	38 ± 13	391 ± 49	184 ± 32	387 ± 48
	P2	1557 ± 176	56 ± 4	95 ± 9.0	39 ± 17	443 ± 55	120 ± 18	357 ± 34
	P3	975 ± 181	45 ± 10	226 ± 22	56 ± 10	1907 ± 991	150 ± 16	431 ± 40
<i>Squalius laietanus</i>	R3	32 ± 12	n.d	n.d	2.3 ± 0.7	4 ± 0.2	10 ± 2	50 ± 7
	R2	61 ± 14	n.d	n.d	0.9 ± 0.3	n.d	11 ± 1	56 ± 6
	R1	35 ± 18	3.2 ± 2.3	2.5 ± 0.4	2.5 ± 0.2	5 ± 3.4	10 ± 3	57 ± 8
	P1	249 ± 53	26 ± 7	22 ± 13	19 ± 12	255 ± 59	48 ± 12	155 ± 18
	P2	2157 ± 292	42 ± 3	44 ± 14	19 ± 4	245 ± 23	63 ± 11	207 ± 26
	P3	761 ± 170	28 ± 4	156 ± 29	34 ± 5	1277 ± 470	104 ± 26	250 ± 24

\*n.d: below detection limit

**Table S3.** Lipid molecules, theoretical mass (Da), elemental composition, measured mass (Da), retention time (minutes), experimental error (ppm) and percentage from total lipid content of PC, PC-P, PC-O, LPC, CE, TG, DG and SM detected in muscle tissue of *B. meridionalis* and *S. laietanus*. All identified compounds in accordance to criteria of maximum permissible mass error of 5 ppm, with atom constraints and with  $-0.5 \leq \text{DBE} \leq 15.0$ . DBE: double-bond equivalent. Elemental composition of PC, PC-O/PC-P, LPC and SM refers to the  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ions whereas TG, DG and CE refers to ammonium adducts  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ .

Lipid species	Theoretical mass (Da)	Elemental composition	Measured mass (Da)	Error (ppm)	DBE	Rt (min)	<i>B. meridionalis</i> % total lipids	<i>S. laietanus</i> % total lipids
PC 30:0	706.5387	C38H77NO8P	706.5386	-0.1	1.5	6.85	0.51	0.63
PC 30:1	704.5230	C38H75NO8P	704.5224	-1	2.5	6.02	0.06	0.03
PC 32:0	734.5700	C40H81NO8P	734.5714	1.9	1.5	8.20	1.41	2.40
PC 32:1	732.5543	C40H79NO8P	732.5538	-0.7	2.5	7.26	3.18	3.47
PC 32:2	730.5387	C40H77NO8P	730.5380	-1	3.5	6.36	0.18	0.19
PC 34:0	762.6013	C42H85NO8P	762.6016	0.4	1.5	9.56	0.10	0.19
PC 34:1	760.5856	C42H83NO8P	760.5842	-1.8	2.5	8.64	9.35	8.32
PC 34:2	758.5700	C42H81NO8P	758.5726	3.4	3.5	7.69	2.04	3.67
PC 34:3	756.5543	C42H79NO8P	756.5563	2.6	4.5	6.84	0.68	1.95
PC 36:1	788.6169	C44H87NO8P	788.6165	-0.5	2.5	9.97	2.30	1.19
PC 36:2	786.6013	C44H85NO8P	786.6018	0.6	3.5	9.09	0.78	0.98
PC 36:3	784.5856	C44H83NO8P	784.5863	0.9	4.5	8.12	0.58	1.61
PC 36:4	782.5700	C44H81NO8P	782.5706	0.8	5.5	7.77	3.87	1.55
PC 36:5	780.5543	C44H79NO8P	780.5538	-0.7	6.5	6.94	9.26	5.05
PC 36:6	778.5387	C44H77NO8P	778.5387	0.3	7.5	6.09	1.59	0.59
PC 38:0	818.6639	C46H93NO8P	818.6627	-1.5	1.5	12.01	0.01	0.00
PC 38:1	816.6482	C46H91NO8P	816.6495	1.6	2.5	11.18	0.20	0.02
PC 38:2	814.6326	C46H89NO8P	814.6312	-1.7	3.5	10.22	0.05	0.03
PC 38:4	810.6013	C46H85NO8P	810.6013	0	5.5	9.17	1.69	0.20
PC 38:5	808.5856	C46H83NO8P	808.5847	-1.1	6.5	8.36	1.28	0.89
PC 38:6	806.5700	C46H81NO8P	806.5703	0.4	7.5	7.58	8.77	5.90
PC 40:1	844.6795	C48H95NO8P	844.6792	-0.4	2.5	12.28	0.06	0.01
PC 40:2	842.6639	C48H93NO8P	842.6642	0.4	3.5	11.40	0.03	0.01
PC 40:5	836.6169	C48H87NO8P	836.6167	-1.1	6.5	9.30	0.63	0.03
<b>Total PC</b>							<b>48.61</b>	<b>38.93</b>
PC-P 32:0	718.575	C40H81NO7P	718.5776	3.5	1.5	9.14	0.05	0.02
PC-P 32:1	716.5593	C40H79NO7P	716.5599	0.7	2.5	8.21	0.06	0.01
PC-P 34:1	744.5907	C42H83NO7P	744.5909	0.3	2.5	9.51	0.25	0.03
PC-P 36:1	772.622	C44H87NO7P	772.6259	4.9	2.5	10.78	0.02	0.00
PC-P 36:2	770.6084	C44H85NO7P	770.6056	-1	3.5	9.84	0.02	0.00
PC-P 36:4	766.5751	C44H81NO7P	766.5756	0.7	5.5	8.61	0.33	0.01
PC-P 38:6	790.5747	C46H81NO7P	790.5723	-3.5	7.5	8.41	1.95	0.64
<b>Total PC-P</b>							<b>2.68</b>	<b>0.72</b>
PC-O 30:0	692.5594	C38H79NO7P	692.5585	-1.3	0.5	7.78	0.02	0.03
PC-O 32:0	720.5907	C40H83NO7P	720.5906	-0.1	0.5	9.13	0.05	0.18
PC-O 32:1	718.575	C40H81NO7P	718.5784	4.6	1.5	8.24	0.19	0.15
PC-O 32:2	716.5593	C40H79NO7P	716.559	-0.6	2.5	7.67	0.03	0.01
PC-O 34:1	746.6064	C42H85NO7P	746.6077	1.7	1.5	9.56	0.48	0.59
PC-O 36:1	774.6377	C44H89NO7P	774.6403	3.4	1.5	10.82	0.07	0.03
PC-O 36:2	772.622	C44H87NO7P	772.6249	3.8	2.5	9.88	0.05	0.03
PC-O 36:5	766.5751	C44H81NO7P	766.5779	3.7	5.5	8.41	0.75	1.20

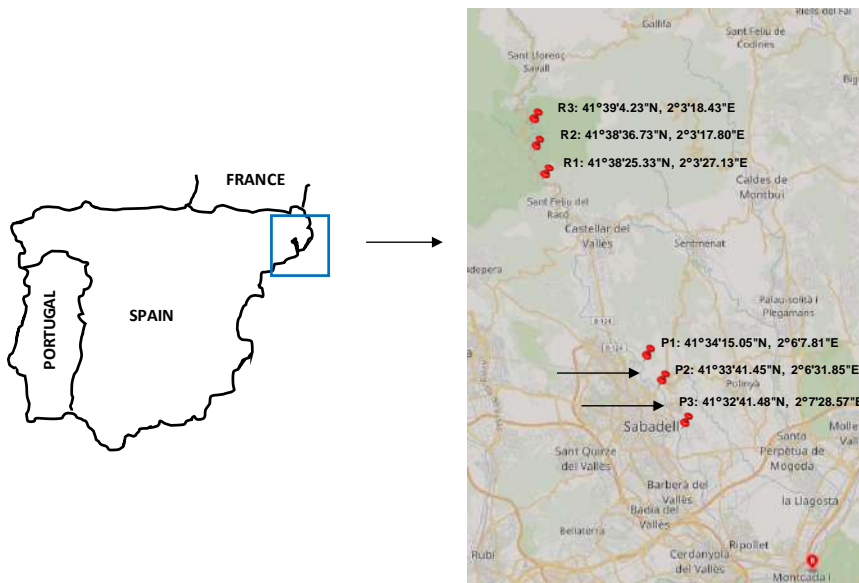
## CAPÍTOL 2

Lipid species	Theoretical mass (Da)	Elemental composition	Measured mass (Da)	Error (ppm)	DBE	Rt (min)	<i>B. meridionalis</i> % total lipids	<i>S. laietanus</i> % total lipids
PC-O 38:5	794.6061	C46H85NO7P	794.6064	0	5.5	8.84	0.38	0.55
PC-O 38:6	792.5885	C46H83NO7P	792.5891	-2	6.5	8.48	1.73	1.89
<b>Total PC-O</b>							<b>3.74</b>	<b>4.66</b>
LPC 16:0	496.3403	C24H51NO7P	496.3399	-0.8	0.5	2.54	1.34	1.90
LPC 16:1	494.3247	C24H49NO7P	494.324	-1.4	1.5	2.12	0.58	0.87
LPC 18:0	524.3716	C26H55NO7P	524.3699	-3.2	0.5	3.17	0.17	0.11
LPC 18:1	522.356	C26H53NO7P	522.3553	-1.3	1.5	2.71	3.03	3.56
LPC 18:2	520.3403	C26H51NO7P	520.3389	-2.7	2.5	2.26	0.78	1.55
LPC 18:3	518.3246	C26H49NO7P	518.3252	1	3.5	1.99	0.19	0.58
LPC 20:1	550.3873	C28H57NO7P	550.3864	-1.6	1.5	3.34	0.04	0.02
LPC 20:2	548.3716	C28H55NO7P	548.369	-4.7	2.5	2.89	0.05	0.08
LPC 20:3	546.356	C28H53NO7P	546.3553	-1.3	3.5	2.60	0.44	0.57
LPC 20:4	544.3403	C28H51NO7P	544.3385	-3.3	4.5	2.28	4.44	2.60
LPC 20:5	542.3246	C28H49NO7P	542.3256	1.7	5.5	1.99	10.38	8.36
LPC 22:4	572.3716	C30H55NO7P	572.3725	-3.1	4.5	2.81	0.16	0.04
<b>Total LPC</b>							<b>21.60</b>	<b>20.24</b>
CE 16:0	642.6189	C43H80NO2	642.6202	2	4.5	16.69	0.02	0.05
CE 16:1	640.6033	C43H78NO2	640.6032	-0.2	5.5	16.07	0.03	0.02
CE 18:0	670.6500	C45H84NO2	670.6502	0.1	4.5	17.58	0.01	0.01
CE 18:1	668.6337	C45H82NO2	668.6340	-0.4	5.5	16.85	0.10	0.14
CE 18:2	666.6189	C45H80NO2	666.6206	2.6	6.5	16.28	0.05	0.10
CE 18:3	664.6057	C45H78NO2	664.6027	4.5	7.5	15.69	0.04	0.06
CE 20:1	696.6659	C47H86NO2	696.6642	-2.4	5.5	17.71	0.02	0.01
CE 20:3	692.6346	C47H82NO2	692.6346	0	7.5	16.47	0.03	0.03
CE 20:4	690.6190	C47H80NO2	690.6184	0.9	8.5	15.95	0.17	0.17
<b>Total CE</b>							<b>0.47</b>	<b>0.59</b>
TG 44:0	768.7081	C47H94O6N	768.7108	3.5	1.5	15.18	0.05	0.05
TG 44:1	766.6925	C47H92O6N	766.6943	2.3	2.5	14.63	0.07	0.12
TG 46:0	796.7394	C49H98NO6	796.7394	0	1.5	15.87	0.11	0.15
TG 46:1	794.7238	C49H96NO6	794.7236	-0.2	2.5	15.38	0.33	0.41
TG 46:2	792.7081	C49H94NO6	792.7087	0.6	3.5	14.83	0.24	0.35
TG 46:3	790.6925	C49H92NO6	790.6926	0.1	4.5	14.31	0.06	0.14
TG 48:0	824.7707	C51H102NO6	824.7715	1	1.5	16.52	0.33	0.50
TG 48:1	822.7551	C51H100NO6	822.7554	0.4	2.5	16.05	0.85	1.30
TG 48:2	820.7394	C51H98NO6	820.7408	1.7	3.5	15.55	1.16	1.34
TG 48:3	818.7238	C51H96NO6	818.7234	-0.5	4.5	15.05	0.57	0.71
TG 48:4	816.7081	C51H94NO6	816.7088	0.9	5.5	14.53	0.15	0.33
TG 50:0	852.8020	C53H106NO6	852.8027	0.8	1.5	17.20	0.12	0.19
TG 50:1	850.7864	C53H104NO6	850.7871	0.8	2.5	16.70	0.97	2.29
TG 50:2	848.7707	C53H102NO6	848.7704	-0.4	3.5	16.23	1.87	2.69
TG 50:3	846.7551	C53H100NO6	846.7540	-1.3	4.5	15.74	1.36	1.97
TG 50:4	844.7394	C53H98NO6	844.7401	0.8	5.5	15.25	0.86	1.29
TG 50:5	842.7238	C53H96NO6	842.7247	1.1	6.5	14.73	0.25	0.54
TG 50:6	840.7081	C53H94NO6	840.7078	-0.4	7.5	14.47	0.09	0.17
TG 52:0	880.8333	C55H110NO6	880.8326	-0.8	1.5	18.01	0.06	0.06
TG 52:1	878.8177	C55H108NO6	878.8193	1.8	2.5	17.39	0.29	0.89
TG 52:2	876.8020	C55H106NO6	876.8038	2.1	3.5	16.86	1.40	3.31
TG 52:3	874.7864	C55H104NO6	874.7878	1.6	4.5	16.39	1.34	2.59
TG 52:4	872.7707	C55H102NO6	872.7715	0.9	5.5	15.92	0.68	1.22
TG 52:5	870.7551	C55H100NO6	870.7552	0.1	6.5	15.7	0.27	0.41
TG 52:6	868.7394	C55H98NO6	868.7433	4.5	7.5	15.22	0.57	0.59
TG 52:7	866.7238	C55H96NO6	866.7249	1.3	8.5	14.69	0.35	0.33
TG 54:1	906.8490	C57H112NO6	906.8516	2.9	2.5	18.18	0.06	0.13
TG 54:2	904.8333	C57H110NO6	904.8334	0.1	3.5	17.59	0.25	0.79
TG 54:3	902.8177	C57H108NO6	902.819	1.4	4.5	17.05	0.58	1.78



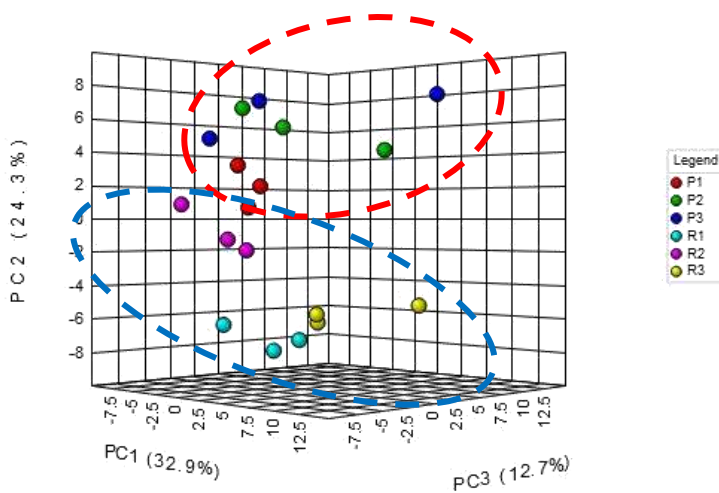
Lipid species	Theoretical mass (Da)	Elemental composition	Measured mass (Da)	Error (ppm)	DBE	Rt (min)	<i>B. meridionalis</i> % total lipids	<i>S. laietanus</i> % total lipids
TG 54:4	900.8020	C57H106NO6	900.8025	0.6	5.5	16.56	0.39	1.17
TG 54:5	898.7864	C57H104NO6	898.7875	1.2	6.5	16.11	0.43	1.06
TG 54:6	896.7707	C57H102NO6	896.7703	-0.4	7.5	15.89	0.62	0.79
TG 54:7	894.7551	C57H100NO6	894.7553	2.5	8.5	15.40	0.66	0.71
TG 54:8	892.7394	C57H98NO6	892.7416	2.5	9.5	14.90	0.33	0.44
TG 54:9	890.7238	C57H96NO6	890.727	3.6	10.5	14.36	0.14	0.18
TG 56:2	932.8647	C59H114NO6	932.8674	3	3.5	18.38	0.04	0.05
TG 56:3	930.8490	C59H112NO6	930.8497	0.8	4.5	17.77	0.06	0.07
TG 56:4	928.8333	C59H110NO6	928.8348	1.6	5.5	17.22	0.05	0.07
<b>Total TG</b>							<b>17.99</b>	<b>31.20</b>
DG 32:0	586.5411	C35H72O5N	586.5384	-4.6	0.5	9.71	0.05	0.10
DG 32:1	584.5255	C35H70O5N	584.5242	-2.1	1.5	8.76	0.15	0.13
DG 32:2	582.5099	C35H68O5N	582.5117	3.4	2.5	7.77	0.08	0.03
DG 32:3	580.4943	C35H66O5N	580.4927	-2.4	3.5	6.91	0.02	0.01
DG 32:4	578.4787	C35H64O5N	578.4758	-4.5	4.5	6.27	0.02	0.01
DG 34:0	614.5724	C37H76O5N	614.5699	-4.1	0.5	10.99	0.03	0.03
DG 34:1	612.5567	C37H74NO5	612.5566	-0.2	1.5	10.06	0.25	0.97
DG 34:2	610.5411	C37H72NO5	610.5411	0	2.5	9.16	0.17	0.22
DG 34:3	608.5256	C37H70O5N	608.5269	2.5	3.5	8.31	0.09	0.11
DG 34:4	606.51	C37H68O5N	606.5108	1.8	4.5	7.33	0.05	0.02
DG 36:1	640.588	C39H78NO5	640.5878	-0.3	1.5	11.28	0.06	0.08
DG 36:2	638.5724	C39H76NO5	638.5723	-0.2	2.5	10.44	0.10	0.15
DG 36:3	636.5569	C39H74O5N	636.5554	-2	3.5	9.54	0.05	0.09
DG 36:4	634.5413	C39H72O5N	634.5413	0.3	4.5	8.73	0.05	0.05
DG 36:5	632.5254	C39H70NO5	632.5246	-1.3	5.5	8.35	0.11	0.08
<b>Total DG</b>							<b>1.28</b>	<b>2.09</b>
SM 16:0	703.5754	C39H80N2O6P	703.5739	-2.1	1.5	6.99	1.04	0.75
SM 16:1	701.5598	C39H78N2O6P	701.5607	1.3	2.5	6.22	0.71	0.01
SM 24:0	815.7006	C47H96N2O6P	815.7007	0.1	1.5	12.25	0.05	0.12
SM 24:1	813.6850	C47H94N2O6P	813.6853	0.3	2.5	11.20	0.42	0.49
SM 24:2	811.6690	C47H92N2O6P	811.6697	0.4	3.5	10.52	1.42	0.21
<b>Total SM</b>							<b>3.63</b>	<b>1.58</b>

**Figure S1.** Map of the sampling sites in the Ripoll River (Catalunya, NE Spain). Arrows indicate effluent inputs from sewage treatment plants coming from the city of Sabadell (208,000 inhabitants), the main urban site.

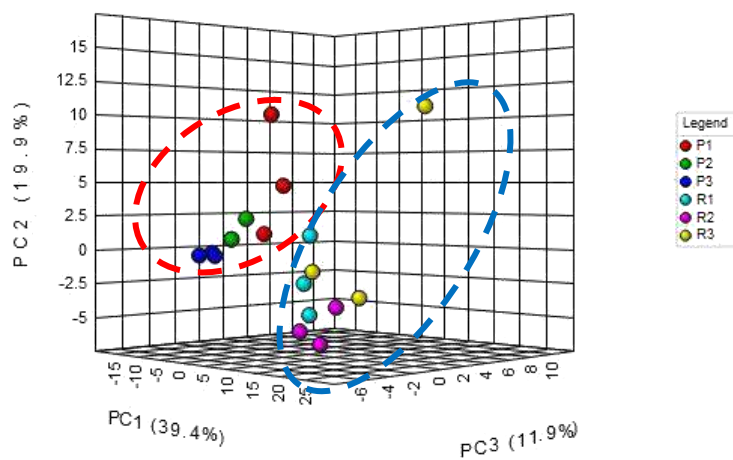


**Figure S2.** 3D Principal component analysis (PCA) scores plot between PC1, PC2 and PC3 for A) *Barbus meridionalis* and B) *Squalius laietanus* lipidomics data. The explained variances are shown in brackets. Red and blue dotted lines confine samples from P and R sites, respectively.

A)



B)







# Capítol 3

## DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

La discussió dels resultats es divideix en quatre seccions: (a) comparativa de les tres tècniques analítiques utilitzades per l'anàlisi dels perfils lipídics dels diferents models biològics, (b) associació de les alteracions lipídiques detectades amb els mecanismes d'acció dels compostos químics estudiats, (c) detecció d'alteracions lipídiques en peixos exposats a mescleres complexes de compostos amb diversos orígens (descàrregues urbanes i industrials) mitjançant la realització d'un estudi de camp i (d) utilitat dels estudis lipídics per la seva implementació en l'avaluació del risc químic.

### 3.1 METODOLOGIES ANALÍTiques UTILITZADES PER ALS ESTUDIS LIPIDÒMICS

En aquesta Tesi l'anàlisi de lípids s'ha dut a terme mitjançant diferents tècniques analítiques; (1) injecció directa de l'extracte de lípids a la fase mòbil acoblat a un espectròmetre de masses d'alta resolució amb analitzador Exactive-Orbitrap amb adquisició en *full scan* (FIA-ESI(+/-)-HRMS), (2) cromatografia de líquids d'ultra alta eficàcia acoblades a l'espectrometria de masses d'alta resolució, utilitzant un analitzador de temps de vol (ToF) i adquirint les dades en mode de *full scan* (UHPLC-ESI(+)-HRMS) i (3) cromatografia de líquids d'ultra alta eficàcia acoblades a l'espectrometria de masses d'alta resolució, usant un espectròmetre de masses híbrid Q-Exactive Orbitrap i treballant en mode de *full scan* i ddMS2 (UHPLC-ESI(+/-)-HRMS/MS).

L'analitzador de l'espectròmetre de masses i el mode d'adquisició de les dades utilitzat per l'anàlisi dels lípids determina la naturalesa de la informació que s'obté, és a dir, el grau d'identificació de les diferents espècies lipídiques. Així, els mètodes analítics FIA-Orbitrap i UHPLC-ToF, en les que s'ha utilitzat l'adquisició en *full scan*, proporcionen el valor de  $m/z$  de l'ió base de l'espectre

de masses, corresponent al compost parental, donant informació del nombre de carbonis i del grau d'insaturació de les espècies lipídiques. En canvi, amb la tècnica UHPLC-HRMS/MS en mode d'adquisició ddMS2, s'obté el patró de fragmentació dels lípids analitzats, i per tant, la composició molecular dels lípids, confirmació de l'espècie lipídica i els àcids grassos que formen els lípids identificats. En alguns casos s'arriba a identificar també la posició dels àcids grassos dins la molècula (sn-1, sn-2, sn-3).

A més, les dades obtingudes amb els diferents mètodes es poden tractar (a) des d'un enfocament dirigit (*suspected screening*), que consisteix en l'ús d'una base de dades generada *a priori* per la identificació dels lípids d'interès, que inclou propietats com els valors de *m/z* esperables, la polaritat dels ions, els adductes més abundants i en els casos que apliqui, el temps de retenció o (b) des d'un enfocament no dirigit, mitjançant l'ús de diferents *softwares* (apartat 1.3.3) per la detecció de compostos desconeguts.

Així, en aquesta Tesi, les dades obtingudes amb el mètodes FIA-HRMS s'han tractat des d'una aproximació dirigida, amb el mètode UHPLC-HRMS s'han aplicat els dos tipus d'aproximacions, dirigida i no dirigida emprant el *software online* XCMS, i per últim, les dades obtingudes a partir de la tècnica UHPLC-HRMS/MS s'han tractat des de una aproximació no dirigida, fent ús del programari LipidMatch. Comparant el perfil lipídic de les cèl·lules PLHC-1 obtingut amb les tècniques FIA-HRMS i UHPLC-HRMS mitjançant l'anàlisi de dades des d'una basant de *suspected screening*, es confirmen algunes diferències en la informació que s'obté amb els dos mètodes. A la [Taula 3.1](#) es mostren les espècies lipídiques que s'identifiquen amb les dues tècniques i les que es reporten exclusivament per una de les tècniques.

**Taula 3.1** Espècies lipídiques identificades en les cèl·lules PLHC-1 mitjançant les tècniques analítiques FIA-Orbitrap i UHPLC-ToF, únicament amb la primera o únicament amb la segona.

	<b>Ambdues tècniques</b>	<b>Només FIA-Orbitrap</b>	<b>Només UHPLC-ToF</b>
<b>TG</b>	46:1, 46:2, 48:0, 48:1, 48:2, 48:3, 50:0,50:1, 50:2, 50:3, 50:4,52:1, 52:2, 52:3, 52:4, 54:1, 54:2, 54:3, 54:4, 54:5, 54:6, 56:3, 56:4, 56:5, 56:6, 58:5, 58:6	52:5, 56:7, 58:7, 58:8	44:0, 46:0, 46:3, 48:4, 52:0, 56:2, 58:4
<b>DG</b>	32:0, 32:1, 32:2, 34:1, 34:2, 34:3, 36:1, 36:2, 36:3, 36:4, 38:3, 38:4, 38:5	30:0, 30:1, 34:0, 38:2, 38:6, 40:3, 40:4, 40:5, 40:6, 40:7	24:4, 28:4, 36:0
<b>PC</b>	32:0, 32:1, 32:2, 34:0, 34:1, 34:2, 34:3, 34:4, 36:1, 36:2, 36:3, 36:4, 36:5, 36:6, 38:1, 38:2, 38:3, 38:4, 38:5, 38:6, 40:3, 40:4, 40:5, 40:6, 40:7, 40:8	36:0	28:0, 28:1, 30:0, 30:1, 30:2, 32:4, 38:7, 40:1, 40:2, 42:2, 42:3, 42:4, 42:5, 42:6, 42:7, 42:8
<b>LPC</b>	18:1		16:0, 16:1, 18:0, 18:2, 20:4
<b>PC-O/PC-P</b>	O-32:1/P-32:0, O-32:2/P-32:1, O-34:1/P-34:0, O-34:3/P-34:2, O-36:2/P-36:1, O-36:3/P-36:2, O-36:4/P-36:3, O-38:5/P-38:4	O-34:2/34:1, O-36:5/36:4, P-36:5, O-38:5/P-38:4, O-38:6/38.5, P-38:6, P-40:6	O-30:0, O-30:1/P-30:0, O-32:0, O-36:1/P-36:0, O-38:1/P-38:0, O-38:3/P-38:2, O-38:4/P-38:3, P-38:7
<b>PE</b>		34:1, 34:2, 36:1, 36:2, 36:3, 36:4, 38:1, 38:2, 38:3, 38:4, 38:5, 38:6, 40:2, 40:3, 40:4, 40:5, 40:6	
<b>PE-O/PE-P</b>		O-32:1, P-32:1, O-34:2/P-34:1, O-34:3/P-34:2, O-36:2/P-36:1, O-36:3/P-36:2, O-36:4/P-36:3, O-36:5/P-36:4, P-36:5, O-38:4/P-38:3, O-38:5/P-38:4, O-38:6/P-38:5, P-38:6, O-40.5/P-40:4, P-40:6, P-40:7	
<b>PG</b>		34:0, 34:1, 36:1	
<b>PI</b>		34:0, 34:1, 34:2, 36:2, 36:3, 36:4, 38:3, 38:4,	

	38:5, 40:3, 40:4	
<b>PS</b>	36:1, 36:2, 38:2, 38:3, 38:4, 40:3, 40:4, 40:5, 40:6, 40:7	
<b>SM</b>		16:0, 18:0, 22:0, 22:1, 24:0, 24:1, 24:2
<b>CE</b>		18:1, 18:2, 20:6

Mitjançant l'espectròmetre de masses Exactive-Orbitrap s'ha emprat una ionització per *electrosprai* en polaritat positiva i negativa, obtenint bona sensibilitat, mentre que amb el sistema ToF, l'*electrosprai* amb polaritat negativa presentava una molt baixa sensibilitat, cosa que no ha permès la detecció d'aquells lípids que s'ionitzen majoritàriament en polaritat negativa, com és el cas de la majoria de subclasses de GPs (PE, PG, PI i PS).

Pel que fa a les espècies de SMs, al ser espècies minoritàries només s'han detectat amb el mètode UHPLC-ToF. La tècnica FIA presenta una elevada supressió iònica, ja que tots els ions presents a l'extracte arriben a la font d'ionització (*electrosprai*) a la vegada, dificultant la ionització de les espècies minoritàries presents a l'extracte de lípids, entre les que es troben les SMs. El motiu pel qual les SMs representen una fracció minoritària dins l'extracte de lípids, pot estar relacionat amb el tipus d'extracció realitzat, ja que les condicions genèriques emprades en els estudis lipídics no són adients per l'anàlisi de SPs. Per la detecció de SPs mitjançant FIA, s'acostumen a eliminar els lípids majoritaris (GPs) mitjançant hidròlisi alcalina suau (Farwanah et al., 2011). A més, el mètode d'extracció de SPs més generalitzat és mitjançant cloroform:metanol en proporció 1:2, al contrari del mètode Folch, utilitzat per l'extracció simultània de diverses classes de lípids, que segueix la proporció 2:1 (Farwanah et al., 2009). De la mateixa manera, les poques espècies de CEs detectades amb el mètode UHPLC-ToF no es detecten mitjançant FIA-Orbitrap.

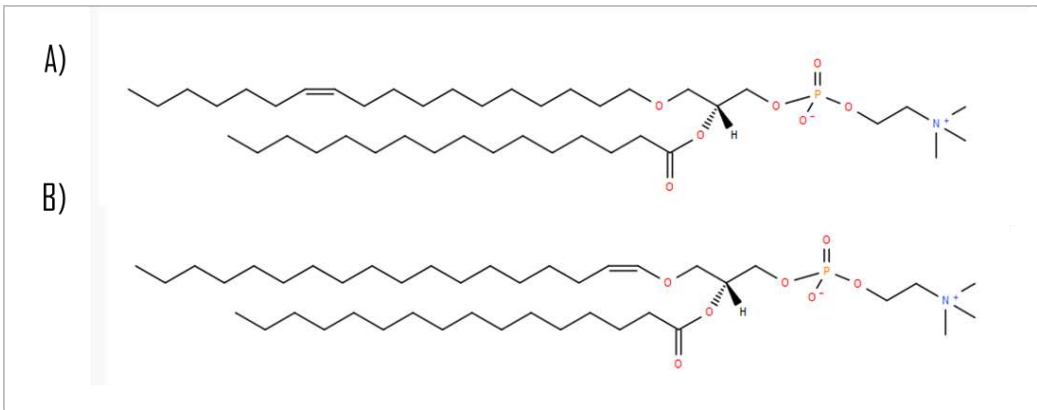
Aquesta diferència s'associa de nou a l'elevada supressió iònica en el mètode FIA, i al fet que per l'anàlisi de CEs, siguin més adients altres extraccions més específiques, com podria ser la mescla binària isooctà:acetat d'etil (75:25) (Krank et al., 2007)

Pel que fa a les subclasses lipídiques TG, DG, i PC, que s'ionitzen preferentment en polaritat positiva, la gran majoria d'espècies s'han pogut analitzar amb les dues tècniques. Les espècies no detectades amb una de dels dues tècniques corresponen, de nou, a les espècies menys abundants de cada classe lipídica.

Gorrochategui et al. (2014) van comparar el comportament d'un analitzador ToF (mateixa tècnica emprada en aquesta Tesi) amb el d'un analitzador Orbitrap per la detecció d'espècies lipídiques en les cèl·lules JEG-3. Del total d'espècies identificades, el 88% dels lípids van ser identificats amb els dos analitzadors, i el 4% i el 8% només amb l'analitzador ToF i l'Orbitrap, respectivament. Així, els autors afirmen que els dos analitzadors mostren una capacitat equivalent per l'anàlisi de lípids en el model cel·lular JEG-3. Val a dir, però, que en el seu cas els dos espectròmetres de masses anaven precedits de UHPLC i, per tant, no patien l'efecte de supressió iònica que produeix la manca de detecció dels lípids minoritaris, com succeeix amb la tècnica FIA-Orbitrap. Tot i així, la tècnica FIA-Orbitrap ha permès cobrir un nombre més elevat de subclasses lipídiques que la tècnica UHPLC-ToF gràcies a la ionització en polaritat negativa i positiva conjuntament, permeten la detecció d'un elevat nombre de lípids en només dos minuts d'anàlisi per mostra.

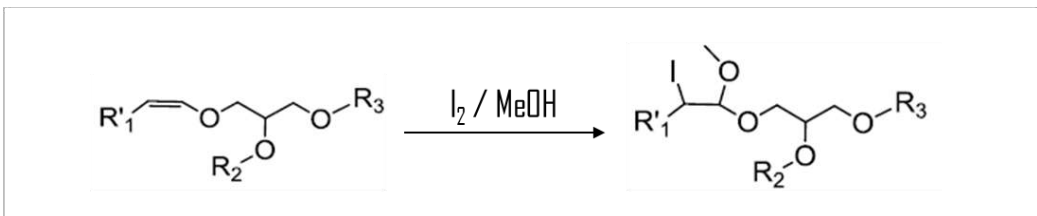
Un dels inconvenients que presenten les tècniques amb detecció en *full scan* és la impossibilitat de diferenciar entre espècies isobàriques, amb funcions biològiques diferents. Aquest és el cas per exemple de les espècies

amb enllaç èter de GPs (plasmanil- / plasmenil-). Aquestes espècies només es diferencien entre elles en la posició d'un doble enllaç dins la cadena alifàtica dels àcids grassos. Mentre que els plasmenils o plasmalògens (PC-P, PE-P), contenen un èter vinil O-(1-alquenil) a la primera posició de la cadena de glicerol, els plasmanils (PC-O, PE-O) no presenten aquest doble enllaç, sinó que la insaturació es troba al llarg d'un dels dos àcids grassos (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1** Exemple de l'estructura de dues espècies isobàriques de lípids: A) PC-O 34:1 i B) PC-P 34:0. (Estructures extretes de LIPIDMAPS).

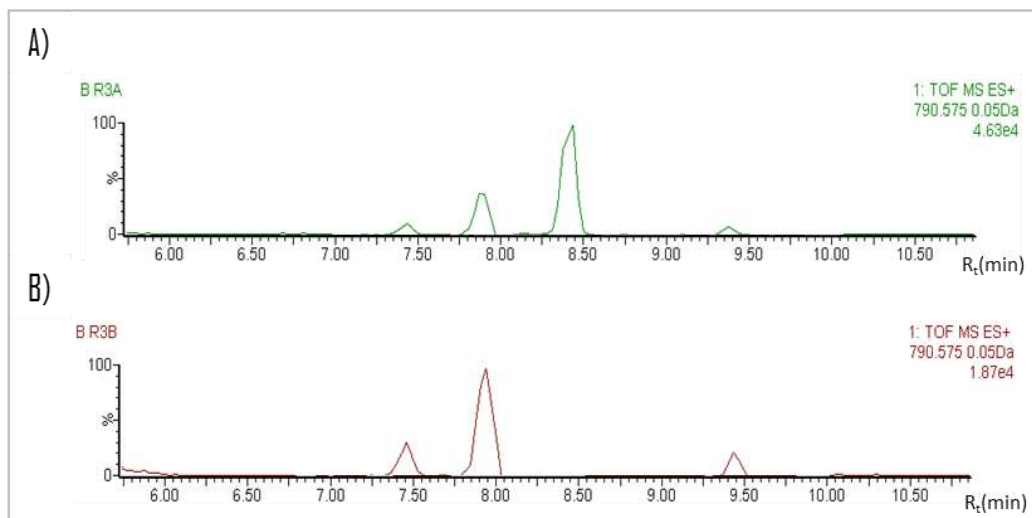
Per resoldre l'ambigüitat en la identificació d'aquestes espècies s'ha dut a terme la derivatització de l'extracte de lípids amb iode i metanol, ja que l'enllaç vinil dels plasmalògens és reactiu al iode, i per tant, les espècies romanents a l'extracte poden ser tentativament identificades com a PC-Os o PE-Os (**Figura 3.2**) (Lydic et al., 2015).



**Figura 3.2** Reacció de derivatització de les espècies plasmenil- GPs mitjançant reacció amb iode. (Lydic et al., 2015)



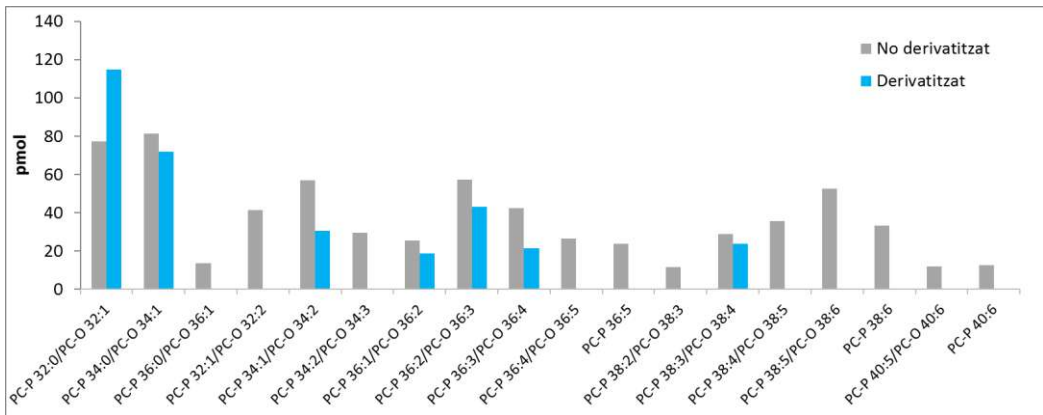
Aquesta derivatització es va aplicar en algunes de les mostres de múscul de peix per una anotació més exacte de les espècies lipídiques, després d'observar que aquestes espècies es trobaven desregulades en els individus mostrejats a les zones contaminades (article V). La separació cromatogràfica dels lípids presents a l'extracte va facilitar la identificació de les espècies, ja que s'observava desaparició del pic cromatogràfic de les espècies PC-P, i no de les PC-O, com es mostra a la [Figura 3.3](#).



**Figura 3.3** Cromatograma extret per la  $m/z$  teòrica 790.5747, que correspon a l'espècie PC-P 38:6 ( $[M+H]^+$ ), per una mostra A) no derivatitzada i B) derivatitzada amb  $I_2$ . S'observa com el pic cromatogràfic que es troba a temps de retenció 8.41 minuts no es detecta a la mostra derivatitzada, confirmant la seva identitat com a PC-P.

Tot i que en aquesta Tesi no s'ha realitzat el procés de derivatització quan la tècnica d'anàlisi de lípids escollida era el FIA-HRMS, i per tant, els lípids han estat anotats com a PC-O/PC-P (o PE-O/PE-P), es va dur a terme un estudi preliminar amb les cèl·lules PLHC-1 per comprovar si la derivatització de l'extracte de lípids amb iode permetia la diferenciació de les espècies isobàriques, tot i l'absència de separació cromatogràfica. Un elevat nombre d'espècies no es va detectar després de la derivatització, i consegüentment, es

podrien anotar com a PC-Ps (Figura 3.4). En canvi, les espècies que es segueixen detectant després del procés de derivatització poden ser, o bé PC-Os, o bé mescles de PC-Os i PC-Ps, si la seva concentració ha patit una lleugera disminució. Així, la derivatització amb iode i metanol dels extractes de lípids per la diferenciació entre plasmanils i plasménils podria ser d'aplicabilitat també en tècniques que no separin els lípids cromatogràficament abans de l'anàlisi a l'espectròmetre de masses.



**Figura 3.4** Contingut d'èter-PCs abans (gris) i després (blau) de derivatitzar les cèl·lules PLHC-1 amb iode/metanol. Les espècies lipídiques que es detecten en l'extracte derivatitzat corresponen a PC-Os, mentre que les que deixen de detectar-se, corresponen a PC-Ps.

La diferenciació entre espècies isobàriques és possible en espectrometria de masses si s'aprofiten els patrons de fragmentació característics de les subclasses lipídiques. Així, mitjançant UHPLC-HRMS/MS, s'aconsegueix confirmar la identitat de molts dels lípids detectats. Per una banda, l'ambigüitat entre diferents subclasses de GPs, *p.ex.* entre PCs i PEs, que fins el moment s'havia resolt escollint l'espècie que incorporés només àcids grassos amb un nombre parell de carbonis, ja que són els més comuns en éssers vius, es poden diferenciar clarament per fragmentació. En polaritat positiva ( $[M+H]^+$ ) les dues subclasses de lípids, PC i PE, es diferenciaríen per el fragment corresponent al cap apolar de la molècula,  $m/z$  184.0733 per PCs i  $m/z$

142.0264 per PEs, però en el cas de les PEs, no s'acostuma a observar aquest ió, sinó la pèrdua neutre del cap apolar (NL, 141.0019) ja que l'etanolamina és menys competitiva per el  $H^+$  (Pulfer and Murphy, 2003; Hsu and Turk, 2009). Per altra banda, les PEs s'ionitzen majoritàriament en polaritat negativa ( $[M-H]^-$ ), i presenten l'ió producte típic a  $m/z$  196.0375.

Aplicar fragmentació en l'anàlisi de lípids permet la identificació de les espècies a nivell molecular, ja que la presència a l'espectre de masses de fragments típics corresponents als àcids grassos permet diferenciar les espècies isomèriques que s'agruparien amb una anotació a nivell de composició suma. A mode d'exemple, en la fragmentació de GPs ionitzats en polaritat negativa ( $[M-H]^-$ ) s'obtindrà la pèrdua d'àcils grassos que formen ions carboxilats desprotonats (Hsu and Turk, 2009). L'espectre de fragmentació de GPs que presentin àcids grassos típics com 16:0, 16:1, 18:0 i 18:1 incorporarà les  $m/z$  dels ions  $[FA-H]^-$ , sent, 255.2324, 253.2167, 283.2637 i 281.2180, respectivament. Per altra banda, espècies com els TGs o els DGs, que s'ionitzen en polaritat positiva formant adductes d'amoni, els seus substituents s'identifiquen per la NL dels acils grassos més amoníac (Han and Gross, 2001). En aquest cas, la NL dels àcids grassos 16:0, 16:1, 18:0 i 18:1, s'observaran com a  $[FA+NH_3]^+$ , corresponent a la pèrdua de 273.2661, 271.2505, 301.2973 i 299.2817, respectivament.

A més, l'anàlisi no dirigit proporciona una major caracterització del perfil lipídic de les cèl·lules al considerar un nombre més ampli de classes lipídiques. Per exemple, comparant el perfil lipídic de les cèl·lules ZFL obtingut mitjançant FIA-HRMS (120 espècies) o UHPLC-HRMS/MS (558 espècies), amb la segona tècnica es descriuen lípids de les subclasses AcCar, Cer, CE, DMPE, èter-TG i

formes oxidades de TG i LPC, que no s'havien incorporat a la base de referència amb la que s'han tractat les dades obtingudes per FIA-HRMS.

Aquestes subclasses van ser alterades per l'exposició a BPA, BPF i BADGE-2HCl (article III), efecte que s'haurien omès amb un anàlisi dirigit. La [Taula 3.2](#) incorpora les espècies lipídiques pertanyents a les subclasses detectades per els dos mètodes i mostra la informació que s'obté amb cadascun dels mètodes. Tot i que mitjançant UHPLC-HRMS/MS s'obtenen més de 4 vegades més espècies lipídiques que amb el mètode FIA-HRMS, hi ha algunes subclasses de lípids detectades correctament amb aquest darrer mètode, com és el cas dels DGs, PCs, Pls i èter-GPs (tot i que no es distingeixi entre plasmalògens i plasmanils). En canvi, amb el mètode FIA es detecta un nombre molt reduït d'espècies lipídiques de subclasses com les LPCs, LPEs, SMS o TGs, possiblement degut a l'elevada supressió iònica que comporta una menor detecció de les espècies minoritàries a l'extracte. Per contra, la baixa detecció de les espècies de TGs amb el mètode FIA, pot estar relacionada amb el tipus d'adducte monitoritzat, ja que com és ben sabut, els TGs formen adductes molt estables amb amoni ( $[M+NH_4]^+$ ) i mentre que la fase mòbil utilitzada en UHPLC-HRMS/MS incorpora el modificador i per tant s'identifiquen aquests adductes, amb el FIA-HRMS es reporten els adductes de sodi ( $[M+Na]^+$ ).

Amb el mètode UHPLC-HRMS/MS s'ha confirmat la presència d'àcids grassos amb nombre de carbonis senars com a substituents de PCs i PEs, suggerint, que les espècies que s'han reportat amb els dos mètodes que no inclouen fragmentació, en realitat són el resultat del sumatori de diverses espècies isobàriques i que una fracció pertany a GPs amb àcids grassos de

cadena senar. L'origen d'aquests àcids grassos, s'acostuma a relacionar amb les bactèries, tot i que una de les maneres d'obtenir-los és mitjançant oxidació  $\alpha$ , procés que té lloc als peroxisomes, i constitueix un pas important en el catabolisme dels àcids grassos ramificats i també dels de cadena llarga (Popkova et al., 2019). Aquest tipus d'oxidació s'ha detectat en models cel·lulars com els preadipocits 3T3-L1, que durant el procés de diferenciació a adipocits, tendeixen a acumular àcids grassos senars en totes les classes majoritàries de lípids (Su et al., 2004).

**Taula 3.2** Espècies lipídiques identificades en les cèl·lules ZFL mitjançant les tècniques analítiques FIA-HRMS i UHPLC-HRMS/MS. S'incorporen només les classes lipídiques que s'han detectat amb les dues tècniques (DG, LPC, LPE, PC, PE, PG, PI, PC-O, PE-O, PC-P, PE-P, PS, SM i TG) i no s'incorporen les classes lipídiques detectades únicament per UHPLC-HRMS/MS (AcCar, Cer, CE, DMPE, èter-TG i formes oxidades de TG i LPC).

	FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS	FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS
<b>DG</b>	DG 32:0			LPC(20:4)
	DG 32:1			LPC(20:5)
	DG 32:2			LPC(22:6)
	DG 34:1	DG(16:0_18:1)	<b>LPE</b>	LPE(16:0)
	DG 34:2	DG(16:0_18:2); DG(16:1_18:1)		LPE(17:0)
	DG 34:3			LPE 18:0
				LPE 18:1
		DG(17:1_18:1)		LPE(18:2)
	DG 36:1	DG(18:0_18:1)		LPE(20:2)
	DG 36:2	DG(18:0_18:2); DG(18:1_18:1)		LPE(20:3)
				LPE(20:4)
	DG 36:3	DG(18:1_18:2)		LPE(22:3)
	DG 36:4			LPE(22:5)
	DG 38:3	DG(16:0_22:3); DG(18:1_20:2)	<b>PC</b>	LPE(22:6)
	DG 38:4	DG(18:1_20:3)		PC(14:0_16:0)
	DG 38:5	DG(18:1_20:4)		PC(14:0_16:1)
		DG(18:1_22:3)		PC(15:0_16:0)
				PC(15:0_16:1)
	<b>LPC</b>		LPC(14:0)	PC 32:0
LPC 16:0		LPC(16:0)	PC 32:1	PC(16:0_16:1)
		LPC(16:1)	PC 32:2	PC(14:0_18:2);
		LPC(17:0)		PC(16:1_16:1)
		LPC(17:1)		PC(16:0_17:0)
		LPC(18:0)		PC(15:0_18:1);
LPC 18:1		LPC(18:1)		PC(16:0_17:1);
		LPC(18:2)		PC(16:1_17:0)
		LPC(18:3)		PC(15:0_18:2);
		LPC(19:0)		PC(16:1_17:1)
		LPC(20:1)		PC(16:0_18:0)
		LPC(20:2)	PC 34:1	PC(16:0_18:1)
		LPC(20:3)	PC 34:2	PC(16:0_18:2);

## DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS	FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS
	PC(16:1_18:1)	PC 40:7	PC(18:1_22:6)
PC 34:3	PC(16:0_18:3);	PC 40:8	PC(20:4_20:4)
	PC(16:1_18:2)	PE	PE(16:0_16:1)
PC 34:4			PE(16:1_16:1)
	PC(17:0_18:0)		PE(33:0)
	PC(17:0_18:1)		PE(33:1)
	PC(17:1_18:1)		PE(33:2)
	PC(15:0_20:3);	PE 34:1	PE(16:0_18:1)
	PC(17:1_18:2);	PE 34:2	PE(16:0_18:2);
	PC(17:2_18:1)		PE(16:1_18:1)
	PC(15:0_20:4)		PE(16:0_18:3);
	PC(18:0_18:0)		PE(16:1_18:2)
PC 36:1	PC(18:0_18:1)		PE(35:0)
PC 36:2	PC(18:0_18:2);		PE(17:0_18:1)
	PC(18:1_18:1)		PE(17:1_18:1)
PC 36:3	PC(16:0_20:3);		PE(35:3)
	PC(18:0_18:3);		PE(35:4)
	PC(18:1_18:2)	PE 36:1	PE(18:0_18:1)
PC 36:4	PC(16:0_20:4);	PE 36:2	PE(18:0_18:2);
	PC(16:1_20:3);		PE(18:1_18:1); PE(36:2)
	PC(18:2_18:2)	PE 36:3	PE(16:0_20:3);
PC 36:5	PC(16:0_20:5);		PE(18:1_18:2)
	PC(16:1_20:4)	PE 36:4	PE(16:0_20:4);
	PC(18:1_19:0)		PE(16:1_20:3);
	PC(17:0_20:2);		PE(18:1_18:3);
	PC(18:2_19:0)		PE(18:2_18:2)
	PC(17:0_20:3);		PE(16:0_20:5);
	PC(17:1_20:2)		PE(16:1_20:4)
	PC(17:0_20:4);		PE(36:6)
	PC(17:1_20:3)		PE(18:1_19:0)
	PC(17:0_20:5)		PE(37:2)
	PC(15:0_22:6)		PE(17:0_20:4);
	PC(18:0_20:1)		PE(17:1_20:3)
PC 38:2	PC(18:0_20:2);		PE(17:0_20:5)
	PC(18:1_20:1);		PE(38:1)
	PC(18:2_20:0)	PE 38:2	PE(18:0_20:2);
PC 38:3	PC(16:0_22:3);		PE(18:1_20:1)
	PC(18:0_20:3);	PE 38:3	PE(18:0_20:3);
	PC(18:1_20:2)		PE(18:1_20:2)
PC 38:4	PC(16:0_22:4);	PE 38:4	PE(18:0_20:4);
	PC(18:0_20:4);		PE(18:1_20:3)
	PC(18:1_20:3)	PE 38:5	PE(18:0_20:5);
PC 38:5	PC(18:1_20:4)		PE(18:1_20:4)
PC 38:6	PC(16:0_22:6);	PE 38:6	PE(16:0_22:6);
	PC(18:2_20:4)		PE(18:1_20:5);
	PC(17:0_22:6)		PE(18:2_20:4)
PC 40:4	PC(18:0_22:4);		PE(16:1_22:6)
	PC(18:1_22:3);		PE(19:0_20:3)
	PC(20:0_20:4)		PE(39:4)
PC 40:5	PC(18:1_22:4);		PE(39:5)
	PC(20:1_20:4);		PE(17:0_22:6)
	PC(20:2_20:3)		PE(39:7)
PC 40:6	PC(18:0_22:6);	PE 40:3	PE(18:0_22:3);
	PC(18:1_22:5);		PE(18:1_22:2)
	PC(20:2_20:4)	PE 40:4	PE(18:1_22:3);

# CAPÍTOL 3

FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS	FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS
	PE(20:1_20:3)		18:1/18:2)
PE 40:5	PE(20:2_20:3)	PC-P 36:3/PC-O 36:4*	PC(O-16:0/20:4); PC(O-16:1/20:3)
PE 40:6	PE(18:0_22:6); PE(18:1_22:5); PE(20:2_20:4); PE(20:3_20:3)	PC-P 36:4/PC-O 36:5*	PC(O-16:0/20:5); PC(O-16:1/20:4)
	PE(18:1_22:6); PE(20:2_20:5)	PC-P 38:2/PC-O 38:3*	PC(O-16:0/22:3); PC(O-18:0/20:3) PC(O-18:1/20:2)
	PE(18:2_22:6); PE(20:4_20:4)	PC-P 38:3/PC-O 38:4*	PC(O-18:0/20:4); PC(O-18:1/20:3)
	PE(42:3)	PC-P 38:4/PC-O 38:5*	PC(O-18:1/20:4)
	PE(42:4)	PC-P 38:5/PC-O 38:6*	PC(O-16:0/22:6); PC(O-18:1/20:5)
	PE(42:6)	PC-P 38:6/PC-O 38:7*	PC(O-16:1/22:6)
	PE(42:7)		PC(O-18:1/22:3); PC(O-20:0/20:4)
	PE(20:2_22:6); PE(20:3_22:5) PE(20:3_22:6)		PC(O-18:0/22:5); PC(O-20:1/20:4)
	PE(44:10)	PC-P 40:5/PC-O 40:6*	PC(O-18:0/22:6); PC(O-18:1/22:5)
	PE(44:11)	PC-P 40:6/PC-O 40:7*	PC(O-18:1/22:6)
<b>PG</b>			PC(O-22:1/20:5)
PG 32:0			PC(O-20:1/22:6)
PG 34:0			
PG 34:1	PG(16:0_18:1)	<b>PE-O</b>	PE-O 32:1
	PG(16:0_18:3)	PE-O 34:1	PE(O-34:1)
PG 36:0		PE-P 34:1/PE-O 34:2*	
PG 36:1		PE-P 34:2/PE-O 34:3*	
	PG(18:1_18:1)	PE-P 34:3/PE-O 34:4*	
	PG(16:0_20:3)	PE-O 36:1	PE(O-36:1)
	PG(18:1_18:2)	PE-P 36:1/PE-O 36:2*	
<b>PI</b>	PI(16:0_18:1)	PE-P 36:2/PE-O 36:3*	
PI 34:1	PI(34:2)	PE-P 36:3/PE-O 36:4*	
	PI(18:0_18:1)	PE-P 36:4/PE-O 36:5*	PE(O-36:5)
PI 36:2	PI(18:1_18:1)		PE(O-38:1)
PI 36:3			PE(O-38:2)
PI 36:4	PI(36:4)		PE(O-16:0/22:3)
PI 38:3	PI(18:0_20:3)	PE-P 38:3/PE-O 38:4*	
PI 38:4	PI(18:0_20:4); PI(18:1_20:3)	PE-P 38:4/PE-O 38:5*	PE(O-38:5)
PI 38:5	PI(18:1_20:4)	PE-P 38:5/PE-O 38:6*	PE(O-38:6)
<b>PC-O</b>			PE(O-40:3)
	PC(O-16:0/14:0)		PE-P 40:4/PE-O 40:5*
	PC(O-16:1/14:0)		PE-P 40:5/PE-O 40:6*
PC-O 32:0	PC(O-16:0/16:0)	<b>PC-P</b>	PC(P-16:0/15:0)
PC-O 32:1	PC(O-16:0/16:1)	PC-P 32:0/PC-O 32:1*	PC(P-16:0/16:0)
PC-P 32:1/PC-O 32:2*	PC(O-16:1/16:1)	PC-P 32:1/PC-O 32:2*	PC(P-16:0/16:1)
	PC(O-16:0/17:0)		PC(P-16:0/17:1)
	PC(O-16:0/17:1); PC(O-16:1/17:0) PC(O-18:1/15:0)	PC-P 34:1/PC-O 34:2*	PC(P-16:0/18:1)
PC-O 34:1	PC(O-18:1/16:0)	PC-P 34:2/PC-O 34:3*	PC(P-16:0/18:2)
PC-P 34:1/PC-O 34:2*	PC(O-16:1/18:1); PC(O-18:1/16:1)	PC-P 36:1/PC-O 36:2*	
PC-P 34:2/PC-O 34:3*	PC(O-16:0/18:3); PC(O-16:1/18:2)	PC-P 36:2/PC-O 36:3*	PC(P-18:0/18:2); PC(P-18:1/18:1)
	PC(O-18:1/17:0)	PC-P 36:3/PC-O 36:4*	PC(P-16:0/20:3)
	PC(O-18:1/17:1)	PC-P 36:4/PC-O 36:5*	
	PC(O-18:0/18:1)	PC-P 36:5	PC(P-16:0/20:5)
PC-P 36:1/PC-O 36:2*	PC(O-18:1/18:1)	PC-P 38:2/PC-O 38:3*	
PC-P 36:2/PC-O 36:3*	PC(O-16:0/20:3); PC(O-	PC-P 38:3/PC-O 38:4*	PC(P-18:0/20:3)

FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS	FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS
PC-P 38:4/PC-O 38:5*	PC(P-16:0/22:4); PC(P-18:0/20:4)		SM(d18:1/16:0)
PC-P 38:5/PC-O 38:6*	PC(P-18:1/20:4)		SM(d18:2/16:0)
PC-P 38:6/PC-O 38:7*	PC(P-18:1/20:5)		SM(d18:1/17:0)
	PC(P-18:0/22:4)		SM(d18:0/18:1)
PC-P 40:5/PC-O 40:6*	PC(P-18:1/22:4)		SM(d18:2/18:1)
PC-P 40:6/PC-O 40:7*	PC(P-18:0/22:6)		SM(d18:2/20:1)
	PC(P-18:1/22:6)		SM(d18:1/20:3)
	PC(P-22:1/20:4)		SM(d18:1/22:0)
	PE(P-16:0/16:1)		SM(d18:2/22:1)
<b>PE-P</b>	PE(P-16:0/18:1); PE(P-18:0/16:1)		SM(42:1)
	PE(P-16:0/18:1); PE(P-18:0/16:1)		SM(d18:1/24:1)
	PE(P-18:0/16:1)		SM(d18:2/24:1)
PE-P 34:1/PE-O 34:2*		<b>TG</b>	TG(8:0_8:0_8:0)
PE-P 34:2/PE-O 34:3*	PE(P-16:0/18:2); PE(P-18:1/16:1)		TG(10:0_8:0_8:0)
PE-P 34:3/PE-O 34:4*	PE(P-16:0/18:3)		TG(10:0_10:0_8:0)
	PE(P-18:1/17:0)		TG(12:0_12:0_8:0)
	PE(P-18:1/17:1)	TG 46:1	
	PE(P-18:1/17:2)	TG 48:1	
PE-P 36:1/PE-O 36:2*	PE(P-16:0/20:1); PE(P-18:0/18:1)	TG 48:2	
PE-P 36:2/PE-O 36:3*	PE(P-16:0/20:2); PE(P-18:1/18:1)	TG 48:3	
PE-P 36:3/PE-O 36:4*	PE(P-16:0/20:3)		TG(12:0_16:0_20:4);
PE-P 36:4/PE-O 36:5*	PE(P-16:0/20:4)		TG(14:1_16:0_18:3)
PE-P 36:5	PE(P-16:0/20:5)		TG(15:1_16:0_18:2)
	PE(P-18:0/20:1)	TG 50:1	TG(16:0_16:0_18:1)
	PE(P-16:0/22:2); PE(P-18:1/20:1) PE(P-20:0/18:2)	TG 50:2	TG(16:0_16:1_18:1)
PE-P 38:3/PE-O 38:4*	PE(P-16:0/22:3); PE(P-18:0/20:3) PE(P-18:1/20:2)	TG 50:3	TG(16:0_16:0_18:3);
PE-P 38:4/PE-O 38:5*	PE(P-16:0/22:4); PE(P-18:0/20:4) PE(P-18:1/20:3)		TG(16:1_16:1_18:1)
PE-P 38:5/PE-O 38:6*	PE(P-18:0/20:5); PE(P-18:1/20:4)		TG(16:0_16:1_18:3);
PE-P 38:6	PE(P-16:0/22:6); PE(P-18:1/20:5)		TG(14:1_16:0_20:4)
	PE(P-18:0/22:2)		TG(12:0_16:0_22:6);
	PE(P-18:0/22:3); PE(P-18:1/22:2)		TG(14:0_18:2_18:4);
PE-P 40:4/PE-O 40:5*	PE(P-18:1/22:3); PE(P-20:0/20:4)		TG(14:1_16:1_20:4)
PE-P 40:5/PE-O 40:6*	PE(P-18:0/22:5); PE(P-18:1/22:4)		TG(16:0_17:0_18:0)
	PE(P-18:0/22:6); PE(P-18:1/22:5)		TG(16:0_17:1_18:1)
	PE(P-18:1/22:6)		TG(15:0_18:1_18:2);
<b>PS</b>	PS 34:1		TG(17:1_17:1_17:1)
	PS 36:1		TG(16:0_18:0_18:1)
	PS 36:2		TG(16:0_18:1_18:1)
	PS(40:6)		TG(16:0_18:1_18:1)
			TG(16:0_18:1_18:1)
			TG(16:0_18:1_18:2)
			TG(16:0_18:1_18:3);
			TG(16:0_18:2_18:2);
			TG(16:1_18:1_18:2)
			TG(16:0_16:0_20:5);
			TG(16:0_16:1_20:4);
			TG(14:0_16:0_22:6);
			TG(16:0_16:1_20:5);
			TG(16:0_18:2_18:4)
<b>SM</b>	SM 16:0		TG(17:0_17:0_19:0)
	SM 24:1		TG(17:0_18:1_18:1)
	SM 24:4		TG(17:0_18:1_18:2)
	SM(d16:1/16:0)		TG(18:0_18:1_18:1)
		TG 54:3	TG(16:1_18:1_20:1);



FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS	FIA-HRMS	UHPLC-HRMS/MS
	TG(18:0_18:1_18:2)		TG(18:1_19:0_20:3)
TG 54:4	TG(18:0_18:1_18:3); TG(18:1_18:1_18:2)		TG(18:1_19:0_20:4) TG(17:0_18:2_22:4)
TG 54:5	TG(16:0_18:2_20:3); TG(18:1_18:2_18:2)		TG(17:0_18:2_22:5) TG(17:0_20:4_20:4)
	TG(16:0_16:0_22:6); TG(16:0_18:1_20:5); TG(16:0_18:2_20:4); TG(18:1_18:2_18:3)		TG(18:1_18:1_22:1) TG(18:0_20:0_20:4); TG(18:0_20:2_20:2); TG(18:1_18:1_22:2); TG(18:1_18:2_22:1)
	TG(16:1_18:2_20:5) TG(15:0_16:0_24:0) TG(18:1_18:1_19:0)		TG(18:0_20:1_20:4); TG(18:1_18:1_22:3) TG(18:0_18:0_22:6); TG(18:1_18:1_22:4)
	TG(17:0_18:0_20:3); TG(17:0_18:1_20:2); TG(17:1_18:1_20:1)		TG(18:0_18:1_22:6); TG(18:1_18:1_22:5); TG(18:1_18:2_22:6); TG(18:3_20:4_20:4)
	TG(17:0_18:0_20:4); TG(17:1_18:1_20:2) TG(17:0_18:1_20:4)		TG(18:1_18:1_22:6); TG(18:1_20:3_20:4) TG(16:0_20:4_22:5)
	TG(17:1_18:1_20:4) TG(17:0_18:2_20:5) TG(16:0_18:0_22:0)		TG(16:0_18:0_25:0) TG(18:0_18:1_23:0) TG(18:2_18:2_23:0)
	TG(16:0_18:1_22:0); TG(18:0_18:1_20:0); TG(18:0_18:1_20:4)		TG(18:0_18:1_24:0); TG(18:1_18:2_24:0) TG(18:0_20:4_22:6)
	TG(16:0_18:1_22:1) TG(18:0_18:0_20:3); TG(18:1_18:1_20:1); TG(18:1_18:2_20:3)		TG(18:1_18:2_24:1) TG(18:1_18:1_24:1) TG(16:0_20:4_24:0); TG(18:2_18:2_24:0)
	TG(18:0_18:1_20:3); TG(18:0_18:2_20:2) TG(16:0_18:1_22:4); TG(18:1_18:2_20:1); TG(18:1_18:2_20:2)		TG(18:1_20:0_22:4) TG(18:1_20:4_22:1) TG(18:1_20:2_22:5); TG(18:2_20:2_22:4)
	TG(16:0_18:1_22:5); TG(18:0_18:2_20:4)		TG(18:1_18:1_25:0) TG(18:1_18:3_26:0)
	TG(16:0_18:1_22:6); TG(18:1_18:2_20:4) TG(16:1_18:1_22:6)		TG(18:1_20:1_24:0) TG(18:0_20:4_24:0); TG(18:2_20:2_24:0)
	TG(16:1_18:3_22:5) TG(18:1_18:2_21:0); TG(18:1_19:0_20:2)		

\*Isòmers que no es poden diferenciar amb el mètode FIA-HRMS.

Amb la tècnica UHPLC-HRMS/MS s'ha obtingut la identificació dels lípids a nivell molecular, determinant la identitat dels àcids grassos substituents, però només en el 30% de les espècies s'ha aconseguit elucidar la posició d'unió dels substituents dins la molècula (sn-1, sn-2, sn-3). Una digestió enzimàtica amb PLA<sub>2</sub>, que a causa de la seva estèreo-especificitat, escindeix l'àcid gras que es troba en posició sn-2, i l'anàlisi per espectrometria de masses de l'extracte

digerit proporcionaria la informació de les posicions del acils (Popkova et al., 2019).

En resum, les tres tècniques analítiques tenen aplicabilitat en estudis lipídics, segons el seu objectiu. Els mètodes FIA-HRMS i UHPLC-HRMS, que són eines comparables i proporcionen informació similar sobre el perfil lipídic dels models cel·lulars, amb l'avantatge addicional en el mètode FIA de que l'anàlisi només dura 2 minuts per mostra, serien recomanables per al cribatge dels efectes de contaminants ambientals, permetent observar tendències a nivell de subclasse lipídica, mentre que si l'objectiu de l'estudi és la identificació de les espècies lipídiques, seria necessària la confirmació de la seva identitat per fragmentació i per tant el mètode UHPLC-HRMS/MS juntament amb un anàlisi no dirigit en el tractament de dades seria la tècnica recomanada.

### 3.2 MECANISMES D'ACCIÓ DELS XENOBIÒTICS ESTUDIATS

En aquesta Tesi s'ha investigat l'alteració del lipidoma de diversos models cel·lulars per exposició a compostos model (TBT, ATRA), additius plàstics (BPA, BPF, BADGE, BADGE·H<sub>2</sub>O, BADGE·2HCl) i el progestagen sintètic DRO.

#### **TBT:**

El TBT ha estat classificat com a obesògen ambiental en diferents models de mamífers i en peixos, motiu pel qual en aquesta Tesi s'ha escollit com a model per avaluar la resposta de les línies cel·lulars PLHC-1 i ZFL i el seu potencial com a eina per la detecció de disruptors lipídics al medi aquàtic (article II).

Les respostes de les dues línies cel·lulars a l'exposició a TBT són comparables. A la concentració més baixa testada (50 nM), en els dos models s'aprecia una lleu acumulació de TGs. Al augmentar la concentració d'exposició

a 100 nM, l'increment de TGs és més evident, ja que augmenta tant el nombre d'espècies com la concentració, i s'aprecia una acumulació de DGs. A 200 nM de TBT, s'observa l'acumulació de TGs i DGs, juntament amb una disminució d'èters de GPs, però mentre que en les cèl·lules PLHC-1 disminueixen les espècies PE-O/PE-P, en el model ZFL són les espècies PC-O/PC-P les que decreixen. Aquests efectes, responen a dos tipus d'alteracions diferenciades, per una banda, es proposa l'activació de la lipogènesis *de novo*, traduïda en l'acumulació simultània de TGs i dels seus precursors, DGs, en les cèl·lules, i per l'altra, la disminució de èters de GPs suggereix una resposta protectora enfront d'un augment de ROS.

En concordança amb els resultats aquí presentats, s'ha descrit que 1 nM TBT induïx el desenvolupament d'adipòcits en larves de peix zebra exposades durant 6 dies (Broeder et al., 2017), i que adults exposats durant 90 dies a 100 ng·L<sup>-1</sup> de TBT desenvolupen esteatosis al fetge, amb acumulació de TGs, colesterol i increment del contingut total de lípids (Zhang et al., 2016). El mecanisme pel qual el TBT induïx la diferenciació de preadipòcits a adipòcits i acumulació de TGs és mitjançant activació dels receptors PPAR $\gamma$  i RXR (Capitão et al., 2017). Així doncs, els resultats obtinguts en els models PLHC-1 i ZFL, permeten detectar l'efecte del TBT com a disruptor lipídic, promovent l'acumulació intracel·lular de GLs.

Els èter-GPs, específicament els plasmalògens (PC-Ps o PE-Ps), actuen com a protectors davant d'oxidació d'altres GPs, ja que, incorporen un enllaç vinil en posició *sn-1* que s'oxida en presència de ROS abans que els dobles enllaços de les cadenes dels àcids grassos. Diversos estudis han mostrat la capacitat del TBT d'induir la generació de ROS en el fetge de peixos exposats (Li et al., 2016). Així, es creu que aquesta disminució dels nivells de plasmalògens exerceix una funció protectora que permet mantenir els nivells basals de lípids de

membrana (*p.ex.* PCs, PEs) i assegurar la integritat cel·lular davant un excés de ROS.

**ATRA:**

El compost ATRA, pot alterar el metabolisme dels lípids mitjançant la seva unió als receptors RAR i PPAR  $\beta/\delta$ , els quals formen heterodímers amb RXR. En aquesta Tesi, les cèl·lules PLHC-1 exposades a 1  $\mu$ M ATRA, han mostrat acumulació d'un elevat nombre de TGs, en canvi, en el model ZFL aquest efecte no ha estat tant notori, ja que el nombre de TGs significativament alterats ha estat molt inferior. En la literatura disponible a dia d'avui, no s'han trobat gaires precedents en que s'investigui l'efecte de l'ATRA sobre el metabolisme de lípids d'organismes aquàtics, però els resultats es veuen corroborats per estudis realitzats en models de mamífers, en els que s'han detectat increment de gotes de lípids en preadipocits humans AML-1 (Morikawa et al., 2013), i tendència de les cèl·lules Ob1771 de ratolí a adquirir un fenotip del tipus adipòcit amb acumulació de TGs (Safonova et al., 1994).

La diferent sensibilitat de les cèl·lules podria ser deguda al contingut basal de TGs de les cèl·lules, ja que aquest era molt superior en PLHC-1 que en ZFL (Figura 1, article II), condició que s'ha relacionat amb l'origen carcinogen de les PLHC-1, i per tant és possible que l'alteració d'aquesta subclasse lipídica sigui més destacada en les cèl·lules que presenten un contingut basal de TGs superior (PLHC-1). Una altra hipòtesi que podria explicar la diferent resposta d'ambdós models cel·lulars és que l'efecte de l'ATRA sigui espècie-específica, conduint a diferències en l'expressió de receptors nuclears de les dues espècies. Així, a la literatura s'han descrit diferents mecanismes d'acció de l'àcid retinoic depenent del model biològic escollit, mentre que el compost va induir l'acumulació de lípids en embrions de peix zebra, va causar la inhibició de la diferenciació de preadiposits 3T3-L1 (Fraher et al., 2015).

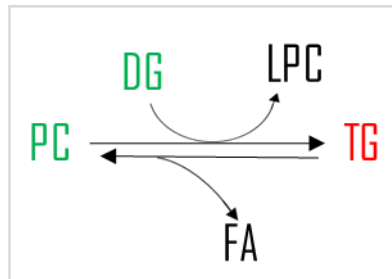
En la línia cel·lular ZFL, s'ha detectat una disminució de l'expressió del gen *dgat1a*, i per tant, una possible inhibició de la síntesi de TGs en aquest model cel·lular. Seria interessant, en un futur, estudiar l'expressió d'aquest i d'altres gens involucrats en el metabolisme de lípids en la línia cel·lular PLHC-1, però el fet de que les cèl·lules provinguin d'una espècie (*Poeciliopsis lucida*) sense el genoma seqüenciat ha dificultat realitzar l'estudi dins el marc d'aquesta Tesi.

### **Additius plàstics:**

L'efecte dels additius plàstics s'ha investigat en dos models cel·lulars: (a) Cèl·lules JEG-3 (article I), derivades d'un carcinoma de placenta humana; s'ha escrit la capacitat de diversos additius plàstics de creuar la barrera placentària, i ha estat detectats en placenta ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i en sang fetal ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Schönfelder et al., 2002), i (b) ZFL (article III), cèl·lules hepàtiques de peix zebra, per tal d'avaluar si la presència d'additius plàstics en sistemes aquàtics pot causar alteracions en el metabolisme de lípids en el fetge de peixos exposats, i com a conseqüència, desregular-ne el perfil lipídic.

Amb el model humà, JEG-3, s'ha estudiat l'efecte del BADGE i dos dels seus derivats,  $\text{BADGE}\cdot\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{BADGE}\cdot 2\text{HCl}$ . Tot i que s'anticipava una forta desregulació de l'homeòstasi dels lípids per l'acció del BADGE, ja que s'ha descrit que té la capacitat d'induir adipogènesi en cèl·lules mare mesenquimals MSCs i en preadipòcits 3T3-L1, després de 14 dies d'exposició a concentracions baixes (nM), l'alteració observada en les cèl·lules JEG-3 ha estat moderada. En aquesta Tesi s'ha detectat un augment significatiu d'algunes espècies de TGs, i la corresponent disminució de DGs i PCs. Aquestes desregulacions estan relacionades, ja que una via de síntesi de TGs és mitjançant la reacció de PCs i DGs, generant LPCs en el procés (Figura 3.5). En aquest cas no s'ha observat

l'augment de LPCs, possiblement degut al baix nombre d'espècies significativament desregulades.



**Figura 3.5** Una de les vies de síntesi de TGs, alterada en el model JEG-3 per exposició a BPA. Lípids en verd indiquen disminució dels nivells, vermell augment, i negre, no alteració respecte a les cèl·lules control.

Pel que fa al BADGE·H<sub>2</sub>O, aquest va causar una disminució de DGs i un augment de PEs a les cèl·lules JEG-3 exposades a 80 µM. La conversió de DGs a PEs possiblement és catalitzada per una activació de la colina/etanolamina fosfotransferasa (CEPT1) (Carrasco and Mérida, 2007). L'activació de la síntesi de PEs pot conduir a l'alteració de la funcionalitat de membrana mitjançant la disminució de la relació PCs/PEs (Li et al., 2006), hipòtesi recolzada per la disminució de la viabilitat cel·lular (~50%) a aquesta concentració (80 µM BADGE·H<sub>2</sub>O).

Sorprenentment, dels tres compostos derivats del BPA, testats en JEG-3, el BADGE·2HCl és el que produeix una major desregulació dels lípids a menor concentració d'exposició (20 µM), causant una forta disminució dels nivells cel·lulars de TGs i en menor mesura de DGs i PC-O/PC-Ps. De manera similar, aquest compost ha produït la disminució de TGs en les cèl·lules hepàtiques de peix PLHC-1, a 5 µM d'exposició (Pérez-Albaladejo et al. dades no publicades). En un primer moment, es va generar la hipòtesis de que el compost causava la hidròlisi de TGs, per això els seus nivells es veien reduïts. Durant l'anàlisi no es va detectar un augment simultani dels nivells d'àcids grassos lliures, però

aquests poden haver estat catabolitzats mitjançant oxidació  $\beta$ . Una altra possible hipòtesi és que el compost afavoreix el transport de TGs mitjançant la formació de lipoproteïnes.

Amb la finalitat d'indagar més en el fort efecte del BADGE-2HCl sobre el TGs, es va estudiar el seu efecte en el model ZFL, on es va estudiar l'expressió de gens involucrats en el metabolisme de lípids mitjançant RT-PCR. Sorprenentment, en aquest model cel·lular, l'exposició a BADGE-2HCl va generar una empremta lipídica, totalment diferent a la observada en els models JEG-3 i PLHC-1, es va detectar l'augment de TGs i les seves formes alquil i alquenil (TG-P, TG-O), augment de Cer-NDS, AcCar i SMs i la disminució de PCs i TG-O/TG-Ps amb elevat contingut de PUFAs. Mitjançant RT-PCR, es va detectar una disminució de l'expressió del gen *ppara*, que regula l'oxidació d'àcids grassos mitocondrials i peroxisòmics (Knight et al., 2005). Aquest resultat obre la hipòtesi de si el mecanisme d'acció d'aquest compost és a través de *ppara* i seria interessant estudiar l'expressió del gen en els altres dos models cel·lulars.

L'efecte dels additius plàstics BPA i el seu anàleg BPF es va investigar en la línia cel·lular ZFL. El BPA ha estat classificat com a obesògen en models de mamífers, però en models aquàtics, la seva acció sobre el metabolisme de lípids mostra controvèrsia. S'ha descrit que el contingut de TGs en fetge de *Gobiocypris rarus* exposats a BPA, pot augmentar o disminuir en funció de si en el balanç pren més importància la síntesis de TGs *de novo*, o el catabolisme d'àcids grassos (Guan et al., 2016, 2019). A més també s'han detectat respostes no monotòniques en la síntesis de lípids total en el fetge de peix zebra exposats durant 21 dies a diferents concentracions de BPA (Santangeli et al., 2018); a la dosis baixa i alta, el contingut de lípids total va incrementar respecte al control, ja que les vies de síntesi d'àcids grassos es trobaven

activades, mentre que a la dosi mitja, el contingut de lípids no va variar respecte al control, degut a una menor síntesi i oxidació d'àcids grassos. De manera similar, en aquesta Tesi (article III), el BPA ha causat una resposta no monotònica en el contingut de TGs de les cèl·lules ZFL; augmentant el contingut de TGs en cèl·lules exposades a 5 i 50  $\mu\text{M}$  de BPA, però no a 20  $\mu\text{M}$ . Per contra, el mateix estudi realitzat en cèl·lules PLHC-1 exposades a les mateixes concentracions (5 i 20  $\mu\text{M}$ ) de BPA no van causar canvis en el contingut de TGs (Pérez-Albaladejo et al. dades no publicades).

Pel que fa a l'exposició a BPF, les alteracions que produeix a nivell lipídic són diferents a les del seu anàleg BPA. Recentment, s'ha reportat que el BPF causa una disminució de l'expressió de gens involucrats en la diferenciació de preadipocits en el model 3T3-L1, mentre que el BPA els augmentava (Drobna et al., 2019). En el model ZFL, després de l'exposició a 50  $\mu\text{M}$  BPF s'observa una disminució de TGs altament insaturats (4-10 dobles enllaços), TGs oxidats, èter-TGs i algunes espècies de PEs i PCs, i un augment de Cer-NDS i TGs amb poques insaturacions (formats majoritàriament pels àcids grassos 18:1/2). Aquests resultats estan en concordança amb les alteracions lipídiques observades en les cèl·lules PLHC-1 exposades a 100  $\mu\text{M}$  BPF, disminució de TGs insaturats (de 4 a 7 dobles enllaços), GPs com PEs, PIs i PSs i èters de PCs i PEs i augment de TGs amb poques insaturacions (1-3 dobles enllaços) (Pérez-Albaladejo et al. dades no publicades). Sent un compost que indueix la generació de ROS (Figura 1, article III), és raonable pensar que les cèl·lules estan utilitzant els àcids grassos provinents dels TGs més insaturats per la síntesi de GPs i així mantenir els lípids de membrana a nivells funcionals per assegurar la integritat de membrana de les cèl·lules que podria veure's afectada per l'excés de ROS.

A més, l'anàlisi no dirigit utilitzant la tècnica UHPLC-HRMS/MS, ha permès la detecció d'alteracions de classes de lípids que no es contemplaven amb



l'aproximació dirigida, ja que aquestes espècies no s'havien inclòs a la base de dades de referència. Així, amb aquesta tècnica s'han detectat alteracions comuns en el perfil lipídic de les ZFL exposades a BPA, BPF i BADGE·2HCl, com són l'increment dels nivells de dihidroceramides (CER-NDS), i de éter-TGs. L'augment de les CER-NDS, lípids implicats en processos de proliferació cel·lular i autofàgia (Siddique et al., 2015), suggereix que aquests tres compostos són capaços d'inhibir la dihidroceramida desaturasa 1 (DES1), que catalitza la seva conversió a CER durant el procés de síntesi de SPs *de novo*. A més, els nivells alts en èters-TGs es poden relacionar amb processos de tumorigenicitat (Snyder and Wood, 1969; Lin et al., 1978).

Amb tot, queda de manifest que els diferents additius plàstics estudiats presenten mecanismes d'acció diversos que condueixen a diferents tipus d'alteracions lipídiques. Aquests resultats ratifiquen la controvèrsia que es troba en la literatura sobre l'efecte que té el BPA en el metabolisme dels lípids, ja que també s'han detectar respostes diferents segons el model cel·lular i la concentració del additius plàstics. Per això es creu que seria interessant crear la informació lipídica obtinguda fins al moment amb altres estudis òmics (*p. ex.* proteòmica, transcriptòmica, metabolòmica) que permetin explicar d'on deriven les diferències i crear un mapa més exhaustiu de les vies metabòliques alterades.

### **DRO:**

Els fàrmacs són compostos dissenyats per ser biològicament actius, i el seu destí al medi aquàtic, genera la necessitat de caracteritzar els efectes sobre la biota habitant aquest sistema ja que a part, l'abocament d'aquests compostos al medi és continu i els organismes s'hi troben exposats de manera crònica. Així

doncs, l'estudi realitzat exemplifica la utilitat de la lipidòmica en models *in vitro* per l'estudi de mecanismes d'acció de fàrmacs en organismes aquàtics.

L'estudi temporal de l'efecte de la DRO sobre el lipidoma de les cèl·lules PLHC-1 ha permès detectar una acumulació significativa dels TGs més insaturats (Figures 3 i 4, article IV), sobretot en les cèl·lules exposades a 10  $\mu$ M durant 48 h. A la literatura només s'ha trobat un precedent que investigui l'efecte de la DRO sobre el metabolisme de lípids d'organismes aquàtics, però investigaven l'alteració que produïa exposició crònica a una mescla de progestàgens (DRO, progesterona i levonogestrel) en els lípids presents al sèrum de *Rutilus rutilus*, conclouent que aquests no es veien alterats (Maasz et al., 2017). En canvi, en humans, concretament en dones sanes administrades amb contraceptius orals que contenien estradiol i drospirenona, es va observar un augment dels nivells de TGs presents al sèrum (Kowalska et al., 2017). La informació obtinguda amb l'anàlisi lipidòmic ha permès detectar que els TGs alterats, en el cas de les PLHC-1 són els que presenten elevats continguts en PUFAs, i tot i que no es coneixen les afectacions a nivell fisiològic d'aquesta alteració lipídica, s'ha reportat que l'administració d'una dieta rica en greixos a ratolins resistent a desenvolupar obesitat mostraven acumulació de TGs amb més de quatre insaturacions al fetge (Nam et al., 2015). L'augment de TGs amb contingut en PUFAs ha causat l'augment de la relació TG/DG, índex que s'ha vist incrementat també en fetges patint esteatosis (Puri et al., 2007).

### **3.3 EMPREMES LIPÍDIQUES DE CONTAMINACIÓ AMBIENTAL DETECTADES MITJANÇANT ESTUDI DE CAMP**

En l'apartat anterior s'han descrit diferents empremtes lipídiques de contaminants ambientals detectades a nivell cel·lular. Per validar l'ús dels models cel·lulars com a eina en la detecció d'alteracions lipidòmiques, s'ha

realitzat un estudi de camp amb organismes exposats a mescles complexes de contaminants en el qual s'ha comparat el lipidoma del teixit muscular de dues espècies de peixos del riu Ripoll mostrejats en zones de referència i en zones afectades per deposicions d'aigua provinents de plantes de depuració (article V). El tractament de les dades obtingudes en l'anàlisi de lípids s'ha dut a terme des de dos enfocaments diferents, un no dirigit utilitzant el programari *online* XCMS i un de dirigit utilitzant una base de dades de referència generada a partir de LIPIDMAPS, que aplicades complementàriament han permès detectar alteracions dels perfils lipídics dels peixos de les zones contaminades.

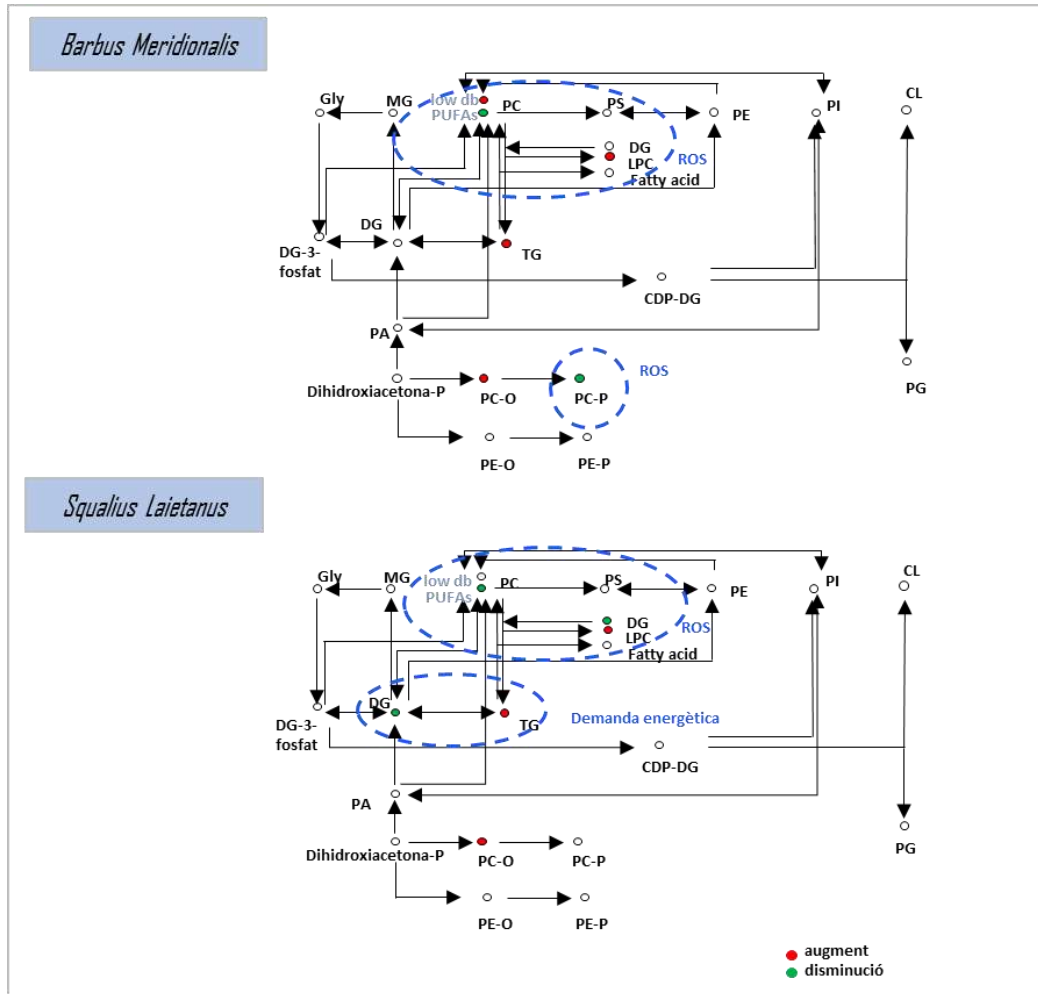
A la [Figura 3.6](#) s'han plasmat les principals alteracions observades en el lipidoma de les dues espècies de peixos en les zones contaminades. El metabolisme del colesterol, segueix una altra via, i per tant no s'ha inclòs a la figura, però l'augment del nivell d'algunes espècies de CEs és una alteració comú tant en *B. meridionalis* com en *S. laietanus*, i un possible indicador de que l'exposició a xenobiòtics està desregulant el metabolisme del colesterol, i s'indueix un emmagatzematge de colesterol en gotes de lípids en la seva forma esterificada (CEs) en el múscul dels peixos exposats (Simons and Ikonen, 2000).

Una de les alteracions observades en el lipidoma de les dues espècies de peixos, és la hidròlisi de PCs amb elevat contingut en PUFAs, possiblement mitjançant l'enzima PLA<sub>2</sub>, i el consegüent augment en els nivells de LPCs, que en el cas del *S. laietanus*, a més venia acompanyat per un consum de DGs i síntesi de TGs. De manera similar, un estudi recent, on s'investigava l'efecte d'efluents de descarregues urbanes sobre el metabolisme de lípids en el fetge de lluç de riu, s'ha descrit una correlació entre el ratio LPCs/PCs amb elevats continguts en PUFAs i l'exposició al compost èter difenílic polibromat (Dépatie et al., 2020). L'alteració d'aquesta ruta metabòlica és un clar indicatiu d'estrès

oxidatiu, i ja s'havia detectat en cèl·lules ZFL exposades a BADGE-2HCl i a BPF (article III), compostos que indueixen la generació de ROS.

Una altra alteració observada en el lipidoma dels *B. meridionalis* de les zones contaminades que recolza la hipòtesi de l'estrès oxidatiu és la disminució de les espècies PC-Ps. Aquestes espècies de lípids s'han descrit com a espècies protectores enfront d'un atac oxidatiu. Aquesta empremta lipídica també s'ha detectat en els models cel·lulars utilitzats en aquesta Tesi, concretament, en les cèl·lules PLHC-1 i ZFL exposades a TBT (article II) i en les JEG-3 exposades a BADGE i els seus derivats (article I).

Per tant, l'estudi de camp confirma que és possible detectar, mitjançant l'estudi lipidòmic, una empremta de l'exposició a contaminants en el múscul de peixos associada a processos d'estrès oxidatiu induït per l'exposició a mesclades de contaminants, així com una alteració del metabolisme del colesterol, i que els models cel·lulars utilitzats són capaços de descriure diferents mecanismes d'acció de contaminants ambientals de manera similar al que s'observaria en estudis *in vivo*.



**Figura 3.6** Rutes del metabolisme dels lípids alterades en el teixit muscular de *Barbus Meridionalis* i *Squalius Laietanus* mostrejats en les zones contaminades, respecte a les zones de referència. Nivells de lípids que han augmentat s'indiquen en vermell mentre els que han disminuït, en verd.

A més, aquest estudi posa de manifest la possibilitat de desenvolupar mètodes no invasius per la caracterització del lipidoma d'organismes vius per mitjà de biòpsies i evitar el sacrifici dels peixos.

### 3.4 IMPLEMENTACIÓ DELS ESTUDIS LIPIDÒMICS EN PROCESSOS D'AVALUACIÓ DEL RISC QUÍMIC

En aquest darrer apartat es discuteix la idoneïtat d'utilitzar les tècniques lipidòmiques utilitzades en aquesta Tesi amb finalitats reguladores, per a l'avaluació del risc químic tant en un context ecotoxicològic, com en un de salut humana.

En l'actualitat els requisits normatius per l'avaluació del risc químic involucren estudis *in vivo*, amb un cost i un temps d'execució molt elevats, però la necessitat de valorar un nombre cada vegada més elevat de compostos químic tot reduint l'ús d'animals, els costos i el temps necessari per realitzar els assajos toxicològics, està generant la necessitat d'avançar cap a enfocaments més predictius per l'avaluació del risc.

Per una banda, hi ha la proposta de la creació dels *adverse outcome pathways* (AOPs), que consisteix en un marc dissenyat per vincular conceptualment un esdeveniment d'inici molecular (MIE), a través d'una sèrie d'esdeveniments clau (KEs) (que abasten diversos nivells d'organització biològica com les respostes a nivell cel·lular, d'òrgan i d'individu), per donar lloc a un resultat advers (AO) (Ankley et al., 2010; Collier et al., 2016). La creació d'aquests AOPs proporciona una millor comprensió de quins són els vincles entre els MIEs i els AOs, que són de vital importància en un context de regulació, i permet predir els efectes de compostos que tenen un mateix MIEs o comparteixen KIEs. De fet, una de les funcions dels AOPs és l'establiment del que s'ha anomenat *read-across*, classificació de substàncies estructuralment anàlogues o amb propietats compartides per l'obtenció d'una hipòtesis sobre l'activitat del nou producte químic, és a dir, predir la seva toxicitat sense proves experimentals.

Per altra banda, des del REACH, hi ha la voluntat d'incrementar el nombre d'assajos *in silico*, *in vitro* i *ex vivo* en detriment dels assajos *in vivo* per a la presa de decisions reglamentàries. I tot i que de moment els assajos *in vitro* no s'accepten com a substituïts directes a la generació d'informació *in vivo*, comencen a aparèixer iniciatives, com el programa de cribratge de disruptors endocrins de l'agència de protecció mediambiental d'Estats Units (US EPA) (<https://www.epa.gov>), que proposa l'ús d'una bateria d'assajos *in vitro* per decidir quines substàncies són prioritàries per ser testades en models *in vivo* (Brockmeier et al., 2017). En aquest context, la implementació de les tècniques lipidòmiques utilitzant cultius cel·lulars com a model biològic pot tenir un paper clau a l'hora d'identificar aquests MIEs i KEs a nivell molecular, ajudant a omplir els buits de coneixement que hi ha fins al moment. A més, la seva utilització per portar a generar hipòtesis, a fer un ús més eficaç de les dades mecanicistes, i a l'establiment de relacions amb els efectes tòxics.

Per això, és de vital importància la validació dels mètodes de cribratge de disruptors lipídics, i com indica l'Organització de Cooperació i Desenvolupament Econòmic (OECD), dedicat a la validació de mètodes amb finalitat de regulació, la validació d'un mètode de cribratge per detectar disruptors lipídics necessària, primordialment, de dues etapes, una validació intralaboratori i una d'interlaboratori. Fins a dia d'avui, tinc coneixement de la realització, únicament, de dos exercicis interlaboratoris per l'anàlisi de lípids. El primer, al 2016, va consistir en la repetició d'anàlisis lipidòmics no dirigits en pacients amb malaltia coronària calcificada realitzats per dos centres independents (Djekic et al., 2016), i en el segon, al 2017, es va realitzar un exercici de comparació interlaboratori per anàlisis lipidòmics utilitzant el material de referència estàndard (SRM) 1950 –Metabòlits en plasma humà congelat–, disponible comercialment (NIST), en el que van participar 31

laboratoris diferents, cadascun d'ells utilitzant un flux de treball lipidòmica diferent (Bowden et al., 2017). Així doncs, amb aquests precedents tan escassos, i degut a la importància que estan prenent els estudis lipidòmics, s'haurien de continuar realitzant aquests tipus d'exercicis, però amb la voluntat de cobrir altres matrius biològiques d'interès, si en un futur es volen proposar els estudis lipidòmics amb finalitats reguladores.





# CONCLUSIONS



La utilització de diferents tècniques analítiques ha permès estudiar el lipidoma de diversos models biològics i detectar alteracions del perfil lipídic per exposició, tant a compostos aïllats, com a mesclades ambientals complexes. A continuació es mostren les conclusions que deriven de la realització d'aquesta Tesi:

- I. Les tècniques analítiques basades en espectrometria de masses d'alta resolució (FIA-HRMS i UHPLC-HRMS) han permès la identificació d'un ampli ventall d'espècies lipídiques. L'ús de fragmentació per espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) ha possibilitat la confirmació de la identitat dels lípids i la diferenciació d'espècies isobàriques, mentre que el mètode FIA acoblat a bioassaigs cel·lulars representa una metodologia ràpida i eficaç per al cribratge de disruptors lipídics.
- II. L'anàlisi del lipidoma de cèl·lules de placenta exposades a BADGE i els seus derivats mostra una major toxicitat d'aquests compostos en comparació al BPA i la capacitat d'alterar el metabolisme de lípids de BADGE i BADGE·2HCl a concentracions baixes ( $\mu\text{M}$ ). El treball posa de manifest la necessitat d'investigar i/o regular l'exposició a aquests compostos al menys amb la mateixa intensitat amb la que s'ha minimitzat i regulat l'exposició a BPA.
- III. L'exposició de les línies cel·lulars PLHC-1 i ZFL a compostos model com el TBT i l'ATRA, ha permès detectar una inducció significativa dels nivells cel·lulars de lípids neutres i la desregulació de gens que codifiquen enzims involucrats en la lipogènesis (*fasn*, *scd*, *elovl6*). A més, l'elevada

resposta del gen *cyp26b1*, deixa de manifestar la idoneïtat del model ZFL per detectar compostos capaços d'alterar el metabolisme de retinoides. Es proposa l'ús de les línies cel·lulars PLHC-1 i ZFL com a models *in vitro* per el cribratge d'alteradors lipídics en sistemes aquàtics.

- IV. L'additiu plàstic BPA actua com a 'obesògen' en cèl·lules ZFL, al induir l'acumulació de TGs a 5 i 50  $\mu\text{M}$ . Per contra, el seu substitut BPF, causa una disminució de TGs i PCs poliinsaturats, mostrant un patró indicatiu d'estrès oxidatiu.
- V. El progestagen sintètic drospironona desregula el metabolisme dels lípids neutres, augmentant la relació TGs/DGs en cèl·lules PLHC-1 a una concentració intracel·lular de drospironona de pocs  $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteïna. El treball mostra per primera vegada la interacció d'aquest fàrmac amb el metabolisme de lípids en cèl·lules hepàtiques d'una espècie no diana.
- VI. L'estudi lipidòmic ha permès la detecció d'empremtes lipídiques associada a processos d'estrès oxidatiu i alteracions en el metabolisme del colesterol en el múscul de peixos exposats a mesclures complexes de contaminants, mostrant el potencial de la lipidòmica en estudis mediambientals per a la detecció d'alteracions a nivell molecular.

# ***CONCLUSIONS***



The use of different analytical techniques has allowed to investigate the lipidome of several biological models and the detection of alterations in the lipid profile by exposure to both isolated compounds and complex environmental mixtures. From the scientific research performed in this Thesis, the following conclusions can be drawn:

- I. The analytical techniques based on high resolution mass spectrometry (FIA-HRMS and UHPLC-HRMS) have allowed the identification of a wide range of lipid species. The use of fragmentation in tandem mass spectrometry (MS/MS) has enabled the confirmation of lipid identities and the differentiation of isobaric species, while the FIA method coupled to cellular bioassays represents a fast and effective methodology for the screening of lipid disruptors.
- II. The analysis of placenta cells lipidoma exposed to BADGE and its derivatives shows a higher toxicity of these compounds compared to BPA and the ability of BADGE and BADGE·2HCl to alter the lipid metabolism at low concentrations ( $\mu\text{M}$ ). The work shows the need to investigate and/or regulate exposure to these compounds at least as intensely as exposure to BPA has been minimised and regulated.
- III. Exposure of PLHC-1 and ZFL cells to the model compounds TBT and ATRA has allowed the detection of a significant induction of neutral lipids in exposed cells and the deregulation of genes encoding enzymes involved in lipogenesis (*fasn*, *scd*, *elovl6*). Moreover, the high response of the *cyp26b1* gene shows the suitability of ZFL cells to detect compounds that alter retinoid metabolism. PLHC-1 and ZFL cell lines are proposed as *in vitro* models for the screening of lipid disruptors in aquatic systems.



- IV. The plastic additive BPA acts as an 'obesogen' in ZFL cells by inducing the accumulation of TGs at 5 and 50  $\mu\text{M}$ . On the other hand, its substitute BPF induces a decrease in TGs and polyunsaturated PCs, showing a pattern indicative of oxidative stress.
- V. The synthetic progestagen drospirenone deregulates the metabolism of neutral lipids, increasing the ratio TGs/DGs in PLHC-1 cells at an intracellular concentration of drospirenone of a few  $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein. The work shows for the first time the interaction of this drug with the metabolism of lipids in hepatic cells of a non-target species.
- VI. The lipidomic study has allowed the detection of lipid fingerprints associated with oxidative stress processes and alterations in the metabolism of cholesterol in the muscle of fish exposed to complex mixtures of contaminants, showing the potential of lipidomics in environmental studies for the detection of alterations at the molecular level.

## Referències

- Adusumilli, R., Mallick, P., 2017. Data Conversion with ProteoWizard msConvert. *Proteomics methods Protoc.* 1550, 339–368.
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–741.
- Antizar-Ladislao, B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environ. Int.* 34, 292–308.
- Avar, P., Maasz, G., Takács, P., Lovas, S., Zrinyi, Z., Svigruha, R., Takátsy, A., Tóth, L.G., Pirger, Z., 2016. HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Test. Anal.* 8, 124–128.
- Baillie-Hamilton, P.F., 2002. Chemical toxins: A hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J. Altern. Complement. Med.* 8, 185–192.
- Bamba, T., Lee, J.W., Matsubara, A., Fukusaki, E., 2012. Metabolic profiling of lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1250, 212–219.
- Berry, D.C., Noy, N., 2009. All-trans-Retinoic Acid Represses Obesity and Insulin Resistance by Activating both Peroxisome Proliferation-Activated Receptor  $\beta/\delta$  and Retinoic Acid Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3286–3296.
- Blanco, M., Fernandes, D., Medina, P., Blázquez, M., Porte, C., 2016. Drospirenone intake alters plasmatic steroid levels and cyp17a1 expression in gonads of juvenile sea bass. *Environ. Pollut.* 213, 541–548.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37.
- Bonet, M.L., Oliver, J., Pico, C., Felipe, F., Ribot, J., Cinti, S., Palou, A., 2000. Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *J. Endocrinol.* 166, 511–517.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Palou, A., 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 177–189.
- Bowden, J.A., Heckert, A., Ulmer, C.Z., Jones, C.M., Koelmel, J.P., Abdullah, L., Ahonen, L., Alnouti, Y., Armando, A.M., Asara, J.M., Bamba, T., Barr, J.R., Bergquist, J., Borchers, C.H., Brandsma, J., Breitkopf, S.B., Cajka, T., Cazenave-Gassiot, A.,

## REFERÈNCIES

---

- Checa, A., Cinel, M.A., Colas, R.A., Cremers, S., Dennis, E.A., Evans, J.E., Fauland, A., Fiehn, O., Gardner, M.S., Garrett, T.J., Gotlinger, K.H., Han, J., Huang, Y., Neo, A.H., Hyötyläinen, T., Izumi, Y., Jiang, Hongfeng, Jiang, Houli, Jiang, J., Kachman, M., Kiyonami, R., Klavins, K., Klose, C., Köfeler, H.C., Kolmert, J., Koal, T., Koster, G., Kuklenyik, Z., Kurland, I.J., Leadley, M., Lin, K., Maddipati, K.R., McDougall, D., Meikle, P.J., Mellett, N.A., Monnin, C., Moseley, M.A., Nandakumar, R., Oresic, M., Patterson, R., Peake, D., Pierce, J.S., Post, M., Postle, A.D., Pugh, R., Qiu, Y., Quehenberger, O., Ramrup, P., Rees, J., Rembiesa, B., Reynaud, D., Roth, M.R., Sales, S., Schuhmann, K., Schwartzman, M.L., Serhan, C.N., Shevchenko, A., Somerville, S.E., St John-Williams, L., Surma, M.A., Takeda, H., Thakare, R., Thompson, J.W., Torta, F., Triebel, A., Trötz Müller, M., Ubhayasekera, S.J.K., Vuckovic, D., Weir, J.M., Welti, R., Wenk, M.R., Wheelock, C.E., Yao, L., Yuan, M., Zhao, X.H., Zhou, S., 2017. Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950-Metabolites in frozen human plasma. *J. Lipid Res.* 58, 2275–2288.
- Brockmeier, E.K., Hodges, G., Hutchinson, T.H., Butler, E., Hecker, M., Tollefsen, K.E., Garcia-Reyero, N., Kille, P., Becker, D., Chipman, K., Colbourne, J., Collette, T.W., Cossins, A., Cronin, M., Graystock, P., Gutsell, S., Knapen, D., Katsiadaki, I., Lange, A., Marshall, S., Owen, S.F., Perkins, E.J., Plaistow, S., Schroeder, A., Taylor, D., Viant, M., Ankley, G., Falciani, F., 2017. The role of omics in the application of adverse outcome pathways for chemical risk assessment. *Toxicol. Sci.* 158, 252–262.
- Broeder, M.J. Den, Moester, M.J.B., Kamstra, J.H., Cenijn, P.H., Legler, J., 2017. Altered Adipogenesis in Zebrafish Larvae Following High Fat Diet and Chemical Exposure Is Visualised by Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 894.
- Capitão, A., Lyssimachou, A., Filipe, L., Castro, C., Santos, M.M., 2017. Obesogens in the aquatic environment: an evolutionary and toxicological perspective. *Environ. Int.* 106, 153–169.
- Carrasco, S., Mérida, I., 2007. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* 32, 27–36.
- Chamorro-García, R., Kirchner, S., Li, X., Janesick, A., C. Casey, S., Chow, C., Blumberg, B., 2012. Bisphenol A Diplycidyl Ether Induces Adipogenic Differentiation of Multipotent Stomal Stem Cells through a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma-Independent Mechanism. *Environ. Health Perspect.* 120, 984–9.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., Mangelsdorft, D.J., 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the x-files. *Science (80- )*. 294, 1866–1870.
- Coleman, R.A., Haynes, E.B., 1987. Synthesis and release of fatty acids by human

- trophoblast cells in culture. *J. Lipid Res.* 28, 1335–1341.
- Collier, Z.A., Gust, K.A., Gonzalez-Morales, B., Gong, P., Wilbanks, M.S., Linkov, I., Perkins, E.J., 2016. A weight of evidence assessment approach for adverse outcome pathways. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 75, 46–57.
- Criscuolo, A., Zeller, M., Cook, K., Angelidou, G., Fedorova, M., 2019. Rational selection of reverse phase columns for high throughput LC–MS lipidomics. *Chem. Phys. Lipids* 221, 120–127.
- Delhaes, F., Giza, S.A., Koreman, T., Eastabrook, G., McKenzie, C.A., Bedell, S., Regnault, T.R.H., de Vrijer, B., 2018. Altered maternal and placental lipid metabolism and fetal fat development in obesity: Current knowledge and advances in non-invasive assessment. *Placenta* 69, 118–124.
- Dépatie, C., Houde, M., Verreault, J., 2020. Environmental exposure of northern pike to a primary wastewater effluent: Impact on the lipidomic profile and lipid metabolism. *Aquat. Toxicol.* 221, 105421.
- Djekic, D., Pinto, R., Vorkas, P.A., Henein, M.Y., 2016. Replication of LC–MS untargeted lipidomics results in patients with calcific coronary disease: An interlaboratory reproducibility study. *Int. J. Cardiol.* 222, 1042–1048.
- Drobna, Z., Talarovicova, A., Schrader, H.E., Fennell, T.R., Snyder, R.W., Rissman, E.F., 2019. Bisphenol F has different effects on preadipocytes differentiation and weight gain in adult mice as compared with Bisphenol A and S. *Toxicology* 420, 66–72.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H., Glass, C., Merrill, A., Murphy, R., Raetz, C., Russell, D., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Van Nieuwenhze, M., White, S., Witztum, J., Dennis, E., 2005. A Comprehensive Classification System for Lipids. *Handb. Biochem. Mol. Biol. Fourth Ed.* 46, 839–862.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J.O., Dennis, E.A., 2009. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 50, S9–S14.
- Farwanah, H., Kolter, T., Sandhoff, K., 2011. Mass spectrometric analysis of neutral sphingolipids: Methods, applications, and limitations. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 854–860.
- Farwanah, H., Wirtz, J., Kolter, T., Raith, K., Neubert, R.H.H., Sandhoff, K., 2009. Normal phase liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for separation, detection and mass spectrometric profiling of neutral sphingolipids and cholesterol. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 2976–2982.

- Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W., 2006. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid Res.* 45, 120–159.
- Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: Assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. Vitro.* 15, 477–488.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stranley, H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fraher, D., Ellis, M.K., Morrison, S., McGee, S.L., Ward, A.C., Walder, K., Gibert, Y., 2015. Lipid abundance in zebrafish embryos is regulated by complementary actions of the endocannabinoid system and retinoic acid pathway. *Endocrinology* 156, 3596–3609.
- Golovko, O., Šauer, P., Fedorova, G., Kroupová, H.K., Grabic, R., 2018. Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. *Sci. Total Environ.* 621, 1066–1073.
- Gorrochategui, E., Casas, J., Pérez-Albaladejo, E., Jáuregui, O., Porte, C., Lacorte, S., 2014. Characterization of complex lipid mixtures in contaminant exposed JEG-3 cells using liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11907–11916.
- Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Zaima, N., Setou, M., 2011. Imaging mass spectrometry for lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 961–969.
- Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C.H., Kurczyk, M.E., Benton, H.P., Rinehart, D., Nguyen, T., Ray, J., Kuehl, J., Arevalo, B., Westenskow, P.D., Wang, J., Arkin, A.P., Deutschbauer, A.M., Patti, G.J., Siuzdak, G., 2014. Interactive XCMS online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Anal. Chem.* 86, 6931–6939.
- Groothuis, F.A., Heringa, M.B., Nicol, B., Hermens, J.L.M., Blaauboer, B.J., Kramer, N.I., 2015. Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. *Toxicology* 332, 30–40.
- Grün, F., Blumberg, B., 2006. Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147, 50–55.
- Grzybek, M., Palladini, A., Alexaki, V.I., Surma, M.A., Simons, K., Chavakis, T., Klose, C., Coskun, Ü., 2019. Comprehensive and quantitative analysis of white and brown adipose tissue by shotgun lipidomics. *Mol. Metab.* 22, 12–20.
- Guan, Y., Gao, J., Zhang, Y., Chen, S., Yuan, C., Wang, Z., 2016. Effects of bisphenol A on lipid metabolism in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Comp. Biochem. Physiol.*

## REFERÈNCIES

---

- Part - C Toxicol. Pharmacol.* 179, 144–149.
- Guan, Y., Zhang, T., He, J., Jia, J., Zhu, L., Wang, Z., 2019. Bisphenol A disturbed the lipid metabolism mediated by sterol regulatory element binding protein 1 in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Aquat. Toxicol.* 207, 179–186.
- Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., King, R.G., 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* 114, 397–407.
- Haimi, P., Uphoff, A., Hermansson, M., Somerharju, P., 2006. Software tools for analysis of mass spectrometric lipidome data. *Anal. Chem.* 78, 8324–8331.
- Han, X., Gross, R.W., 2001. Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 295, 88–100.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150.
- Hart, G.W., Copeland, R.J., 2010. Glycomics hits the big time. *Cell* 143, 672–676.
- Hartler, J., Trötz Müller, M., Chitraju, C., Spener, F., Köfeler, H.C., Thallinger, G.G., 2011. Lipid data analyzer: Unattended identification and quantitation of lipids in LC-MS data. *Bioinformatics* 27, 572–577.
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Abdulfatah, A., Fontaine, P., Rodina, M., Linhart, O., 2012. Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 56–62.
- Heringa, M.B., Schreurs, R.H.M.M., Busser, F., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Hermens, J.L.M., 2004. Toward more useful in vitro toxicity data with measured free concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6263–6270.
- Horgan, R.P., Kenny, L.C., 2011. ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Obstet. Gynaecol.* 13, 189–195.
- Hsu, F.F., Turk, J., 2009. Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: Mechanisms of fragmentation and structural characterization. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 2673–2695.
- Hübner, G., Crone, C., Lindner, B., 2009. LipID - A software tool for automated assignment of lipids in mass spectra. *J. Mass Spectrom.* 44, 1676–1683.
- Janesick, A.S., Blumberg, B., 2016. Obesogens: An emerging threat to public health. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 214, 559–565.
- Jurowski, K., Kochan, K., Walczak, J., Barańska, M., Piekoszewski, W., Buszewski, B., 2017. Analytical Techniques in Lipidomics: State of the Art. *Crit. Rev. Anal. Chem.*

- 47, 418–437.
- Kershaw, E.E., Schupp, M., Guan, H.P., Gardner, N.P., Lazar, M.A., Flier, J.S., 2007. PPAR $\gamma$  regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293, 1736–1745.
- Keston S, A., Brand, T, R., 1964. The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide. *Anal. Biochem.* 5, 1–5.
- Kim, Sang-il, Yang, Y., Hong, Y., Myung, S., Kim, Sae-chul, 2015. Distribution of serum bisphenol A diglycidyl ether and its metabolite in Korean adult men and its association with reproductive hormone levels. *Mol. Cell. Toxicol.* 11, 71–78.
- Kind, T., Liu, K.H., Lee, D.Y., Defelice, B., Meissen, J.K., Fiehn, O., 2013. LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat. Methods* 10, 755–758.
- Kirchner, S., Kieu, T., Chow, C., Casey, S., Blumberg, B., 2010. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 24, 526–539.
- Knight, B.L., Hebbach, A., Hauton, D., Brown, A.M., Wiggins, D., Patel, D.D., Gibbons, G.F., 2005. A role for PPAR $\alpha$  in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem. J.* 389, 413–421.
- Koelmel, J.P., Kroeger, N.M., Ulmer, C.Z., Bowden, J.A., Patterson, R.E., Cochran, J.A., Beecher, C.W.W., Garrett, T.J., Yost, R.A., 2017. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 18, 331.
- Kowalska, K., Ścisłalska, M., Bizoń, A., Śliwińska-Mossoń, M., Milnerowicz, H., 2017. Influence of oral contraceptives on lipid profile and paraoxonase and commonly hepatic enzymes activities. *J. Clin. Lab. Anal.* 1–7.
- Krank, J., Murphy, R.C., Barkley, R.M., Duchoslav, E., McAnoy, A., 2007. Qualitative Analysis and Quantitative Assessment of Changes in Neutral Glycerol Lipid Molecular Species Within Cells. *Methods Enzymol.* 432, 1–20.
- Krattenmacher, R., 2000. Drospirenone: Pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. *Contraception* 62, 29–38.
- Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T.R., Neumann, S., 2012. CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal. Chem.* 84, 283–289.
- Lee, J.W., Mok, H.J., Lee, D.Y., Park, S.C., Kim, G.S., Lee, S.E., Lee, Y.S., Kim, K.P., Kim, H.D., 2017. UPLC-QqQ/MS-Based Lipidomics Approach to Characterize Lipid Alterations in Inflammatory Macrophages. *J. Proteome Res.* 16, 1460–1469.

## REFERÈNCIES

---

- Legeay, S., Faure, S., 2017. Is bisphenol A an environmental obesogen? *Fundam. Clin. Pharmacol.* 31, 594–609.
- Lei, B., Huang, Y., Liu, Y., Xu, J., Sun, S., Zhang, X., Xu, G., Wu, M., Yu, Y., Feng, C., 2018. Low-concentration BPF induced cell biological responses by the ER $\alpha$  and GPER1-mediated signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 165, 144–152.
- Lephart, E.D., Simpson, E.R., 1991. Assay of aromatase activity. *Methods Enzymol., Methods in Enzymology* 206, 477–483.
- Li, M., Yang, L., Bai, Y., Liu, H., 2014. Analytical methods in lipidomics and their applications. *Anal. Chem.* 86, 161–175.
- Li, N., Kelsh, R.N., Croucher, P., Roehl, H.H., 2010. Regulation of neural crest cell fate by the retinoic acid and Pparg signalling pathways. *Development* 137, 389–394.
- Li, X., Ycaza, J., Blumberg, B., 2011. The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 9–15.
- Li, Z.-H., Li, P., Shi, Z.-C., 2016. Chronic Effects of Tributyltin on Multiple Biomarkers Responses in Juvenile Common Carp, *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol.* 31, 937–944.
- Li, Z., Agellon, L.B., Allen, T.M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., Vance, D.E., 2006. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab.* 3, 321–331.
- Lin, H.J., Ho, F.C.S., Hing Lee, C.L., 1978. Abnormal Distribution of O-Alkyl Groups in the Neutral Glycerolipids from Human Hepatocellular Carcinomas. *Cancer Res.* 38, 946–949.
- Lv, Y.Z., Yao, L., Wang, L., Liu, W.R., Zhao, J.L., He, L.Y., Ying, G.G., 2019. Bioaccumulation, metabolism, and risk assessment of phenolic endocrine disrupting chemicals in specific tissues of wild fish. *Chemosphere* 226, 607–615.
- Lydic, T.A., Townsend, S., Adda, C.G., Collins, C., Mathivanan, S., Reid, G.E., 2015. Rapid and comprehensive “shotgun” lipidome profiling of colorectal cancer cell derived exosomes. *Methods* 87, 83–95.
- Maasz, G., Zrinyi, Z., Takacs, P., Lovas, S., Fodor, I., Kiss, T., Pirger, Z., 2017. Complex molecular changes induced by chronic progestogens exposure in roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 9–17.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P., 2001. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *J. Food Compos. Anal.* 14, 93–100.



## REFERÈNCIES

---

- Manolescu, D.-C., Sima, A., Bhat, P. V., 2010. All-trans Retinoic Acid Lowers Serum Retinol-Binding Protein 4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice. *J. Nutr.* 140, 311–316.
- Maradonna, F., Nozzi, V., Santangeli, S., Traversi, I., Gallo, P., Fattore, E., Mita, D.G., Mandich, A., Carnevali, O., 2015. Xenobiotic-contaminated diets affect hepatic lipid metabolism: Implications for liver steatosis in *Sparus aurata* juveniles. *Aquat. Toxicol.* 167, 257–264.
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A., Schwudke, D., 2008. Lipid extraction by methyl-terf-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 49, 1137–1146.
- Melvin, S.D., Lanctôt, C.M., Doriean, N.J.C., Bennett, W.W., Carroll, A.R., 2019. NMR-based lipidomics of fish from a metal(loid) contaminated wetland show differences consistent with effects on cellular membranes and energy storage. *Sci. Total Environ.* 654, 284–291.
- Morcillo, Y., Albalat, A., Porte, C., 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution: Bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1203–1208.
- Morcillo, Y., Porte, C., 1999. Evidence of endocrine disruption in the imposex-affected gastropod *Bolinus brandaris*. *Environ. Res.* 81, 349–354.
- Morikawa, K., Hanada, H., Hirota, K., Nonaka, M., Ikeda, C., 2013. All-trans retinoic acid displays multiple effects on the growth, lipogenesis and adipokine gene expression of AML-I preadipocyte cell line. *Cell Biol. Int.* 37, 36–46.
- Mortazavi, S., Bakhtiari, A.R.R., Sari, A.E., Rahbarizadeh, F., Hassanzadeh, N., 2019. Effects of xenostrogen treatment (4-nonylphenol, bisphenol a) on vitellogenin expression in juvenile cyprinus carpio. *Casp. J. Environ. Sci.* 17, 43–53.
- Mu, X., Liu, J., Yuan, L., Yang, K., Huang, Y., Wang, C., Yang, W., Shen, G., Li, Y., 2019. The mechanisms underlying the developmental effects of bisphenol F on zebrafish. *Sci. Total Environ.* 687, 877–884.
- Nakazawa, H., Yamaguchi, a, Inoue, K., Yamazaki, T., Kato, K., Yoshimura, Y., Makino, T., 2002. In vitro assay of hydrolysis and chlorohydroxy derivatives of bisphenol A diglycidyl ether for estrogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1827–1832.
- Nam, M., Choi, M.S., Jung, S., Jung, Y., Choi, J.Y., Ryu, D.H., Hwang, G.S., 2015. Lipidomic profiling of liver tissue from obesity-prone and obesity-resistant mice fed a high fat diet. *Sci. Rep.* 5, 1–11.
- OECD, 2005. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Series on Testing and Assessment.

- Olukole, S.G., Lanipekun, D.O., Ola-Davies, E.O., Oke, B.O., 2019. Maternal exposure to environmentally relevant doses of bisphenol A causes reproductive dysfunction in F1 adult male rats: protective role of melatonin. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 28940–28950.
- Otieno, A.C., Mwongela, S.M., 2008. Capillary electrophoresis-based methods for the determination of lipids-A review. *Anal. Chim. Acta* 624, 163–174.
- Page, B., Page, M., Noel, C., 1993. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int. J. Oncol.* 3, 473–476.
- Palacios, S., Foidart, J.M., Genazzani, A.R., 2006. Advances in hormone replacement therapy with drospirenone, a unique progestogen with aldosterone receptor antagonism. *Maturitas* 55, 297–307.
- Pande, G., 2000. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 569–574.
- Patterson, A.D., Maurhofer, O., Beyoğlu, D., Lanz, C., Krausz, K.W., Pabst, T., Gonzalez, F.J., Dufour, J.F., Idle, J.R., 2011. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling. *Cancer Res.* 71, 6590–6600.
- Pennimpede, T., Cameron, D.A., MacLean, G.A., Li, H., Abu-Abed, S., Petkovich, M., 2010. The role of CYP26 enzymes in defining appropriate retinoic acid exposure during embryogenesis. *Birth Defects Res. Part A* 88, 883–894.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395.
- Poole, A., van Herwijnen, P., Weideli, H., Thomas, M.C., Ransbotyn, G., Vance, C., 2004. Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE). *Food Addit. Contam.* 21, 905–19.
- Popkova, Y., Dannenberger, D., Schiller, J., Engel, K.M., 2019. Differences in the lipid patterns during maturation of 3T3-L1 adipocytes investigated by thin-layer chromatography, gas chromatography, and mass spectrometric approaches. *Anal. Bioanal. Chem.*
- Pulfer, M., Murphy, R.C., 2003. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.* 22, 332–364.
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., Sanyal, A.J., 2007. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46, 1081–1090.
- Quehenberger, O., Armando, A.M., Dennis, E.A., 2011. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-

- mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 648–656.
- Rebollo-Ramirez, S., Krokowski, S., Lobato-Márquez, D., Thomson, M., Pennisi, I., Mostowy, S., Larrouy-Maumus, G., 2018. Intact Cell Lipidomics Reveal Changes to the Ratio of Cardiolipins to Phosphatidylinositols in Response to Kanamycin in HeLa and Primary Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 31, 688–696.
- Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of bisphenol A substitutes. *Environ. Health Perspect.* 123, 643–650.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., Shroot, B., 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104, 201–211.
- Sandra, K., Sandra, P., 2013. Lipidomics from an analytical perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 847–853.
- Santangeli, S., Consales, C., Pacchierotti, F., Habibi, H.R., Carnevali, O., 2019. Transgenerational effects of BPA on female reproduction. *Sci. Total Environ.* 685, 1294–1305.
- Santangeli, S., Notarstefano, V., Maradonna, F., Giorgini, E., Gioacchini, G., Forner-Piquer, I., Habibi, H.R., Carnevali, O., 2018. Effects of diethylene glycol dibenzoate and Bisphenol A on the lipid metabolism of Danio rerio. *Sci. Total Environ.* 636, 641–655.
- Satoh, K., Ohyama, K., Aoki, N., Iida, M., Nagai, F., 2004. Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food Chem. Toxicol.* 42, 983–93.
- Šauer, P., Stará, A., Golovko, O., Valentová, O., Bořík, A., Grabic, R., Kroupová, H.K., 2018. Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water Res.* 137, 64–71.
- Schechter, A., Malik, N., Haffner, D., Smith, S., Harris, T.R., Paepke, O., Birnbaum, L., 2010. Bisphenol A (BPA) in U.S. Food. *Environ. Sci. Technol.* 44, 9425–9430.
- Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224, 163–183.
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., Chahoud, I., 2002. Parent bisphenol a accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* 110, 703–707.
- Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J.P., Schirmer, K., 2005. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability

## REFERÈNCIES

---

- assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal. Biochem.* 344, 76–85.
- Siddique, M.M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V.A., Summers, S.A., 2015. Dihydroceramides: From bit players to lead actors. *J. Biol. Chem.* 290, 15371–15379.
- Simons, K., Ikonen, E., 2000. How Cells Handle Cholesterol. *Science (80- )*. 290, 1721–1727.
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39.
- Smedes, F., 1999. Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst* 124, 1711–1718.
- Snyder, F., Wood, R., 1969. Alkyl and Alk-1-enyl Ethers of Glycerol in Lipids from Normal and Neoplastic Human Tissues. *Cancer Res.* 29, 251–257.
- Spener, F., Lagarde, M., Geloën, A., Record, M., 2003. What is lipidomics? *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 105, 481–482.
- Srivastava, S., Gupta, P., Chandolia, A., Alam, I., 2015. Bisphenol A : A Threat to Human Health? *J. Environ. Health* 77, 20–26.
- Su, X., Han, X., Yang, J., Mancuso, D.J., Chen, J., Bickel, P.E., Gross, R.W., 2004. Sequential Ordered Fatty Acid  $\alpha$  Oxidation and  $\Delta 9$  Desaturation Are Major Determinants of Lipid Storage and Utilization in Differentiating Adipocytes. *Biochemistry* 43, 5033–5044.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107–184.
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., Vandergheynst, J., Fiehn, O., Arita, M., 2015. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods* 12, 523–526.
- Wang, B., Tontonoz, P., 2018. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 452–463.
- Wang, J., Wang, C., Han, X., 2019. Tutorial on lipidomics. *Anal. Chim. Acta* 1061, 28–41.
- Wang, Q., Yang, H., Yang, M., Yu, Y., Yan, M., Zhou, L., Liu, X., Xiao, S., Yang, Y., Wang, Y., Zheng, L., Zhao, H.H., Li, Y., 2019. Toxic effects of bisphenol A on goldfish gonad development and the possible pathway of BPA disturbance in female and male fish reproduction. *Chemosphere* 221, 235–245.
- Wang, X., Xu, Y., Song, X., Jia, Q., Zhang, X., Qian, Y., Qiu, J., 2019. Analysis of glycerophospholipid metabolism after exposure to PCB153 in PC12 cells through

- targeted lipidomics by UHPLC-MS/MS. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 120–127.
- Wenk, M.R., 2010. Lipidomics: New tools and applications. *Cell.* 143, 888–895.
- Wymann, M.P., Schneider, R., 2008. Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 162–176.
- Yang, K., Han, X., 2016. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem. Sci.* 41, 954–969.
- Yetukuri, L., Ekroos, K., Vidal-Puig, A., Orešič, M., 2011. Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 991–999.
- Zhang, H., Shao, X., Zhao, H., Li, X., Wei, J., Yang, C., Cai, Z., 2019. Integration of Metabolomics and Lipidomics Reveals Metabolic Mechanisms of Triclosan-Induced Toxicity in Human Hepatocytes. *Environ. Sci. Technol.* 53, 5406–5415.
- Zhang, J., Sun, P., Kong, T., Yang, F., Guan, W., 2016. Tributyltin promoted hepatic steatosis in zebrafish (*Danio rerio*) and the molecular pathogenesis involved. *Aquat. Toxicol.* 170, 208–215.
- Zhang, S., Bao, J., Gong, X., Shi, W., Zhong, X., 2019. Hazards of bisphenol A — — blocks RNA splicing leading to abnormal testicular development in offspring male mice. *Chemosphere.* 230, 432–439.
- Zhang, T., Zhao, Q., Xiao, X., Yang, R., Hu, D., Zhu, X., Gonzalez, F.J., Li, F., 2019. Modulation of Lipid Metabolism by Celastrol. *J. Proteome Res.* 18, 1133–1144.
- Zhao, C., Tang, Z., Xie, P., Lin, K., Chi Kong Chung, A., Cai, Z., 2019. Immunotoxic potentials of bisphenol F mediated through lipid signaling pathways on macrophages. *Environ. Sci. Technol.* 53, 11420–11428.
- Zhao, C., Xie, P., Wang, H., Cai, Z., 2018. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics reveal toxicological mechanisms of bisphenol F in breast cancer xenografts. *J. Hazard. Mater.* 358, 503–507.
- Zucchi, S., Mirbahai, L., Castiglioni, S., Fent, K., 2014. Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 3523–3531.