



Instituto de Bioingeniería

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

**ALTERACIÓN DEL SISTEMA  
RETINOIDE POR EXPOSICIÓN A  
XENOBIÓTICOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Ismael Sánchez Pérez**

Julio, 2017



**D. Javier Esteban Mozo, Profesor Contratado Doctor del Área de Toxicología del Departamento de Biología Aplicada e Investigador del Instituto de Bioingeniería,**

**CERTIFICA:**

Que D. Ismael Sánchez Pérez ha realizado la investigación incluida en la memoria de Tesis Doctoral titulada “**Alteración del sistema retinoide por exposición a xenobióticos**“, bajo mi dirección en la División de Toxicología del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

En Elche, a 25 de julio de 2017

Javier Esteban Mozo



La Dra. **Ángela Sastre Santos**, Catedrática de Universidad del Área de Química Orgánica y Subdirectora del Instituto de Bioingeniería,

HACE CONSTAR:

Que da su conformidad a la lectura de la tesis doctoral titulada “**Alteración del sistema retinoide por exposición a xenobióticos**“, presentada por Ismael Sánchez Pérez, para optar al grado de doctor, dentro del Programa de Doctorado en Bioingeniería, por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Lo firmo en Elche, a instancia del interesado y a los efectos oportunos, a 25 de julio de 2017

Ángela Sastre Santos  
Catedrática de Universidad  
Subdirectora del Instituto de Bioingeniería



## AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento más sincero va a mi director de tesis, Javier Esteban, quien me acogió en su laboratorio. Me iniciaste en una disciplina prácticamente desconocida para mí, con paciencia infinita y ese entusiasmo que te caracteriza y que imprimes en cada una de tus lecciones. Gracias por enseñarme a investigar y a valorar las satisfacciones que da hacerlo, por encima de los malos ratos.

También tengo que agradecer a Helen Håkansson el apoyo prestado durante este periodo, por aceptarme en su departamento y por permitirme colaborar en sus proyectos. En este sentido, también le doy las gracias a todos los investigadores junto con los que he tenido el placer de trabajar, ya sea a distancia o en persona, sobre todo a Sabina Litens, a Leo van der Ven y a Raimo Pohjanvirta.

Muchas gracias también a José Barril y a M<sup>a</sup> Cruz Pellín por sus consejos, por crear un entorno tan especial desde el momento en el que entré en el Departamento hace ya seis años y por su sabiduría fuera y dentro del laboratorio. Y a Katja y Felip, por enseñarme junto con José y el propio Javier, a ver mi entorno con otros ojos, unos más críticos y observadores.

Gran parte de este periodo lo he pasado a oscuras, por cuestiones metodológicas, y en esas condiciones, una buena compañía es muy de agradecer. Por eso no puedo olvidarme de todos los alumnos que han pasado por aquí y con los que he compartido conocimientos, risas y, en definitiva, muchas horas. De todos ellos, me gustaría destacar el trabajo de Sergio Martínez, por sus aportaciones al proyecto y por compartir mi humor; de Sonia Alarcón, por sus contribuciones clave sobre todo en la recta final del proyecto; y el de Marina Serrano, por su inestimable ayuda en la consecución de este trabajo, por el tesón y la constancia que le pone a cada cosa que hace, por escuchar todas mis paridas y por su alegría contagiosa.

Muchas gracias también a mis amigos, sobre todo a Adrián, Roberto y Valentín, por devolverme a la realidad no-académica cada fin de semana, por las risas interminables, por el interés mostrado y los ánimos todo este tiempo.

Para terminar, sólo me queda dar las gracias a mi familia, testigos de noches en vela, de frustraciones y de momentos de flaqueza, que a pesar de todo, no dejaron de animarme y de recordarme no sólo que todo pasa, sino que el esfuerzo al final vale la pena. Por todo el apoyo y porque si tengo algo bueno, es realmente gracias a vosotros y a todo lo que habéis hecho por mí a lo largo de este tiempo.

Y en definitiva, gracias a todos los que “sí”, e incluso a los que “no”.



## ABSTRACT

### “Alteration of the retinoid system by exposure to xenobiotics”

The retinoid system is a cellular regulation system with a crucial role in many aspects of life, development and reproduction. Hundreds of retinoids have been identified, including retinyl esters, the storage form in the liver; retinol, the most representative retinoid in blood; retinal, involved in vision; and retinoic acids, which activate the retinoid receptors. Also can be found functional retinoids, as 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-retinoic acid, which activates RAR, and 9-*cis*-13,14-dihydro-retinoic acid, which activates RXR; and also biotransformation products found in urine, as retinoyl- $\beta$ -glucuronides. All of them are present in a very wide concentration range depending on species, sex or tissue, and that is the reason why the election of the extraction and analysis method is a critic step, depending on the case.

The homeostasis of the retinoid system can be altered after the exposure to several xenobiotics. This alteration was associated with serious outcomes, as neurologic development and metabolic impairments and fertility problems. The present work is focused on the effects on the retinoid system, driven by four xenobiotics, specifically to the retinoid concentrations and expression of genes involved in their regulation. Two flame retardants were assayed: hexabromocyclododecane (HBCD) and decabromodiphenyl ether (decaBDE), administered for 28 days to Wistar rats of both sexes with doses from 0.3 to 200 mg/kg bw/d for HBCD and from 1.87 to 30 mg/kg bw/d for decaBDE. Also laquinimod and tasquinimod metabolites precursors, IMA-08401 and IMA-07101, respectively, were assayed. Those two drugs act as immunomodulators and potential activators of aryl hydrocarbon receptor. Male Sprague-Dawley rats were exposed to IMA-08401 and IMA-07101 at repeated doses of 100 and 75 mg/kg bw/d, respectively, for 5 days.

Exposure to HBCD was associated with induction of retinoid mobilization, as reflected by the reduction in the levels of retinyl palmitate and 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-retinoic acid in liver of both sexes. No changes of all-*trans*-retinoic acid were observed in females, probably due to the simultaneous induction of the expression of genes of enzymes involved in biosynthesis, as *Adh1*, *Aox1* or *Aldh1a1*, and biotransformation, as *Cyp26a1* or *Ugts*. In males, however, induction of biosynthesis was less potent than in females, which was associated with a decrease in the hepatic concentration of all-*trans*-retinoic acid.

After exposure to decaBDE, no mobilization of retinyl esters was observed, and there was even a slight increase in retinyl palmitate concentrations in females, together with an induction of the enzyme lecithin-retinol acyltransferase, which mediates retinol esterification. Neither retinol nor 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-retinoic acid were altered, whereas hepatic expression of *Crabp1* and *Cyp26a1* was induced, genes associated with biotransformation of all-*trans* retinoic acid and, therefore, with the decrease of its hepatic concentrations, a more pronounced effect in males than in females.

Treatment with IMA-08401 and IMA-07101 induced retinoid mobilization from the liver as reflected by decreased retinyl palmitate and hepatic 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-retinoic acid, as well as increased retinol in serum. It was also associated with the increase in all-*trans*-retinoic acid biosynthesis in liver and with a drastic reduction of all-*trans*-retinoic acid metabolites in both liver and serum.

The different patterns of expression of genes involved in the retinoid system, as well as the different degree of alteration of retinoid concentrations, showed that the retinoid profile is affected in a particular manner by factors such as those related to exposure to the xenobiotic and biological ones, including the sex of the organism.



## RESUMEN

### “Alteración del sistema retinoide por exposición a xenobióticos”

El sistema retinoide es un sistema de regulación celular con un papel crucial en muchos aspectos de la vida, el desarrollo y la reproducción. Cientos de retinoides han sido identificados, incluyendo ésteres de retinilo, las formas de almacenamiento en hígado; retinol, el principal retinoide presente en la circulación; retinal, implicado en la visión; ácidos retinoicos, que activan los receptores de retinoides; retinoides funcionales, como el ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidretinoico, que activa el RAR y el ácido 9-*cis*-13,14-dihidretinoico, que activa el RXR; así como productos de biotransformación encontrados en orina como retinoil- $\beta$ -glucuronidos. Todos ellos se encuentran en un amplio rango de concentraciones dependiente de la especie, el sexo o el tejido, por lo que la elección del método de extracción y análisis es crítico según el caso.

La homeostasis del sistema retinoide puede verse alterada tras la exposición a diversos xenobióticos. Esta alteración se ha asociado con efectos graves, como trastornos del desarrollo neurológico, problemas de fertilidad y trastornos metabólicos. Este trabajo se centra en los efectos de cuatro xenobióticos sobre el sistema retinoide, tanto en las concentraciones como en la expresión de genes involucrados en su regulación. Concretamente, se utilizaron dos retardantes de llama, el hexabromociclododecano (HBCD) y el decabromodifenil éter (decaBDE), administrados durante 28 días a ratas Wistar de ambos sexos a dosis comprendidas entre 0.3 y 200 mg/kg pc/d para el HBCD y entre 1.87 y 30 mg/kg pc/d para el decaBDE; así como IMA-08401 y IMA-07101, precursores de los metabolitos del laquinimod y el tasquinimod, respectivamente, dos fármacos inmunomoduladores potenciales activadores del receptor arilo de hidrocarburos, con los que se expuso a ratas macho Sprague-Dawley a dosis repetidas de 100 y 75 mg/kg pc/d, respectivamente, durante 5 días.

La exposición a HBCD se asoció con la inducción de la movilización de retinoides, como refleja la reducción en los niveles de palmitato de retinilo y ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidretinoico en hígado de ambos sexos. No se observaron cambios de ácido todo-*trans*-retinoico en hembras, mientras que se determinó una inducción simultánea de la expresión génica de enzimas de biosíntesis (*Adh1*, *Aox1* o *Aldh1a1*) y de biotransformación (*Cyp26a1* o *Ugts*). En machos, sin embargo, la inducción de la biosíntesis fue menos eficaz que en hembras, asociada a una disminución en la concentración hepática de ácido todo-*trans*-retinoico.

Tras la exposición a decaBDE, no se observó movilización de ésteres de retinilo, e incluso hubo un ligero aumento de las concentraciones de palmitato de retinilo en hembras, acompañado de la inducción de la enzima lecitina-retinol aciltransferasa, que media la esterificación de retinol. Ni el retinol ni el ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidretinoico se alteraron, pero sí se indujo la expresión hepática de *Crabp1* y *Cyp26a1*, efectos asociados a la biotransformación del ácido todo-*trans*-retinoico y, por lo tanto, a la disminución en la concentración hepática de este, de forma más potente y eficaz en machos que en hembras.

El tratamiento con IMA-08401 y IMA-07101, indujo la movilización de retinoides desde el hígado, como refleja la disminución de palmitato de retinilo y de ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidroretinoico hepático, así como el aumento de retinol en suero. También se asoció al incremento en la biosíntesis de ácido todo-*trans*-retinoico en hígado y a una drástica disminución de metabolitos del ácido todo-*trans*-retinoico tanto en hígado como en suero.

Los diferentes patrones de expresión de genes implicados en el sistema retinoide, así como el distinto grado de alteración de las concentraciones de retinoides, indicaron que el perfil retinoide responde de una manera particular a diversos factores entre los que se encuentran los relativos a la exposición al xenobiótico y los de carácter biológico, incluyendo el sexo del organismo.



## ABREVIATURAS

2-P	2-Propanol
AA	Ácido acético
ACN	Acetonitrilo
ADH	Alcohol deshidrogenasa
AhR	Receptor arilo de hidrocarburos
AhRR	Represor del receptor arilo de hidrocarburos
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AmA	Acetato amónico
AmS	Sulfato amónico
AOX	Aldehído oxidasa
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ARAT	Acyl-CoA: retinol acyltransferase
ARNT	Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos
AsA	Ácido ascórbico
BCO-I	$\beta,\beta$ -caroteno-15,15'-monooxigenasa
BFR	Retardantes de llama polibromados
bHLH	Familia hélice-bucle-hélice básica
BHT	Hidroxitolueno butilado
BMD	Modelado de la relación dosis-respuesta
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetimida
BuOH	Butanol
CAR	Receptor constitutivo de androstano
CAS	Chemical Abstracts Service
CED	Dosis de efecto crítico
CEDL	Límite inferior de la dosis de efecto crítico
Chl	Cloroformo
CNS	Sistema nervioso central
CPE	Extracción Cloud point
CRABP	Proteína celular de unión a ácido retinoico
CRBP	Proteína celular de unión a retinol
CYP	Citocromo P450
D	Dioxano
DAD	Detector diodo array
DCM	Diclorometano
DecaBDE	Decabromodifenil éter
DEE	Dietil éter
DIPE	Diisopropil éter
DLLME	Microextracción dispersiva líquido-líquido
EA	Etil acetato
ECB	European Chemicals Bureau
ECD	Detector electroquímico
EEF	Factor eucariótico de elongación de la traducción
EFSA	Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos
EPA	Environmental Protection Agency
EPS	Espuma de poliestireno expandido
EROD	Etoxiresorufin-O-deetilasa

ESI	Ionización por electroespray
EtOH	Etanol
FA	Ácido fórmico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC-FID	Cromatografía de gases-detector de ionización por llama
HBCD	Hexabromociclododecano
HBGV	Valores de orientación basados en la salud
HH	Hidrocloruro de hidroxilamina
HIPS	Poliestireno de alto impacto
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IPA	Isopropil alcohol
IS	Estándar interno
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LCQ	Cromatografía líquida con cuadrupolo
LDI	Ionización por Desorción Láser
LRAT	Lecitina-retinol aciltransferasa
MA	Ácido metanóico
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MC	Cloruro de metileno
MeOH	Metanol
MOE	Margen de exposición
MRM	Modo reacción múltiple
MSTQ	Espectrómetro de masas con triple cuadrupolo
MtBE	Metil- <i>tert</i> -butil éter
m/z	Proporción Masa por carga
NCI	Ionización química con ion negativo
NOAEL	Nivel sin efecto observable
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OHD3	Hidroxi vitamina D3
PAS	Per-Arnt-Sim
PBDE	Polibromodifenil éter
PCB	Bifenilos policlorados
PCDF	Dibenzofuranos policlorados
PDA	Fotodiodo-array
PFB	Pentafluorobencilo
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales
POP	Contaminantes orgánicos persistentes
PP	Precipitación de proteínas
PPAR	Receptor activado proliferador de peroxisomas
PROD	Pentoxiresorufin-O-deetilasa
PXR	Receptor X de pregnano
RA	Ácido retinoico
RAC	Comité de Evaluación de Riesgos
RAL	Retinal
RALDH	Retinal deshidrogenasa
RAR	Receptor del ácido retinoico
RDH	Retinol deshidrogenasa
RE	Éster de retinilo

REAC	Acetato de retinilo
REACH	Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas
REH	Hidrolasas de ésteres de retinilo
REPA	Palmitato de retinilo
RES	Ésteres de retinilo
REOH	Retinol
RIVM	Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente de los Países Bajos
RXR	Receptor X retinoide
SEAC	Comité de Análisis Socioeconómico
SFE	Extracción en fluido supercrítico
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SIM	Monitoreo de iones seleccionado
SRM	Monitoreo de reacción seleccionado
SVHC SD	Documento de apoyo sobre sustancias muy preocupantes
T3	Triyodotironina
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TBHQ	<i>tert</i> -butilhidroquinona
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
TCE	Tetracloroetano
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
THR	Receptor de la hormona tiroidea
TRL	Lipoproteína rica en triglicéridos
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
TTR	Transtiretrina
UGT	UDP-glucuronosil transferasa
UHPLC	Cromatografía líquida de rendimiento ultra alto
VECAP	Programa de Acción de Control de Emisiones Voluntarias
VIP	Importancia de la variable en la proyección
WHO	Organización Mundial de la Salud
XPS	Espuma de poliestireno extruido



## LISTA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	SISTEMA RETINOIDE.....	3
2.1.	Determinación de retinoides en muestras biológicas .....	8
2.1.1.	Precauciones en el laboratorio.....	8
2.1.2.	Preparación de la muestra.....	9
2.1.3.	Estándares de retinoides y calibración .....	11
2.1.3.1.	Estándares.....	11
2.1.3.2.	Calibración .....	12
2.1.4.	Condiciones cromatográficas .....	15
2.1.5.	Detección UV .....	16
2.1.6.	Espectrometría de masas .....	16
2.2.	Concentraciones en tejidos.....	18
3.	RETARDANTES DE LLAMA BROMADOS .....	19
3.1.	Hexabromociclododecano .....	19
3.1.1.	Propiedades físico-químicas.....	19
3.1.2.	Usos y producción.....	20
3.1.3.	Regulación.....	20
3.1.4.	Exposición.....	21
3.1.5.	Efectos sobre la salud .....	22
3.1.5.1.	Estudios en humanos .....	23
3.1.5.2.	Estudios experimentales.....	23
3.2.	Decabromodifenil éter.....	25
3.2.1.	Propiedades físico-químicas.....	25
3.2.2.	Usos y producción.....	25
3.2.3.	Regulación.....	26
3.2.4.	Exposición.....	27
3.2.5.	Efectos sobre la salud .....	28
3.2.5.1.	Estudios en humanos .....	29
3.2.5.2.	Estudios experimentales.....	29
4.	MODULADORES DEL AHR .....	31
4.1.	Receptor arilo de hidrocarburos .....	31
4.2.	Activación del AhR.....	31
4.3.	IMA-08401 e IMA-07101 .....	32
5.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
6.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
6.1.1.	Animales y diseño del estudio.....	37
6.1.2.	Compuestos químicos.....	38
6.1.3.	Análisis de retinoides .....	39
6.1.3.1.	Instrumentación.....	39
6.1.3.2.	Método de análisis.....	39
6.1.4.	Análisis de expresión génica .....	43
6.1.4.1.	Instrumentación.....	43
6.1.4.2.	Método de análisis.....	43
6.1.5.	Modelado de dosis-respuesta.....	44
6.1.6.	Análisis de mínimos cuadrados parciales.....	45
6.1.7.	Relevancia en humanos – Margen de exposición.....	46
7.	RESULTADOS.....	49
7.1.1.	Hexabromociclododecano .....	49

7.1.2.	DecaBDE.....	61
7.1.3.	Moduladores del AhR .....	70
8.	DISCUSIÓN.....	73
8.1.1.	HBCD.....	73
8.1.2.	DecaBDE.....	82
8.1.3.	Moduladores del AhR .....	89
8.2.	Discusión general .....	92
9.	CONCLUSIONES.....	97
10.	MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	99
11.	APÉNDICES .....	113
11.1.	Preparación de la muestra.....	113
11.2.	Estándares internos.....	124
11.3.	Condiciones cromatográficas .....	127
11.4.	Detección de retinoides .....	139
11.5.	Espectrometría de masas .....	154
11.6.	Niveles de retinoides en muestras biológicas .....	160
12.	REFERENCIAS .....	199



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Peso molecular, absorbancia máxima y coeficiente de extinción molar .....	14
Tabla 2	Expresión de ARNm hepático en ratas Wistar tratadas con HBCD.....	51
Tabla 3	Niveles de retinoides hepáticos en ratas Wistar tratadas con HBCD.....	55
Tabla 4	Modelado de la relación dosis-respuesta en ratas Wistar tratadas con HBCD.....	56
Tabla 5	Márgenes de exposición en base a las alteraciones inducidas por HBCD .....	60
Tabla 6	Expresión de ARNm hepático en ratas Wistar tratadas con decaBDE.....	62
Tabla 7	Niveles de retinoides hepáticos en ratas Wistar tratadas con decaBDE.....	65
Tabla 8	Modelado de la relación dosis-respuesta en ratas Wistar tratadas con decaBDE .....	66
Tabla 9	Márgenes de exposición en base a alteraciones inducidas por decaBDE.....	69
Tabla 10	Niveles de retinoides en hígado, riñón y suero en ratas tratadas con C2 y C4.....	71
Tabla 11	Resumen de la modulación del sistema retinoide específico de compuesto y sexo .....	92
Tabla S1	Secuencias de los cebadores para el análisis de expresión de ARNm por qPCR. ....	99
Tabla S2	T-test de los valores delta-CT hembras frente a machos (HBCD).....	100
Tabla S3	T-test de los valores delta -CT hembras frente a machos (decaBDE).....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Isopreno .....	3
Figura 2	Numeración aceptada de átomos de carbono en la estructura de los retinoides .....	4
Figura 3	Especies retinoides endógenas determinadas en el presente trabajo.....	5
Figura 4	Ingesta, absorción y movilización de la vitamina A .....	6
Figura 5	Metabolismo detallado de retinoides .....	7
Figura 6	Diastereoisómeros principales del hexabromociclododecano (HBCD).....	19
Figura 7	Pictograma para la clasificación y etiquetado de HBCD .....	22
Figura 8	Fórmula del decaBDE.....	25
Figura 9	Pictogramas para la clasificación y etiquetado de pentaBDE.....	29
Figura 10	Pictogramas para la clasificación y etiquetado de TCDD.....	31
Figura 11	Formula del IMA-08401 e IMA-07101 .....	33
Figura 12	Círculos de correlación de la regresión PLS en ratas tratadas con HBCD. ....	59
Figura 13	Círculos de correlación de la regresión PLS en ratas Wistar tratadas con decaBDE..	67
Figura 14	Modulación del sistema retinoide tras la exposición al HBCD .....	74
Figura 15	Modulación del sistema retinoide tras la exposición al decaBDE .....	83
Figura S1	VIP por componentes en ratas Wistar tratadas con HBCD .....	102
Figura S2	VIP por componentes en ratas Wistar tratadas con decaBDE .....	103
Figura S3	Gráfico de dosis-respuesta del peso del hígado (g) en ratas hembras.....	104
Figura S4	Relaciones dosis-respuesta en ratas expuestas a decaBDE.....	105
Figura S5	Expresión hepática de ARNm de genes alterados tras exposición a decaBDE .....	108
Figura S6	Diagramas de caja tras el tratamiento con C2 y C4 en muestras de hígado .....	109
Figura S7	Diagramas de caja para el tratamiento con C2 y C4 en muestras de suero.....	110
Figura S8	Diagramas de caja para el tratamiento con C2 y C4 en muestras de riñón.....	111
Figura S9	Evaluación de niveles control de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico hepático (decaBDE)..	112



## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema retinoide es un sistema de regulación celular, que juega un papel crucial en muchos aspectos de la vida, así como durante el desarrollo (Mark et al., 2009) y la reproducción (Clagett-Dame y Knutson, 2011).

La homeostasis del sistema retinoide puede verse alterada tras la exposición a diversos compuestos químicos, como los retardantes de llama polibromados (BFRs) (van der Ven et al., 2006, 2008a, 2008b, 2009; Novák et al., 2008, Nilsson y Håkansson, 2002). Asimismo, un sistema retinoide comprometido se ha asociado con efectos graves, como trastornos del desarrollo neurológico (Dickman et al., 1997), problemas de fertilidad (Clagett-Dame y Knutson 2011) y trastornos metabólicos (Takahashi y Takasu, 2011, Trasino y Gudas, 2015).

Los BFRs se encuentran en todo tipo de muestras biológicas, incluido en humanos, debido a su uso masivo y su carácter persistente y bioacumulable. De todos ellos, este trabajo se centra especialmente en el decabromodifenil éter (decaBDE) y el hexabromociclododecano (HBCD) y sus efectos sobre el sistema retinoide y el hígado como principal órgano diana. Cada vez hay más evidencias que apuntan a que varios BFRs muestran un modo de acción alterador endocrino (EFSA, 2011a, b, c), interfiriendo en el desarrollo durante la infancia, un periodo de tiempo especialmente sensible que depende de niveles exactos de hormonas en momentos concretos (WHO, 2012). Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos que subyacen a la toxicidad de los BFRs aún no se han aclarado.

El correcto funcionamiento del sistema retinoide también puede ser alterado por exposición a compuestos activadores del receptor arilo de hidrocarburos (AhR). Entre ellos destacan las dioxinas, siendo la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) la más tóxica y, por lo tanto, la considerada como modelo de activador de dicho receptor (Van den Berg et al., 1998). Por otro lado, existen otros compuestos que, siendo activadores del AhR, producen efectos deseables para el organismo, y desempeñan funciones vitales como desarrollo de la autoinmunidad o la diferenciación celular, lo cual posiciona a este receptor como una potencial diana de terapias farmacológicas para el tratamiento de patologías en diferentes campos de la medicina (Zhu et al., 2014) al no provocar los efectos tóxicos que observamos tras la exposición a dioxinas (Safe et al., 2013; Mahiout et al., 2017).



## 2. SISTEMA RETINOIDE

Los retinoides llevan a cabo funciones críticas en numerosos procesos vitales del organismo (revisado en Novák et al., 2008; Theodosiou et al., 2010; Brtko, 2011; Kedishvili, 2013), por ejemplo:

- Implicación en el correcto desarrollo embrionario
- Regulación de la expresión génica
- Activación de genes supresores de tumores
- Mantenimiento del sistema inmune
- Mantenimiento del sistema reproductor
- Mantenimiento de las funciones visuales
- Diferenciación, desarrollo y maduración celular
- Desarrollo óseo y crecimiento

Además, su alteración se ha asociado a embriotoxicidad y teratogénesis en vertebrados (Novák et al., 2008). Del mismo modo, el trastorno del sistema retinoide ha sido asociado con efectos adversos en el sistema tiroideo (Mangelsdorf y Evans, 1995; Brtko et al., 2011), con diabetes, obesidad y otros trastornos metabólicos (Wolf, 2010; Takahashi y Takasu, 2011; Trasino y Gudas, 2015), cáncer (Shiota et al., 2006; Shiota y Kanki, 2013), Alzheimer y trastornos del desarrollo neurológico (Lee et al., 2009; Elsea y Williams, 2011; Hou et al., 2015) y espermatogénesis anormal y problemas de fertilidad (Chung et al., 2009; Clagett-Dame y Knutson, 2011). Además, altas dosis pueden provocar efectos negativos como pérdida de apetito y peso, irritabilidad, disfunción renal o dolor de huesos y articulaciones (Theodosiou et al., 2010) y teratogénesis (Rutledge et al., 1994; Armstrong et al., 1994).

El sistema retinoide está formado por compuestos retinoides, proteínas de transporte, enzimas de biotransformación, transportadores y receptores nucleares. El término “retinoide” incluye tanto las formas naturales de vitamina A, como otros análogos sintéticos del retinol (Blomhoff et al., 1991, Blomhoff & Blomhoff, 2006). Además, estos se denominan isoprenoides poliénicos, ya que derivan de precursores de isopreno (Figura 1)

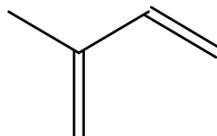


Figura 1 Isopreno

De hecho, según la nomenclatura de la IUPAC (IUPAC, 1982), se considera que los retinoides son una clase de compuestos consistentes en cuatro unidades de isopreno unidas entre sí. Todos los retinoides pueden derivarse formalmente de un compuesto monocíclico principal que contiene cinco enlaces dobles carbono-carbono y un grupo funcional en el extremo de la porción acíclica.

Por consiguiente, la numeración de los átomos dependería del grupo funcional principal, lo que podría causar cambios en la numeración de las posiciones conforme el retinoide en cuestión se transforme, por ejemplo, mediante las enzimas implicadas en su metabolismo. Así, por conveniencia, la nomenclatura aceptada de retinoides se basa en la numeración de átomos de carbono que se muestra en la figura 2.

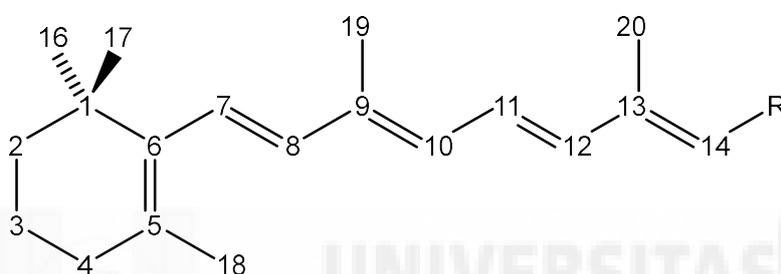


Figura 2 Numeración aceptada de átomos de carbono en la estructura de los retinoides

Sin embargo, actualmente, el término retinoide se refiere a la capacidad de activar un conjunto de receptores y por lo tanto regular la expresión de genes que están implicados en una serie de eventos biológicos.

Entre las propiedades fisicoquímicas de los retinoides se encuentran su baja solubilidad en agua y su alta solubilidad en grasas y disolventes orgánicos. Algunas formas retinoides son compuestos inestables, con alta sensibilidad al oxígeno, a agentes oxidantes, metales, luz y a un ambiente excesivamente cálido, que pueden causar isomerización y degradación de estas especies retinoides (Barua et al., 1998; desarrollado en la sección 2.1.1. *Precauciones en el laboratorio*). Las principales formas naturales de vitamina A (Figura 3) se pueden clasificar en formas de almacenamiento (ésteres de retinilo), formas de transporte (retinol) y formas funcionales, por ejemplo, ácido *trans*-retinoico, retinal y ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidroretinoico (Blomhoff & Blomhoff, 2006).

La vitamina A y su compuesto de origen, el retinol, fue descubierta a principios del siglo XX (Semba, 2012), y el conocimiento de la mayoría de formas retinoides de origen biológico, así como de las vías metabólicas en las que están implicadas, se ha ido perfeccionando desde entonces. Actualmente se conoce multitud de formas retinoides (desarrollado en 11.6. *Niveles de retinoides en muestras*

*biológicas*), no obstante todavía hay nuevos retinoides por descubrir. Un ejemplo es el mencionado ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidretinoico, su forma reducida o un ligando fisiológico del RXR. Diferentes estudios muestran que el ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidretinoico está presente en altas concentraciones en hígado y que puede ser un importante intermediario en la principal vía metabólica endógena de la vitamina A (Schmidt et al., 2002; Schuchardt et al., 2009).

Por lo tanto, una mejor comprensión del funcionamiento del sistema retinoide es imprescindible para entender su papel en la salud y la enfermedad a lo largo de la vida, así como en farmacología, toxicología y medicina medioambiental.

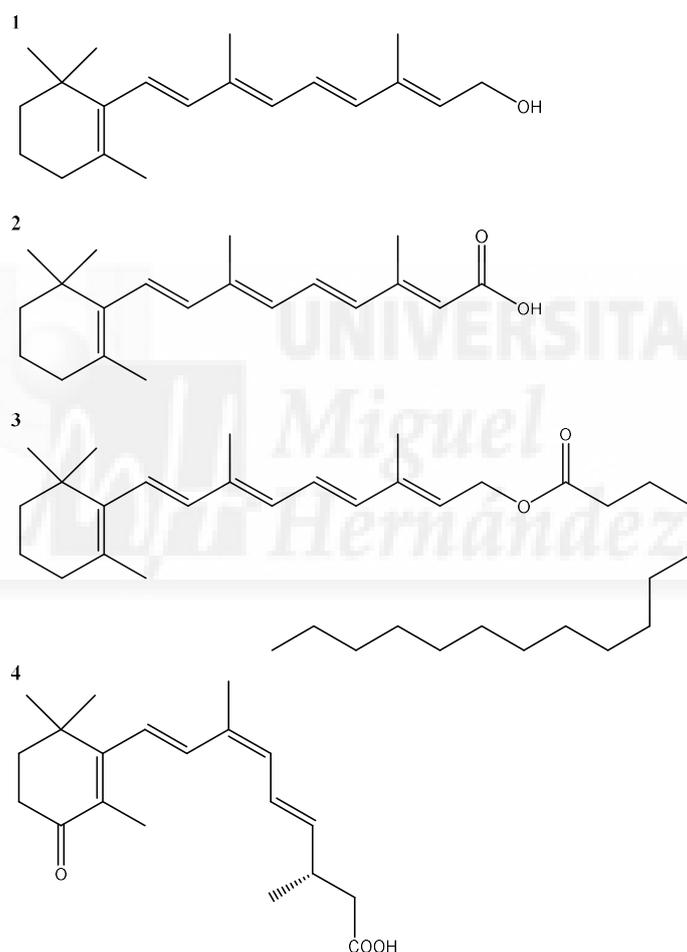


Figura 3 Especies retinoides endógenas determinadas en el presente trabajo: 1) Retinol  
2) ácido todo-*trans*-retinoico 3) Palmitato de retinilo 4) ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-  
dihidretinoico

Los retinoides se adquieren a través de la dieta en forma de  $\beta$ -caroteno, retinol y ésteres de retinilo. Los  $\beta$ -carotenos son transformados en retinol en el intestino por la enzima  $\beta,\beta$ -caroteno-15,15'-monooxigenasa (BCO-I), mientras que los ésteres de retinilo son convertidos en retinol por la familia de hidrolasas de ésteres de retinilo (RES). A su vez, el retinol se une a la proteína celular de unión a

retinol tipo II (CRBP<sub>II</sub>), que facilita su unión con la enzima lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT), cuya función es catalizar la esterificación del retinol y dar lugar a ésteres de retinilo (Figura 4). Estos se liberan desde el intestino, formando parte de quilomicrones, al sistema circulatorio portal, desde donde pasan al hígado. Una vez en los hepatocitos, los ésteres de retinilo son convertidos de nuevo en retinol por las hidrolasas de ésteres de retinilo (REHs). El retinol unido a la proteína de unión al retinol (RBP) puede pasar a la circulación formando el complejo transtiretrina-RBP-retinol (TTR-RBP-REOH) que asegura su llegada a los tejidos diana, previniendo su filtración por los riñones (Theodosiou et al., 2010).

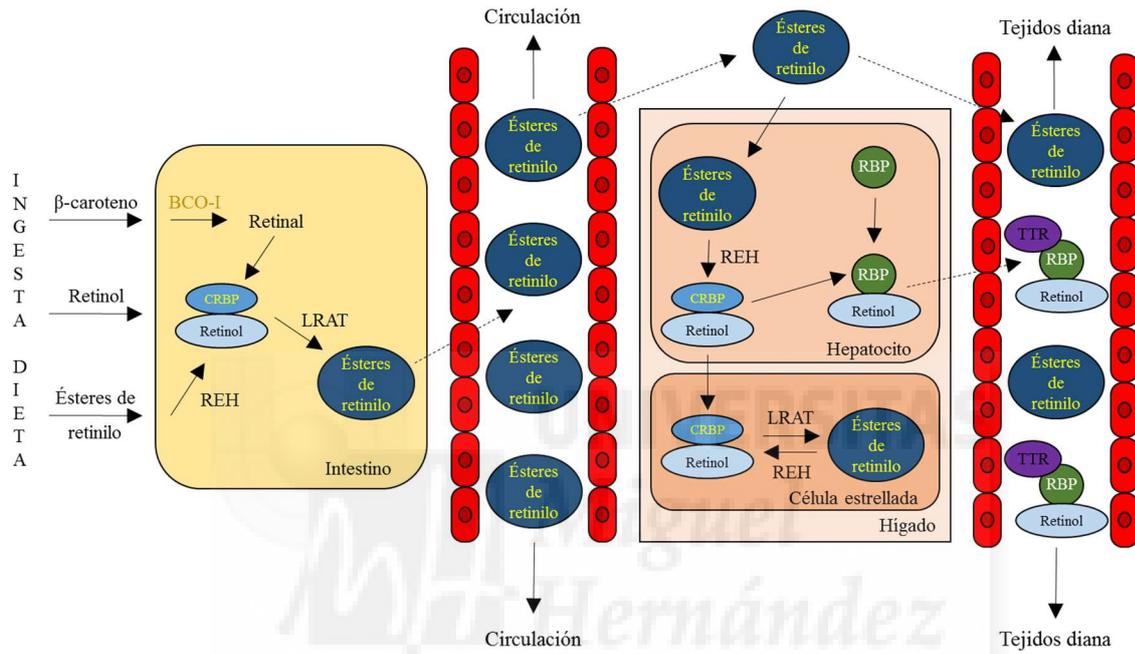


Figura 4 Ingesta, absorción y movilización de la vitamina A. Adaptado de Theodosiou et al., 2010.

Una vez dentro de las células diana, el retinol unido al CRBPI es transformado en retinal por la retinol deshidrogenasa (RDH) por medio de una reacción reversible (Figura 5), tras la que es transformado en los isómeros del ácido todo-*trans*-retinoico de forma irreversible por la retinal deshidrogenasa (RALDH). Los isómeros del ácido todo-*trans*-retinoico, al mismo tiempo, pueden ser transportados al núcleo donde interaccionarán con los receptores nucleares o pueden ser metabolizados por los citocromos P450 (CYPs), especialmente por CYP26, formando los metabolitos 4-oxo o 4-OH-ácido retinoico, carentes de actividad retinoide. El RAR (receptor del ácido todo-*trans*-retinoico) y RXR (receptor X retinoide) forman heterodímeros u homodímeros, que se unen a los elementos de respuesta al ácido todo-*trans*-retinoico y a otras formas retinoideas, interviniendo en la regulación de la expresión génica (Novák et al., 2008).

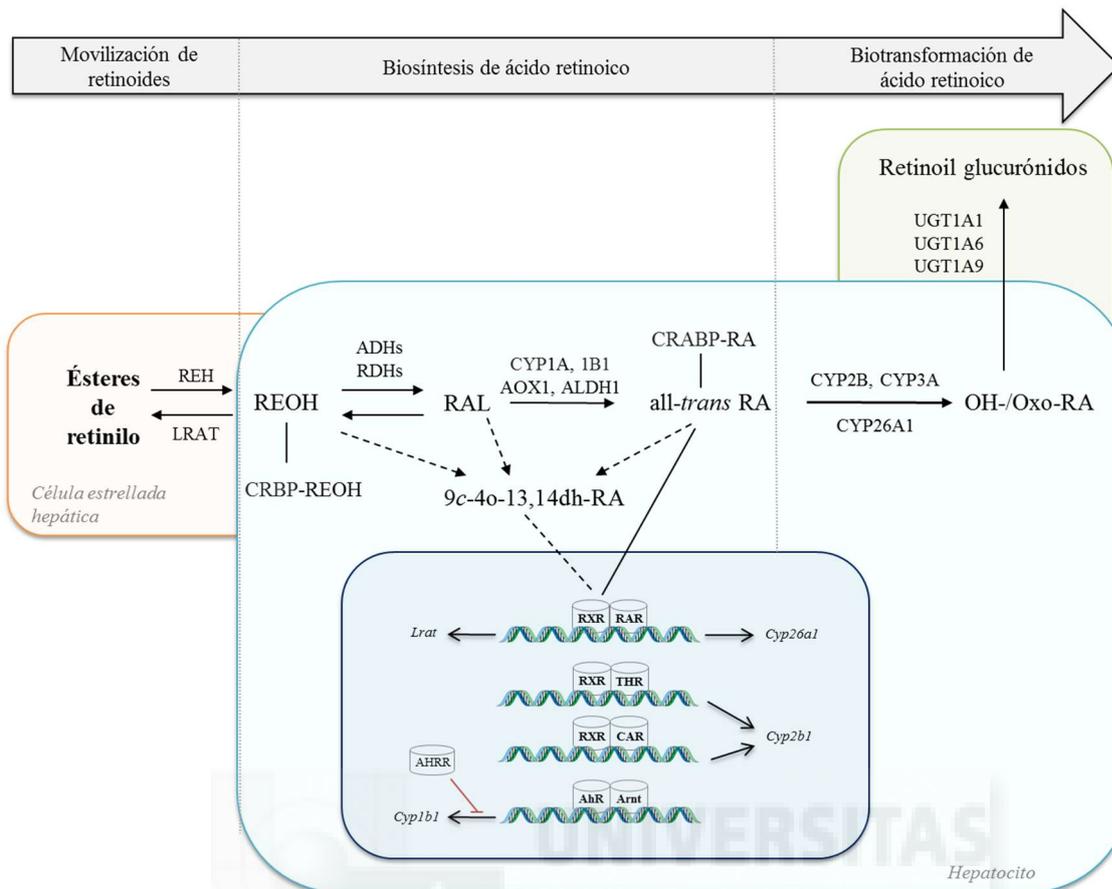


Figura 5 Metabolismo detallado de retinoides. ADH: alcohol deshidrogenasa; AhR: receptor arilo de hidrocarburos; AhRR: represor del receptor arilo de hidrocarburos; ARNT: translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; CAR: receptor constitutivo de androstano; CRABP: proteína celular de unión a ácido retinoico; CRBP: proteína celular de unión a retinol; CYP: superfamilia del citocromo P450; LRAT: lecitina-retinol aciltransferasa; NRs: receptores nucleares (p. ej.: PPAR: receptor activado proliferador de peroxisomas; o THR: receptor de la hormona tiroidea); RA: ácido retinoico; RAL: retinal; RALDH: retinal deshidrogenasa; RAR: receptor del ácido retinoico; RBP-TTR: complejo proteína de unión al retinol – transtiretrina; RDH: retinol deshidrogenasa; REH: hidrolasa de ésteres de retinilo; REOH: retinol; RXR: receptor X de retinoides; UGT: UDP-glucuronosil transferasa. Las líneas discontinuas indican incertidumbres en el conocimiento actual

La mayoría de las funciones biológicas desempeñadas por los retinoides están mediadas por dos tipos de receptores nucleares (RAR y RXR), excepto el sistema visual. Mientras que los RARs tienen afinidad por el ácido todo-*trans*-retinoico y por metabolitos como el ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidretinoico, los RXRs unen preferentemente ácido 9-*cis*-13,14-dihidretinoico, aunque se especula que otras formas retinoides pueden estar implicadas en la activación de RXRs (Novak et al., 2008; Theodosiou et al., 2010).

## **2.1. Determinación de retinoides en muestras biológicas**

Existe una serie de revisiones sobre la química analítica de los retinoides a las que se puede acudir para una mayor documentación en el campo (Wyss et al., 1995; Barua y Furr, 1998; Gundersen y Blomhoff, 2001; Gundersen, 2006; Kane, 2012). Sin embargo, a continuación se proporciona una descripción de los métodos analíticos para la determinación de los retinoides, en el que se detallan los estudios publicados después de las revisiones mencionadas.

Aunque en la literatura se han descrito diferentes métodos analíticos, tales como cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de fluidos supercríticos y electroforesis capilar junto con fluorescencia, quimioluminiscencia y detecciones electroquímicas, el foco centrado en métodos de cromatografía líquida junto con detección ultravioleta y espectrométrica de masas proporciona una mejor percepción sobre los métodos más adecuados para la detección y cuantificación de retinoides endógenos en muestras biológicas.

### **2.1.1. Precauciones en el laboratorio**

La cadena de polieno de los retinoides los hace vulnerables a la luz, la oxidación, los ácidos y el calor como se describe a continuación y está revisado en Wyss et al. (1995), Barua y Furr (1998), Gundersen y Blomhoff (2001) y Gundersen (2006).

Los retinoides deben ser protegidos de fuentes naturales y de otras fuentes comunes de luz interior y, por lo tanto, a menudo se manipulan bajo luz por encima de 500 nm, es decir, luz amarilla tenue o roja para evitar la isomerización. Para el almacenamiento, es preferible la utilización de recipientes de color ámbar y estos, a su vez, mantenerlos en la oscuridad. Además, las muestras biológicas deben protegerse de la luz, aunque la isomerización fotoinducida de los retinoides en los tejidos y la sangre se produce en menor medida en comparación con las soluciones transparentes de retinoides en disolventes orgánicos.

Con respecto a la oxidación, se recomienda la purga o burbujeo de las soluciones con argón o, si no se dispone, con nitrógeno y, en cualquier caso, llenar los envases para reducir tanto como sea posible la presencia de aire. Adicionalmente, a menudo se usaba hidroxitolueno butilado como un antioxidante en soluciones madre para su almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, este antioxidante puede ser nocivo en el proceso de análisis, durante el cual se evita en la mayoría de los métodos actuales. En cuanto a las muestras biológicas, en muchos casos, no es posible el análisis inmediato de los retinoides, en cuyo caso los tubos con suero también se rellenan con argón o nitrógeno.

Los retinoides disueltos en disolventes orgánicos son estables durante horas a temperatura ambiente. Para el almacenamiento a largo plazo de soluciones de retinoides, es preferible el uso de temperaturas inferiores a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, si es posible, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cuando se recogen muestras biológicas, se recomienda utilizar nitrógeno líquido para congelarlas y evitar la degradación y almacenarlas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Un paso crítico es la homogenización (u otras técnicas de preparación de muestras), durante la cual los tejidos deben sumergirse en un baño de hielo y deben extraerse inmediatamente, ya que los retinoides pueden degradarse mediante enzimas endógenas y tioles.

Además, se deben evitar soluciones ácidas para el almacenamiento de retinoides, ya que puede producirse la isomerización y la hidrólisis de glucurónidos u otros conjugados. Aunque la saponificación ha sido un método para hidrolizar los ésteres de retinilo en retinol, las soluciones alcalinas también deben evitarse para el almacenamiento a largo plazo de los retinoides.

Por otro lado, los materiales de vidrio, plástico o acero utilizados con frecuencia en los laboratorios pueden adsorber retinoides. Por lo tanto, se recomienda pirolizar el vidrio por encima de  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$  para volver a reticular los grupos silanol de su superficie y descontaminarlos de compuestos orgánicos (Schmidt et al., 2003a).

En conjunto, además de aplicar las precauciones de laboratorio adecuadas, es necesario utilizar estándares de retinoides para monitorear la preparación de la muestra y el análisis de retinoides en los diferentes pasos del proceso y así controlar la potencial degradación de los retinoides.

### **2.1.2. Preparación de la muestra**

Existen varios métodos para el proceso de preparación de muestras previo a la determinación de retinoides en el HPLC (revisado en Wyss et al., 1995; Barua y Furr, 1998; Gundersen y Blomhoff, 2001 y Gundersen, 2006). La mayoría de métodos están enfocados en medir retinoides en sangre y tejidos, pero también en comida, leche, cosméticos, formulaciones e incluso deshechos. Los volúmenes de suero necesarios para el análisis van desde decenas de microlitros a unidades de mililitro, siendo lo más común centenas de microlitro. Las cantidades de tejido varían desde decenas de miligramo a unidades de gramo. Los tejidos procesados más frecuentemente son hígado y riñón, y en menor medida otros órganos procedentes de animales de experimentación y humanos, entre los cuales está cerebro, testículos y tejido adiposo. El análisis de retinoides en tejidos requiere la homogenización de la muestra en agua, tampón o disolvente orgánico usando un homogeneizador tipo “potter” para tejidos blandos (como hígado, riñón o cerebro) o un homogeneizador mecánico para tejidos fibrosos (como pulmón o corazón).

Conviene tener en cuenta que el tejido en sí mismo, la fase del desarrollo o la especie en ocasiones restringe la cantidad de muestra disponible, como el caso de los 8 mg de próstata para el análisis de isómeros del ácido retinoico (Wang et al., 2001) o el uso de hasta 100 ejemplares de *Daphnia* para ácidos retinoicos (Venne et al., 2016) o 1000 embriones de *Xenopus* para metabolitos retinoides 4-oxo (Blumberg et al., 1996), lo cual en muchos casos requiere un paso previo de concentración de retinoides antes de la cuantificación (Apéndice 11.1).

Los retinoides objeto de estudio fueron ésteres de retinilo, retinol, isómeros del ácido retinoico así como metabolitos retinoides y derivados. En ese sentido, el método de extracción depende directamente de la polaridad del retinoide, para la cual el método tiene que estar específicamente optimizado (Apéndice 11.1).

Las muestras biológicas pueden ser procesadas de distinta manera: inyección directa tras centrifugación de muestras líquidas, precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y extracción en fase sólida automatizada on-line, para la cual se requiere un equipamiento más sofisticado (Apéndice 11.1).

La inyección directa de fluidos biológicos, como plasma, en el sistema de cromatografía puede llevarse a cabo. Sin embargo, este proceso resta sensibilidad al resultado y, en muchos casos, puede alterar la columna analítica e incrementar el riesgo de bloqueo de vías en el sistema HPLC, incluso después de la centrifugación. Aun así es un tipo de procesado rápido que puede usarse en ciertos casos y aplicaciones.

La precipitación de proteínas es un paso en el que las proteínas de la muestra biológica son precipitadas por la adición de un disolvente orgánico miscible en agua, como el acetonitrilo. Tras la centrifugación, los retinoides se disuelven en la fase líquida. La principal ventaja de la precipitación de proteínas es que es un paso rápido comparado con otras aproximaciones y reduce el riesgo de isomerización y degradación de retinoides. La desventaja es que una mínima recogida de muestra precipitada puede incrementar el riesgo de interferencias, a menos que se usen métodos altamente sensibles y selectivos, como se discutirá en la sección sobre espectrometría de masas.

La extracción líquido-líquido se usa a menudo en los análisis de retinoides en los que un disolvente orgánico inmisible en agua, como el hexano o el cloroformo, se añade a la muestra líquida o al tejido homogenizado. Después de la mezcla y la centrifugación, los retinoides pueden ser fácilmente disueltos en la fase orgánica para los siguientes pasos del proceso de análisis.

La extracción en fase sólida se lleva a cabo usando columnas con fases estacionarias como C18 o aminopropilo, en las cuales se retienen los retinoides. Las columnas C18 retienen retinoides más

apolares, mientras que los compuestos polares son eluidos. Las columnas de aminopropilo, intercambiadora de aniones, son las adecuadas para retener retinoides ionizados como ácidos carboxílicos, mientras que los retinoides apolares como retinol o ésteres de retinilo son eluidos.

Los sistemas de extracción en fase sólida automatizados reducen considerablemente el tiempo de trabajo. Las extracciones líquido-líquido y en fase sólida se combinan a menudo para purificar adecuadamente las muestras biológicas para la determinación de retinoides (Apéndice 11.1).

Tras ambas extracciones, se lleva a cabo la evaporación del disolvente orgánico y la reconstitución del residuo seco en fase móvil o en una solución con baja capacidad de elución para concentrar los retinoides y mejorar la sensibilidad. Con frecuencia, la concentración por evaporación y reconstitución se hace después de la precipitación de proteínas por el mismo motivo.

En muchos métodos se requirió una combinación de los pasos descritos con tal de evitar interferencias y alcanzar una sensibilidad óptima con la que lograr resolver problemas analíticos. Aunque los métodos semi-automatizados de extracción en fase sólida están disponibles, las laboriosas extracciones líquido-líquido y en fase sólida, junto con las etapas de evaporación y reconstitución, aumentan el riesgo de artefactos, requieren altos volúmenes de disolventes orgánicos y se consideran métodos que consumen mucho tiempo, por lo que no son elegibles para análisis de rutina.

La extracción automatizada on-line en fase sólida puede realizarse tras la precipitación de proteínas para concentrar y limpiar la muestra y así reducir las interferencias y aumentar la sensibilidad, mientras se minimiza la isomerización y degradación de los retinoides, tal y como se mencionó anteriormente en el apartado de precauciones de laboratorio (Apéndice 11.1). Siempre que las instalaciones disponibles en el laboratorio proporcionen este tipo de equipo, esta sería probablemente la técnica a elegir.

### **2.1.3. Estándares de retinoides y calibración**

#### **2.1.3.1. Estándares**

Los estándares retinoides se usan para la identificación y cuantificación, entre ellos, ácido todo-*trans*-retinoico, ácido 13-*cis*-retinoico, ácido 9-*cis*-retinoico, todo-*trans* retinol, 13-*cis*-retinol y todo-*trans*-palmitato de retinilo. Para tal fin, los retinoides son sintetizados a partir de precursores disponibles por medio de reacciones químicas, por irradiación de luz o tomados directamente de fuentes naturales (revisado en Wyss et al., 1995; Barua & Furr, 1998; Gundersen y Blomhoff, 2001; Gundersen, 2006 y Kiser et al., 2014).

Para lograr análisis exactos y precisos, la cuantificación de retinoides requiere un estándar interno que contribuya a aumentar la robustez del análisis. La selección de este dependerá de muchos factores, tales como el tipo de muestra, el protocolo de extracción de retinoides, las condiciones cromatográficas o la técnica de detección.

Algunas de las características que debe cumplir un estándar interno son las siguientes:

- Debe ser lo más similar posible al retinoide en estudio.
- Debe estar bien resuelto durante la cromatografía para la identificación UV.
- Debe ser el retinoide estructuralmente relacionado y marcado con isótopo estable para co-eluir con el analito para la detección por espectrometría de masas.
- No debe estar presente en la muestra.

El estándar interno usado más frecuentemente para retinoides apolares, como ésteres de retinilo y retinol, es el acetato de retinilo, aunque también se han usado compuestos como el retinil nonanoato (Apéndice 11.2).

Para compuestos polares, como el ácido retinoico y sus análogos, el retinoide aromático TMMP-ácido retinoico (acitretina) o uno de sus isómeros *cis*, es añadido como estándar interno (Apéndice 11.2). Para espectrometría de masas, es preferible el uso de retinoides marcados con isótopos estables, como se describirá en la sección de espectrometría de masas.

### **2.1.3.2. Calibración**

La calibración y cuantificación por el método del estándar interno es preferible sobre la del estándar externo. Para garantizar una medida adecuada, deben tenerse en cuenta algunas consideraciones, incluyendo los retinoides objeto de estudio, la matriz de la muestra y la técnica de identificación. A continuación se proporcionan algunas recomendaciones (revisado en Wyss et al., 1995; Barua & Furr, 1998; Gundersen y Blomhoff, 2001 y Gundersen, 2006).

- Los retinoides deben medirse espectrofotométricamente antes de su uso como estándares. En este sentido, el disolvente seleccionado juega un papel crucial, puesto que sus características pueden implicar variaciones críticas en la absorbancia máxima y, por tanto, en la concentración del retinoide.

- Los retinoides están normalmente unidos a transportadores o proteínas de unión en condiciones fisiológicas (ácido retinoico con CRABPs o albúmina, retinol con CRBPs o RBP, ésteres de retinilo con quilomicrones y lipoproteínas).
- Dada la gran variedad de matrices en las cuales podemos encontrar retinoides, una manera de mantenerlos en solución y evitar su agregación al recipiente y su consiguiente degradación, es añadir a la solución un 1% de albúmina libre de ácidos grasos en tampón fosfato (PBS).
- Los retinoides seleccionados para realizar la curva de calibrado deberían ser los mismos que los retinoides objeto de estudio, a menos que estos no estén a la venta ni puedan ser sintetizados en laboratorio.



Tabla 1 Peso molecular, absorbancia máxima y coeficiente de extinción molar.

Retinoide	Pm	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$	$E^{1\% 1cm}$	Retinoide	Pm	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$	$E^{1\% 1cm}$
at-ROH (vitamina A)	286.46	325	48305	1689	9- <i>cis</i> -Retinoil- $\beta$ -glucurónido	476.56	353		
13- <i>cis</i> -ROH	286.46	328	51770	1810	5,6-Epoxy-RA	316.44	338	45280	1442
11- <i>cis</i> -ROH	286.46	319	34890	1220	5,8-Epoxy-RA	316.44	298	39470	1257
11,13-di- <i>cis</i> -ROH	286.46	311	29240	1024	3-OH-RA (Ro-14-7627/000)	316.44	355		
9,13-di- <i>cis</i> -ROH	286.46	324	39500	1379	at-4-Oxo-RA	314.43	360	58220	1854
9- <i>cis</i> -ROH	286.46	323	42300	1477	13- <i>cis</i> -4-Oxo-RA	314.43	361	39000	1242
at-4-Oxo-ROH	301.44	347			at-4-Oxo-Retinoil- $\beta$ -glucurónido	491.55	364		
at-3-OH-ROH	302.45	325			13- <i>cis</i> -4-Oxo-Retinoil- $\beta$ -glucurónido	491.55	367		
5,6-Epoxy-ROH	302.45	310	73140	2422	9- <i>cis</i> -4-Oxo-Retinoil- $\beta$ -glucurónido	491.55	356		
5,8-Epoxy-ROH	302.45	278	53390	1768	Acitretina (TMMP-RA)	326.44	361	41400	1270
at-3,4-Didehidro-ROH	284.44	350	41320	1455	13- <i>cis</i> -Acitretina	326.44	361	40450	1241
(vitamina A <sub>2</sub> )					at-RAL	284.44	383	42880	1510
13- <i>cis</i> -3,4-didehidro-ROH	284.44	352	39080	1376	13- <i>cis</i> -RAL	284.44	375	35500	1250
9- <i>cis</i> -3,4-didehidro-ROH	284.44	348	32460	1143	11- <i>cis</i> -RAL	284.44	380	24935	878
9,13-Di- <i>cis</i> -3,4-didehidro-ROH	284.44	350	29950	1030	11,13-di- <i>cis</i> -RAL	284.44	373	19880	700
$\alpha$ -ROH	286.45	311	47190	1650	9,13-di- <i>cis</i> -RAL	284.44	368	32380	1140
14-Hidroxi-4,14-retro-ROH	302.46	348	53960	1785	9- <i>cis</i> -RAL	284.44	373	36100	1270
at-acetato de retinilo	328.5	325	51180	1560	at-3,4-didehidro-RAL	282.4	401-314	41450	1470
at-palmitato de retinilo	524.9	325	49260	940	9- <i>cis</i> -3,4-didehidro-RAL	282.4	391-315		
Anhydroretinol	268.44	371	97820	3650	13- <i>cis</i> -3,4-didehidro-RAL	282.4	395-314		
Anhydrovitamina A <sub>2</sub>		370	79270	2980	11,13-Di- <i>cis</i> -3,4-didehidro-RAL	282.4	386-269		
Retinil metil ether	300.48	328	49800	1660	3-OH-RAL	300.43	379		
TMMP-ROH	316.48	325	49800	1596	4-Oxo-RAL	299.43	381		
at-RA (tretinoína)	300.42	350	45300	151	5,6-Epoxy-RAL	300.43	365	45330	1511
13- <i>cis</i> -RA (isotretinoína)	300.4	354	39750	1325	$\alpha$ -RAL	300.43	368	48800	1720
11- <i>cis</i> -RA	300.42	342			Etretinato	354.49			
11,13-Di- <i>cis</i> -RA	300.42	346	25890	863	Arotinoide (TTNPB)	348.49			
9,13-Di- <i>cis</i> -RA	300.42	346	34450	1150	TTNN	358.48			
9- <i>cis</i> -RA	300.42	345	36900	1230	AM 580	351.45			
at-3,4-didehidro-RA	298.43	370	41570	1395					
(vitamina A <sub>2</sub> ácida)									
13- <i>cis</i> -3,4-didehidro-RA	298.43	372	38740	1300					
9- <i>cis</i> -3,4-didehidro-RA	298.43	369	36950	1240					
9,13-Di- <i>cis</i> -3,4-didehidro-RA	298.43	366	32990	1107					
$\alpha$ -RA	300.44	340	33000	1100					
at-Metilretinoato	314.46	354	44340	1415					
13- <i>cis</i> -Metilretinoato	314.46	359	38310	1220					
at-Retinoil- $\beta$ -glucurónido	476.56	360	50700	1065					
13- <i>cis</i> -Retinoil- $\beta$ -glucurónido	476.56	369							

Adaptado de Gundersen & Blomhoff, 2001 y recopilado de Barua & Furr, 1998; Gyorgy & Pearson, 1967; Wingerath et al., 1999; Barua & Barua, 1966; Sporn et al., 1994. ROH, retinol; RAL, retinal; RA, ácido retinoico; Pm, peso molecular.

#### 2.1.4. Condiciones cromatográficas

Al igual que sucede con la extracción de retinoides, la elección de las condiciones cromatográficas para una separación adecuada de retinoides depende de los analitos de interés entre la amplia diversidad de especies retinoides, incluyendo ésteres de retinilo, retinoles, retinales, ácidos retinoicos y sus correspondientes metabolitos oxidados y conjugados de biotransformación de fase II (revisado en Wyss et al., 1995; Barua & Furr, 1998; Gundersen y Blomhoff, 2001 y Gundersen, 2006; y detallado en Apéndice 11.3). Por lo tanto no hay un método que permita la determinación simultánea de todos los potenciales retinoides encontrados en muestras biológicas. A menudo los métodos se centran o bien en compuestos más apolares como ésteres de retinilo y retinoles, o bien en compuestos más polares como los isómeros y metabolitos del ácido retinoico, ya que las condiciones cromatográficas tienen que seleccionarse para permitir la separación de compuestos estructuralmente relacionados en un tiempo de análisis razonable, y al mismo tiempo evitar interferencias, para lo cual la preparación de la muestra puede ser un paso crítico como se describe en la sección sobre la *Preparación de la muestra*). Hay que destacar el hecho de que las concentraciones de retinoides en una muestra biológica pueden diferir en órdenes de magnitud, razón por la cual la separación es una tarea cromatográfica decisiva para lograr la cuantificación de retinoides.

Aunque los métodos basados en cromatografía líquida en fase normal están disponibles y son adecuados para la separación de isómeros de retinol y retinal en sangre, tejidos, comida y leche, la mayoría de métodos están basados en separación de retinoides en fase reversa (Apéndice 11.3). Además, los métodos en fase reversa pueden acoplarse a espectrometría de masas. La mayoría de métodos cromatográficos en fase reversa hacen uso de columnas de octadecilsilano (C18), aunque también se han usado otras columnas, como las C30 o C8. Además, las columnas C18 mostraron una mayor eficiencia para separar metabolitos de ácido retinoico oxidados, mientras que las columnas de alquilamida fueron óptimas para la separación de isómeros críticos de ácido retinoico (Apéndice 11.3). Con respecto a la fase móvil, la separación se llevó a cabo usando tanto condiciones isocráticas como de gradiente. Una separación isocrática proporciona una mejor resolución de los isómeros, mientras que los gradientes permiten la separación de una gama más amplia de retinoides en un tiempo reducido. Las condiciones isocráticas, además, permiten líneas de base horizontales, preferibles para las detecciones UV o electroquímicas. Sin embargo, los gradientes se implementaron con éxito para la detección de UV en una serie de métodos (Apéndice 11.3).

Dependiendo de la complejidad de la muestra y del número de analitos que se estén evaluando, los tiempos de análisis oscilaron entre pocos minutos hasta aproximadamente 1 hora de análisis por muestra, siendo notable el número de métodos que requerían más de 30 o 40 minutos para permitir una separación apropiada (Apéndice 11.3).

### **2.1.5. Detección UV**

En muchos casos, la detección ultravioleta ha sido la técnica elegida para la identificación de retinoides, ya que la cadena de polieno conjugada absorbe fuertemente a longitudes de onda entre 300 y 400 nm (Tabla 1). Aunque otras técnicas como la fluorescencia y las detecciones electroquímicas se han utilizado debido a su selectividad, la detección por ultravioleta fue superior en términos de sensibilidad para la determinación de retinoides y decisiva para la identificación de ácidos retinoicos, con débiles propiedades de fluorescencia, a niveles endógenos (revisado en Wyss et al., 1995; Barua y Furr, 1998; Gundersen y Blomhoff, 2001 y Gundersen, 2006; y detallado en el Apéndice 11.4).

Tanto los detectores de longitud de onda variable como los de diodo han sido usados para la detección ultravioleta de retinoides, logrando límites de detección y cuantificación a concentraciones inferiores a 1 pmol/mL o pmol/g. Por lo tanto, estos métodos se aplicaron para la cuantificación de retinoides en suero, tejidos, alimentos, leche, cosméticos y formulaciones y desechos (Apéndice 11.4). Los detectores de diodo se usaron tanto a longitudes de onda fijas como en modo escáner. Las longitudes de onda fijadas proporcionan una mayor selectividad, mientras que el modo escáner permite obtener información adicional, junto con los tiempos de retención, en la identificación de retinoides. Sin embargo, la relación de absorbancia a longitudes de onda fijadas también se utilizó para la identificación de retinoides y/o para la evaluación de potenciales interferencias (Apéndice 11.4). La cromatografía líquida y la detección ultravioleta para la cuantificación de retinoides es la técnica elegida en laboratorios que carecen de equipos más sofisticados, como la espectrometría de masas.

### **2.1.6. Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas en tándem es la técnica para la cuantificación de retinoides con mayor potencial en términos de desarrollo y aplicación para nuevos metabolitos de retinoides a concentraciones endógenas por debajo de los pmol/mL o pmol/g. Aunque los métodos basados en espectrometría de masas han sido revisados por Wyss et al. (1995); Barua y Furr (1998); Gundersen y Blomhoff (2001); Gundersen (2006) y Kane, (2012), recientemente han sido publicados métodos detallados en el apéndice 11.5.

Dado que la ionización en el espectrómetro requiere tampones volátiles, el Apéndice 11.5 proporciona información sobre las condiciones cromatográficas y de espectrometría de masas. La ionización de los retinoides se realiza a menudo mediante ionización por electroespray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI). En general, la APCI logró una mejor sensibilidad al tiempo que minimizó la supresión de iones comparada con la ESI. En particular, el APCI positivo es el óptimo para la determinación de isómeros de ácido retinoico, mientras que el ESI negativo mostró ventajas para la

determinación de metabolitos de ácido retinoico oxidados. Es preferible el uso de columnas de calibre ancho para la APCI, ya que la sensibilidad depende de la cantidad del fragmento que llega al detector. Cabe destacar que los diferentes métodos de trabajo de los equipos afectan a la ionización, por lo cual es muy recomendable la optimización de las condiciones de espectrometría de masas cuando se reproduce un método de otro laboratorio. Para evitar la supresión de señal, al mismo tiempo que se mejora la cuantificación, se añade un isótopo marcado del retinoide estudiado en la etapa de preparación de la muestra (Apéndice 11.5).

Teniendo en cuenta que los pesos moleculares de los retinoides, por ejemplo, 286,5 g/mol para el retinol, 300,4 g/mol para el ácido retinoico y 476,6 g/mol para el retinoil- $\beta$ -glucurónido, se encuentran dentro de un rango muy prevalente de pesos moleculares entre compuestos endógenos, y que las muestras biológicas contienen altos niveles de lípidos, es probable que sucedan interferencias en la espectrometría de masas y en menor medida en la espectrometría de masas en tándem. En cualquier caso, de manera similar al enfoque con DAD en la detección de ultravioleta, monitorizar varias transiciones de masa usando la espectrometría de masas en tándem mejora notablemente la selectividad del método aunque pierde sensibilidad (Apéndice 11.5).

Por lo tanto, la limpieza de la muestra y la cromatografía son fundamentales para evitar artefactos para los retinoides funcionales presentes en muestras biológicas a niveles de pmol/mL o de pmol/g. Además de las interferencias endógenas, la separación cromatográfica de isómeros *cis* y *trans* es necesaria para la detección por espectrometría de masas, ya que la identificación está basada en las mismas transiciones de masa. De forma similar, los ésteres de retinilo perderán el ácido graso para el que se seleccionará un  $m/z$  de 269 para retinoles y ésteres de retinilo y, por lo tanto, se requiere una separación cromatográfica previa para su determinación. Alternativamente, las ionizaciones basadas en la ionización por desorción láser (LDI) y la ionización por desorción por láser asistida por matriz (MALDI) generan diferentes iones radicales ( $M^+$ ) (Gundersen, 2006) y por lo tanto la separación cromatográfica no es estrictamente requerida, aunque recomendada. Los tiempos de ejecución de los métodos de espectrometría de masas son más cortos que los de la detección ultravioleta, en parte debido a la mayor selectividad de los espectrómetros de masas en tándem, lo que evita las interferencias por co-elución, y por el uso de cromatógrafos más sofisticados como la cromatografía líquida de rendimiento ultra alto (UHPLC), que permite mayores flujos y presiones en el sistema (Apéndices 11.4-11.5).

En general, los límites de cuantificación basados en espectrometría de masas son ligeramente inferiores a los de la detección ultravioleta. Sin embargo, algunos de los métodos revisados basados en cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem llevados a cabo utilizando espectrómetros de triple cuadrupolo, proporcionaron los límites de detección más sensibles (Apéndice 11.4-11.5). Esos límites de detección sensibles son críticos cuando se miden retinoides en cantidades limitadas de

muestras (Apéndice 11.4-11.5). Además, los espectrómetros que monitorizan las transiciones de masa de fragmentación proporcionan información relevante para la identificación de nuevos retinoides endógenos y/o metabolitos.

## 2.2. Concentraciones en tejidos

Cientos de retinoides han sido identificados en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo ésteres de retinilo, las formas de almacenamiento en hígado; retinol, el principal retinoide presente en la circulación; retinal, implicado en la visión; ácidos retinoicos, que activan los receptores de retinoides; retinoides funcionales, como el ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidroretinoico, que activa el RAR y el ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico, que activa el RXR; así como productos de biotransformación encontrados en orina como retinoil- $\beta$ -glucurónidos (Wyss et al., 1995; Barua y Furr, 1998; Gundersen y Blomhoff, 2001; Gundersen, 2006; Kane, 2012; de Lera et al., 2016).

Estos retinoides se encuentran en un amplio rango de concentraciones, el cual depende de la propia naturaleza del retinoide, de la especie, el sexo, la fase del desarrollo del organismo, el órgano y la ingesta de precursores de la vitamina A en la dieta (Apéndice 11.6). Los principales retinoides encontrados en muestras biológicas y sus respectivas concentraciones se describen en el apéndice 11.6.

### 3. RETARDANTES DE LLAMA BROMADOS

Los retardantes de llama bromados (BFRs) son un tipo de compuestos químicos añadidos a los materiales tales como plásticos, textiles o elementos eléctricos y electrónicos para retrasar el proceso de combustión y propagación del fuego (Harrad et al., 2010). Existen diferentes clases de BFRs, como por ejemplo el hexabromociclododecano (HBCD) y los polibromodifenil éteres, entre los que se encuentra el decabromodifenil éter (decaBDE). Dichos BFRs se describen en las secciones 3.1 y 3.2.

#### 3.1. Hexabromociclododecano

##### 3.1.1. Propiedades físico-químicas

El 1,2,5,6,9,10-HBCD corresponde con un compuesto cíclico de 12 carbonos al que se unen seis átomos de bromo (Br), con fórmula química  $C_{12}H_{18}Br_6$  (Figura 6), y masa molecular de 641.7 g/mol. Su estado físico es un sólido blanco inodoro a temperatura ambiente con una densidad de 2,38 g/cm<sup>3</sup>, una presión de vapor de  $6,3 \cdot 10^{-5}$  Pa (21 °C) y un coeficiente de reparto octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de  $10^{5,62}$  ( $\log K_{ow} = 5,62$ ), para la formulación técnica. Concretamente el HBCD, se comercializa en formulaciones técnicas (números CAS 25637-99-4 y 3194-55-6) con 16 estereoisómeros teóricos de los que solamente 8 se han cuantificado y constituyen 5 diastereoisómeros.

Los tres diastereoisómeros principales, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) se encuentran en una proporción de 70-95% para  $\gamma$ -HBCD y 5-30% para  $\alpha$ - y  $\beta$ -HBCD. Los tres son quirales por lo que contienen un par de enantiómeros cada uno. Los dos diastereoisómeros restantes,  $\delta$ - y  $\epsilon$ -HBCD, son aquirales y se encuentran en bajas proporciones (0,5 y 0,3%, respectivamente) (ECB, 2008). La solubilidad en agua depende del diastereoisómero, siendo de 48.8, 14.7 y 2.1  $\mu\text{g/L}$  para  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD, respectivamente.

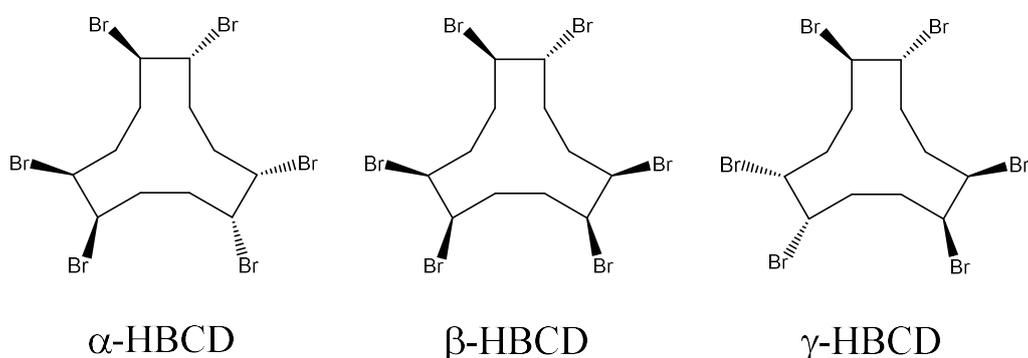


Figura 6 Diastereoisómeros principales del hexabromociclododecano (HBCD)

### 3.1.2. Usos y producción

El HBCD está en el mercado mundial desde la década de 1960, pero su uso en la producción de materiales de poliestireno ignífugos comenzó en la década de 1980 (ECB, 2008). El HBCD es el tercer BFR más utilizado, después del tetrabromobisfenol A (TBBPA; más de la mitad del mercado), y el decaBDE (Morose, 2006).

El HBCD es altamente eficaz a bajas concentraciones, y se añade en la espuma de poliestireno expandido (EPS) y la espuma de poliestireno extruido (XPS). EPS y XPS se utilizan principalmente como componente de placas de aislamiento térmico en la construcción, que contienen aproximadamente 0,5% en peso de HBCD en el producto final (Morose, 2006). El HBCD también puede ser utilizado como retardante de llama en el revestimiento de textiles para muebles tapizados, donde la máxima concentración de HBCD puede llegar al 30% (Morose, 2006; ECHA, 2009). Además, el HBCD se utiliza en la producción de poliestireno de alto impacto (HIPS) destinado a aparatos eléctricos y electrónicos tales como equipos audio-visuales, y en algunas aplicaciones de alambre y cable (Morose, 2006; ECHA, 2009). Finalmente, menos del 1% de la utilización comercial y de consumo total de HBCD es para los tejidos, textiles y prendas de vestir.

La formulación técnica comercial del HBCD alcanzó una producción anual global de 16.700 toneladas en 2001. La mayor parte del consumo fue de la UE con 9500 t (57%). La producción mundial de HBCD se elevó a 22.500 t en 2007, donde el amplio consumo de la UE, de 11.600 t (51.6%), seguía constituyendo la mayor parte de la demanda mundial (ECHA, 2009).

### 3.1.3. Regulación

Debido a su persistencia en el medio ambiente, bioacumulación, biomagnificación en la cadena trófica y toxicidad, así como por su transporte, la Convención de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (POP) decidió registrar el HBCD en el Anexo A (Convención de Estocolmo, 2013), lo que supone la obligación de prohibir la fabricación y uso del HBCD a corto plazo. Así, el HBCD es considerado como una sustancia extremadamente preocupante y, en consecuencia, su producción y uso a partir de ese momento deben estar sujetos a autorización, la cual se concederá siempre y cuando se considere que los beneficios socioeconómicos compensen los riesgos para la salud humana o el medio ambiente y no hayan sustancias o tecnologías alternativas adecuadas (ECHA, 2009). De tal manera que, aunque el HBCD se ha clasificado como POP, su uso en espumas de poliestireno para aislamiento en la construcción deberá estar completamente restringido antes del 2024 (Convención de Estocolmo, 2013).

Por otro lado, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos llegó a la conclusión de que la toxicidad del HBCD necesita ser evaluada con mayor profundidad para caracterizar los riesgos de salud relacionados con su exposición a nivel ocupacional y de consumo, incluyendo la exposición de la población general a través de la ingestión de partículas de HBCD liberadas en el medio ambiente (US EPA, 2015).

#### **3.1.4. Exposición**

Como resultado de su liberación al medio ambiente, su persistencia y bioacumulación y como consecuencia de ello su biomagnificación en los organismos vivos (Stockholm Convention, 2013; Koch et al., 2015) se pueden detectar niveles de HBCD en todas las matrices del medio ambiente (EFSA, 2011a, b).

En los seres humanos hay dos vías principales de exposición al compuesto (Fromme et al., 2016). Una de ellas es la dieta, siendo especialmente significativos aquellos alimentos de origen animal con alto contenido en lípidos (Covaci et al., 2006). Una vez alcanza el tracto gastrointestinal, el HBCD alcanza la circulación para, finalmente, distribuirse al resto de tejidos del organismo. Un estudio sobre exposición a través de la dieta en población noruega mostró unos niveles de exposición de 0.3 ng/kg p.c./día, cuyo origen se debe principalmente al consumo de pescado rico en grasas (Knutsen et al., 2008; Fromme et al., 2016). En otro estudio realizado sobre población holandesa con un alto consumo en pescado y moluscos, se estimó una ingesta de 0.12 ng/kg p.c./día. Se encontraron valores similares en estudios relacionados en Francia y en Suecia, con 0.21 y 0.14 ng/kg p.c., respectivamente (Rivière et al., 2014; Törnkvist et al., 2011; Fromme et al., 2016); y superiores en estudios realizados en Bélgica, Reino Unido y España, concretamente ingestas de 0.99, 5.9 y 2.6 ng/kg p.c., respectivamente (Gosciny et al., 2011; FSA, 2006; Eljarrat et al., 2014; Fromme et al., 2016). La segunda vía de entrada del HBCD es a través de partículas liberadas de materiales que contienen HBCD (3.1.2. Usos y producción). Un estudio en el que se evaluó la concentración en diferentes ambientes, demostró que este retardante de llama es más abundante en el interior de edificios y medios de transporte, que al aire libre (Abdallah et al., 2008).

Por otro lado, la exposición es especialmente relevante durante la infancia, al permanecer largos periodos de tiempo en contacto con el suelo y transferirse partículas desde las manos, los juguetes u otros materiales a la boca (Covaci et al., 2006), lo que provoca una exposición más alta a HBCD: la ingesta diaria estimada de HBCD en edad infantil es de 403,8 ng/día y 1473,1 ng/d, en comparación con los 131 ng/d y 328,7 ng/d para los adultos, en escenarios de entrada de partículas media y alta para cada grupo, respectivamente (Abdallah et al., 2008). Esta diferencia por edades también se puso de manifiesto en otros estudios donde se estimaron ingestas diarias de HBCD, entre 1.9 ng/kg p.c. y 7.6 ng/día en edad

infantil, frente a 0,15 ng/kg p.c. y 6.0 ng/d en edad adulta en población alemana y sueca respectivamente (Fromme et al., 2016; de Wit et al., 2012). Un estudio de cohorte que comparó la ingesta por distintas vías entre madres e hijos corroboró esta tendencia: se estimaron valores medios de ingesta de 11 y 3.4 ng/día procedentes de la dieta y a través del polvo en madres, respectivamente; frente a 5 y 6.9 ng/día en edad infantil (Sahlström et al., 2014). Como se puede observar, a través de la dieta, la ingesta es mayor en las madres, mientras que a través del polvo, es mayor en edad infantil.

No disponemos de información suficiente sobre la tendencia en las concentraciones del HBCD en muestras humanas. De hecho, para llevar a cabo una evaluación adecuada de la situación actual de los retardantes de llama, es necesaria una recopilación de datos exhaustiva que permita trazar tendencias temporales en lo que respecta a las concentraciones detectadas en las distintas matrices entre países (Law et al., 2014).

Como consecuencia de la exposición, se han detectado niveles de HBCD en suero (Rawn et al., 2014b; Thomsen et al., 2008), tejido adiposo humano (Malarvannan et al., 2013), leche materna (Shi et al., 2013; Asante et al., 2011), hígado y placenta (Rawn et al., 2014a). Además, los resultados toxicocinéticos sugieren que el HBCD se absorbe fácilmente y se distribuye rápidamente a los diferentes tejidos cuando la exposición es por vía oral, con una vida media estimada de 64 días en el tejido adiposo (Geyer et al., 2004).

### 3.1.5. Efectos sobre la salud

Según su clasificación y etiquetado del HBCD, es susceptible de perjudicar la fertilidad o dañar al feto (H361), pudiendo incluso causar daño a lactantes (H362) (Figura 7) (ECHA, 2008).



Figura 7 Pictograma para la clasificación y etiquetado de HBCD como peligroso para la salud (ECHA, 2008).

La clasificación y etiquetado de HBCD obedece a los efectos observados en animales de experimentación expuestos a este retardante de llama, entre los cuales destacaron las alteraciones neuroendocrinas y la toxicidad en el desarrollo, relacionados ambos con la alteración del sistema tiroideo; así como efectos adversos en el hígado, la fertilidad y el sistema inmune (van der Ven et al., 2006; EFSA, 2011a). Estas observaciones se consideraron relevantes para la evaluación de riesgo para la salud humana (EFSA, 2011a).

Para llevar a cabo la caracterización del riesgo, las autoridades reguladoras estimaron los márgenes de exposición (MOEs) para distintos sectores de población Europea, clasificados por edad y/o exposición al HBCD. El Panel de la EFSA sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) consideró la alteración del comportamiento debido a defectos en el neurodesarrollo como una observación crítica y, en relación a ella, estableció un valor de carga corporal de 0.79 mg/kg p.c. en el modelado de la relación dosis-respuesta. Aunque en población general se consideró un riesgo aceptable, los lactantes, el grupo más expuesto con una exposición diaria de 0.60 - 213 ng/kg p.c., mostraron valores de MOEs que variaron desde los 5000 a los 14, siendo este último un valor muy cercano al 8, considerado el límite a partir del cual la exposición supone un riesgo para la salud (EFSA, 2011a).

#### **3.1.5.1. Estudios en humanos**

Disponemos de un número insuficiente de trabajos en los que se estudie su efecto en humanos. Un test de sensibilización dérmica no provocó reacción en ninguno de los sujetos sobre los que se aplicó (ECB, 2008) y otro estudio evaluó la relación entre la presencia de HBCD en la leche materna y los niveles de TSH, en ausencia de relaciones estadísticamente significativas (Eggesbø et al., 2011). También se evaluó la relación entre la concentración de BFRs y los niveles hormonales séricos en hombres. Los resultados mostraron una correlación inversa entre la exposición a HBCD y la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), y directa con el índice de andrógenos libre, calculado como la relación de testosterona frente a SHBG (Johnson et al., 2013). Por otro lado, un estudio con adolescentes investigó las asociaciones entre los niveles séricos de varios retardantes de llama y el rendimiento cognitivo, así como con los niveles séricos de hormonas tiroideas. Sin embargo, el HBCD no mostró asociaciones consistentes ni con el rendimiento en las pruebas neurocomportamentales, ni con los niveles hormonales (Kiciński et al., 2012). No obstante, se precisan de más estudios en humanos, por lo que se utilizaron los estudios en animales de experimentación para caracterizar la toxicidad del HBCD.

#### **3.1.5.2. Estudios experimentales**

La toxicidad aguda provocada por exposición a HBCD es muy baja. Concretamente, la dosis letal oral es mayor de 20 g/kg p.c. en ratas y mayor que 40 g/kg p.c. en ratones (ECB, 2008; EFSA, 2011a).

Tras la exposición a HBCD se observaron efectos en la glándula tiroides y su funcionamiento: hiperplasia, aumento de peso de la glándula, disminución de las hormonas T3 y T4 (van der Ven et al., 2006) e incremento de la TSH, así como hipertrofia de las células foliculares en estudios de 28 y 90 días (ECB, 2008). En estudios de desarrollo se detectaron efectos similares en la descendencia (Saegusa et al., 2009; EFSA, 2011a) y tanto en la descendencia como en la generación F0 en estudios de dos generaciones (Ema et al., 2008; EFSA, 2011a).

Otra de las dianas principales del HBCD es el hígado. Se observó un incremento del peso del hígado en ratas tratadas con HBCD durante 28 días con dosis desde 23 mg/kg p.c./día en hembras (CEDL en van der Ven et al., 2006), durante 90 días desde 100 mg/kg p.c./día tanto en hembras como en machos y en todas las generaciones (Ema et al., 2008; EFSA, 2011a). Este incremento de peso podría explicarse por el incremento en la inducción enzimática, efecto también relevante para el ser humano.

Los exámenes histopatológicos mostraron inducción del retículo endoplásmico hepático en ratas hembra (van der Ven et al., 2006), compatible con la inducción de CYP3A en hembras y CYP2B en machos (Germer et al., 2006, ECB, 2008), y una acumulación de depósitos de lípidos en ambos sexos (ECB, 2008). En un estudio de carcinogenicidad de 18 meses en ratones, se observó hinchazón de hepatocitos, degeneración, necrosis, formación de vacuolas, depósitos de lípidos focales, aunque las relaciones dosis-respuesta no fueron monotónicas (Ema et al., 2008; EFSA, 2011a).

La exposición a HBCD también provocó un incremento en la actividad T4-UGT (van der Ven et al., 2006) y la reducción del contenido total de retinol y palmitato de retinilo a las dosis más bajas ensayadas (van der Ven et al., 2006, 2009; ECB, 2008).

La fertilidad también se vio afectada por la exposición a HBCD: se observó una reducción significativa del número de folículos primordiales en hembras F1 de aproximadamente un 30%, disminución en el índice de fertilidad en ambas generaciones y un alto incremento dosis-dependiente de la mortalidad de las crías a la dosis más alta ensayada (Ema et al., 2008; EFSA, 2011a). Un estudio de una generación en ratas mostró en crías destetadas una disminución del peso de los testículos, de la próstata y el incremento de la distancia anogenital así como el retraso del 12% en la apertura vaginal a la dosis más alta (van der Ven et al., 2009).

Además de la alteración en hígado, en tiroides y en la reproducción, la exposición a HBCD también provocó la alteración en la homeostasis del hueso (van der Ven et al., 2009), efectos sobre el sistema inmune (Watanabe et al., 2010; van der Ven et al., 2009); incremento de peso de la glándula pituitaria (van der Ven et al., 2006) y trastornos del sistema nervioso (Eriksson et al., 2006; Saegusa et al., 2009; Lilienthal et al., 2009).

## 3.2. Decabromodifenil éter

### 3.2.1. Propiedades físico-químicas

El decaBDE es un compuesto altamente bromado, con una estructura molecular compuesta por dos anillos fenilos unidos por un enlace éter, que se encuentran halogenados en todas sus posiciones por 10 átomos de bromo. La formulación comercial se compone mayoritariamente de BDE-209 (número CAS: 1163-19-5), con fórmula química  $C_{12}Br_{10}O$  (Figura 8), y masa molecular de 959.2 g/mol. Su estado físico es un sólido blanquecino a temperatura ambiente con una densidad de  $3,36 \text{ g/cm}^3$ , una presión de vapor de  $4,63 \times 10^{-6} \text{ Pa}$  ( $21 \text{ }^\circ\text{C}$ ), razón por la cual también se considera un compuesto muy poco volátil, y un coeficiente de reparto octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de  $10^{6,3-12,6}$  ( $\log K_{ow} = 6,3-12,6$ ) y su solubilidad en agua es menor de  $1 \text{ mg/mL}$  a  $25^\circ\text{C}$  (ECHA, 2014).

Se ha comprobado que el decaBDE puede sufrir desbromación y transformarse con el paso del tiempo en otros congéneres menos bromados, que también son considerados contaminantes orgánicos persistentes. Por lo tanto, los procesos que intervienen en dicha degradación deben ser tenidos en cuenta a la hora de promover medidas de control frente a esos compuestos producto de la degradación (Christiansson, et al., 2009; ECHA, 2014).

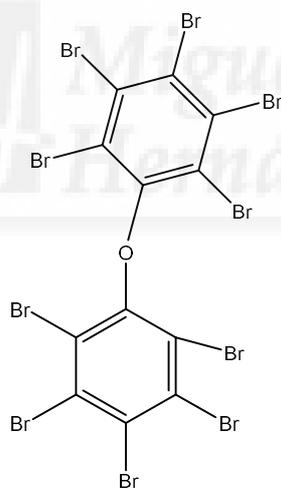


Figura 8 Fórmula del decaBDE

### 3.2.2. Usos y producción

Al igual que otros BFRs, el decaBDE se usa como aditivo retardante de llama, en este caso formando parte de equipos eléctricos y electrónicos, artículos de plástico y textiles, como tapicería (alfombras y asientos), o como partes de vehículos, tales como automóviles, entre otros. También se usan en el sector de la construcción y el minero (techados, adhesivos, selladores o revestimientos) (ECHA, 2014). No

hay información detallada sobre los volúmenes usados en cada una de estas actividades (ECB, 2002; VECAP, 2012; SVHC SD, 2012 en ECHA, 2014).

### 3.2.3. Regulación

El decaBDE no se produce en la Unión Europea desde el 1999 (ECB, 2002), de hecho su uso se debe a la importación del mismo, ya sea en forma de sustancia aislada o como parte de productos. A pesar de las directivas del Parlamento Europeo (Directiva 2003/11/CE, EU, 2003), la regulación del decaBDE no se resolvió hasta la aplicación de la Directiva 2011/65/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, que restringía el uso de equipos eléctricos y electrónicos con una concentración de decaBDE superior al 0.1% en peso.

En el 2012, el Comité de los Estados miembros (Reglamento (CE) n° 1907/2006, artículo 57), calificó el decaBDE como sustancia persistente, bioacumulable y tóxica, además de muy persistente y muy bioacumulable (letras d) y e) de dicho artículo). Además, ese mismo año se incluyó en la lista de posibles sustancias extremadamente preocupantes (SEP), con la posibilidad de ser incluido en el anexo XIV (Lista de Autorización) del Reglamento REACH (UE, 2017).

En el 2013, Noruega propuso incluir al decaBDE en el Convenio de Estocolmo. A raíz de esta petición, la Comisión Europea, por medio de la Agencia europea de compuestos químicos (ECHA), diseñó la propuesta de restricción de dicha sustancia.

En el año 2014, la ECHA y Noruega presentaron un expediente donde se puso de manifiesto la necesidad de adoptar medidas a escala de la Unión para hacer frente a los riesgos derivados de la fabricación, la comercialización y el uso del decaBDE sobre la salud. El Comité de Evaluación de Riesgos (RAC) aceptó dicho expediente confirmando todos los efectos irreversibles y a largo plazo planteados, y reconociendo junto al Comité de Análisis Socioeconómico (SEAC), que la restricción en su uso reduciría las emisiones (UE, 2017).

Estos dictámenes, diseñados por el RAC y el SEAC, se presentaron a la Comisión en el 2015, que consideró que la fabricación, el uso y la comercialización del decaBDE, supone un riesgo inaceptable para la salud humana y el medio ambiente. No obstante, dadas las incertidumbres respecto al reciclado y la gestión de los residuos con decaBDE, se aplaza la puesta en vigor de la restricción por un periodo mayor de 18 meses (UE, 2017).

Se prevé la prohibición en la fabricación y comercialización del decaBDE como tal después del 2 de marzo del 2019. A partir de esta fecha, no se usará para producir otras sustancias, mezclas o artículos con una concentración igual o superior al 0.1% en peso, quedando exentas de esta normativa la producción de aeronaves antes del 2 de marzo del 2027, la producción de vehículos cuya regulación esté amparada previamente por otros reglamentos o directivas y aquellos artículos fabricados antes del 2 de marzo de 2019 (UE, 2017).

#### **3.2.4. Exposición**

A pesar de las restricciones, los productos que lo contienen son de consumo duradero y siguen siendo utilizados, por eso el decaBDE, entre otros PBDEs, continuarán liberándose al medio ambiente durante las próximas décadas (Danon-Schaffer et al., 2013).

Al ser un contaminante ubicuo, ya que está presente en sedimentos, biota y adherido a partículas suspendidas en la atmósfera y ambientes de interior, el ser humano está expuesto al BDE-209 por múltiples vías. La ingesta es la vía principal, en especial cuando se trata de alimentos de origen animal (EFSA, 2011c). No obstante, en aquellos países donde se han usado en mayor cantidad, como es el caso de EEUU, la vía principal de exposición es a través de partículas en ambientes cerrados (US EPA, 2010; Fromme et al., 2016), como en los coches o en el interior de la vivienda. De esto se deriva que la exposición es especialmente relevante durante la infancia (Stapleton et al., 2012; Johnson-Restrepo y Kannan, 2009; US EPA, 2010) y cuya exposición se estimó en el rango de 0.5 a 80 ng/kg p.c. (EFSA, 2011c). El congénere BDE-209 fue el más abundante de todos los que se detectaron en un estudio llevado a cabo sobre el polvo del interior de las casas, ya que representó el 90% de todos los PBDEs analizados (entre 219 y 386 ng/g de partículas de polvo) (Król et al., 2014; Fromme et al., 2014). En todos estos ambientes, donde la exposición por vía inhalatoria es significativa (Strid et al., 2014), el tamaño de partícula es un factor clave a la hora de discriminar entre la exposición inhalatoria o por ingesta. Concretamente, podemos distinguir entre partículas respirables ( $<4\mu\text{m}$ ), que pueden penetrar hasta las regiones más profundas del sistema respiratorio, y partículas inhalables ( $>4\mu\text{m}$ ), que se depositan en la parte superior del tracto respiratorio y finalmente son ingeridas (La Guardia et al., 2017). El BDE-209 también forma parte de la contaminación atmosférica, tanto de zonas altamente pobladas como rurales, como demuestra un estudio realizado en China donde se encontró a una concentración de 58,5 y 34,2  $\text{pg}/\text{m}^3$  de aire respectivamente (He et al., 2014).

En aquellos países donde se han utilizado menores cantidades de BDEs, como los europeos, la vía de exposición a BDE-209 es más significativa a través de la dieta, concretamente de productos de origen animal (Domingo, 2012). También se detectaron niveles de BDE-209 en tejido graso, tanto en adultos

como en niños. En un estudio realizado con población general del Reino Unido, se detectó este congénere a concentraciones de 15 ng/g de lípido en suero (Thomas et al., 2006) y en población consumidora de pescado del lago Mjøsa (Noruega), 2,4 ng/g lípido en hombres y 2,3 ng/g lípido en mujeres en el percentil 95 (Thomsen et al., 2008).

De todos los grupos de población europea que participaron en encuestas sobre alimentación, el grupo con mayor ingesta fue el de edad infantil (entre 1 y 3 años), con 2.90 y 17.6 ng/kg p.c./día, en el límite inferior y superior del grupo, respectivamente. Esto dio lugar a un MOE de alrededor de 97000, siendo incluso mayor en el resto de grupos.

Sin embargo, las poblaciones cercanas a las plantas de reciclaje de componentes electrónicos (Jin et al., 2009; Zheng et al., 2015) y aquellos trabajadores que aplican los BFRs, por ejemplo, en mobiliario (Stapleton et al., 2008; Chen et al., 2014), son los sectores donde se detectan los niveles más elevados de BDE-209 y otros congéneres en comparación con la población general (US EPA, 2008): desde 4,8 ng/g hasta 340 ng/g en peso de lípido en trabajadores de plantas de reciclaje de productos electrónicos, en Suecia y Guiyu (China), respectivamente (US EPA, 2008; Bi et al., 2007).

### **3.2.5. Efectos sobre la salud**

La clasificación y etiquetado del decaBDE muestra una ausencia de frases de peligrosidad H (ECHA, 2017).

Sin embargo, y a pesar de lo anterior, el decaBDE es una sustancia vigilada cuyo uso se encuentra en continuo proceso de regulación. La motivación principal de estas iniciativas legales por parte de las autoridades reguladoras es la tendencia de este compuesto a transformarse en PBDEs menos bromados, más móviles y tóxicos, como por ejemplo el octaBDE o el pentaBDE, ya sea en el propio organismo por procesos de biotransformación (Huwe and Smith, 2007; Stapleton et al., 2004; Noyes et al., 2011) o en el medio abiótico por procesos físicos (Söderström et al., 2004).

De hecho, al contrario que el decaBDE, el octaBDE está clasificado como una sustancia que puede suponer un grave peligro para la salud (Figura 7). Concretamente puede dañar al feto y se sospecha que también pueda dañar la fertilidad (H360Df). Asimismo, el pentaBDE, puede suponer un grave peligro para la salud, dado que puede causar daño a lactantes (H362) y a los órganos por exposición prolongada o repetida (H373). Además es peligroso para el medio ambiente (Figura 9). Concretamente, el pentaBDE es muy tóxico para la vida acuática (H400), con efectos duraderos a largo plazo (H410).



Figura 9 Pictogramas para la clasificación y etiquetado de pentaBDE como peligroso para el medio ambiente y para la salud (ECHA, 2017b).

El Panel CONTAM de la EFSA, tras evaluar los resultados obtenidos de una de las vías de exposición más comunes entre la población, es decir, a través de la ingesta de partículas de polvo, se determinó que dichos niveles de exposición estaban situados muy por debajo del límite inferior de la dosis crítica obtenida mediante modelado dosis-respuesta para el BDE-209, es decir, 1.7 mg/kg p.c./día, por lo que consideró que este retardante de llama no es preocupante para la salud (EFSA, 2011c).

Por todo ello, y de acuerdo a las notificaciones facilitadas por las empresas a la ECHA, el decaBDE no está clasificado. No obstante, durante los últimos años ha sido sometido a distintas evaluaciones con el objetivo de lograr una regulación efectiva.

#### **3.2.5.1. Estudios en humanos**

La exposición al decaBDE se ha asociado con el deterioro del desarrollo neurológico en niños (Chao et al., 2011; Gascon et al., 2012), con alteración de la función motora y los niveles de hormona tiroidea en adolescentes (Kicinski et al., 2012) y con problemas de fertilidad (Den Hond et al., 2015). Por lo tanto, el desarrollo y la infancia son etapas de máxima preocupación con respecto a la exposición a decaBDE (Convenio de Estocolmo, 2014).

#### **3.2.5.2. Estudios experimentales**

A los efectos provocados en el hígado, se le suman los efectos cada vez mejor estudiados sobre el desarrollo neurológico, el sistema reproductor, el sistema inmunológico, así como sobre los sistemas hormonales tiroideos y retinoide (Costa y Giordano, 2011; Lee et al., 2010; van der Ven et al., 2008a; EFSA, 2011c). El decaBDE ha sido clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés) dentro del grupo 3 (EFSA, 2011c), no obstante, el dictamen de la UE (EU, 2008) concluyó que aún se necesitan más estudios sobre la exposición al decaBDE y su toxicidad.

Diversos estudios con animales de experimentación a los que se expuso a decaBDE, mostraron indicios del carácter alterador endocrino de este retardante de llama (EFSA, 2011c; Tseng et al., 2006, 2008, 2011). Estos estudios mostraron efectos en la reproducción, tanto a nivel de tejidos como metabólico: disminución del peso absoluto de los testículos, anomalías espermáticas, estrés oxidativo, daño al ADN de la cromatina y alteración de la histopatología testicular (Tseng et al., 2011), disminución del peso del epidídimo y aumento del peso de la vesícula seminal (Van der Ven et al., 2008a), y alteración de la espermatogénesis y de los niveles de testosterona (Miyaso et al., 2014). Además de los efectos en la reproducción a diversos niveles, la exposición a decaBDE también se asoció con la alteración de los niveles de hormonas tiroideas en suero, de la estructura de la glándula tiroides (Tseng et al., 2008; Van der Ven et al., 2008a; Lee et al., 2010), así como del metabolismo y señalización de los retinoides (van der Ven et al., 2008a).

El efecto más frecuente en estudios con ratas tras la exposición a decaBDE fue la alteración hepática. Entre los efectos hepáticos observados, destacan la hipertrofia centrilobular (ECB, 2002; Van der ven et al., 2008a; Tseng et al., 2008; Fujimoto et al., 2011; Sakamoto et al., 2013), vacuolización (Sakamoto et al., 2013; Feng et al., 2015) y hepatomegalia (Lee et al., 2010; Feng et al., 2015). También se observó hígado graso, degeneración vascular hepatocítica (ECB, 2002; Lee et al., 2010) e infiltración inflamatoria y focal (Lee et al., 2010; Feng et al., 2015), así como un aumento de la carcinogenicidad y proliferación de adenomas a un nivel de exposición superior a la dosis límite (ECB, 2002; Sakamoto et al., 2013).

## 4. MODULADORES DEL AHR

### 4.1. Receptor arilo de hidrocarburos

El AhR es un factor de transcripción perteneciente a la familia hélice-bucle-hélice básica (bHLH) Per-Arnt-Sim (PAS) capaz de unir ligandos endógenos y exógenos. Se relaciona con la regulación transcripcional en numerosos procesos fisiológicos y patofisiológicos, así como con el metabolismo de xenobióticos (Nebert y Dalton, 2006), crecimiento perinatal (Fernández-Salguero et al., 1995; Mimura et al., 1997), fertilidad (Abbott et al., 1999; Baba et al., 2005), desarrollo vascular y hepático (Schmidt et al., 1996; Lahvis et al., 2000; Lund et al., 2003), autoinmunidad (Veldhoen et al., 2008), hematopoyesis (Schmidt et al., 1996; Singh et al., 2011) y cáncer (Shimizu et al., 2000).

Muchas proteínas PAS están implicadas en la regulación de las respuestas a señales ambientales, como la luz, la hipoxia, el estado de oxidación-reducción y ritmos circadianos (McIntosh et al., 2010). Se ha documentado un amplio espectro de efectos fisiológicos en animales AhR<sup>-/-</sup> y en animales expuestos a sustancias que interfieren en las vías de acción del AhR. Esto sugiere que la interferencia con la regulación endógena de la vía del AhR, puede alterar a su vez diferentes respuestas fisiológicas en diferentes tejidos y tipos de células. Este receptor también regula la expresión de una serie de enzimas de desintoxicación, siendo el CYP1A1 la enzima con una mayor regulación positiva asociada. De hecho la activación del AhR se evalúa habitualmente determinando niveles de CYP1A1, tales como expresión de ARNm, nivel de proteína o actividad enzimática (Andreola et al., 1997; Nishimura et al., 2005).

### 4.2. Activación del AhR

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los activadores del AhR mejor conocidos es la 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD). Es el compuesto más estudiado dentro del grupo de hidrocarburos aromáticos halogenados (Kransler et al., 2007).

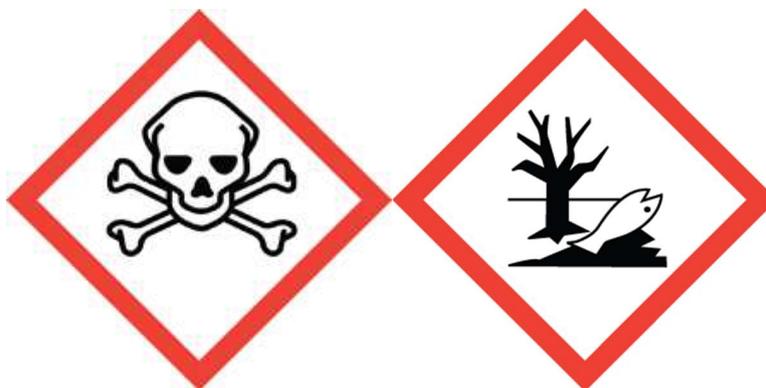


Figura 10 Pictogramas para la clasificación y etiquetado de TCDD como tóxico agudo y muy tóxico para la vida acuática (ECHA, 2016)

Es fatal si se ingiere (H300), muy tóxico para la vida acuática (H400), con efectos nocivos duraderos (H410) y causa irritación ocular grave (H319) (Figura 10). Se trata de un compuesto orgánico persistente que junto con otros contaminantes activadores del AhR, como bifenilos policlorados (PCB) similares a dioxinas o dibenzofuranos policlorados (PCDFs), provocan una activación descompensada e inapropiada del receptor, desencadenan como consecuencia un amplio rango de manifestaciones tóxicas, que incluyen el síndrome de desgaste, alteración endocrina, cloracné, inmunosupresión, atrofia tímica, alteración del desarrollo, hepatotoxicidad, teratogénesis, promoción tumoral y deterioro del sistema retinoide (Poland y Knutson, 1982; Pohjanvirta y Tuomisto, 1994; Birnbaum y Tuomisto, 2000; Mandal, 2005).

#### **4.3. IMA-08401 e IMA-07101**

Sin embargo, algunas de las consecuencias fisiológicas de la activación del AhR podrían considerarse positivas para el organismo e incluso contar con potencial terapéutico (Zhu et al., 2014) si se excluyeran los efectos tóxicos inherentes a la exposición a compuestos semejantes a la dioxina.

Lograr una activación controlada del AhR carente de la respuesta tóxica asociada abriría la posibilidad de combatir enfermedades inflamatorias de la piel, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis o el cáncer (Arsenescu et al., 2011; Benson y Shepherd, 2011; Díaz-Díaz et al., 2016; Furumatsu et al., 2011; Haas et al., 2016; Jin et al., 2014; Quintana et al., 2008; Van Den Bogaard et al., 2013).

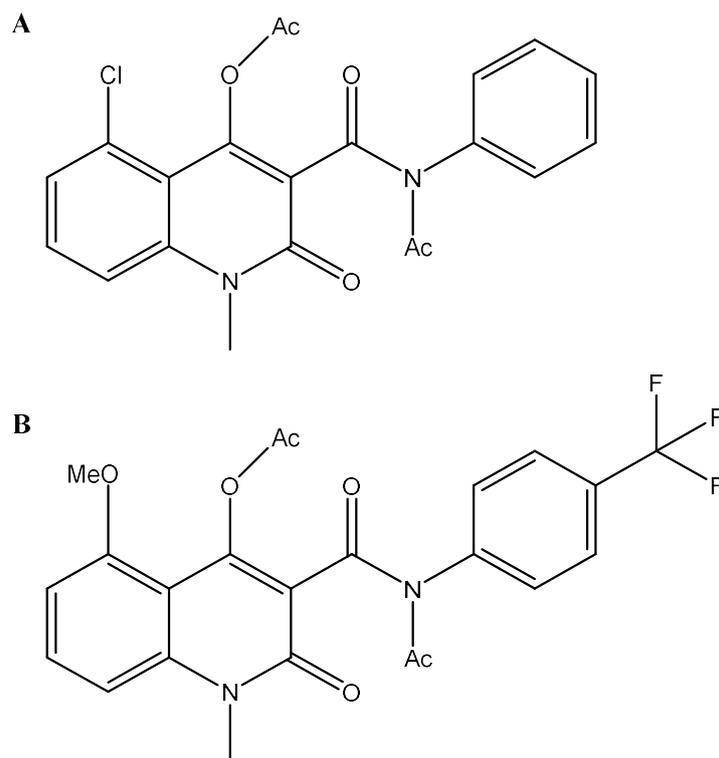


Figura 11 A) IMA-08401 (C2; N-acetyl-N-phenyl-4-acetoxy-5-chloro-1,2-dihydro-1-methyl-2-oxo-quinoline-3-carboxamide; CAS: 1373260-17-3). B) IMA-07101 (C4; N-acetyl-N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-acetoxy-1,2-dihydro-5-methoxy-1-methyl-2-oxo-quinoline-3-carboxamide; CAS: 1373259-76-7).

Se han propuesto dos moduladores del AhR como potenciales fármacos que provoquen los efectos deseados derivados de la activación del AhR: IMA-08401 e IMA-07101, precursores de los metabolitos activos de los fármacos inmunomoduladores laquinimod y tasquinimod (Figura 11). Entre las observaciones que se tuvieron en cuenta para la evaluación de dichos compuestos se encuentra el sistema retinoide y su posible alteración, partiendo de que este es un efecto típico observado tras la activación del receptor previa exposición a dioxinas (Fletcher et al., 2001; Hoegberg et al., 2003; Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003b).

Está aceptado que numerosos tipos de sustancias químicas, entre ellos varios de los que se sospecha que se comportan como alteradores endocrinos, pueden alterar el sistema retinoide (revisado en Nilsson y Håkansson, 2002; Novák et al., 2008; Shmarakov, 2015 y Zile, 2001). No obstante, los mecanismos que llevan asociados estas alteraciones aún no se han descrito en detalle. Por ejemplo, ningún estudio ha descrito la alteración del sistema retinoide poniendo el foco en el ácido todo-*trans*-retinoico y sus metabolitos, o en aquellos genes con un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis del sistema retinoide en relación con la exposición a compuestos químicos. Mejorar nuestro conocimiento en

relación a estas observaciones, permitiría interpretar las reducciones de formas retinoides hepáticas a dosis bajas, así como el significado toxicológico de este fenómeno. La importancia del sistema retinoide por su participación en procesos vitales del desarrollo del organismo (ver sección 2. *Sistema retinoide*), así como por su posible papel en la evaluación de los aspectos biológicos y toxicológicos de la alteración endocrina (OECD, 2012), hace que llevar a cabo esos estudios sea una prioridad.

Los estudios llevados a cabo con los dos primeros compuestos son extensiones de dos estudios previos de toxicidad con dosis repetidas de HBCD y decaBDE durante 28 días en ratas Wistar (van der Ven et al., 2006 y van der Ven et al., 2008a, respectivamente), en los que se puso especial atención en la relación dosis-respuesta a niveles de exposición relevantes en términos ambientales. El objetivo de estos dos estudios se centra en la expresión de los genes implicados en la homeostasis y señalización del ácido retinoico, así como en las concentraciones asociadas de los retinoides de transporte, de almacenamiento y de señalización en el hígado (Figura 5). Otro de los objetivos consiste en identificar modulaciones específicas de sexo a niveles relevantes en humanos, y estimar los MOEs en escenarios de exposición en humanos obtenidos de la literatura.

El tercer estudio se realizó para caracterizar los efectos producidos tras la exposición a dos derivados de fármacos inmunomoduladores, ligandos del receptor arilo de hidrocarburos. Concretamente se centró en la determinación las concentraciones de retinoides de transporte, de almacenamiento y de señalización en el hígado, riñón y suero de ratas macho Sprague-Dawley con la intención de evaluar si la activación del AhR por estos ligandos va acompañada de los efectos tóxicos típicos derivados de la misma.

## 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis general alrededor de la cual gira el presente estudio es que la exposición al decaBDE, al HBCD y a dos precursores de los metabolitos del laquinimod y el tasquinimod provoca la alteración del sistema retinoide en ratas dependiente de compuesto y sexo.

A partir de dicha hipótesis, se plantea el siguiente objetivo principal:

El presente estudio se realizó para proporcionar información más detallada sobre el efecto de la exposición a distintos xenobióticos en el sistema retinoide, concretamente a HBCD, a decaBDE y a dos moduladores sintéticos del AhR.

Este objetivo, a su vez, se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar los efectos del HBCD sobre las concentraciones hepáticas de retinoides de ambos sexos de ratas Wistar tratadas durante 28 días.
2. Conocer si las concentraciones hepáticas de retinoides de ambos sexos de ratas Wistar se modularon tras la exposición a decaBDE durante 28 días.
3. Identificar genes implicados en el sistema retinoide cuyas expresiones hepáticas estén alteradas tras la exposición al HBCD en ambos sexos de ratas Wistar tratadas durante 28 días.
4. Comprobar si se produce la alteración de la expresión de genes implicados en el sistema retinoide tras la exposición al decaBDE en ambos sexos de ratas Wistar tratadas durante 28 días.
5. Evaluar si las concentraciones de retinoides en hígado, riñón y suero de ratas Sprague-Dawley se alteraron tras el tratamiento durante 5 días consecutivos con IMA-08401 e IMA-07101, precursores de los metabolitos de laquinimod y tasquinimod, respectivamente, que activan el AhR.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1.1. Animales y diseño del estudio

#### HBCD

El diseño del estudio se describió en detalle en Van der Ven et al., 2006. En resumen, el estudio con animales se llevó a cabo en el RIVM, tras la aprobación por el Comité institucional de experimentación animal de acuerdo con la legislación holandesa bajo las normas de calidad ISO 9001-2000. El estudio se diseñó de acuerdo a los estudios de toxicidad con dosis repetidas durante 28 días (OECD, 2008), para detectar efectos en el sistema endocrino y optimizado para la evaluación dosis-respuesta mediante el abordaje por modelado de la relación dosis-respuesta (BMD, benchmark dose modelling). La formulación técnica de HBCD, disuelta en aceite de maíz, se administró a ratas Wistar machos y hembras (11 semanas de edad) a dosis de 0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 o 200 mg/kg pc/d por sonda como parte de un estudio de toxicidad por dosis repetidas durante 28 días con 5 ratas/sexo/dosis.

#### DecaBDE

El diseño del estudio se describió en detalle en Van der Ven et al., 2008a. En resumen, el estudio con animales se llevó a cabo en el RIVM, tras la aprobación por el Comité institucional de experimentación animal de acuerdo con la legislación holandesa bajo las normas de calidad ISO 9001-2000. El estudio se diseñó de acuerdo al método de ensayo OECD 407 como parte del proyecto EU-FIRE (QLTR-2001-00596). La emulsión para la administración del decaBDE se basó en un protocolo diseñado por la Dra. Anna Sandholm-Mörck (Mörck et al., 2003), para mejorar la absorción gástrica. El compuesto se administró por sonda a ratas Wistar machos y hembras (11 semanas de edad) a dosis de 1.87, 3.75, 7.5, 15 y 30 mg/kg pc/d como parte de un estudio de toxicidad por dosis repetidas durante 28 días con 5 ratas/sexo/dosis, utilizando un diseño de estudio con el abordaje de la relación dosis-respuesta.

#### Moduladores del AhR

El diseño del estudio se describió en detalle en Mahiout et al., 2017. Se usaron ratas macho Sprague-Dawley (aproximadamente 9 semanas de edad). El estudio fue autorizado por el Consejo Nacional de Experimentación Animal en Finlandia (Eläinkoelautakunta, ELLA; código de licencia del proyecto: ESAVI/6882/04.10.03/2012). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y el Consejo. Se hizo un estudio de toxicidad subaguda para explorar las propiedades y la toxicidad de los compuestos C2 y C4 tras la administración repetida durante 5 días consecutivos a dosis de 100 mg/kg pc/día para el C2 y 75 mg/kg pc/día para C4. Se usaron de 5 a 6 animales por grupo.

### 6.1.2. Compuestos químicos

Los reactivos empleados para la determinación de retinoides en muestras de hígado se describen a continuación. Los estándares internos como la acitretina y el acetato de retinilo, fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química (Madrid, España). Los disolventes empleados de pureza adecuada para el análisis por HPLC fueron acetato amónico y *n*-hexano, suministrado por Panreac (Barcelona, España) e isopropanol y cloroformo de calidad para HPLC de Scharlab (Barcelona, España). Además, los disolventes metanol y etanol ambos también con calidad para HPLC, fueron suministrados por J.T.Baker (Center Valley, USA). El agua desionizada utilizada durante el proceso, fue purificada por un módulo Milli Q (Millipore, Molsheim, Francia). El resto de reactivos necesarios fueron suministrados por proveedores locales.

#### HBCD

La formulación técnica de HBCD contenía tres enantiómeros, i.e. HBCD- $\alpha$  10.3%,  $\beta$  8.7%, y  $\gamma$  81% (y trazas de tetra y pentabromociclododecano) como se describe más arriba (van der Ven et al., 2006; 2008). La formulación se obtuvo a través del Bromine Science and Environmental Forum (BSEF, Dr. Klaus Rothenbacher).

#### DecaBDE

La formulación técnica de decaBDE se obtuvo como un compuesto de porciones iguales de tres productos comerciales del fabricante (Albermarle Corporation, Great Lakes Chemical Corporation, y Bromine Compounds Limited) a través del Bromine Science and Environmental Forum (BSEF; con la colaboración del Dr. Klaus Rothenbacher) para llevar a cabo el experimento descrito previamente basado en esta formulación de decaBDE purificada de dioxinas, dibenzofuranos y otras moléculas coplanares (Van der Ven et al., 2008a). La formulación purificada contenía entre 97 y 98% de decaBDE (BDE-209) con trazas de nona y octabromodifenil éteres.

#### Moduladores del AhR

Los compuestos del ensayo C2 (IMA-08401; N-acetyl-N-phenyl-4-acetoxy-5-chloro-1,2-dihydro-1-methyl-2-oxo-quinoline-3-carboxamide; CAS: 1373260-17-3) y C4 (IMA-07101; N-acetyl-N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-acetoxy-1,2-dihydro-5-methoxy-1-methyl-2-oxo-quinoline-3-carboxamide; CAS: 1373259-76-7) se sintetizaron siguiendo el proceso descrito por Pettersson (2012) (en Mahiout et al., 2017). Las soluciones stock de ambas soluciones para el estudio *in vivo* se prepararon mezclando los compuestos con PEG-400 (Ph. Eur. grade, SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) y calentándolos durante 1h en un baño a 80°C. Las diluciones se prepararon a partir de los stocks con PEG-400.

### **6.1.3. Análisis de retinoides**

#### **6.1.3.1. Instrumentación**

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó en el HPLC Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), sistema equipado con un inyector automático (G1313A) y con un compartimento de columna termostaticado (G1316A). Los analitos se detectaron mediante un sistema de detección de longitud de onda variable de VWD (G1316A). Se empleó el software HPCHEM AGILENT para controlar el cromatógrafo.

#### **6.1.3.2. Método de análisis**

Se ha seguido un protocolo adaptado del establecido por Schmidt et al., 2003a, donde se determinaron y cuantificaron los retinoides por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Las rectas de calibrado fueron lineales en las concentraciones halladas en muestras biológicas procedentes de animales de experimentación. La precisión y exactitud de las muestras control mostraron coeficientes de variación menores del 10%. Los límites de detección para las concentraciones de retinoides en hígado y riñón fueron de 0,5 pmol/g para ácido 13-*cis*-retinoico, 0,6 pmol/g para ácido todo-*trans*-retinoico, 1 pmol/g para ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dh-retinoico y ácido 4-OH-todo-*trans*-retinoico y 5,6 pmol/g para retinol y palmitato de retinilo (Schmidt et al., 2003a). El límite de detección para las concentraciones de retinoides en suero fue de 0,3 pmol/ml para el ácido todo-*trans*-retinoico, 0,4 pmol/ml para ácido 13-*cis*-retinoico, 0,6 pmol/ml para ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dh-retinoico y 4,2 pmol/ml para retinol y palmitato de retinilo (Schmidt et al., 2003a). Experimentalmente, con el presente método se confirmaron concentraciones en el límite inferior de las distribuciones estadísticas de retinoides procedentes de muestras biológicas de 1,66 pmol/ml de ácido todo-*trans*-retinoico, 0,175 pmol/ml de retinol y 0,02 pmol/ml de palmitato de retinilo con exactitud y precisión con variaciones menores al 10%. Todo el proceso se hizo en rigurosa oscuridad y en frío, debido a la fotolabilidad de los retinoides.

<b>RESUMEN DE RESULTADOS DE EXACTITUD Y PRECISIÓN INTRADÍA</b>			
<b>Retinoide</b>	<b>Concentración</b>	<b>% Exactitud</b>	<b>% Precisión</b>
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/ml)	1.7	98.7	10
	13.3	105	8.5
	33.3	96.7	2.8
Ácido 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidroretinoico (pmol/ml)	1.6	109.5	4.2
	6.3	109.5	6.3
	63.2	104.3	4.7
	126.4	97.7	8.2
Retinol (nmol/ml)	0.2	107.5	2.1
	1.7	102.4	3.7
	3.5	110	2.2
	7	108.2	3.9
	10.5	105.8	2.1
Palmitato de retinilo (nmol/ml)	0.02	104.7	1.2
	0.1	102.1	2.1
	1.9	109	3.2
	13.3	100.4	5.4
	28.6	98.5	5.1

<b>RESUMEN DE RESULTADOS DE EXACTITUD Y PRECISIÓN INTERDÍA</b>			
<b>Retinoide</b>	<b>Concentración</b>	<b>% Exactitud</b>	<b>% Precisión</b>
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/ml)	1.7	101.7	6
	3.3	108.6	4.4
	13.3	101.4	4.9
	33.3	100.3	5.8
Ácido 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidroretinoico (pmol/ml)	6.3	101.1	10
	63.2	96.1	2.5
Retinol (nmol/ml)	3.5	109.1	0.8
	34.9	101.1	0.7
Palmitato de retinilo (nmol/ml)	0.02	109.1	9.7
	0.1	108.3	1.2
	1.9	104.9	3.6
	19.1	88.5	3.5

### Preparación de la muestra y extracción líquida

Las muestras de hígado (300 mg) congeladas a -80 °C se homogenizaron IKA RW 20 digital (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) con 300 µl de agua MilliQ (1:1, w/w) Potter S. Del homogenizado se transfirió 400 µl a un tubo COREX de ensayo donde se añadió 1.6 ml de isopropanol, 100 µl de estándar interno acetato de retinilo (100 µg/mL en etanol), que es el estándar interno de las especies más apolares, y 100 µl de todo-*trans*-acitretina (20 ng/mL en etanol), que es el estándar interno de las especies más polares. Seguidamente, se agitó durante 5 segundos en vórtex y 5 minutos en agitador mecánico.

Seguidamente se centrifugaron las muestras para separar los restos de tejido no homogenizados del resto, durante 10 minutos, 5.000 G (Centrífuga: Beckman Coulter, Allegra- 21R) y a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante, donde se encuentran las especies retinoides disueltas, se transfirió a un nuevo tubo donde se añadió 3.2 ml de cloroformo. Se agitó durante 5 segundos en vórtex, 5 minutos en agitador mecánico y se volvieron a centrifugar otros 5 minutos a 3000 G y temperatura de 4 °C. Esta última centrifugación permitió facilitar la extracción líquido-líquido, la fase acuosa se desechó y la fase orgánica donde se encuentran las especies retinoides se transfirió a un nuevo tubo de ensayo.

### Extracción en fase sólida

A continuación se realiza la extracción en fase sólida, donde se separaron los retinoides más polares (ácido todo-*trans*-retinoico y ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico) de los más apolares (palmitato de retinilo y retinol), empleando para ello columnas de aminopropilo (con grupos amino, -NH<sub>2</sub>). Los retinoides más apolares eluyeron cuando se le añadió 1 ml de disolvente cloroformo-isopropanol 2:1 (v/v) y los retinoides más polares eluyeron cuando se añadieron 3 ml de disolvente cloroformo-isopropanol 2:1 con ácido acético al 3% (v/v). Ambas fracciones se recogieron en tubos diferentes. Una vez purificados los retinoides se evaporó el disolvente en un sistema de evaporación centrífuga durante 1:30 h a 1 mbar y 30 °C.

### Reconstitución de las muestras

La fracción polar se reconstituyó con 100 µl de metanol, se agitó en el vórtex durante 30 segundos, 5 segundos de sonicado y 5 minutos de agitación. Posteriormente se le añadieron 100 µl de PBS (tampón fosfato salino) y se agitó igual que se hizo anteriormente. La fracción apolar se reconstituyó con 160 µl de etanol y se agitó en el vórtex durante 30 segundos, 5 segundos de sonicado y 5 minutos de agitación. Posteriormente se le añadieron 40 µl de agua MilliQ y se agitó igual que se hizo anteriormente. Es imprescindible que los disolventes de reconstitución entren en contacto con las zonas de evaporación donde se encuentra el retinoide.

Para finalizar, se transfirieron los 200  $\mu$ l a los viales de color topacio, (polares y apolares por separado), proporcionando una atmósfera inerte de nitrógeno para asegurar la estabilidad de los retinoides.

#### Condiciones cromatográficas

Para el proceso de determinación y cuantificación de los retinoides se empleó una columna C18 Poroshell 120 CE (150 mm x 3,0 mm x 2,7  $\mu$ m de tamaño de partícula) suministrado por Agilent Technologies (USA). Para detectar los analitos se usó una longitud de onda de 340 nm para las muestras polares y 325 nm para las muestras apolares.

#### **Retinoides Polares**

La disolución A se preparó con acetato amónico (60mM, pH= 5.7) y metanol en proporción 1:1. La disolución B fue metanol al 100%. En primer lugar se hace un acondicionamiento de las vías con la purga abierta para evitar la presencia de burbujas en la columna. Después se cierra la purga y se procede al acondicionamiento de la columna. El flujo de entrada en el sistema fue de 0.35 mL/min con un gradiente lineal de 20% a 80%, de dilución B en 30 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 60 °C. Ambas disoluciones fueron filtradas previamente con un filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m (Millipore, Milford, MA, USA). La disolución de acetato amónico-metanol fue sonicada antes de ser utilizada.

#### **Retinoides Apolares**

Para la fracción de retinoides más apolares, los disolventes empleados para las vías A y B, fueron agua MilliQ y etanol, respectivamente. El flujo de entrada en el sistema fue de 0.25 ml/min con un gradiente lineal de 80% a 100%, de la disolución B en 15 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 40 °C. Ambas disoluciones fueron filtradas previamente con un filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m (Millipore, Milford, MA, USA).

El protocolo realizado para el análisis de las muestras tiene establecido que entre muestra y muestra se haga un blanco para limpiar las vías de posibles restos de retinoides de la muestra anterior. Se estimó el tiempo empleado por el HPLC para analizar 6 muestras de retinoides polares en 10h y 45 min, y para los retinoides apolares en 8h.

Los cromatogramas obtenidos tras el análisis fueron importados del software desde HPCHEM. El programa que se empleó para analizarlos fue Clarity Chromatography Station. Para calcular las concentraciones de retinoides se usó el método de estándar interno.

## 6.1.4. Análisis de expresión génica

### 6.1.4.1. Instrumentación

Los programas empleados para el diseño de cebadores fueron Splign web (National Center for Biotechnology information), y Primer3 web (versión 4.0.0, Whitehead Institute for Biomedical Research), ambos son herramientas bioinformáticas de uso gratuito a través de internet.

Para el aislamiento de ARNm se usó el kit ARN total I de E.Z.N.A. (Omega Bio-tek Inc. USA), y para cuantificarlo, un Nanodrop 1000 de Thermo Scientific. Para el proceso de transcripción inversa, se usó un kit de alta capacidad suministrado por Applied Biosystems.

Finalmente, para el análisis de expresión, se empleó el kit Maxima SYBR Green qPCR mastermix (2X) (Fermentas GmbH, Alemania) y el equipo Real Time PCR system 7500 de Applied Biosystems. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software R versión 3.1.2, R Development Core Team, R Fundación para la Computación de Estadística, Viena, Austria.

### 6.1.4.2. Método de análisis

En el presente estudio se determinó la expresión hepática de 22 genes con la finalidad de conocer si la exposición a los retardantes de llama alteró el sistema retinoide. Los genes seleccionados están implicados de forma directa en el sistema retinoide como las proteínas de unión, las enzimas de biosíntesis y biotransformación, y los receptores nucleares, o de forma indirecta como los genes relacionados con el AhR, las UGTs, enzimas de biotransformación de fase II, y otros receptores nucleares capaces de dimerizar con RXR.

#### Diseño de los cebadores

La búsqueda del ARN mensajero (ARNm) y el ADN genómico (ADNg) de cada gen se hizo en la especie *Rattus norvegicus*. El programa Splign permitió alinear el ARNm y ADNg, detectándose las regiones que correspondían a los exones ya que como requisito se estableció que el cebador debía coincidir entre dos exones. Dicha información se utilizó en el programa Primer 3, con la finalidad de que este buscara las mejores secuencias para los cebadores que debían ajustarse a los siguientes requisitos: el producto de amplificación podía variar entre 70- 100 bases, las secuencias de los cebadores podían estar entre 20-29 bases con un óptimo en 22 y el porcentaje de guanina y citosina (GC) debía ser igual o superior al 45%. Los cebadores que se diseñaron para el presente estudio fueron los que se presentan en la tabla S1.

### Aislamiento de ARNm hepático y síntesis de ADNc

El aislamiento de ARNm del hígado de las ratas expuestas a decaBDE se hizo empleando el kit ARN total I, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El ARN purificado se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000. Las muestras se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La síntesis de ADNc a partir del ARNm se realizó empleando una concentración de  $75\text{ ng RNA}/\mu\text{l}$  y el kit de alta capacidad en transcripción inversa a ADNc, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Los niveles de expresión génica se analizaron empleando el kit de SYBR Green y el equipo Real Time PCR. Las condiciones de tiempo y temperatura que se usaron para hacer la PCR cuantitativa fueron: una primera fase de desnaturalización de 10 minutos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una segunda fase de 40 ciclos donde las muestras estaban 10 segundos a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  (desnaturalización), 30 segundos a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (amplificación) y 20 segundos a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (medida de fluorescencia). Se incluyeron los controles negativos en todos los experimentos comprobando así que no hubiera ninguna contaminación.

### Análisis estadístico

Se usó como gen testigo el que codifica la beta actina aunque se probó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con el fin de decidir cuál de ambos era el que mejor se ajustaba. El método empleado para el cálculo de la expresión génica fue  $\Delta\Delta\text{CT}$ . Esta medida es una cuantificación relativa ya que compara la expresión de un gen diana frente a un gen de referencia o gen testigo. El gen testigo es un gen que se expresa constitutivamente, a niveles relativamente bajos, en todas las células bajo condiciones normales o fisiológicas.

Tanto para la expresión génica como para las concentraciones de retinoides, los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Con los datos obtenidos se hizo el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) de un factor empleando el programa R. Las variables mostraron una distribución normal según la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov y gráficas QQ.

#### **6.1.5. Modelado de dosis-respuesta**

Los datos se analizaron con el paquete PROAST versión 38.9 (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) en el software R versión 3.1.0, (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) de modelado dosis-respuesta de Benchmark (BMD), (Slob, 2002). Este programa aporta un nuevo enfoque ya que permite buscar un modelo matemático que se ajuste a los datos experimentales y así determinar si existe tal relación dosis-respuesta. La ventaja de usar este análisis

estadístico es que la variable dosis en lugar de tratarla como una variable cualitativa, como lo hace el ANOVA, lo toma como una variable cuantitativa continua, es decir puede adoptar infinitos valores dentro de un rango. Otra ventaja que ofrece este programa es que todos y cada uno de los animales de cada grupo de dosificación contribuyen por igual para el ajuste del modelo, al contrario de lo que ocurre con el ANOVA donde solo tiene en cuenta las medias. Así pues el hacer modelos dosis-respuesta permite determinar nuevos parámetros que proporcionan una mejor caracterización del riesgo, como son la dosis de efecto crítico (CED) o el límite inferior del intervalo de confianza al 95% de la CED (CEDL).

La CED está asociada con el término variación del efecto crítico (CES), por ejemplo, si el CES es de 5 %, la CED se determina como la dosis a la cual se observa una variación en la concentración, en este caso del 5%. Pero este valor se puede modificar. Los modelos matemáticos que el programa utiliza son los siguientes:

$$\text{Modelo 1: } y = a$$

$$\text{Modelo 2: } y = ae^{(bx)}$$

$$\text{Modelo 3: } y = ae^{(bx^d)}$$

$$\text{Modelo 4: } y = a(c - (c - 1))e^{(bx)}$$

$$\text{Modelo 5: } y = a(c - (c - 1))e^{(bx^d)}$$

Donde **a** representa el valor de la observación en el grupo control; **b** la potencia del xenobiótico; **c** el cambio máximo relativo a los controles y **d** la pendiente de la ecuación.

Con el fin de tener en cuenta los errores estadísticos de los datos de dosis-respuesta, se calcula el intervalo de confianza en torno al valor CED obtenido. Para ello se determina el CEDL que puede ser utilizado como alternativa a la dosis máxima a la cual no se observa efecto adverso (NOAEL) para la evaluación del riesgo.

El cociente entre CED/CEDL se emplea como medida de la incertidumbre del modelado. Un valor de este cociente menor o igual a 10, indica que las estimaciones son aceptables.

#### **6.1.6. Análisis de mínimos cuadrados parciales**

Se utilizaron análisis estadísticos más potentes usando regresiones multivariantes de PLS (R software versión 3.1.0, [R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria]) para visualizar la respuesta del sistema retinoide a la exposición a decaBDE y HBCD en términos de interrelaciones entre las diferentes formas de retinoides y genes relacionados, así como otras

observaciones toxicológicas relevantes. Los análisis de PLS se hicieron como aparece descrito previamente (Elabbas et al., 2014) usando el método “enter” con el programa R (R Core Team, 2014). Todas las variables insertadas, es decir, las concentraciones hepáticas de las diferentes formas retinoides (variables Y), y el resto de observaciones, es decir, resultados de peso corporal y de hígado publicados anteriormente (van der Ven et al., 2006, 2008a), así como la expresión génica hepática, niveles de proteína y actividad enzimática procedentes de este estudio (variable X), se modelaron simultáneamente para cada animal para mostrar la interrelación de las variables según su disposición en cuadrantes dentro del círculo de correlaciones (Figura 12 y 13). La significancia de cada variable X en el modelo está representada por los valores VIP (Importancia de la variable en la proyección) (Figura S1 y S2). Los resultados globales de PLS se representan como proyecciones a lo largo del componente principal t1, es decir, el eje horizontal (abscisas), y a lo largo del componente secundario t2, es decir, el eje vertical (ordenadas). Estos dos componentes fueron seleccionados en el modelo mediante el seguimiento del error equivalente de la media cuadrática (Mevik y Cederkvist, 2004). Se obtuvieron modelos PLS separados para ratas hembra y machos con la intención de visualizar similitudes y diferencias entre géneros en la respuesta del sistema retinoide a la exposición a HBCD y decaBDE.

#### **6.1.7. Relevancia en humanos – Margen de exposición**

##### HBCD

Calculamos los valores de MOE para los niveles de T4 y T4-UGT, así como para el peso de la tiroides, dividiendo los CEDL para estas observaciones (van der Ven et al., 2006), basados en la concentración de HBCD en grasa hepática, a partir de los cuales se pueden derivar valores de orientación basados en la salud (HBGVs); entre las concentraciones de HBCD medidas en hígados de fetos sanos (Rawn et al., 2014a). Como se usaron datos de concentración de HBCD de tejido humano y de rata para el cálculo de los MOE, no hubo necesidad de usar un factor toxicocinético de extrapolación interespecífica (EFSA, 2011a; Van den Berg et al., 2006). Sin embargo, se aplicó un factor toxicodinámico de 2,5 para cubrir la variabilidad entre especies y un factor de 10 para cubrir la variabilidad interindividual. Por lo tanto, en este estudio un factor de incertidumbre (UF) de 25 se consideró adecuado para extrapolar resultados de animales a humanos para los criterios de valoración analizados. Se calcularon los MOE para las concentraciones de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico y palmitato de retinilo, que aún no se han utilizado para la derivación de HBGVs.

##### DecaBDE

Calculamos los valores de MOE para los niveles de T3 plasmáticos y para los pesos del epidídimo y la vesícula seminal derivados de este experimento (van der Ven et al., 2008a). Para ello se dividió los correspondientes CEDL para estas observaciones, basados en la concentración de decaBDE en grasa

sérica, a partir de los cuales se pueden derivar HBGVs; entre los niveles de exposición a decaBDE procedentes de diferentes estudios humanos presentados en la literatura (Bi et al., 2007; Thomsen et al., 2008; Jin et al., 2009; Vizcaino et al., 2011, 2014; Sahlström et al., 2014). Se utilizó una razón de distribución entre los niveles plasmáticos y hepáticos de 0,075 para el decaBDE (Huwe y Smith, 2007) para estimar los CEDL séricos experimentales a partir de los datos correspondientes de los lípidos hepáticos. De la misma manera también se calcularon los MOEs correspondientes para la expresión de CYP17 en las glándulas suprarrenales y las concentraciones hepáticas de ácido todo-*trans*-retinoico, que aún no se han utilizado para la derivación de HBGVs.





## 7. RESULTADOS

### 7.1.1. Hexabromociclododecano

#### *Análisis de expresión génica hepática*

En ratas hembra observamos incrementos, relacionados con HBCD, en la expresión de ARNm de genes implicados en la síntesis de ácido todo-*trans*-retinoico, como *Adh1*, *Aldh1a1* y *Aox1*; en su biotransformación, como *Cyp26a1*, *Ugt1a1*, *Ugt1a6* y *Ugt1a9*; y en su función, como *Rxra* (Tablas 2 y 4). Los incrementos máximos en la expresión génica variaron desde el 56 al 267% en comparación con el grupo control y los correspondientes CEDs fueron desde 1 hasta 118 mg HBCD/kg pc/día (Tabla 4). De forma similar, en ratas macho observamos incrementos, relacionados con HBCD, en la expresión hepática de ARNm de genes implicados en la síntesis de ácido todo-*trans*-retinoico, como *Aldh1a1* y *Aox1*; y en su biotransformación, como *Ugt1a1* (Tablas 2 y 4). Los incrementos máximos en la expresión génica fueron desde el 32 al 97% en comparación con el grupo control y los correspondientes CEDs variaron desde 9.1 a 131 mg HBCD/kg pc/día (Tabla 4).

Por medio del análisis estadístico usando regresiones multivariantes con PLS, se logran visualizar similitudes y diferencias entre sexos en las respuestas del sistema retinoide a la exposición a HBCD (Figura 5). Proporcionó mayor fuerza estadística a las relaciones causales entre la exposición a HBCD y los cambios en las concentraciones de retinoides y de expresión génica hepática tanto en ratas hembra como en machos.

En ratas hembra, la expresión incrementada de muchos genes relacionados con el sistema retinoide se agrupó con la dosis de HBCD a lo largo del eje horizontal (componente t1) y presentó asociaciones robustas con todas las concentraciones de retinoides (Figura 12A). Por otro lado, sólo unos pocos genes relacionados con el sistema retinoide con expresión de ARNm incrementada se agruparon con la dosis de HBCD a lo largo del eje horizontal en ratas macho (componente t1; Figura 12B). Sin embargo, estos pocos genes presentaron fuertes asociaciones con las bajas concentraciones de retinol, ácido todo-*trans*-retinoico y ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico a lo largo del eje vertical (componente t2) (Figura 12B). En más detalle, en ratas hembra, el grupo formado por las concentraciones de retinol y ácido todo-*trans*-retinoico en la componente t2, es decir, a dosis bajas de HBCD, estuvo directamente asociado con las expresiones de ARNm de *Adh1* y *Cyp26a1*, e inversamente relacionado con el grupo de expresión de *Ugt1a1*, *Ugt1a6*, *Ugt1a9*, *Aldh1a1* y *Aox1* en la componente t1, es decir, a dosis altas de HBCD (Figura 12A). Además, las expresiones hepáticas incrementadas de *Ugt1a9*, *Aox1* y *Ugt1a1* (con proyecciones similares en la componente t1, Figura 12A), que fueron las variables con la mayor importancia en el modelo PLS para hembras (Valores VIP > 1.4, Figura S1A), estuvieron asociadas con reducciones en las concentraciones hepáticas de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico y palmitato de retinilo. En ratas macho, las expresiones incrementadas de *Aldh1a1*, *Aox1* y *Ugt1a1* se agruparon con la dosis de HBCD en el eje

horizontal (componente t1) y fueron asociadas con bajas concentraciones de retinol, ácido todo-*trans*-retinoico y ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico a lo largo del eje vertical (componente t2) (Figura 12B). Además del incremento en la expresión génica inducida por HBCD, también observamos una disminución dosis-dependiente en la expresión de ARNm de la enzima de almacenamiento de ésteres de retinilo *Lrat* en ambos sexos (Tablas 2 y 4). Las disminuciones máximas en la expresión de *Lrat* fueron de 32 y 29% para ratas hembra y macho, respectivamente, en comparación con los controles; y los correspondientes valores de CED para la reducción en la expresión de *Lrat* fueron 118 y 25 mg HBCD/kg p.c./día (Tabla 4). Las disminuciones en la expresión hepática de ARNm de *Lrat* se relacionaron con las concentraciones hepáticas incrementadas de ácido todo-*trans*-retinoico en ratas hembra (Figura 12A), mientras que en ratas macho se observaron concentraciones reducidas de ácido todo-*trans*-retinoico (Figura 12B); en ambos casos, a lo largo del eje vertical (componente t2) en los círculos de correlación.



Tabla 2 Expresión de ARNm hepático en ratas Wistar hembra tratadas oralmente con una mezcla técnica de HBCD durante 28 días según el método de ensayo OCDE TG407<sup>1</sup> (tabla para machos en la siguiente página).

	p-valor <sup>a</sup>	Dosis (mg/kg pc/d)					Modelo dosis-respuesta <sup>b</sup>	p-valores <sup>c</sup> T-test con delta-CT
		0	1	30	100	200		
<i>Adh1</i>	0.023	1.0 ± 0.32	1.32 ± 0.31	1.23 ± 0.28	1.41 ± 0.39	1.91 ± 0.59	+	
<i>Aldh1a1</i>	<0.001	1.0 ± 0.43	0.52 ± 0.27	1.74 ± 0.54	2.50 ± 0.97	2.66 ± 1.01	+	0.04
<i>Aox1</i>	<0.001	1.0 ± 0.08	0.93 ± 0.24	1.11 ± 0.23	1.55 ± 0.18	1.71 ± 0.33	+	
<i>Cyp26a1</i>	0.017	1.0 ± 0.41	0.94 ± 0.55	1.15 ± 0.40	1.58 ± 0.51	2.59 ± 1.45	+	
<i>Lrat</i>	0.058	1.0 ± 0.19	0.71 ± 0.11	1.00 ± 0.46	0.94 ± 0.29	0.56 ± 0.14	+	
<i>Rxr α</i>	0.055	1.0 ± 0.16	1.18 ± 0.57	1.67 ± 0.42	1.67 ± 0.27	1.40 ± 0.44	+	0.02
<i>Rxr β</i>		1.0 ± 0.30	1.14 ± 0.17	0.94 ± 0.18	1.16 ± 0.15	0.94 ± 0.13		
<i>Rxr γ</i>		1.0 ± 0.15	1.09 ± 0.39	0.89 ± 0.13	0.94 ± 0.09	1.06 ± 0.09		0.04
<i>Ugt1a1</i>	<0.001	1.0 ± 0.37	0.84 ± 0.19	1.79 ± 0.38	1.94 ± 0.22	1.46 ± 0.30	+	
<i>Ugt1a6</i>	0.006	1.0 ± 0.55	1.40 ± 0.62	1.23 ± 0.61	2.91 ± 1.32	3.24 ± 1.62	+	0.03
<i>Ugt1a9</i>	0.032	1.0 ± 0.31	1.05 ± 0.42	1.14 ± 0.27	1.52 ± 0.22	1.72 ± 0.61	+	
<i>Ahr</i>		1.0 ± 0.44	0.76 ± 0.22	0.95 ± 0.31	0.92 ± 0.2	0.76 ± 0.09		
<i>Arnt</i>		1.0 ± 0.21	0.68 ± 0.13	1.00 ± 0.59	0.57 ± 0.12	1.05 ± 0.31		
<i>Crabp1</i>		1.0 ± 0.94	1.22 ± 1.21	0.73 ± 0.47	0.41 ± 0.21	0.48 ± 0.32		
<i>Crbp1</i>		1.0 ± 0.15	1.20 ± 0.37	0.77 ± 0.30	0.85 ± 0.17	1.09 ± 0.17		0.01
<i>Cyp1b1</i>		1.0 ± 0.60	1.40 ± 1.05	0.80 ± 0.57	0.51 ± 0.52	0.45 ± 0.19		0.03
<i>Rar α</i>		1.0 ± 0.24	0.86 ± 0.16	1.13 ± 0.33	1.03 ± 0.24	0.87 ± 0.18		
<i>Rar γ</i>		1.0 ± 0.72	0.92 ± 0.33	1.29 ± 0.30	0.95 ± 0.34	0.74 ± 0.21		
<i>Rdh10</i>		1.0 ± 0.15	0.93 ± 0.07	1.10 ± 0.19	1.07 ± 0.14	0.93 ± 0.06		
<i>Thr α</i>		1.0 ± 0.52	1.14 ± 0.27	1.09 ± 0.38	1.01 ± 0.28	1.01 ± 0.14		
<i>Thr β</i>		1.0 ± 0.34	1.10 ± 0.19	0.96 ± 0.16	1.18 ± 0.12	0.86 ± 0.33		
<i>Car</i>		1.0 ± 0.37	1.21 ± 0.75	0.89 ± 0.76	1.10 ± 1.30	1.83 ± 1.16		0.01
<i>Pxr</i>		1.0 ± 0.41	0.69 ± 0.12	0.93 ± 0.20	0.77 ± 0.24	0.66 ± 0.10		

<sup>1</sup> Datos representados como media ± DS de 4/5 muestras independientes/grupos de dosis/sexo, salvo indicación específica; <sup>a</sup> p-valor calculado por ANOVA de un factor, siendo valores significativos aquellos p < 0.05 y en el límite entre 0.05 y 1 (0.05 ≤ p < 0.1); <sup>b</sup> + indica presencia de relación dosis respuesta (ver Tabla 4 para resultados); <sup>c</sup> T-test con los delta-CT de controles, hembras frente a machos, con Graph Pad Prism (versión 5.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com). *Adh*: Alcohol deshidrogenasa de cadena media citosólica; *Aldh*: Retinal deshidrogenasa; *Ahr*: Receptor arilo de hidrocarburos; *Aox*: Aldehído oxidasa; *Arnt*: Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; *Car*: Receptor constitutivo de androstano; *Crabp*: Proteína celular de unión al ácido retinoico; *Crbp*: Proteína celular de unión al retinol; *Cyp*: Superfamilia de citocromos P450; *Lrat*: Lecitin:retinol aciltransferasa; *Pxr*: Receptor X de pregnano. *Rar*: Receptor del ácido retinoico; *Rdh10*: Retinol deshidrogenasa; *Rxr*: Receptor X retinoide; *Thr*: Receptor de la hormona tiroidea; *Ugt*: UDP-glucuronosiltransferasa.

Tabla 2 (cont) Expresión de ARNm hepático en ratas Wistar macho tratadas oralmente con una mezcla técnica de HBCD durante 28 días según el método de ensayo OCDE TG407<sup>1</sup>

	p-valor <sup>a</sup>	Dosis (mg/kg pc/d)					Modelo dosis-respuesta <sup>b</sup>	p-valores <sup>c</sup> T-test con delta -CT
		0	1	30	100	200		
<i>Adh1</i>		1.0 ± 0.39	0.97 ± 0.34	0.88 ± 0.28	0.79 ± 0.21	0.92 ± 0.18		
<i>Aldh1a1</i>	0.012	1.0 ± 0.37	0.77 ± 0.38	0.90 ± 0.14	1.35 ± 0.42	1.60 ± 0.46	+	0.04
<i>Aox1</i>		1.0 ± 0.18	0.89 ± 0.17	0.97 ± 0.22	1.17 ± 0.20	1.14 ± 0.32	+	
<i>Cyp26a1</i>		1.0 ± 1.07	0.57 ± 0.35	0.48 ± 0.14	0.76 ± 0.33	0.88 ± 0.70		
<i>Lrat</i>	0.013	1.0 ± 0.26	0.85 ± 0.15	0.77 ± 0.22	0.52 ± 0.18	0.83 ± 0.12	+	
<i>Rxr α</i>		1.0 ± 0.33	0.62 ± 0.16	0.85 ± 0.08	0.77 ± 0.14	0.80 ± 0.10		0.02
<i>Rxr β</i>		1.0 ± 0.14	0.74 ± 0.12	1.05 ± 0.17	0.91 ± 0.11	0.97 ± 0.26		
<i>Rxr γ</i>		1.0 ± 0.18	0.95 ± 0.09	1.07 ± 0.31	1.01 ± 0.13	0.97 ± 0.07		0.04
<i>Ugt1a1</i>	0.006	1.0 ± 0.32	0.90 ± 0.48	1.22 ± 0.17	2.05 ± 0.53	1.48 ± 0.64	+	
<i>Ugt1a6</i>		1.0 ± 0.30	1.01 ± 0.45	0.66 ± 0.17	1.00 ± 0.30	0.94 ± 0.35		0.03
<i>Ugt1a9</i>		1.0 ± 0.16	1.17 ± 0.30	0.83 ± 0.37	0.93 ± 0.19	1.11 ± 0.30		
<i>Ahr</i>		1.0 ± 0.34	1.04 ± 0.46	1.09 ± 0.35	1.14 ± 0.39	0.98 ± 0.23		
<i>Arnt</i>	0.006	1.0 ± 0.16	0.82 ± 0.20	1.09 ± 0.19	0.62 ± 0.14	0.99 ± 0.25		
<i>Crabp1</i>		1.0 ± 0.55	1.43 ± 1.01	1.07 ± 0.28	0.94 ± 0.28	1.52 ± 0.89		
<i>Crbp1</i>		1.0 ± 0.04	0.97 ± 0.13	1.24 ± 0.69	0.86 ± 0.15	0.82 ± 0.08		0.01
<i>Cyp1b1</i>		1.0 ± 0.87	1.46 ± 0.87	1.30 ± 0.57	0.67 ± 0.27	1.31 ± 0.75		0.03
<i>Rar α</i>		1.0 ± 0.18	1.24 ± 0.25	1.32 ± 0.14	1.09 ± 0.16	1.12 ± 0.19		
<i>Rar γ</i>		1.0 ± 0.18	0.93 ± 0.15	0.98 ± 0.28	0.79 ± 0.25	1.14 ± 0.21		
<i>Rdh10</i>		1.0 ± 0.21	1.03 ± 0.10	1.10 ± 0.20	1.11 ± 0.12	0.97 ± 0.12		
<i>Thr α</i>		1.0 ± 0.15	1.10 ± 0.13	1.04 ± 0.30	1.09 ± 0.38	1.00 ± 0.21		
<i>Thr β</i>		1.0 ± 0.25	0.94 ± 0.29	0.90 ± 0.18	0.98 ± 0.27	0.96 ± 0.07		
<i>Car</i>		1.0 ± 0.28	1.10 ± 0.48	1.03 ± 0.48	1.30 ± 0.71	0.92 ± 0.29		0.01
<i>Pxr</i>	0.046	1.0 ± 0.27	0.75 ± 0.18	1.13 ± 0.19	1.05 ± 0.28	0.77 ± 0.20		

<sup>1</sup> Datos representados como media ± DS de 4/5 muestras independientes/grupos de dosis/sexo, salvo indicación específica; <sup>a</sup> p-valor calculado por ANOVA de un factor, siendo valores significativos aquellos  $p < 0.05$  y en el límite entre 0.05 y 1 ( $0.05 \leq p < 0.1$ ); <sup>b</sup> + indica presencia de relación dosis respuesta (ver Tabla 4 para resultados); <sup>c</sup> T-test con los delta-CT de controles, hembras frente a machos, con Graph Pad Prism (versión 5.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com). *Adh*: Alcohol deshidrogenasa de cadena media citosólica; *Aldh*: Retinal deshidrogenasa; *Ahr*: Receptor arilo de hidrocarburos; *Aox*: Aldehído oxidasa; *Arnt*: Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; *Car*: Receptor constitutivo de androstano; *Crabp*: Proteína celular de unión al ácido retinoico; *Crbp*: Proteína celular de unión al retinol; *Cyp*: Superfamilia de citocromos P450; *Lrat*: Lecitin:retinol aciltransferasa; *Pxr*: Receptor X de pregnano. *Rar*: Receptor del ácido retinoico; *Rdh10*: Retinol deshidrogenasa; *Rxr*: Receptor X retinoide; *Thr*: Receptor de la hormona tiroidea; *Ugt*: UDP-glucuronosiltransferasa.

### *Concentraciones hepáticas de retinoides*

En ratas hembra, observamos disminuciones dosis-dependientes en las concentraciones hepáticas de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico y palmitato de retinilo (Tabla 3) con CEDs de 3.3 y 1.4 mg/kg pc/día, respectivamente, con disminuciones máximas del 64% para ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico y de 34% para palmitato de retinilo (Tabla 4). Observamos que los niveles de retinol hepático en ratas hembra tendían a incrementarse en comparación con el grupo control a dosis bajas de HBCD ( $p < 0.004$ ; Tabla 3). También se observó la misma tendencia en niveles hepáticos de ácido todo-*trans*-retinoico en ratas hembra, aunque al borde del límite de significancia tras el ANOVA de un factor ( $p = 0.07$ ; Tabla 3). Además, los modelados exponenciales no identificaron relaciones dosis-respuesta para el retinol ni para el ácido todo-*trans*-retinoico en ratas hembra (Tabla 4). Cuando se usó la dosis de HBCD como referencia del signo de los vectores, los análisis PLS en ratas hembra (Figura 12A) confirmaron los resultados del ANOVA de un factor (Tabla 3) y BMD (Tabla 4).

Para ratas hembra se mostró claramente que las reducciones de las concentraciones hepáticas de palmitato de retinilo y ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico inducidas por HBCD, estaban asociadas entre ellas, ya que ambas formas retinoides estaban localizadas próximas entre ellas en el extremo derecho de la componente t1 en el círculo de correlación (Figura 12A). La marcada reducción del ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico con respecto a la del palmitato de retinilo se puede visualizar en el círculo de correlación (Figura 12A), donde el ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico se proyecta en el lado inferior del eje vertical (componente t2). Del mismo modo, las concentraciones de retinol hepático y ácido todo-*trans*-retinoico se localizaron cerca entre sí a lo largo del eje horizontal (componente t1), lo que sugiere una estrecha asociación entre las reducciones inducidas por HBCD en estas dos formas de retinoides en ratas hembras (Figura 12A). Además, como estas formas retinoides se representaron en el lado superior del eje vertical (componente t2), el análisis de PLS apoyó las tendencias al aumento observadas a dosis bajas de HBCD como se observa en el ANOVA (Tabla 3). Los resultados de PLS confirman también los resultados del análisis de ANOVA (Tabla 3) en relación a las concentraciones hepáticas de retinol y ácido todo-*trans*-retinoico, que revirtieron a los niveles de control a dosis elevadas de HBCD en comparación con los niveles ligeramente aumentados observados a las dosis más bajas. En ese sentido, estas formas retinoides fueron representadas en el lado derecho a lo largo del eje horizontal (componente t1) en el círculo de correlación (Figura 12A).

En ratas macho, se observaron reducciones dosis-dependientes de los niveles hepáticos de ácido todo-*trans*-retinoico y de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico después de la exposición a HBCD (Tabla 3) a CEDs de 1.6 y 4.4 mg/kg pc/día, respectivamente, con disminuciones máximas del 29% para ácido todo-*trans*-retinoico y del 46% para ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico (Tabla 4). Las concentraciones de retinol no se vieron afectadas por la exposición a HBCD en ratas macho (Tabla 3). Los resultados del ANOVA de un factor (Tabla 3) y BMD (Tabla 4) se confirmaron por los resultados obtenidos en el análisis PLS en ratas

macho usando la dosis de HBCD como referencia para el signo de los vectores (Figura 12B). El análisis PLS mostró claramente disminuciones en las concentraciones hepáticas de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico y ácido todo-*trans*-retinoico y estas estuvieron a su vez relacionadas entre ellas ya que ambas formas se proyectaron en el lado superior del eje vertical (componente t2) del círculo de correlación (Figura 12B). Del mismo modo, tras la exposición a HBCD, las concentraciones de retinol hepático se asociaron claramente con concentraciones hepáticas de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico y ácido todo-*trans*-retinoico, puesto que todos ellos se representaron agrupados en el círculo de correlación (Figure 12B). Sin embargo, las concentraciones hepáticas de retinol, que casi se proyectaron sobre el eje vertical, no fueron modificadas como resultado de la exposición a HBCD (Figura 12B, Tabla 3). De un modo similar, no hubo un efecto claro del HBCD sobre las concentraciones hepáticas de palmitato de retinilo en ratas macho (Tablas 3 y 4), aunque el ANOVA de un factor detectó una tendencia aparentemente decreciente en los niveles de este en el rango de dosis de 3 a 100 mg de HBCD/kg pc ( $p < 0,001$ ; Tabla 3).

Los análisis de regresión multivariante de PLS indicaron una tendencia decreciente en las concentraciones hepáticas de palmitato de retinilo en relación con la exposición a HBCD a lo largo del eje horizontal (componente t1) y una tendencia creciente menor a lo largo del eje vertical (componente t2) en el círculo de correlación (Figura 12B). Claramente, en ratas macho, las concentraciones hepáticas de palmitato de retinilo no se agruparon con las otras formas retinoides analizadas cuando se evaluaron en relación con la dosificación con HBCD (Figura 12B).

Tabla 3 Niveles de retinoides hepáticos en ratas Wistar hembras y machos tratadas oralmente con la mezcla técnica de HBCD durante 28 días, según el método de ensayo OECD TG407.<sup>1</sup>

	p-valor <sup>a</sup>	Dosis (mg/kg pc/d)								Modelo dosis- respuesta <sup>b</sup>
		0	0.3	1	3	10	30	100	200	
<b>Hembras</b>										
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	0.07	26 ± 6.4	24 ± 11	42 ± 22	32 ± 11	22 ± 5.5	25 ± 8.9	19 ± 8.7	25 ± 7.6	
Ácido 9 <i>c</i> -4 <i>o</i> -13,14-dh-retinoico (pmol/g)	< 0.001	116 ± 22	119 ± 18	113 ± 15	136 ± 31	112 ± 20	85 ± 18	49 ± 15	46 ± 7.4	+
Retinol (nmol/g)	0.004	19 ± 2.9	29 ± 13	26 ± 7.1	25 ± 2.7	23 ± 1.2	17 ± 3.5	17 ± 5.0	15 ± 1.3	
Palmitato de retinilo (µmol/g)	< 0.001	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	+
<b>Machos</b>										
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	0.03	26 ± 4.4	21 ± 2.6	29 ± 6.4	25 ± 7.8	23 ± 7.3	15 ± 2.5	17 ± 2.2	23 ± 6.9	+
Ácido 9 <i>c</i> -4 <i>o</i> -13,14-dh-retinoico (pmol/g)	0.005	44 ± 12	56 ± 15	42 ± 12	58 ± 23	37 ± 6.1	38 ± 5.6	26 ± 4.6	26 ± 2.5 <sup>c</sup>	+
Retinol (nmol/g)		19 ± 4.1	25 ± 15	17 ± 3.5	19 ± 4.3	18 ± 4.3	14 ± 2.1	17 ± 4.2	16 ± 2.9	
Palmitato de retinilo (µmol/g)	< 0.001 <sup>d</sup>	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.2	

<sup>1</sup> Datos representados como media ± DS de 4/5 muestras independientes/grupos de dosis/sexo, salvo indicación específica; <sup>a</sup> p-valor calculado por ANOVA de un factor, siendo valores significativos aquellos  $p < 0.05$  y en el límite entre 0.05 y 1 ( $0.05 \leq p < 0.1$ ).; <sup>b</sup> + indica presencia de relación dosis-respuesta (ver Tabla 4 para resultados); <sup>c</sup> n = 3, puesto que se identificaron dos valores atípicos y fueron excluidos del análisis estadístico; <sup>d</sup> el p-valor significativo parece estar asociado con una tendencia a la disminución en el rango de dosis desde 3 a 100 mg/kg pc/día.

Tabla 4 Resultados del modelado de la relación dosis-respuesta de niveles de retinoides hepáticos y expresión de ARNm en ratas Wistar tratadas oralmente con una mezcla técnica de HBCD.<sup>1</sup>

	Dosis oral (mg/kg pc/día)				Dosis interna <sup>a</sup> (µg/g grasa de hígado)			
	CED	CEDL	Ratio	Respuesta máxima (%)	CED	CEDL	Ratio	Respuesta máxima (%)
<b>Hembras</b>								
<i>Expresión de ARNm</i>								
<i>Lrat</i>	118	67	1.8	- 32	–	–	–	–
<i>Adhl</i>	74	50	1.5	64	–	–	–	–
<i>Aldh1a1</i>	3.5	1.2	2.9	267	66	21	3.2	184
<i>Aox1</i>	60	46	1.3	84	18	8.5	2.2	64
<i>Cyp26a1</i>	36	25	1.5	173	–	–	–	–
<i>Ugt1a1</i>	2.7	0.7	3.9	101	24	11	2.2	169
<i>Ugt1a6</i>	33	23	1.5	200	4.1	0.7	5.9	206
<i>Ugt1a9</i>	66	44	1.5	74	55	14	3.9	90
<i>Rxr α</i>	1.0	0.9	1.2	56	–	–	–	–
<i>Niveles de retinoides</i>								
Palmitato de retinilo (µmol/g)	1.4	0.7	1.9	- 34	40	27	1.5	- 34
Ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico (pmol/g)	3.3	2.3	1.4	- 64	18	8.5	2.2	- 66
<b>Machos</b>								
<i>Expresión de ARNm</i>								
<i>Lrat</i>	25	NA	NA	- 29	157	95	1.6	- 48
<i>Aldh1a1</i>	54	38	1.4	97	90	54	1.7	154
<i>Aox1</i>	131	78	1.7	32	180	105	1.7	59
<i>Ugt1a1</i>	9.1	1.4	6.5	88	84	49	1.7	172
<i>Niveles de retinoides</i>								
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	1.6	0.5	2.9	- 29	–	–	–	–
Ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico (pmol/g)	4.4	1.8	2.5	- 46	41	23	1.8	- 44

<sup>1</sup> Definición de los parámetros del modelado de la relación dosis-respuesta (del inglés BMD, Benchmark Dose Modeling): CED: Dosis de efecto crítico (del inglés critical effect dose) a un tamaño de efecto crítico (del inglés CES, critical effect size) de 5%; CEDL: Límite inferior del intervalo de confianza del 95% del CED (mg/kg pc/d); ratio CED/CEDL: Medida para la variación de datos, incluye incertidumbre estadística para CED, un máximo de 10 es aceptable; Respuesta máxima: La diferencia de la respuesta a dosis alta en comparación con niveles de base, expresado como porcentaje, en el modelo dosis-respuesta (obtenido usando el parámetro c cuando se seleccionaron los modelos 4 o 5); <sup>a</sup> La dosis interna incluye la suma de α, β and γ-HBCD; '–': No se obtuvo efecto dosis-respuesta; NA: No aplicable.

### *Efectos toxicológicos inducidos por HBCD y asociaciones con observaciones del sistema retinoide*

En ratas hembra, las dosis de HBCD y el incremento en el peso del hígado (resultados detallados previamente en Van der Ven et al., 2006), que fue el parámetro con mayor importancia en el modelo PLS en hembras (Valor VIP > 1.4, Figura S1A), mostraron proyecciones similares en la componente t1 (Figura 12A). Además, el incremento en el peso del hígado debido a la exposición a HBCD en ratas hembra se relacionó con reducciones en las concentraciones hepáticas de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico y palmitato de retinilo, ambos con proyecciones similares en la componente t1. Por otro lado, CYP2B y CYP3A se encontraron entre las variables con menor importancia en el modelo de PLS para ratas hembra (valores VIP < 0,85, Figura S1A). Además, el incremento en la expresión del gen funcional *Rxra* se asoció con bajos niveles de todas las formas retinoides analizadas, puesto que están agrupadas a lo largo del eje horizontal (componente t1, Figure 12A).

En ratas macho, las dosis de HBCD y los niveles incrementados de expresión de proteínas CYP2B y CYP3A, que fueron los parámetros con mayor importancia en el modelo PLS para machos (valores VIP > 1.3, Figura S1B), mostraron proyecciones similares en la componente t1 (Figura 12B). Además, estos niveles de proteína se asociaron al grupo de disminución de expresión de *Lrat* y de las concentraciones de retinol, ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico y ácido todo-*trans*-retinoico (proyecciones similares en la componente t2, Figura 12B). No obstante, la actividad PROD, que se proyectó cerca del peso del hígado (Figura 12B), fue la variable con menor importancia en el modelo PLS para ratas macho (valores VIP < 0.43, Figura S1B).

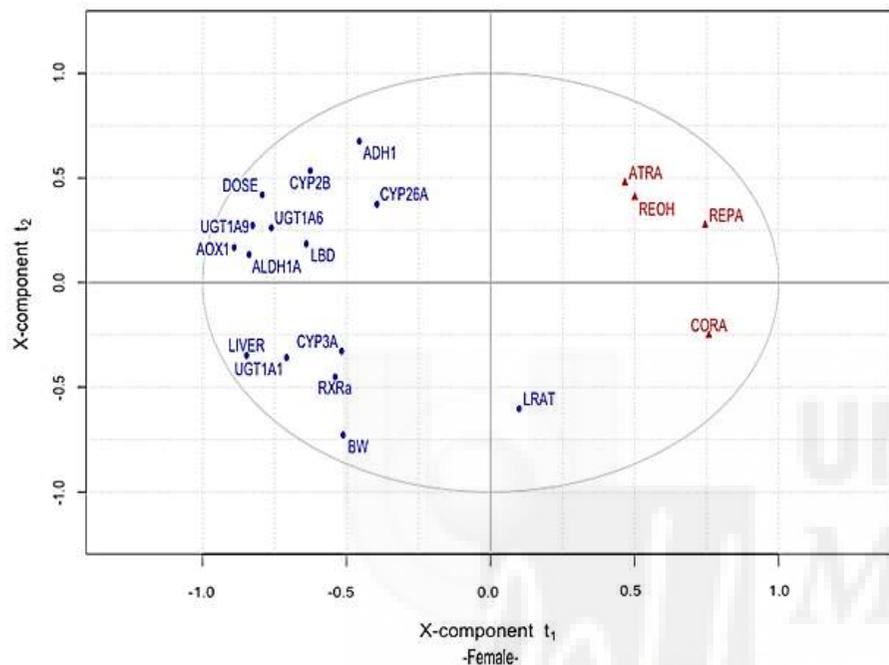
Los resultados de este estudio, llevado a cabo para proporcionar información más detallada acerca del efecto de la exposición a HBCD sobre el sistema retinoide, están resumidos en la figura 14. Se puede considerar que el HBCD interacciona con los CYPs 2B y 3A por medio de la activación de los receptores CAR y PXR, respectivamente, provocando una reducción funcional del ácido todo-*trans*-retinoico, junto con la activación del CYP26A1 y las enzimas UGT. Para corregir esta alteración en la biotransformación de ácido todo-*trans*-retinoico producida por la activación de los CYPs 26A1, 2B y 3A tras el tratamiento con HBCD, el organismo podría reaccionar estimulando la movilización de formas retinoides de almacenamiento desde el hígado, provocando así una disminución en los niveles de palmitato de retinilo (en ratas hembra), acompañado a su vez de una reducción del metabolito ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico, tanto en hembras como en machos.

*Lrat* y presumiblemente las *Reh*, que no se analizaron en el presente estudio, podrían estar contribuyendo a la movilización de ésteres de retinilo hepáticos. Además, los genes responsables de la síntesis de ácido todo-*trans*-retinoico, es decir, *Adh1*, *Aox1* y *Aldh1a1*, están siendo inducidos con el propósito de mantener los niveles homeostáticos de ácido todo-*trans*-retinoico. Dado que la respuesta global parece ser mayor y más fuerte en las hembras (en términos de número de genes afectados y la potencia de estos

efectos), podría estar ocurriendo que la mencionada movilización neta podría no ser lo suficientemente fuerte, resultando en la pérdida de ácido todo-*trans*-retinoico, efecto que se encontró solo en ratas macho.



A - Hembras



B - Machos

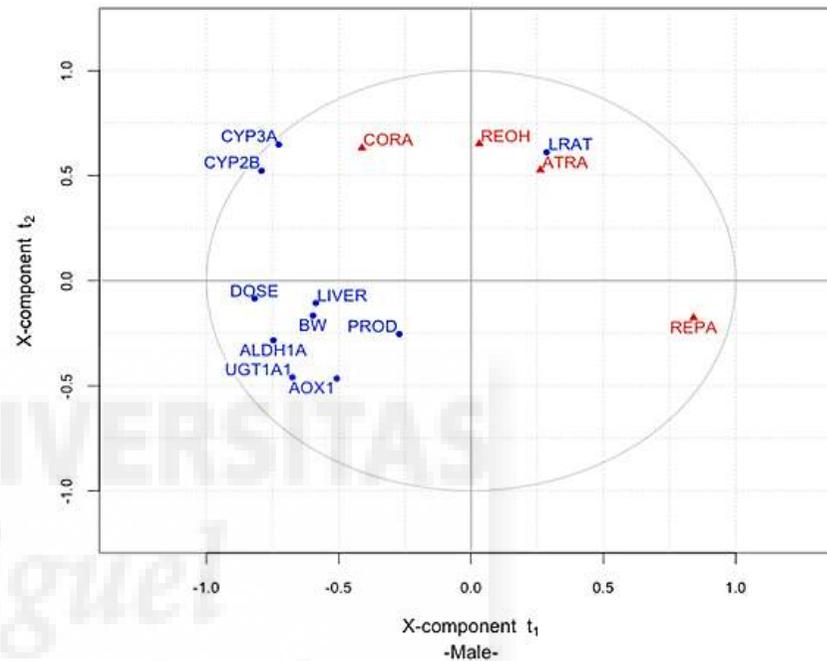


Figura 12 Círculos de correlación de la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para concentraciones hepáticas (variables Y) frente al resto de observaciones (variables X) en ratas Wistar hembras (A) y machos (B) tratadas con la mezcla técnica de HBCD durante 28 días. Tanto las variables Y (concentraciones de retinoides), como las variables X (expresión hepática de ARNm, niveles de proteína y actividades enzimáticas), así como datos de peso corporal y de hígado publicados previamente (van der Ven et al., 2006), están situadas en los círculos de correlación. Las variables cercanas entre ellas en el círculo están directamente asociadas, mientras que aquellas localizadas en posiciones opuestas están inversamente asociadas. Las variables poco significativas se sitúan cerca del origen. Además, la significancia de cada variable X en el modelo está representada por su valor de la variable de importancia en la proyección (VIP) (Figura S1). Se usa la dosis de HBCD como referencia para el signo de los vectores en el círculo de correlación: variables incrementadas se localizan en la izquierda y variables disminuidas en la derecha del eje horizontal (abscisa), tanto en ratas hembra como en macho. A lo largo del eje vertical (ordenada), es decir la componente secundaria  $t_2$ , las variables incrementadas se localizan en la parte superior para hembras (Figura 12A), mientras que en rata macho (Figura 12B), las variables incrementadas se sitúan en la parte inferior del eje vertical. ATRA: ácido todo-*trans*-retinoico; BW: peso corporal; CORA: ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidroretinoico; DOSE: dosis de HBCD; LBD: actividad enzimática microsomal relacionada con CYP3A; LIVER: peso de hígado; PROD: actividad citocromo hepático pentoxiresorufin-O-dealquilasa; REOH: retinol; REPA: palmitato de retinilo.

### Cálculo de MOE

Los valores de MOE calculados para las hormonas tiroideas circulantes y el peso de la tiroides estaban en el rango entre 20 y 7255 y el intervalo de MOE correspondiente para palmitato de retinilo hepático y ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico fue entre 8 y 924 (Tabla 5). Los valores de MOE derivados de la mediana de los niveles de exposición para todas las observaciones estaban muy por encima de 25, mientras que los valores de MOE derivados de la media ponderada de las exposiciones más altas, representando la población altamente expuesta, fueron 8 y 26 para las formas de retinoides y en el rango de 20 a 205 para los efectos relacionados con la tiroides (Tabla 5).

Tabla 5 Márgenes de exposición (MOE) en base a las alteraciones inducidas por HBCD en las concentraciones de retinoides hepáticos y de hormona tiroidea y en el peso de la tiroides.<sup>1</sup>

Escenario	Tejido	Exposición (ng/g lípido)	MÁRGENES DE EXPOSICIÓN				
			Ácido 9c-4o- 13,14-dh- retinoico <sup>a</sup>	Palmitato de retinilo <sup>a</sup>	T4 <sup>b,c</sup>	T4-UGT <sup>c,d</sup>	Glándula tiroides <sup>c,d</sup>
Fetos sanos (Canadá) <sup>e</sup>	Hígado	29 <sup>f</sup>	293	924	7255	724	1345
		1028 <sup>g</sup>	8	26	205	20	38

<sup>1</sup> MOEs menores de 25 indican un riesgo no aceptable (EFSA, 2011). <sup>a</sup> MOEs calculados a partir del CEDL basado en dosis internas (µg/g grasa de hígado) obtenidas en este estudio (CES 5%); <sup>b</sup> MOE calculado a partir del CEDL basado en dosis orales (mg/kg pc/día) obtenidas en este estudio (CES 5%); <sup>c</sup> MOE calculado a partir del CEDL basado en dosis orales (mg/kg pc/día) mostradas en van der Ven et al., 2006 (CES 10%); <sup>d</sup> Los CEDLs basados en dosis orales se convirtieron en CEDLs basadas en dosis internas usando la ecuación de regresión de van der Ven (2006): ecuaciones de regresión (Ci = CEDL basados en dosis internas convertidos; Ce = CEDL basado en dosis orales) para hembras es:  $Ci = 33.377 * Ce^{0.5587}$ , y para machos es:  $Ci = 61.01 * Ce^{0.6276}$ ; <sup>e</sup> Los valores de exposición se obtuvieron de Rawn et al., 2014, donde se recolectaron 52 muestras de hígado de fetos sanos entre 6.5 y 19.5 semanas procedentes de embarazos interrumpidos (las muestras se obtuvieron entre 1998 y 2002 y entre 2008 y 2010); <sup>f</sup> Mediana; <sup>g</sup> Media de los valores máximos de exposición detectados cada año; T4: Tiroxina; T4-UGT: Tiroxina-glucurónido.

### 7.1.2. DecaBDE

#### *Análisis de expresión génica hepática*

Los niveles hepáticos de ARNm de *Cyp26a1*, *Crabp1*, *Cyp1b1* y *Ahrr* fueron inducidos significativamente tanto en machos como en hembras tras la exposición a decaBDE (Tabla 6). Los niveles inducidos de *Cyp1b1* y *Cyp26a1* fueron comparables en ambos sexos, mientras que la inducción de *Crabp1* fue más pronunciada en machos y la de *Ahrr* más pronunciada en hembras. Se observaron incrementos significativos para ratas hembra en la expresión génica de *Adh1*, *Lrat*, *Arnt*, *Rara*, *Rxra*, *Rxry*, *Thra*, *Thrβ* y *Car* (Tabla 6). Los incrementos observados en la expresión de *Rxra*, *Rxry* y *Thra* fueron leves. Para la mayoría de genes, la inducción fue estadísticamente significativa sólo a dosis bajas, salvo para *Car*, cuya inducción significativa se observó a las dosis más altas y sólo en ratas hembra (Tabla 6). No se observaron diferencias entre sexos en ninguno de los genes examinados a nivel del ARNm en animales control, excepto para *Rxra*, *Ugt1a9* y *Car*, que tuvieron p-valores < 0.05 (Tabla 6 y S3). Además de estos genes, *Crabp1*, *Rarγ* y *Thra* mostraron tendencia a la significancia (p-valores < 0.1) (Tabla S3).

El modelo PLS basado en las concentraciones de retinoides hepáticos, en los análisis de expresión génica hepática y en datos de toxicidad previamente publicados (van der Ven et al., 2008a), mostró que en machos, *Crabp1*, *Ahrr*, *Cyp1b1* y *Cyp26a1* formaron un grupo que se asoció con concentraciones reducidas de ácido todo-*trans*-retinoico (proyecciones con direcciones opuestas en la componente t1 de la Figura 13A). En hembras, las dosis internas de BDE207 y BDE209 se asociaron con la actividad EROD y con la expresión de *Cyp1b1*, *Ahrr* y *Crabp1* (cuadrante superior izquierdo), y en machos con la inducción hepática de actividades EROD y PROD, ya que formaron un grupo en el cuadrante inferior izquierdo (Figura 13A). Una diferencia importante entre ambos sexos fue que las ratas macho tenían menos grupos de genes hepáticos, pero estos estaban más organizados y presentaron asociaciones más fuertes con la disminución de las concentraciones hepáticas de ácido todo-*trans*-retinoico (Figura 13).

Tabla 6 Expresión de ARNm hepático en ratas Wistar macho tratadas oralmente con una mezcla técnica de decaBDE durante 28 días según el método de ensayo OCDE TG407<sup>1</sup> (tabla para hembras en la siguiente página).

	p-valor <sup>a</sup>	Dosis (mg/kg pc/d)					t-test con delta-CT <sup>d</sup> (p-valores)
		0	1.87	7.5	15	30	
<i>Adh1</i>	0.603	1 ± 0.48	1.22 ± 0.55	1.15 ± 0.36	0.73 ± 0.46	0.87 ± 0.68	
<i>Aldh1a1</i>	0.572	1 ± 0.39	0.72 ± 0.4	0.91 ± 0.34	1.12 ± 0.82	1.44 ± 1.02	
<i>Aox1</i>	0.612	1 ± 0.13	0.92 ± 0.23	0.8 ± 0.23	1.03 ± 0.19	0.87 ± 0.38	
<i>Cyp26a1</i>	0.032	1 ± 0.49	2.9 ± 1.46 <sup>c</sup>	2.51 ± 1.3	1.68 ± 1.01	0.89 ± 0.68	
<i>Lrat</i>	0.112	1 ± 0.55	0.8 ± 0.32	2.06 ± 1.01	1.33 ± 0.84	1.35 ± 0.52	
<i>Rxr α</i>	0.262	1 ± 0.3	0.52 ± 0.31	1.81 ± 1.54	0.99 ± 0.66	1.19 ± 0.59	0.04
<i>Rxr β</i>	0.812	1 ± 0.35	0.66 ± 0.2	0.84 ± 0.3	0.88 ± 0.43	0.85 ± 0.6	
<i>Rxr γ</i>	0.313	1 ± 0.47	0.93 ± 0.31	1.21 ± 0.59	0.75 ± 0.33	0.62 ± 0.47	
<i>Ugt1a1</i>	0.885	1 ± 0.32	1.05 ± 0.35	0.83 ± 0.31	1.14 ± 0.62	1.08 ± 0.65	
<i>Ugt1a6</i>	0.378	1 ± 0.24	1.7 ± 0.53	1.07 ± 0.24	1.61 ± 0.98	1.51 ± 0.89	
<i>Ugt1a9</i>	0.556	1 ± 0.21	1.36 ± 0.52	1.14 ± 0.32	1.24 ± 0.86	0.81 ± 0.42	0.01
<i>Ahr</i>	0.578	1 ± 0.22	0.9 ± 0.4	1.06 ± 0.49	1.31 ± 0.36	1.23 ± 0.58	
<i>Ahrr</i>	0.001	1 ± 1.03	5.73 ± 3.53 <sup>c</sup>	5.74 ± 3.51	0.92 ± 0.49	0.4 ± 0.18	
<i>Arnt</i>	0.314	1 ± 0.41	0.64 ± 0.38	1.54 ± 0.86	1.43 ± 1.01	1.16 ± 0.33	
<i>Crabp1</i>	0.001	1 ± 0.42 <sup>c</sup>	50 ± 31	72 ± 44	2.47 ± 1.67 <sup>b</sup>	1.78 ± 0.74	
<i>Crbp1</i>	0.683	1 ± 0.4	1.1 ± 0.17	1.23 ± 0.48	1.05 ± 0.45	1.42 ± 0.74	
<i>Cyp1b1</i>	0.001	1 ± 0.34 <sup>c</sup>	35 ± 23	42 ± 24	2.64 ± 1.28	0.96 ± 0.38 <sup>b</sup>	
<i>Rar α</i>	0.536	1 ± 0.72	0.52 ± 0.31	1.49 ± 1.02	1.24 ± 1.16	1.12 ± 0.57	
<i>Rar γ</i>	0.243	1 ± 0.3	1.14 ± 0.44	1.71 ± 0.53	1.11 ± 0.57	1.01 ± 0.71	
<i>Rdh10</i>	0.753	1 ± 0.37	1.21 ± 0.27	1.45 ± 0.57	1.14 ± 0.67	1.05 ± 0.79	
<i>Thr α</i>	0.378	1 ± 0.43	0.63 ± 0.39	1.57 ± 0.94	1.31 ± 0.94	1.23 ± 0.53	
<i>Thr β</i>	0.419	1 ± 0.48	0.68 ± 0.13	1.45 ± 0.63	1.23 ± 0.93	1.05 ± 0.44	
<i>Pxr</i>	0.436	1 ± 0.51	0.66 ± 0.26	0.66 ± 0.46	1.12 ± 0.63	0.75 ± 0.31	
<i>Car</i>	0.545	1 ± 0.51	0.56 ± 0.15	0.76 ± 0.65	1.09 ± 0.44	0.96 ± 0.53	0.02

<sup>1</sup> Datos representados como media ± DS de 4/5 muestras independientes/grupos de dosis/sexo, salvo indicación específica; <sup>a</sup> p-valor calculado por ANOVA de un factor, siendo valores significativos aquellos p < 0.05 y en el límite entre 0.05 y 1 (0.05 ≤ p < 0.1). <sup>b</sup> N=4; <sup>c</sup> N=3. <sup>d</sup> T-test con los valores delta-CT de los grupos control, hembras frente a machos. *Aldh*: Retinal deshidrogenasa; *Adh*: Alcohol deshidrogenasa de cadena media citosólica; *Ahr*: Receptor arilo de hidrocarburos; *Ahrr*: Represor del receptor arilo de hidrocarburos; *Aox*: Aldehído oxidasa; *Arnt*: Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; *Car*: Receptor constitutivo de androstano; *Crabp*: Proteína celular de unión al ácido retinoico; *Crbp*: Proteína celular de unión al retinol; *Cyp*: Superfamilia de citocromos P450; *Lrat*: Lecitin:retinol aciltransferasa; *Pxr*: Receptor X de pregnano; *Rar*: Receptor del ácido retinoico; *Rdh10*: Retinol deshidrogenasa; *Rxr*: Receptor X retinoide; *Thr*: Receptor de la hormona tiroidea; *Ugt*: UDP-glucuronosiltransferasa.

Tabla 6 (cont) Expresión de ARNm hepático en ratas Wistar hembra tratadas oralmente con una mezcla técnica de decaBDE durante 28 días según el método de ensayo OCDE TG407<sup>1</sup>.

	p-valor <sup>a</sup>	Dosis (mg/kg pc/d)						t-test con delta-CT <sup>d</sup> (p-valores)
		0	1.87	7.5	15	30		
<i>Adh1</i>	0.004	1 ± 0.4	1.31 ± 0.2	1.41 ± 0.6	0.52 ± 0.32	0.59 ± 0.31		
<i>Aldh1a1</i>	0.385	1 ± 0.34	1.51 ± 0.37	1.75 ± 1.04	1.5 ± 0.4	1.41 ± 0.45		
<i>Aox1</i>	0.839	1 ± 0.51	1.12 ± 0.28	0.84 ± 0.41	1.01 ± 0.38	0.92 ± 0.33		
<i>Cyp26a1</i>	0.000	1 ± 0.26 <sup>b</sup>	3.03 ± 1.28	2.72 ± 0.73	0.6 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.3		
<i>Lrat</i>	0.000	1 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.97 ± 1.05 <sup>b</sup>	2.13 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.57 ± 0.43	0.75 ± 0.21 <sup>b</sup>		
<i>Rxr α</i>	0.010	1 ± 0.35	1.8 ± 0.56	2.05 ± 0.97	1.43 ± 0.41	0.75 ± 0.33	0.04	
<i>Rxr β</i>	0.902	1 ± 0.34	1.27 ± 0.62	1.25 ± 0.47	1.13 ± 0.43	1.1 ± 0.58		
<i>Rxr γ</i>	0.000	1 ± 0.37	1.32 ± 0.34 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.36	0.64 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.30		
<i>Ugt1a1</i>	0.620	1 ± 0.42	1.06 ± 0.2	1.25 ± 0.64	0.99 ± 0.23	0.87 ± 0.23		
<i>Ugt1a6</i>	0.092	1 ± 0.56	1.32 ± 0.65	0.89 ± 0.18	1.68 ± 0.56	0.93 ± 0.32		
<i>Ugt1a9</i>	0.642	1 ± 0.23	1.42 ± 0.5	1.11 ± 0.54	1.16 ± 0.4	1.15 ± 0.44	0.01	
<i>Ahr</i>	0.972	1 ± 0.38	1.1 ± 0.47	1.14 ± 0.28	1.04 ± 0.15	1.08 ± 0.3		
<i>Ahrr</i>	0.003	1 ± 1.00 <sup>b</sup>	17 ± 12.0	13 ± 8.00	2.05 ± 1.15	1.3 ± 0.44		
<i>Arnt</i>	0.016	1 ± 0.25	2.37 ± 1.13	1.92 ± 0.62	1.75 ± 0.71	0.92 ± 0.49		
<i>Crabp1</i>	0.001	1 ± 1.06	28 ± 20.0	20 ± 12.0	1.06 ± 0.91	0.57 ± 0.34		
<i>Crbp1</i>	0.230	1 ± 0.29	1.6 ± 0.85	1.65 ± 0.5	1.07 ± 0.34	1.31 ± 0.51		
<i>Cyp1b1</i>	0.001	1 ± 0.65 <sup>b</sup>	46 ± 30.0	34 ± 18.0	1.82 ± 1.12	1.22 ± 0.16 <sup>b</sup>		
<i>Rar α</i>	0.001	1 ± 0.16	2.08 ± 0.85	2.59 ± 0.85	1.52 ± 0.43	0.87 ± 0.41		
<i>Rar γ</i>	0.141	1 ± 0.27	1.88 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.68	1.25 ± 0.58	1.37 ± 0.75		
<i>Rdh10</i>	0.169	1 ± 0.34	1.37 ± 0.32	1.33 ± 0.35	0.85 ± 0.42	0.93 ± 0.52		
<i>Thr α</i>	0.011	1 ± 0.21	1.51 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.74 ± 0.57	1.49 ± 0.5	0.79 ± 0.16 <sup>b</sup>		
<i>Thr β</i>	0.005	1 ± 0.24 <sup>b</sup>	2.96 ± 1.34	2.8 ± 1.12	1.55 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.83 ± 0.27 <sup>b</sup>		
<i>Pxr</i>	0.777	1 ± 0.58	1.13 ± 0.42	1.21 ± 0.47	1.4 ± 0.79	1.41 ± 0.64		
<i>Car</i>	0.000	1 ± 1.33	0.99 ± 0.77	1.45 ± 0.67	17 ± 11.0	16 ± 6.0	0.02	

<sup>1</sup> Datos representados como media ± DS de 4/5 muestras independientes/grupos de dosis/sexo, salvo indicación específica; <sup>a</sup> p-valor calculado por ANOVA de un factor, siendo valores significativos aquellos  $p < 0.05$  y en el límite entre 0.05 y 1 ( $0.05 \leq p < 0.1$ ). <sup>b</sup> N=4; <sup>c</sup> N=3. <sup>d</sup> T-test con los valores delta-CT de los grupos control, hembras frente a machos. *Aldh*: Retinal deshidrogenasa; *Adh*: Alcohol deshidrogenasa de cadena media citosólica; *Ahr*: Receptor arilo de hidrocarburos; *Ahrr*: Represor del receptor arilo de hidrocarburos; *Aox*: Aldehído oxidasa; *Arnt*: Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; *Car*: Receptor constitutivo de androstano; *Crabp*: Proteína celular de unión al ácido retinoico; *Crbp*: Proteína celular de unión al retinol; *Cyp*: Superfamilia de citocromos P450; *Lrat*: Lecitin:retinol aciltransferasa; *Pxr*: Receptor X de pregnano; *Rar*: Receptor del ácido retinoico; *Rdh10*: Retinol deshidrogenasa; *Rxr*: Receptor X retinoide; *Thr*: Receptor de la hormona tiroidea; *Ugt*: UDP-glucuronosiltransferasa.

### *Concentraciones hepáticas de retinoides*

Se observaron disminuciones en las concentraciones hepáticas de ácido todo-*trans*-retinoico tanto en ratas macho como en ratas hembra (Tabla 7), con CEDs de 0.02 y 0.31 mg decaBDE/kg pc/día y disminuciones máximas del 50% y 37% para ratas machos y hembras respectivamente (Tabla 8). La concentración hepática de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico no se vio afectada por la exposición a decaBDE en ninguno de los dos sexos (Tabla 7). En ratas hembra, las concentraciones hepáticas de palmitato de retinilo se incrementaron con la dosis de decaBDE con una respuesta máxima del 23%, mientras que los niveles de retinol hepático no se vieron afectados por el tratamiento con decaBDE en hembras (Tablas 7 y 8). En ratas macho, se detectaron reducciones de los niveles hepáticos de retinol y palmitato de retinilo según el ANOVA de un factor (Tabla 7).



Tabla 7 Niveles de retinoides hepáticos en ratas Wistar machos y hembras tratadas oralmente con una mezcla técnica de decaBDE durante 28 días, según el método de ensayo OCDE TG407.<sup>1</sup>

	p-valor <sup>a</sup>	Dosis (mg/kg pc/d)						Modelo dosis-respuesta <sup>b</sup>
		0	1.87	3.75	7.5	15	30	
<b>Machos</b>								
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	0.000	35 ± 4	17 ± 1	20 ± 1	18 ± 1	19 ± 4	18 ± 2	+
Ácido 9 <i>c</i> -4 <i>o</i> -13,14-dh-retinoico (pmol/g)	0.740	75 ± 15	61 ± 19	63 ± 21	65 ± 9	63 ± 26	57 ± 13	
Retinol (nmol/g)	0.000	13 ± 1	7 ± 1	10 ± 1	13 ± 4	16 ± 2	16 ± 4	
Palmitato de retinilo (µmol/g)	0.001	1.19 ± 0.12	0.95 ± 0.11	0.91 ± 0.13	1.19 ± 0.12	1.25 ± 0.15	1.03 ± 0.11	
<b>Hembras</b>								
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	0.266	68 ± 32	52 ± 12	43 ± 9	42 ± 23	45 ± 22	40 ± 6	+
Ácido 9 <i>c</i> -4 <i>o</i> -13,14-dh-retinoico (pmol/g)	0.945	246 ± 44	262 ± 41	259 ± 70	229 ± 47	244 ± 61	242 ± 69	
Retinol (nmol/g)	0.315	18 ± 3	22 ± 2	17 ± 5	20 ± 3	22 ± 7	20 ± 1	
Palmitato de retinilo (µmol/g)	0.000	1.45 ± 0.19	1.33 ± 0.12	1.44 ± 0.15	1.63 ± 0.12	1.45 ± 0.05	1.75 ± 0.06	+

<sup>1</sup> Datos representados como media ± DS de 4/5 muestras independientes/grupos de dosis/sexo. <sup>a</sup> p-valor calculado por ANOVA de un factor, siendo valores significativos aquellos p < 0.05; <sup>b</sup> + indica presencia de relación dosis-respuesta (ver Tabla 8 para los resultados).

Tabla 8 Resultados del modelado de la relación dosis-respuesta de niveles de retinoides hepáticos en ratas Wistar machos y hembras tratadas oralmente con una mezcla técnica de decaBDE durante 28 días según el método de ensayo OCDE TG407.<sup>1</sup>

	Dosis Oral (mg/kg pc/día)				Dosis interna hepática (ng/g peso húmedo)			
	CED	CEDL	Ratio	Respuesta máxima (%)	CED	CEDL	Ratio	Respuesta máxima (%)
<b>Machos</b>								
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	0.02	0	NA	- 50	114	49	2.3	- 48
<b>Hembras</b>								
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	0.31	0	NA	- 37	346	198	1.7	- 39
Palmitato de retinilo (μmol/g)	7.0	5.0	1.4	23				

<sup>1</sup> Definición de los parámetros del modelado de la relación dosis-respuesta (del inglés BMD, Benchmark Dose Modeling): CED: Dosis de efecto crítico (del inglés critical effect dose) a un tamaño de efecto crítico (del inglés CES, critical effect size) de 5%; CEDL: Límite inferior del intervalo de confianza del 95% del CED (mg/kg pc/d); ratio CED/CEDL: Medida para la variación de datos, incluye incertidumbre estadística para CED, un máximo de 10 es aceptable; Respuesta máxima: La diferencia de la respuesta a dosis alta en comparación con niveles de base, expresado como porcentaje, en el modelo dosis-respuesta. NA: No aplicable.

El modelo PLS mostró que, en ratas macho las dosis internas de BDEs 207 y 209 estaban asociadas con concentraciones disminuidas de ácido todo-*trans*-retinoico (proyecciones con direcciones opuestas en la componente t1, Figura 13A). En hembras, las dosis internas de BDE207 y BDE209 se asociaron con concentraciones reducidas de ácido todo-*trans*-retinoico (proyecciones con direcciones opuestas en la componente t2, Figura 13B). Además, los niveles disminuidos de ácido todo-*trans*-retinoico se asociaron débilmente con la expresión de *Cyp26a1*, siendo esta asociación más pronunciada en el caso de la expresión de *Lrat* (proyecciones con direcciones opuestas en la componente t2, Figura 13B). También en hembras, se observó un asociación entre la expresión de *Arnt*, *Rxra* y *Rara*, al formar un grupo en el cuadrante superior derecho. El aumento de expresión de estos genes, a su vez, se asoció con la reducción de la concentración de ácido todo-*trans*-retinoico (proyecciones en direcciones opuestas en la componente t2, Figura 13B).

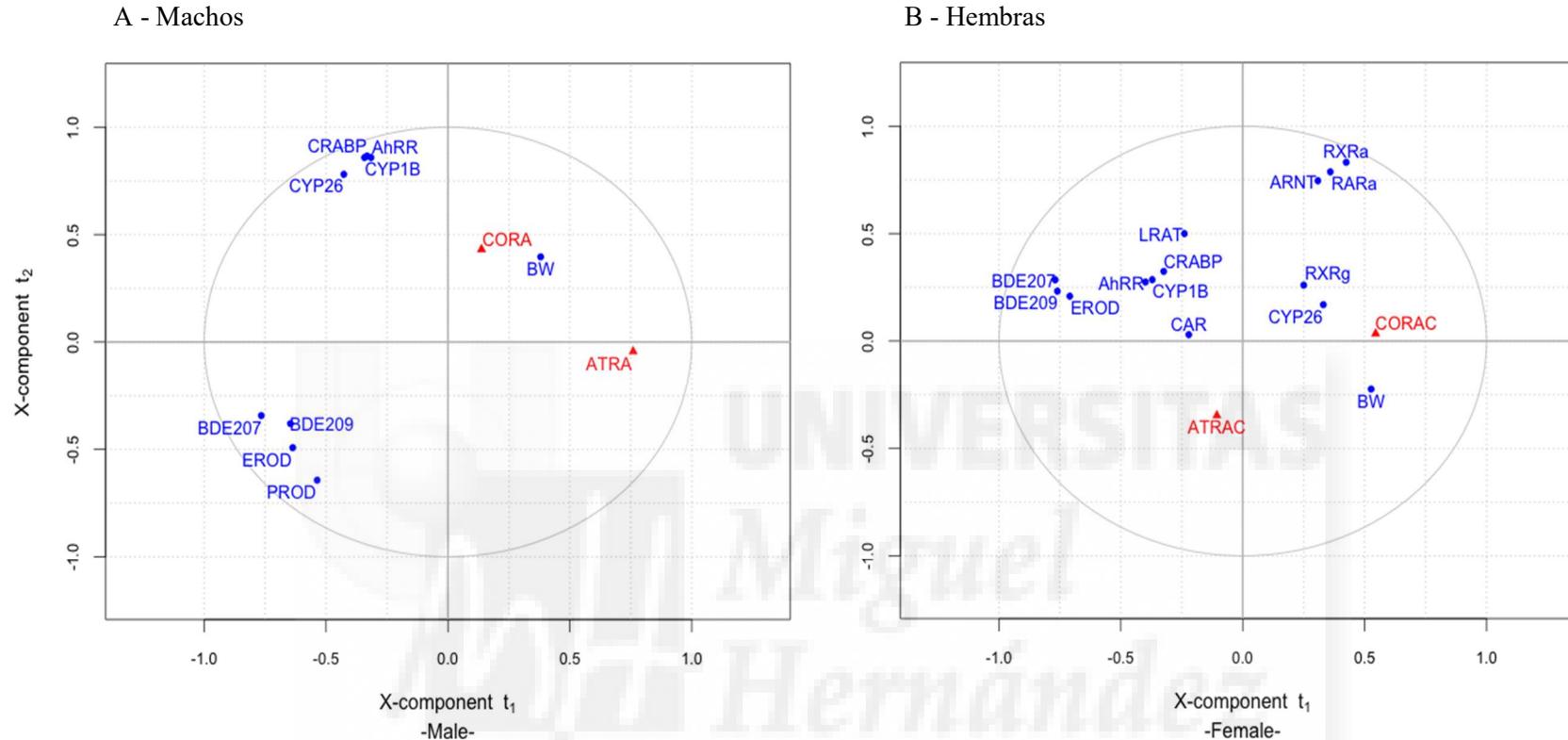


Figura 13 Círculos de correlación de la regresión de mínimos cuadrados parciales en los componentes t1 y t2 para las concentraciones de retinoides en ratas Wistar machos (A) y hembras (B) tratadas con la mezcla técnica de DecaBDE durante 28 días. El círculo de correlación muestra la interrelación de las variables por organización en cuadrantes. Los cuadrantes opuestos representan respuestas opuestas para las variables modeladas. De estas, la reducción de las concentraciones de retinoides se representó en el cuadrante superior derecho, para el cual todas las variables situadas en la parte derecha en la parte derecha en la abscisa del componente principal t1 se redujeron por dosis, mientras que aquellas situadas a la izquierda de la abscisa aumentaron por la dosis. De manera similar, en el componente secundario t2, las variables situadas en el lado superior de la ordenada se redujeron, mientras que las situadas en el lado inferior se incrementaron. AhRR: Represor del receptor arilo de hidrocarburos; ARNT: Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; ATRAC: ácido todo-*trans*-retinoico; BDE207 y BDE209: Difencil éteres bromados; BW: peso corporal; CAR: Receptor constitutivo de androstano; CORAC, ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidrotretinoico; CRABP: Proteína celular de unión al ácido retinoico; CYP1B: Superfamilia de citocromos P450 1B1; CYP26: Superfamilia de citocromos P450 26 A1; EROD: Actividad enzimática etoxiresorufin-O-deetilasa; LRAT: Lecitin:retinol aciltransferasa; PROD: Actividad enzimática 7-pentoxiresorufin O-desalquilasa; RARa: Receptor de ácido retinoico  $\alpha$ ; RXRa: Receptor X retinoide  $\alpha$ ; RXRg: Receptor X retinoide  $\gamma$ .

### *Cálculo de MOE*

Los valores de MOE calculados para los niveles de T3 circulantes, los pesos de las vesículas seminales y del epidídimo se encontraban en el intervalo de 0.5 - 18840 y los correspondientes valores de MOE para el ácido todo-*trans*-retinoico y CYP17 estaban en el rango de 0.4 - 1375 para las diferentes observaciones y escenarios de exposición, que incluían hombres y mujeres de grupos ocupacionales expuestos y la población general (Tabla 9). Los valores de MOE para la población general en Haojian (alrededor de 50 km al este de Guiyu), los habitantes cercanos a la fábrica de componentes electrónicos de Laizhou Bay y los trabajadores de la planta de reciclaje de Guiyu, estaban muy por debajo del valor de referencia aceptable de 25 para concentraciones hepáticas disminuidas de ácido todo-*trans*-retinoico en ambos sexos y niveles de CYP17 disminuidos en mujeres (Tabla 9). Del mismo modo, los valores de MOE por debajo de 25 fueron estimados para el aumento del peso de la vesícula seminal en hombres en los tres lugares de estudio y para la disminución del peso del epidídimo en Guiyu (Tabla 9). Los valores de MOE basados en el aumento de los niveles séricos de T3 estaban muy por encima de 25 para todos los grupos de población, excepto para las mujeres en la localidad de Guiyu, donde se estimó un MOE de 20 (Tabla 9). Los valores de MOE estimados para la población general, incluidas las madres en periodo de lactancia en España o Suecia, así como los consumidores de grandes cantidades de pescado procedentes de Noruega estaban muy por encima de 25 para todos los parámetros analizados en ambos sexos (Tabla 9).

En resumen, los trabajadores de reciclaje de residuos electrónicos en China, así como la población general que vive cerca de tales actividades industriales o de reciclaje, están claramente por debajo del valor de referencia aceptable de 25 para todos los parámetros estimados. Por otra parte, la exposición al decaBDE no plantea un riesgo según los cálculos de MOE basados en niveles de T3 plasmáticos disminuidos, ni en la disminución de los niveles hepáticos de ácido todo-*trans*-retinoico o la expresión de CYP17 suprarrenal en madres lactantes en Suecia o España o en la población general Noruega con alto consumo de pescado del lago Mjösa (Tabla 9).

Tabla 9 Márgenes de exposición (MOE) en base a alteraciones inducidas por decaBDE en ácido todo-*trans*-retinoico hepático, actividad CYP17 suprarrenal, T3 sérico, así como el peso de la vesícula seminal y el epidídimo.

<b>MARGEN DE EXPOSICIÓN</b>						
<b>Escenarios</b>	<b>Exposición</b> (ng/g lípido en plasma)	<b>At-RA</b>	<b>CYP17</b>	<b>T3</b>	<b>Peso de la vesícula seminal</b>	<b>Peso del epidídimo</b>
<b>Mujeres</b>						
Madres (Valencia) <sup>k</sup>	4.7 <sup>c</sup>	1375	562	18840		
Madres (Uppsala) <sup>l</sup>	5.9 <sup>d</sup>	1095	448	15005		
Madres (Asturias) <sup>m</sup>	8.7 <sup>d</sup>	743	304	10175		
Consumo de pescado (Lake Mjøsa) <sup>g</sup>	14 <sup>c</sup>	462	189	6320		
Proximidad a la planta de reciclaje de residuos electrónicos (Haojian) <sup>i</sup>	466 <sup>e</sup>	<b>14</b>	<b>5.7</b>	190		
Proximidad a la fábrica de componentes electrónicos (Laizhou Bay) <sup>h</sup>	1690 <sup>f</sup>	<b>3.8</b>	<b>1.6</b>	52		
Planta de reciclaje de residuos electrónicos (Guiyu) <sup>j</sup>	4500 <sup>c</sup>	<b>1.4</b>	<b>0.6</b>	<b>20</b>		
<b>Hombres</b>						
Consumo de pescado (Lake Mjøsa) <sup>g</sup>	14 <sup>a</sup>	114			187	2863
Proximidad a la fábrica de componentes electrónicos (Laizhou Bay) <sup>h</sup>	335 <sup>b</sup>	<b>4.8</b>			<b>6.1</b>	94
Proximidad a la planta de reciclaje de residuos electrónicos (Haojian) <sup>i</sup>	466 <sup>b</sup>	<b>3.4</b>			<b>4.4</b>	68
Planta de reciclaje de residuos electrónicos (Guiyu) <sup>j</sup>	4500 <sup>a</sup>	<b>0.4</b>			<b>0.5</b>	<b>7</b>

La exposición y los límites inferiores del intervalo de confianza de la dosis de referencia al 95% (CEDLs) se expresan en ng/g lípido en plasma. Los CEDLs para el at-RA hepático se calcularon usando las dosis internas de lípidos hepáticos mostradas en la tabla 8. Los CEDLs para el CYP17, el T3 plasmático total y las masas de la vesícula seminal y el epidídimo se calcularon a partir de datos adquiridos anteriormente (van der Ven et al., 2008). Los CEDLs se convirtieron en ng/g de lípido en plasma usando el 0.23% como contenido medio de lípidos en plasma y usando una proporción de distribución entre hígado y plasma del 0.075 según Huwe (Huwe and Smith, 2007). La exposición a decaBDE en humanos se representó con: <sup>a</sup> máximo valor de exposición detectado; <sup>b</sup> exposición media más dos desviaciones estándar; <sup>c</sup> percentil 90; <sup>d</sup> percentil 95; <sup>e</sup> máximo valor de exposición detectado; <sup>g</sup> consumidores de pescado (41 hombres y 25 mujeres) del altamente contaminado lago Mjøsa en Noruega (Thomsen et al., 2008); <sup>h</sup> voluntarios (71 hombres y 85 mujeres) residentes en la zona sur costera del área de Laizhou Bay (China, Jin et al., 2009); <sup>i</sup> 21 habitantes del distrito de Haojiang, Shantou City (China, Bi et al., 2007); <sup>j</sup> trabajadores (18 hombres y 8 mujeres) de una planta de reciclaje de residuos electrónicos en el sur de China en Guiyu (Bi et al., 2007); <sup>k</sup> suero de 174 mujeres embarazadas de una cohorte de población general (Valencia, España; Vizcaino et al., 2011); <sup>l</sup> muestras de suero de 24 madres suecas (Uppsala, Sahlström, 2014); <sup>m</sup> muestras de suero de 325 mujeres embarazadas recogidas durante el primer trimestre de gestación (Asturias, Vizcaino et al., 2014). MOEs inferiores a 25 sugieren un riesgo no aceptable (EFSA, 2011). At-RA: ácido todo-*trans*-retinoico. CYP17: citocromo P450 17. T3: Triyodotironina.

### 7.1.3. Moduladores del AhR

En los análisis llevados a cabo en hígado, se observaron diferencias significativas en el ácido todo-*trans*-retinoico, cuya concentración aumentó solamente tras la exposición al compuesto C2 (Tabla 10, Figura S6). Por otra parte, se apreciaron disminuciones significativas en el caso del ácido 4-OH-todo-*trans*-retinoico tras ambos tratamientos (Tabla 10, Figura S6). El ácido 9-*cis*-4-oxo-dh-13,14-retinoico disminuyó drásticamente en comparación con animales control (Tabla 10, Figura S6). El palmitato de retinilo mostró diferencias, pero las ratas parecen ser más sensibles al C2, puesto que la disminución fue más profunda (Tabla 10, Figura S6).

En suero también se observaron diferencias significativas, en todas las formas retinoides analizadas a excepción del ácido todo-*trans*-retinoico (Tabla 10, Figura S7). Las disminuciones se detectaron en ácido 13-*cis*-retinoico y palmitato de retinilo (Tabla 10, Figura S7). El ácido 9-*cis*-4-oxo-dh-13,14-retinoico también mostró una disminución general con la exposición, pero en contraste con el resto de observaciones, la concentración de este metabolito en el tratamiento con C4 está más cerca de los controles que en el grupo C2 (Tabla 10, Figura S7). Por otro lado, la concentración de retinol aumentó con el tratamiento (Tabla 10, Figura S7).

El test de ANOVA mostró diferencias significativas en el ácido todo-*trans*-retinoico renal, aunque esto fue debido al incremento en el grupo tratado con C2, porque el grupo C4 no mostró diferencias en comparación con los controles (Tabla 10, Figura S8). También se detectaron incrementos en el retinol y el palmitato de retinilo, siendo las diferencias en retinol más similares entre grupos que en el caso del palmitato de retinilo, cuyos incrementos parecen estar más relacionados con la exposición a C4 (Tabla 10, Figura S8).

Tabla 10 Niveles de retinoides en hígado, riñón y suero en ratas macho tratadas con C2 y C4. La comparación entre grupos de tratamiento se llevó a cabo usando el test t-student.

	Control			C2			C4			ANOVA	
	Media	±	SD	Media	±	SD	Media	±	SD		
<i>Hígado</i>											
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	11.82	±	1.79	15.94	±	1.85	**	14.09	±	2.56	0.020 *
Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico (pmol/g)	3.76	±	0.67	7.70	±	5.11	*	4.32	±	0.89	0.080
Ácido 4-OH-todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	1.65	±	0.64	0.52	±	0.25	***	0.55	±	0.25	*** 0.001 ***
Ácido 9- <i>cis</i> -4-oxo-dh-13,14-retinoico (pmol/g)	58.56	±	9.33	4.68	±	2.25	***	3.86	±	1.62	*** 0.000 ***
Retinol (nmol/g)	12.74	±	1.89	15.95	±	3.79		16.88	±	3.57	* 0.094
Palmitato de retinilo (μmol/g)	0.74	±	0.09	0.41	±	0.11	***	0.52	±	0.11	** 0.000 ***
<i>Suero</i>											
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	1.02	±	0.28	1.14	±	0.34		1.15	±	0.24	0.687
Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico (pmol/g)	1.36	±	0.30	0.74	±	0.16	***	0.50	±	0.14	*** 0.000 ***
Ácido 9- <i>cis</i> -4-oxo-dh-13,14-retinoico (pmol/g)	3.52	±	0.84	1.58	±	0.56	**	2.15	±	0.75	** 0.003 **
Retinol (nmol/g)	2.50	±	0.19	3.21	±	0.24	***	3.12	±	0.15	*** 0.000 ***
Palmitato de retinilo (nmol/g)	0.06	±	0.01	0.03	±	0.01	***	0.03	±	0.01	*** 0.000 ***
<i>Riñón</i>											
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico (pmol/g)	7.88	±	0.60	9.92	±	0.94	**	8.41	±	1.03	0.005 **
Ácido 9- <i>cis</i> -4-oxo-dh-13,14-retinoico (pmol/g)	1.15	±	0.44	1.80	±	1.00		1.45	±	0.88	0.423
Retinol (nmol/g)	7.01	±	0.69	9.32	±	0.75	***	9.10	±	0.62	*** 0.000 ***
Palmitato de retinilo (nmol/g)	6.08	±	5.80	14.50	±	6.12	*	20.02	±	7.25	** 0.007 **



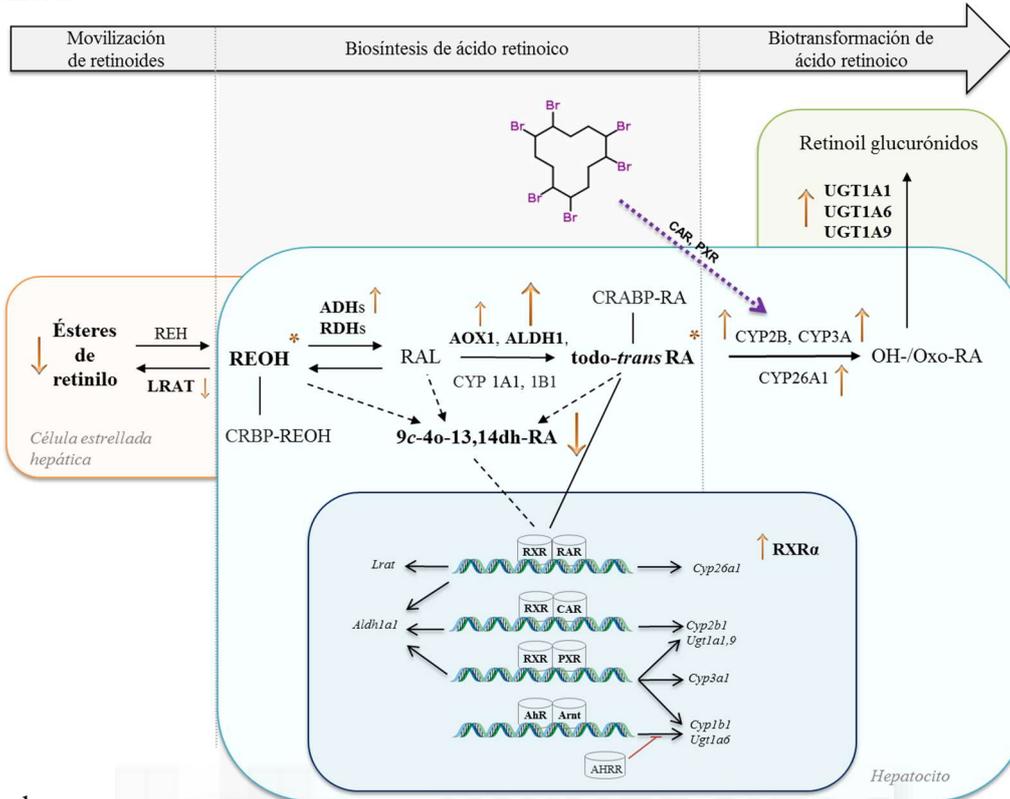
## 8. DISCUSIÓN

### 8.1.1. HBCD

Considerando los niveles de retinoides, la reducción en los niveles hepáticos de ácido 9 $\alpha$ -4 $\alpha$ -13,14-dh-retinoico en ambos sexos fue el efecto más pronunciado tras la exposición a HBCD en este estudio, mientras que la reducción de los niveles de palmitato de retinilo y ácido todo-*trans*-retinoico hepáticos fue el efecto más sensible en ratas hembra y macho, respectivamente. Ambos resultados indican un aumento en la movilización de formas de almacenamiento. *Aldh1a1*, *Aox1* y *Ugt1a1* se indujeron tras el tratamiento con HBCD en ambos sexos, mientras que *Adh1*, *Cyp26a1*, *Ugt1a6* y *Ugt1a9* sólo en ratas hembra (Tablas 2 y 4, Figura 14). Varias líneas de evidencia apoyan el papel clave del *Cyp2b* y *Cyp3a* en las modulaciones del sistema retinoide observadas por la exposición a HBCD en ratas macho y hembra. Estas isoformas están asociadas con la activación de CAR y PXR, xenosensores que median la inducción de *Cyp2b* y *Cyp3a*, respectivamente (Aleksunes y Klaassen, 2012), lo que sugiere que los mecanismos mediados por estos receptores están implicados en el proceso.

Los cambios más pronunciados en el sistema retinoide de ratas hembra con respecto al de machos están en línea con el pronunciado perfil de toxicidad del HBCD en hembras. Los efectos en las hembras fueron más potentes y eficaces, y el número de genes afectados fue mayor en comparación con las ratas macho. Los cálculos del MOE sugieren que los cambios del sistema retinoide inducido por HBCD podrían estar ocurriendo en poblaciones humanas.

A - Hembras



B - Machos

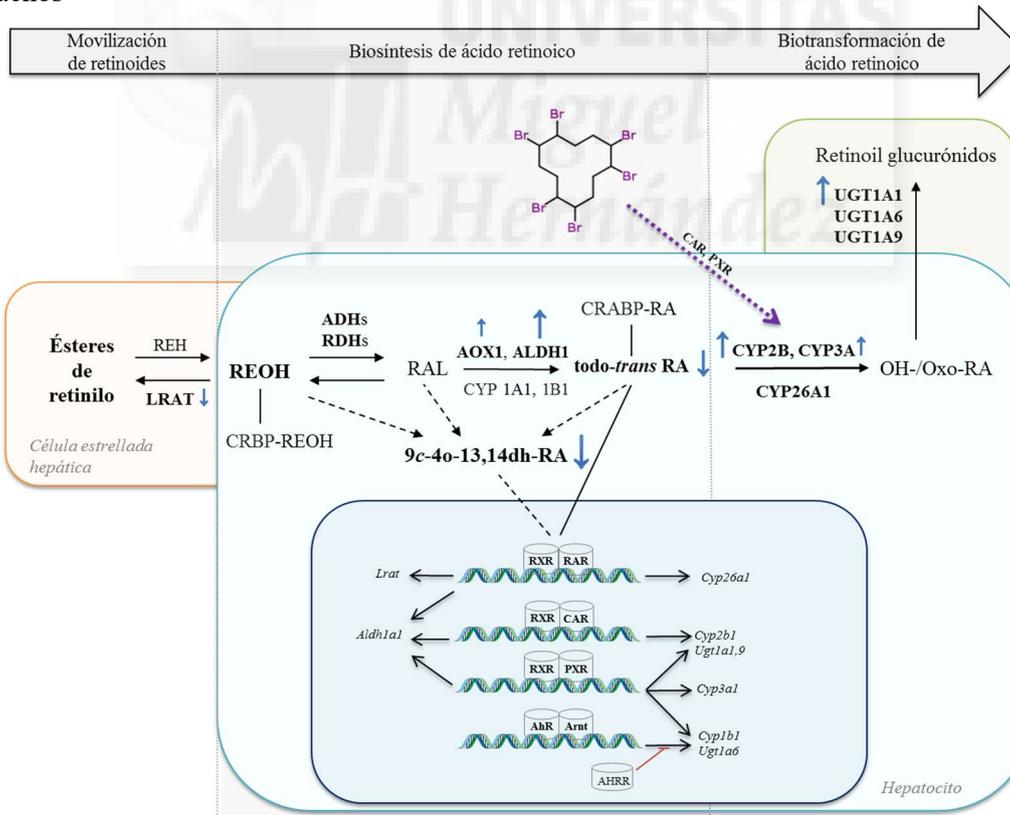


Figura 14 Modelo propuesto para la modulación del sistema retinoide después de 28 días de exposición al HBCD por sonda gástrica según el método de ensayo TG407 de la OCDE en ratas Wistar hembra (A) y macho (B). \*: Incremento de la concentración de retinol y ácido *todo-trans*-retinoico a dosis bajas. Ver figura 5 para abreviaturas.

### *Movilización de retinoides de almacenamiento a precursores de retinoides funcionales*

El palmitato de retinilo es el retinoide de almacenamiento predominante y se encuentra a altas concentraciones en el hígado, concretamente en las células de Ito (o células estrelladas) (Theodosiou et al., 2010). Con el fin de valorar las relaciones dosis-respuesta, se evaluaron los valores control de todos los retinoides detectados en este estudio con respecto a los valores obtenidos en estudios análogos previamente publicados. Las concentraciones hepáticas de palmitato de retinilo en ratas control fueron de 1.3 y 1.7  $\mu\text{mol/g}$  hígado, en machos y hembra respectivamente, valores cercanos a las concentraciones estimadas en estudios previos: 1  $\mu\text{mol/g}$  hígado para machos (Esteban et al., 2014) y 1.3-2,4  $\mu\text{mol/g}$  hígado para hembras (Viluksela et al., 2014; Fletcher et al., 2005).

La reducción de los niveles de palmitato de retinilo hepático podría interpretarse como una movilización de retinoides de almacenamiento dirigida a la producción de precursores de retinoides funcionales, como el retinol. Dicho proceso podría cursar por una disminución de la actividad de la enzima lecitín-retinol aciltransferasa (LRAT), encargada de la esterificación del retinol a palmitato de retinilo (Tabla 4) (Theodosiou et al., 2010).

Por otro lado, el ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico es un metabolito que se une y activa los receptores de ácido retinoico (RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ ), tanto *in vitro* como *in vivo*, (Schuchardt et al., 2009) y, por lo tanto, media la transcripción de los respectivos genes diana asociados (Theodosiou et al., 2010). La concentración hepática de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico en los grupos control fue de 116,1 y 44 pmol/g hígado, valores cercanos a los hallados en otros estudios en grupos equivalentes: 107, 93 o 97 pmol/g hígado en hembras (Fletcher et al., 2005; Van der Ven et al., 2008a; Viluksela et al., 2014, respectivamente) o 34 o 33 pmol/g hígado en machos (Van der Ven et al., 2008a y Esteban et al., 2014, respectivamente). No obstante, cabe destacar que los niveles de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico presentan valores muy dispares, dependientes de las edades de los animales, de la especie, la cepa y el contenido de vitamina A en la dieta (Schmidt et al., 2002). Las concentraciones detectadas de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico en animales control fueron tres veces mayores en hembras que en machos (tanto en animales control como expuestos), una proporción que ya fue descrita en ratas con anterioridad (Viluksela et al., 2014), pero no en ratones (Hoegberg et al., 2005). Estos resultados apoyan la idea de que los genes responsables de la formación y/o degradación de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico, pueden estar sujetos a una regulación dependiente de sexo.

La pronunciada reducción de los niveles hepáticos de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico fue el efecto más remarcable derivado del tratamiento con HBCD en ambos sexos. Las CEDs para estas disminuciones se encontraron alrededor de los 4 mg/kg p.c./día, con respuestas máximas de 64% y 46% en hembras y en machos, respectivamente (Tabla 4).

Los niveles de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico se relacionan directamente con los de palmitato de retinilo, de modo que la administración de este último a través de la dieta provocó un incremento dosis-dependiente de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico en hígado, suero y riñón (Schmidt et al., 2002). Este efecto podría darse a modo de respuesta frente a las fluctuaciones en el contenido de retinol o palmitato de retinilo, que evitaría variaciones drásticas en la concentración de ácido todo-*trans*-retinoico (Schuchardt et al., 2009).

Al considerar en conjunto la reducción de palmitato de retinilo y ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico (Tablas 3 y 4) con la ligera disminución de *Lrat*, se propone que la reducción dosis-dependiente de palmitato de retinilo en hígados de ratas hembra podría deberse a una movilización de retinoides neta desde los depósitos hepáticos más acentuada en comparación con ratas macho (Nilsson y Håkansson, 2002; Novák et al., 2008). Los niveles hepáticos obtenidos de palmitato de retinilo y ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico proporcionaron valores de CED muy similares (Tabla 4). Es de destacar que ambas formas retinoides parecieron estar relacionadas según el PLS en ratas hembra (Figure 1A), lo que sugiere que tanto el ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico como el palmitato de retinilo podrían estar conjuntamente modulados y, por tanto, implicados en esta movilización de formas retinoides de almacenamiento desde el hígado. También es posible que las hidrolasas de ésteres de retinilo (REHs), que no se analizaron en este estudio, puedan haber contribuido aún más a la marcada reducción de los niveles de palmitato de retinilo hepático en ratas hembra por medio del aumento de hidrólisis de ésteres de retinilo en retinol (Schreiber et al., 2012; Figura 12). Se necesitan, por lo tanto, más análisis para explorar el papel potencial de las REHs en los cambios observados en el sistema retinoide inducidos por HBCD.

#### *Significado toxicológico del cambio en los niveles de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico y palmitato de retinilo*

La reducción de los niveles de ésteres de retinilo hepáticos se ha relacionado con la exposición a varios tipos de compuestos químicos con anterioridad, incluyendo contaminantes ambientales, sustancias químicas de origen industrial, plaguicidas, fármacos y alcohol (Nilsson y Håkansson, 2002; Novák et al., 2008; Zile, 2001). Sin embargo, todavía no se ha evaluado si esta reducción en los ésteres de retinilo por sí misma podría considerarse una observación toxicológica de interés regulatorio, y/o un marcador de alteraciones del sistema retinoide. Son necesarios más estudios y/o acciones reguladoras para validar el uso de las observaciones del sistema retinoide como sugiere la OECD (2012). Del mismo modo, existe la necesidad de dilucidar el significado biológico y toxicológico de la marcada reducción en el ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico hepático tanto en ratas macho como hembra. Ya en estudios previos se asoció la exposición a TCDD y a formulados de PCBs con reducciones de este metabolito en paralelo con palmitato de retinilo (Schmidt et al., 2003; Esteban et al., 2014), resultados coherentes con los obtenidos en el presente estudio.

La formación, la biotransformación y los roles funcionales de este metabolito de ácido todo-*trans*-retinoico sólo se han evaluado de manera preliminar con respecto a la relevancia bioquímica y toxicológica (Elabbas et al., 2014; Esteban et al., 2014; Hoegberg et al., 2005; Schuchardt et al., 2009). Basándonos en nuestros resultados y en la suposición de que el ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico podría ser producido desde el retinol (Schmidt et al., 2002; Schuchardt et al., 2009), se propone que el retinol disponible se esté utilizando para mantener la homeostasis del ácido todo-*trans*-retinoico en detrimento de la conversión de retinol en ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico, biotransformación que estaría siendo regulada a la baja tras la exposición a HBCD.

#### *Biosíntesis de ácido todo-trans-retinoico*

Las concentraciones de retinol en hígados de ratas control fueron de 19 nmol/g hígado para ambos sexos, un valor comparable con los hallados a partir de grupos control de otros estudios: 13 - 22 nmol/g hígado en hembras (Esteban et al., 2014; Van der Ven et al., 2008a) y 5.7 – 59 nmol/g hígado (Schmidt et al., 2003a; Esteban et al., 2014). Por otro lado, las concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico en hígado fueron de 26 pmol/g hígado en los grupos control de ambos sexos, valor comprendido entre los obtenidos en controles de otros estudios, 15 – 31 pmol/g hígado para hembras (Esteban et al., 2014; Viluksela et al., 2014) y 21.5 – 35 pmol/g hígado para machos (Hoegberg et al., 2003; Esteban et al., 2014).

La exposición a HBCD provocó la inducción de ARNm de *Aox1* y *Aldh1a1* en ratas hembra y macho y la inducción de *Adh1* sólo en ratas hembra (Tabla 4). Estas enzimas son las responsables del proceso de biosíntesis del ácido todo-*trans*-retinoico a partir de retinol (Theodosiou et al., 2010; Figura 5). La reducción de la concentración de ácido todo-*trans*-retinoico observada en machos (Figura 12B), que aumenta ligeramente a dosis bajas en hembras, podría ser debida a la ausencia de inducción de *Adh1* y una movilización de ésteres de retinilo hepáticos menos marcada que en hembras, en términos de número de genes afectados que codifican enzimas de síntesis (Tabla 2, Figura 5) y de la magnitud de las respuestas tanto de genes como del palmitato de retinilo (Tabla 4).

El aumento simultáneo en la expresión de enzimas de síntesis y biotransformación de ácido todo-*trans*-retinoico tras el tratamiento con HBCD se asoció con el mantenimiento de la homeostasis del retinol y el ácido todo-*trans*-retinoico por medio de una especie de respuesta no monotónica en hembras. Además, en consonancia con resultados publicados anteriormente, el HBCD indujo la actividad de los CYP2B (200 mg/kg/día en hembras y 30 mg/kg/día en machos) y 3A (3 mg/kg/día en hembras y 30 mg/kg/día en machos) (Germer et al., 2006), enzimas implicadas en la oxidación del ácido todo-*trans*-retinoico (Chen et al., 2009).

### *Biotransformación del ácido retinoico*

La expresión inducida de ARNm de *Cyp26a1*, *Ugt1a1*, *1a6* y *1a9*, enzimas de biotransformación involucradas en la posterior oxidación o glucuronidación del ácido todo-*trans*-retinoico, fue observada a raíz del tratamiento con HBCD (Tablas 2 y 4) y podrían participar en la inducción de la biotransformación como el evento iniciador. De nuevo, estas enzimas se indujeron solamente en ratas hembra.

Por todo lo anterior, dado que se considera que el evento iniciador tras la exposición al HBCD ha ocurrido tanto en hembras como en machos sobre la base de efectos comunes, como la reducción de ambos niveles hepáticos de ácido 9 $\alpha$ -13,14-dh-retinoico, no es probable que *Cyp26a1*, inducido en hembras pero no en machos, sea el evento iniciador después de la exposición a HBCD, que desencadenó las respuestas descritas. Esta consideración se apoya, además, en los análisis PLS, ya que el valor VIP del *Cyp26a1* fue de aproximadamente 0.5 en ambas componentes (Figure S1), es decir, una de las variables de menor importancia en el modelo, para el cual enzimas como los CYPs 2B y 3A, inducidos por la exposición a HBCD y con mayor importancia en los modelos PLS para ambos sexos, podrían haber participado como evento iniciador.

### *El papel del Cyp2b y Cyp3a en las modulaciones del sistema retinoide inducidas por HBCD*

Es bien sabido que los CYPs 2B y 3A juegan papeles críticos en el sistema retinoide por oxidación del ácido todo-*trans*-retinoico (Chen et al., 2009). Los resultados publicados muestran que el HBCD induce la expresión y los niveles de proteína de CYP2B y CYP3A, junto con sus actividades enzimáticas microsomales asociadas PROD y LBD (Germer et al., 2006), y que dicha inducción de *Cyp2b* y *Cyp3a* se produce mediante la activación de *Car* y *Pxr* respectivamente (di Masi et al., 2009), que también están asociados con la inducción de UGTs (Shmarakov, 2015). En línea con esto, se encontraron fuertes relaciones entre los niveles de CYP2B y CYP3A y la dosis de HBCD por PLS tanto en ratas macho como hembra (Figura 12). De acuerdo con Germer et al. (2006), se identificó una relación robusta entre la dosis de HBCD y la actividad LBD microsomal hepática (relacionada con CYP3A) en ratas hembra (Figura 12A), pero no con la actividad microsomal PROD (relacionada con CYP2B) (Figura 12A).

Además, el análisis PLS mostró claras correlaciones entre el grupo de retinol y ácido todo-*trans*-retinoico y la actividad inducida de CYP3A en hembras (LBD, con un valor VIP de aproximadamente 1 en la componente t1, Figure S1B), así como con los niveles de proteína de CYP2B y CYP3A incrementados en machos (valores VIP > 1.5, Figura S1B).

### *Señalización mediada por receptores retinoides*

Se observó un aumento de expresión de *Rxra*, un regulador transcripcional que dimeriza con RAR. Sin embargo, no se detectaron cambios en la expresión de *Rar*, por lo que la regulación transcripcional pudo haberse dado a través de la formación de heterodímeros con otros receptores, como CAR y PXR, involucrados en la inducción de la biotransformación de xenobióticos (Evans et al., 2014). PXR y CAR también reconocen y pueden mediar la eliminación de compuestos endógenos, como esteroides, esteroides, retinoides, hormonas tiroideas y ácidos biliares (Evans et al., 2014).

Se encontraron niveles endógenos de expresión hepática de ARNm de *Car* cinco veces mayores en machos que en hembras, en línea con las diferencias de género que Germer y colaboradores (2006) encontraron en los patrones de actividad inducidos por CYP. La ausencia de expresión inducida de *Car* y *Pxr* en términos de dosis-respuesta en el presente estudio (Tabla 2), apoya a noción de que los niveles endógenos de estos receptores son suficientes para dar cuenta de la inducción hepática asociada de CYP2B y CYP3A.

Además, la alteración de los niveles hepáticos del palmitato de retinilo y de ácido 9 $\alpha$ -4 $\alpha$ -13,14-dh-retinoico se produjo a niveles tan bajos de exposición al HBCD como aquellos asociados a la inducción hepática del ARNm de *Cyp2b* y *Cyp3a* (Germer et al., 2006) y sus niveles de proteína (Germer et al., 2006), y a niveles más bajos que aquellos para los que se observó el aumento en el peso del hígado (25 mg/kg pc/día con CES 5%, Figura S3).

En conjunto, todas las asociaciones descritas proporcionan apoyo al papel clave de los CYPs 2B y 3A en la modulación del sistema retinoide tanto en ratas hembra como en macho. Por lo tanto, se sugirió que el HBCD induce directamente una regulación específica de género de CYP2B y CYP3A mediada por la activación de CAR y PXR, respectivamente, que podrían ser elementos importantes de los eventos iniciadores responsables de la reducción observada de varias formas de retinoides hepáticos.

### *Efectos selectivos según sexo*

Múltiples evidencias, del presente estudio basado en el método de ensayo TG407 de la OCDE, apoyan la existencia de notables diferencias de sexo en los efectos observados tras la exposición al HBCD, especialmente en relación con la magnitud de las respuestas. El evento iniciador sugerido de la modulación del sistema retinoide, que podría estar basado en la inducción de los CYPs 2B y 3A a través de CAR y PXR, respectivamente, está teniendo lugar cualitativamente en ambos sexos, aunque resultó ser más pronunciado en ratas hembra (Figura 14, Germer et al., 2006). Tales diferencias de género en el evento iniciador condujeron a una rotación en las concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico más notable en ratas hembra. En consecuencia, la magnitud de la movilización neta, inducida por HBCD, de

las formas retinoides a partir de ésteres de retinilo hepáticos, que parece estar impulsada por una marcada regulación de las enzimas implicadas en la biosíntesis de ácido todo-*trans*-retinoico, fue más acusada en ratas hembra (Figura 14). Esta modulación dependiente del sexo del sistema retinoide es también notable en términos de número de genes afectados (Tabla 2).

#### *Perfil retinoide alterado en presencia de efectos tóxicos*

Asociados a los efectos mencionados sobre el sistema retinoide, se encontraron numerosos efectos dosis-dependientes, como la alteración de la homeostasis de la tiroides, marcada por la disminución en la tiroxina, incremento del peso de la glándula pituitaria y tiroidea y activación de células foliculares; incremento del peso del hígado, inducción de la T4-glucuronil transferasa y otros efectos metabólicos y en hueso (Van der Ven et al., 2006). En general, para cada uno de estos efectos, de nuevo las ratas hembra parecían ser más sensibles al HBCD que las ratas macho (Van der Ven et al., 2006).

#### *Relevancia de los cambios en el sistema retinoide inducidos por HBCD en humanos*

Los cálculos de MOE en este estudio sugieren que la población general, teniendo en cuenta la exposición actual al HBCD, no corre un gran riesgo de experimentar la alteración de la homeostasis de los retinoides o de las hormonas tiroideas; los valores MOE derivados de los niveles medios de exposición para estas observaciones están todos muy por encima de 25 (Tabla 5). Sin embargo, los valores de MOE calculados para el percentil 95 altamente expuesto de la población están alrededor o por debajo de 25 para algunas observaciones de retinoides y para los niveles circulantes de T4-glucurónido (Tabla 5), lo que sugiere que este segmento de la población está en riesgo de sufrir modulación de los sistemas retinoide y tiroideo. Los niveles de exposición a HBCD en hígados de fetos sanos de Canadá (Rawn et al., 2014a) usados para los cálculos de MOE, estaban dentro del rango de concentraciones encontradas en muestras de monitoreo ambiental (Law et al., 2006; EFSA, 2011a; Gosciny et al., 2011; Ni et al., 2013; Koch et al., 2015). Por lo tanto, estos datos se consideran parámetros de exposición relevantes para el cálculo de los valores MOE basados en la población humana general. Del mismo modo, los parámetros relacionados con la tiroides y el sistema retinoide también se consideraron adecuados para ser incluidos en el cálculo MOE, ya que ambos se ven afectados a niveles de dosis de HBCD comparables (es decir, a rangos de CED de 1 - 76 mg/kg pc/día para observaciones en tiroides, en comparación con 1 - 5 mg/kg pc/día para retinoides, en ratas macho y hembra). Además, los efectos sobre el sistema tiroideo están bien establecidos como puntos de referencia pivotantes / apicales en los estudios de toxicología regulatoria, así como en las evaluaciones clínicas. Por lo tanto, está claro que el sistema retinoide está respondiendo a los niveles de exposición a HBCD, que son similares o ligeramente inferiores a los niveles de exposición que afectan a las observaciones relacionadas con la tiroides; observaciones que se están usando para establecer dosis de referencia en la

evaluación de riesgos de sustancias químicas. Además, desde un punto de vista mecanicista, los sistemas retinoides y tiroideo se intersectan a diferentes niveles, incluyendo el transporte tanto de retinol como de hormona tiroidea a través del complejo de transporte común de transtiretrina y proteína de unión a retinol (RBP-TTR) (Novák et al., 2008), así como a nivel de señalización hormonal, donde los RXRs forman heterodímeros con receptores de la hormona tiroidea (THR<sub>s</sub>), así como con los RARs (Evans y Mangelsdorf, 2014).

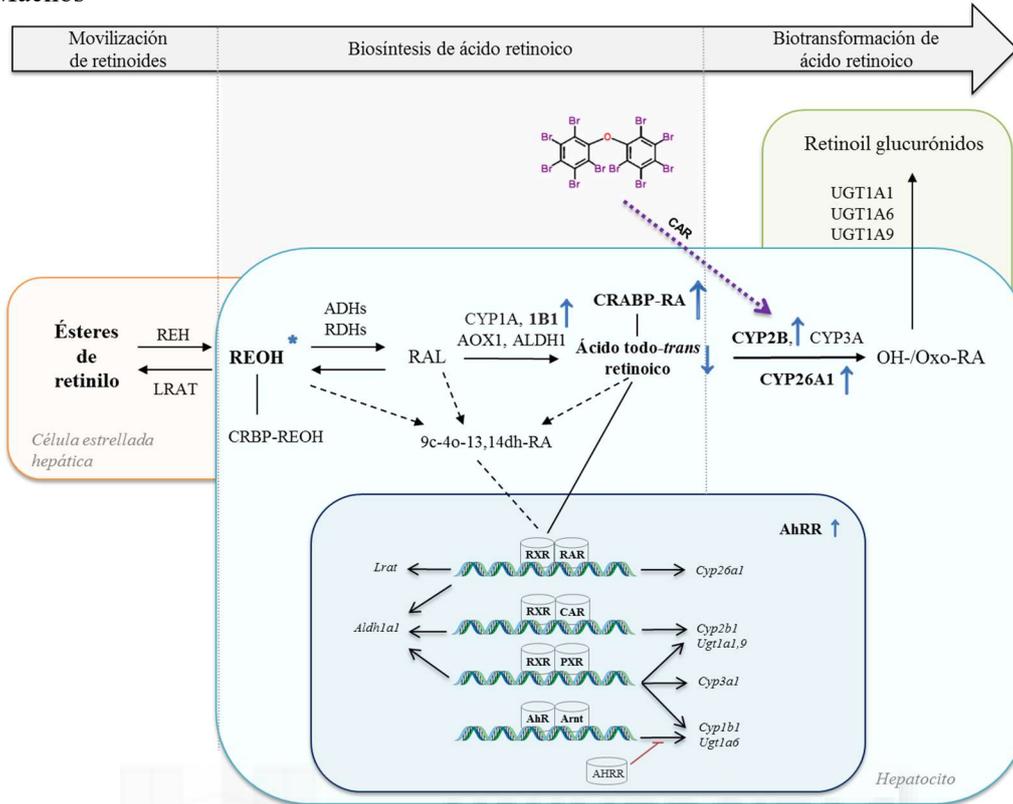


### 8.1.2. DecaBDE

Los resultados de este estudio realizado de acuerdo con el método de ensayo OCDE TG407, que se realizó para proporcionar información más detallada sobre el efecto de la exposición a decaBDE en el sistema retinoide, se resumen en la Figura 15. En ausencia de una movilización neta de retinoides hepáticos de almacenamiento, se observaron reducciones de los niveles hepáticos de ácido todo-*trans*-retinoico, reducciones de mayor potencia y eficacia en machos en comparación con ratas hembra; un hallazgo que está en línea con el perfil de toxicidad más pronunciado en ratas macho tras la exposición al decaBDE. El aumento de la expresión hepática de *Cyp1b1*, *Cyp2b*, *Crabp1* y *Cyp26a1* se asoció con la reducción de los niveles de ácido todo-*trans*-retinoico. Se necesitan más investigaciones para aclarar el papel de los AhRR, CAR y PXR hepáticos en la modulación inducida por decaBDE de los niveles de ácido todo-*trans*-retinoico. Las consecuencias toxicológicas de los cambios en el sistema retinoide inducidos por decaBDE requieren un abordaje adicional, quizás aún más importante durante las etapas de vida embrionarias.

Se observó anteriormente que las ratas macho mostraban una mayor tasa de biotransformación del decaBDE, lo cual resultó en una mayor proporción de BDEs poco bromados frente a los altamente bromados, en comparación con ratas hembra (van der Ven et al., 2008a). Estas observaciones sobre las diferencias cinéticas entre ratas macho y hembra están en línea con las diferencias de género en el perfil de toxicidad de decaBDE (van der Ven et al., 2008a), así como con las diferencias de género observadas en la respuesta del sistema retinoide de este estudio. Se ha demostrado que el decaBDE se metaboliza *in vivo* para formar congéneres de BDE poco bromados (Cai et al., 2011; Huwe y Smith, 2007; Mörck et al., 2003; Sandholm et al., 2003), que se sabe que son más bioacumulables y tóxicos que el decaBDE propiamente dicho (Meerts et al., 2001; Hamers et al., 2006, 2008; Dingemans et al., 2008). Además, los CYP fueron elementos clave en la hidroxilación de los congéneres de BDE (BDE-OH) (Stapleton et al., 2009; Erratico et al., 2011), que fueron inducidos tras la exposición al decaBDE (van der Ven et al., 2008a).

A - Machos



B - Hembras

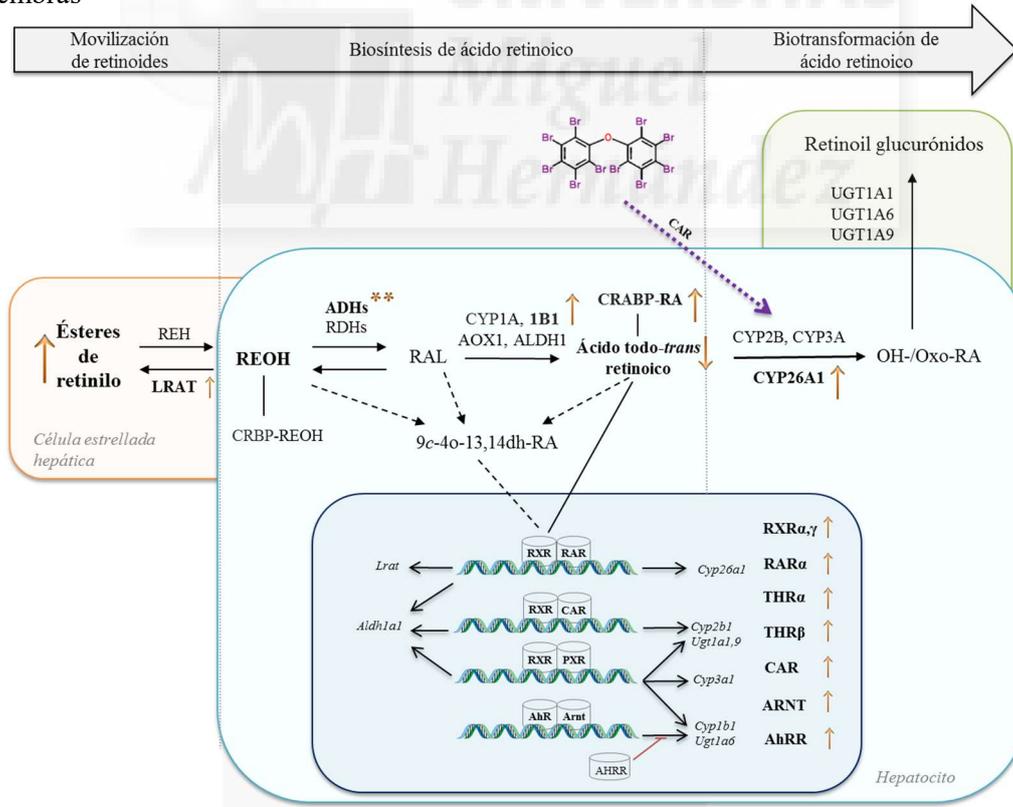


Figura 15 Modelo propuesto para la modulación del sistema retinoide después de 28 días de exposición al decaBDE en ratas Wistar macho (A) y hembra (B). \*: Disminución de retinol a dosis bajas. \*\*: Incremento de la expresión de *Adh1* a dosis bajas. Ver figura 5 para abreviaturas.

### *Ausencia de movilización de retinoides de almacenamiento*

Con tal de evaluar las relaciones dosis-respuesta, se estudiaron los valores control de los retinoides detectados y se compararon con los valores obtenidos en estudios análogos previamente publicados. En los hígados del grupo control, se encontraron concentraciones de 1,2 y 1,5  $\mu\text{mol/g}$  hígado en machos y hembras, respectivamente. Estos valores son coherentes con los obtenidos en estudios previos para ambos sexos (1–3  $\mu\text{mol/g}$  hígado; Schmidt., 2003b; Esteban et al., 2014; Fletcher et al., 2005; Viluksela et al., 2014).

Como consecuencia de la inducción de biotransformación, proceso en el que pueden participar CRABP, CYP26 y CYP2B, se esperaría una respuesta biológica compensatoria inmediata para reestablecer los niveles hepáticos de ácido todo-*trans*-retinoico. Aunque el incremento en la movilización de las formas retinoides derivadas de la dieta o de los ésteres de retinilo almacenados se encuentra a menudo como una respuesta a la alteración del sistema retinoide (Nilsson y Håkansson, 2002; Novák et al., 2008), ya que estas formas funcionan como precursores de retinoides funcionales (Murphy et al., 2007; Theodosiou et al., 2010), la exposición a decaBDE no provocó la movilización de retinoides de almacenamiento ni cambios en las enzimas de biosíntesis de ácido todo-*trans*-retinoico, como ADH1, RDH10 o ALDH1. Los genes *Adh* y *Aldh* codifican las proteínas responsables de la oxidación del retinol a retinal y, posteriormente y de forma irreversible, a ácido todo-*trans*-retinoico (Blomhoff y Blomhoff, 2006), por lo tanto, la ausencia de alteraciones en estos genes apoya la idea de que la movilización de formas retinoides de almacenamiento no es una vía principal activada por la exposición a decaBDE. Con todo esto, parece improbable que la exposición a decaBDE induzca una movilización neta de ésteres de retinilo de almacenamiento hepáticos para compensar la disminución en los niveles hepáticos de ácido todo-*trans*-retinoico en ambos sexos. En su lugar, en las ratas hembra, puede haber una ligera tendencia al aumento de la formación de ésteres de retinilo mediante la inducción de *Lrat*.

La movilización de ésteres de retinilo comprende su hidrólisis hacia retinol, la forma en la que la vitamina A se distribuye por la circulación unido a RBP-TTR (Theodosiou et al., 2010). Las concentraciones hepáticas de retinol encontradas en este estudio fueron de 13,3 y 18,1 nmol/g, para machos y hembras, respectivamente, valores dentro del rango presentando en otros trabajos donde también se midió esta forma retinoide (7 - 40 nmol/g) (Schmidt et al., 2002; Schmidt et al., 2003a; Schmidt et al., 2003b; Esteban et al., 2014; Viluksela et al., 2015).

No se observaron alteraciones ni en las concentraciones de retinol, ni en la expresión hepática de *Rdh10*, en ningún sexo. Por otro lado, los resultados de *Adh1* mostraron incrementos sólo a dosis bajas en hembras. Estos resultados apoyan la idea del mantenimiento del equilibrio entre biosíntesis (REH) y biotransformación de retinol hacia ácido todo-*trans*-retinoico (Blomhoff et al., 2006).

### *Homeostasis de ácido todo-trans-retinoico*

La concentración del ácido todo-*trans*-retinoico hepático en machos control fue de 35,5 pmol/g hígado, un valor coherente con las concentraciones medidas en estudios previos (16-50 pmol/g hígado) (Esteban et al., 2014; Viluksela et al., 2014). Sin embargo, las hembras control mostraron concentraciones de 68 pmol/g hígado. Este valor fue ligeramente superior a los detectados en otros estudios (17-42 pmol/g hígado) (Schmidt et al., 2003a; Schmidt et al., 2003b; Fletcher et al., 2005; Esteban et al., 2014; Viluksela et al., 2015), pero inferior a los encontrados en ratas hembra Han/Wistar (150 pmol/g hígado) (Fletcher et al., 2005). Esto demuestra que las concentraciones medidas de ácido todo-*trans*-retinoico dependen de factores como la cepa, la alimentación y la edad de los animales (Schmidt et al., 2002).

La exposición a decaBDE provocó disminuciones en la concentración de ácido todo-*trans*-retinoico en ambos sexos, pero es de destacar la potencia y la eficacia con la que disminuyó en controles macho (Tabla 8). Este brusco descenso se observó desde la primera dosis, por lo que se sospechó que ese grupo presentara niveles elevados en comparación con otros controles. Sin embargo, los niveles de ácido todo-*trans*-retinoico en los controles de este estudio se encontraron dentro de la misma distribución estadística normal que los otros 10 animales control (Van der Ven et al., 2006; Van der Ven et al., 2008b; Figura S9A). Para corroborar este efecto, se emplearon los 15 controles, y el modelado dosis-respuesta siguió mostrando una reducción (Figura S9B), por lo que se asoció al tratamiento con decaBDE.

Dado el papel del AhRR de modulador por retroalimentación de la expresión génica dependiente de AhR, el aumento de la expresión hepática de *Ahrr* parece ser un elemento protector frente a la inducción de la expresión hepática de *Cyp1a1* relacionada con el AhR tanto en ratas macho como en hembras. Sin embargo, en ratas macho, con un aumento menos pronunciado de la expresión hepática de *Ahrr*, y ausencia de inducción de la expresión de *Arnt*, se observó un aumento en los niveles de proteína de CYP1A1 relacionado con el decaBDE, pero no en las hembras (van der Ven et al., 2008a), aunque se indujo de forma dosis-dependiente la expresión de ARNm de *Cyp1a1* en ambos sexos. Sólo la inducción combinada de *Arnt* y *Ahrr*, como se observa en hembras (Tabla 6; Figura S5), parece proporcionar una mejor capacidad para reprimir completamente la inducción de *Cyp1a1* mediada por AhR, una vía que se ha asociado con la síntesis y oxidación del ácido todo-*trans*-retinoico (revisión por Murphy et al., 2007) y con consecuencias de salud severas en casos de activación sostenida por ligandos de alta afinidad a AhR, como la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) y compuestos similares a dioxinas.

Además, el CYP1B1 estuvo involucrado en la actividad de EROD en menor medida que el CYP1A1/2 (Shimada et al., 1997). Sin embargo, el CYP1B1 respondió al ácido todo-*trans*-retinoico (Kawai et al., 2003) y fue capaz de convertir retinal en ácido todo-*trans*-retinoico (Chambers et al., 2007), para lo cual otro mecanismo podría estar involucrado, a través de los receptores de retinoides, en la fuerte inducción

observada del ARNm de *Cyp1b1*. La exposición a decaBDE también produjo una mayor inducción del ARNm de *Cyp2b* en los machos y, por lo tanto, la actividad del PROD fue inducida en los machos pero no en las hembras (van der Ven et al., 2008a). En ratas macho, no hubo inducción de la expresión hepática de ARNm de *Car*, lo que sugiere que los niveles constitutivos de CAR son suficientes para apoyar el incremento en la expresión de ARNm de *Cyp2b* y la actividad PROD relacionada con la dosis de decaBDE. Cabe destacar que en las hembras hubo una pronunciada inducción de la expresión hepática del ARNm de *Car*, por lo cual se consideró que las hembras estaban, a nivel cualitativo, en el mismo proceso dinámico que los machos en lo referido a la capacidad de biotransformación, aunque mostrándose a dosis y/o tiempos de exposición más altos. No hubo cambios en la expresión de ARNm hepático de *Pxr* en ningún sexo, ni inducciones de expresión de ARNm de *Cyp3a*, niveles de proteína o actividad (van der Ven et al., 2008a) relacionadas con el tratamiento. Sin embargo, se mostró inducción del CYP3A tanto en ratones como en ratas tras la exposición a decaBDE (Lee et al., 2010, Pacyniak et al., 2007).

#### *Biotransformación del ácido todo-trans-retinoico*

La inducción enzimática también está implicada en la biotransformación de endobióticos: la inducción del CYP2B pudo haber contribuido, al menos en parte, a la reducción de las concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico (Kakizaki et al., 2002; Kawamoto et al., 1999; Chen et al., 2009; Kedishvili, 2013), con mayor eficacia y potencia en machos que en hembras, como sucedió con las propias inducciones de CYP. Curiosamente, el ortólogo CYP2B6 en hígados humanos parece estar asociado con la hidroxilación de BDE-47 (Feo et al., 2013) y BDE-99 (Erratico et al., 2012), los cuales podrían interferir en la señalización del ácido retinoico mediante su unión a RARs (Zhao et al., 2015, artículo original). No obstante, dicha relación requiere un estudio más profundo.

*Crabp1* es una proteína transportadora de ácido todo-*trans*-retinoico, con un papel crítico en la regulación de su degradación (Blomhoff y Blomhoff, 2006), ya que lo transporta para su degradación oxidativa por *Cyp26a1*; la principal enzima catabolizante con alta especificidad de sustrato para el ácido todo-*trans*-retinoico (Ross y Zolfaghari, 2011; Theodosiou et al., 2010) y sus metabolitos (Topletz et al., 2015). Tanto *Crabp1* como *Cyp26a1* están bajo la regulación del ácido todo-*trans*-retinoico (Topletz et al., 2015) a través de RARs (Theodosiou et al., 2010), por lo que es probable que los aumentos observados en las expresiones hepáticas de *Crabp1* y *Cyp26a1* estén asociados con la disminución de los niveles de ácido todo-*trans*-retinoico tras la exposición al decaBDE. En este estudio, no hubo aumento en la expresión de enzimas UGT inducido por decaBDE, por lo que se supone que las formas oxidadas de ácido todo-*trans*-retinoico no se glucuronizaron y excretaron (Zile et al., 1982; Samokyszyn et al., 2000), sino que estuvieron disponibles para la señalización a través de RARs (Topletz et al., 2015; Zhao et al., 2015).

Curiosamente, la expresión de *Rara*, *Rxra* y *Rxry* fue inducida en hembras, pero no en machos. Sin embargo, se necesitan más análisis de especificidad de sustrato para aclarar la contribución exacta de cada una de las enzimas, proteínas de unión y factores de transcripción en la disminución observada en los niveles hepáticos de ácido todo-*trans*-retinoico de este estudio. Con respecto a los monómeros de unión a RXRs (Evans y Mangelsdorf, 2014), un aumento de *Thra* y *Thrβ* a dosis bajas, también observado sólo en ratas hembra, podría indicar una alteración de la homeostasis de la hormona tiroidea en la que podrían estar implicados los BDE hidroxilados (Hallgren y Darnerud, 2002; Hamers et al., 2006; Richardson et al., 2008). Este hallazgo fue respaldado por la alteración de los niveles de T3 plasmático encontrados en ese sexo en el estudio precedente de van der Ven et al. (2008a).

#### *Homeostasis del ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico*

La concentración del ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico hepático en machos control fue de 75 pmol/g hígado, valor superior a los encontrados en otros estudios (16-23 pmol/g hígado; Esteban et al., 2014; Viluksela et al., 2014), pero dentro del rango de las decenas de pmol/g. Estos estudios de referencia se llevaron a cabo con cepas de rata distintas a las del presente estudio, hecho que podría explicar en parte las diferencias mencionadas. Las hembras control presentaron una concentración de 246 pmol/g, un valor similar al referido en controles de estudios previos (107-145 pmol/g hígado (Fletcher et al., 2005), 370 pmol/g hígado (Schmidt et al., 2002)). Las diferencias observadas al comparar los estudios mencionados se deben a que, al igual que sucede con el resto de retinoides, la concentración de este metabolito también depende de la ingesta de vitamina A, de la edad y de la especie objeto de estudio.

Trabajos previos apuntan a que el ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico podría sintetizarse desde el retinol hepático (Schmidt et al., 2002), hipótesis que concuerda con la ausencia de alteraciones en las concentraciones de retinol y con el equilibrio entre la biosíntesis y eliminación del ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico.

#### *Perfil retinoide alterado en presencia de efectos tóxicos*

Se observó una serie de efectos junto a la alteración del sistema retinoide descrita en este estudio. La observación más sensible en ratas macho fue el incremento en el peso de la vesícula seminal y disminución en el del epidídimo. En hembras se detectó una disminución de la actividad del CYP17, una enzima con un papel crucial en la síntesis de andrógenos (Van der Ven et al., 2008). Por lo tanto, parece ser que el decaBDE tiene efectos en paralelo sobre el sistema retinoide y el endocrino (Van der Ven et al., 2008).

*Relevancia de los cambios en el sistema retinoide inducidos por decaBDE en humanos*

Los cálculos de MOE sugieren que el ácido todo-*trans*-retinoico es una observación más sensible a la exposición a decaBDE que los niveles plasmáticos de T3, así como el peso de la vesícula seminal y el epidídimo. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la población general tiene un bajo riesgo, mientras que los trabajadores de residuos electrónicos o los residentes cercanos a estos lugares de trabajo, en las situaciones de exposición actuales, corren el riesgo de experimentar una alteración de la homeostasis de los retinoides. Por lo tanto, el trabajo en el reciclado de dispositivos electrónicos necesita la implementación inmediata de medidas de mitigación del riesgo para reducir la exposición a niveles de riesgo aceptables.



### 8.1.3. Moduladores del AhR

#### *Movilización de retinoides de almacenamiento*

La exposición a los compuestos nombrados como C2 y C4 provocó cambios similares en los niveles de palmitato de retinilo medidos en hígado: se mostró una disminución en ambos casos, que fue ligeramente más acusada en el caso del C2 en comparación con los niveles control (Figura S6). Este es uno de los efectos típicos observados tras la exposición a TCDD, tanto en aquellos estudios donde se expuso a los animales a una dosis única, a dosis repetidas, o en los que se evaluó la relación dosis-respuesta, se observaron disminuciones tempranas y a dosis bajas (Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003; Hoegberg et al., 2003; Fletcher et al., 2005). Un posible explicación a esta disminución tan marcada podría estar tanto en la alteración de los mecanismos de esterificación, es decir, la expresión de enzimas como LRAT o ARAT, o bien el incremento en la expresión de hidrolasas, como las REH que favorezcan la movilización de retinoides de almacenamiento hacia formas precursoras, como el retinol, de especies funcionales como el ácido todo-*trans*-retinoico (Nilsson et al., 2000), es decir la biosíntesis de ácido retinoico.

La concentración de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico también se vio disminuida, tal y como se observó con anterioridad en estudios análogos, tanto en hígado como en suero (Hoegberg et al., 2003; Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003b), aunque las diferencias fueron mucho más acusadas en el caso de las concentraciones hepáticas, donde las disminuciones fueron de más de 10 veces en comparación con los valores control (Figura S6). Las similitudes entre estudios en el caso de los niveles de este metabolito en riñón no están tan claras. De hecho, mientras que en este estudio no se observan cambios (Figura S8), en trabajos anteriores sí que se detectaron incrementos (Fletcher et al., 2005), puede que debido a la síntesis en el propio riñón, tras la recaptación de retinol, ácido todo-*trans*-retinoico o sus metabolitos desde el suero (Fletcher et al., 2005).

Esta hipótesis apoyaría los resultados obtenidos en riñón para el ácido todo-*trans*-retinoico y el retinol, cuyas concentraciones aumentaron (Figura S8), siguiendo la tendencia de trabajos análogos en los que también se detectaron aumentos significativos tras la exposición a TCDD (Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003; Hoegberg et al., 2003; Fletcher et al., 2005). Este incremento en riñón podría estar relacionado, a su vez con la esterificación de retinol y, en consecuencia, el aumento de la concentración de palmitato de retinilo en riñón (Figura S8), un efecto coherente con los estudios de exposición a TCDD previamente mencionados (Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003; Hoegberg et al., 2003; Fletcher et al., 2005). En este efecto podría estar implicado la LRAT, cuya expresión ha sido asociada con la exposición a TCDD (Hoegberg et al., 2003; Nilsson et al., 2000), o lo que es lo mismo, el incremento en la expresión y la actividad de esta enzima podría explicar el incremento en la esterificación de retinol hacia formas de almacenamiento (Fletcher et al., 2005). La exposición a TCDD no provocó cambios en las concentraciones de ésteres de retinilo en suero (Hoegberg et al., 2003), lo cual apoya la idea de que

estos se sintetizaron directamente en el órgano y no se recuperó del suero. Sin embargo, en este estudio se observaron disminuciones significativas tras el tratamiento con ambos compuestos (Figura S7).

#### *Biosíntesis de ácido todo-trans-retinoico*

Un efecto que suele ir asociado y que define el proceso de movilización de retinoides, es el aumento de la concentración de retinol en suero (Fletcher et al., 2005; Håkansson et al., 1987; Kransler et al., 2007; Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003a). En el presente estudio se observó este efecto y, además, este fue comparable en ambos tratamientos (Figura S6 y S7). Otro de los efectos en el hígado que suele acompañar a la exposición a TCDD es la disminución en la concentración de retinol. En estudios a largo plazo se observaron disminuciones hepáticas (Fletcher et al., 2005), sin embargo, en el presente estudio no se observó tal efecto (Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003b), lo cual indica que la toxicocinética juega un papel crucial a la hora de evaluar los efectos de la dioxina.

La ausencia de efectos en la concentración de retinol podría explicar una situación en la que las concentraciones de retinol se mantienen en equilibrio entre la hidrólisis incrementada de palmitato de retinilo y la síntesis de ácido todo-*trans*-retinoico, cuya concentración tendió a incrementarse significativamente tras el tratamiento con C2 (Figura S6). Una explicación tras este efecto sería el incremento en la expresión de alcohol y aldehído deshidrogenasas, o bien la inducción de los citocromos P450 1A1 y 1A2, que catalizan la conversión de retinol a retinal y de retinal a ácido todo-*trans*-retinoico (Chen et al., 2000; Raner et al., 1996; Roberts et al., 1992; Tomita et al., 1996; Zhang et al., 2000).

#### *Biotransformación de ácido todo-trans-retinoico*

Partiendo de los datos de los que disponíamos, se hubiera esperado un aumento de los niveles séricos de ácido todo-*trans*-retinoico (Hoegberg et al., 2003; Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003b), sin embargo estos no se vieron alterados tras la exposición a C2 y C4. Sin embargo en el caso del isómero 13-*cis* del ácido todo-*trans*-retinoico, sí que se detectaron disminuciones comparables con las referidas en la bibliografía (Figura S7). Concretamente, los cambios inducidos en esta forma retinoide se consideran un marcador plasmático de la exposición a TCDD (Fletcher et al., 2005). Una vía por la que estos niveles se encuentran disminuidos puede ser por un aumento en su biotransformación. Estudios previos dirigidos en esta dirección mostraron que la oxidación y la glucuronidación de isómeros *cis* del ácido todo-*trans*-retinoico en microsomas hepáticos de rata fueron más eficaces que para el propio ácido todo-*trans*-retinoico (Genchi et al., 1996; Marchetti et al., 1997; Schmidt et al., 2003b), lo cual podría explicar los bajos niveles séricos encontrados en ratas tratadas con C2 y C4.

En el presente estudio se observaron además cambios en otras formas retinoides, como el ácido 4-OH-todo-*trans*-retinoico en tejidos de rata, cuyas variaciones por efecto del TCDD no han sido estudiadas con anterioridad por las bajas concentraciones en las que se encuentran. De esto y de las diferencias identificadas entre nuestro trabajo y aquellos llevados a cabo con TCDD, se deduce que se requieren más estudios al respecto para conocer con exactitud las similitudes entre las alteraciones inducidas por C2 / C4 y TCDD.



## 8.2. Discusión general

Este estudio proporciona la primera evidencia de que los retardantes de llama HBCD y decaBDE modulan la expresión hepática de ARNm de múltiples genes involucrados en la síntesis y degradación del ácido todo-*trans*-retinoico. Por otro lado, se aporta información sobre la alteración de las concentraciones de retinoides como consecuencia de la exposición a los compuestos mencionados y a otros dos xenobióticos derivados de sendos inmunomoduladores con capacidad de activar el AhR. Aunque en el caso de los inmunomoduladores también se determinen las concentraciones de retinoides en riñón y suero, el órgano objeto de estudio en este trabajo fue el hígado. Este órgano actúa como principal reserva de retinoides en el organismo, concretamente de aquellos que reciben el nombre de retinoides de almacenamiento, cuyo principal componente es el palmitato de retinilo. Por lo tanto, es el hígado desde donde se liberan para cubrir las necesidades en el resto de órganos y, en definitiva, para mantener la homeostasis del sistema retinoide (Theodosiou et al., 2010).

Tabla 11 Resumen de la modulación del sistema retinoide específico de compuesto y sexo

	Movilización de retinoides	Biosíntesis de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	Biotransformación de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	Toxicidad
<b>HBCD</b>				
♀	+	++	++	- Alteración de la homeostasis de la tiroides - Incremento del peso del hígado, pituitaria - Inducción de la T4-glucuronil transferasa - Incremento de colesterol - Incremento densidad mineral ósea
♂	-	+	+	- Disminución del peso del timo - Disminución del número de esplenocitos - Inducción de la T4-glucuronil transferasa
<b>DecaBDE</b>				
♀	-	+	+	- Disminución de la actividad del CYP17
♂	-	+	++	- Incremento del peso de la vesícula seminal - Disminución del epidídimo
<b>Moduladores AhR</b>				
♂	+	+	-	- Disminución del peso del timo - Ligero retraso en ganancia de peso corporal - Ligera inducción de hematopoyesis extramedular hepática

De los dos retardantes de llama, sólo el HBCD provocó la movilización de palmitato de retinilo, caracterizada por la disminución significativa de sus niveles, concretamente en hembras. Este cambio se asoció a la disminución en la expresión de enzimas de esterificación (Nilsson y Håkansson, 2002; Novák et al., 2008), un efecto que aunque también se detectó en machos, no produjo una disminución de palmitato de retinilo dosis-dependiente. En el caso del decaBDE, las hembras también parecieron más sensibles a la exposición, pero en este caso siguiendo una dinámica opuesta, ya que, aunque levemente, se incrementaron los niveles de palmitato, un efecto probablemente precedido de la

inducción correspondiente de la LRAT, cuya función es esterificar el retinol para su posterior almacenamiento en las células estrelladas. La respuesta tras la exposición a los inmunomoduladores fue mucho más marcada y estuvo caracterizada por disminuciones significativas en los niveles de palmitato de retinilo tras el tratamiento tanto con C2 como con C4. Este efecto es uno de los más observados como consecuencia de la activación del AhR, como demuestran estudios previos hechos con TCDD (Nilsson et al., 2000; Schmidt et al., 2003; Hoegberg et al., 2003; Fletcher et al., 2005). Por el contrario, la exposición a estos compuestos produce en riñón un incremento de palmitato de retinilo, probablemente asociado a un incremento en la esterificación mediada por la LRAT (Nilsson et al., 2000; Hoegberg et al., 2003), provocado a su vez por el aumento en la concentración de ácido todo-*trans*-retinoico, efecto que sólo se observó tras el tratamiento con C2. También se observó una disminución de palmitato de retinilo en suero, efecto que podría estar debido a la internalización de este a través del receptor de lipoproteína como vía de recuperación frente a la movilización a nivel hepático.

Los niveles de palmitato de retinilo están estrechamente relacionados con las concentraciones del metabolito ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico. Tras el tratamiento con decaBDE, el metabolito ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico no sufrió variaciones en ninguno de los dos sexos, un efecto coherente con el estado del palmitato de retinilo tras la exposición. Sin embargo, el tratamiento con HBCD apoya la idea de la modulación dependiente de sexo, ya que aunque los niveles de ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico se redujeron en ambos sexos, el efecto fue más acusado en hembras, probablemente como respuesta a una mayor tasa de síntesis de ácido todo-*trans*-retinoico y a la reducción significativa en las reservas de palmitato de retinilo (Schuchardt et al., 2009). La exposición a los dos inmunomoduladores se asoció a disminuciones significativas en la concentración del metabolito ácido 9*c*-4*o*-13,14-dh-retinoico en suero e hígado, probablemente debido a la ausencia de síntesis a partir de ácido todo-*trans*-retinoico o retinol, cuyas concentraciones, de hecho, aumentaron en este tejido.

Una vez el palmitato de retinilo es hidrolizado se produce retinol, que es transportado por la circulación unido a la RBP-TTR a los distintos tejidos extrahepáticos para suplir las necesidades de formas retinoides activas. En este sentido, la exposición a HBCD provocó en hembras un incremento en la concentración de retinol, pero sólo a dosis intermedias, reestableciéndose estas a nivel de los controles a dosis altas. Estas variaciones siguieron un patrón de dosis-respuesta no monotónico que forma parte, probablemente, de un mecanismo de mantenimiento de la homeostasis del retinol dirigido por la inducción simultánea de enzimas implicadas tanto en la síntesis como en la biotransformación del retinol. Esta situación de equilibrio también parece ser la responsable de alguno de los efectos observados tras el tratamiento con decaBDE en ambos sexos, donde tampoco se observaron alteraciones drásticas en la concentración de retinol ni en la de los genes relacionados con la biosíntesis y la biotransformación de este, sino que se mostraron incrementos a dosis intermedias en el caso del retinol

en machos y de la expresión de *Adh* en hembras. De hecho, este patrón no-monotónico correspondiente a una respuesta en forma de U invertida se detectó en numerosos genes tras el tratamiento con decaBDE.

La respuesta del retinol hepático a los inmunomoduladores también fue débil, pues sólo el aumento observado tras la exposición a C4 fue significativo. Sin embargo, en riñón aumentaron claramente tras el tratamiento con ambos compuestos. Este aumento de retinol en riñón, junto al observado en suero, podría indicar no sólo un aumento de la internalización de palmitato de retinilo desde el suero, sino además un incremento de la síntesis en el propio riñón.

Hasta transformarse en ácido todo-*trans*-retinoico, el retinol sufre dos reacciones en las que están involucradas numerosas enzimas, como ADHs, RDHs, CYPs 1A y 1B, AOX1 y/o ALDH1 (Blomhoff y Blomhoff, 2006). Tanto la exposición a decaBDE como a HBCD estuvieron asociadas a la inducción de algunas de estas enzimas, catalizando el paso de retinol a retinal y de retinal a ácido todo-*trans*-retinoico. Sin embargo, estas inducciones no se tradujeron en un incremento en la biosíntesis neta de ácido todo-*trans*-retinoico: la exposición a decaBDE provocó disminuciones en ambos sexos y el HBCD sólo en machos.

En el caso del estudio con inmunomoduladores, se observan incrementos en la concentración de ácido todo-*trans*-retinoico tras la exposición a C2. Concretamente, estos cambios se detectaron en hígado y en riñón. Mientras que el incremento en hígado pudo verse debido a la inducción de enzimas de biosíntesis, el ácido todo-*trans*-retinoico renal podría haberse producido o por síntesis o por recaptación de retinol, de ácido todo-*trans*-retinoico o de sus metabolitos desde el suero.

La disminución de ácido todo-*trans*-retinoico observada tras el tratamiento con decaBDE podría estar relacionada con la inducción de enzimas de biotransformación y transporte en ambos sexos (Theodosiou et al., 2010), siendo esta inducción más acusada en machos que en hembras, efecto que se refleja en una disminución más potente en las concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico (Kakizaki et al., 2002; Kawamoto et al., 1999; Chen et al., 2009; Kedishvili, 2013). Por otro lado, la inducción de enzimas de biotransformación tras la exposición a HBCD (Germer et al., 2006; Chen et al., 2009) fue más significativa en hembras, tanto de CYPs como de UGTs, aunque sólo se observó una clara disminución de ácido todo-*trans*-retinoico en machos, probablemente debido a que la potencia con la que se indujo la biosíntesis de ácido todo-*trans*-retinoico fue mayor en hembras que en machos, lo cual permitió mantener con mayor eficacia su homeostasis.

La exposición a los dos inmunomoduladores se asoció a disminuciones significativas en la concentración de los metabolitos 13-*cis* en suero e hidroxilado en hígado, no así en riñón donde no se

detectaron diferencias, probablemente debido a la ausencia de síntesis a partir de ácido todo-*trans*-retinoico o retinol o por un incremento en la glucuronidación mediada por UGTs y posterior excreción.

Las alteraciones observadas de genes clave en el sistema retinoide tras la exposición a HBCD son más pronunciadas en hembras en comparación con machos, lo cual va en la línea de los patrones de expresión hepática observados con anterioridad, que demostraron ser modulados en un grado significativamente mayor en ratas hembra (Cantón et al., 2008). Tales alteraciones dependientes del sexo también están apoyadas por el perfil de toxicidad más pronunciado de HBCD en ratas hembras (van der Ven et al., 2006). Los cambios en el sistema retinoide más sensibles en las ratas hembra ocurrieron por debajo o en el extremo inferior de las dosis a las cuales se detectaron con anterioridad observaciones toxicológicas como el incremento de peso de hígado, pituitaria y tiroides, cambios en parámetros óseos, disminución de niveles de T4, reducción de la fosfatasa alcalina plasmática y colesterol plasmático incrementado (CEDLs = 1.6 - 56 mg HBCD/kg pc/día; van der Ven et al., 2006).

La exposición a decaBDE también moduló la expresión de ARNm de múltiples genes relacionados con la síntesis y degradación oxidativa del ácido todo-*trans*-retinoico, provocando en última instancia una disminución en los niveles hepáticos de este. No obstante, esta reducción fue más pronunciada en ratas macho que en hembras, resultados que van en la línea del perfil de toxicidad más pronunciado en machos para este PBDE (van der Ven et al., 2008a).

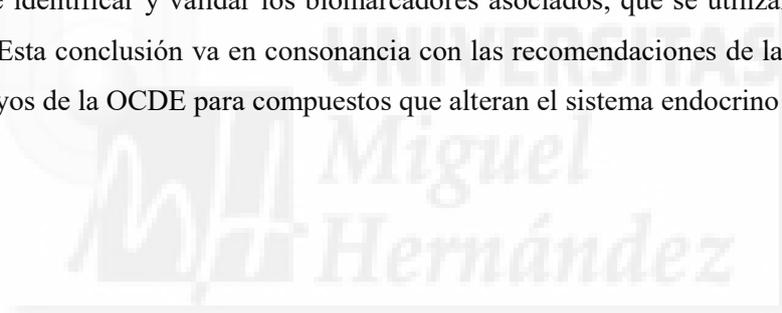
Los resultados obtenidos defienden la necesidad de una investigación más profunda para aclarar cualquier pre-requisito estructural y/o dinámico implicado con las alteraciones específicas del sistema retinoide por exposición a decaBDE y una evaluación de los efectos en hembras expuestas a HBCD, pues parecen ser las más vulnerables a este BFR.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, los dos nuevos compuestos ensayados son considerados potentes activadores del AhR, pues reproducen la gran mayoría de los efectos observados en el sistema retinoide tras la exposición a TCDD. No obstante, los animales expuestos no mostraron algunos de los efectos tóxicos característicos del TCDD, probablemente debido a diferencias entre la farmacocinética de esta dioxina y la de los compuestos ensayados (Mahiout et al., 2017). La diferente sensibilidad del receptor a los distintos ligandos, así como la promiscuidad del lugar de unión a este, son factores que también podrían condicionar los efectos y la ruta de señalización del AhR.

Dadas todas estas incertidumbres, se requeriría llevar a cabo estudios con más dosis en los que hacer hincapié en posibles efectos de tipo II o con los que ampliar el conocimiento sobre la afinidad del

receptor a los compuestos ensayados. No obstante, como resultado preliminar, C2 y C4 podrían considerarse potenciales activadores selectivos el AhR.

Estos resultados apoyan la necesidad urgente de evaluar las modulaciones del sistema retinoide dentro de los métodos de ensayo existentes para cualquier tipo de producto químico, utilizar otros escenarios de exposición y abordar efectos adicionales a los del presente estudio. A pesar del papel fundamental que tiene una apropiada fisiología de los retinoides para todos los órganos y funciones desde las primeras etapas de la vida embrionaria y durante el curso de esta, no existen tales requisitos en los mencionados estudios de experimentación animal. Sin embargo, es bien sabido que, en términos farmacológicos, los aspectos de seguridad de los retinoides, cuando se usan como fármacos para el cáncer o como tratamientos tópicos o de otro tipo, son considerables. Además, las anomalías en el sistema retinoide se han correlacionado con resultados toxicológicos en varias especies y tipos de estudios (Chu et al., 2001, 2008; Fletcher et al., 2005; Nilsson y Håkansson, 2002; Van den Berg et al., 2006; Zile, 2001). Sin embargo, es necesario definir los mecanismos precisos tras las irregularidades observadas en el sistema retinoide, que sólo se han aclarado para algunas sustancias químicas (Jacobs et al., 2011; Tonk et al., 2014), además de identificar y validar los biomarcadores asociados, que se utilizarán en los estudios observacionales. Esta conclusión va en consonancia con las recomendaciones de la reciente estrategia ampliada de ensayos de la OCDE para compuestos que alteran el sistema endocrino (OCDE, 2012).



## 9. CONCLUSIONES

La exposición durante 28 días a la mezcla técnica de HBCD:

- Se acompañó de una reducción en los niveles de palmitato de retinilo y de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico en hígado de ambos sexos, lo que indica una movilización de retinoides de almacenamiento a precursores del ácido retinoico.
- En hembras, se asoció con la inducción de enzimas implicadas en la biosíntesis del ácido todo-*trans*-retinoico (*Adh1*, *Aldh1a1* y *Aox1*) y en su biotransformación (*Cyp26a1*, *Ugt1a1*, *Ia6* y *Ia9*, así como CYP2B y CYP3A), a la vez que los niveles de dicho retinoide se mantuvieron en rangos basales.
- En machos, se produjo una inducción de enzimas de biosíntesis (*Aldh1a1* y *Aox1*), menos potente y eficaz que en hembras, y de biotransformación (*Ugt1a1*, así como CYP2B y CYP3A), lo que se asoció a una disminución en los niveles de ácido todo-*trans*-retinoico.

La exposición durante 28 días a la mezcla técnica de decaBDE:

- Se asoció con la ausencia de movilización neta de palmitato de retinilo en ambos sexos, en base a la ausencia de reducciones significativas en los niveles de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico y palmitato de retinilo y a la expresión de *Lrat*, implicada en el almacenamiento de ésteres de retinilo.
- Careció de efectos en la expresión génica de genes implicados en la biosíntesis de ácido todo-*trans*-retinoico en machos, tales como *Adh1*, *Rdh10*, *Aox1* y *Aldh1a1*.
- Provocó una ligera acumulación de palmitato de retinilo en hembras, apoyada por el aumento en la expresión de *Lrat*.
- Produjo una disminución en los niveles de ácido todo-*trans*-retinoico junto con un incremento de la expresión de genes implicados en la biotransformación del mismo, es decir *Crabp1*, proteína de transporte celular de ácido todo-*trans*-retinoico, *Cyp26a1*, enzima de biotransformación que oxida de manera altamente específica dicho retinoide funcional, así como de la actividad CYP2B.

El tratamiento durante 5 días consecutivos con IMA-08401 e IMA-07101:

- Indujo la movilización de retinoides, que se reflejó en la disminución de los niveles de palmitato de retinilo y de ácido 9c-4o-13,14-dh-retinoico en hígado y un aumento de retinol en suero.
- Provocó un incremento de los niveles de ácido todo-*trans*-retinoico en hígado lo que se consideró una inducción de su biosíntesis.
- Se relacionó con efectos tipo I de dioxinas sobre la homeostasis del sistema retinoide.



## 10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1 Secuencias de los cebadores diseñados para los análisis de expresión de ARNm por qPCR.

Nombre del gen	ID	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
<i>β-Actin</i>	81822	AGCCATGTACGTAGCCATCCA	TCTCCGGAGTCCATCACAATG
<i>Eef1a1</i>	171361	CCGGCAAGTCCACCACAACCG	GCCCTTTCCCATCTCAGCAGCC
<i>Gapdh</i>	24383	ATCCGCTAACATCAAATGG	GTGGTTCACACCCATCACAA
<i>Adh1</i>	24162	TGGGAGCCTCACAAGCCCTTCA	TGCTTTCCGGGTGCTTGCAGA
<i>Aldh1a1</i>	24188	GGTGCTTTCTGTCTAGCTCCC	GGGTACAGAGGGACAGAGCTT
<i>Aox1</i>	54349	GCTAGGGACCTCGTCGTATGGAT	TGGTGTGGGGTTGTACCGTGA
<i>Crabp1</i>	25061	AGGCTCTGGGTGTGAACGCCAT	ACTCCTGCACTTGCCTCCGT
<i>Crbp1</i>	25056	ATGCTGTGGACTTCAACGGGT	TGGTCGCCATCTGCACGATCT
<i>Cyp1b1</i>	25426	GCAGATCAACCGCAACTTCAGCAAC	GTCTGTAATAGTGGCAGGCACATCC
<i>Cyp26a1</i>	154985	CGCTCAAGCTCTGGGACCTGTA	AATGGGAAGCCCATGGTACCCG
<i>Lrat</i>	64047	TCCCTCCTTCTGGAGAAGCTGC	TCCAACACGTCACCCCGGAGAA
<i>Rdh10</i>	353252	TGCTCTGCAAGCTGGGAACGGT	ACCTCACCAACCTCCTTGCAGGA
<i>Ugt1a1</i>	24861	GCAGGAGAGCTACCATGTCCGT	ACGCAGAGGGACCCAACACACA
<i>Ugt1a6</i>	113992	ATCACGTGCGCAGGTCTCTAAC	ACCTAGAAGTGTAGCCCCAGAGC
<i>Ugt1a9</i>	396552	CGTGTGTGGCTTAACTGTTGCC	TGGGCACTGGGCACCTCTTTA
<i>Ahr</i>	25690	CGGCTGAACACAGAGTTAGACC	GCAACATCAAAGAAGCTCTTGG
<i>Ahr<sup>a</sup></i>	498999	GCACCGGGACCGCTCAATA	CTGCAAGGCTTGAAGAAGCTC
<i>Arnt</i>	25242	CATCGTTGTGTGGCTACTG	GCTGTCTCTTAGAAGTTGTTGG
<i>Car</i>	65035	TGGTCCCATCTGTCCGTTTGTCT	TCCCAGGGCTTCTGTCTGACA
<i>Pxr</i>	84385	AAGGGCGTCATCAACTTCGCCA	CCCTTCAGCAGGGAGATCTGGT
<i>Rar α</i>	24705	CATCCGGCTACCACTATGGGGT	CGGTTCCGGGTCACCTTGTTGA
<i>Rar β<sup>a</sup></i>	24706	AGTACCAGCTCTGAGGAGCTCG	TCGCAGGCACTGACGCCATA
<i>Rar γ</i>	685072	GCTTCCTTGGACATGCCACT	TGTCCCCACAGATGGCACAGA
<i>Rxr α</i>	25271	ATGGCGTCCCTCAAGGTTCCCTGC	AAGAAGCCCTTGACGCCCTCA
<i>Rxr β</i>	361801	ATTCCCGAAGCCAGACAGCTC	ACTGATGACTGGGAAGGGGGAG
<i>Rxr γ</i>	83574	TCAAGCCCTTACCAGGTCTGCC	TGTCCCCACAGATGGCACAGA
<i>Thr α</i>	81812	GCCAGGTCACCAGATGGAAAGCG	CGGTGGCCTTGTCCCCACAC
<i>Thr β</i>	24831	GAGAACCCTGAGAAGAGGCGG	TGGGCATTGGTGGCCACG

Genes constitutivos: *β-Actina*: beta-actina; *Gapdh*: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; *Eef1a1*: Factor eucariótico de elongación de la traducción 1 alfa 1. *Adh*: Alcohol deshidrogenasa de cadena media citosólica; *Aldh*: Retinal deshidrogenasa; *Aox*: Aldehído oxidasa; *Crabp*: Proteína celular de unión al ácido retinoico; *Crbp*: Proteína celular de unión al retinol; *Cyp*: Superfamilia de citocromos P450; *Lrat*: Lecitin:retinol aciltransferasa; *Rdh10*: Retinol deshidrogenasa; *Ugt*: UDP-glucuronosiltransferasa; *Ahr*: Receptor arilo de hidrocarburos; *Ahr<sup>a</sup>*: Represor del receptor arilo de hidrocarburos; *Arnt*: Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; *Car*: Receptor constitutivo de androstano; *Pxr*: Receptor X de pregnano; *Rar*: Receptor del ácido retinoico; *Rxr*: Receptor X retinoide; *Thr*: Receptor de la hormona tiroidea (de arriba a abajo).

Tabla S2 T-test de los valores delta-CT hembras frente a machos <sup>1</sup> (HBCD)

Genes	Hembras	Machos	p-valor <sup>a</sup>
<i>Adh1</i>	0.25 ± 0.10	0.28 ± 0.15	0.72
<i>Aldh1a1</i>	0.03 ± 0.02	<b>0.11 ± 0.04</b>	0.04
<i>Ahr</i>	<b>0.03 ± 0.01</b>	0.02 ± 0.01	0.23
<i>Aox1</i>	0.23 ± 0.03	<b>0.30 ± 0.08</b>	0.14
<i>Arnt</i>	<b>0.00015 ± 0.00003</b>	0.00010 ± 0.00002	0.12
<i>Car</i>	0.0037 ± 0.0013	<b>0.023 ± 0.006</b>	0.01
<i>Crabp1</i>	<b>0.0009 ± 0.0009</b>	0.0004 ± 0.0002	0.10
<i>Crbp1</i>	<b>0.10 ± 0.02</b>	0.05 ± 0.004	0.01
<i>Cyp26a1</i>	<b>0.0014 ± 0.0007</b>	0.0006 ± 0.0006	0.14
<i>Cyp1b1</i>	<b>0.0005 ± 0.0003</b>	0.0003 ± 0.0002	0.03
<i>Lrat</i>	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.003	1.0
<i>Pxr</i>	0.01 ± 0.005	0.01 ± 0.004	0.62
<i>Rar α</i>	0.005 ± 0.001	<b>0.007 ± 0.001</b>	0.08
<i>Rar γ</i>	0.008 ± 0.007	<b>0.01 ± 0.002</b>	0.57
<i>Rdh10</i>	0.015 ± 0.004	0.016 ± 0.004	0.77
<i>Rxr α</i>	0.04 ± 0.01	<b>0.09 ± 0.03</b>	0.02
<i>Rxr β</i>	0.0021 ± 0.0006	<b>0.0026 ± 0.0005</b>	0.11
<i>Rxr γ</i>	<b>0.025 ± 0.002</b>	0.019 ± 0.004	0.04
<i>Thr α</i>	0.0017 ± 0.0008	<b>0.0020 ± 0.0003</b>	0.50
<i>Thr β</i>	0.011 ± 0.003	<b>0.015 ± 0.0036</b>	0.11
<i>Ugt1a1</i>	0.08 ± 0.02	<b>0.11 ± 0.04</b>	0.20
<i>Ugt1a6</i>	0.04 ± 0.02	<b>0.13 ± 0.04</b>	0.03
<i>Ugt1a9</i>	<b>0.018 ± 0.007</b>	0.014 ± 0.0032	0.36

<sup>1</sup> Valores en negrita indican qué sexo fue más afectado. <sup>a</sup> T-test llevado a cabo con Graph Pad Prism (versión 5.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA).

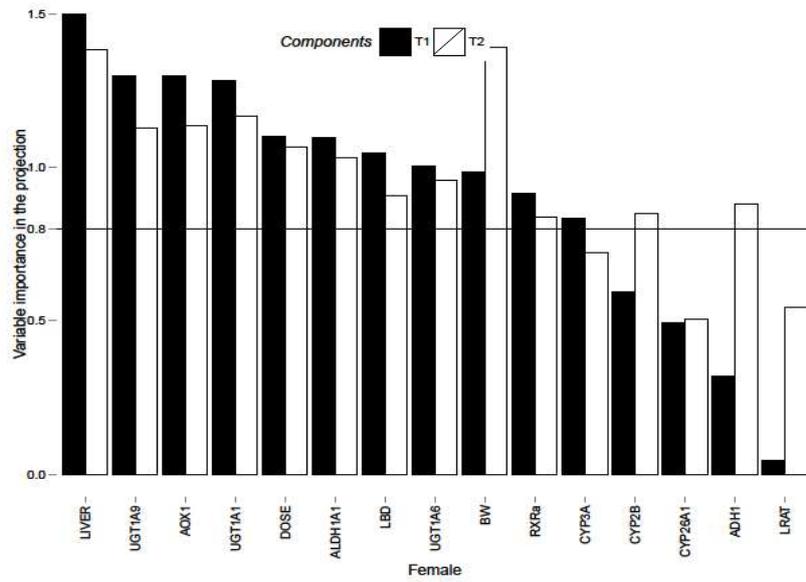
Tabla S3 T-test de los valores delta -CT hembras frente a machos (decaBDE)

<b>Genes</b>	<b>p-valor<sup>a</sup></b>	<b>Genes</b>	<b>p-valor<sup>a</sup></b>
<i>Adh1</i>	0.15	<i>Rar α</i>	0.11
<i>Aldh1a1</i>	0.14	<i>Rar γ</i>	0.06
<i>Ahr</i>	0.40	<i>Rdh10</i>	0.92
<i>Aox1</i>	0.57	<i>Rxr α</i>	0.04
<i>Arnt</i>	0.26	<i>Rxr β</i>	0.14
<i>Car</i>	0.02	<i>Rxr γ</i>	0.48
<i>Crabp1</i>	0.47	<i>Thr α</i>	0.08
<i>Crbp1</i>	0.06	<i>Thr β</i>	0.21
<i>Cyp26a</i>	0.28	<i>Ugt1a1</i>	0.13
<i>Cyp1b1</i>	0.62	<i>Ugt1a6</i>	0.92
<i>Lrat</i>	0.11	<i>Ugt1a9</i>	0.01
<i>Pxr</i>	0.12		

<sup>a</sup> p-valor significativamente diferente < 0.05 según el t-test.



### A - Hembras



### B - Machos

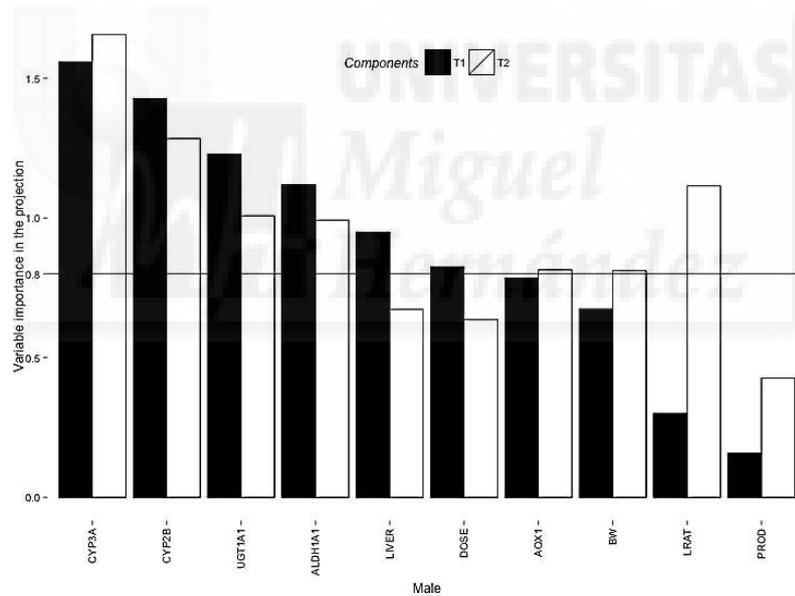
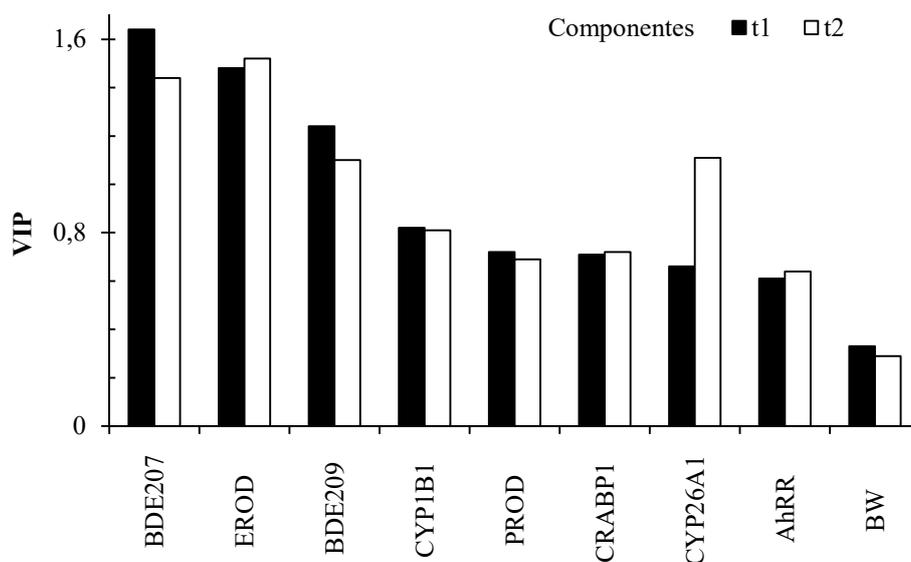


Figura S1 Importancia de la variable en la proyección (VIP) por componentes de las variables X del análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para concentraciones de retinoides hepáticos (variables Y) en ratas Wistar hembra (A) y macho (B) tratadas con la mezcla técnica de HBCD durante 28 días. Las barras negras se corresponden con la componente t1 y las blancas con la componente t2.

A - Machos



B - Hembras

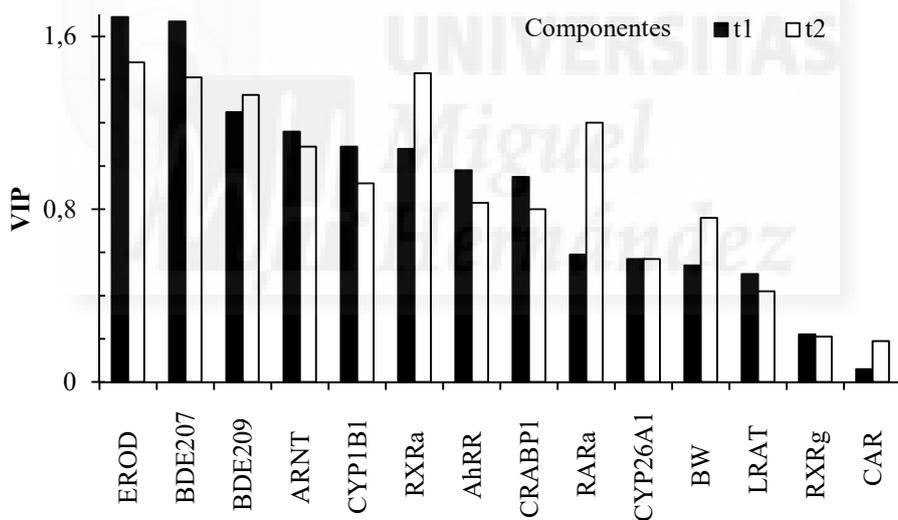


Figura S2 Importancia de la variable en la proyección (VIP) por componentes de las variables explicativas del análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para las concentraciones de retinoides hepáticos por observaciones toxicológicas en ratas macho y hembra Wistar (A) tratadas con DecaBDE durante 28 días. Barra negra, componente t1 y barra blanca, componente t2. AhRR: Represor del receptor arilo de hidrocarburos; ARNT: Translocador nuclear del receptor arilo de hidrocarburos; BDE207 y BDE209: Difenil éteres bromados; BW: peso corporal; CAR: Receptor constitutivo de androstano; CRABP1: Proteína celular de unión al ácido retinoico; CRBP1: Proteína celular de unión al retinol; CYP1B1: Superfamilia de citocromos P450 1B1; CYP26A1: Superfamilia de citocromos P450 26 A1; EROD: Actividad enzimática etoxiresorufin-O-deetilasa; LRAT: Lecitin:retinol aciltransferasa; PROD: Actividad enzimática 7-pentoxiresorufin O-desalquilasa; RARa: Receptor de ácido retinoico  $\alpha$ ; RXRa: Receptor X retinoide  $\alpha$ ; RXRg: Receptor X retinoide  $\gamma$ . Véase Datos complementarios en van der Ven et al., 2008 para obtener información detallada sobre el peso corporal y de órganos, la química clínica del plasma, las hormonas tiroideas y el metabolismo hepático de fármacos. Los valores VIP representan la relevancia de cada variable explicativa en los componentes y las variables retinoides resultantes. Se seleccionaron dos componentes en el modelo monitorizando el error equivalente de la media cuadrática (ver *Materiales y métodos*).

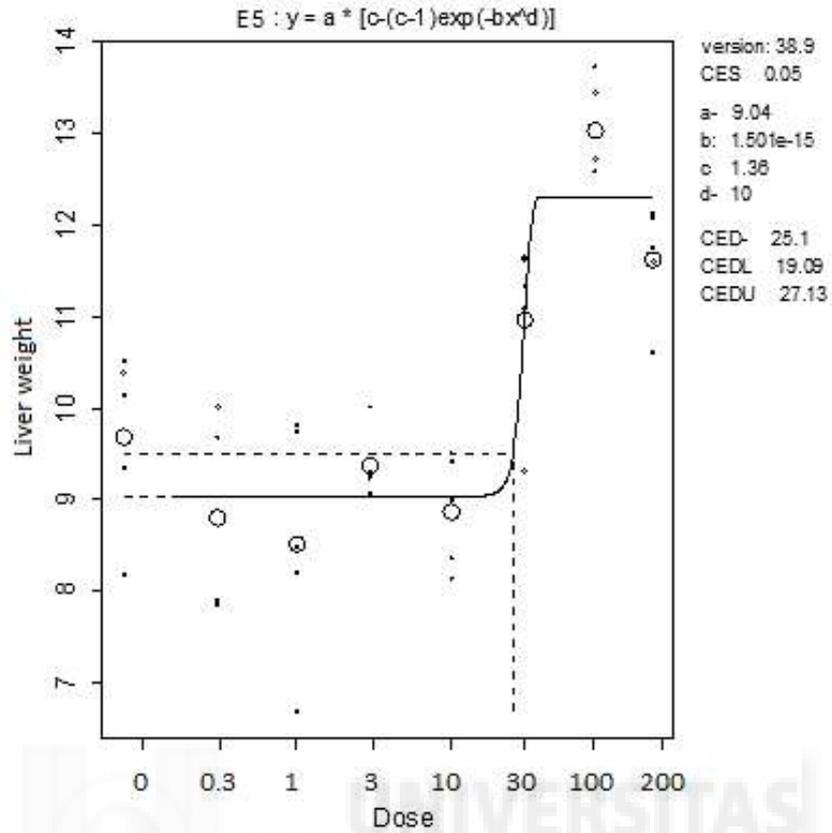


Figura S3 Relación dosis-respuesta del peso del hígado (g) en ratas hembras, mostrado como una función de la dosis oral de HBCD (mg/kg p.c./d). Se seleccionó el modelo exponencial E5 para la descripción de los datos (ver ecuación más arriba). El valor de CEDL (19.09 mg/kg p.c./d) indica una respuesta sensible que está en línea con otros parámetros medidos en el presente estudio (Tabla 4).

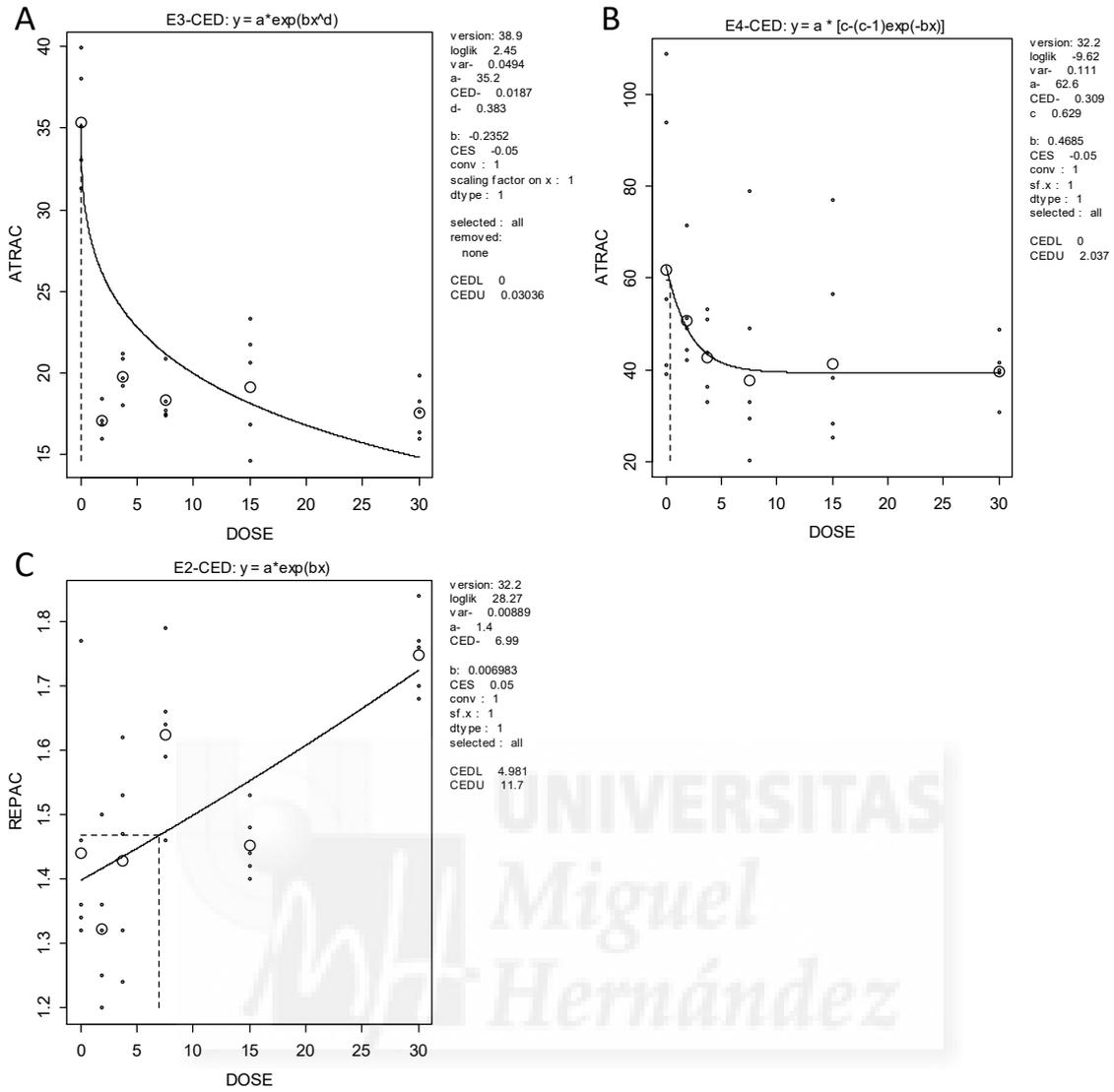
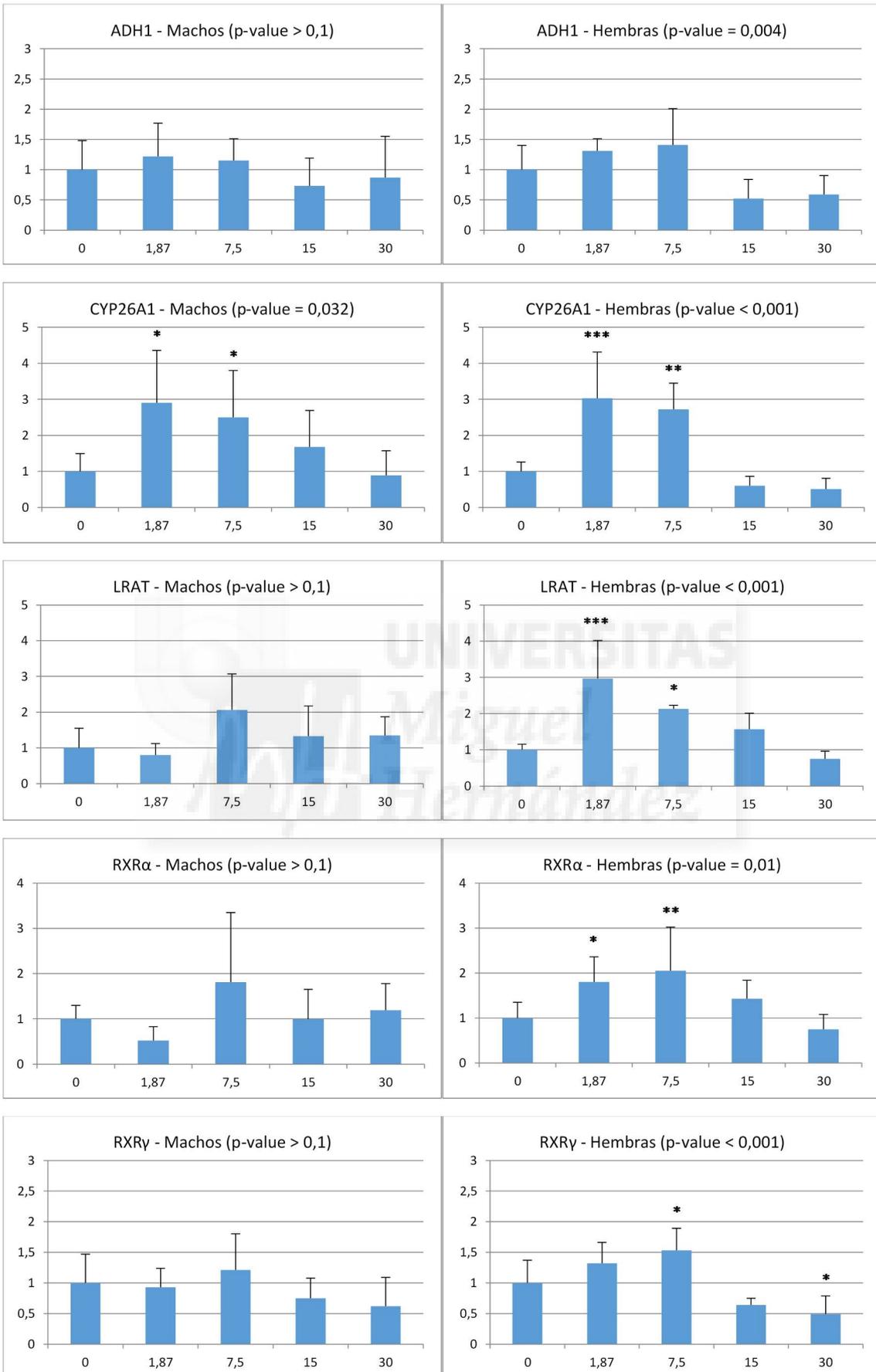
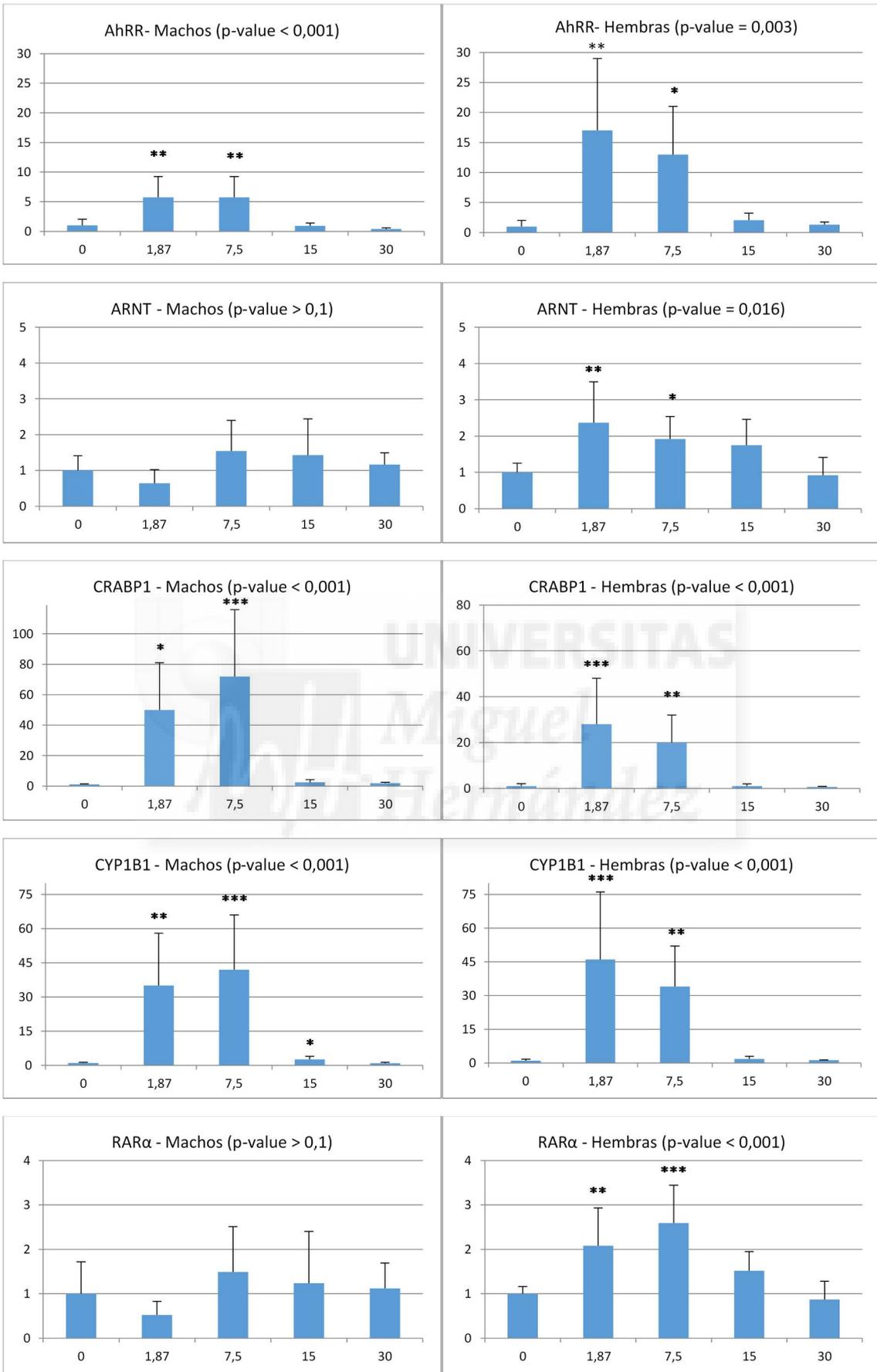


Figura S4 Relaciones dosis-respuesta para ácido todo-*trans*-retinoico (A) en machos y para ácido todo-*trans*-retinoico (B) y palmitato de retinilo (C) en hembras expuestas a decaBDE.





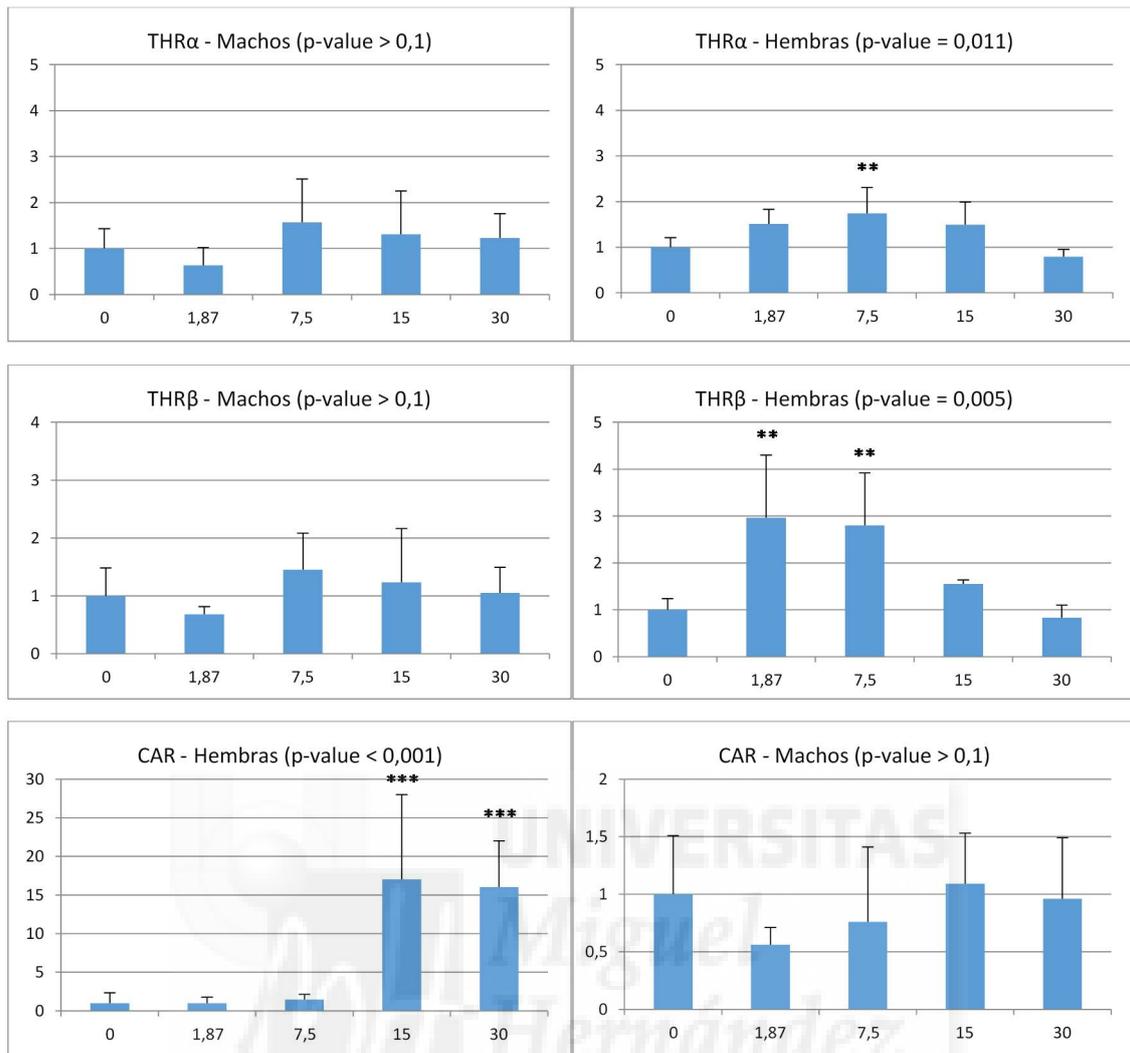


Figura S5 Expresión hepática de ARNm de los genes alterados tras la exposición a decaBDE, en relación a  $\beta$ -actina y expresada en relación a la media del control (Eje Y: expresión relativa, eje X: dosis).

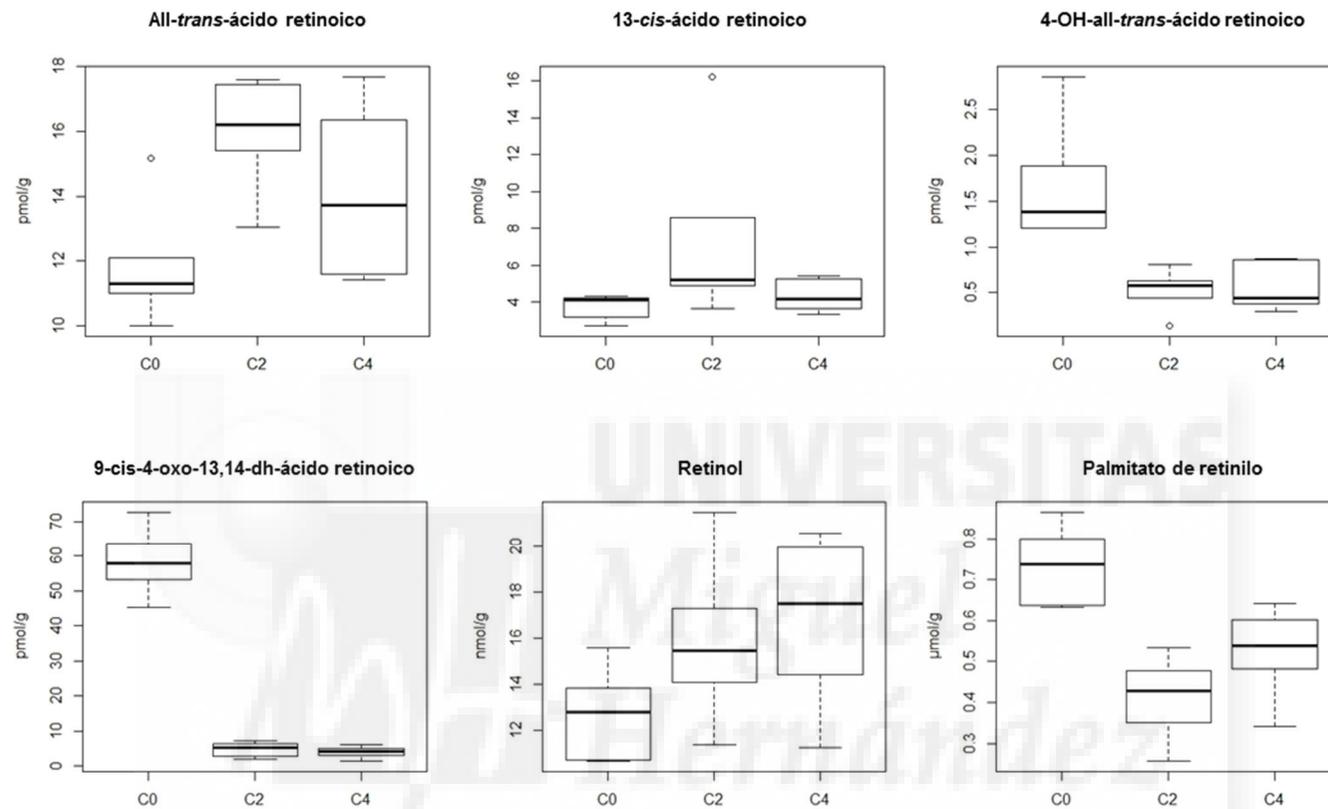


Figura S6 Diagramas de caja para los seis retinoides analizados comparando el grupo control (C0) y los grupos de tratamiento (C2, IMA-08401 y C4, IMA-07101) para muestras de hígado.

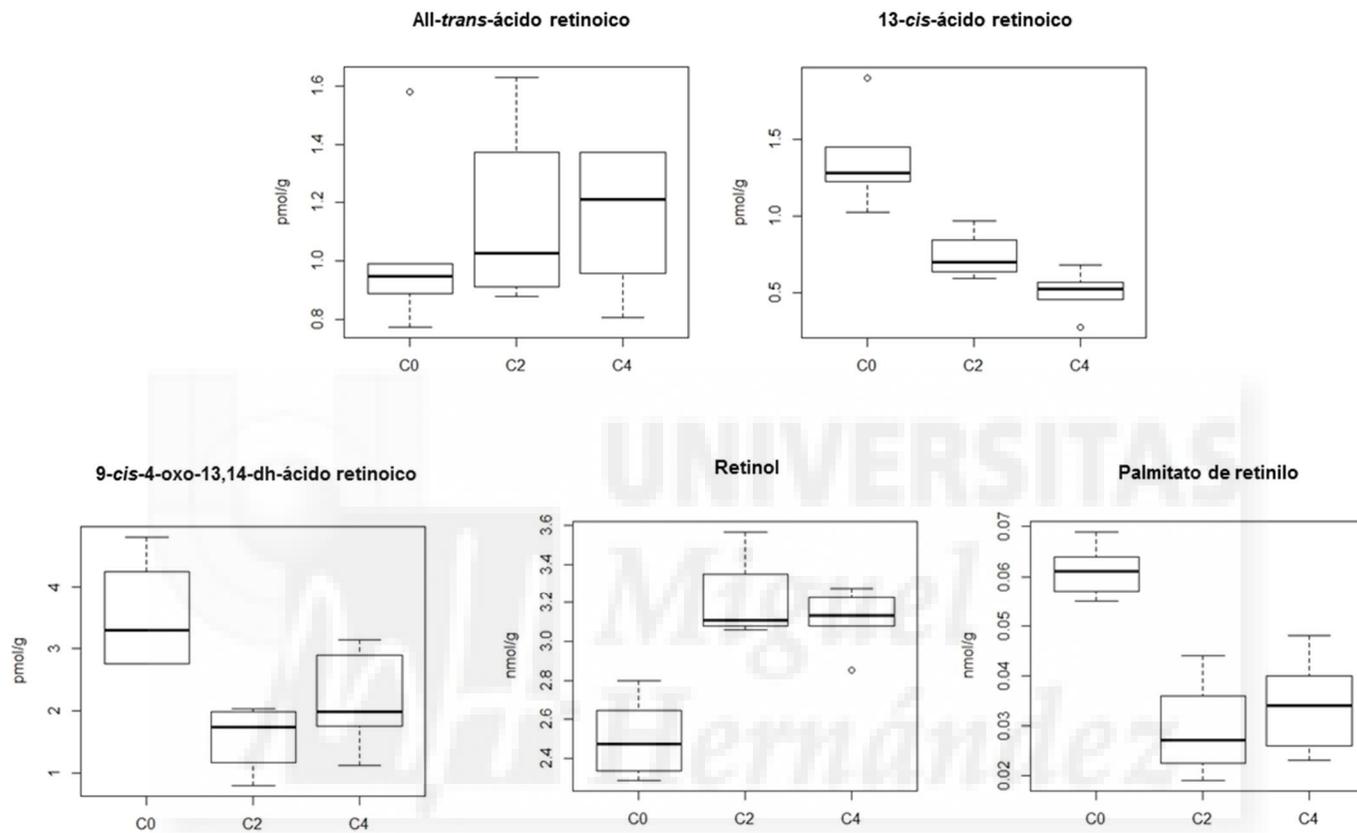


Figura S7 Diagramas de caja para los seis retinoides analizados comparando el grupo control (C0) y los grupos de tratamiento (C2, IMA-08401 y C4, IMA-07101) para muestras de suero.

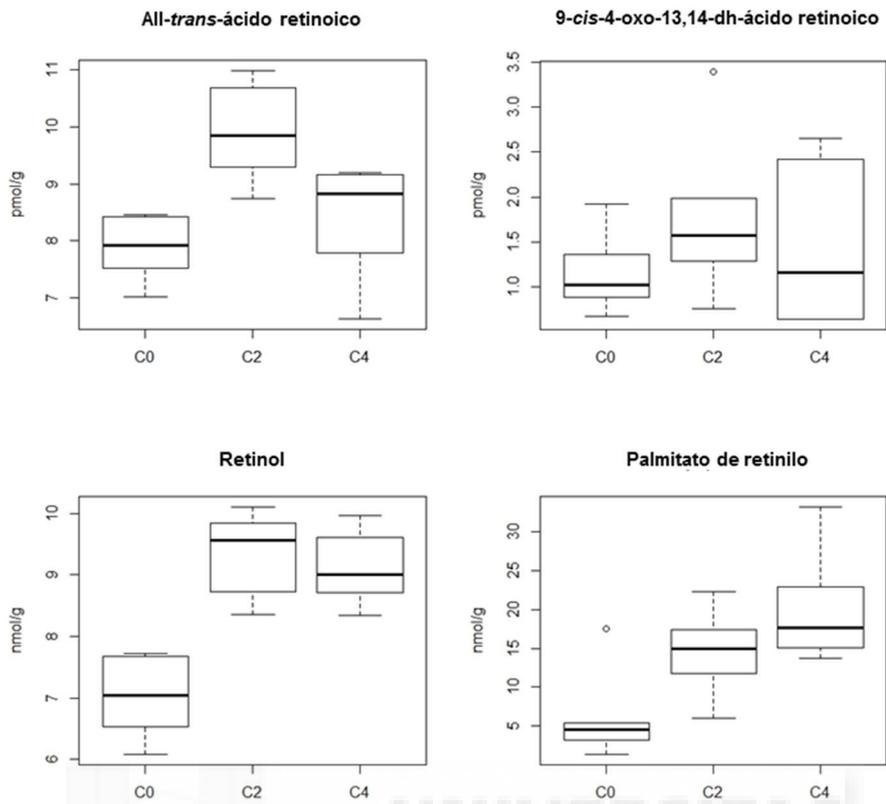


Figura S8 Diagramas de caja para los seis retinoides analizados comparando el grupo control (C0) y los grupos de tratamiento (C2, IMA-08401 y C4, IMA-07101) para muestras de riñón.

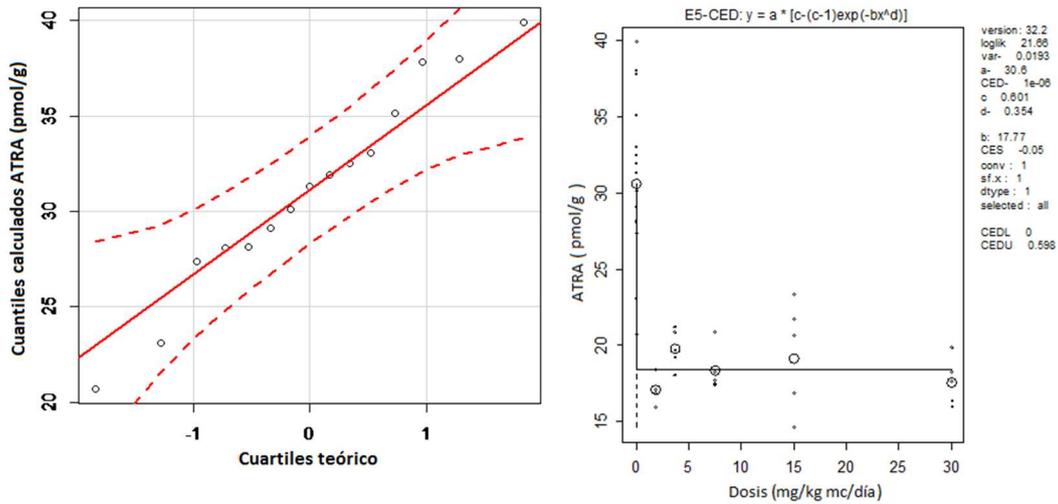


Figura S9 Evaluación de la concentración de los niveles control de ácido todo-*trans*-retinoico hepático en machos del estudio con decaBDE usando controles de otros estudios. A. Gráfico Cuantil-Quantil Normal: distribución estadística de las concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico (ordenadas) frente a distribución estadística normal teórica (abscisas). Línea sólida, distribución estadística normal; líneas discontinuas, intervalo de confianza al 95% de la distribución estadística normal; ○ concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico (pmol/g hígado) para cada animal (n = 15). B. Modelado dosis-respuesta decreciente para la concentración de ácido todo-*trans*-retinoico (pmol/g hígado) en ratas Wistar macho. Grupo control ampliado hasta 15 ratas. Línea sólida, modelado exponencial; ◑, concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico para cada animal (n = 15 controles + 25 animales tratados); ◐, media de las concentraciones de ácido todo-*trans*-retinoico en cada grupo de tratamiento.



## 11. APÉNDICES

### 11.1. Preparación de la muestra

#### APÉNDICE 11.1.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS
SANGRE Suero	0.05 ml	ROH	CPE: Genapol X-080 NaCl (s) ACN	Sirimanne et al., 1998
Suero de ratón	0.2 ml	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	LL: 0.025 M KOH en EtOH. Hexano, HCl y evaporación. Reconstitución con ACN	Kane et al., 2005
Suero	0.02 - 0.1 ml	All- <i>trans</i> -4-oxoretinoil- $\beta$ -glucuronido, all- <i>trans</i> -retinoil- $\beta$ -glucuronido, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -RAL, ésteres de retinilo	LL: 2-P-DCM (2:1) y AA o EA y hexano	Barua & Olson, 1998
Suero	0.5 ml	All- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9,13- <i>dicis</i> -RA, 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA, 4-oxo-all- <i>trans</i> -RA	LL: ACN y HCl. Hexano. Evaporación y reconstitución ACN:agua (60:40) o PP: ACN	Arnold et al., 2012
Plasma	0.05 ml	RA	LL: ACN. EA:hexano (1:1). Evaporación y reconstitución con ACN	Teglia et al., 2014
Plasma	0.2 ml	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	LL: DEE (5% BHT). Evaporación y reconstitución con MeOH:ACN (1:1) y MeOH:AmA (0.1 M) (90:10, v/v)	Wang et al., 2003
Plasma	0.2 - 1 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	LL: DEE-EA (50:50). Evaporación y disolución en MeOH	Disdier et al., 1996
Plasma	1 ml	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, metabolitos 4-oxo	LL: EtOH, hexano, tampón fosfato. Evaporación y redisolución en PFB-benzeno. Evaporación, hexano y ACN	Renalder et al., 1993
Suero	0.6 ml	ROH	LL: EtOH, solución NaCl (30%), hexano. Evaporación y reconstitución con agua/MeOH/MtBE (1:2:1; v/v/v)	Zhu et al., 2006
Plasma	0.1 ml	ROH	LL: EtOH, n-hexano (BHT). Evaporación y reconstitución 2-P	Schweigert et al., 2003
Plasma	0.1 ml	RA	LL: HCl, MeOH, hexano y metilación	Napoli et al., 1985
Suero de ratón	0.1 ml	ROH, REPA	LL: Hexano y agua. Evaporación y reconstitución con ACN/MeOH/MC (70:15:15, v/v/v)	Kim & Quadro, 2010
Suero de rata	0.45 ml	All- <i>trans</i> -RA	LL: MeOH, n-hexano:EA (1:1). Secado y reconstitución con ACN	Kumar et al., 2014

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS	
SANGRE	Sangre (manchas de sangre seca)	Círculos de 6.35 mm Ø (12 µL sangre)	ROH	LL: Agua (10 g/L AsA), sonificado. ACN y <i>n</i> -hexano (5g/L BHT)	Erhardt et al., 2002
	Plasma	0.1 ml	ROH, α-tocoferol, γ-tocoferol	LL: Agua, EtOH + BHT y hexano. Evaporación y reconstitución con THF y EtOH.	Bell et al., 2014
	Suero	0.1 ml	ROH	SPE en línea: BSA-80Ts 13 µm, 10 x 4.6 mm, 200 nM SDS–EtOH (70:30) con 200 mM EDTA y 0.3% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Moriyama et al., 1998
	Suero de ratón	0.1–0.2 ml	All- <i>trans</i> -RAL	Derivatización en oxima: MeOH, O-etilhidroxilamina (0.1 M). LL: Hexano. Evaporación y reconstitución en ACN.	Wang et al., 2015
	Suero de rata	3-veces 2P	14-hydroxi- <i>retro</i> -ROH, 4-hydroxi-ROH	PP y LL: 2-P. SPE automatizada	Rühl et al., 2005
	Suero de rata	0.125 ml	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	PP y LL: 2-P. SPE automatizada	Rühl & Schweigert, 2003
	Plasma	0.1 ml	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA y all- <i>trans</i> -ROH	PP y LL: ACN (Extracción en mono-fase)	Gundersen et al., 2007
	Plasma de vaca	1 vol	13- <i>cis</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	PP: 2-P. AA. SPE (hexano, AA en 2-P/Chl (1/1, v/v), MeOH, NH <sub>4</sub> OH, agua). Evaporado y disuelto en ACN:MeOH:Chl:AA (17:68:5:10, v/v/v/v)	Horst et al., 1995
	Suero de ratón	0.1 ml	9- <i>cis</i> -13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -13,14-dihidro-RA	PP: 2-P. Evaporación y reconstitución con MeOH y solución de AmA	Rühl et al., 2015
	Suero	3-fold 2-P	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA y ROH	PP: 2-P. Evaporación y reconstitución con MeOH y solución de AmA	Rühl, 2006
	Suero de ratón	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	PP: 2-P. LL: Chl. SPE: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH / EtOH	Schmidt et al., 2003
	Suero de rata	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	PP: 2-P. LL: Chl. SPE: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH / EtOH	Schmidt et al., 2003
	Suero	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	PP: 2-P. LL: Chl. SPE: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH / EtOH	Schmidt et al., 2003

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS
SANGRE Plasma	0.5 ml	13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	PP: 2-P+BHT. Solución de AmA y SPE Accubond Metil-C1, 100 mg, eluyendo con MeOH, AmA y ACN. Conversión a pentafluorobencil éster, evaporación y disolución en ACN+BHT	Lehman & Franz, 1995
Plasma	0.2 ml	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	PP: ACN. Evaporación y reconstitución con ACN-agua (65:35, v/v)	Dimitrova et al., 1996
Plasma	0.35 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	PP: ACN. Concentración en columna.	Teerlink et al., 1997
Suero	0.5 ml	9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA, 4-oxo-all- <i>trans</i> -RA	PP: ACN. SPE en línea: Bondapak C18, 37–53 µm, 10 x 2.1 mm 0.05% TFA-ACN (85:15)	Gundersen et al., 1997
Suero	0.5 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	PP: ACN. SPE en línea: Bondapak C18, 37–53 µm, 10 x 2.1 mm, ACN- <i>n</i> -BuOH–MeOH–2% AmA–glacial AA, (69:2:10:16:3) dilución en línea con agua	Gundersen & Blomhoff, 1999
Plasma de vaca	1 ml	Carotenoides y ROH	PP: Etil alcohol. LL: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con ACN–DCM–MeOH.	Chauveau-Duriot et al., 2010
Suero	3.5 ml	RA, RAL e isómeros del ROH	PP: EtOH, NaOH (2 M). LL: <i>n</i> -hexano y HCl (2 M). Evaporación y reconstitución con <i>n</i> -hexano	Miyagi et al., 2001
Suero	0.2 ml	13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, REOH	PP: EtOH, <i>n</i> -hexano-EA (1:1 v/v). Filtración, evaporación y reconstitución con MeOH	Wang & Wang, 2001
Plasma	0.5 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	PP: EtOH, AmS saturado. LL: agua + <i>n</i> -hexano–DCM-2-P (80:19:1). Secado y disuelto en <i>n</i> -hexano.	Lanvers et al., 1996
Plasma	0.8 ml	Caroteno y ROH	PP: EtOH. LL: Hexano (BHT). Secado y reconstituido con MtBE	Colmán-Martínez et al., 2015
Plasma	0.4 ml	13- <i>cis</i> -3-OH-RA, all- <i>trans</i> -3-OH-RA, 13- <i>cis</i> -3-OH-4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -3-OH-4-oxo-RA	PP: EtOH. SPE en línea LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4 x 4 mm, 0.02% AmA y AA–EtOH (100:3:4) también usado para la dilución en línea	Wyss et al., 1998
Plasma	0.2 ml	All- <i>trans</i> -ROH, ésteres de retinilo	PP: EtOH. SPE en línea, LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4 x 4 mm, 1.2% AmA–AA–EtOH (80:1:20) dilución en línea con 100:2:4	Hartmann et al., 2001
Plasma	0.4 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	PP: EtOH. SPE en línea, LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4 x 4 mm, 1.25% AmA y AA–EtOH (8:2), dilución en línea con 2% AA–EtOH (102:4)	Wyss & Bucheli, 1997
Suero	0.25 ml	ROH	PP: EtOH–MeOH (95:5, v/v). LL: <i>n</i> -hexano–DCM (70:30, v/v) y BHT. Evaporación y disolución en MeOH	Khan et al., 2010

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS
SANGRE Plasma	0.1 ml	ROH	PP: MeOH (BHT). LL: Hexano y agua. Evaporación y reconstitución con 2-P y ACN (1:1)	Lunetta et al., 2002
Suero	0.5 ml	ROH	PP: MeOH y EtOH. LL: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH	Kucerová et al., 2013
Suero	1 ml	All- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -REPA	PP: NaCl, EtOH. LL: Hexano. Evaporación y redisolución en MeOH-MtBE-AA	van Breemen et al., 1998
Plasma	4 ml	ROH y carotenoides	Extracción de TRL. PP: EtOH y 0.02% (wt:vol) hidroxitolueno butilado. LL: Hexano.	Edwards et al., 2001
Suero (fracción FTRL)	0.5 ml	Ésteres de retinilo y $\alpha$ -ésteres de retinilo	Evaporación y saponificación. Aislamiento de TRL. LL: EtOH, hexano.	Goetz et al., 2016
Suero (fracción FTRL)	0.5 ml	Palmitato de retinilo	Secado y redisolución con MtBE Aislamiento de TRL. LL: EtOH, hexano.	Kopec et al., 2013
Plasma	3 ml	ROH	Secado y redisolución con MtBE Aislamiento de TRL. PP: EtOH. LL: hexano. Secado y saponificación (KOH sililado (piridina y BSTFA), secado y redisoluto en heptano (para GCMS)	You et al., 2002
Suero de ratón	0.1 – 0.2 ml	All- <i>trans</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	Método ácido-base en dos pasos: 0.025 M KOH en EtOH, hexano y HCl. Evaporación y resuspensión con ACN	Kane et al., 2008
Suero de ratón	0.1–0.2 ml	Ésteres de retinilo, ROH y RAL	Método ácido-base en dos pasos: 0.025 M KOH en EtOH, hexano y HCl. Evaporación y resuspensión con ACN	Kane et al., 2008 b

## APÉNDICE 11.1.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS	
TEJIDOS Y ANIMALES	Cerebro humano	1 - 3 g	Carotenoides y ROH	Filtración: Hexano:EA (90:10). Secado y saponificación: EtOH, pirogalol, KOH. LL: agua, hexano:EA. Evaporación y reconstitución en EA y ACN/D/MeOH/IPA/TEA (80:15:2,5:2,5:0,1) con AmA	Craft et al., 2004
	Hígado de ternera	0.15 g	REPA	Filtración: MeOH/Chl (4:1). SFE: CO <sub>2</sub> / Hidromatrix, 41 min at 2 ml / min y 80°C	Burri et al., 1997
	Hígado, riñón, testículos y cerebro de ratón	0.01–0.02 g	all- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	LL: 0.025 M KOH en EtOH. Hexano, HCl y evaporación. Reconstitución con ACN	Kane et al., 2005
	Hígado de rata y humano	0.1 – 0.2 g	All- <i>trans</i> -4-oxoretinoil-β-glucuronido, all- <i>trans</i> -retinoil-β-glucuronido, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -RAL, ésteres de retinilo	LL: 2-P-DCM (2:1) y AA o EA y hexano	Barua & Olson, 1998Rr
	Embriones de <i>Xenopus</i>	1000 uds	4-oxo-ROH, 4-oxo-RAL, 4-oxo-RA	LL: ACN:1-BuOH (1:1) + BHT, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> saturado LL: DIPE, MeOH, AsA.	Blumberg et al., 1996
	Presa de focas	1 g	ROH, REPA	Filtración, evaporación y reconstitución con MeOH–EA (3:1, v/v, con AsA) LL: EtOH, <i>n</i> -hexano.	Routti et al., 2005
	Fluido folicular	0.2 ml	ROH	Evaporación y reconstitución con 2-P LL: Hexano y agua.	Schweigert et al., 2003
	Hígado de ratón	0.1 g	ROH, ésteres de retinilo	Evaporación y reconstitución con ACN/MeOH/MC (70:15:15, v/v/v)	Kim & Quadro, 2010
	Huevos de teleósteos	1 ml (filtrado acuoso)	RAL, 3,4-didehidro-RAL	LL: HH (2M) y MeOH. DCM y hexano	Irie & Seki, 2002
	Cerebro, placenta e hígado de rata	0.05 g	All- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -REPA	LL: <i>n</i> -hexano. Secado y reconstitución en Chl/MeOH (1:3) LL: <i>n</i> -hexano–DCM (5:1)	Barbas et al., 1997
	Hígado de rata	1 g	ROH, 15 diferentes ésteres de retinilo	Secado de fracciones y disolución en acetona aplicada a LDI en oro LL: Agua-MeOH-MC (1:2:1). Evaporación y reconstitución en	Wingerath et al., 1997
	CNS de rata	1 ml/g tejido	RA y ROH	ACN/MeOH/IPA/agua (30:25:15:30, con 1.2% (v/v) AA)	Werner y Deluca, 2002
	Piel de la oreja de cerdo	0.6 cm <sup>2</sup>	ROH, REAC	Mezclado y centrifugación: MeOH o acetona. Inyección directa del sobrenadante	Padula et al., 2008
	Hígado, riñón, tejido adiposo, testículos y bazo de ratón	0.015 – 0.035 g	all- <i>trans</i> -RAL	Derivatización en oxima: MeOH, O-etilhidroxilamina (0.1 M). LL: Hexano. Evaporación y reconstitución en ACN.	Wang et al., 2015

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS	
TEJIDOS Y ANIMALES	Hígado de rata	9-veces exceso de 0,9% NaCl	14-OH- <i>retro</i> -ROH, 4-OH-ROH	PP y LL: 2-P. SPE automatizada	Rühl et al., 2005
	Riñón de ratón	0.125 g	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	PP y LL: 2-P. SPE automatizada	Rühl & Schweigert, 2003
	Hígado de ratón	0.125 g	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	PP y LL: 2-P. SPE automatizada	Rühl & Schweigert, 2003
	Hígado y cerebro de ratón	0.1 g	9- <i>cis</i> -13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -13,14-dihidro-RA	PP: 2-P. Evaporación y reconstitución con MeOH y solución de AmA	Rühl et al., 2015
	Hígado, riñones y testículos de rata	0.3 g	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	PP: 2-P. LL: Chl. SPE: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH / EtOH	Schmidt et al., 2003
	Hígado humano	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	PP: 2-P. LL: Chl. SPE: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH / EtOH	Schmidt et al., 2003
	Hígado, cerebro y riñón de ratón	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	PP: 2-P. LL: Chl. SPE: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH / EtOH	Schmidt et al., 2003
	Hígado de foca ártica	0.02 g	REPA	PP: 2-P-acetona (1:1, v/v). Filtración, evaporación y ACN. Concentración en columna	Molander et al., 1999
	Huevos de salmón	3-4 g	ROH	PP: Acetona. LL: MtBE y agua. Evaporación, resuspensión en MtBE y filtración	Li et al. 2005
	Embriones de ratón	1.64 uds	13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	PP: ACN. Agua. SPE en línea, Bondapak C18, 37–53 µm, 10 x 2.1 mm ACN–MeOH–2% AmA–glacial AA (79:2:16:3)–agua (1:3)	Sakhi et al., 1998
	Pecho, hígado, tejido adiposo, colon, músculo humano	0.1 g	ROH	PP: EtOH, KOH (5.4 M), pirogalol (0.6 M). LL: Hexano/DEE (3/1, v/v), BHT (91 mM in MeOH). Evaporación y reconstitución con 2-P y ACN (1:1)	Lunetta et al., 2002
	Próstata de rata	0.008 g	9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	PP: EtOH. Evaporación y reconstitución en agua/MeOH/AA (50:50:0.5, v/v/v)	Wang et al., 2001
	Tejido adiposo humano	0.0325 g	ROH, β-caroteno y α-tocoferol	PP: EtOH. Extracción con <i>n</i> -hexano con 2% 2-P y 0.01% TBHQ. Evaporación y reconstitución en <i>n</i> -hexano con 0.7% de 2-P	Casal et al., 2001
	Pulgas de agua	25 - 100 uds.	All- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA	PP: MeOH (1% FA). Evaporación. LL: HH, MtBE. Evaporación y reconstitución con MeOH.	Venne et al., 2016

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS	
<b>TEJIDOS Y ANIMALES</b>	Arenque	5 g	ROH	Saponificación: agua, EtOH, AsA, KOH. LL: mezcla de petrol eter y DEE. Secado y disolución en hexano.	Routti et al., 2005
	Hígado , riñón, tejido adiposo, músculo, bazo, testículos y regiones cerebrales de ratón	0.04 – 0.115 g	All- <i>trans</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	Método ácido-base en dos pasos: 0.025 M KOH en EtOH, hexano y HCl. Evaporación y resuspensión con ACN	Kane et al., 2008
	Hígado , riñón, tejido adiposo, músculo, bazo, testículos y regiones cerebrales de ratón	0.01–0.02 g	Ésteres de retinilo, ROH y RAL	Método ácido-base en dos pasos: 0.025 M KOH en EtOH, hexano y HCl. Evaporación y resuspensión con ACN	Kane et al., 2008 b



## APÉNDICE 11.1.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS	
COMIDA	Suplementos nutricionales	5 g	REPA	Disolución en L-glutamato monosódico. SPE, elución con agua y EtOH	Iwase, 2003
	Zumos de fruta enriquecidos	0.1–2 ml	ROH, REAC, REPA	DLLME: MeOH y tetracloruro de carbono en agua. Evaporación y reconstitución en MeOH.	Viñas et al., 2013 (b)
	Forrajes (hierba y heno)	0.05 – 0.1 g (liofilizada)	Carotenoides y ROH	LL: Acetona, DEE y agua. Evaporación y saponificación: KOH en etil alcohol. Extracción con DEE, evaporación y reconstitución con THF y ACN/DCM/MeOH (75:10:15). Filtración LL: DCM-MeOH (2:1). Filtración. LL: Agua. Evaporación y disolución en DEE. Filtración, evaporación y reconstitución en EtOH y <i>n</i> -hexano. Filtración.	Chauveau-Duriot et al., 2010
	Fórmulas infantiles	25 g	REAC	LL: Disolución con dimetil sulfóxido. Extracción con <i>n</i> -hexano	Rodas Mendoza et al. 2003
	Comprimidos dietéticos	5 tabletas	REAC y REPA	LL: Disolución con dimetil sulfóxido. Extracción con <i>n</i> -hexano	Davydova et al., 2010
	Fórmula infantil	1 g	REAC	LL: EtOH, <i>n</i> -hexano y filtración	Rodas Mendoza et al. 2003
	Comida para animales	1 g	REAC	PP: acetona–Chl (30:70). Evaporación y redisolución en <i>n</i> -BuOH	Qian y Sheng, 1998
	Comida para animales	10 g	REAC	PP: Solución en amonio (0.2%), EtOH. Evaporación y reconstitución con EtOH (65%, v/v). SPE: MeOH, EtOH, agua.	Xue et al., 2008
	Fórmula para lactantes fortificada	50 g	REOH	Saponificación y SPE con <i>n</i> -hexano (con BHT). Evaporación y reconstitución en hexano/D/2-P (96.7:3:0.3, v/v/v)	Heudi et al., 2004
	Bebidas de fruta y leche	2 mL	REOH	Saponificación: AsA, KOH por microondas. LL: AA, solución de NaCl saturada, ciclohexano (con BHT).	Höller et al., 2003
	Zumos	0.2–2 ml	13- <i>cis</i> -ROH, all- <i>trans</i> -ROH	Saponificación: AsA, MeOH y KOH. Filtración. DLLME: Filtración con extracto metanólico con TCE. Agua y sedimentación.	Viñas et al., 2013
	Fórmulas de alimentación enteral	3 ml	Isómeros de REOH	Saponificación: Solución NaCl 1% (w/v), AsA, EtOH, solución KOH (1:1, w/v). LL: hexano. Evaporación y reconstitución con hexano.	Duarte-Fávaro et al. 2003

## APÉNDICE 11.1.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS
LECHE Leche materna	0.5 ml	ROH	LL: <i>n</i> -hexano. Evaporación y disolución en MeOH	Kasparová et al., 2012
Fórmula infantil / leche en polvo	20 g	Vitamina A total	PP y LL: 0.1 M Tris. Tampón HCl. Hexano:EtOH (50:50), solución de NaCl saturado. Filtración	Woollard et al. 2016
Leche infantil	2 g	Retinil palmitato, REAC	PP y LL: EtOH, hexano, solución de NaCl saturado, hexano. Filtración o evaporación y reconstitución en hexano	Chávez-Servín et al., 2006
Leche materna	1 ml	ROH	PP: 12% pirogalol en EtOH. KOH y EtOH (3:5, vol:vol). LL: <i>n</i> -hexano, solución NaCl y EtOH. Evaporación y reconstitución en 2-P	Macias & Schweigert, 2001
Leche de vaca	2 ml	Carotenoides y ROH	PP: Etil alcohol y <i>n</i> -hexano/EA (9:1). LL: EtOH/agua (90:10). Extracción, evaporación. Saponificación: KOH. Purificación: <i>n</i> -hexano/EA (9:1). Evaporación y disolución en THF y ACN-DCM-MeOH (75:10:15)	Chauveau-Duriot et al., 2010
Leche de rumiante	6 ml	RA, RAL, ROH, ésteres de retinilo	PP: EtOH (BHT). LL: hexano. Evaporación y dilución con 2-P/hexano (75:25, v/v) (1 g/L BHT)	Rocchi et al., 2016
Leche materna	0.5 ml	ROH	PP: EtOH, AsA (0.1 M). Saponificación: KOH. LL: <i>n</i> -hexano, agua. Evaporación y reconstitución en MeOH	Plísek et al., 2013
Leche materna	0.5 ml	ROH	PP: EtOH, KOH-HOH (50:50 (w/v)). LL: Hexano. Evaporación y reconstitución in MeOH-dicloruro de etileno (50:50)	Tanumihardjo y Penniston, 2002
Leche materna	0.5 ml	ROH	PP: EtOH. Saponificación: AsA, NaOH. LL: <i>n</i> -hexano. Evaporación y reconstitución con MeOH	Kucerová et al., 2014
Leche materna	10 ml	ROH	PP: Pirogalol-EtOH (7%, w/v), solución de NaCl (1%, w/v) y solución de KOH (60%, w/v). LL: Hexano - EA (9:1, v/v), agua y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Evaporación y reconstitución en hexano-EA (9:1, v/v)	Kamao et al., 2007
Leche en polvo, harina	1.25 g	ROH	Saponificación: NaOH, EtOH, hidroquinona. LL: agua, DEE, éter de petróleo. Filtración, evaporación y disolución en MeOH	Ake et al., 1998

## APÉNDICE 11.1.5 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS	
<b>COSMÉTICOS Y FORMULACIONES</b>	Formulación dermatológica	0.5 g	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	Extracción con ACN	Tashtoush et al., 2007
	Cápsula de isotretinoína de gelatina blanda	2 mg/ml	13- <i>cis</i> -RA	Extracción con DCM. Agitación	Lima et al. 2005
	Cremas y productos farmacéuticos	0.01 – 0.02 g	REAC	Extracción con MeOH y agua. Filtración.	Wang & Wang, 2001
	Formulación tópica	2.5 g	All- <i>trans</i> -RA	Extracción con MeOH. Filtración	Ye et al., 2004
	Crema a base de agua	0.1 – 0.12 g	RA, retinoil $\beta$ -glucuronido	Extracción con cloruro de metileno y MeOH	Barua, 2003
	Pomada natural	1 g	REPA	Extracción con <i>n</i> -hexano. Filtración	Kwiecien et al., 2010



## APÉNDICE 11.1.6 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	EXTRACCIÓN	REFERENCIAS
DESECHOS Heces	2 g	ROH	Extracción con Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCO <sub>3</sub> , THF. Filtración, evaporación y reconstitución con MeOH/THF (1:1, v/v) PP: KOH solución (0.5 M). LL: agua, hexano.	Zhu et al., 2006
Desechos de crustáceos	0.4 g	ROH	Evaporación y reconstitución in MeOH/ACN/agua (68:28:4 (v/v/v)). Filtración.	López-Cervantes et al. 2006
Orina	5 ml	Retinoil-β-glucuronidos de 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA	SPE: Bond-Elut C-18, 500 mg. MeOH, agua y ACN. Evaporación y reconstitución in 1 M AmA-agua-MeOH (4:496:600 (v/v/v))	Li et al., 1996



## 11.2. Estándares internos

### APÉNDICE 11.2 ESTÁNDARES INTERNOS

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE / S	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
Suero	ROH	REAC	Sirimanne et al., 1998
Suero	All- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -REPA	REAC	Van Breemen et al., 1998
Suero	All- <i>trans</i> -4-oxoretinoil- $\beta$ -glucuronido, all- <i>trans</i> -retinoil- $\beta$ -glucuronido, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -RAL, ésteres de retinilo	REAC	Barua y Olson, 1998
Suero	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	All- <i>trans</i> -acitretina	Gundersen y Blomhoff, 1999
Suero	9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA, 4-oxo-all- <i>trans</i> -RA	9,10-dimetilantraceno	Gundersen et al., 1997
Suero	REOH	REAC	Khan et al., 2010
Suero	RA, RAL e isómeros de ROH	Arotinoid	Miyagi et al., 2001
Suero	All- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9,13- <i>dicis</i> -RA, 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA, 4-oxo-all- <i>trans</i> -RA	13- <i>cis</i> -RA-d <sub>5</sub> , 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA-d <sub>3</sub>	Arnold et al., 2012
Suero	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
Suero (fracción TRL)	Retinil palmitato	d8- $\beta$ -caroteno	Kopec et al., 2013
Plasma	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	All- <i>trans</i> -acitretina	Wyss y Bucheli, 1997
Plasma	ROH	REAC	Bell et al., 2014
Plasma	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	Etilsulfona de arotinoide	Lanvers et al., 1996
Plasma	9- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	All- <i>trans</i> -acitretina, 13- <i>cis</i> -acitretina	Disdier et al., 1996
Plasma	13- <i>cis</i> -3-OH-RA, all- <i>trans</i> -3-OH-RA, 13- <i>cis</i> -3-OH-4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -3-OH-4-oxo-RA	Ro 12-7310/000	Wyss et al., 1998
Plasma	All- <i>trans</i> -ROH, ésteres de retinilo	Retinil propionato	Hartman et al., 2001
Plasma	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> RA	Carbazol	Wang et al., 2003
Plasma	ROH	Equinenona, d <sub>8</sub> -REAC	You et al., 2002
Plasma	ROH	RAL- <i>O</i> -etiloxima y $\beta$ -apo-12'-carotenal- <i>O</i> - <i>t</i> -butiloxima	Lunetta et al., 2003
Plasma	ROH y carotenoides	$\delta$ -tocoferol, equinenona	Edwards et al., 2001
Plasma	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	4-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-antraceni) ácido benzoico	Dimitrova et al., 1996
Plasma	13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	Acitretina	Lehman y Franz, 1995
Plasma	RA	All- <i>trans</i> -RA-d <sub>5</sub>	Napoli et al., 1985
Plasma	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA and all- <i>trans</i> -ROH	<sup>13</sup> C4-RA	Gundersen et al., 2007
Plasma de vaca	13- <i>cis</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	Ro-23-5525	Horst et al., 1995
Plasma de vaca	Carotenoides y ROH	Equinenona	Chauveau-Duriot et al., 2010

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE / S	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
Suero de ratón	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	4,4-dimetil-RA	Kane et al., 2005
Suero de ratón	Ésteres de retinilo, ROH y RAL	REAC	Kane et al., 2008 b
Suero de ratón	ROH, REPA	REAC	Kim y Quadro, 2011
Suero de ratón	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
Suero de ratón	All- <i>trans</i> -retinal	All- <i>trans</i> -3,4-didehidro RAL	Wang et al., 2015
Suero de ratón	All- <i>trans</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	4,4-dimetil-RA	Kane et al., 2008
Suero de rata	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
Sangre (Manchas de sangre seca)	ROH	Tocol	Erhardt et al., 2002
Hígado de rata	ROH, ésteres de retinilo	REPA	Wingerath et al., 1997
Cerebro, placenta e hígado de rata	All- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -REPA	Vitamina K	Barbas et al., 1997
Hígado, riñón y testículos de rata	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
Hígado de rata y humano	All- <i>trans</i> -4-oxoretinoil- $\beta$ -glucuronido, all- <i>trans</i> -retinoil- $\beta$ -glucuronido, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -RAL, ésteres de retinilo	REAC	Barua y Olson, 1998
Hígado humano	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
Próstata de rata	9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	REAC	Wang et al., 2001
Hígado de foca ártica	REPA	Retinil nonadecanoato	Molander et al., 1999
Hígado, riñón, testículos y cerebro de ratón	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	4,4-dimetil-RA	Kane et al., 2005
Hígado, riñón, tejido adiposo, músculo, bazo, testículos, piel y cerebro de ratón	Ésteres de retinilo, ROH and RAL	REAC	Kane et al., 2008 b
Hígado de ratón	ROH, ésteres de retinilo	REAC	Kim & Quadro, 2010
Tejidos de ratón	All- <i>trans</i> -retinal	All- <i>trans</i> -3,4-didehidro-RAL	Wang et al., 2015
Hígado, cerebro y riñón de ratón	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
Hígado, riñón, tejido adiposo, músculo, bazo, testículos y cerebro de ratón	All- <i>trans</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	4,4-dimetil-RA	Kane et al., 2008
Tejido adiposo humano	ROH, $\beta$ -caroteno	Tocol	Casal et al., 2001
Pecho, hígado, tejido adiposo, colon y músculo humano	ROH	RAL- <i>O</i> -etiloxima y $\beta$ -apo-12'-carotenal- <i>O</i> - <i>t</i> -butiloxima	Lunetta et al., 2002
Embriones de ratón	13- <i>cis</i> RA, 9- <i>cis</i> RA, at-RA, at-ROH	13- <i>cis</i> -acitretina	Sakhi et al., 1998
Huevos de teleosteos	RAL, 3,4-didehidro-RAL	Retinaloxima	Irie y Seki, 2002
Huevos de salmón	ROH	$\beta$ -criptoxantina	Li et al. 2005
Presas de foca	ROH, REPA	REAC	Routti et al., 2005
Arenque	ROH	REAC	Routti et al., 2006
Pulgas de agua	RAs	Acitretina	Venne et al., 2016

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE / S	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
Leche de vaca	Carotenoides y ROH	Equinenona	Chauveau-Duriot et al., 2010
Leche de rumiante	RA, RAL, ROH, ésteres de retinilo	Retinil propionato y retinil pentadecanoato	Rocchi et al., 2016
Leche materna	ROH	d <sub>6</sub> -REAC, d <sub>6</sub> -β-caroteno	Kamao et al., 2007
Fórmula infantil / leche en polvo	Vitamina A total	ROH propionato	Woollard et al. 2016
Orina	Retinoil-β-glucuronidos de 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA	Acitretina-β-glucuronido	Li et al., 1996
Forraje (hierba y heno)	Carotenoides y ROH	Equinenona	Chauveau-Duriot et al., 2010



### 11.3. Condiciones cromatográficas

#### APÉNDICE 11.3.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>SANGRE</b>								
NP. Cyano		BDS Hypersil (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático: hexano/2P (98.5:1.5)	Blood (manchas de sangre seca)	Círculos 6.35 mm Ø (12 µl sangre)	ROH	4	Erhardt et al., 2002
NP. Silica.		Inertsil SILICA 100-5 (4.6 mm x 25 cm, 5 µm)	Gradiente: n-Hexano: 2P:AA: (1000:43:0.675) (A); (1000:17.5:0.675) (B)	Suero	3.5 ml	RA, RAL y ROH isómeros	60	Miyagi et al., 2001
NP. Silica.		DuPont Zorbax (250 x 4.6 mm)	Isocrático: MtBE-hexano 2:98 (v/v) o tolueno-hexano 45:55 (v/v)	Plasma	0.1 ml	RA	6.5	Napoli et al., 1985
RP. Alkyl-amide.		Supelco ABZ + columna C16 (100 mm x 2.1 mm, 3 µm)	Gradient: ACN/MeOH/agua/FA (40:30:30:0.1) (A); ACN/MeOH/agua/FA (55:30:15:0.1) (B)	Suero de ratón	0.2 ml	all-trans-RA, 13-cis-RA	30	Kane et al., 2005
RP. Alkyl-amide.		Ascentis Express (150 mm x 2.1 mm, 2.7 µm)	Gradient: agua (A) y ACN (B), con 40% MeOH y 0.1% FA en ambas fases	Suero	0.5 ml	All-trans-RA, 9-cis-RA, 13-cis-RA, 9,13-dicis-RA, 4-oxo-13-cis-RA, 4-oxo-all-trans-RA	20	Arnold et al., 2012
RP. Alkyl-amide.		Supelcosil ABZ+PLUS (2.1 x 20 mm, 5 µm) Ascentis (Supelco, 2.1 x 150 mm, 3 µm)	Gradiente: Agua con 0.1% FA (A); ACN con 0.1% FA (B)	Suero de ratón	0.1 - 0.2 ml	All-trans-RA, 9,13-di-cis-RA, 13-cis-RA	25	Kane et al., 2008
RP. Alkyl-amide.		Suplex pkb-100 (25 x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático: ACN:MeOH:Chl:AA (17:68:5:10, v/v/v/v)	Plasma de vaca	1 vol	13-cis-RA, 9,13-di-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA	24	Horst et al., 1995
RP. Alkyl-amide.		Suplex pKb-100 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: ACN-n-BuOH-MeOH-2% AmA-glacial AA, (69:2:10:16:3)	Suero	0.5 ml	9-cis-RA, 13-cis-RA, all-trans-RA, 4-oxo-13-cis-RA, 4-oxo-all-trans-RA	30	Gundersen et al., 1997
RP. Alkyl-amide.		Suplex pKb-100 (250 x 2.1 mm, 5 µm)	Isocrático: ACN-n-BuOH-MeOH-2% AmA-glacial AA, (69:2:10:16:3)	Suero	0.5 ml	13-cis-4-oxo-RA, all-trans-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA, all-trans-ROH	12	Gundersen y Blomhoff, 1999
RP. C18.		Eclipse plus columna RRHD (2.1 x 150 mm, 1.8 µm)	Gradiente: 0.1% FA en agua (A); 0.1% FA en ACN (B)	Suero de ratón	0.1-0.2 ml	all-trans-RAL	25	Wang et al., 2015

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>SANGRE</b>								
RP. C18.		Zorbax SB (4.6 x 100 mm, 3.5 µm)	Gradiente: 11% agua / 89% ACN/ 0.1% FA	Suero de ratón	0.1–0.2 ml	Ésteres de retinilo, ROH y RAL	25	Kane et al., 2008 b
RP. C18.		Nova-Pack (250 x 4.6 mm, 4 µm)	Gradiente: 2% AA en MeOH–ACN (65:35) + 5% THF	Plasma	0.2 - 1 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	26	Disdier et al., 1996
RP. C18.		Sperisorb ODS2 (10 x 4.6 mm, 3 µm)	Gradiente: 40 mM AmA–tampón pH 5.75–MeOH (50:50) en MeOH	Plasma	0.35 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	35	Teerlink et al., 1997
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (2,1 x 150 mm, 3 µm) (Fase polar) J'sphere ODS-H80 (4,6 x 150 mm, 4 µm) (Fase apolar)	Gradiente: 60 mM AmA (pH 5.7 con AA) : MeOH (1:1) (A), MeOH (B) – Fase polar Gradiente: MeOH : ACN (85:15, v/v) (A), Chl : ACN (1:1, v/v) (B) – Fase apolar	Suero de ratón	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	40 (Fase polar) 27 (Fase apolar)	Schmidt et al., 2003
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (2,1 x 150 mm, 3 µm) (Fase polar) J'sphere ODS-H80 (4,6 x 150 mm, 4 µm) (Fase apolar)	Gradiente: 60 mM AmA (pH 5.7 con AA) : MeOH (1:1) (A), MeOH (B) – Fase polar Gradiente: MeOH : ACN (85:15, v/v) (A), Chl : ACN (1:1, v/v) (B) – Fase apolar	Suero de rata	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	40 (Fase polar) 27 (Fase apolar)	Schmidt et al., 2003
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (2,1 x 150 mm, 3 µm) (Fase polar); Reversed phase. J'sphere ODS-H80 (4,6 x 150 mm, 4 µm) (Fase apolar)	Gradiente: 60 mM AmA (to pH 5.7 con AA) : MeOH (1:1) (A), MeOH (B) - Fase polar Gradiente: MeOH : ACN (85:15, v/v) (A), Chl : ACN (1:1, v/v) (B) - Fase apolar	Suero	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	40 (Fase polar) 27 (Fase apolar)	Schmidt et al., 2003
RP. C18.		2 x Supersher 100 18e (5 µm, 250 x 4 mm)	Gradiente: ACN– agua–10% AmA–AA (60:30:6:1) de 95:2:0.5:2 a 99:0.5:0:0.5 Gradiente: ACN:agua:FA (10:90:0,1, v/v/v) - ACN:agua:MeOH:FA (45:45:10:0,1, v/v/v) - ACN:MeOH:FA (90:10:0,1, v/v/v)	Plasma	0.4 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	38	Wyss y Bucheli, 1997
RP. C18.		Zorbax SB (4,6 x 50 mm, 1,8 µm)	Gradiente: ACN:agua:FA (10:90:0,1, v/v/v) - ACN:agua:MeOH:FA (45:45:10:0,1, v/v/v) - ACN:MeOH:FA (90:10:0,1, v/v/v)	Plasma	0.1 ml	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA y all- <i>trans</i> -ROH	7	Gundersen et al., 2007
RP. C18.		Nova-Pak (225 x 3.9 mm)	Gradiente: ACN-0.1 M AmA pH=5.0 con AA (80:20) a (80:10)	Plasma	0.5 ml	13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	35	Lehman y Franz, 1995

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>SANGRE</b>								
RP. C18.		Acquity UPLC HSS T3 (150 x 2.1 mm, 1.8 µm)	Gradiente: ACN–DCM–MeOH (75/10/15) (A); Agua (0.05 M AmA) (B)	Plasma de vaca	1 ml	Carotenoides y ROH	46	Chauveau-Duriot et al., 2010
RP. C18.		2 x Purospher 100 18e (250 x 4 mm, 5 µm)	Gradiente: ACN–agua–10% AmA–AA (540:450:2:30) de (600:350:2:30) a (950:40:2:30)	Plasma	0.4 ml	13- <i>cis</i> -3-OH-RA, all- <i>trans</i> -3-OH-RA, 13- <i>cis</i> -3-OH-4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -3-OH-4-oxo-RA	26	Wyss et al., 1998
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (120 mm x 4 mm, 3 µm)	Gradiente: MeOH (A) y 60 mM AmA:MeOH (1:1, v/v) (B)	Suero de rata	3-veces 2P	14-OH- <i>retro</i> -ROH; 4-OH-ROH	41.5	Rühl et al., 2005
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (120 mm x 4 mm, 3 µm)	Gradiente: MeOH (A) y 60 mM AmA:MeOH (1:1, v/v) (B)	Suero de rata	0.125 ml	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	41.5	Rühl y Schweigert, 2003
RP. C18.		Acquity BEH (2.1 x 150 mm, 1.7 µm)	Gradiente: MeOH y ACN de 80:20 (v/v) a 10:90 (v/v).	Plasma	0.1 ml	ROH	6	Bell et al., 2014
RP. C18.		Bondapak (300 mm x 3.9 mm, 10 µm)	Gradiente: MeOH:0.02 M AmA (50:50, v/v) (A); MeOH:0.1 M AmA (90:10, v/v) (B)	Plasma	0.2 ml	all- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	18	Wang et al., 2003
RP. C18.		Microsorb-MV (100 x 4.6 mm, 3 µm)	Gradiente: MeOH–agua (3:1) 10 mM AmA a MeOH–DCM (4:1)	Suero	0.02 - 0.1 ml	All- <i>trans</i> -4-oxoretinoil-β-glucuronido, all- <i>trans</i> -retinoil-β-glucuronido, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -RAL, ésteres de retinilo	30-40	Barua y Olson, 1998
RP. C18.		Bondapak (3.9 x 300 mm, 5 µm)	Gradiente: MeOH-agua (92:8, v/v), 0.1 M tampón acetato (pH 4.72)	Suero	0.2 ml	13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	12	Wang y Wang, 2001
RP. C18.		Nucleosil 100 (200 x 4 mm, 5 µm)	Gradiente: <i>n</i> -hexano–2P–AA (400:1:0.27) a (400:6:0.27)	Plasma	0.5 ml	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	45	Lanvers et al., 1996
RP. C18.		Beckman Ultrasphere (4.6 mm x 250 mm, 5 µm)	Isocrático: ACN 70%; MeOH 15%; MC 15%	Suero de ratón	0.1 ml	ROH, REPA	35	Kim y Quadro, 2010
RP. C18.		2 x Adsorbosphere HS ODS (150 x 4.6 mm, 3 µm)	Isocrático: ACN, 2P y MeOH (68:20:12 v/v), con 0.02% AmA (w/v)	Plasma	0.1 ml	ROH	20	Lunetta et al., 2002
RP. C18.		Acquity BEH (2.1 mm x 50 mm, 1.7 µm)	Isocrático: ACN:MeOH:agua (90:8:2, v/v/v)	Suero de rata	0.45 ml	all- <i>trans</i> -RA	5	Kumar et al., 2014

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>SANGRE</b>								
RP. C18.		Superspher 100 18e (12.5 x 4 mm + 250 x 4 mm)	Isocrático: ACN–MeOH–EtOH–2P (1:1:1:1)	Plasma	0.2 ml	all-trans-ROH, ésteres de retinilo	30	Hartman et al., 2001
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: ACN-agua–MeOH– <i>n</i> -butil alcohol (56:37:4:3) con 100 mM AmA y 70 mM AA pH=6.3	Plasma	0.2 ml	all-trans-4-oxo-RA, 5,6-epoxi-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA, all-trans-ROH	23	Dimitrova et al., 1996
RP. C18.		Burdick y Jackson (150 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: EtOH–ACN–agua (45:45:10)	Suero	0.05 ml	ROH	18	Sirimanne et al., 1998
RP. C18.		Cambio de columna. TSKgel ODS-80Ts (150 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: EtOH–agua (80:20)	Suero	0.1 ml	ROH	18	Moriyama et al., 1998
RP. C18.		Chromolith HighResolution (100 x 4.6 mm, 130 Å)	Isocrático: MeOH	Suero	0.5 ml	ROH	1.5	Kucerová et al., 2013
RP. C18.		Zorbax (4.6 mm x 75 mm, 3.5 µm)	Isocrático: MeOH 83.4% (v/v), ACN 0.6% (v/v) y solución ácida acuosa 16% (v/v)	Plasma	0.05 ml	RA	12	Teglia et al., 2014
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (15 cm x 3 mm, 5 µm)	Isocrático: MeOH:ACN:Chl (47:47:6, vol), 0.05% TEA, y 0.05 M AaA	Plasma	4 ml	ROH y carotenoides	≈24	Edwards et al., 2001
RP. C18.		Spherisorb ODS2 (15 cm x 3 mm, 5 µm)	Isocrático: MeOH:ACN:Chl (47:47:6, v/v/v) TEA (0.05%) y AmA (0.05 M)	Plasma	3 ml	ROH	> 18.6	You et al., 2002
RP. C18.		Supelco (150 mm x 3 mm, 3 µm)	Isocrático: MeOH–agua (99:1, v/v)	Suero	0.25 ml	ROH	6	Khan et al., 2010
RP. C30.		YMC Lab-Comp Kft (150 x 2.1 mm, 3 µm)	Gradiente: 60 mM AmA / MeOH (1:1, v/v) (A) y MeOH (B)	Suero	3-veces 2P	All-trans-4-oxo-RA, 13-cis-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA y ROH	20	Rühl, 2006
RP. C30.		YMC Lab-Comp Kft (150 x 2.1 mm, 3 µm).	Gradiente: 60 mM AmA / MeOH (1:1, v/v) (A) y MeOH (B)	Suero de ratón	3-veces 2P	All-trans-4-oxo-RA, 13-cis-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA y ROH	20	Rühl, 2015
RP. C30.		YMC (4.6 x 250 mm, 3 µm)	Gradiente: 90:10 MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (A); 78:20:2 MtBE/MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (B)	Suero (fracción TRL)	0.5 ml	Ésteres de retinilo y α- ésteres de retinilo	29	Goetz et al., 2016
RP. C30.		YMC carotenoid (2.0 x 100 mm, 3 µm)	Gradiente: MeOH/agua/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (A); MeOH/MtBE/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (B)	Suero	0.6 ml	ROH	25	Zhu et al., 2006

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>SANGRE</b>								
RP. C30.		YMC carotenoid (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Gradiente: MeOH:agua (90:10 v:v, con 0.4 g/l AmA) (A); MeOH:MtBE:agua (8:90:2 v:v:v, con 0.1 g/l AmA) (B)	Plasma	0.1 ml	ROH	39	Schweigert et al., 2003
RP. C30.		YMC (4.6 x 150 mm, 5 µm)	Gradiente: MeOH-agua (80:20, v/v) (A); MtBE-MeOH-agua (78:20:2, v/v/v) (B). AmA 0.4 g/L	Suero (fracción TRL)	0.5 ml	Retinil palmitato	19	Kopec et al., 2013
RP. C30.		YMC (100 x 2.0 mm)	Gradiente: MeOH-agua-AA (50:50:0.5) a MeOH-MtBE-AA (50:50:0.5)	Suero	1 ml	All-trans-ROH, all-trans-REPA	25	van Breemen et al., 1998
RP. C30.		YMC Carotenoid HS (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: MeOH, MtBE y agua	Plasma	0.8 ml	Carotenos y ROH	72	Colmán-Martínez et al., 2015
RP. Diol fase.		LC-Packings (250 x 0.32 mm micro column, 5 µm)	Gradiente: Hexano:tolueno (95:5, v/v) para RAs y hexano:THF (97.5:2.5 v/v) para metabolitos oxo	Plasma	1 ml	All-trans-RA, 13-cis-RA, metabolitos 4-oxo	13	Renalder et al., 1993

## APÉNDICE 11.3.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FAE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>TEJIDOS</b>								
NP. Silica		Zorbax (250 x 4.6-mm, 7 µm)	Gradiente: Hexano-2P-AA (200:0.5:0.5) (A); 2P 0.25% AA (B)	CNS rata	1 ml/g tejido	RA y ROH	50	Werner y Deluca, 2002
NP. Silica		Lichrosorb Si60 (4.6 mm x 25 cm, 5 µm)	Gradiente: <i>n</i> -hexano (A) y <i>n</i> -hexano / 2P (90:10)	Tejido adiposo humano	0.0325 g	ROH, β-caroteno	23	Casal et al., 2001
NP. Silica		YMC-SIL (6 x 150 mm, 3 µm)	Isocrático: 5% MtBE, 0.04% EtOH, 25% benzeno en <i>n</i> -hexano	Huevos de teleósteos	1 ml (filtrado acuoso)	RAL, 3,4-didehidro-RAL	30	Irie y Seki, 2002
NP. Silica		Li Chro CART Si-60 (5 µm)	Isocrático: 99.5% hexano, 0.5% 2P	Arenque	5 g	ROH	22	Routti et al., 2005
RP. Alkyl-amide		Supelco ABZ + C16 column (100 mm x 2.1 mm, 3 µm)	Gradiente: ACN/MeOH/agua/FA (40:30:30:0.1) (A); ACN/MeOH/agua/FA (55:30:15:0.1) (B)	Hígado, riñón, testículos y cerebro de ratón	0.01–0.02 g	all- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	30	Kane et al., 2005
RP. Alkyl-amide		Suplex pKb-100 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Gradiente: ACN–MeOH–DCM– <i>n</i> -hexano (88:4:4:4) a (70:10:10:10)	Hígado de rata	1 g	ROH, ésteres de retinilo	28	Wingerath et al., 1997
RP. Alkyl-amide		Supelcosil ABZ+PLUS (2.1 x 20 mm, 5 µm) Ascentis (Supelco, 2.1 x 150 mm, 3 µm)	Gradiente: Agua con 0.1% FA (A); ACN con 0.1% FA (B)	Hígado, riñón, tejido adiposo, músculo, bazo, testículos y cerebros de ratón	0.04 - 0.115 g	All- <i>trans</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	25	Kane et al., 2008
RP. Alkyl-amide		Suplex pKb-100 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: ACN–MeOH–2% AmA–glacial AA (79:2:16:3)	Embriones de ratón	1.64 uds	13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	20	Sakhi et al., 1998
RP. C18		Spherisorb ODS2 (2,1 x 150 mm, 3 µm) (Fase polar) J'sphere ODS-H80 (4,6 x 150 mm, 4 µm) (Fase apolar)	Gradiente: 60 mM AmA (pH 5.7 con AA) : MeOH (1:1) (A), pure MeOH (B) - Fase polar Gradiente: MeOH : ACN (85:15, v/v) (A), Chl : ACN (1:1, v/v) (B) - Fase apolar	Hígado, cerebro y riñón de ratón	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	40 (Fase polar) 27 (Fase apolar)	Schmidt et al., 2003
RP. C18		Spherisorb ODS2 (2,1 x 150 mm, 3 µm) (Fase polar) J'sphere ODS-H80 (4,6 x 150 mm, 4 µm) (Fase apolar)	Gradiente: 60 mM AmA (pH 5.7 con AA) : MeOH (1:1) (A), pure MeOH (B) - Fase polar Gradiente: MeOH : ACN (85:15, v/v) (A), Chl : ACN (1:1, v/v) (B) - Fase apolar	Hígado humano	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	40 (Fase polar) 27 (Fase apolar)	Schmidt et al., 2003

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FAE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>TEJIDOS</b>								
RP. C18		Acquity UPLC cortecs (50 x 2.1 mm, 1.6 µm)	Gradiente: 0.1% AA en H <sub>2</sub> O (A), 0.1% AA en MeOH: ACN (3:2) (B)	Pulgas de agua	25 - 100 uds.	RA's	30	Venne et al., 2016
RP. C18		Eclipse plus RRHD column (2.1 x 150 mm, 1.8 µm)	Gradiente: 0.1% FA en agua (A); 0.1% FA en ACN (B)	Tejidos de ratón	0.015 - 0.035 g	all- <i>trans</i> -RAL	25	Wang et al., 2015
RP. C18		Zorbax SB (4.6 x 100 mm, 3.5 µm)	Gradiente: 11% agua / 89% ACN/ 0.1% FA	Hígado, riñón, tejido adiposo, músculo, bazo, testículos, piel, cerebro y cerebro de ratón	0.01–0.02 g	Ésteres de retinilo, ROH y RAL	25	Kane et al., 2008 b
RP. C18		Spherisorb ODS2 (2,1 x 150 mm, 3 µm) (Fase polar) J'sphere ODS-H80 (4,6 x 150 mm, 4 µm) (Fase apolar)	Gradiente: 60 mM AmA (pH 5.7 con AA) : MeOH (1:1) (A), MeOH (B) - Fase polar Gradiente: MeOH : ACN (85:15, v/v) (A), CHl : ACN (1:1, v/v) (B) - Fase apolar	Hígado, riñón y testículos de rata	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	40 (Fase polar) 27 (Fase apolar)	Schmidt et al., 2003
RP. C18		Aguas Symmetry (5 µm) o Aguas Nova-Pak	Gradiente: 93% MeOH (con agua)	Presas de foca	1 g	ROH, REPA	34.5	Routti et al., 2005
RP. C18		NovaPak (150 x 3.9 mm, 4µm)	Gradiente: ACN (A), agua 1% glacial AA (v/v) (B)	Piel de oreja de cerdo	0.6 cm <sup>2</sup>	ROH, REAC	25	Padula et al., 2008
RP. C18		Beckman ODS (80 x 4.6 mm, 3 µm)	Gradiente: ACN-MeOH-THF-AmA-BHT (85:5:5:5:0,05 (A); 55:35:5:5:0,05 (B)	Hígado de ternera	0.15 g	REPA	47	Burri et al., 1997
RP. C18		Vydac 201TP54 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Gradiente: Tampón A (100), tampón A (25) / MeOH (75), MeOH (60) / tampón D (40) (50% MeOH/50% CHCl <sub>3</sub> ), tampón D (100)	Embriones de <i>Xenopus</i>	1000 uds	4-oxo-ROH, 4-oxo-RAL, 4-oxo-RA	30	Blumberg et al., 1996
RP. C18		Finesse Genesis (150 mm x 2.1 mm, 4 µm)	Gradiente: MeOH (90%), MtBE (5%) y agua (5%), con FA 0.1% (v/v)	Huevos de salmón	3-4 g	ROH	20	Li et al. 2005
RP. C18		Spherisorb ODS2 (120 mm × 4 mm i.d., 3 µm)	Gradiente: MeOH (A) y 60 mM AmA:MeOH (1:1, v/v) (B)	Riñones de ratón	Ambos riñones	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	41.5	Rühl y Schweigert, 2003
RP. C18		Spherisorb ODS2 (120 mm × 4 mm i.d., 3 µm)	Gradiente: MeOH (A) y 60 mM AmA:MeOH (1:1, v/v) (B)	Hígado de ratón	9-veces exceso de 0.9% NaCl	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	41.5	Rühl y Schweigert, 2003

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FAE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>TEJIDOS</b>								
RP. C18		Spherisorb ODS2 (120 mm × 4 mm, 3 μm)	Gradiente: MeOH (A) y 60 mM AmA:MeOH (1:1, v/v) (B)	Hígado de rata	9-veces exceso de 0.9% NaCl	14-OH- <i>retro</i> -ROH, 4-OH-ROH	41.5	Rühl et al., 2005
RP. C18		Microsorb-MV (100 x 4.6 mm, 3 μm)	Gradiente: MeOH-agua (3:1) 10 mM AmA to MeOH-DCM (4:1)	Hígado de rata y humano	0.1 – 0.2 mg	all- <i>trans</i> -4-oxoretinoil-β-glucurónido, all- <i>trans</i> -retinoil-β-glucurónido, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -RAL, ésteres de retinilo	30 - 40	Barua y Olson, 1998
RP. C18		Micra non-porous silica column (4.6 x 33 mm)	Gradiente: Agua/MeOH/AA (50 : 50 : 0.5, v/v/v) (A); MeOH/MtBE/AA (50 : 50 : 0.5, v/v/v) (B)	Próstata de rata	0.008 g	9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	39	Wang et al., 2001
RP. C18		Develosil HG-5 (250 x 4.6 mm)	Isocrático: 60% MeOH, 10% <i>n</i> -BuOH, y 30% agua (10 mM AmA)	CNS de rata	1 ml/g tejido	ROH	60	Werner y Deluca, 2002
RP. C18		Spherisorb ODS2 (4 x 250 mm, 3 μm)	Isocrático: 80% ACN / 15% D / 2.5% MeOH / 2.5% 2P / 0.1% TEA con 150 mM AmA	Cerebro humano	1 - 3 g	Carotenoides y ROH	23	Craft et al., 2004
RP. C18		Beckman Ultrasphere (4.6 mm x 250 mm, 5 μm)	Isocrático: ACN 70%; MeOH 15%; MC 15%	Hígado de ratón	0.1 g	ROH, ésteres de retinilo	35	Kim y Quadro, 2011
RP. C18		2 x Adsorbosphere HS ODS (150 x 4.6 mm, 3 μm)	Isocrático: ACN, 2P y MeOH (68:20:12 v/v), con 0.02% AmA (w/v)	Pecho, hígado, tejido adiposo, colon y músculo humano	0.1 g	ROH	20	Lunetta et al., 2002
RP. C18		Nucleosil 120 (150 x 4,6 mm, 5 μm)	Isocrático: MeOH-agua (96.5:3.5)	Cerebro, placenta e hígado de rata	0.05 g	all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -REPA	13	Barbas et al., 1997
RP. C18		Zorbax silane (ODS) (250 x 4.6 mm)	Isocrático: 30% ACN, 25% MeOH, 15% 2P, y 30% agua (con 1.2% (vol/vol) AA)	CNS de rata	1 ml/g tejido	RA y ROH	70	Werner y Deluca, 2002
RP. C30		YMC carotenoid (250 x 4.6 mm, 5 μm)	Gradiente: MeOH:agua (90:10 v:v, con 0.4 g/l AmA) (A); MeOH:MtBE:agua (8:90:2 v:v:v, con 0.1 g/l AmA) (B)	Fluido folicular	0.2 ml	ROH	39	Schweigert et al., 2003
RP. C30		YMC (40 cm x 320 μm, 5 μm)	Isocrático: ACN-DCM (70:30)	Hígado de foca ártica	0.02 g	REPA	45	Molander et al., 1999

### APÉNDICE 11.3.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>COMIDA</b>								
NP. Amino		Zorbax (15 cm x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: <i>n</i> -hexano	Comprimidos dietéticos	5 tabletas	REAC y REPA	15	Davydova et al., 2010
NP. Silica		Shim-pack CLC-SIL-M (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: <i>n</i> -hexano - 1-octanol (96:4 (v/v))	Fórmulas de alimentación enteral	3 ml	Isómeros de ROH	35	Duarte-Fávaro et al. 2003
NP. Silica		Hibar LiChrosorb Si 60 (125 x 4 mm, 5 µm)	Isocrático: <i>n</i> -hexano/2P (98:2; v/v)	Bebidas de frutas y leche	2 mL	ROH	5	Höller et al., 2003
NP. Silica		LiChrospher Si 60 (250 x 4 mm, 5 µm)	Isocrático: <i>n</i> -hexano: 2P (98:2 (v/v))	Zumos	0.2–2 ml	13- <i>cis</i> -ROH, all- <i>trans</i> -ROH	7	Viñas et al., 2013
RP. C18		Acquity UPLC HSS T3 (150 x 2.1 mm, 1.8 µm)	Gradiente: ACN–DCM–MeOH (75/10/15) (A); Agua (0.05 M AmA) (B)	Forajess (hierba y heno)	0.05 – 0.1 g (liofilizada)	Carotenoides y ROH	46	Chauveau-Duriot et al., 2010
RP. C18		Nucleosil 100-5 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: Hexano/D/2P (96.7:3:0.3, v/v/v)	Fórmula para lactantes fortificada	50 g	ROH	30	Heudi et al., 2004
RP. C18		Novapak (150 x 3.9 mm, 4 µm)	Isocrático: MeOH	Comida para animales	1 g	REAC	12	Qian y Sheng, 1998
RP. C18		Tracer Spherisorb ODS2 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: MeOH	Formula infantil	1 - 25 g	REAC	20	Rodas Mendoza et al. 2003
RP. C18		Inertsil ODS 80A (15 x 0.3 cm, 5 µm)	Isocrático: MeOH–EtOH (50:50, v/v)	Suplementos nutricionales	5 g	REPA	12	Iwase, 2003
RP. C18		Atlantis d (4.6 mm x 150 mm, 5 µm)	Isocrático: MeOH–agua (98:2 v/v)	Comida para animales	10 g	REAC	18	Xue et al., 2008
RP. C8		Zorbax Eclipse XDB (15 cm x 46 mm, 5 µm)	Gradiente: MeOH:agua (90:10 (v/v))	Zumos de frutas enriquecidos	0.1–2 ml	ROH, REAC, REPA	34	Viñas et al., 2013b

## APÉNDICE 11.3.4 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>LECHE</b>								
NP. Silica		Pinnacle II short narrow bore (50 mm × 2.1 mm, 3 μm)	Isocrático: 0.5% EA en hexano	Leche infantil	2 g	REPA, REAC	25	Chávez-Servín et al., 2006
NP. Silica		Alltech Econosphere (150 x 4.6 mm, 3 μm)	Isocrático: 600 μL 2P / 1 L hexano	Fórmula infantil / leche en polvo	20 g	Vitamina A total	12.5	Woollard et al. 2016
RP. C18		Acquity UPLC HSS T3 (150 x 2.1 mm, 1.8 μm)	Gradiente: ACN-DCM-MeOH (75/10/15) (A); Agua (0.05 M AmA) (B)	Leche de vaca	2 ml	Carotenoides y ROH	46	Chauveau-Duriot et al., 2010
RP. C18		Capcellpak UG120 (250 x 4.6 mm, 5 μm)	Gradiente: MeOH-H <sub>2</sub> O (90:10, v/v) (A), ACN (B)	Leche materna	10 ml	ROH	40	Kamao et al., 2007
RP. C18		Lichrosorb (125 x 4.5 mm, 5 μm)	Isocrático: ACN	Leche en polvo, harina	1.25 g	ROH	15	Ake et al., 1998
RP. C18		Chromolith HighResolution (100 x 4.6 mm, 130 Å)	Isocrático: MeOH	Leche materna	0.5 ml	ROH	1.5	Kucerová et al., 2013
RP. C18		Kinetex core-shell columns (100 Å, 100 mm x 4.6 mm y 50 mm x 4.6 mm, 2.6 μm)	Isocrático: MeOH	Leche materna	0.5 ml	ROH	1.8	Plísek et al., 2013
RP. C18		Chromolith Performance (100 mm x 4.6 mm, 2 μm)	Isocrático: MeOH	Leche materna	0.5 ml	ROH	2	Kasparová et al., 2012
RP. C18		Phenomenex (15 cm, 5 μm)	Isocrático: MeOH - agua (89:11)	Leche materna	0.5 ml	ROH	< 7	Tanumihardjo y Penniston, 2002
RP. C18/C30		Tandem C18 TSKgel Super-ODS (4,6 x 100 mm, 2 μm) y ProntoSIL (4,6 x 250 mm, 3 μm)	Gradiente: MeOH (A); 2-P/hexano (50:50 v/v) (B)	Leche de rumiante	6 ml	RA, RAL, ROH, Ésteres de retinilo	30	Rocchi et al., 2016
RP. C30		YMC column (250 x 4.6 mm, 5 μm)	Gradiente: MeOH:MeOH:agua (83:15:2; vol:vol:vol, con 1.5% AmA in H <sub>2</sub> O) (A) y MeOH:MeOH:agua (8:90:2; vol:vol:vol, con 1.5% AmA en H <sub>2</sub> O) (B).	Leche materna	1 ml	ROH	39	Macias y Schweigert, 2001

## APÉNDICE 11.3.5 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>COSMÉTICOS Y FORMULACIONES</b>								
NP. Silica.		Lichrospher Si-60 (100 x 4 mm)	Isocrático: Hexano/EA/DCM (80:15:5) con 0.01% FA	Cápsula de gelatina de isotretinoína	2 mg/ml	13- <i>cis</i> -RA	10	Lima et al. 2005
RP. C18.		Lichrospher (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Gradiente: ACN-MeOH-tampón fosfato (pH 2.5)	Formulación tópica	2.5 g	All- <i>trans</i> -RA	40	Ye et al., 2004
RP. C18.		Microsorb-MV (4.6 mm x 10 cm, 3µm)	Gradiente: MeOH:agua con 10 mM AmA (7:3, v/v) (A) y MeOH:MC (4:1, v/v) (B)	Crema a base de agua	0.1 – 0.12 g	RA, retinoil β-glucurónico	30	Barua, 2003
RP. C18.		Phenomenex Nucleosil (100 Å, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Isocrático: 0.01% TFA y ACN (15:85, v/v%)	Formulación dermatológica	0.5 g	all- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	< 20	Tashtoush et al., 2007
RP. C18.		LiChrosphere 100 (4.6 x 250 mm; 5 µm)	Isocrático: MeOH:agua (98:2, v/v)	Pomada natural	1 g	REPA	30	Kwiecien et al., 2010
RP. C18.		Bondapack (3.9 x 300 mm, 5 µm)	Isocrático: MeOH-agua (92:8, v/v), 0.1 M tampón acetato (pH 4.72)	Crema y productos farmacéuticos	0.01 – 0.02 g	REAC	12	Wang y Wang, 2001

### APÉNDICE 11.3.6 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

TIPO DE MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	REFERENCIAS
<b>DESECHOS</b>								
RP. C18		Zorbax ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Gradiente: 1 M AmA-agua-MeOH-(4:496:600) to MeOH-EA (400:100)	Orina	5 ml	Retinoil-β-glucurónidos of 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA	40	Li et al., 1996
RP. C18		SS Exsil ODS (250 x 4 mm, 5 µm)	Isocrático: MeOH:ACN:agua (68:28:4 (v/v/v))	Desechos de crustáceos	0.4 g	ROH	12.5	López-Cervantes et al. 2006
RP. C30		YMC carotenoid column (2.0 x 100 mm, 3 µm)	Gradiente: MeOH/agua/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (A); MeOH/MtBE/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (B)	Heces	2 g	ROH	27.5	Zhu et al., 2006

## 11.4. Detección de retinoides

### APÉNDICE 11.4.1 DETECCIÓN DE RETINOIDES

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
SANGRE	Suero de ratón	0.2 ml	<i>all-trans</i> -RA, <i>13-cis</i> -RA	DAD UV	30		LOD: 0.5 pmol/ml LOQ: 1 pmol/ml	4,4-dimetil RA	Kane et al., 2005
	Plasma	0.1 ml	ROH	DAD UV	39				Schweigert et al., 2003
	Plasma	4 ml	ROH y carotenoides	DAD UV	≈24			δ-tocoferol, equinenona	Edwards et al., 2001
	Plasma	3 ml	ROH	DAD UV	> 18.6			Equinenona, d <sub>8</sub> -REAC	You et al., 2002
	Plasma	0.1 ml	<i>all-trans</i> -4-oxo-RA, <i>13-cis</i> -4-oxo-RA, <i>13-cis</i> -RA, <i>all-trans</i> -RA y <i>all-trans</i> -ROH	DAD UV	7		LOD: 0.1 - 1.3 pmol/ml LOQ: 0.3 - 4.2 pmol/ml	<sup>13</sup> C4-RA	Gundersen et al., 2007
	Suero (TRL fraction)	0.5 ml	Ésteres de retinilo y α- ésteres de retinilo	DAD UV	29		LOD: 1.4 pmol/ml (αREPA); 8.9 pmol/ml (REPA) LOQ: 4.8 pmol/ml (αREPA); 29.5 pmol/ml (REPA)		Goetz et al., 2016
	Suero	3-veces 2P	<i>All-trans</i> -4-oxo-RA, <i>13-cis</i> -4-oxo-RA, <i>13-cis</i> -RA, <i>9-cis</i> -RA, <i>all-trans</i> -RA y ROH	DAD UV: 250–500 nm	20		LOD: 0.23 pmol/ml LOQ: 0.67 pmol/ml		Rühl, 2006
	Suero de ratón	3-veces 2P	<i>9-cis</i> -13,14-dihidro-RA, <i>all-trans</i> -13,14-dihidro-RA	DAD UV: 290 nm	20		LOD: 0.33 pmol/ml		Rühl, 2015
	Sangre (manchas de sangre seca)	6.35 mm Ø (12 µL sangre)	ROH	DAD UV: 300-325 nm	4	LOD: 0.1 µmol/L	LOD: 100 pmol/ml	Tocol	Erhardt et al., 2002

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS	
SANGRE	Suero de ratón	0.1 ml	ROH, REPA	DAD UV: 325 nm	35	LOD: 0.35 pmol (ROH); 0.95 pmol (REPA)	LOD: 17.5 pmol/ml (ROH); 47.5 pmol/ml (REPA)	REAC	Kim y Quadro, 2010
	Suero	0.05 ml	ROH	DAD UV: 325 nm	18	LOD: 1 ng/ml	LOD: 3.49 pmol/ml	REAC	Sirimanne et al., 1998
	Suero de rata	0.125 ml	All-trans-4-oxo-RA, 13-cis-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA, ROH, REPA	DAD UV: 326, 354 nm	41.5		LOD: 4 pmol/ml		Rühl y Schweigert, 2003
	Suero de rata	3-veces 2P	14-OH-retro-ROH; 4-OH-ROH	DAD UV: 326, 354 nm	41.5		LOD: 4 pmol/ml		Rühl et al., 2005
	Plasma	0.8 ml	Carotenos y ROH	DAD UV: 330 nm	72	LOD: 0.2 µg/ml LOQ: 0.7 µg/ml	LOD: 0.7 ng/ml LOQ: 2.4 ng/ml		Colmán-Martínez et al., 2015
	Suero (fracción TRL)	0.5 ml	Retinil palmitato	DAD UV: 330 nm	19		LOD: 30.65 pmol/ml LOQ: 102.1 pmol/ml	d8-β-caroteno	Kopec et al., 2013
	Suero	0.02 - 0.1 ml	All-trans-4-oxoretinoil-β-glucurónido, all-trans-retinoil-β-glucurónido, all-trans-4-oxo-RA, all-trans-5,6-epoxi-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA, all-trans-ROH, all-trans-RAL, RES	DAD UV: 340 nm	30-40			REAC	Barua y Olson, 1998
	Plasma	0.05 ml	RA	DAD UV: 350 nm	12	LOD: 1.3 - 4.5 ng/ml LOQ: 3.2 - 12 ng/ml	LOD: 4.33 - 14.98 pmol/ml LOQ: 10.65 - 39.94 pmol/ml		Teglia et al., 2014
	Suero	0.5 ml	13-cis-4-oxo-RA, all-trans-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA, all-trans-ROH	DAD UV: 350 nm	12	LOD: 30-60 pg	LOD: 1.6 pmol/ml	All-trans-acitretina	Gundersen y Blomhoff, 1999
	Suero	0.5 ml	9-cis-RA, 13-cis-RA, all-trans-RA, 4-oxo-13-cis-RA, 4-oxo-all-trans-RA	DAD UV: 350 nm	30	LOD: 1 pg	LOD: 3.33 - 23.3 pmol/ml LOQ: 9.98 - 79.88 pmol/ml	All-trans-acitretina	Gundersen et al., 1997
	Plasma	0.5 ml	13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA	DAD UV: 369 nm	35	LOD: 25 pg	LOD: 0.83 pmol/ml	Acitretina	Lehman y Franz, 1995

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
SANGRE	Plasma de vaca	1 ml	ROH	DAD UV-Vis: 210 - 600 nm (UHPLC)	46	LOD: 0.8 ng ROH LOQ: 1.4 ng ROH	LOD: 0.28 nmol/ml LOQ: 0.49 nmol/ml LOQ: 6.66 pmol/ml (13-cis-RA)	Equinenona	Chauveau-Duriot et al., 2010
	Suero	0.2 ml	13-cis-RA, all-trans-RA, ROH, RAL	ECD (+1.0 V)	12	LOQ: 0.4 ng (13-cis-RA) 0.2 ng (all-trans-RA) 0.5 ng (ROH) 0.8 ng (RAL)	3.33 pmol/ml (all-trans-RA) 8.73 pmol/ml (ROH) 14.06 pmol/ml (RAL)		Wang y Wang, 2001
	Plasma	0.1 ml	ROH	FL: Ex 325 nm; Em 470 nm (ROH and REAC) (UHPLC)	6	LOQ: 0.02 µg/mL LOD: 0.01 µg/mL	LOQ: 69.8 pmol/ml LOD: 34.9 pmol/ml	REAC	Bell et al., 2014
	Suero	0.5 ml	ROH	FL: Ex 325, Em 480 (UHPLC)	1.5	LOD: 2.3 nmol/l LOQ: 7.7 nmol/l	LOD: 2.3 pmol/ml LOQ: 7.7 pmol/ml		Kucerová et al., 2013
	Suero	0.1 ml	ROH	FL: Ex 340 nm; Em 460 nm	18	LOD: 0.56 µg/dl	LOD: 19.55 pmol/ml		Moriyama et al., 1998
	Suero de ratón	0.1 - 0.2 ml	All-trans-RA, 9,13-di-cis-RA, 13-cis-RA	MS	25			4,4-dimetil-RA	Kane et al., 2008
	Suero	1 ml	All-trans-ROH, all-trans-REPA	MS	25		LOD: 34 pmol/ml (ROH), 36 pmol/ml (REPA)	REAC	Van Breemen et al., 1998
	Suero	0.6 ml	ROH	MS	25				Zhu et al., 2006
	Suero de ratón	0.1-0.2 ml	all-trans-RAL	MS (UHPLC)	25		LOD: 1 pmol/ml LOQ: 4 pmol/ml	All-trans-3,4-didehidro RAL	Wang et al., 2015

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS	
SANGRE	Suero	0.5 ml	All- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9,13- <i>dicis</i> -RA, 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA, 4-oxo-all- <i>trans</i> -RA	MS (UHPLC)	20	LOD: 700 amol (RA); 10 fmol (4-oxo-RA); 20 fmol (4-oxo-13- <i>cis</i> -RA); 2.5 fmol (4-OH-RA); 2.5 fmol (4-OH-9- <i>cis</i> -RA) LOQ: 2 fmol (RA); 20 fmol (4-oxo-RA); 40 fmol (4-oxo-13- <i>cis</i> -RA); 7.5 fmol (4-OH-RA); 7.5 fmol (4-OH-9- <i>cis</i> -RA)	13- <i>cis</i> -RA-d <sub>5</sub> , 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA-d <sub>3</sub>	Arnold et al., 2012	
	Plasma	0.2 ml	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	UV detector	23	LOD: 5–50 ng/ml	LOD: 16.64 - 166.42 pmol/ml	4-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametil-2-antraceni) ácido benzoico	Dimitrova et al., 1996
	Plasma	1 ml	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, metabolitos 4-oxo	UV detector	13	LOQ: 0.3 ng/ml	LOQ: 1 pmol/ml		Renalder et al., 1993
	Plasma	0.2 ml	all- <i>trans</i> -ROH, RES	UV detector 325 nm	30	LOQ: 2.5 ng/ml	LOQ: 8.73 pmol/ml	Retinil propionato	Hartman et al., 2001

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
SANGRE	Plasma	0.1 ml	ROH	UV detector 325 nm	20	LOD: ≈10 nmol	LOD: 0.5 μmol/ml	RAL-O-etiloxima y β-apo-12'-carotenal-O-t-butiloxima	Lunetta et al., 2002
	Suero de ratón	0.1–0.2 ml	RES, ROH y RAL	UV detector 325, 325,340 nm	25	LOD: 0.7 pmol (RES); 0.2 pmol (ROH); 0.2 pmol (RAL)	LOD: 7 pmol/ml (RES); 2 pmol/ml (ROH); 2 pmol/ml (RAL) LOQ: 1.5 pmol/ml (13-cis-4-oxo-RA); 0.75 pmol/ml (13-cis-RA. all-trans-RA. ROH)	REAC	Kane et al., 2008 b
	Plasma	0.35 ml	13-cis-4-oxo-RA, 13-cis-RA, all-trans-RA, ROH	UV detector 340 nm	35	LOQ: 0.6. 0.3. 0.3. 0.3 pmol			Teerlink et al., 1997
	Plasma	0.2 ml	All-trans-RA, 13-cis-RA	UV detector 340 nm	18	LOQ: 1 ng/ml (all-trans-RA) 5 ng/ml (13-cis-RA)	LOQ: 3.33 - 16.64 pmol/ml	Carbazol	Wang et al., 2003
	Plasma	0.5 ml	13-cis-4-oxo-RA, all-trans-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA, all-trans-ROH	UV detector 350 nm	45	LOD: 0.5 ng/ml RA. 10 ng/ml ROH	LOD: 1.66 pmol/ml (all-trans-RA); 34.91 pmol/ml (ROH)	Arotinoid etilsulfona	Lanvers et al., 1996
	Plasma	0.2 - 1 ml	13-cis-4-oxo-RA, all-trans-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, all-trans-RA, all-trans-ROH	UV detector 350 nm	26	LOQ: 2 ng/ml	LOQ: 6.66 pmol/ml	All-trans-acitretina, 13-cis-acitretina	Disdier et al., 1996
	Plasma	0.4 ml	13-cis-4-oxo-RA, all-trans-4-oxo-RA, 13-cis-RA, all-trans-RA	UV detector 360 nm	38	LOQ: 0.3 ng/ml	LOQ: 1 pmol/ml	All-trans-acitretina	Wyss y Bucheli, 1997
	Plasma	0.4 ml	13-cis-3-OH-RA, all-trans-3-OH-RA, 13-cis-3-OH-4-oxo-RA, all-trans-3-OH-4-oxo-RA	UV detector 360 nm	26	LOQ: 1 ng/ml	LOQ: 3.49 pmol/ml	Ro 12-7310/000	Wyss et al., 1998
	Suero	0.25 ml	ROH	UV detector: 280–300 nm	6	LOD: 1 ng/ml LOQ: 3.5 ng/ml	LOD: 3.49 pmol/ml LOQ: 12.22 pmol/ml	REAC	Khan et al., 2010
	Suero de ratón	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13-cis-4-oxo-RA, 9-cis-4-oxo-13,14-dihidro-RA, all-trans-RA, 9-cis-RA, 13-cis-RA	UV detector: 340 and 325 nm	40 / 27		LOD: 0.4 - 19 pmol/ml	all-trans-acitretina, all-trans-retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
	Suero de rata	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13-cis-4-oxo-RA, 9-cis-4-oxo-13,14-dihidro-RA, all-trans-RA, 9-cis-RA, 13-cis-RA	UV detector: 340 and 325 nm	40 / 27		LOD: 0.4 - 19 pmol/ml	all-trans-acitretina, all-trans-retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003

TIPO DE MUESTRA		CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
SANGRE	Suero	0.4 ml	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	UV detector: 340 and 325 nm	40 / 27		LOD: 0.4 - 19 pmol/ml	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
	Plasma	0.1 ml	RA	UV detector: 340 nm	6.5		LOD: 240 fmol/ml	All- <i>trans</i> -RA-d <sub>3</sub>	Napoli et al., 1985
	Suero	3.5 ml	RA, RAL e isómeros ROH	UV detector: 350 nm	60			Arotenoid	Miyagi et al., 2001
	Suero de rata	0.45 ml	all- <i>trans</i> -RA	UV detector: 351 nm (UPLC)	5	LOQ: 1 ng/ml LOD: 0.5 ng/ml	LOQ: 3.33 pmol/ml LOD: 1.66 pmol/ml		Kumar et al., 2014
	Plasma de vaca	1 volumen	13- <i>cis</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA	UV detector: 365 nm	24		LOD: 0.83 pmol/ml	Ro-23-5525	Horst et al., 1995

## APÉNDICE 11.4.2 DETECCIÓN DE RETINOIDES

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
TEJIDOS	Hígado, riñón, testículos y cerebro de ratón	0.01–0.02 g	all- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	DAD UV	30		LOD: 0.5 pmol/ml LOQ: 1 pmol/ml	4,4-dimetil RA	Kane et al., 2005
	CNS de rata	1 ml/g tejido	RA	DAD UV	50				Werner and Deluca, 2002
	CNS de rata	1 ml/g tejido	RA	DAD UV	70				Werner and Deluca, 2002
	CNS de rata	1 ml/g tejido	RA	DAD UV	60				Werner and Deluca, 2002
	Hígado de ternera	0.15 g	REPA	DAD UV: 325 nm	47				Burri et al., 1997
	Fluido folicular	0.2 ml	ROH	DAD UV: 325 nm	39				Schweigert et al., 2003
	Hígado de ratón	0.1 g	ROH, RES	DAD UV: 325 nm	35	LOD:0.35 pmol (ROH); 0.95 pmol (REPA)	LOD: 17.5 pmol/ml (ROH); 47.5 pmol/ml (REPA)	REAC	Kim y Quadro, 2010
	Cerebro, placenta e hígado de rata	0.05 g	all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -REPA	DAD UV: 325 nm	13			Vitamina K	Barbas et al., 1997
	Riñón de ratón	Ambos riñones	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	DAD UV: 326, 354 nm	41.5		LOD: 4 pmol/ml		Rühl y Schweigert, 2003
	Hígado de ratón	9-veces exceso de 0.9% NaCl	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH, REPA	DAD UV: 326, 354 nm	41.5		LOD: 4 pmol/ml		Rühl y Schweigert, 2003
	Hígado de rata	9-veces exceso de 0.9% NaCl	14-OH- <i>retro</i> -ROH, 4-OH-ROH	DAD UV: 326, 354 nm	41.5		LOQ: 52.4 pmol/ml		Rühl et al., 2005
	Hígado de rata y humano	0.1 – 0.2 g	all- <i>trans</i> -4-oxoretinoil- $\beta$ -glucurónido, all- <i>trans</i> -retinoil- $\beta$ -glucurónido, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -5,6-epoxi-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -RAL, RES	DAD UV: 330 nm	30 - 40			REAC	Barua y Olson, 1998
	Embriones de <i>Xenopus</i>	1000 uds	4-oxo-ROH, 4-oxo-RAL, 4-oxo-RA	DAD UV-Vis: 200-600 nm	30	LOD: 0.5 ng	LOD: 1.66 pmol		Blumberg et al., 1996

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS	
TEJIDOS	Tejido adiposo humano	0.0325 g	ROH	DAD: 452 nm (β-carotene), 327 nm (ROH) and 295 nm (IS)	23	LOQ (ng/mL): 0.4 ROH LOD (ng/mL): 0.2 ROH	LOQ: 1.4 pmol/ml LOD: 0.7 pmol/ml	<i>rac</i> -tocoferol	Casal et al., 2001
	Embriones de ratón	1.64 uds	13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, all- <i>trans</i> -ROH	ECD + 0.7 V	20	LOD: 10 pg RA LOD: 25 pg ROH	LOD: 0.03 pmol RAs LOD: 0.09 pmol ROH LOD: 6.25 (RA. 9- <i>cis</i> -RA); 100 (13- <i>cis</i> -RA) fmol/ml	13- <i>cis</i> -acitretina	Sakhi et al., 1998
	Hígado, riñones, tejido adiposo, musculoso, bazo, testículos y cerebro de ratón	0.04 - 0.115 g	All- <i>trans</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	MS	25	LOD: 37.5 (RA); 50 (9- <i>cis</i> -RA); 300 (13- <i>cis</i> -RA) fmol/ml LOQ: 14.04 pmol/ml (RA) LOQ: 42.8 pmol/ml (ROH)	LOD: 37.5 (RA); 50 (9- <i>cis</i> -RA); 300 (13- <i>cis</i> -RA) fmol/ml	4,4-dimetil-RA	Kane et al., 2008
	Prótata de rata	0.008 g	9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	MS	39	LOQ: 14.04 pmol/ml (RA) LOQ: 42.8 pmol/ml (ROH)		REAC	Wang et al., 2001
	Tejidos de ratón	0.015 - 0.035 g	all- <i>trans</i> -RAL	MS (UHPLC)	25	LOD: 1 pmol/ml LOQ: 4 pmol/ml		All- <i>trans</i> -3,4-dihidroRAL	Wang et al., 2015
	Pulgas de agua	25 - 100 uds.	RAs	MS (UHPLC)	30	LOD: 3.3 pmol/ml LOQ: 16.6 pmol/ml		Acitretina	Venne et al., 2016
	Pecho, hígado, tejido adiposo, colon y músculo humano	0.1 g	ROH	UV detector 325 nm	20	LOD: ≈10 nmol	LOD: 0.5 μmol/ml	RAL-O etiloxima y β-apo-12'-carotenal-O-t-butiloxima	Lunetta et al., 2002
	Hígado, riñón, tejido adiposo, músculo, bazo, testículos, piel, cerebro de ratón	0.01-0.02 g	RES, ROH y RAL	UV detector 325, 325,340 nm	25	LOD: 0.7 pmol (RES) 0.2 pmol (ROH) 0.2 pmol (RAL)	LOD: 7 pmol/ml (RES); 2 pmol/ml (ROH); 2 pmol/ml (RAL)	REAC	Kane et al., 2008 b
	Huevos de salmón	3-4 g	ROH	UV detector: 325 nm	20			β-criptoxantina	Li et al. 2005
	Arenque	5 g	ROH	UV detector: 325 nm	22			REAC	Routti et al., 2005

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS	
TEJIDOS	Piel de oreja de cerdo	0.6 cm <sup>2</sup>	ROH, REAC	UV detector: 325 nm	25	LOQ: 0.058 µg/mL (0.20 nM) (ROH) 0.045 µg/mL (0.14 nM) (REAC) LOD: 0.022 µg/mL (0.08 nM) (ROH) 0.022 µg/mL (0.07 nM) (REAC)	LOQ: 0.20 pmol/ml (ROH); 0.14 pmol/ml (REAC) LOD: 0.08 pmol/ml (ROH); 0.07 pmol/ml (REAC)		Padula et al., 2008
	Hígado de rata	1 g	ROH, ésteres de retinilo	UV detector: 325 nm	28		LOD: 400 pmol/ml	REPA	Wingerath et al., 1997
	Presas de foca	1 g	ROH, REPA	UV detector: 325 nm	34.5			REAC	Routti et al., 2005
	Hígado de foca ártica	0.02 g	REPA	UV detector: 327 nm	45	LOD: 27 pg	LOD: 5.14 pmol/ml	Retinil nonadecanoato	Molander et al., 1999
	Huevos de teleosteo	1 ml (filtrado acuoso)	RAL, 3,4-didehidro-RAL	UV detector: 330-350 nm	30			Retinaloxima	Irie y Seki, 2002
	Hígado de humano	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	UV detector: 340 and 325 nm	40 / 27		LOD: 0.4 - 19 pmol/ml	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
	Hígado, cerebro y riñón de ratón	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	UV detector: 340 and 325 nm	40 / 27		LOD: 0.4 - 19 pmol/ml	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
	Hígado, riñón y testículos de rata	0.3 mg	Ésteres de retinilo, ROH, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 9- <i>cis</i> -4-oxo-13,14-dihidro-RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	UV detector: 340 and 325 nm	40 / 27		LOD: 0.4 - 19 pmol/ml	all- <i>trans</i> -acitretina, all- <i>trans</i> -retinil nonanoato	Schmidt et al., 2003
	Cerebro humano	1 - 3 g	ROH	UV-Vis detector: 325-450 nm	23	LOD: 0.3 pmol/g	LOD: 0.3 pmol/g		Craft et al., 2004

## APÉNDICE 11.4.3 DETECCIÓN DE RETINOIDES

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
COMIDA	Fórmula para lactantes fortificada	50 g	ROH	DAD UV	30		LOD: 122 pmol/ml LOQ: 262 pmol/ml		Heudi et al., 2004
	Comprimidos dietéticos	5 tabletas	REAC, REPA	DAD UV: 325 nm	15				Davydova et al., 2010
	Fórmulas de alimentación enteral	3 ml	Isómeros of ROH	DAD UV: 325 nm	35	LOQ: 1.76 µg/100 ml ((E)-ROH) 1.63 µg/100 ml ((Z)-13)	LOQ: 61.4 pmol/ml ((E)-ROH) 56.9 pmol/ml ((Z)-13)		Duarte-Fávaro et al. 2003
	Formula infantil	1 - 25 g	REAC	DAD UV: 325 nm	20	LOD: 0.33 ng LOQ: 0.42 ng	LOD: 0.63 pmol LOQ: 0.8 pmol		Rodas Mendoza et al. 2003
	Forrajes (hierba y heno)	0.05 – 0.1 g (liofilizado)	Carotenoides y ROH	DAD UV-Vis: 210 y 600 nm	46	LOD: 0.8 ROH LOQ: 1.4 ng ROH	LOD: 0.28 nmol/ml LOQ: 0.49 nmol/ml LOD: 2.86 pmol/ml (REOH); 2.31 pmol/ml (REAC)	Equinenona	Chauveau-Duriot et al., 2010
	Zumos de frutas enriquecidos	0.1–2 ml	ROH, REAC, REPA	FL: Ex 325 nm, Em 480 nm	34	LOD (ng/ml): 0.82 (REOH); 0.76 (REAC) 0.96 (REPA) LOQ (ng/ml): 2.7 (REOH); 2.5 (REAC) 3.2 (REPA)	1.83 pmol/ml (REPA) LOQ: 9.43 pmol/ml (REOH); 7.61 pmol/ml (REAC) 6.1 pmol/ml (REPA)		Viñas et al., 2013 (b)
	Bebidas de frutas y leche	2 ml	ROH	FL: Ex 325 nm, Em 480 nm	5	LOD: 0.6 ng/ml	LOD: 2.1 pmol/ml		Höller et al., 2003
	Zumos	0.2–2 ml	13- <i>cis</i> -ROH, all- <i>trans</i> -ROH	FL: Ex 325 nm, Em 480 nm	7	LOD: 0.23 ng/ml LOQ: 0.76 ng/ml	LOD: 0.8 pmol/ml LOQ: 2.65 pmol/ml		Viñas et al., 2013
	Suplementos nutricionales	5 g	REPA	FL: Ex 350 nm, Em 480 nm	12	LOD: 0.1 ng	LOD: 1.9 pmol/ml		Iwase, 2003
	Comida para animales	10 g	REAC	UV detector: 265 nm	18	LOD: 0.075 - 1.26 µg/ml LOQ: 0.25 - 4.2 µg/ml	LOD: 0.23 - 3.84 nmol/ml LOQ: 0.76 - 12.8 nmol/ml		Xue et al., 2008

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
COMIDA	Comida para animales	1 g	REAC	UV detector: 290 nm	12	LOD 10 ng/g	LOD: 30.4 pmol/g	Qian y Sheng, 1998



## APÉNDICE 11.4.4 DETECCIÓN DE RETINOIDES

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
LECHE	Leche de vaca	2 ml	Carotenoides y ROH	DAD UV: 210 - 600 nm (UHPLC)	46	LOD: 0.8 ROH LOQ: 1.4 ng ROH	LOD: 0.28 nmol/ml LOQ: 0.49 nmol/ml	Equinenona	Chauveau-Duriot et al., 2010
	Leche en polvo, harina	1.25 g	ROH	DAD UV: 292 nm	15	LOD: 0.02 mg/1 LOQ: 0.06 mg/1	LOD: 69.82 pmol/ml LOQ: 209.5 pmol/ml		Ake et al., 1998
	Leche materna	0.5 ml	ROH	DAD UV: 325 nm	2	LOD: 0.13 µmol/L LOQ: 0.27 µmol/L	LOD: 130 pmol/ml LOQ: 270 pmol/ml		Kasparová et al., 2012
	Leche materna	0.5 ml	ROH	DAD UV: 325 nm	1.8	LOD: 0.004 µmol/L LOQ: 0.012 µmol/L	LOD: 4 pmol/ml LOQ: 12 pmol/ml		Plísek et al., 2013
	Leche materna	1 ml	ROH	DAD UV: 325 nm	39		LOD: 0.14 pmol/ml		Macias and Schweigert, 2001
	Leche de rumiante	6 ml	RA, RAL, ROH, ésteres de retinilo	DAD UV: 325 nm (ROH y ésteres de retinilo); 350 nm (RAL and RA)	30		LOD: 22.5 - 448.6 pmol/ml LOQ: 74.9 pmol/ml - 1.5 nmol/ml LOD: 1.52 pmol/ml (REPA); 1.83 pmol/ml (REAC)	Retinil propionato Retinil pentadecanoato	Rocchi et al., 2016
	Leche infantil	2 g	REPA, REAC	DAD UV: 326 nm	25	LOD: 0.8 (REPA); 0.6 (REAC) LOQ: 2.5 (REPA); 1.8 (REAC)	LOQ: 4.76 pmol/ml (REPA); 5.48 pmol/ml (REAC)		Chávez-Servín et al., 2006
	Fórmula infantil / leche en polvo	20 g	Vitamina A total	FL: Ex 325 nm, Em 450 nm	12.5			ROH propionato	Woollard et al. 2016
	Leche materna	0.5 ml	ROH	FL: Ex 325, Em 480 (UHPLC)	1.5	LOD: 2.3 nmol/l LOQ: 7.7 nmol/l	LOD: 2.3 pmol/ml LOQ: 7.7 pmol/ml		Kucerová et al., 2014
	Leche materna	10 ml	ROH	MS	40		LOD: 3.5 pmol/ml	d <sub>6</sub> -REAC, d <sub>6</sub> -β-caroteno	Kamao et al., 2007

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
<b>LECHE</b>	Leche materna	0.5 ml	ROH	UV detector: 350-325 nm	< 7				Tanumihardjo and Penniston, 2002



## APÉNDICE 11.4.5 DETECCIÓN DE RETINOIDES

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
<b>COSMÉTICOS Y FORMULACIONES</b>	Pomada natural	1 g	REPA	DAD UV: 325 nm	30	LOD: 0.43 mg/100 ml LOQ: 1.31 mg/100 ml	LOD: 8.2 nmol/ml LOQ: 24.9 nmol/ml		Kwiecien et al., 2010
	Formulación tópica	2.5 g	All- <i>trans</i> -RA	DAD UV: 353 nm	40				Ye et al., 2004
	Crema a base de agua	0.1 – 0.12 g	RA, retinoil β-glucurónido	DAD UV: 360 nm	30	LOD: 1 ng RAG LOD: 0.5 ng RA	LOD: 2.1 pmol (RAG); 1.7 pmol (RA)		Barua, 2003
	Cremas y productos farmacéuticos	0.01 – 0.02 g	REAC	ECD (+1.0 V)	12	LOQ: 0.8 ng	LOQ: 121.8 pmol/ml		Wang y Wang, 2001
	Cápsulas de gelatina de isotretinoína	2 mg/ml	13- <i>cis</i> -RA	FL: Ex 350 nm; Em 520 nm	10				Lima et al. 2005
	Cápsulas de gelatina de isotretinoína	2 - 3 mg/ml	13- <i>cis</i> -RA	GC-FID	30				Lima et al. 2005
	Formulación dermatológica	0.5 g	All- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA	UV detector: 342 nm	< 20	LOQ: 10 pmol	LOQ: 0.2 nmol/ml		Tashtoush et al., 2007
	Cápsulas de gelatina de isotretinoína	2 mg/ml	13- <i>cis</i> -RA	UV detector: 365 nm	10				Lima et al. 2005

## APÉNDICE 11.4.6 DETECCIÓN DE RETINOIDES

	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	RETINOIDE / S	DETECCIÓN	TIEMPO DE ANÁLISIS (MIN)	LOD / LOQ	LOD / LOQ	ESTÁNDAR INTERNO	REFERENCIAS
<b>DESECHOS</b>	Desechos de crustáceos	0.4 g	ROH	DAD UV: 325 nm	12.5	LOD:38 ng/ml	LOD: 133 pmol/ml		López-Cervantes et al. 2006
	Heces	2 g	ROH	MS	25				Zhu et al., 2006
	Orina	5 ml	Retinoil-β-glucurónidos of 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, all- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA	UV detector: 363 nm	40	LOD: 0.01 μg/ml	LOD: 33.3 pmol/ml	Acitretina-β-glucurónido	Li et al., 1996



## 11.5. Espectrometría de masas

### APÉNDICE 11.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECTOR	MODO DE DETECCIÓN	RANGO (m/z)	PERMANENCIA (ms)	PRECURSOR (m/z)	PRODUCTO (m/z)	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	T (min)	REFs.	
SANGRE	Suero	All- <i>trans</i> -ROH, all- <i>trans</i> -REPA	YMC C-30, 100 x 2.0 mm	MeOH/H <sub>2</sub> O/AA (50:50:0.5) to MeOH/MtBE/AA (50:50:0.5)	LC-MS QqQ con APCI (+)	SIM	100-500	200	269	60	50	Van Breemen et al., 1998	
	Suero	ROH	YMC carotenoid column (3 µm, 2.0 x 100 mm)	MeOH/H <sub>2</sub> O/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (A); MeOH/MtBE/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (B)	LC-MS QqQ con APCI (+)	SIM			269		26	Zhu et al., 2006	
	Suero	All- <i>trans</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, all- <i>trans</i> -RA y ROH	C30 (150 x 2.1 mm i.d. con YMC30, 3 µm; Lab-Comp Kft).	Gradiente: 60 mM AmA / MeOH (1:1, v/v) (A) y MeOH (B)	LC-DAD-MS/MS-APCI (+)	MRM			315.2 (all- <i>trans</i> -4-oxo-RA) 315.2 (13- <i>cis</i> -4-oxo-RA) 301.1 (13- <i>cis</i> -RA) 301.1 (9- <i>cis</i> -RA) 301.1 (all- <i>trans</i> -RA) 269.1 (ROH)	297.2 (all- <i>trans</i> -4-oxo-RA) 297.2 (13- <i>cis</i> -4-oxo-RA) 205.3 (13- <i>cis</i> -RA) 205.3 (9- <i>cis</i> -RA) 205.3 (all- <i>trans</i> -RA) 93.2 (ROH)	7 (all- <i>trans</i> -4-oxo-RA) 7 (13- <i>cis</i> -4-oxo-RA) 10 (13- <i>cis</i> -RA) 10 (9- <i>cis</i> -RA) 10 (all- <i>trans</i> -RA) 15 (ROH)	24	Rühl, 2006
	Suero	All- <i>trans</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9,13- <i>dicis</i> -RA, 4-oxo-13- <i>cis</i> -RA, 4-oxo-all- <i>trans</i> -RA	Ascentis Express RP Amide column (2.7 µm; 150 mm x 2.1 mm)	Gradiente: agua (A) y ACN (B), con 40% MeOH y 0.1% FA en ambas fases	UHPLC-MS-APCI (+)				301 (RAs) 299 (4-OH-RA) 315 (4-oxo-RA) 300 (4-oxo-RA-d <sub>3</sub> ) 306 (13- <i>cis</i> -RA-d <sub>5</sub> )	205 (RAs) 157 (4-OH-RA) 159 (4-oxo-RA) 226 (4-oxo-RA-d <sub>3</sub> ) 116 (13- <i>cis</i> -RA-d <sub>5</sub> )	17 (RAs) 16 (4-OH-RA) 23 (4-oxo-RA) 35 (4-oxo-RA-d <sub>3</sub> ) 97 (13- <i>cis</i> -RA-d <sub>5</sub> )	14.5	Arnold et al., 2012

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECTOR	MODO DE DETECCIÓN	RANGO (m/z)	PERMANENCIA (ms)	PRECURSOR (m/z)	PRODUCTO (m/z)	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	T (min)	REFs.	
SANGRE	Suero (TRL)	Retinil palmitato	YMC C30 (4.6 x 150 mm, 5 µm)	Gradiente: MeOH-agua (80:20, v/v) (A); MtBE-MeOH-agua (78:20:2, v/v/v) (B). AmA 0.4 g/L solvente Gradiente: 90:10 MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (A); 78:20:2 MtBE/MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (B) Gradiente: 90:10 MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (A); 78:20:2 MtBE/MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (B) 0.1 M AmA-ACN pH=5.0 con AA (80:20) a (80:10) Isocrático: MeOH:ACN :Chl (47:47:6, v/v/v) TEA (0.05%) y AmA (0.05 M)	LC-PDA-MS/MS-QqQ con APCI (+)	MRM		50	269.2	213.2	20 / 35	19	Kopec et al., 2013
	Suero (TRL)	Ésteres de retinilo y α-ésteres de retinilo	YMC C30 (4.6 x 250 mm, 3 µm)	MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (A); 78:20:2 MtBE/MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (B) Gradiente: 90:10 MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (A); 78:20:2 MtBE/MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (B) 0.1 M AmA-ACN pH=5.0 con AA (80:20) a (80:10) Isocrático: MeOH:ACN :Chl (47:47:6, v/v/v) TEA (0.05%) y AmA (0.05 M)	LC-PDA-MS/MS-APCI (+)	MRM	70	269.2 (α-ésteres de retinilo) 269.2 (ésteres de retinilo)	123.1 (α-retinyl esters) 239.1 (retinyl esters)	27.5 (α-ésteres de retinilo) 35 / 25 (ésteres de retinilo)	29	Goetz et al., 2016	
	Suero (TRL)	Ésteres de retinilo y α-ésteres de retinilo	YMC C30 (4.6 x 250 mm, 3 µm)	MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (A); 78:20:2 MtBE/MeOH/H <sub>2</sub> O con 0.1% FA (v/v) (B) 0.1 M AmA-ACN pH=5.0 con AA (80:20) a (80:10) Isocrático: MeOH:ACN :Chl (47:47:6, v/v/v) TEA (0.05%) y AmA (0.05 M)	LC-PDA-MS/MS-ESI (+)	MRM	70	496.6 - 552.6	145 - 197	17.5 (α-ésteres de retinilo) 40 (ésteres de retinilo)	29	Goetz et al., 2016	
	Plasma	13- <i>cis</i> RA, 9- <i>cis</i> RA, all- <i>trans</i> -RA	Nova-Pak C-18, 225 x 3.9 mm	MeOH:ACN :Chl (47:47:6, v/v/v) TEA (0.05%) y AmA (0.05 M)	LC/PB/MS (-)	SIM	50-800	325±0,5 (acitretina) 299±0,5 (RAs)			32	Lehman & Franz, 1996	
	Plasma	ROH	Spherisorb C18 ODS2 (15 cm × 3 mm, 5 µm)	MeOH:ACN :Chl (47:47:6, v/v/v) TEA (0.05%) y AmA (0.05 M)	DAD-GCMS	SIM		358.5 (d0-ROH) 362.5 (d4-ROH); 366.5 (d8-ROH)				You et al., 2002	

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECTOR	MODO DE DETECCIÓN	RANGO (m/z)	PERMANENCIA (ms)	PRECURSOR (m/z)	PRODUCTO (m/z)	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	T (min)	REFs.
SANGRE	Plasma	REs y carotenoides	Spherisorb C18 ODS2 (15 cm × 3 mm, 5 μm)	Isocrático: MeOH:ACN :Chl (47:47:6 vol), 0.05% trietilamina, y 0.05 M AaA Gradiente: Hexano:tolueno (95:5, v/v) para RAs y hexano:THF (97.5:2.5 v/v) para metabolitos oxo	DAD-GCMS			358.4 (d0-ROH-TMS) 362.4 (d4-ROH-TMS)			5.22 (d0-ROH-TMS) 5.21 (d4-ROH-TMS)	Edwards et al., 2001
	Plasma	All-trans-RA, 13-cis-RA, metabolitos 4-oxo	LC-Packings (250 x 0.32 mm I.D. micro column, 5 μm diol phase)	Isocrático: MtBE-hexano 2:98 (v/v) o tolueno-hexano 45:55 (v/v) Gradiente: ACN:agua:FA (10:90:0,1, v/v/v) - ACN:agua:MeOH:FA (45:45:10:0,1, v/v/v) - ACN:MeOH:FA (90:10:0,1, v/v/v)	micro-LC-MS			308.3 (RAs) 319.3 (4-oxo-Ras) (con sus <sup>13</sup> C IS)			13	Renalder et al., 1993
	Plasma	RA	Dupont Zorbax-Sil (250 x 4.6 mm)	Isocrático: MtBE-hexano 2:98 (v/v) o tolueno-hexano 45:55 (v/v) Gradiente: ACN:agua:FA (10:90:0,1, v/v/v) - ACN:agua:MeOH:FA (45:45:10:0,1, v/v/v) - ACN:MeOH:FA (90:10:0,1, v/v/v)	GLC-MS-NCI	100-400		314			6,5	Napoli et al., 1985
	Plasma	all-trans-4-oxo-RA, 13-cis-4-oxo-RA, 13-cis-RA, all-trans-RA y all-trans-ROH	Zorbax SB C18 (4,6 x 50 mm, 1,8 μm)	Isocrático: MeOH:FA (45:45:10:0,1, v/v/v) - ACN:MeOH:FA (90:10:0,1, v/v/v)	LC MS QqQ con APCI (+)	MRM 60-500	180 (4-oxo-RAs) 100 (RAs) 10 (IS) 10 (ROH)	315.4 (4-oxo-RAs) 301.2 (RAs) 305.0 (IS) 269.2 (ROH)	297 (4-oxo-RAs) 205 (RAs) 209 (IS) 93 (ROH)	15 (4-oxo-RAs) 22 (RAs) 22 (IS) 22 (ROH)	7	Gundersen et al., 2007

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECTOR	MODO DE DETECCIÓN	RANGO (m/z)	PERMANENCIA (ms)	PRECURSOR (m/z)	PRODUCTO (m/z)	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	T (min)	REFs.
SANGRE	Suero de ratón	All-trans-RA, 9,13-di-cis-RA, 13-cis-RA	Supelcosil ABZ+PLUS Supelguard (Supelco, 2.1 x 20 mm, 5 µm) y Ascentis RP-Amide (Supelco, 2.1 x 150 mm, 3 µm)	Gradiente: Agua con 0.1% FA (A); ACN con 0.1% FA (B)	LC-MS/MS QqQ con APCI (+)		150	301.1 (RA) 329.4 (IS)	205.0 (RA) 151.3 (IS)	17	25	Kane et al., 2008
	Suero de ratón	all-trans-RA, 13-cisRA	Supelco ABZ + C-16 alkylamide column (100 mm x 2.1 mm, 3 µm)	ACN/MeOH /H2O/MA (formic) (40:30:30:0.1) (A) ACN/MeOH /H2O/MA (55:30:15:0.1) (B)	LC MS QqQ con ESI/APCI(+/-)		150	Q1: 301.1 (RA) Q1: 329.4 (IS)	Q3: 205.0 (RA) Q3: 151.3 (IS)	20	25	Kane et al., 2005
	Suero de ratón	all-trans-RAL	Eclipse plus C <sub>18</sub> RRHD column (Agilent, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm)	0.1% FA (H <sub>2</sub> O) (A); 0.1% FA (ACN) (B)	LC-APCI-QqQ-MS (+)			328.5 326.6 (IS)	236.4 234.4 (IS)	17	25	Wang et al., 2015
	Suero de ratón	9-cis-13,14-dihidro-RA, all-trans-13,14-dihidro-RA	C30 Lab-Comp Kft (150 x 2.1 mm i.d. con YMC30, 3 µm).	Gradiente: 60 mM AmA / MeOH (1:1, v/v) (A) y MeOH (B)	LC-DAD-MS/MS-APCI (+)			303	207	10	24	Ruhl et al., 2015
	Suero de rata	14-OH-retro-ROH 4-OH-ROH	C18 (120 mm x 4 mm i.d. con Spherisorb ODS2, 3 µm)	MeOH (A) y 60 mM AmA:MeOH (1:1, v/v) (B)	LCQ trampa de iones con APCI	80-290		285		40		Rühl et al., 2005

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECTOR	MODO DE DETECCIÓN	RANGO (m/z)	PERMANENCIA (ms)	PRECURSOR (m/z)	PRODUCTO (m/z)	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	T (min)	REFs.	
TEJIDOS	Hígado de rata	ROH 15 Res diferentes	Suplex pKb-100, 5 µm, 250 x 4.6 mm	ACN- MeOH- DCM- <i>n</i> - Hexano 88:4:4:4 a 70:10:10:10 Gradiente:	LDI-TOF-MS (+)	sobre 240		552.5	452.4		30	Wingerath et al., 1997	
	Hígado de rata	14-OH- <i>retro</i> - ROH 4-OH-ROH	C18 (120 mm × 4 mm i.d. con Spherisorb ODS2, 3 µm)	MeOH (A) y 60 mM AmA:MeOH (1:1, v/v) (B) H2O/MeOH/ AA (50:50:0.5, v/v/v) (A); MeOH/MtB E/AA (50:50:0.5, v/v/v) (B) ACN/MeOH /H2O/MA (fórmico) (40:30:30:0. 1) (A) ACN/MeOH /H2O/MA (55:30:15:0. 1) (B)	LCQ trampa de iones con APCI (+)	80-290		285		40	41.5	Rühl et al., 2005	
	Próstata de rata	9- <i>cis</i> RA, 13- <i>cis</i> RA, all- <i>trans</i> -RA, ROH	Micra non-porous silica C <sub>18</sub> column (4.6 x 33 mm)		LC-MS-APCI (+/-)	SIM		889	301.1 (RA+) 269 (ROH y IS)	299.1 (RA-)		15	Wang et al., 2001
	Hígado, riñón, testículo y cerebro de ratón	all- <i>trans</i> -RA, 13- <i>cis</i> RA	Supelco ABZ + C- 16 alkylamide column (100 mm x 2.1 mm, 3 µm)		LC-QqQ con ESI/APCI(+/-)	SRM		150	Q1: 301.1 (RA) Q1: 329.4 (IS)	Q3: 205.0 (RA) Q3: 151.3 (IS)	20	25	Kane et al., 2005
	Tejidos de ratón	all- <i>trans</i> -RAL	Eclipse plus C <sub>18</sub> RRHD column (Agilent, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm)	H2O (0.1% FA) (A); ACN (0.1% FA) (B)	LC-APCI- QqQ-MS (+)	MRM			328.5 326.6 (IS)	236.4 234.4 (IS)	17	25	Wang et al., 2015
	Hígado, riñón, tejido adiposo, músculo , bazo, testículo s y cerebro de ratón	All- <i>trans</i> -RA, 9,13-di- <i>cis</i> - RA, 13- <i>cis</i> -RA	Supelcosil ABZ+PLUS Supelguard (Supelco, 2.1 x 20 mm, 5 µm) y Ascentis RP-Amide (Supelco, 2.1 x 150 mm, 3 µm)	Gradiente: Agua con 0.1% FA (A); ACN con 0.1% FA (B)	LC-MS/MS QqQ con APCI (+)	SRM		150	301.1 (RA) 329.4 (IS)	205.0 (RA) 151.3 (IS)	17	25	Kane et al., 2008

TIPO DE MUESTRA	RETINOIDE	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECTOR	MODO DE DETECCIÓN	RANGO (m/z)	PERMANENCIA (ms)	PRECURSOR (m/z)	PRODUCTO (m/z)	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	T (min)	REFs.	
TEJIDOS	Huevos de salmón	ROH	Finesse Genesis C <sub>18</sub> column (150 mm length, 2.1 mm i.d., 4 µm)	MeOH/MiB E/H <sub>2</sub> O (90:5:5, v/v/v)	LC-MS QqQ-ESI (+)	SIM / MRM	100-650	269	93		26	Li et al. 2005	
	Pulgas de agua	RAs	Acquity UPLC cortecs (C <sub>18</sub> <sup>+</sup> ), 2.1 x 50 mm, 1.6 µm	H <sub>2</sub> O (0.1% AA) (A), MeOH (0.1% AA): ACN (3:2) (B)	UHPLC-MS QqQ-ESI (+/-)	SRM		200	299.3 (RAs) 325.2 (IS)	255.3 (RAs) 265.9 (IS)	15	16	Venne et al., 2016
COMIDA	Fórmula para lactantes fortificada	ROH	Nucleosil 100-5, 250 mm x 4.6 mm	Hexano/D/2-P (96.7:3:0.3, v/v/v)	LC-MS-APCI (+)	SIM		269.1			30	Heudi et al., 2004	
	Zumos de frutas enriquecidos	ROH, REAC, REPA	Zorbax Eclipse XDB C <sub>8</sub> (15 cm x 4.6 mm x 5 µm)	MeOH:H <sub>2</sub> O (90:10, v/v)	LC-MS-APCI (+) trampa de iones	SIM		269			25	Viñas et al., 2013 (b)	
LECHE	Leche materna	ROH	Capcellpak C <sub>18</sub> UG120	MeOH-H <sub>2</sub> O (90:10, v/v) (A), ACN (B)	LC-MS/MS QqQ APCI (+)	MRM		269.1	213.4		19	95	Kamao et al., 2007
	Leche de rumiante	RA, RAL, ROH, ésteres de retinilo	C18/C30 tandem TSKgel Super-ODS (4,6 x 100 mm, 2 µm) y ProntoSIL C30 (4,6 x 250 mm, 3 µm)	Gradiente: MeOH (A); 2-P/hexano (50:50 v/v) (B)	LC-PDA-MS/MS-QqQ con APCI (+)	MRM		269 (ROH) 285 (RAL) 300 (RA) 269 (IS) 269 (Ésteres de retinilo)	119 (ROH) 175 (RAL) 185 (RA) 199 (IS) 119 (Ésteres de retinilo)		30	Rocchi et al., 2016	
DESECHOS	Heces	ROH	YMC carotenoid column (3 µm, 2.0 x 100 mm)	MeOH/H <sub>2</sub> O/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (A); MeOH/MiB E/AA (50:49.5:0.5, v/v/v) (B)	LC-MS QqQ con APCI (+)	SIM		269			26	Zhu et al., 2006	

## 11.6. Niveles de retinoides en muestras biológicas

### APÉNDICE 11.6.1 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO TODO-*TRANS*-RETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ácido todo-*trans*-retinoico fue encontrado a niveles de pmol/mL o pmol/g en sangre, hígado, riñón así como en otros organismos como cerebro, testículos y páncreas. Las concentraciones van desde 1 a decenas de pmol/mL o pmol/g en diferentes tejidos, siendo 150 pmol/g el máximo valor medio encontrado en hígado de Ratas hembra Han/Wistar.

La RALDH media la biosíntesis de ácido todo-*trans*-retinoico desde su precursor, el retinal. En el citosol, el ácido todo-*trans*-retinoico se une al CRABP para translocarse al núcleo permitiendo la asociación con los receptores de retinoides correspondientes, como los RARs. El ácido todo-*trans*-retinoico puede ser metabolizado a metabolitos oxidados por medio del CYP26A1 (White et al., 2000) y juega un papel importante en numerosos y diversos procesos biológicos como la embriogénesis y la diferenciación celular (Novák et al., 2008; Theodosiou et al., 2010; Shmarakov et al., 2015).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido todo-<i>trans</i>-retinoico</b>													
Humano		Ambos	19-21 años	Suero		5.39 (4.79 - 6.02)		pmol/mL	61	1.62		ng/mL	Gruber et al. 2012
Humano		Ambos	25-58 años	Suero		8.99 ± 2.00		pmol/mL	26	2.70 ± 0.60		ng/mL	Tang et al. 1990
Humano		Ambos	19-41 años	Suero		9.32 ± 2.66		pmol/mL	6	2.80 ± 0.80		ng/mL	Mihaly et al. 2011
Humano		Ambos	27-62 años	Suero		8.32 ± 3.66		pmol/mL	27	2.50 ± 1.10		ng/mL	Moulas et al. 2006
Humano		Ambos	38-55 años	Suero		9.55 ± 1.73		pmol/mL	28	2.87 ± 0.52		ng/mL	Liu et al. 2015
Humano		Ambos	34-77 años	Suero		5.8 (5.2 - 6.3)		pmol/mL	17	1.74		ng/mL	Soderlund et al. 2003
Humano		Ambos	31-81 años	Suero		5.2 ± 1.0		pmol/mL	80	1.56 ± 0.30		ng/mL	Wahlberg et al. 1996
Humano		Mujeres	31 años	Suero		2.76 ± 1.30		pmol/mL	502	0.83 ± 0.39		ng/mL	Siegel et al. 2004
Humano		Hombres	18-65 años	Suero		3.1 ± 0.9		pmol/mL	20	0.93 ± 0.27		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	18-65 años	Suero	Ayuno nocturno	3 ± 0.6		pmol/mL	20	0.90 ± 0.18		ng/mL	Arnold et al., 2012

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido todo-trans-retinoico</b>													
Humano		Hombres	NR	Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	3 ± 1		pmol/g	10	0.8 ± 0.2		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres	NR	Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	7 ± 2		pmol/g	10	2 ± 0.5		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Cerebro (entero)	15400	5.4 ± 0.4		pmol/g	4	1.6 ± 0.1		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Cerebelo	15400	10.7 ± 0.3		pmol/g	4	3.2 ± 0.1		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Cortex	15400	2.6 ± 0.4		pmol/g	8	0.8 ± 0.1		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Hipocampo	15400	8.4 ± 1.2		pmol/g	8	2.5 ± 0.4		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Estriado	15400	15.3 ± 4.7		pmol/g	5	4.6 ± 1.4		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Cerebro	15400	7.7 ± 0.9		pmol/g	8	2.3 ± 0.3		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Cerebro	4000	33.9 ± 3.9		pmol/g	8	10.18 ± 1.17		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Cerebelo	4000	54.8 ± 3.6		pmol/g	8	16.46 ± 1.08		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Córtex	4000	16 ± 1.3		pmol/g	7	4.81 ± 0.39		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Hipocampo	4000	45.3 ± 5.2		pmol/g	8	13.61 ± 1.56		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Riñón	15400	7 ± 1.3		pmol/g	12	2.1 ± 0.4		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Hígado	15400	9.6 ± 1		pmol/g	12	2.9 ± 0.3		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	7-12 semanas	Hígado	30000	15 ± 3.0		pmol/g	NR	4.51 ± 0.90		ng/g	Kane et al., 2010
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Bulbo olfatorio	4000	76.5 ± 21.3		pmol/g	4	22.98 ± 6.40		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Suero	15400	1.9 ± 0.4		pmol/mL	6	0.6 ± 0.1		ng/mL	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Estriado	4000	78 ± 33.2		pmol/g	3	23.43 ± 9.97		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Testículos	15400	9.3 ± 1.4		pmol/g	8	2.8 ± 0.4		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Tálamo	4000	80.9 ± 6		pmol/g	4	24.31 ± 1.80		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/7	Machos	7-12 semanas	Suero	30000	1.9 ± 0.3		pmol/mL	NR	0.57 ± 0.09		ng/mL	Kane et al., 2010
Ratón	C57BL/8	Machos	7-12 semanas	Pancreas	30000	7 ± 0.5		pmol/g	NR	2.10 ± 0.15		ng/g	Kane et al., 2010

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido todo-trans-retinoico</b>													
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Cerebro	15000	5.3 ± 0.9		pmol/g	5	1.6 ± 0.27		ng/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	15000	5.33 ± 0.90		pmol/g	5	1.60 ± 0.27		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	45000	4.89 ± 1.20		pmol/g	6	1.47 ± 0.36		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	150000	3.40 ± 0.37		pmol/g	5	1.02 ± 0.11		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Riñón	15000	7.9 ± 3.2		pmol/g	6	2.37 ± 0.95		ng/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	15000	7.89 ± 3.16		pmol/g	6	2.37 ± 0.95		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	45000	4.16 ± 0.67		pmol/g	6	1.25 ± 0.20		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	150000	2.16 ± 0.60		pmol/g	6	0.65 ± 0.18		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Hígado	15000	18.5 ± 5.9		pmol/g	6	5.55 ± 1.78		ng/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	15000	18.47 ± 5.92		pmol/g	6	5.55 ± 1.78		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	45000	15.58 ± 5.43		pmol/g	6	4.68 ± 1.63		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	150000	25.13 ± 15.58		pmol/g	5	7.55 ± 4.68		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	15000	3.59 ± 1.10		pmol/mL	2	1.08 ± 0.33		ng/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	45000	2.23 ± 0.50		pmol/mL	3	0.67 ± 0.15		ng/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	150000	1.60 ± 0.20		pmol/mL	3	0.48 ± 0.06		ng/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Suero/plasma	15000	3.6 ± 1.1		pmol/mL	2	1.08 ± 0.33		ng/mL	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (epidídimo)	4000	14.2 ± 2.4		pmol/g	18	4.27 ± 0.72		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Cerebro	4000	17.1 ± 3.7		pmol/g	19	5.14 ± 1.11		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Riñón	4000	15.2 ± 2.2		pmol/g	30	4.57 ± 0.66		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	38.1 ± 3.4		pmol/g	18	11.45 ± 1.02		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Músculo	4000	1.5 ± 0.2		pmol/g	15	0.45 ± 0.06		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Suero	4000	2.7 ± 0.3		pmol/mL	21	0.81 ± 0.09		ng/mL	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Bazo	4000	7.3 ± 0.6		pmol/g	14	2.19 ± 0.18		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Testículos	4000	8.9 ± 1		pmol/g	14	2.67 ± 0.30		ng/g	Kane et al., 2008 b
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Riñón	12000	3.33 ± 0.67		pmol/g	≥6	1.00 ± 0.20		ng/mg	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	150 ± 80		pmol/g	5	45.1 ± 24.0		ng/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Hembras	12 semanas	Hígado	18800	15 ± 3		pmol/g	5	4.51 ± 0.90		ng/g	Van der Ven et al., 2008a

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido todo-trans-retinoico</b>													
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	26 ± 6		pmol/g	5	7.81 ± 1.80		ng/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	68 ± 28		pmol/g	5	20.43 ± 8.41		ng/g	Van der Ven et al., 2008b
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Suero	12000	1.46 ± 0.61		pmol/mL	≥6	0.44 ± 0.18		ng/mL	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Machos	12 semanas	Hígado	18800	32 ± 3		pmol/g	5	9.61 ± 0.90		ng/g	Van der Ven et al., 2008a
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	26 ± 4		pmol/g	5	7.81 ± 1.20		ng/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	35 ± 3		pmol/g	5	10.52 ± 0.90		ng/g	Van der Ven et al., 2008b
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Riñón	12000	4.33 ± 1.00		pmol/g	≥6	1.30 ± 0.30		ng/mg	Fletcher et al., 2005
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	42 ± 17		pmol/g	5	12.6 ± 5.1		ng/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Suero	12000	1.33 ± 0.07		pmol/mL	≥6	0.40 ± 0.02		ng/mL	Fletcher et al., 2005
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	35 días	Riñón	Canadian cookies	11 ± 1		pmol/g	5	3.30 ± 0.30		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	77 días	Riñón	Canadian cookies	8.9 ± 1.5		pmol/g	5	2.67 ± 0.45		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	350 días	Riñón	Canadian cookies	8.5 ± 0.6		pmol/g	5	2.55 ± 0.18		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	Madres PND30	Riñón	Canadian cookies	9.1 ± 0.7		pmol/g	5	2.73 ± 0.21		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	35 días	Hígado	Canadian cookies	15 ± 1		pmol/g	5	4.51 ± 0.30		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	77 días	Hígado	Canadian cookies	23 ± 11		pmol/g	5	6.91 ± 3.30		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	350 días	Hígado	Canadian cookies	26 ± 8		pmol/g	5	7.81 ± 2.40		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	Madres PND30	Hígado	Canadian cookies	41 ± 8		pmol/g	5	12.32 ± 2.40		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	10 semanas	Hígado	12000	31 ± 3		pmol/g	5	9.31 ± 0.90		ng/g	Viluksela et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Riñón	6000	13.5 ± 2.8		pmol/g	6	4.06 ± 0.84		ng/g	Schmidt et al., 2003a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Riñón	6000	13.5 ± 3.1		pmol/g	6	4.06 ± 0.92		ng/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Riñón	6000	12.1 ± 3.2		pmol/g	6	3.64 ± 0.973		ng/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Riñón	6000	13.9 ± 2.3		pmol/g	6	4.18 ± 0.69		ng/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Riñón	6000	9.8 ± 2.1		pmol/g	6	2.95 ± 0.64		ng/g	Hoegberg et al., 2003

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido todo-trans-retinoico</b>													
Rata	Sprague-Dawley	Machos	35 días	Riñón	Canadian cookies	8.9 ± 2.7		pmol/g	5	2.67 ± 0.81		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	77 días	Riñón	Canadian cookies	6 ± 1.5		pmol/g	5	1.80 ± 0.45		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	350 días	Riñón	Canadian cookies	4.8 ± 1.3		pmol/g	5	1.44 ± 0.39		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Hígado	6000	16.9 ± 2.4		pmol/g	6	5.08 ± 0.72		ng/g	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Hígado	6000	16.9 ± 2.6		pmol/g	6	5.08 ± 0.79		ng/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Hígado	6000	15.3 ± 1.1		pmol/g	5	4.59 ± 0.337		ng/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Hígado	6000	17.7 ± 3.5		pmol/g	6	5.33 ± 1.04		ng/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Hígado	6000	21.5 ± 3.9		pmol/g	6	6.46 ± 1.16		ng/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	35 días	Hígado	Canadian cookies	14 ± 1		pmol/g	5	4.21 ± 0.30		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	77 días	Hígado	Canadian cookies	16 ± 4		pmol/g	5	4.81 ± 1.20		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	350 días	Hígado	Canadian cookies	35 ± 12		pmol/g	5	10.52 ± 3.61		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	10 semanas	Hígado	12000	50 ± 4		pmol/g	5	15.02 ± 1.20		ng/g	Viluksela et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Suero	6000	2.2 ± 1.7		pmol/mL	6	0.656 ± 0.497		ng/mL	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Suero	6000	2.3 ± 0.0		pmol/mL	6	0.697 ± 0.007		ng/mL	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Suero	6000	2.3 ± 0.2		pmol/mL	6	0.693 ± 0.062		ng/mL	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Suero	6000	2.0 ± 0.1		pmol/mL	6	0.592 ± 0.029		ng/mL	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Suero/plasma	6000	2.2 ± 0.2		pmol/mL	6	0.66 ± 0.05		ng/mL	Schmidt et al., 2003a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Testículos	4000	12.8 ± 1.2		pmol/g	6	3.85 ± 0.37		ng/g	Schmidt et al., 2003a
Humano		NR	NR	Plama	NR	2.66		pmol/mL	1	0.80		ng/mL	Gundersen et al., 2007

## APÉNDICE 11.6.2 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO 9-*CIS*-13,14-DIHIIDRORETINOICO EN MUESRTAS BIOLÓGICAS

El ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico fue encontrado en suero (390 pmol/mL), hígado (446 pmol/mL) y cerebro (23 pmol/g) de ratón (Rühl et al., 2015).

Sus niveles fueron considerados suficientes para activar los RXRs (de Lera et al., 2016). Tras la administración de ácido 9-*cis*-retinoico a ratas, se detectó en hígado ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico, junto con su conjugado de taurina (Shirley et al., 1996). Son necesarias más investigaciones para lograr elucidar tanto la función como la estructura y, en última instancia, determinar sus funciones biológicas (de Lera et al., 2016).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 9-<i>cis</i>-13,14-dihidroretinoico</b>													
Ratón	50% C57BL/6 y 50 % 129sVeMS/j	NR	3 meses	Suero	16000	390 ± 50		pmol/mL	8	118 ± 15		ng/mL	Rühl et al., 2015
Ratón	50% C57BL/6 y 50 % 129sVeMS/j	NR	4 meses	Hígado	16000	446 ± 40		pmol/g	8	135 ± 12		ng/g	Rühl et al., 2015
Ratón	50% C57BL/6 y 50 % 129sVeMS/j	NR	5 meses	Cerebro	16000	23 ± 3		pmol/g	3	7 ± 1		ng/g	Rühl et al., 2015

### APÉNDICE 11.6.3 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO TODO-*TRANS*-13,14-DIHI-DRORETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ácido todo-*trans*-13,14-dihidroretinoico se encontró en suero (56 pmol/mL), hígado (255 pmol/mL) y cerebro (13 pmol/g) de Ratón (Rühl et al., 2015). Los RARs también son activados por el ácido todo-*trans*-13,14-dihidroretinoico (de Lera et al., 2016).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido todo-<i>trans</i>-13,14-dihidroretinoico</b>													
Ratón	50% C57BL/6 y 50% 129sVeMS/j	NR	3 meses	Suero	16000	317 ± 56		pmol/mL	8	96 ± 17		ng/mL	Rühl et al., 2015
Ratón	50% C57BL/6 y 50% 129sVeMS/j	NR	4 meses	Hígado	16000	1164 ± 255		pmol/g	8	352 ± 77		ng/g	Rühl et al., 2015
Ratón	50% C57BL/6 y 50% 129sVeMS/j	NR	5 meses	Cerebro	16000	126 ± 13		pmol/g	3	38 ± 4		ng/g	Rühl et al., 2015

## APÉNDICE 11.6.4 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO 9,13-DI-CIS-RETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ácido 9,13-di-*cis*-retinoico se encontró en suero de hombres por debajo de los pmol/mL (Arnold et al., 2012), y sus concentraciones dependieron del contenido de vitamina A en la dieta, ya que concentraciones elevadas de 57 pmol/mL se encontraron tras el consumo de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg bw) (Arnhold et al., 1996). El análisis de varios órganos mostró niveles de hasta 38 pmol/g en páncreas (Kane et al., 2008b; 2010). Se considera que los receptores de retinoides no son activados por el ácido 9,13-di-*cis*-retinoico (de Lera et al., 2016).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 9,13-di-<i>cis</i>-retinoico</b>													
Humano		Hombres	18-65 años	Suero		0.4 ± 0.4		pmol/mL	20	0.12 ± 0.12		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	18-65 años	Suero	Ayuno nocturno	0.3 ± 0.1		pmol/mL	20	0.09 ± 0.03		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	NR	Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	n.d	n.d	pmol/g	10	n.d ± n.d		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres	NR	Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	57	19	pmol/g	10	17.1 ± 5.8		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Cerebro	4000	20.6 ± 2.6		pmol/g	8	6.19 ± 0.78		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Cerebelo	4000	17.6 ± 1.1		pmol/g	8	5.29 ± 0.33		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Córtex	4000	17.2 ± 1.9		pmol/g	7	5.17 ± 0.57		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Hipocampo	4000	21.1 ± 1.3		pmol/g	8	6.34 ± 0.39		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	7-12 semanas	Hígado	30000	20 ± 2.0		pmol/g	NR	6.01 ± 0.60		ng/g	Kane et al., 2010
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Bulbo olfatorio	4000	19.8 ± 2.4		pmol/g	4	5.95 ± 0.72		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Estriado	4000	25.2 ± 11.1		pmol/g	3	7.57 ± 3.33		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Tálamo	4000	22.4 ± 2		pmol/g	4	6.73 ± 0.60		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/7	Machos	7-12 semanas	Suero	30000	10 ± 1		pmol/mL	NR	3.00 ± 0.30		ng/mL	Kane et al., 2010
Ratón	C57BL/8	Machos	7-12 semanas	Pancreas	30000	38 ± 2		pmol/g	NR	11.42 ± 0.60		ng/g	Kane et al., 2010
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (epidídimo)	4000	4.5 ± 0.6		pmol/g	29	1.35 ± 0.18		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Cerebro	4000	18.2 ± 3		pmol/g	21	5.47 ± 0.90		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Riñón	4000	12.1 ± 1.6		pmol/g	20	3.64 ± 0.48		ng/g	Kane et al., 2008 b

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 9,13-di-cis-retinoico</b>													
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	23 ± 1.3		pmol/g	5	6.91 ± 0.39		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Músculo	4000	n.d ± n.d		pmol/g		n.d ± n.d		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Suero	4000	1.6 ± 0.3		pmol/mL	15	0.48 ± 0.09		ng/mL	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Bazo	4000	3.3 ± 0.4		pmol/g	9	0.99 ± 0.12		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Testículos	4000	4.3 ± 0.4		pmol/g	5	1.29 ± 0.12		ng/g	Kane et al., 2008 b



## APÉNDICE 11.6.5 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO 13-*CIS*-RETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ácido 13-*cis*-retinoico es un isómero que se encuentra en plasma a concentraciones de nanomolar. Como sucede con tantos otros retinoides, se transporta en plasma unido a albúmina, y sus niveles son dependientes de la ingesta de vitamina A. Se considera que los receptores de retinoides no son activados por el ácido 13-*cis*-retinoico (de Lera et al., 2016). Puede intercambiarse espontáneamente o mediante isomerasas en sus isómeros *todo-trans* y 9-*cis* (de Lera et al., 2016).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 13-<i>cis</i>-retinoico</b>													
Humano		Ambos	25-58 años	Suero		8.99 ± 2.33		pmol/mL	26	2.70 ± 0.70		ng/mL	Tang et al. 1990
Humano		Ambos	34-77 años	Suero		4.7 (3.7 - 5.7)		pmol/mL	17	1.41 ±		ng/mL	Soderlund et al. 2003
Humano		Ambos	31-81 años	Suero		4.8 ± 1.3		pmol/mL	80	1.44 ± 0.39		ng/mL	Wahlberg et al. 1996
Humano		Mujeres	31 años	Suero		4.49 ± 2.46		pmol/mL	502	1.35 ± 0.74		ng/mL	Siegel et al. 2004
Humano		Hombres	18-65 años	Suero		5.3 ± 5.7		pmol/mL	20	1.59 ± 1.71		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	18-65 años	Suero	Ayuno nocturno	3.9 ± 1		pmol/mL	20	1.17 ± 0.30		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	NR	Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	4	1	pmol/g	10	1.1 ± 0.2		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres	NR	Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	72	14	pmol/g	10	21.5 ± 4.3		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Cerebro (entero)	15400	1.5 ± 0.4		pmol/g	5	0.45 ± 0.12		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Cerebelo	15400	3 ± 0.8		pmol/g	4	0.90 ± 0.24		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Córtex	15400	1.8 ± 0.3		pmol/g	8	0.54 ± 0.09		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Hipocampo	15400	7.8 ± 0.8		pmol/g	8	2.34 ± 0.24		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Hembras	12 meses	Estriado	15400	8 ± 2.2		pmol/g	5	2.40 ± 0.66		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Cerebro	15400	4.2 ± 1.3		pmol/g	7	1.26 ± 0.39		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Cerebro	4000	22.2 ± 1.1		pmol/g	4	6.67 ± 0.33		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Cerebelo	4000	42.3 ± 4.8		pmol/g	4	12.71 ± 1.44		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Córtex	4000	30.3 ± 2.5		pmol/g	7	9.10 ± 0.75		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Hipocampo	4000	23.8 ± 3.1		pmol/g	8	7.15 ± 0.93		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Riñón	15400	3.1 ± 0.4		pmol/g	12	0.93 ± 0.12		ng/g	Kane et al., 2005

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 13-<i>cis</i>-retinoico</b>													
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Hígado	15400	3.6 ± 0.6		pmol/g	12	1.08 ± 0.18		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Bulbo olfatorio	4000	38.1 ± 5.6		pmol/g	4	11.45 ± 1.68		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Suero	15400	1.2 ± 0.3		pmol/mL	3	0.36 ± 0.09		ng/mL	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Estriado	4000	33.4 ± 11.2		pmol/g	3	10.03 ± 3.36		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Testículos	15400	2.9 ± 0.9		pmol/g	7	0.87 ± 0.27		ng/g	Kane et al., 2005
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Tálamo	4000	46.3 ± 1.9		pmol/g	4	13.91 ± 0.57		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (epidídimo)	4000	1.1 ± 0.2		pmol/g	7	0.33 ± 0.06		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Cerebro	4000	3 ± 0.6		pmol/g	10	0.90 ± 0.18		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Riñón	4000	5.7 ± 2.2		pmol/g	9	1.71 ± 0.66		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	6.2 ± 1		pmol/g	7	1.86 ± 0.30		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Músculo	4000	1 ± 0.1		pmol/g	7	0.30 ± 0.03		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Suero	4000	1.1 ± 0.1		pmol/mL	19	0.33 ± 0.03		ng/mL	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Bazo	4000	4.7 ± 0.2		pmol/g	8	1.41 ± 0.06		ng/g	Kane et al., 2008 b
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Testículos	4000	2.6 ± 0.6		pmol/g	6	0.78 ± 0.18		ng/g	Kane et al., 2008 b
Humano		NR	NR	Plama	NR	5.33		pmol/mL	1	1.60		ng/mL	Gundersen et al., 2007

## APÉNDICE 11.6.6 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO 9-*CIS*-RETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

La determinación de ácido 9-*cis*-retinoico en muestras biológicas es controvertida y susceptible a errores en el análisis (Kane, 2012; de Lera et al., 2016). El consumo de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.) dio lugar a concentraciones de ácido 9-*cis*-retinoico de 9 pmol/mL en suero de hombres (Arnhold et al., 1996). Kane y colaboradores (2010) encontraron niveles de 21 pmol/g en páncreas de ratones C57BL/6 machos a los que se les administró una dieta con 30,000 IU/kg de vitamina A.

El ácido 9-*cis*-retinoico es uno de los retinoides activos y uno de los productos de isomerización del ácido todo-*trans*-RA. Se une a los RARs, pero también a los RXRs con mayor afinidad, por lo que se le ha propuesto como su ligando endógeno. Sin embargo, la dificultad en la detección de este isómero en diferentes vertebrados, probablemente debido a concentraciones por debajo de los LODs, la rápida interacción con su mediador o la potencial acumulación selectiva en células (Kane, 2012), hace que su importancia biológica sea dudosa, con la excepción de aquellas ratas a las que se les administró un exceso de ácido retinoico (que parece isomerizarse en la forma 9-*cis* incrementando su concentración) y, quizás en el páncreas donde se encontró a altas concentraciones (de Lera et al., 2016).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 9-<i>cis</i>-retinoico</b>													
Humano		Mujeres	31 años	Suero		3.40	± 1.93	pmol/mL	502	1.02	± 0.58	ng/mL	Siegel et al. 2004
Ratón	C57BL/6	Machos	7-12 semanas	Hígado	30000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2010
Ratón	C57BL/6	Machos	7-12 semanas	Suero	30000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2010
Ratón	C57BL/6	Machos	7-12 semanas	Pancreas	30000	21.1	± 2.7			6.34	± 0.81		Kane et al., 2010
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Suero	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	SV130	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	SV131	Machos	2-4 meses	Riñón	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	SV132	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (epidídimo)	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	SV133	Machos	2-4 meses	Músculo	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	SV134	Machos	2-4 meses	Bazo	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	SV135	Machos	2-4 meses	Testículos	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	SV136	Machos	2-4 meses	Cerebro	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/6	Machos	4 meses	Cerebro	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/7	Machos	4 meses	Hipocampo	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/8	Machos	4 meses	Córtex	4000	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.		Kane et al., 2008 b

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 9-<i>cis</i>-retinoico</b>													
Ratón	C57BL/9	Machos	4 meses	Bulbo olfatorio	4000	n.d.	n.d			n.d	n.d		Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/10	Machos	4 meses	Tálamo	4000	n.d.	n.d			n.d	n.d		Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/11	Machos	4 meses	Cerebelo	4000	n.d.	n.d			n.d	n.d		Kane et al., 2008 b
Ratón	C57BL/12	Machos	4 meses	Estriado	4000	n.d.	n.d			n.d	n.d		Kane et al., 2008 b
Humano		Hombres	18-65 años	Suero	fed state	0.1 ± 0.1		pmol/mL	20	0.03 ± 0.03		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	18-65 años	Suero	overnight fast	0.08 ± 0.02		pmol/mL	20	0.02 ± 0.01		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	NR	Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	n.d	n.d	pmol/g	10	n.d ± n.d		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres	NR	Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	9 ± 4		pmol/g	10	2.7 ± 1.1		ng/mL	Arnhold et al., 1996

## APÉNDICE 11.6.7 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO 4-OXO-13-CIS-RETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ácido 4-oxo-13-*cis*-retinoico se encontró en suero humano a concentraciones de decenas de pmol/mL y estas dependieron del contenido de vitamina A en la dieta, puesto que se encontraron niveles de hasta 102 pmol/mL tras consumir hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg bw) (Arnhold et al., 1996).

El ácido 4-oxo-13-*cis*-retinoico es un metabolito de oxidación de fase I desde el ácido 13-*cis*-retinoico. El ácido 4-oxo-13-*cis*-retinoico parece unirse al RAR con la misma afinidad que el RA (Idres et al., 2002; Van Heusden et al., 1998; Ramp et al., 1994), pero la limitada información disponible acerca de su concentración en tejidos humanos hace difícil asignarle una función biológica endógena.

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 4-oxo-13-<i>cis</i>-retinoico</b>													
Humano	NA	Ambos	34-77 años	Suero		9.8 (7.7 - 12)		pmol/mL	17			ng/mL	Soderlund et al. 2003
Humano		Hombres	18-65 años	Suero		17.8 ± 31		pmol/mL	20	5.60 ± 9.75		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres	18-65 años	Suero	Ayuno nocturno	12.2 ± 7.2		pmol/mL	20	3.84 ± 2.26		ng/mL	Arnold et al., 2012
Humano		Hombres		Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	8 ± 2		pmol/g	10	2.4 ± 0.6		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres		Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	102 ± 16		pmol/g	10	32.1 ± 4.9		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		NR	NR	Plama	NR	11.1		pmol/mL	1	3.50		ng/mL	Gundersen et al., 2007

### APÉNDICE 11.6.8 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO TODO-*TRANS*-4-OXO-RETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ácido todo-*trans*-4-oxo-retinoico se encontró a niveles de 2 y 3 pmol/g en suero de hombres antes y después del consumo de hígado de pavo frito, respectivamente, y a 13 fmol/mL en una muestra de suero humano.

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido todo-<i>trans</i>-4-oxo-retinoico</b>													
Humano		Hombres		Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	2 ± 1		pmol/g	3	0.6 ± 0.3		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres		Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	3 ± 1		pmol/g	10	0.8 ± 0.2		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		NR	NR	Plama	NR	12.7		fmol/mL	1	4.00		pg/mL	Gundersen et al., 2007

## APÉNDICE 11.6.9 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO 9-*CIS*-4-OXO-13,14-DIHI-DRORETINOICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidroretinoico se encontró principalmente en hígado (10-370 pmol/g hígado), pero también en riñón y suero a concentraciones más bajas, directamente dependientes del contenido de vitamina A en la dieta así como de la edad del animal.

El ácido 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihidroretinoico es un metabolito del ácido 9-*cis*-retinoico sustituido con concentraciones hepáticas particularmente altas, que es capaz de activar el RAR, aunque con menor potencia en comparación con el ácido todo-*trans*-retinoico (Schuchardt et al., 2009).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 9-<i>cis</i>-4-oxo-13,14-dihidroretinoico</b>													
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	45000	5.03 ± 1.86		pmol/g	6	1.59 ± 0.59		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	150000	9.13 ± 2.37		pmol/g	6	2.89 ± 0.75		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Hígado	15000	36.03 ± 6.32		pmol/g	6	11.4 ± 2		ng/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	15000	36.03 ± 6.32		pmol/g	6	11.40 ± 2.00		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	45000	194.06 ± 36.66		pmol/g	6	61.40 ± 11.60		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	150000	369.79 ± 91.66		pmol/g	5	117.00 ± 29.00		ng/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	15000	1.90 ± 0.16		pmol/mL	2	0.60 ± 0.05		ng/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	45000	10.43 ± 4.11		pmol/mL	3	3.30 ± 1.30		ng/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	150000	20.83 ± 2.53		pmol/mL	3	6.59 ± 0.80		ng/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Suero/plasma	15000	1.90 ± 0.16		pmol/mL	2	0.6 ± 0.05		ng/mL	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	106 ± 44		pmol/g	≥8	33.5 ± 13.9		ng/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Hembras	12 semanas	Hígado	18800	93 ± 17		pmol/g	5	29.43 ± 5.38		ng/g	Van der Ven et al., 2008a
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	116 ± 20		pmol/g	5	36.70 ± 6.33		ng/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	246 ± 40		pmol/g	5	77.83 ± 12.66		ng/g	Van der Ven et al., 2008b
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Suero	12000	1.25 ± 0.53		pmol/mL	≥6	0.40 ± 0.17		ng/mL	Fletcher et al., 2005

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ácido 9-cis-4-oxo-13,14-dihidroretinoico</b>													
Rata	Han/Wistar	Machos	12 semanas	Hígado	18800	34 ± 7		pmol/g	5	10.76 ± 2.21		ng/g	Van der Ven et al., 2008a
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	44 ± 10		pmol/g	5	13.92 ± 3.16		ng/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	75 ± 13		pmol/g	5	23.73 ± 4.11		ng/g	Van der Ven et al., 2008b
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	70 ± 18		pmol/g	≥8	22.1 ± 5.7		ng/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Suero	12000	0.96 ± 0.29		pmol/mL	≥6	0.31 ± 0.09		ng/mL	Fletcher et al., 2005
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	35 días	Hígado	Canadian cookies	15 ± 5		pmol/g	5	4.75 ± 1.58		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	77 días	Hígado	Canadian cookies	30 ± 7		pmol/g	5	9.49 ± 2.21		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	350 días	Hígado	Canadian cookies	46 ± 12		pmol/g	5	14.55 ± 3.80		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	Madres PND30	Hígado	Canadian cookies	35 ± 5		pmol/g	5	11.07 ± 1.58		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	10 semanas	Hígado	12000	97 ± 20		pmol/g	5	30.69 ± 6.33		ng/g	Viluksela et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Hígado	6000	12.45 ± 1.90		pmol/g	6	3.94 ± 0.6		ng/g	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Hígado	6000	12.33 ± 1.90		pmol/g	6	3.9 ± 0.6		ng/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Hígado	6000	10.75 ± 1.58		pmol/g	6	3.4 ± 0.5		ng/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Hígado	6000	10.43 ± 0.85		pmol/g	6	3.3 ± 0.27		ng/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Hígado	6000	14.85 ± 4.11		pmol/g	6	4.7 ± 1.3		ng/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	35 días	Hígado	Canadian cookies	12 ± 5		pmol/g	5	3.80 ± 1.58		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	77 días	Hígado	Canadian cookies	16 ± 7		pmol/g	5	5.06 ± 2.21		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	350 días	Hígado	Canadian cookies	33 ± 4		pmol/g	5	10.44 ± 1.27		ng/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	10 semanas	Hígado	12000	23 ± 11		pmol/g	5	7.28 ± 3.48		ng/g	Viluksela et al., 2014

## APÉNDICE 11.6.10 CONCENTRACIÓN DE RETINAL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El retinal se encontró en riñón, hígado, testículos, tejido adiposo y suero de ratones SV129.

El retinal juega un papel crucial como pigmento visual. Es la forma oxidada del retinol y, junto con la opsina, forma rodopsina, donde los isómeros *trans* sufren isomerización en presencia de luz hacia el isómero *cis*, volviendo a su configuración nativa en ausencia de luz (Kiser et al., 2014).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Retinal</b>													
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (blanco)	4000	63.5 ± 5.2		pmol/g	12	18.06 ± 1.48		ng/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Riñón	4000	187.3 ± 31.2		pmol/g	12	53.28 ± 8.87		ng/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	160.9 ± 14.3		pmol/g	26	45.77 ± 4.07		ng/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Suero	4000	32.2 ± 6.2		pmol/mL	6	9.16 ± 1.76		ng/mL	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Testículos	4000	90.7 ± 10.1		pmol/g	12	25.80 ± 2.87		ng/g	Kane et al., 2008 a

## APÉNDICE 11.6.11 CONCENTRACION DE RETINOL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

En humanos, los niveles de retinol se encuentran a nivel de  $\mu\text{M}$  (nmol/mL). En tejidos, los niveles de retinol se encuentran a nmol/g de varios órganos, como hígado, riñón y cerebro entre otros.

Como principal retinoide en circulación y precursor de retinoides activos, juega un papel esencial. El retinol o sus precursores, pueden ser adquiridos a través del consumo de verduras (caroteno), hígado, yema de huevo y el componente graso de productos lácteos. Los niveles de retinol en sangre están estrechamente regulados, por lo que sólo se observan niveles reducidos en casos de malnutrición. De hecho, la prevalencia en la población de bajos niveles de retinol en suero (0.70  $\mu\text{mol/l}$  o menos), puede usarse para evaluar la severidad de la deficiencia en vitamina A (WHO UNEP, 2011).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Retinol</b>													
Humano		Ambos	19-41 años	Suero		1.78 ± 0.76		nmol/mL	6	0.51 ± 0.22		$\mu\text{g/mL}$	Mihaly et al. 2011
Humano		Ambos	21-48 años	Suero		2.63 ± 1.29		nmol/mL	28	0.75 ± 0.37		$\mu\text{g/mL}$	Soares-Mota et al. 2015
Humano		Ambos	27-62 años	Suero		2.56 ± 1.18		nmol/mL	27	0.73 ± 0.34		$\mu\text{g/mL}$	Moulas et al. 2006
Humano		Ambos	47 años	Suero		0.90		nmol/mL	50	0.26		$\mu\text{g/mL}$	Ukleja et al. 2002
Humano		Ambos	41-56 años	Suero	Vit A	2.1 (1.8 - 2.4)		nmol/mL	50	0.60		$\mu\text{g/mL}$	Caram et al. 2015
Humano		Ambos	34-77 años	Suero		2.2 (1.9 - 2.5)		nmol/mL	17	0.63		$\mu\text{g/mL}$	Soderlund et al. 2003
Humano		Ambos	53-73 años	Suero	Vit A	2.35 ± 0.78		nmol/mL	93	0.67 ± 0.22		$\mu\text{g/mL}$	Sögüt et al. 2015
Humano		Ambos	65-79 años	Suero		2.93 ± 1.04		nmol/mL	1418	0.84 ± 0.30		$\mu\text{g/mL}$	Holvik et al. 2015
Humano		Hombres	7-17 años	Suero		1.44 ± 0.68		nmol/mL	1770	0.41 ± 0.19		$\mu\text{g/mL}$	Yang et al. 2015
Humano		Hombres	21-22 años	Suero	Vit A	2.34 ± 0.14		nmol/mL	10	0.67 ± 0.04		$\mu\text{g/mL}$	Wiecek et al. 2015
Humano		Hombres	35-45 años	Suero		2.22 ± 0.51		nmol/mL	137	0.64 ± 0.15		$\mu\text{g/mL}$	Faure et al. 2006
Humano		Hombres	45-50 años	Suero		2.34 ± 0.58		nmol/mL	1378	0.67 ± 0.17		$\mu\text{g/mL}$	Faure et al. 2006
Humano		Hombres	49-51 años	Suero		2.27 ± 0.06		nmol/mL	407	0.65 ± 0.02		$\mu\text{g/mL}$	Michaëlsson et al. 2003
Humano		Hombres	50-60 años	Suero		2.33 ± 0.58		nmol/mL	1914	0.67 ± 0.17		$\mu\text{g/mL}$	Faure et al. 2006

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Retinol</b>													
Humano		Hombres	>60 años	Suero		2.40 ± 0.6		nmol/mL	158	0.69 ± 0.17		µg/mL	Faure et al. 2006
Humano		Hombres	55->70 años	Suero		0.023 (0.023 - 0.024)		nmol/mL	1809	0.01			Nash et al. 2015
Humano		Hombres	65-75 años	Suero		3.06		nmol/mL	414	0.88		µg/mL	Holvik et al. 2015
Humano		Mujeres	7-17 años	Suero		1.44 ± 0.66		nmol/mL	1687	0.41 ± 0.19		µg/mL	Yang et al. 2015
Humano		Mujeres	21-22 años	Suero	Vit A	1.95 ± 0.14		nmol/mL	10	0.56 ± 0.04		µg/mL	Wiecek et al. 2015
Humano		Mujeres	19-35 años	Suero		1.33 ± 0.28		nmol/mL	254	0.38 ± 0.08		µg/mL	Mumford et al. 2016
Humano		Mujeres	31 años	Suero		1.62 ± 0.59		nmol/mL	502	0.47 ± 0.17		µg/mL	Siegel et al. 2004
Humano		Mujeres	35-45 años	Suero		1.88 ± 0.53		nmol/mL	2155	0.54 ± 0.15		µg/mL	Faure et al. 2006
Humano		Mujeres	45-50 años	Suero		1.96 ± 0.50		nmol/mL	1494	0.56 ± 0.14		µg/mL	Faure et al. 2006
Humano		Mujeres	41-59 años	Suero		1.76 (1.73 - 1.78)		nmol/mL	1480	0.50		µg/mL	Bakker et al. 2016
Humano		Mujeres	50-60 años	Suero		2 ± 0.51		nmol/mL	1637	0.57 ± 0.15		µg/mL	Faure et al. 2006
Humano		Mujeres	>60 años	Suero		2.06 ± 0.48		nmol/mL	127	0.59 ± 0.14		µg/mL	Faure et al. 2006
Humano		Mujeres	57-71 años	Suero	Vit A	2.02 ± 0.07		nmol/mL	533	0.58 ± 0.02		µg/mL	Opotowsky et al. 2004
Humano		Mujeres	68-77 años	Suero		2.87 ± NA		nmol/mL	1004	0.82	NA	µg/mL	Holvik et al. 2015
Humano		Mujeres	79 años	Suero		2 (1.96 - 2.05)		nmol/mL	934	0.57		µg/mL	Barker et al. 2005
Humano		Hombres	NR	Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	2238 ± 346		nmol/mL	10	641 ± 99		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres	NR	Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	2793 ± 367		nmol/mL	10	800 ± 105		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Cerebro	4000	0.68 ± 0.23		nmol/g	19	0.19 ± 0.066		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Cerebelo	4000	0.42 ± 0.08		nmol/g	8	0.12 ± 0.023		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Córtex	4000	0.08 ± 0.01		nmol/g	18	0.02 ± 0.003		µg/g	Kane et al., 2008 a

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Retinol</b>													
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Hipocampo	4000	0.3 ± 0.03		nmol/g	27	0.09 ± 0.009		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Bulbo olfatorio	4000	0.2 ± 0.02		nmol/g	4	0.06 ± 0.006		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Suero	4000	0.9 ± 0.11		nmol/mL	13	0.26 ± 0.032		µg/mL	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Estriado	4000	0.21 ± 0.05		nmol/g	4	0.06 ± 0.014		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Tálamo	4000	0.2 ± 0.04		nmol/g	4	0.06 ± 0.011		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/7	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	20.7 ± 2.9		nmol/g	18	5.93 ± 0.831		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/8	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (blanco)	4000	1.8 ± 0.3		nmol/g	4	0.52 ± 0.086		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	NMRI	Hembras	Adultas	Cerebro	15000	2.27 ± 1.54		nmol/g	5	0.65 ± 0.44		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	15000	2.27 ± 1.54		nmol/g	5	0.65 ± 0.44		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	45000	2.06 ± 1.68		nmol/g	6	0.59 ± 0.48		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	150000	2.83 ± 1.47		nmol/g	5	0.81 ± 0.42		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Riñón	15000	1.43 ± 0.14		nmol/g	6	0.41 ± 0.04		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	15000	1.43 ± 0.14		nmol/g	6	0.41 ± 0.04		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	45000	2.16 ± 0.49		nmol/g	6	0.62 ± 0.14		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	150000	2.76 ± 0.45		nmol/g	6	0.79 ± 0.13		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Hígado	15000	38.40 ± 4.54		nmol/g	6	11 ± 1.3		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	15000	38.40 ± 4.54		nmol/g	6	11.00 ± 1.30		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	45000	82.39 ± 61.44		nmol/g	6	23.60 ± 17.60		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	150000	129.52 ± 61.44		nmol/g	5	37.10 ± 17.60		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	15000	0.59 ± 0.03		nmol/mL	3	0.17 ± 0.01		µg/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	45000	0.66 ± 0.14		nmol/mL	3	0.19 ± 0.04		µg/mL	Schmidt et al., 2002

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Retinol</b>													
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	150000	0.87 ± 0.10		nmol/mL	3	0.25 ± 0.03		µg/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Suero/plasma	15000	0.59 ± 0.03		nmol/mL	3	0.17 ± 0.01		µg/mL	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (marrón)	4000	0.64 ± 0.21		nmol/g	5	0.18 ± 0.060		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (blanco)	4000	0.63 ± 0.03		nmol/g	37	0.18 ± 0.009		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Riñón	4000	0.6 ± 0.04		nmol/g	37	0.17 ± 0.011		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	9.6 ± 0.9		nmol/g	60	2.75 ± 0.258		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Músculo	4000	0.15 ± 0.02		nmol/g	38	0.04 ± 0.006		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Suero	4000	0.81 ± 0.04		nmol/mL	70	0.23 ± 0.011		µg/mL	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Piel	4000	0.32 ± 0.01		nmol/g	5	0.09 ± 0.003		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Bazo	4000	0.6 ± 0.06		nmol/g	26	0.17 ± 0.017		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Testículos	4000	0.08 ± 0.01		nmol/g	27	0.02 ± 0.003		µg/g	Kane et al., 2008 a
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Riñón	12000	2.47 ± 0.29		nmol/g	≥6	0.71 ± 0.08		µg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	328 ± 73		nmol/g	≥8	94.0 ± 20.9		µg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Hembras	12 semanas	Hígado	18800	22 ± 6		pmol/g	5	6.30 ± 1.72		ng/g	Van der Ven et al., 2008a
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	19 ± 3		pmol/g	5	5.44 ± 0.86		ng/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	18 ± 3		pmol/g	5	5.16 ± 0.86		ng/g	Van der Ven et al., 2008b
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Suero	12000	0.59 ± 0.10		nmol/mL	≥6	0.17 ± 0.03		µg/mL	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Machos	12 semanas	Hígado	18800	14 ± 1		pmol/g	5	4.01 ± 0.29		ng/g	Van der Ven et al., 2008a
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	19 ± 4		pmol/g	5	5.44 ± 1.15		ng/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	13 ± 1		pmol/g	5	3.72 ± 0.29		ng/g	Van der Ven et al., 2008b
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Riñón	12000	1.40 ± 0.17		nmol/g	≥6	0.40 ± 0.05		µg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	300 ± 80		nmol/g	≥8	85.9 ± 22.9		µg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Suero	12000	0.67 ± 0.10		nmol/mL	≥6	0.19 ± 0.03		µg/mL	Fletcher et al., 2005

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Retinol</b>													
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	35 días	Riñón	Canadian cookies	3.9 ± 0.9		nmol/g	9-20	1.12 ± 0.26		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	77 días	Riñón	Canadian cookies	2.8 ± 0.3		nmol/g	9-21	0.80 ± 0.09		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	350 días	Riñón	Canadian cookies	2.2 ± 0.4		nmol/g	9-22	0.63 ± 0.11		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	Madres PND30	Riñón	Canadian cookies	3.8 ± 0.6		nmol/g	9-23	1.09 ± 0.17		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	35 días	Hígado	Canadian cookies	13 ± 3		nmol/g	9-13	3.72 ± 0.86		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	77 días	Hígado	Canadian cookies	18 ± 4		nmol/g	9-14	5.16 ± 1.15		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	350 días	Hígado	Canadian cookies	96 ± 66		nmol/g	9-15	27.50 ± 18.91		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	Madres PND30	Hígado	Canadian cookies	30 ± 4		nmol/g	9-16	8.59 ± 1.15		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	10 semanas	Hígado	12000	40 ± 5		pmol/g	5	11.46 ± 1.43		ng/g	Viluksela et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Riñón	6000	43.64 ± 4.54		nmol/g	6	12.5 ± 1.3		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Riñón	6000	43.64 ± 4.54		nmol/g	6	12.5 ± 1.3		µg/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Riñón	6000	41.54 ± 4.19		nmol/g	6	11.9 ± 1.2		µg/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Riñón	6000	41.19 ± 4.54		nmol/g	6	11.8 ± 1.3		µg/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Riñón	6000	43.29 ± 5.24		nmol/g	6	12.4 ± 1.5		µg/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	35 días	Riñón	Canadian cookies	4.4 ± 1.1		nmol/g	9-24	1.26 ± 0.32		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	77 días	Riñón	Canadian cookies	4.9 ± 1.1		nmol/g	9-25	1.40 ± 0.32		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	350 días	Riñón	Canadian cookies	3.3 ± 0.9		nmol/g	9-26	0.95 ± 0.26		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Hígado	6000	5.66 ± 0.56		nmol/g	6	1.62 ± 0.16		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Hígado	6000	5.66 ± 0.56		nmol/g	6	1.62 ± 0.16		µg/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Hígado	6000	6.35 ± 0.28		nmol/g	6	1.82 ± 0.08		µg/g	Schmidt et al., 2003 b

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Retinol</b>													
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Hígado	6000	7.02 ± 0.49		nmol/g	6	2.01 ± 0.14		µg/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Hígado	6000	13.79 ± 1.26		nmol/g	6	3.95 ± 0.36		µg/g	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	35 días	Hígado	Canadian cookies	12 ± 2		nmol/g	9-17	3.44 ± 0.57		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	77 días	Hígado	Canadian cookies	13 ± 3		nmol/g	9-18	3.72 ± 0.86		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	350 días	Hígado	Canadian cookies	59 ± 17		nmol/g	9-19	16.90 ± 4.87		µg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	10 semanas	Hígado	12000 IU/kg	23 ± 2		pmol/g	5	6.59 ± 0.57		ng/g	Viluksela et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Suero	6000	1.82 ± 0.24		nmol/mL	6	0.52 ± 0.07		µg/mL	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Suero	6000	1.78 ± 0.21		nmol/mL	6	0.51 ± 0.06		µg/mL	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Suero	6000	1.99 ± 0.17		nmol/mL	6	0.57 ± 0.05		µg/mL	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Suero	6000	1.68 ± 0.21		nmol/mL	6	0.48 ± 0.06		µg/mL	Schmidt et al., 2003 b
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Suero/plasma	6000	1.82 ± 0.24		nmol/mL	6	0.52 ± 0.07		µg/mL	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Testículos	4000	0.31 ± 0.10		nmol/g	6	0.09 ± 0.03		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Wistar	NR	3 días	Hígado	Altromn 1324 diet	12 ± 0		pmol/g	2	1298 ± 575		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	11 días	Hígado	Altromn 1324 diet	166 ± 78		pmol/g	3	5274 ± 767		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	Adultas	Hígado	Altromn 1324 diet	799 ± 370		pmol/g	4	16005 ± 4171		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	3 días	Suero	Altromn 1324 diet	4531 ± 2007		nmol/mL	3	3.3		ng/mL	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	11 días	Suero	Altromn 1324 diet	18412 ± 2678		nmol/mL	3	47.5 ± 22.3		ng/mL	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	Adultas	Suero	Altromn 1324 diet	55874 ± 14561		nmol/mL	4	229 ± 106		ng/mL	Rühl et al., 2005
Humano		NR	NR	Plama	NR	1983		pmol/mL	1	568		ng/mL	Gundersen et al., 2007

## APÉNDICE 11.6.12 CONCENTRACIÓN DE 4-OH-RETINOL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El 4-hidroxi-retinol es un metabolito del retinol *in vivo* e *in vitro*, que se encuentra tanto en hígado como en suero de ratas en los días 3 y 11 tras el nacimiento, pero no en la fase adulta de esos mismos animales (Rühl et al., 2005). El 4-hidroxi-retinol se ha mostrado como un activador alternativo del RAR, pero no del RXR, en células madre embrionarias y durante procesos del desarrollo (Lane et al., 1999; Achkar et al., 1996).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>4-hidroxi-retinol</b>													
Rata	Wistar	NR	3 días	Hígado	Altromn 1324 diet	2810 ± 1233		pmol/g	2	850 ± 373		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	11 días	Hígado	Altromn 1324 diet	344 ± 20		pmol/g	3	104 ± 6		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	Adultas	Hígado	Altromn 1324 diet	n.d ± n.d		pmol/g	4	n.d ± n.d		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	3 días	Suero	Altromn 1324 diet	124 ± NR		nmol/mL	3	37.4 ± NR		ng/mL	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	11 días	Suero	Altromn 1324 diet	138 ± 9		nmol/mL	3	41.8 ± 2.8		ng/mL	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	Adultas	Suero	Altromn 1324 diet	n.d ± n.d		nmol/mL	4	n.d ± n.d		ng/mL	Rühl et al., 2005

### APÉNDICE 11.6.13 CONCENTRACIÓN DE 14-HIDROXI-RETRO-RETINOL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El 14-hidroxi-retro-retinol se encontró en suero de hombres y sus niveles incrementaron tras el consumo de hígado de pavo frito (Arnhold et al., 1996). También se encontró tanto en hígado como en suero de ratas en los días 3 y 11 tras el nacimiento, pero no en la fase adulta de esos mismos animales (Rühl et al., 2005). Se relaciona con la ontogénesis del sistema inmune, debido a su papel en la proliferación de linfocitos (O'Connell et al., 1996).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>14-hidroxi-retro-retinol</b>													
Rata	Wistar	NR	3 días	Hígado	Altromn 1324 diet	579 ± 284.3		pmol/g	2	175 ± 86		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	11 días	Hígado	Altromn 1324 diet	942 ± 17		pmol/g	3	285 ± 5		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	Adultas	Hígado	Altromn 1324 diet	n.d ± n.d		pmol/g	4	n.d ± n.d		ng/g	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	3 días	Suero	Altromn 1324 diet	94 ± NR		pmol/mL	3	28.5 ± NR		ng/mL	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	11 días	Suero	Altromn 1324 diet	76 ± 15		pmol/mL	3	23 ± 4.6		ng/mL	Rühl et al., 2005
Rata	Wistar	NR	Adultas	Suero	Altromn 1324 diet	n.d ± n.d		pmol/mL	4	n.d ± n.d		ng/mL	Rühl et al., 2005
Humano		Hombres		Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	4 ± 1		pmol/g	3	1.3 ± 0.2		ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres		Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	12 ± 3		pmol/g	10	3.7 ± 0.9		ng/mL	Arnhold et al., 1996

#### APÉNDICE 11.6.14 CONCENTRACIÓN DE 9-CIS-RETINOL EN MUESRTAS BIOLÓGICAS

El 9-*cis*-retinol se encontró en hígado (0.25 nmol/g), tejido adiposo blanco (0.18 nmol/g) y suero (30 pmol/mL) de ratones C57BL/6 macho (Kane et al., 2008a).

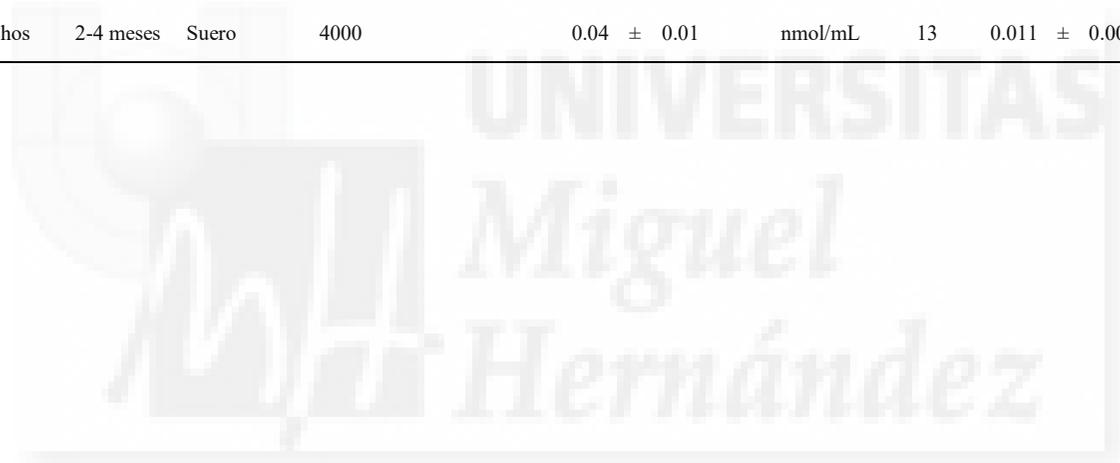
ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>9-<i>cis</i>-retinol</b>													
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (blanco)	4000	0.18 ± 0.01		nmol/g	4	0.052 ± 0.003		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	0.25 ± 0.01		nmol/g	18	0.072 ± 0.003		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Suero	4000	0.03 ± 0.01		nmol/mL	13	0.009 ± 0.003		µg/mL	Kane et al., 2008 a



### APÉNDICE 11.6.15 CONCENTRACIÓN DE 13-*CIS*-RETINOL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El 13-*cis*-retinol se encontró en hígado (0.3 nmol/g), tejido adiposo blanco (80 pmol/g) y suero (40 pmol/mL) de ratones C57BL/6 macho (Kane et al., 2008a).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>13-<i>cis</i>-retinol</b>													
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (blanco)	4000	0.08 ± 0.01		nmol/g	4	0.023 ± 0.003		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	0.3 ± 0.04		nmol/g	18	0.086 ± 0.011		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Suero	4000	0.04 ± 0.01		nmol/mL	13	0.011 ± 0.003		µg/mL	Kane et al., 2008 a



## APÉNDICE 11.6.16 CONCENTRACIÓN DE PALMITATO DE RETINILO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

El palmitato de retinilo, entre otros ésteres de retinilo, es el retinoide de almacenamiento predominante en las células estrelladas del hígado. Los niveles de palmitato de retinilo en el hígado son mayores que en otros tejidos y se encontró en el rango de los nmol/g a los  $\mu\text{mol/g}$ . La cantidad de vitamina A en la dieta está directamente relacionada con las concentraciones hepáticas de ésteres de retinilo. En caso de suficiente ingesta de vitamina A, las concentraciones de ésteres de retinilo se ven incrementadas con la edad del organismo.

Los ésteres de retinilo se encuentran en la dieta y son considerados como los precursores para la biosíntesis de retinoides funcionales. Se convierten en retinol, la forma móvil, por medio de hidrolasas de ésteres de retinilo, y se transforman de nuevo en formas de almacenamiento mediante la lecitina-retinol aciltransferasa (Novák et al., 2008; Theodosiou et al., 2010; Shmarakov et al., 2015).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Palmitato de retinilo</b>													
Humano	NA	Ambos	27-62 años	Suero		0.03	± 0.03	nmol/mL	27	0.02	± 0.02	ng/mL	Moulas et al. 2006
Humano		Hombres	NR	Suero	Antes de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	61	36	pmol/mL	9	32.2	± 19.1	ng/mL	Arnhold et al., 1996
Humano		Hombres	NR	Suero	Después de hígado de pavo frito (2 g peso crudo/Kg p.c.)	6745	3308	pmol/mL	9	3540	± 1736	ng/mL	Arnhold et al., 1996
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	2.37	± 0.3	$\mu\text{mol/g}$	≥8	1.2	± 0.2	mg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Hígado	12000	3	± 0.2	$\mu\text{mol/g}$	≥8	1.6	± 0.1	mg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	35 días	Hígado	Canadian cookies	0.36	± 0.04	$\mu\text{mol/g}$	9-13	0.19	± 0.02	mg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	77 días	Hígado	Canadian cookies	1.4	± 0.2	$\mu\text{mol/g}$	9-14	0.73	± 0.10	mg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	350 días	Hígado	Canadian cookies	5.4	± 0.9	$\mu\text{mol/g}$	9-15	2.83	± 0.47	mg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	Madres PND30	Hígado	Canadian cookies	2.9	± 0.3	$\mu\text{mol/g}$	9-16	1.52	± 0.16	mg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	35 días	Hígado	Canadian cookies	0.32	± 0.04	$\mu\text{mol/g}$	9-17	0.17	± 0.02	mg/g	Esteban et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	77 días	Hígado	Canadian cookies	1	± 0.1	$\mu\text{mol/g}$	9-18	0.52	± 0.05	mg/g	Esteban et al., 2014

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Palmitato de retinilo</b>													
Rata	Sprague-Dawley	Machos	350 días	Hígado	Canadian cookies	4.2 ± 0.6		μmol/g	9-19	2.20 ± 0.31		mg/g	Esteban et al., 2014



## APÉNDICE 11.6.17 CONCENTRACIÓN DE ÉSTERES DE RETINOLO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ésteres de retinilo</b>													
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Cerebro	4000	0.84 ± 0.16		nmol/g	19	0.44 ± 0.08		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Cerebelo	4000	0.73 ± 0.1		nmol/g	8	0.38 ± 0.05		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Córtex	4000	0.35 ± 0.04		nmol/g	18	0.18 ± 0.02		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Hipocampo	4000	0.7 ± 0.05		nmol/g	27	0.37 ± 0.03		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Bulbo olfatorio	4000	0.63 ± 0.03		nmol/g	4	0.33 ± 0.02		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Estriado	4000	0.41 ± 0.08		nmol/g	4	0.22 ± 0.04		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	C57BL/6	Machos	2-4 meses	Tálamo	4000	0.47 ± 0.06		nmol/g	4	0.25 ± 0.03		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Cerebro	15000	0.52 ± 0.3		noml/g	5	0.27 ± 0.16		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	15000	0.52 ± 0.30		nmol/g	5	0.27 ± 0.16		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	45000	0.51 ± 0.40		nmol/g	6	0.27 ± 0.21		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Cerebro	150000	0.44 ± 0.22		nmol/g	5	0.23 ± 0.12		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Riñón	15000	0.8 ± 0.17		noml/g	6	0.42 ± 0.09		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	15000	0.80 ± 0.17		nmol/g	6	0.42 ± 0.09		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	45000	1.80 ± 0.63		nmol/g	6	0.94 ± 0.33		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Riñón	150000	2.37 ± 0.83		nmol/g	6	1.24 ± 0.44		µg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Hígado	15000	4.19 ± 0.53		µmol/g	6	2.20 ± 0.28		mg/g	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	15000	4 ± 1		µmol/g	6	2.20 ± 0.28		mg/g	Schmidt et al., 2002

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ésteres de retinilo</b>													
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	45000	8 ± 1		µmol/g	6	4.06 ± 0.76		mg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Hígado	150000	17 ± 2		µmol/g	5	8.82 ± 1.00		mg/g	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	15000	0.35 ± 0.14		nmol/mL	3	0.18 ± 0.07		µg/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	45000	0.96 ± 0.19		nmol/mL	3	0.50 ± 0.10		µg/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	+ 15 días	Suero	150000	1.39 ± 0.25		nmol/mL	3	0.73 ± 0.13		µg/mL	Schmidt et al., 2002
Ratón	NMRI	Hembras	Adultos	Suero/plasma	15000	352 ± 142		pmol/mL	3	185 ± 75		ng/mL	Schmidt et al., 2003 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (marrón)	4000	0.99 ± 0.21		nmol/g	5	0.52 ± 0.11		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Tejido adiposo (blanco)	4000	0.59 ± 0.09		nmol/g	29	0.31 ± 0.05		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Riñón	4000	1.8 ± 0.2		nmol/g	37	0.94 ± 0.10		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Hígado	4000	562.6 ± 75.9		nmol/g	55	295 ± 40		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Músculo	4000	0.25 ± 0.03		nmol/g	31	0.13 ± 0.02		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Suero	4000	0.22 ± 0.02		nmol/mL	69	0.12 ± 0.01		µg/mL	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Piel	4000	0.22 ± 0.02		nmol/g	5	0.12 ± 0.01		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Bazo	4000	1.2 ± 0.1		nmol/g	26	0.63 ± 0.05		µg/g	Kane et al., 2008 a
Ratón	SV129	Machos	2-4 meses	Testículos	4000	0.31 ± 0.02		nmol/g	27	0.16 ± 0.01		µg/g	Kane et al., 2008 a
Rata	Han/Wistar	Hembras	12 semanas	Hígado	18800	1.7 ± 0.1		µmol/g	5	0.89 ± 0.05		mg/g	Van der Ven et al., 2008a
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	1.7 ± 0.3		µmol/g	5	0.89 ± 0.16		mg/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Hembras	15 semanas	Hígado	18800	1.5 ± 0.2		µmol/g	5	0.79 ± 0.10		mg/g	Van der Ven et al., 2008b

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ésteres de retinilo</b>													
Rata	Han/Wistar	Hembras	25 semanas	Suero	12000	0.25 ± 0.13		nmol/mL	≥6	0.13 ± 0.07		µg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Han/Wistar	Machos	12 semanas	Hígado	18800	1 ± 0.1		µmol/g	5	0.52 ± 0.05		mg/g	Van der Ven et al., 2008a
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	1.3 ± 0.1		µmol/g	5	0.68 ± 0.05		mg/g	Van der Ven et al., 2006
Rata	Han/Wistar	Machos	15 semanas	Hígado	18800	1.2 ± 0.1		µmol/g	5	0.63 ± 0.05		mg/g	Van der Ven et al., 2008b
Rata	Long/Evans	Hembras	25 semanas	Suero	12000	0.14 ± 0.04		nmol/mL	≥6	0.07 ± 0.02		µg/g	Fletcher et al., 2005
Rata	Sprague-Dawley	Hembras	10 semanas	Hígado	12000	1.3 ± 0.2		µmol/g	5	0.68 ± 0.10		mg/g	Viluksela et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Riñón	6000	37.4 ± 13.5		nmol/g	6	19.63 ± 7.09		µg/g	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Riñón	6000	37.5 ± 14.8		nmol/g	6	19.68 ± 7.77		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Riñón	6000	38.5 ± 12.5		nmol/g	6	20.21 ± 6.56		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Riñón	6000	39.5 ± 7.45		nmol/g	6	20.73 ± 3.91		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Riñón	6000	32.9 ± 14.6		nmol/g	6	17.27 ± 7.66		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Hígado	6000	0.22 ± 0.02		µmol/g	6	0.12 ± 0.01		mg/g	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Hígado	6000	217 ± 17		nmol/g	6	114 ± 8.92		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Hígado	6000	209 ± 20		nmol/g	6	109.7 ± 10.50		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Hígado	6000	196 ± 17		nmol/g	6	102.87 ± 8.92		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Hígado	6000	336 ± 43		nmol/g	6	176.35 ± 22.57		µg/g	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	10 semanas	Hígado	12000	1 ± 0.1		µmol/g	5	0.52 ± 0.05		mg/g	Viluksela et al., 2014
Rata	Sprague-Dawley	Machos	28 días	Suero	6000	69.1 ± 9.34		pmol/ml	6	36.27 ± 4.90		ng/mL	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	29 días	Suero	6000	77.3 ± 47.3		pmol/ml	6	40.57 ± 24.83		ng/mL	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	31 días	Suero	6000	63 ± 11.9		pmol/ml	6	33.07 ± 6.25		ng/mL	Hoegberg et al., 2003
Rata	Sprague-Dawley	Machos	56 días	Suero	6000	82 ± 18.3		pmol/ml	6	43.04 ± 9.60		ng/mL	Hoegberg et al., 2003

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Ésteres de retinilo</b>													
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Suero/plasma	6000	69.1 ± 8.5		pmol/mL	6	36.27 ± 4.46		ng/mL	Schmidt et al., 2003 a
Rata	Sprague-Dawley	Machos	Adultas	Testículos	4000	0.81 ± 0.13		noml/g	6	0.43 ± 0.07		µg/g	Schmidt et al., 2003 a



## APÉNDICE 11.6.18 CONCENTRACIÓN DE 4-OXO-TODO-*TRANS*-RETINOIL- $\beta$ -GLUCURONIDO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tanto el 4-oxo-todo-*trans* como el 4-oxo-13-*cis* retinoil- $\beta$ -glucurónido se encontraron en orina de ratas CD macho como resultado de la biotransformación y excreción. 4-oxo-todo-*trans*-retinoil- $\beta$ -glucurónido se encontró tras la administración oral de 20 mg/Kg de ácido todo-*trans*-retinoico, mientras que el 4-oxo-13-*cis* retinoil- $\beta$ -glucurónido tras la administración oral de 20 mg/Kg de ácido todo-*trans*-retinoico y ácido 13-*cis*-retinoico. No se encontraron otros conjugados glucurónidos de isómeros del ácido retinoico o de metabolitos oxidados (Li et al., 1996).

Todos estos valores han sido determinados usando tejidos procedentes de sujetos control, de modo que pueden ser objeto de comparación a la hora de evaluar la modulación del sistema retinoide tras la exposición a diferentes xenobióticos. Algunos de estos estresantes son los llamados retardantes de llama bromados (BFRs, del inglés) (van der Ven et al., 2006; Novák et al. 2008; Nilsson y Håkansson, 2002). A su vez, estos cambios han sido asociados a numerosos y graves efectos, como trastornos del desarrollo neurológico (Elsea y Williams, 2011; Hou et al., 2015), cáncer (Shiota y Kanki, 2013), problemas de fertilidad (Clagett-Dame y Knutson 2011) y trastornos metabólicos (Takahashi y Takasu, 2011; Trasino et al., 2015).

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>4-oxo-todo-<i>trans</i>-retinoil-<math>\beta</math>-glucurónido</b>													
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	8.48		nmol/mL	1	4.17		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	2.54		nmol/mL	1	1.25		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	4.41		nmol/mL	1	2.17		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996

**APÉNDICE 11.6.19 CONCENTRACIÓN DE 4-OXO-13-CIS-RETINOIL-β-GLUCURONIDO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>4-oxo-13-cis-retinoil-β-glucurónido</b>													
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	15.60		nmol/mL	1	7.67		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	12.88		nmol/mL	1	6.33		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	18.82		nmol/mL	1	9.25		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	41.70		nmol/mL	1	20.50		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	10.17		nmol/mL	1	5.00		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	9.32		nmol/mL	1	4.58		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	4.41		nmol/mL	1	2.17		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	6.61		nmol/mL	1	3.25		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d ± n.d		nmol/mL	1	n.d ± n.d		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d ± n.d		nmol/mL	1	n.d ± n.d		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d ± n.d		nmol/mL	1	n.d ± n.d		µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d ± n.d		nmol/mL	1	n.d ± n.d		µg/mL	Li et al., 1996

**APÉNDICE 11.6.20 CONCENTRACIÓN DE 13-CIS-RETINOIL-β-GLUCURONIDO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>13-cis-retinoil-β-glucurónido</b>													
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	2.97	± n.d	nmol/mL	1	1.42	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	3.85	± n.d	nmol/mL	1	1.83	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d	± n.d	nmol/mL	1	n.d	± n.d	µg/mL	Li et al., 1996

**APÉNDICE 11.6.21 CONCENTRACIÓN DE 9-*CIS*-RETINOIL- $\beta$ -GLUCURONIDO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>9-<i>cis</i>-retinoil-<math>\beta</math>-glucurónido</b>													
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1995
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1997
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1998
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1999
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2000
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2001
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2002
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2003
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2004
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2005

**APÉNDICE 11.6.22 CONCENTRACIÓN DE TODO-*TRANS*-RETINOIL- $\beta$ -GLUCURONIDO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

ESPECIE	CEPA	SEXO	EDAD	ÓRGANO	VIT A DIETA IU/KG	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	n	VALOR	SD/SEM	UNIDADES	REFERENCIAS
<b>Todo-<i>trans</i>-retinoil-<math>\beta</math>-glucurónido</b>													
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1995
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1996
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1997
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1998
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 1999
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2000
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2001
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2002
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 1 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2003
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2004
Rata	CD	Machos	Adult + TTO 4 d	Orina	Oral 20 mg/Kg de ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	n.d $\pm$ n.d		nmol/mL	1	n.d $\pm$ n.d		$\mu$ g/mL	Li et al., 2005

## 12. REFERENCIAS

1. Abbott BD, Schmid JE, Pitt JA, Buckalew AR, Wood CR, Held GA, et al. Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;155(1):62-70.
2. Abdallah MA, Harrad S, Covaci A. Hexabromocyclododecanes and tetrabromobisphenol-A in indoor air and dust in Birmingham, U.K: implications for human exposure. *Environ Sci Technol.* 2008;42(18):6855-61.
3. Achkar CC, Derguini F, Blumberg B, Langston A, Levin AA, Speck J, et al. 4-Oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(10):4879-84.
4. Ake M, Fabre H, Malan AK, Mandrou B. Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: a validation procedure. *J Chromatogr A.* 1998;826(2):183-9.
5. Aleksunes LM, Klaassen CD. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR $\alpha$ -, and Nrf2-null mice. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(7):1366-79.
6. Ali R, Campos B, Dyckhoff G, Haefeli WE, Herold-Mende C, Burhenne J. Quantification of retinoid concentrations in human serum and brain tumor tissues. *Anal Chim Acta.* 2012;725:57-66.
7. Andreola F, Fernandez-Salguero PM, Chiantore MV, Petkovich MP, Gonzalez FJ, De Luca LM. Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR $^{-/-}$ ) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res.* 1997;57(14):2835-8.
8. Armstrong R, Ashenfelter K, Eckhoff C, Levin A, Shapiro S. General and reproductive toxicology of retinoids. *The Retinoids Biology, chemistry and medicine*: Raven Press (New York); 1994.
9. Arnhold T, Tzimas G, Wittfoht W, Plonait S, Nau H. Identification of 9-cis-retinoic acid, 9,13-di-cis-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-retro-retinol in human plasma after liver consumption. *Life Sci.* 1996;59(12):PL169-77.
10. Arnold SL, Amory JK, Walsh TJ, Isoherranen N. A sensitive and specific method for measurement of multiple retinoids in human serum with UHPLC-MS/MS. *J Lipid Res.* 2012;53(3):587-98.
11. Arsenescu R, Arsenescu V, Zhong J, Nasser M, Melinte R, Dingle RW, et al. Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(5):1149-62.
12. Asante KA, Adu-Kumi S, Nakahiro K, Takahashi S, Isobe T, Sudaryanto A, et al. Human exposure to PCBs, PBDEs and HBCDs in Ghana: Temporal variation, sources of exposure and estimation of daily intakes by infants. *Environ Int.* 2011;37(5):921-8.
13. Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K, et al. Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol.* 2005;25(22):10040-51.
14. Bakker MF, Peeters PH, Klaasen VM, Bueno-de-Mesquita HB, Jansen EH, Ros MM, et al. Plasma carotenoids, vitamin C, tocopherols, and retinol and the risk of breast cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(2):454-64.
15. Barbas C, Castro M, Bonet B, Viana M, Herrera E. Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1997;778(1-2):415-20.
16. Barker ME, McCloskey E, Saha S, Gossiel F, Charlesworth D, Powers HJ, et al. Serum retinoids and beta-carotene as predictors of hip and other fractures in elderly women. *J Bone Miner Res.* 2005;20(6):913-20.
17. Barua A, Furr H. Properties of Retinoids. Structure, Handling, and Preparation. In: Redfern CPF, editor. *Retinoids protocols.* 891998.
18. Barua AB. A simple rapid method of sample preparation for LC analysis of retinoyl beta-glucuronide and retinoic acid in water-based creams. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;32(3):563-7.

19. Barua AB, Olson JA. Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998;707(1-2):69-79.
20. Bell EC, John M, Hughes RJ, Pham T. Ultra-performance liquid chromatographic determination of tocopherols and retinol in human plasma. *J Chromatogr Sci.* 2014;52(9):1065-70.
21. Benson JM, Shepherd DM. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicol Sci.* 2011;120(1):68-78.
22. Berggren M, Fex G, Nilsson-Ehle P. Decreasing serum concentrations of all-trans, 13-cis retinoic acids and retinol during fasting and caloric restriction. *J Intern Med.* 2003;253(3):375-80.
23. Bi X, Thomas GO, Jones KC, Qu W, Sheng G, Martin FL, et al. Exposure of electronics dismantling workers to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in South China. *Environ Sci Technol.* 2007;41(16):5647-53.
24. Birnbaum LS, Tuomisto J. Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit Contam.* 2000;17(4):275-88.
25. Blomhoff R, Blomhoff H. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of neurobiology.* 2006;66(7):606-30.
26. Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev.* 1991;71(4):951-90.
27. Blumberg B, Bolado J, Derguini F, Craig AG, Moreno TA, Chakravarti D, et al. Novel retinoic acid receptor ligands in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(10):4873-8.
28. Brtko J, Dvorak Z. Role of retinoids, rexinoids and thyroid hormone in the expression of cytochrome p450 enzymes. *Current drug metabolism.* 2011;12(2):71-88.
29. Burri BJ, Neidlinger TR, Lo AO, Kwan C, Wong MR. Supercritical fluid extraction and reversed-phase liquid chromatography methods for vitamin A and beta-carotene heterogeneous distribution of vitamin A in the liver. *J Chromatogr A.* 1997;762(1-2):201-6.
30. Cai Y, Zhang W, Hu J, Sheng G, Chen D, Fu J. Characterization of maternal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) administered to pregnant Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol.* 2011;31(1):106-10.
31. Cantón RF, Peijnenburg AA, Hoogenboom RL, Piersma AH, van der Ven LT, van den Berg M, et al. Subacute effects of hexabromocyclododecane (HBCD) on hepatic gene expression profiles in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;231(2):267-72.
32. Caram LM, Amaral RA, Ferrari R, Tanni SE, Correa CR, Paiva SA, et al. Serum Vitamin A and Inflammatory Markers in Individuals with and without Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:862086.
33. Casal S, Macedo B, Oliveira MB. Simultaneous determination of retinol, beta-carotene and alpha-tocopherol in adipose tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;763(1-2):1-8.
34. Chambers D, Wilson L, Maden M, Lumsden A. RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. *Development.* 2007;134(7):1369-83.
35. Chao HR, Tsou TC, Huang HL, Chang-Chien GP. Levels of breast milk PBDEs from southern Taiwan and their potential impact on neurodevelopment. *Pediatr Res.* 2011;70(6):596-600.
36. Chauveau-Duriot B, Doreau M, Nozière P, Graulet B. Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(2):777-90.
37. Chávez-Servín JL, Castellote AI, López-Sabater MC. Simultaneous analysis of Vitamins A and E in infant milk-based formulae by normal-phase high-performance liquid chromatography-diode array detection using a short narrow-bore column. *J Chromatogr A.* 2006;1122(1-2):138-43.

38. Chen H, Howald WN, Juchau MR. Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from all-trans-retinol: catalysis of all-trans-retinol oxidation by human P-450 cytochromes. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(3):315-22.
39. Chen PJ, Padgett WT, Moore T, Winnik W, Lambert GR, Thai SF, et al. Three conazoles increase hepatic microsomal retinoic acid metabolism and decrease mouse hepatic retinoic acid levels in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;234(2):143-55.
40. Chen SJ, Ding N, Zhu ZC, Tian M, Luo XJ, Mai BX. Sources of halogenated brominated retardants in house dust in an industrial city in southern China and associated human exposure. *Environ Res.* 2014;135:190-5.
41. Christiansson A, Eriksson J, Teclechiel D, Bergman A. Identification and quantification of products formed via photolysis of decabromodiphenyl ether. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2009;16(3):312-21.
42. Chu I, Bowers WJ, Caldwell D, Nakai J, Wade MG, Yagminas A, et al. Toxicological effects of in utero and lactational exposure of rats to a mixture of environmental contaminants detected in Canadian Arctic human populations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* 2008;71(2):93-108.
43. Chu I, Lecavalier P, Håkansson H, Yagminas A, Valli V, Poon P, et al. Mixture effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chemosphere.* 2001;43(4):807-14.
44. Chung SS, Wang X, Wolgemuth DJ. Expression of retinoic acid receptor alpha in the germline is essential for proper cellular association and spermiogenesis during spermatogenesis. *Development.* 2009;136(12):2091-100.
45. Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients.* 2011;3(4):385-428.
46. Colmán-Martínez M, Martínez-Huélamo M, Miralles E, Estruch R, Lamuela-Raventós RM. A New Method to Simultaneously Quantify the Antioxidants: Carotenes, Xanthophylls, and Vitamin A in Human Plasma. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:9268531.
47. Convención de Estocolmo. Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes. Evaluación de la gestión de los riesgos sobre el hexabromociclododecano. 2013.
48. Convención de Estocolmo. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its tenth meeting. Addendum  
Risk profile on decabromodiphenyl ether (commercial mixture, c-decaBDE). In: Committee POPR, editor. 2014.
49. Costa L, Giordano G. Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? *Neurotoxicology.* 2011;32(1):9-24.
50. Covaci A, Gerecke AC, Law RJ, Voorspoels S, Kohler M, Heeb NV, et al. Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: a review. *Environ Sci Technol.* 2006;40(12):3679-88.
51. Craft NE, Haitema TB, Garnett KM, Fitch KA, Dorey CK. Carotenoid, tocopherol, and retinol concentrations in elderly human brain. *J Nutr Health Aging.* 2004;8(3):156-62.
52. Danon-Schaffner MN, Mahecha-Botero A, Grace JR, Ikononou M. Transfer of PBDEs from e-waste to aqueous media. *Sci Total Environ.* 2013;447:458-71.
53. Davydova N, Stippler E, Jin P, Giancaspro G. Development and validation of a dissolution test method for vitamin A in dietary supplement tablets. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(3):295-301.
54. de Lera A, Krezel W, Rühl R. An Endogenous Mammalian Retinoid X Receptor Ligand, At Last! *ChemMedChem.* 2016;11(10):1027-37.
55. de Wit CA, Björklund JA, Thuresson K. Tri-decabrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in indoor air and dust from Stockholm microenvironments 2: indoor sources and human exposure. *Environ Int.* 2012;39(1):141-7.
56. Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int.* 2015;84:154-60.

57. Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE, Zhao B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci.* 2011;124(1):1-22.
58. di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med.* 2009;30(5):297-343.
59. Díaz-Díaz CJ, Ronnekleiv-Kelly SM, Nukaya M, Geiger PG, Balbo S, Dator R, et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor is a Repressor of Inflammation-associated Colorectal Tumorigenesis in Mouse. *Ann Surg.* 2016;264(3):429-36.
60. Dickman ED, Thaller C, Smith SM. Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development.* 1997;124(16):3111-21.
61. Dimitrova B, Poyrè M, Guiso G, Badiali A, Caccia S. Isocratic reversed-phase liquid chromatography of all-trans-retinoic acid and its major metabolites in new potential supplementary test systems for developmental toxicology. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;681(1):153-60.
62. Dingemans MM, de Groot A, van Kleef RG, Bergman A, van den Berg M, Vijverberg HP, et al. Hydroxylation increases the neurotoxic potential of BDE-47 to affect exocytosis and calcium homeostasis in PC12 cells. *Environ Health Perspect.* 2008;116(5):637-43.
63. Disdier B, Bun H, Catalin J, Durand A. Simultaneous determination of all-trans-, 13-cis-, 9-cis-retinoic acid and their 4-oxo-metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;683(2):143-54.
64. Domingo JL. Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: a review of the recent scientific literature. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(2):238-49.
65. ECB. Risk Assessment Report bis(pentabromophenyl) ether. 2002.
66. ECB. Risk Assessment Report Hexabromocyclododecane. In: Agency SC, editor. 2008.
67. ECHA. Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation). Hexabromocyclododecane 2008 [Available from: <https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/104361>].
68. ECHA. Background document for hexabromocyclododecane and all major diastereoisomers identified (HBCDD). 2009.
69. ECHA. Notified classification and labelling - 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 2016 [Available from: <https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/notification-details/130422/1061383>].
70. ECHA. Notified classification and labelling - Decabromodiphenyl ether. 2017.
71. ECHA. Notified classification and labelling - Pentabromodiphenyl ether 2017 [Available from: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.046.425>].
72. ECHA. Annex XV Restriction Report. Proposal for a restriction on decaBDE. 2014.
73. Edwards AJ, You CS, Swanson JE, Parker RS. A novel extrinsic reference method for assessing the vitamin A value of plant foods. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(3):348-55.
74. EFSA. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on hexabromocyclododecane (HBCD) and its derivatives in food. *EFSA Journal* 2011:2011.
75. EFSA. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and its derivatives in food. *EFSA Journal* 2011.
76. EFSA. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on polybromodiphenyl ether (PBDE) and its derivatives in food. *EFSA Journal.* 2011:274.
77. Eggesbø M, Thomsen C, Jørgensen JV, Becher G, Odland J, Longnecker MP. Associations between brominated flame retardants in human milk and thyroid-stimulating hormone (TSH) in neonates. *Environ Res.* 2011;111(6):737-43.

78. Elabbas L, Esteban J, Barber X, Hamscher G, Nau H, Bowers WJ, et al. In Utero and Lactational Exposure to a Mixture of Environmental Contaminants Detected in Canadian Arctic Human Populations Alters Retinoid Levels in Rat Offspring with Low Margins of Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2014;77(5):223-45.
79. Eljarrat E, Gorga M, Gasser M, Díaz-Ferrero J, Barceló D. Dietary exposure assessment of Spanish citizens to hexabromocyclododecane through the diet. *J Agric Food Chem*. 2014;62(12):2462-8.
80. Elsea SH, Williams SR. Smith-Magenis syndrome: haploinsufficiency of RAI1 results in altered gene regulation in neurological and metabolic pathways. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e14.
81. Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M. Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod Toxicol*. 2008;25(3):335-51.
82. Erhardt JG, Craft NE, Heinrich F, Biesalski HK. Rapid and simple measurement of retinol in human dried whole blood spots. *J Nutr*. 2002;132(2):318-21.
83. Eriksson P, Fischer C, Fredriksson A. Polybrominated diphenyl ethers, a group of brominated flame retardants, can interact with polychlorinated biphenyls in enhancing developmental neurobehavioral defects. *Toxicol Sci*. 2006;94(2):302-9.
84. Erratico CA, Moffatt SC, Bandiera SM. Comparative oxidative metabolism of BDE-47 and BDE-99 by rat hepatic microsomes. *Toxicol Sci*. 2011;123(1):37-47.
85. Erratico CA, Szeitz A, Bandiera SM. Oxidative metabolism of BDE-99 by human liver microsomes: predominant role of CYP2B6. *Toxicol Sci*. 2012;129(2):280-92.
86. Esteban J, Elabbas LE, Borg D, Herlin M, Åkesson A, Barber X, et al. Gestational and lactational exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 modulates retinoid homeostasis in rat offspring. *Toxicol Lett*. 2014;229(1):41-51.
87. EU. Parlamento Europeo, 2003. Directiva 2003/11/ce del parlamento europeo y del consejo de 6 de febrero de 2003 por la que se modifica por vigesimocuarta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo, éter de octabromodifenilo). *Diario Oficial de la Unión Europea* 2003.
88. EU. Communication from the Commission on the results of the risk evaluation of chlorodifluoromethane, bis(pentabromophenyl)ether and methenamine and on the risk reduction strategy for the substance methenamine. *Official Journal of the European Union* 2008.
89. EU. Reglamento (UE) 2017/227 de la Comisión de 9 de febrero de 2017 que modifica, por lo que respecta al bis(pentabromofenil)éter, el anexo XVII del Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH). *Diario Oficial de la Unión Europea* 2017.
90. Evans JE, McCaffery P. HPLC/MS(N) analysis of retinoids. *Methods Mol Biol*. 2010;652:149-62.
91. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*. 2014;157(1):255-66.
92. Faure H, Preziosi P, Roussel AM, Bertrais S, Galan P, Hercberg S, et al. Factors influencing blood concentration of retinol, alpha-tocopherol, vitamin C, and beta-carotene in the French participants of the SU.VI.MAX trial. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60(6):706-17.
93. Fávoro RM, Iha MH, Bianchi MeL. Liquid chromatographic determination of geometrical retinol isomers and carotene in enteral feeding formulas. *J Chromatogr A*. 2003;1021(1-2):125-32.
94. Feng Y, Hu Q, Meng G, Wu X, Zeng W, Zhang X, et al. Simulating long-term occupational exposure to decabrominated diphenyl ether using C57BL/6 mice: biodistribution and pathology. *Chemosphere*. 2015;128:118-24.
95. Feo ML, Gross MS, McGarrigle BP, Eljarrat E, Barceló D, Aga DS, et al. Biotransformation of BDE-47 to potentially toxic metabolites is predominantly mediated by human CYP2B6. *Environ Health Perspect*. 2013;121(4):440-6.

96. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*. 1995;268(5211):722-6.
97. Fletcher N, Giese N, Schmidt C, Stern N, Lind PM, Viluksela M, et al. Altered retinoid metabolism in female Long-Evans and Han/Wistar rats following long-term 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-treatment. *Toxicol Sci*. 2005;86(2):264-72.
98. Fletcher N, Hanberg A, Håkansson H. Hepatic vitamin a depletion is a sensitive marker of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure in four rodent species. *Toxicol Sci*. 2001;62(1):166-75.
99. Fromme H, Becher G, Hilger B, Völkel W. Brominated flame retardants - Exposure and risk assessment for the general population. *Int J Hyg Environ Health*. 2016;219(1):1-23.
100. Fromme H, Hilger B, Kopp E, Miserok M, Völkel W. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD) and "novel" brominated flame retardants in house dust in Germany. *Environ Int*. 2014;64:61-8.
101. FSA UK. Brominated chemicals: UK dietary intakes. Food survey information sheet 10/06.2006. In: Division CS, editor. 2006.
102. Fujimoto H, Woo GH, Inoue K, Takahashi M, Hirose M, Nishikawa A, et al. Impaired oligodendroglial development by decabromodiphenyl ether in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reprod Toxicol*. 2011;31(1):86-94.
103. Furr HC. Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. *J Nutr*. 2004;134(1):281S-5S.
104. Furumatsu K, Nishiumi S, Kawano Y, Ooi M, Yoshie T, Shiomi Y, et al. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis. *Dig Dis Sci*. 2011;56(9):2532-44.
105. Gascon M, Fort M, Martinez D, Carsin AE, Forns J, Grimalt JO, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk and neuropsychological development in infants. *Environ Health Perspect*. 2012;120(12):1760-5.
106. Genchi G, Wang W, Barua A, Bidlack WR, Olson JA. Formation of beta-glucuronides and of beta-galacturonides of various retinoids catalyzed by induced and noninduced microsomal UDP-glucuronosyltransferases of rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1289(2):284-90.
107. Germer S, Piersma AH, van der Ven L, Kamyschnikow A, Fery Y, Schmitz HJ, et al. Subacute effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on hepatic cytochrome P450 levels in rats. *Toxicology*. 2006;218(2-3):229-36.
108. Geyer HJ, Schramm KW, Darnerud PO, Aune M, Feicht EA, Fried KW. Terminal elimination half-lives of the brominated flame retardants TBBPA, HBCD, and lower brominated PBDEs in humans. *Organohalogen compounds*; 2004. p. 3867-72.
109. Goetz HJ, Kopec RE, Riedl KM, Cooperstone JL, Narayanasamy S, Curley RW, et al. An HPLC-MS/MS method for the separation of  $\alpha$ -retinyl esters from retinyl esters. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1029-1030:68-71.
110. Goscinny S, Vandevijvere S, Maleki M, Van Overmeire I, Windal I, Hanot V, et al. Dietary intake of hexabromocyclododecane diastereoisomers ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -HBCD) in the Belgian adult population. *Chemosphere*. 2011;84(3):279-88.
111. Grüber C, Taner C, Mihály J, Matricardi PM, Wahn U, Rühl R. Serum retinoic acid and atopy among children of different ethnic origin living in Germany. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(4):558-60.
112. Gundersen TE. Methods for detecting and identifying retinoids in tissue. *J Neurobiol*. 2006;66(7):631-44.
113. Gundersen TE, Bastani NE, Blomhoff R. Quantitative high-throughput determination of endogenous retinoids in human plasma using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(7):1176-86.
114. Gundersen TE, Blomhoff R. On-line solid-phase extraction and isocratic separation of retinoic acid isomers in microbore column switching system. *Methods Enzymol*. 1999;299:430-41.

115. Gundersen TE, Blomhoff R. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J Chromatogr A*. 2001;935(1-2):13-43.
116. Gundersen TE, Lundanes E, Blomhoff R. Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of retinoids in human serum using on-line solid-phase extraction and column switching. Determination of 9-cis-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid, 4-oxo-all-trans-retinoic acid and 4-oxo-13-cis-retinoic acid. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;691(1):43-58.
117. Haas K, Weighardt H, Deenen R, Köhrer K, Clausen B, Zahner S, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Is Essential for Murine Skin Barrier Integrity. *J Invest Dermatol*. 2016;136(11):2260-9.
118. Hallgren S, Darnerud PO. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats-testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology*. 2002;177(2-3):227-43.
119. Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MH, Andersson PL, et al. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci*. 2006;92(1):157-73.
120. Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Visser TJ, Van Velzen MJ, et al. Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(2):284-98.
121. Harrad S, de Wit CA, Abdallah MA, Bergh C, Bjorklund JA, Covaci A, et al. Indoor contamination with hexabromocyclododecanes, polybrominated diphenyl ethers, and perfluoroalkyl compounds: an important exposure pathway for people? *Environ Sci Technol*. 2010;44(9):3221-31.
122. Harrison EH, Curley RW. Carotenoids and Retinoids: Nomenclature, Chemistry, and Analysis. *Subcell Biochem*. 2016;81:1-19.
123. Hartmann S, Froescheis O, Ringenbach F, Wyss R, Bucheli F, Bischof S, et al. Determination of retinol and retinyl esters in human plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;751(2):265-75.
124. He W, Qin N, He QS, Kong XZ, Liu WX, Wang QM, et al. Atmospheric PBDEs at rural and urban sites in central China from 2010 to 2013: residual levels, potential sources and human exposure. *Environ Pollut*. 2014;192:232-43.
125. Heudi O, Trisconi MJ, Blake CJ. Simultaneous quantification of vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004;1022(1-2):115-23.
126. Hoegberg P, Schmidt CK, Fletcher N, Nilsson CB, Trossvik C, Gerlienke Schuur A, et al. Retinoid status and responsiveness to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking retinoid binding protein or retinoid receptor forms. *Chem Biol Interact*. 2005;156(1):25-39.
127. Hoegberg P, Schmidt CK, Nau H, Ross AC, Zolfaghari R, Fletcher N, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces lecithin: retinol acyltransferase transcription in the rat kidney. *Chem Biol Interact*. 2003;145(1):1-16.
128. Höller U, Wolter D, Hofmann P, Spitzer V. Microwave-assisted rapid determination of vitamins a and e in beverages. *J Agric Food Chem*. 2003;51(6):1539-42.
129. Holvik K, Ahmed LA, Forsmo S, Gjesdal CG, Grimnes G, Samuelsen SO, et al. No increase in risk of hip fracture at high serum retinol concentrations in community-dwelling older Norwegians: the Norwegian Epidemiologic Osteoporosis Studies. *Am J Clin Nutr*. 2015;102(5):1289-96.
130. Horst RL, Reinhardt TA, Goff JP, Koszewski NJ, Napoli JL. 9,13-Di-cis-retinoic acid is the major circulating geometric isomer of retinoic acid in the periparturient period. *Arch Biochem Biophys*. 1995;322(1):235-9.
131. Hou N, Ren L, Gong M, Bi Y, Gu Y, Dong Z, et al. Vitamin A deficiency impairs spatial learning and memory: the mechanism of abnormal CBP-dependent histone acetylation regulated by retinoic acid receptor alpha. *Mol Neurobiol*. 2015;51(2):633-47.
132. Huwe JK, Smith DJ. Accumulation, whole-body depletion, and debromination of decabromodiphenyl ether in male sprague-dawley rats following dietary exposure. *Environ Sci Technol*. 2007;41(7):2371-7.

133. Idres N, Marill J, Flexor MA, Chabot GG. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *J Biol Chem.* 2002;277(35):31491-8.
134. Irie T, Seki T. Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002;131(2):209-19.
135. IUPAC-IUB. Joint Commission on Biochemical Nomenclature. *Eur. J. Biochem.*, 129; 1982.
136. Iwase H. Sample preparation for routine high-performance liquid chromatographic determination of retinol palmitate in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction using monosodium L-glutamate as dissolving agent. *J Chromatogr A.* 2003;1008(1):81-7.
137. Jacobs H, Dennefeld C, Feret B, Viluksela M, Hakansson H, Mark M, et al. Retinoic acid drives aryl hydrocarbon receptor expression and is instrumental to dioxin-induced toxicity during palate development. *Environ Health Perspect.* 2011;119(11):1590-5.
138. Jin J, Wang Y, Yang C, Hu J, Liu W, Cui J, et al. Polybrominated diphenyl ethers in the serum and breast milk of the resident population from production area, China. *Environ Int.* 2009;35(7):1048-52.
139. Jin UH, Lee SO, Pfent C, Safe S. The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis. *BMC Cancer.* 2014;14:498.
140. Johnson PI, Stapleton HM, Mukherjee B, Hauser R, Meeker JD. Associations between brominated flame retardants in house dust and hormone levels in men. *Sci Total Environ.* 2013;445-446:177-84.
141. Johnson-Restrepo B, Kannan K. An assessment of sources and pathways of human exposure to polybrominated diphenyl ethers in the United States. *Chemosphere.* 2009;76(4):542-8.
142. Kakizaki S, Karami S, Negishi M. Retinoic acids repress constitutive active receptor-mediated induction by 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene of the CYP2B10 gene in mouse primary hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(2):208-11.
143. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Wada A, Mori T, Murata K, et al. Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;859(2):192-200.
144. Kane MA. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(1):10-20.
145. Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem J.* 2005;388(Pt 1):363-9.
146. Kane MA, Folias AE, Napoli JL. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem.* 2008;378(1):71-9.
147. Kane MA, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Obrochta KM, Krois CR, et al. Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(50):21884-9.
148. Kane MA, Folias AE, Wang C, Napoli JL. Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008;80(5):1702-8.
149. Kane MA, Napoli JL. Quantification of endogenous retinoids. *Methods Mol Biol.* 2010;652:1-54.
150. Kašparová M, Plíšek J, Solichová D, Krčmová L, Kučerová B, Hronek M, et al. Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human breast milk. *Talanta.* 2012;93:147-52.
151. Kawai M, Chen J, Cheung CY, Chang TK. Transcript profiling of cytochrome P450 genes in HL-60 human leukemic cells: upregulation of CYP1B1 by all-trans-retinoic acid. *Mol Cell Biochem.* 2003;248(1-2):57-65.

152. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, Negishi M. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6318-22.
153. Kedishvili NY. Enzymology of retinoic acid biosynthesis and degradation. *J Lipid Res.* 2013;54(7):1744-60.
154. Khan A, Khan MI, Iqbal Z, Shah Y, Ahmad L, Watson DG. An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-retinol (vitamin A) and alpha-tocopherol (vitamin E) in human serum: comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(25):2339-47.
155. Kiciński M, Viaene MK, Den Hond E, Schoeters G, Covaci A, Dirtu AC, et al. Neurobehavioral function and low-level exposure to brominated flame retardants in adolescents: a cross-sectional study. *Environ Health.* 2012;11:86.
156. Kim YK, Quadro L. Reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of retinol and retinyl esters in mouse serum and tissues. *Methods Mol Biol.* 2010;652:263-75.
157. Kiser PD, Goleczak M, Palczewski K. Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chem Rev.* 2014;114(1):194-232.
158. Knutsen HK, Kvaalem HE, Thomsen C, Frøshaug M, Haugen M, Becher G, et al. Dietary exposure to brominated flame retardants correlates with male blood levels in a selected group of Norwegians with a wide range of seafood consumption. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(2):217-27.
159. Koch C, Schmidt-Kötters T, Rupp R, Sures B. Review of hexabromocyclododecane (HBCD) with a focus on legislation and recent publications concerning toxicokinetics and -dynamics. *Environ Pollut.* 2015;199:26-34.
160. Kopec RE, Schweiggert RM, Riedl KM, Carle R, Schwartz SJ. Comparison of high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/photo-diode array detection for the quantitation of carotenoids, retinyl esters,  $\alpha$ -tocopherol and phylloquinone in chylomicron-rich fractions of human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013;27(12):1393-402.
161. Kransler KM, Tonucci DA, McGarrigle BP, Napoli JL, Olson JR. Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters retinoid homeostasis in maternal and perinatal tissues of the Holtzman rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;224(1):29-38.
162. Krcmová L, Urbánek L, Solichová D, Kasparová M, Vlcková H, Melichar B, et al. HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. *J Sep Sci.* 2009;32(15-16):2804-11.
163. Król S, Namieśnik J, Zabiegała B. Occurrence and levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in house dust and hair samples from Northern Poland; an assessment of human exposure. *Chemosphere.* 2014;110:91-6.
164. Kučerová B, Křmová L, Solichová D, Plíšek J, Solich P. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2013;36(14):2223-30.
165. Kumar M, Sharma G, Singla D, Singh S, Sahwney S, Chauhan AS, et al. Development of a validated UPLC method for simultaneous estimation of both free and entrapped (in solid lipid nanoparticles) all-trans retinoic acid and cholecalciferol (vitamin D3) and its pharmacokinetic applicability in rats. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;91:73-80.
166. Kwiecień A, Hubicka U, Krzek J. Determination of retinyl palmitate in ointment by HPLC with diode array detection. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(5):475-9.
167. La Guardia MJ, Schreder ED, Uding N, Hale RC. Human Indoor Exposure to Airborne Halogenated Flame Retardants: Influence of Airborne Particle Size. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(5).
168. Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, et al. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(19):10442-7.
169. Lane MA, Chen AC, Roman SD, Derguini F, Gudas LJ. Removal of LIF (leukemia inhibitory factor) results in increased vitamin A (retinol) metabolism to 4-oxoretinol in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(23):13524-9.

170. Lanvers C, Hempel G, Blaschke G, Boos J. Simultaneous determination of all-trans-, 13-cis- and 9-cis-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-trans-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;685(2):233-40.
171. Law K, Halldorson T, Danell R, Stern G, Gewurtz S, Alaei M, et al. Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. *Environ Toxicol Chem.* 2006;25(8):2177-86.
172. Law RJ, Covaci A, Harrad S, Herzke D, Abdallah MA, Fernie K, et al. Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: status at the end of 2012. *Environ Int.* 2014;65:147-58.
173. Lee E, Kim TH, Choi JS, Nabanata P, Kim NY, Ahn MY, et al. Evaluation of liver and thyroid toxicity in Sprague-Dawley rats after exposure to polybrominated diphenyl ether BDE-209. *The Journal of toxicological sciences.* 2010;35(4):535-45.
174. Lee HP, Casadesus G, Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA, et al. All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2009;9(11):1615-21.
175. Lehman PA, Franz TJ. A sensitive high-pressure liquid chromatography/particle beam/mass spectrometry assay for the determination of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid in human plasma. *J Pharm Sci.* 1996;85(3):287-90.
176. Li H, Tyndale ST, Heath DD, Letcher RJ. Determination of carotenoids and all-trans-retinol in fish eggs by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;816(1-2):49-56.
177. Li S, Barua AB, Huselton CA. Quantification of retinoyl-beta-glucuronides in rat urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;683(2):155-62.
178. Lilienthal H, van der Ven LT, Piersma AH, Vos JG. Effects of the brominated flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on dopamine-dependent behavior and brainstem auditory evoked potentials in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicol Lett.* 2009;185(1):63-72.
179. Lima EM, Diniz DG, Antoniosi-Filho NR. Development of a gas chromatography method for the determination of isotretinoin and its degradation products in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;38(4):678-85.
180. Liu Y, Chen H, Wang J, Zhou W, Sun R, Xia M. Association of serum retinoic acid with hepatic steatosis and liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(1):130-7.
181. López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Ríos-Vázquez NJ. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *J Chromatogr A.* 2006;1105(1-2):135-9.
182. Lund AK, Goens MB, Kanagy NL, Walker MK. Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;193(2):177-87.
183. Lunetta JM, Zulim RA, Dueker SR, Lin Y, Flaig V, Schneider PD, et al. Method for the simultaneous determination of retinol and beta-carotene concentrations in human tissues and plasma. *Anal Biochem.* 2002;304(1):100-9.
184. Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab.* 2001;45(2):82-5.
185. Mahiout S, Lindén J, Esteban J, Sánchez-Pérez I, Sankari S, Pettersson L, et al. Toxicological characterisation of two novel selective aryl hydrocarbon receptor modulators in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;326:54-65.
186. Malarvannan G, Dirinck E, Dirtu AC, Pereira-Fernandes A, Neels H, Jorens PG, et al. Distribution of persistent organic pollutants in two different fat compartments from obese individuals. *Environ Int.* 2013;55:33-42.
187. Mandal PK. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B.* 2005;175(4):221-30.
188. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 1995;83(6):841-50.

189. Marchetti MN, Sampol E, Bun H, Scoma H, Lacarelle B, Durand A. In vitro metabolism of three major isomers of retinoic acid in rats. Intersex and interstrain comparison. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(5):637-46.
190. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e002.
191. McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:625-45.
192. Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, et al. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect.* 2001;109(4):399-407.
193. Mevik BH, Cederkvist HR. Mean squared error of prediction (MSEP) estimates for principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR). *Journal of chemometrics*2004. p. 422–9.
194. Michaëlsson K, Lithell H, Vessby B, Melhus H. Serum retinol levels and the risk of fracture. *N Engl J Med.* 2003;348(4):287-94.
195. Mihály J, Gamlieli A, Worm M, Rühl R. Decreased retinoid concentration and retinoid signalling pathways in human atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2011;20(4):326-30.
196. Miller I, Serchi T, Cambier S, Diepenbroek C, Renaut J, Van der Berg JH, et al. Hexabromocyclododecane (HBCD) induced changes in the liver proteome of eu- and hypothyroid female rats. *Toxicol Lett.* 2016;245:40-51.
197. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, et al. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells.* 1997;2(10):645-54.
198. Miyagi M, Yokoyama H, Shiraishi H, Matsumoto M, Ishii H. Simultaneous quantification of retinol, retinal, and retinoic acid isomers by high-performance liquid chromatography with a simple gradient. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;757(2):365-8.
199. Miyaso H, Nakamura N, Naito M, Hirai S, Matsuno Y, Itoh M, et al. Early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether affects expression of androgen and thyroid hormone receptor-alpha and its splicing variants in mouse Sertoli cells. *PLoS One.* 2014;9(12):e114487.
200. Mörck A, Hakk H, Orn U, Klasson Wehler E. Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(7):900-7.
201. Moriyama H, Yamasaki H, Masumoto S, Adachi K, Katsura N, Onimaru T. Rapid determination of vitamins A and E in serum with surfactant as a diluent by column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1998;798(1-2):125-30.
202. Morose G. An overview of alternatives to tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD). Lowell Center for Sustainable Production University of Massachusetts 2006.
203. Moulas AN, Gerogianni IC, Papadopoulos D, Gourgoulanis KI. Serum retinoic acid, retinol and retinyl palmitate levels in patients with lung cancer. *Respirology.* 2006;11(2):169-74.
204. Mumford SL, Browne RW, Schliep KC, Schmelzer J, Plowden TC, Michels KA, et al. Serum Antioxidants Are Associated with Serum Reproductive Hormones and Ovulation among Healthy Women. *J Nutr.* 2016;146(1):98-106.
205. Murphy KA, Quadro L, White LA. The intersection between the aryl hydrocarbon receptor (AhR)- and retinoic acid-signaling pathways. *Vitam Horm.* 2007;75:33-67.
206. Napoli JL, Pramanik BC, Williams JB, Dawson MI, Hobbs PD. Quantification of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: total versus all-trans-retinoic acid in human plasma. *J Lipid Res.* 1985;26(3):387-92.
207. Nash SH, Till C, Song X, Lucia MS, Parnes HL, Thompson IM, et al. Serum Retinol and Carotenoid Concentrations and Prostate Cancer Risk: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24(10):1507-15.

208. Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(12):947-60.
209. Ni HG, Zeng H. HBCD and TBBPA in particulate phase of indoor air in Shenzhen, China. *Sci Total Environ*. 2013;458-460:15-9.
210. Nilsson CB, Håkansson H. The retinoid signaling system--a target in dioxin toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 2002;32(3):211-32.
211. Nilsson CB, Hoegberg P, Trossvik C, Azaïs-Braesco V, Blaner WS, Fex G, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases serum and kidney retinoic acid levels and kidney retinol esterification in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;169(2):121-31.
212. Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C. Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol*. 2005;79(5):260-7.
213. Novák J, Beníšek M, Hilscherová K. Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International*. 2008;34(6):898-913.
214. Noyes PD, Hinton DE, Stapleton HM. Accumulation and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) induces thyroid disruption and liver alterations. *Toxicol Sci*. 2011;122(2):265-74.
215. O'Connell MJ, Chua R, Hoyos B, Buck J, Chen Y, Derguini F, et al. Retro-retinoids in regulated cell growth and death. *J Exp Med*. 1996;184(2):549-55.
216. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 2008.
217. OECD. Detailed review paper on the state of the science on novel in vitro and in vivo screening and testing methods and endpoints for evaluating endocrine disruptors. ENV/JM/MONO(2012)23. 2012.
218. Opotowsky AR, Bilezikian JP, study NIF-u. Serum vitamin A concentration and the risk of hip fracture among women 50 to 74 years old in the United States: a prospective analysis of the NHANES I follow-up study. *Am J Med*. 2004;117(3):169-74.
219. Pacyniak EK, Cheng X, Cunningham ML, Crofton K, Klaassen CD, Guo GL. The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators. *Toxicological sciences*. 2007;97(1):94-102.
220. Padula C, Campana N, Santi P. Simultaneous determination of benzophenone-3, retinol and retinyl acetate in pig ear skin layers by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2008;22(10):1060-5.
221. Plíšek J, Kašparová M, Solichová D, Krčmová L, Kučerová B, Sobotka L, et al. Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk. *Talanta*. 2013;107:382-8.
222. Pohjanvirta R, Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev*. 1994;46(4):483-549.
223. Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:517-54.
224. Qian H, Sheng M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *J Chromatogr A*. 1998;825(2):127-33.
225. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453(7191):65-71.
226. Ramp U, Gerharz CD, Eifler E, Biesalski HK, Gabbert HE. Effects of retinoic acid metabolites on proliferation and differentiation of the clonal rhabdomyosarcoma cell line BA-HAN-1C. *Biol Cell*. 1994;81(1):31-7.

227. Ranalder UB, Lausecker BB, Huselton C. Micro liquid chromatography-mass spectrometry with direct liquid introduction used for separation and quantitation of all-trans- and 13-cis-retinoic acids and their 4-oxo metabolites in human plasma. *J Chromatogr.* 1993;617(1):129-35.
228. Raner GM, Vaz AD, Coon MJ. Metabolism of all-trans, 9-cis, and 13-cis isomers of retinal by purified isozymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral. *Mol Pharmacol.* 1996;49(3):515-22.
229. Rawn DF, Gaertner DW, Weber D, Curran IH, Cooke GM, Goodyer CG. Hexabromocyclododecane concentrations in Canadian human fetal liver and placental tissues. *Sci Total Environ.* 2014;468-469:622-9.
230. Rawn DF, Ryan JJ, Sadler AR, Sun WF, Weber D, Laffey P, et al. Brominated flame retardant concentrations in sera from the Canadian Health Measures Survey (CHMS) from 2007 to 2009. *Environ Int.* 2014;63:26-34.
231. Richardson VM, Staskal DF, Ross DG, Diliberto JJ, DeVito MJ, Birnbaum LS. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226(3):244-50.
232. Rivière G, Sirot V, Tard A, Jean J, Marchand P, Veyrand B, et al. Food risk assessment for perfluoroalkyl acids and brominated flame retardants in the French population: results from the second French total diet study. *Sci Total Environ.* 2014;491-492:176-83.
233. Roberts ES, Vaz AD, Coon MJ. Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol Pharmacol.* 1992;41(2):427-33.
234. Rocchi S, Caretti F, Gentili A, Curini R, Perret D, Pérez-Fernández V. Quantitative profiling of retinyl esters in milk from different ruminant species by using high performance liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2016;211:455-64.
235. Rodas Mendoza B, Morera Pons S, Castellote Bargalló AI, López-Sabater MC. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *J Chromatogr A.* 2003;1018(2):197-202.
236. Ross AC, Zolfaghari R. Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2011;31:65-87.
237. Routti H, Nyman M, Bäckman C, Koistinen J, Helle E. Accumulation of dietary organochlorines and vitamins in Baltic seals. *Mar Environ Res.* 2005;60(3):267-87.
238. Rühl R. Method to determine 4-oxo-retinoic acids, retinoic acids and retinol in serum and cell extracts by liquid chromatography/diode-array detection atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(16):2497-504.
239. Rühl R, Hamscher G, Garcia AL, Nau H, Schweigert FJ. Identification of 14-hydroxy-retro-retinol and 4-hydroxy-retinol as endogenous retinoids in rats throughout neonatal development. *Life Sci.* 2005;76(14):1613-22.
240. Rühl R, Krzyżosiak A, Niewiadomska-Cimicka A, Rochel N, Szeles L, Vaz B, et al. 9-cis-13,14-Dihydroretinoic Acid Is an Endogenous Retinoid Acting as RXR Ligand in Mice. *PLoS Genet.* 2015;11(6):e1005213.
241. Rühl R, Schweigert FJ. Automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for retinoid determination in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;798(2):309-16.
242. Rutledge JC, Shourbaji AG, Hughes LA, Polifka JE, Cruz YP, Bishop JB, et al. Limb and lower-body duplications induced by retinoic acid in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(12):5436-40.
243. Saegusa Y, Fujimoto H, Woo GH, Inoue K, Takahashi M, Mitsumori K, et al. Developmental toxicity of brominated flame retardants, tetrabromobisphenol A and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reprod Toxicol.* 2009;28(4):456-67.
244. Safe S, Lee SO, Jin UH. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. *Toxicol Sci.* 2013;135(1):1-16.

245. Sahlström LM, Sellstrom U, de Wit CA, Lignell S, Darnerud PO. Brominated flame retardants in matched serum samples from Swedish first-time mothers and their toddlers. *Environ Sci Technol*. 2014;48(13):7584-92.
246. Sakamoto Y, Inoue K, Takahashi M, Taketa Y, Kodama Y, Nemoto K, et al. Different pathways of constitutive androstane receptor-mediated liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis in mice treated with piperonyl butoxide or decabromodiphenyl ether. *Toxicol Pathol*. 2013;41(8):1078-92.
247. Sakhi AK, Gundersen TE, Ulven SM, Blomhoff R, Lundanes E. Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by high-performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection. *J Chromatogr A*. 1998;828(1-2):451-60.
248. Samokyszyn VM, Gall WE, Zawada G, Freyaldenhoven MA, Chen G, Mackenzie PI, et al. 4-hydroxyretinoic acid, a novel substrate for human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase(s) and recombinant UGT2B7. *J Biol Chem*. 2000;275(10):6908-14.
249. Sandholm A, Emanuelsson BM, Wehler EK. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica*. 2003;33(11):1149-58.
250. Schmidt CK, Brouwer A, Nau H. Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. *Anal Biochem*. 2003;315(1):36-48.
251. Schmidt CK, Hoegberg P, Fletcher N, Nilsson CB, Trossvik C, Håkansson H, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the endogenous metabolism of all-trans-retinoic acid in the rat. *Arch Toxicol*. 2003;77(7):371-83.
252. Schmidt CK, Volland J, Hamscher G, Nau H. Characterization of a new endogenous vitamin A metabolite. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1583(2):237-51.
253. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6731-6.
254. Schreiber R, Taschler U, Preiss-Landl K, Wongsiriroj N, Zimmermann R, Lass A. Retinyl ester hydrolases and their roles in vitamin A homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(1):113-23.
255. Schuchardt JP, Wahlström D, Rüegg J, Giese N, Stefan M, Hopf H, et al. The endogenous retinoid metabolite S-4-oxo-9-cis-13,14-dihydro-retinoic acid activates retinoic acid receptor signalling both in vitro and in vivo. *FEBS journal*. 2009;276(11):3043-59.
256. Schweigert FJ, Steinhagen B, Raila J, Siemann A, Peet D, Buscher U. Concentrations of carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 2003;18(6):1259-64.
257. Semba RD. On the 'discovery' of vitamin A. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(3):192-8.
258. Shi Z, Wang Y, Niu P, Wang J, Sun Z, Zhang S, et al. Concurrent extraction, clean-up, and analysis of polybrominated diphenyl ethers, hexabromocyclododecane isomers, and tetrabromobisphenol A in human milk and serum. *J Sep Sci*. 2013;36(20):3402-10.
259. Shimada T, Gillam EM, Sutter TR, Strickland PT, Guengerich FP, Yamazaki H. Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metab Dispos*. 1997;25(5):617-22.
260. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):779-82.
261. Shiota G, Kanki K. Retinoids and their target genes in liver functions and diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 1:33-7.
262. Shiota G, Tsuchiya H, Hoshikawa Y. The liver as a target organ of retinoids. *Hepatol Res*. 2006;36(4):248-54.
263. Shirley MA, Bennani YL, Boehm MF, Breau AP, Pathirana C, Ulm EH. Oxidative and reductive metabolism of 9-cis-retinoic acid in the rat. Identification of 13,14-dihydro-9-cis-retinoic acid and its taurine conjugate. *Drug Metab Dispos*. 1996;24(3):293-302.

264. Shmarakov IO. Retinoid-xenobiotic interactions: the Ying and the Yang. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015;4(4):243-67.
265. Siegel EM, Craft NE, Roe DJ, Duarte-Franco E, Villa LL, Franco EL, et al. Temporal variation and identification of factors associated with endogenous retinoic acid isomers in serum from Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(11 Pt 1):1693-703.
266. Singh KP, Garrett RW, Casado FL, Gasiewicz TA. Aryl hydrocarbon receptor-null allele mice have hematopoietic stem/progenitor cells with abnormal characteristics and functions. *Stem Cells Dev.* 2011;20(5):769-84.
267. Sirimanne SR, Patterson DG, Ma L, Justice JB. Application of cloud-point extraction-reversed-phase high-performance liquid chromatography. A preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998;716(1-2):129-37.
268. Slob W. Dose-response modeling of continuous endpoints. *Toxicol Sci.* 2002;66(2):298-312.
269. Soares-Mota M, Silva TA, Gomes LM, Pinto MA, Mendonça LM, Farias ML, et al. High prevalence of vitamin A deficiency in Crohn's disease patients according to serum retinol levels and the relative dose-response test. *World J Gastroenterol.* 2015;21(5):1614-20.
270. Söderström G, Sellström U, de Wit CA, Tysklind M. Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209). *Environ Sci Technol.* 2004;38(1):127-32.
271. Söğüt E, Kadı H, Karayakalı M, Mertoğlu C. The association of plasma vitamin A and E levels with coronary collateral circulation. *Atherosclerosis.* 2015;239(2):547-51.
272. Stapleton HM, Alae M, Letcher RJ, Baker JE. Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. *Environ Sci Technol.* 2004;38(1):112-9.
273. Stapleton HM, Eagle S, Sjödin A, Webster TF. Serum PBDEs in a North Carolina toddler cohort: associations with handwipes, house dust, and socioeconomic variables. *Environ Health Perspect.* 2012;120(7):1049-54.
274. Stapleton HM, Kelly SM, Allen JG, McClean MD, Webster TF. Measurement of polybrominated diphenyl ethers on hand wipes: estimating exposure from hand-to-mouth contact. *Environ Sci Technol.* 2008;42(9):3329-34.
275. Stapleton HM, Kelly SM, Pei R, Letcher RJ, Gunsch C. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by human hepatocytes in vitro. *Environ Health Perspect.* 2009;117(2):197-202.
276. Strid A, Smedje G, Athanassiadis I, Lindgren T, Lundgren H, Jakobsson K, et al. Brominated flame retardant exposure of aircraft personnel. *Chemosphere.* 2014;116:83-90.
277. Takahashi N, Takasu S. A close relationship between type 1 diabetes and vitamin A-deficiency and matrix metalloproteinase and hyaluronidase activities in skin tissues. *Exp Dermatol.* 2011;20(11):899-904.
278. Tang GW, Russell RM. 13-cis-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J Lipid Res.* 1990;31(2):175-82.
279. Tanumihardjo SA, Penniston KL. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J Lipid Res.* 2002;43(2):350-5.
280. Tashtoush BM, Jacobson EL, Jacobson MK. A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(3):859-64.
281. Teerlink T, Copper MP, Klaassen I, Braakhuis BJ. Simultaneous analysis of retinol, all-trans- and 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxoretinoic acid in plasma by liquid chromatography using on-column concentration after single-phase fluid extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;694(1):83-92.
282. Teglia CM, Gil García MD, Galera MM, Goicoechea HC. Enhanced high-performance liquid chromatography method for the determination of retinoic acid in plasma. Development, optimization and validation. *J Chromatogr A.* 2014;1353:40-8.

283. Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cellular and molecular life sciences*. 2010;67(9):1423-45.
284. Thomas GO, Wilkinson M, Hodson S, Jones KC. Organohalogen chemicals in human blood from the United Kingdom. *Environ Pollut*. 2006;141(1):30-41.
285. Thomsen C, Knutsen HK, Liane VH, Frøshaug M, Kvale HE, Haugen M, et al. Consumption of fish from a contaminated lake strongly affects the concentrations of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in serum. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(2):228-37.
286. Tomita S, Okuyama E, Ohnishi T, Ichikawa Y. Characteristic properties of a retinoic acid synthetic cytochrome P-450 purified from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-induced rats. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1290(3):273-81.
287. Tonk EC, Pennings JL, Piersma AH. An adverse outcome pathway framework for neural tube and axial defects mediated by modulation of retinoic acid homeostasis. *Reprod Toxicol*. 2014.
288. Topletz AR, Tripathy S, Foti RS, Shimshoni JA, Nelson WL, Isoherranen N. Induction of CYP26A1 by metabolites of retinoic acid: evidence that CYP26A1 is an important enzyme in the elimination of active retinoids. *Mol Pharmacol*. 2015;87(3):430-41.
289. Torabi B, Shemirani F. A new approach to highly sensitive determination of retinoic acid isomers by preconcentration with CdSe quantum dots. *Talanta*. 2014;120:34-9.
290. Törnkvist A, Glynn A, Aune M, Darnerud PO, Ankarberg EH. PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005--levels and dietary intake estimations. *Chemosphere*. 2011;83(2):193-9.
291. Trasino SE, Gudas LJ. Vitamin A: a missing link in diabetes? *Diabetes Manag (Lond)*. 2015;5(5):359-67.
292. Tseng LH, Hsu PC, Lee CW, Tsai SS, Pan MH, Li MH. Developmental exposure to decabrominated diphenyl ether (BDE-209): effects on sperm oxidative stress and chromatin DNA damage in mouse offspring. *Environ Toxicol*. 2011;28(7):380-9.
293. Tseng LH, Lee CW, Pan MH, Tsai SS, Li MH, Chen JR, et al. Postnatal exposure of the male mouse to 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabrominated diphenyl ether: decreased epididymal sperm functions without alterations in DNA content and histology in testis. *Toxicology*. 2006;224(1-2):33-43.
294. Tseng LH, Li MH, Tsai SS, Lee CW, Pan MH, Yao WJ, et al. Developmental exposure to decabromodiphenyl ether (PBDE 209): effects on thyroid hormone and hepatic enzyme activity in male mouse offspring. *Chemosphere*. 2008;70(4):640-7.
295. UE. Reglamento (UE) 2017/227 de la comisión que modifica, por lo que respecta al bis(pentabromofenil)éter, el anexo XVII del Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH). *Diario Oficial de la Unión Europea* 2017.
296. Ukleja A, Scolapio JS, McConnell JP, Spivey JR, Dickson RC, Nguyen JH, et al. Nutritional assessment of serum and hepatic vitamin A levels in patients with cirrhosis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2002;26(3):184-8.
297. US EPA. Toxicological review of Decabromodiphenyl ether (BDE-209). In: U.S. Environmental Protection Agency Washington D, editor. 2008.
298. US EPA. An Exposure Assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers. In: National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Washington D, editor. 2010.
299. US EPA. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks. 2015 [Available from: <https://www.epa.gov/enforcement/enforcement-annual-results-fiscal-year-fy-2015>].
300. Van Breemen RB, Huang CR. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of retinoids. *FASEB J*. 1996;10(9):1098-101.
301. Van Breemen RB, Nikolic D, Xu X, Xiong Y, van Lieshout M, West CE, et al. Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1998;794(1-2):245-51.

302. Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunström B, Cook P, Feeley M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 1998;106(12):775-92.
303. Van den Berg M, Birnbaum L, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological sciences.* 2006;93(2):223-41.
304. Van den Bogaard EH, Bergboer JG, Vonk-Bergers M, van Vlijmen-Willems IM, Hato SV, van der Valk PG, et al. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2013;123(2):917-27.
305. Van der Ven LT, van de Kuil T, Leonards PE, Slob W, Cantón RF, Germer S, et al. A 28-day oral dose toxicity study in Wistar rats enhanced to detect endocrine effects of decabromodiphenyl ether (decaBDE). *Toxicol Lett.* 2008;179(1):6-14.
306. Van der Ven LT, van de Kuil T, Leonards PE, Slob W, Lilienthal H, Litens S, et al. Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicol Lett.* 2009;185(1):51-62.
307. Van der Ven LT, van de Kuil T, Verhoef A, Leonards PE, Slob W, Cantón RF, et al. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. *Toxicology.* 2008;245(1-2):109-22.
308. Van der Ven LT, Verhoef A, van de Kuil T, Slob W, Leonards PE, Visser TJ, et al. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. *Toxicol Sci.* 2006;94(2):281-92.
309. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(23):2198-207.
310. Van heusden J, Wouters W, Ramaekers FC, Krekels MD, Dillen L, Borgers M, et al. All-trans-retinoic acid metabolites significantly inhibit the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Br J Cancer.* 1998;77(1):26-32.
311. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature.* 2008;453(7191):106-9.
312. Venne P, Yargeau V, Segura PA. Quantification of ecdysteroids and retinoic acids in whole daphnids by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2016;1438:57-64.
313. Viluksela M, Heikkinen P, van der Ven LT, Rendel F, Roos R, Esteban J, et al. Toxicological profile of ultrapure 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180) in adult rats. *PLoS One.* 2014;9(8):e104639.
314. Viñas P, Bravo-Bravo M, López-García I, Hernández-Córdoba M. An evaluation of cis- and trans-retinol contents in juices using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorimetric detection. *Talanta.* 2013;103:166-71.
315. Viñas P, Bravo-Bravo M, López-García I, Hernández-Córdoba M. Quantification of  $\beta$ -carotene, retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate in enriched fruit juices using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2013;1275:1-8.
316. Vizcaino E, Grimalt JO, Glomstad B, Fernandez-Somoano A, Tardon A. Gestational weight gain and exposure of newborns to persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect.* 2014;122(8):873-9.
317. Vizcaino E, Grimalt JO, Lopez-Espinosa MJ, Llop S, Rebagliato M, Ballester F. Polybromodiphenyl ethers in mothers and their newborns from a non-occupationally exposed population (Valencia, Spain). *Environ Int.* 2011;37(1):152-7.
318. Vogeser M, Seger C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem.* 2010;56(8):1234-44.
319. Wahlberg P, Fex G. Retinoic acid concentrations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer.* 1996;32A(2):366-7.

320. Wang CJ, Pao LH, Hsiong CH, Wu CY, Whang-Peng JJ, Hu OY. Novel inhibition of cis/trans retinoic acid interconversion in biological fluids--an accurate method for determination of trans and 13-cis retinoic acid in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;796(2):283-91.
321. Wang J, Yoo HS, Obrochta KM, Huang P, Napoli JL. Quantitation of retinaldehyde in small biological samples using ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2015;484:162-8.
322. Wang LH, Wang JF. Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retinyl acetate in pharmaceuticals by RP-LC with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;25(5-6):785-93.
323. Wang Y, Chang WY, Prins GS, van Breemen RB. Simultaneous determination of all-trans, 9-cis, 13-cis retinoic acid and retinol in rat prostate using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2001;36(8):882-8.
324. Watanabe W, Shimizu T, Sawamura R, Hino A, Konno K, Hirose A, et al. Effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, on the immune response to respiratory syncytial virus infection in mice. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(4):393-7.
325. Werner EA, Deluca HF. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(3):E672-8.
326. White RD, Shea D, Schlezinger JJ, Hahn ME, Stegeman JJ. In vitro metabolism of polychlorinated biphenyl congeners by beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and pilot whale (*Globicephala melas*) and relationship to cytochrome P450 expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000;126(3):267-84.
327. WHO UNEP. Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. In: (NHD) DoNfHaD, editor. 2011.
328. WHO UNEP. State of the science of endocrine disrupting chemicals . 2012 [Bergman Å, Heindel JJ, Joblings S, Kidd KA, Zoeller RT:[Available from: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>].
329. Wiecek M, Maciejczyk M, Szymura J, Szygula Z, Kantorowicz M. Changes in Non-Enzymatic Antioxidants in the Blood Following Anaerobic Exercise in Men and Women. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143499.
330. Wingerath T, Kirsch D, Spengler B, Kaufmann R, Stahl W. High-performance liquid chromatography and laser desorption/ionization mass spectrometry of retinyl esters. *Anal Chem.* 1997;69(19):3855-60.
331. Wolf G. Retinoic acid activation of peroxisome proliferation-activated receptor delta represses obesity and insulin resistance. *Nutr Rev.* 2010;68(1):67-70.
332. Woollard DC, Bensch A, Indyk H, McMahon A. Determination of vitamin A and vitamin E esters in infant formulae and fortified milk powders by HPLC: Use of internal standardisation. *Food Chem.* 2016;197(Pt A):457-65.
333. Wyss R. Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995;671(1-2):381-425.
334. Wyss R, Bucheli F. Determination of endogenous levels of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), all-trans-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;700(1-2):31-47.
335. Wyss R, Bucheli F, Hartenbach R. Determination of 13-cis-3-hydroxyretinoic acid, all-trans-3-hydroxyretinoic acid and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;18(4-5):761-76.
336. Xue X, You J, He P. Simultaneous determination of five fat-soluble vitamins in feed by high-performance liquid chromatography following solid-phase extraction. *J Chromatogr Sci.* 2008;46(4):345-50.
337. Yang C, Chen J, Liu Z, Yun C, Li Y, Piao J, et al. Association of Vitamin A Status with Overnutrition in Children and Adolescents. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(12):15531-9.
338. Ye YR, Bektic E, Buchta R, Houlden R, Hunt B. Simultaneous determination of tretinoin and clindamycin phosphate and their degradation products in topical formulations by reverse phase HPLC. *J Sep Sci.* 2004;27(1-2):71-7.

339. You CS, Parker RS, Swanson JE. Bioavailability and vitamin A value of carotenes from red palm oil assessed by an extrinsic isotope reference method. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2002;11 Suppl 7:S438-42.
340. Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky L. Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(3):292-7.
341. Zhao J, Zhu X, Xu T, Yin D. Structure-dependent activities of polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated metabolites on zebrafish retinoic acid receptor. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015;22(3):1723-30.
342. Zheng X, Xu F, Chen K, Zeng Y, Luo X, Chen S, et al. Flame retardants and organochlorines in indoor dust from several e-waste recycling sites in South China: composition variations and implications for human exposure. *Environ Int*. 2015;78:1-7.
343. Zhu C, Xie Q, Zhao B. The role of AhR in autoimmune regulation and its potential as a therapeutic target against CD4 T cell mediated inflammatory disorder. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):10116-35.
344. Zhu D, Wang Y, Pang Y, Liu A, Guo J, Bouwman CA, et al. Quantitative analyses of beta-carotene and retinol in serum and feces in support of clinical bioavailability studies. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(16):2427-32.
345. Zile MH. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr*. 2001;131(3):705-8.
346. Zile MH, Inhorn RC, DeLuca HF. Metabolites of all-trans-retinoic acid in bile: identification of all-trans- and 13-cis-retinoyl glucuronides. *J Biol Chem*. 1982;257(7):3537-43.

