

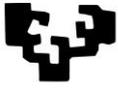
Trabajo Fin de Grado
Grado en Química

Metabolómica dirigida aplicada a la búsqueda de biomarcadores de esquizofrenia

Egilea/Autor:
Endika Romillo Fernández
Zuzendaria/Director/a:
Rosa María Alonso Rojas



eman ta zabal zazu

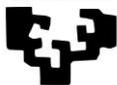


Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología





TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN QUÍMICA

METABOLÓMICA DIRIGIDA APLICADA A LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE ESQUIZOFRENIA

**MEMORIA PRESENTA POR ENDIKA ROMILLO
FERNÁNDEZ**

FECHA DE MATRICULACIÓN Y DEFENSA: 25 de Junio de 2015

DIRECTOR/A: Rosa María Alonso Rojas

Departamento: Química Analítica

eman ta zabal zazu

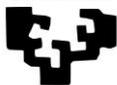


Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología





Índice

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. ESQUIZOFRENIA Y SU PROBLEMÁTICA.....	1
1.2. METABOLÓMICA.....	4
1.3. METABOLÓMICA Y ENFERMEDADES DEL SNC.....	9
1.4. METABOLÓMICA Y ESQUIZOFRENIA.....	10
1.5. OBJETIVO.....	16
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
2.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	17
2.2. INSTRUMENTACIÓN.....	18
2.3. TOMA DE MUESTRA.....	20
2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	21
2.4.1. Tratamiento de muestra:Precipitación de proteínas	21
2.4.2. Condiciones cromatográficas.....	21
2.4.2.1. Análisis de ácidos orgánicos.....	21
2.4.2.2. Análisis de azúcares.....	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. ANÁLISIS DE ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	23
3.2. AZÚCARES.....	28
4. CONCLUSIONES.....	36
5. BIBLIOGRAFÍA.....	37

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

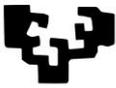


ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Euskadi
2 0 0 6



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. ESQUIZOFRENIA Y SU PROBLEMÁTICA

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico multifactorial, cuyo desarrollo está influenciado por un conjunto de factores genéticos y ambientales que contribuyen a la manifestación de un espectro de síntomas. Es un desorden devastador que afecta al 0,5-1% de la población mundial y por lo general afecta a adultos jóvenes. Se caracteriza por una alteración profunda en la cognición y la emoción, desarrollando síntomas psiquiátricos como delirios y alucinaciones, es decir, síntomas negativos en los que las bases emocionales y de comportamiento disminuyen o desaparecen. Se desarrollan también síntomas de deterioro cognitivo como comportamiento desorganizado o catatónico, problemas de atención, concentración, ralentización psicomotriz, reducción en la habilidad de trabajar y cuidar de sí mismo. Todo ello provoca una dependencia total o parcial que puede conducir a una discapacidad permanente.^{1,2}

A pesar de la investigación desarrollada, los procesos patofisiológicos moleculares que subyacen en esta enfermedad permanecen desconocidos. La falta de herramientas de diagnóstico molecular fiables hace que en la actualidad el diagnóstico de la esquizofrenia se base en una interpretación subjetiva de los síntomas que presentan los pacientes, así como en entrevistas con los familiares.³

La terapia con psicofármacos es el pilar principal del tratamiento de esta enfermedad, especialmente en sus fases agudas, en las que los psiquiatras administran a los pacientes fármacos neurolepticos o antipsicóticos convencionales, como el haloperidol, la clorpromazina y la flufenazina (**Figura 1**). En los últimos años, los fármacos antipsicóticos atípicos (AAPD) han demostrado su superioridad sobre los neurolepticos convencionales en términos de eficacia y efectos secundarios. Entre estos fármacos AAPD se incluyen la olanzapina, la clozapina y la risperidona entre otros (**Figura 2**).

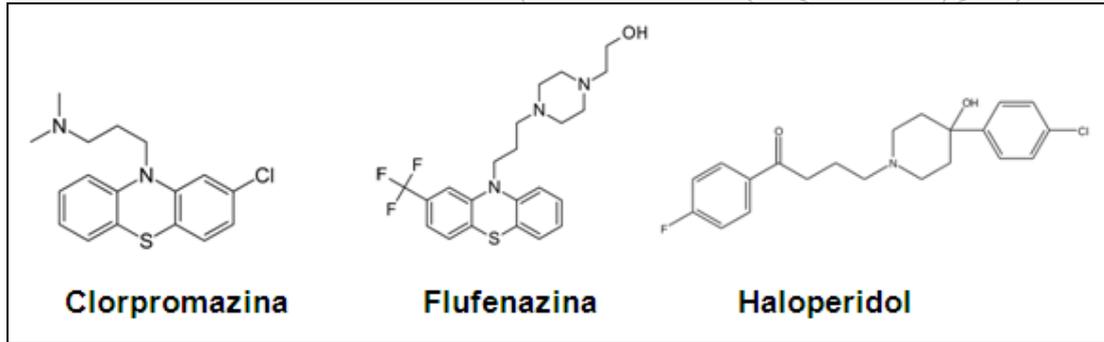


Figura 1. Estructura química de algunos fármacos antipsicóticos típicos.

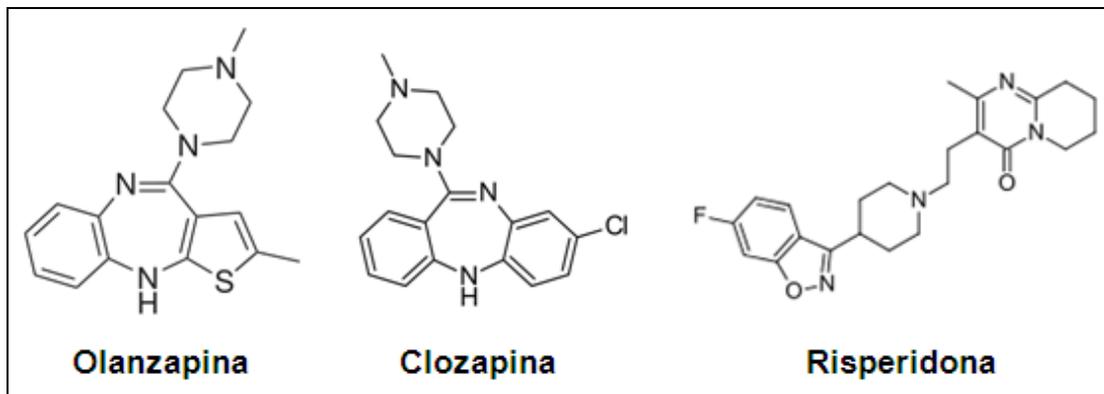


Figura 2. Estructura química de algunos fármacos AAPD.

Existen multitud de evidencias que ponen de manifiesto que pacientes con esquizofrenia difieren de los controles sanos en lo relativo a parámetros neuropatológicos, bioquímicos y genéticos. Por otro lado queda patente la existencia de factores ambientales desencadenantes como un trauma infantil o una infección viral neonatal entre otras, pero aún no se han obtenido resultados satisfactorios a nivel clínico que permitan asegurar un diagnóstico fiable.⁴

En un intento de conseguir este diagnóstico fiable se recurre a las ciencias ómicas con el fin de esclarecer la enfermedad a nivel molecular. Las ciencias ómicas engloban a todas las disciplinas, tecnologías y áreas de investigación que estudian el conjunto o totalidad de un sistema biológico, proporcionando gran cantidad de información. Entre ellas se encuentran la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, como se muestra en

la **Figura 3**, y son complementarias entre sí. Todas ellas constituyen nuevas herramientas de conocimiento que posibilitan el avance científico en áreas más específicas, como puede ser la búsqueda de biomarcadores.

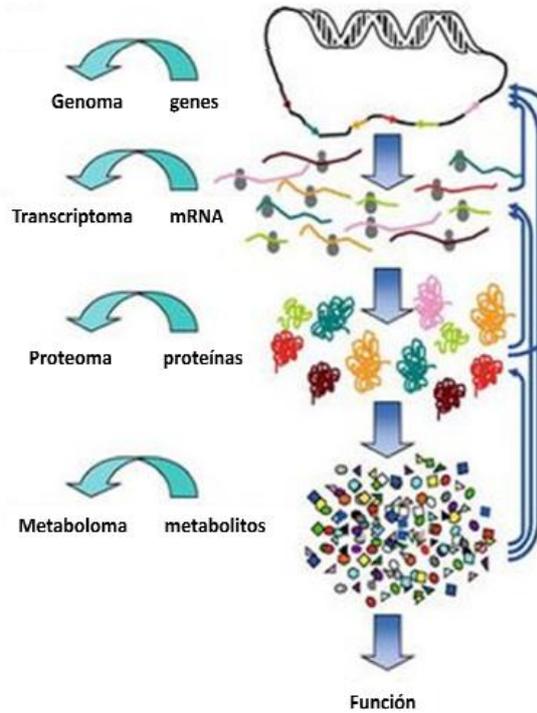


Figura 3. Cascada de las ciencias ómicas.

Un biomarcador es un compuesto (metabolito) del sistema biológico humano que se analiza en sangre, plasma, orina, etc. Se mide y se evalúa de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Así mismo se puede definir como la propiedad biológica de un humano o animal cuya medición in vitro o identificación es útil para la prevención, diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de las enfermedades, además de su comprensión.⁵

En este trabajo, se utilizará como ciencia ómica la metabolómica, para la búsqueda de biomarcadores de la esquizofrenia. Como se observa en la **Figura 4** es una técnica que está en auge en los últimos años.

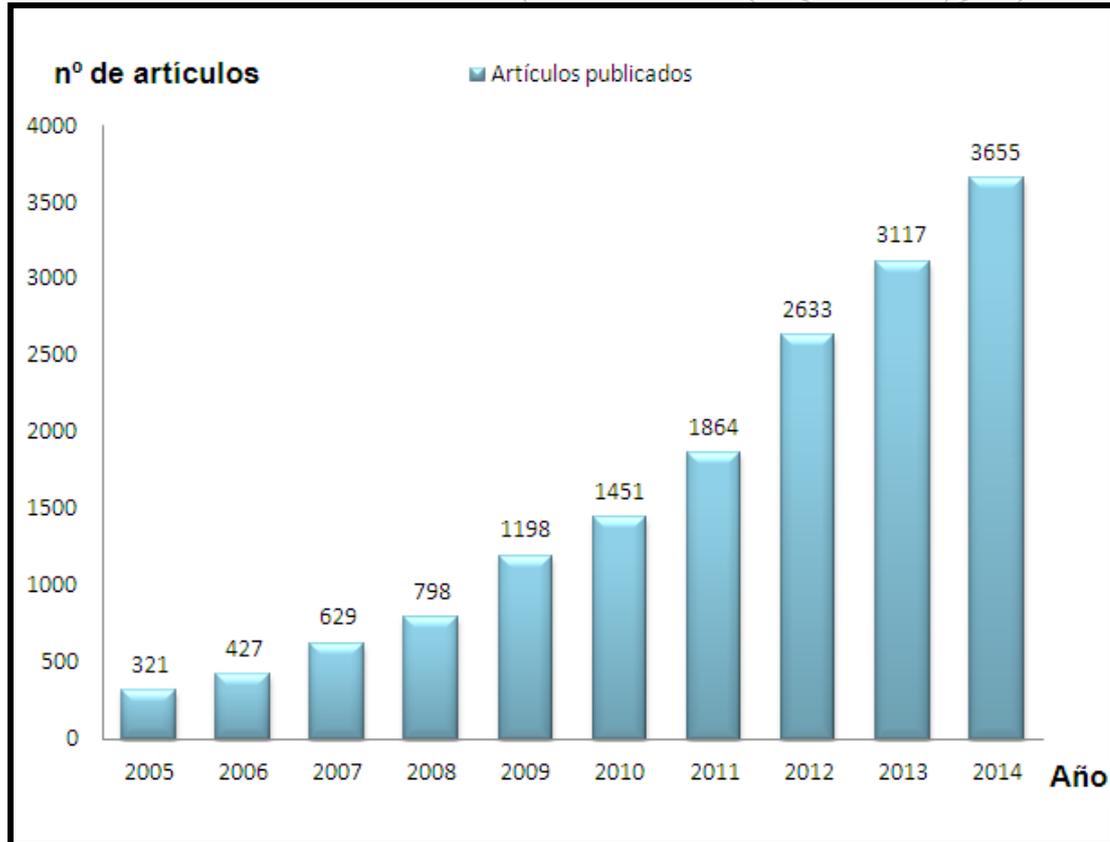


Figura 4. Evolución de las publicaciones de los artículos sobre metabolómica en los 10 últimos años. (Fuente: SciFinder, Keywords: Metabolomics).

1.2. METABOLÓMICA

Como se ha mencionado anteriormente, la metabolómica es una ciencia “ómica” que se centra en la identificación, cuantificación y caracterización del metaboloma.⁶ Consiste en el estudio y comparación de todas las moléculas de bajo peso molecular (<1200 Da), que intervienen en los procesos celulares y nos revela el funcionamiento del metabolismo para un determinado órgano o ser vivo en un momento dado. Estas moléculas de bajo peso molecular son denominadas metabolitos y entre ellos se encuentran intermediarios del metabolismo, hormonas y otras moléculas de señalización, así como metabolitos secundarios. La ausencia o presencia de alguno de estos compuestos, así como la concentración relativa de ellos, puede ser un indicador del estado en el que se encuentra el ser vivo objeto de estudio. Mientras que otras ómicas, como la genómica y la proteómica,

nos indican lo que podría haber pasado en el organismo, la metabolómica nos da información sobre lo que realmente ha pasado y, por lo tanto, es la ciencia que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos. Asimismo ayuda a entender mejor los mecanismos bioquímicos, a identificar biomarcadores, a cuantificar metabolitos en distintos entornos, así como en diferentes flujos biológicos. Además, la metabolómica le ha sido la técnica mas empleada en los últimos años en comparación con las demás ciencias ómicas, como se puede ver en la **Figura 5**.

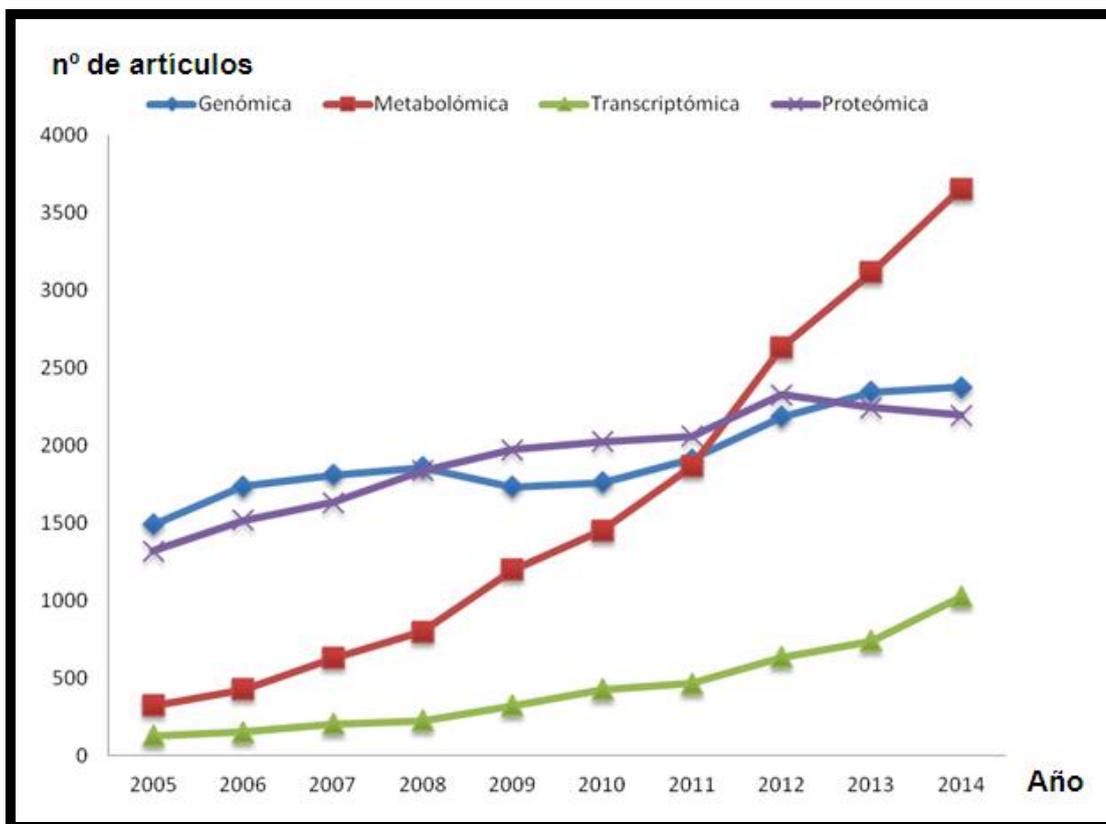


Figura 5. Evolución de las publicaciones sobre las distintas ciencias “ómicas” en los 10 últimos años. (Fuente: SciFinder, Keywords: Genomics, Metabolomics, Transcriptomics y Proteomics).

Existen dos variantes de la metabolómica, la dirigida y la no dirigida, siendo ambas complementarias. Por un lado, la metabolómica no dirigida consiste en la obtención del perfil metabólico mediante el análisis de todo el metaboloma, mientras que por otro lado, la metabolómica dirigida se enfoca en un conjunto de metabolitos conocidos. En este último tipo de

metabolómica, la identificación de los metabolitos se ha obtenido haciendo usos de bases de datos o mediante la realización previa de una metabolómica no dirigida.^{3,7}

El flujo de trabajo en metabolómica se recoge en la **Figura 6**. En primer lugar se realiza la recogida y almacenaje de las muestras, que deben ser lo más reproducibles posibles y adecuadas tipo de muestra a estudiar con tal de que no influyan negativamente en los datos finales.³

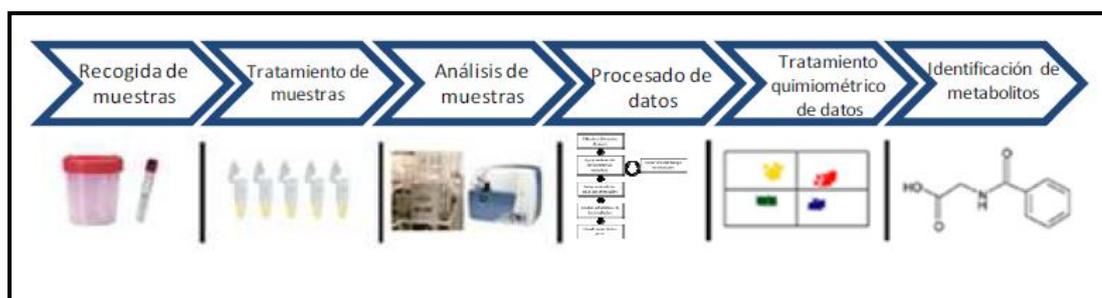


Figura 6. Flujo de trabajo en metabolómica.

La segunda etapa, el tratamiento de muestra, depende de la matriz a analizar y de la técnica analítica que se emplee. Como el objetivo es analizar el mayor número de metabolitos el mejor tratamiento de muestra es aquel en el que la muestra se modifique lo menos posible. Las matrices que se suelen analizar en metabolómica suelen ser plasma, fluido cerebroespinal, orina, hígado, heces y células entre otras. Es importante conocer el procedimiento de tratamiento de muestra para las diferentes matrices porque es un paso muy crítico a la hora de obtener resultados óptimos. En el caso de la orina, por ejemplo, una simple dilución es el procedimiento más común. Mientras que para el plasma las más comunes suelen ser una extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida.^{8,9,10} En este trabajo se utilizará el método de precipitación de proteínas, previamente optimizado por el grupo investigador, como tratamiento de muestra.

El análisis de las muestras en metabolómica, requiere el empleo de técnicas analíticas universales, capaces de analizar cientos e incluso miles de compuestos de naturaleza muy diversa y de forma simultánea. Las dos



técnicas más empleadas en este campo son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas (MS). La RMN proporciona la información estructural más detallada de los metabolitos, pero su aplicación tiene limitaciones por su sensibilidad y complejidad.^{11,12} Esta técnica determina las propiedades físicas y químicas de los átomos o las moléculas en las que están contenidos. Para ello se mide la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias, donde es el núcleo de los átomos el que está envuelto en la absorción.¹³ Por otro lado, la Espectroscopía de Masas (MS) sirve para identificar y cuantificar compuestos desconocidos de interés, además de dilucidar la estructura y las propiedades químicas de las moléculas. Esta técnica analítica convierte los componentes de una muestra en iones gaseosos que se separan por su masa.^{14,15}

La MS se acopla a diferentes técnicas de separación como son la cromatografía de líquidos (LC) y la cromatografía de gases (GC). La técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) es adecuada dada su alta sensibilidad, pero la complejidad de las muestras biológicas hace que el análisis bidimensional GCxGC/MS, cobre importancia debido a que se logra una mejoría considerable en la separación de los metabolitos y disminuye la complejidad del análisis de los metabolitos de bajo peso molecular mediante MS.¹⁶ Esta última técnica se está utilizando cada vez en mayor medida. Hay que destacar que la utilización de la GC está limitada a muestras con compuestos volátiles o derivatizados químicamente para convertirlos en volátiles. Por otro lado, la separación de los analitos también se puede realizar por LC previo a su análisis por MS.¹⁷ La ventaja de la LC es que las muestras no necesitan una etapa de derivatización previa.

Muchos analitos no polares, se pueden analizar por GC o GCxGC/MS una vez derivatizados, pero no todos los metabolitos no polares pueden ser detectados. Para superar esta limitación se puede recurrir a otra técnica, la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC).¹⁸



Esta técnica de SFC combina propiedades tanto de la GC como de la LC, ya que la separación se lleva a cabo a una temperatura y presión elevadas y la muestra se encuentra en un estado gaseoso y posee una mayor fluidez.¹⁹ Por lo tanto, las moléculas que no son volátiles y por consecuencia no se pueden analizar por GC a veces se pueden separar mediante SFC. Lo mismo se puede aplicar a los compuestos no polares que son insolubles en disolventes acuosos y no se pueden separar mediante LC.²⁰

En definitiva, la obtención de datos fiables de los metabolitos requiere de un análisis amplio mediante el mayor número de herramientas analíticas posibles, como son las diferentes técnicas y métodos analíticos. Es decir, no hay un único ensayo que permita la detección e identificación de todos los metabolitos en una muestra biológica, así que se tendrán que emplear diferentes técnicas analíticas para un análisis metabolómico. Debido a la complejidad de estos análisis, a menudo se lleva a cabo una metabolómica dirigida para experimentos específicos.¹⁸

Una vez realizados los análisis por los diferentes métodos analíticos, la siguiente etapa consiste en procesar los datos obtenidos y en tratarlos convenientemente para hallar los metabolitos presentes en las muestras analizadas.

Por lo tanto, la metabolómica es una ciencia que permite obtener perfiles metabólicos, así como alteraciones en los mismos, que podrían estar asociados a una enfermedad o a un tratamiento farmacológico. Además, es una ciencia que se puede aplicar a muestras obtenidas de una forma no invasiva, como la orina o la saliva, o de una forma poco invasiva como la sangre. Debido a esta última ventaja, se emplea para el estudio de un amplio número de enfermedades. Entre estas enfermedades se encuentran las del Sistema Nervioso Central (SNC), que han sido descritas en una serie de trabajos recientes. Estos trabajos han demostrado la viabilidad y las ventajas del empleo de la metabolómica como herramienta para estudiar las múltiples rutas bioquímicas que podrían estar alteradas en las enfermedades del SNC.



1.3. METABOLÓMICA Y ENFERMEDADES DEL SNC

Una de las enfermedades del SNC en la que se ha aplicado la metabolómica es la Enfermedad de Huntington (HD), que es una enfermedad neurodegenerativa causada por la mutación en un gen. Se caracteriza por una neurodegeneración progresiva que se manifiesta por una alteración cognitiva, trastorno del comportamiento y una descoordinación en los movimientos.²¹ Se ha estudiado la concentración de diferentes metabolitos involucrados en el metabolismo energético del cerebro mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y de fósforo (^{31}P -RMN) empleando como matriz cerebro de ratón. Ambas son unas técnicas no destructivas.²² Algunos de los biomarcadores encontrados en el cerebro para esta enfermedad son el adenosín trifosfato (ATP), la creatina quinasa y el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) entre otros, los cuales han proporcionado un apoyo fundamental para la detección de señales precursoras antes de la neurodegeneración en esta enfermedad.²¹

Otra enfermedad muy importante del SNC es el Parkinson, que es el trastorno motor neurodegenerativo más común. Es fácil de reconocer por su prominente fenotipo locomotor, caracterizado por la bradicinesia (lentitud de movimiento), dificultad para iniciar el movimiento, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural. Caudle y col.²³ estudiaron las concentraciones de algunos metabolitos mediante RMN, LC-MS o GC-MS en muestras de orina y sangre de pacientes diagnosticados con esta enfermedad. Los metabolitos estudiados para esta enfermedad son la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), el ácido úrico y principalmente, la α -sinucleína, los cuales han demostrado ser biomarcadores óptimos para el seguimiento de la enfermedad, con una sensibilidad y especificidad buena.²⁴

Además de las dos enfermedades citadas, también se incluyen entre las patologías relacionadas con el SNC el trastorno bipolar, la depresión y la esquizofrenia. Este trabajo se centrará en las aportaciones de la metabolómica dirigida a la búsqueda de posibles biomarcadores de la esquizofrenia.



1.4. METABOLÓMICA Y ESQUIZOFRENIA

La aplicación de la metabolómica a una enfermedad como la esquizofrenia precisa conocer los metabolitos que sufren alteraciones en su concentración al desarrollar la enfermedad. Como ya se ha comentado en el flujo de trabajo, para la detección de estos metabolitos es necesario seguir una metodología definida, que va desde la toma de muestra hasta la identificación de los diferentes metabolitos. Hasta ahora la mayor parte de los experimentos realizados para la identificación de biomarcadores de enfermedades se han realizado en animales, más concretamente en ratones. Sin embargo, en este trabajo se llevará a cabo la determinación de ciertos metabolitos en plasma de pacientes diagnosticados como esquizofrénicos con el fin de obtener información sobre los posibles mecanismos alterados en la esquizofrenia en función de las diferencias encontradas.

En primer lugar se debe realizar una toma de muestra que generalmente consiste en obtener una muestra de sangre u orina. Además es necesario obtener el mayor número de muestras que aporten información específica (edad, sexo, enfermedad como diabetes o hiperlipidemia, desarrollo de síndrome metabólico, entre otros) que permitan agrupar a los individuos en función de las diferentes variables. Se analizarán diferentes grupos de individuos: uno es el grupo control, que son los que no han desarrollado la enfermedad y otro grupo son los que han desarrollado la enfermedad. En este último grupo se debe conocer si los pacientes están siendo tratados con fármacos o no, ya que si así fuera los metabolitos en estudio podrían estar alterados y los resultados podrían llevar a confusión. En caso de no estar recibiendo un tratamiento en el momento de la toma de muestra, hay que conocer cuánto tiempo llevan los pacientes sin medicación.

La revisión bibliográfica realizada sobre las aportaciones de la metabolómica a la esquizofrenia nos aporta la información recogida en la **Tabla 1** sobre posibles biomarcadores de la enfermedad.



Tabla 1. Metabolitos analizados como posibles marcadores de esquizofrenia a lo largo del tiempo

Año	Tipo de metabolómica	Biomarcador	Técnica analítica	Matriz	Metabolómica	Fármaco administrado	Referencia
2007	Metabolómica	colesterol	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Sangre	Dirigida	Aripiprazol Risperidona Olanzapina	25
		diacilglicerol (DAG)					
		ácidos grasos libres					
		triacilglicerol					
		fosfatidilcolina (PC)					
Apolipoproteína E							
2008	Proteómica	α-2-macroglobulina	Escala de los síndromes positivo y negativo (PANSS)	Sangre	Dirigida	—	26
2012	Proteómica	lisofosfatidilcolina (LPC)	inmunoensayo multiplex	Sangre	Dirigida	—	27
2012	Metabolómica	fosfatidilcolina (PC)	Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) + ESI MS	Sangre	Dirigida	—	28
		Fosfatidiletanolamina (PE)					
		fosfatidilglicerol (PG)					
		fosfatidilserina (PS)					
		ácido fosfatídico (PA)					
		triglicerido (TG)					
Fosfatidiletanolamina (PE)							
2013	Metabolómica	fosfatidilcolina (PC)	Extracción + cromatografía en capa fina	Plasma	Dirigida	Risperidona Aripiprazol	29, 30
		ácido araquidónico (AA)					
		Ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA)					
		Ácido eicosapentaenoico (EPA)					
2015	Metabolómica	Plasmalógenos de colina	Centrifugación a vacío + MS	Sangre	Dirigida	—	31
		Plasmalógenos de etanolamina					
		ácido docosahexaenoico					

Como se observa en la **Tabla 1**, los metabolitos analizados para diagnosticar la esquizofrenia generalmente son ácidos grasos y carbohidratos (azúcares). Se han estudiados también algunos aminoácidos sulfurados en plasma³² y se ha comprobado que sus niveles en enfermos de esquizofrenia estaban alterados, **Tabla 2**.

Tabla 2. Variación de los niveles de aminoácidos sulfurados en pacientes de esquizofrenia en muestras de plasma humano.

Metabolito	Ruta	Niveles	Referencia
Metionina	Ciclo de la metionina	Aumentan	33
Homocisteína	Ciclo de la metionina	Aumentan	34
Cisteína	Trans-sulfuración	Disminuyen	35
Cistina	Dímero de la cisteína	Disminuyen	36
Omitina	Precursor de poliaminas	Aumentan	37
Glutación	Antioxidante	Disminuyen	38

Así mismo, teniendo en cuenta los estudios que relacionan la esquizofrenia con la alteración del metabolismo glucídico y de ciertas proteínas, entre ellas algunas que están involucradas en el metabolismo central del carbono, en este trabajo se han analizado algunos de los productos de dichas proteínas, **Figura 7**, que se sospecha que pueden ser biomarcadores de la enfermedad.

Entre los metabolitos del metabolismo central del carbono se han seleccionado algunos azúcares y ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos han sido: gliceraldehido 3-fosfato (GA3F), ácido fosfoenolpirúvico (FEP) y ácido 6-fosfogluconico (6FG), ácido láctico (Lac), ácido piruvico (Pir), ácido 2-fosfoglicérico (2FG), ácido glucurónico (Gluc), ácido glutámico (Glut), ácido aspártico (Asp) y ácido galacturónico (Gal), cuyas estructuras químicas se muestran en la **Figura 8**. Los azúcares estudiados han sido fructosa 6-fosfato (F6F), glucosa 6-fosfato (G6F), fructosa 1,6-Bifosfato (F16bF), ribosa 5-fosfato (R5F) y maltosa (Mal), que se muestran en la **Figura 8**.

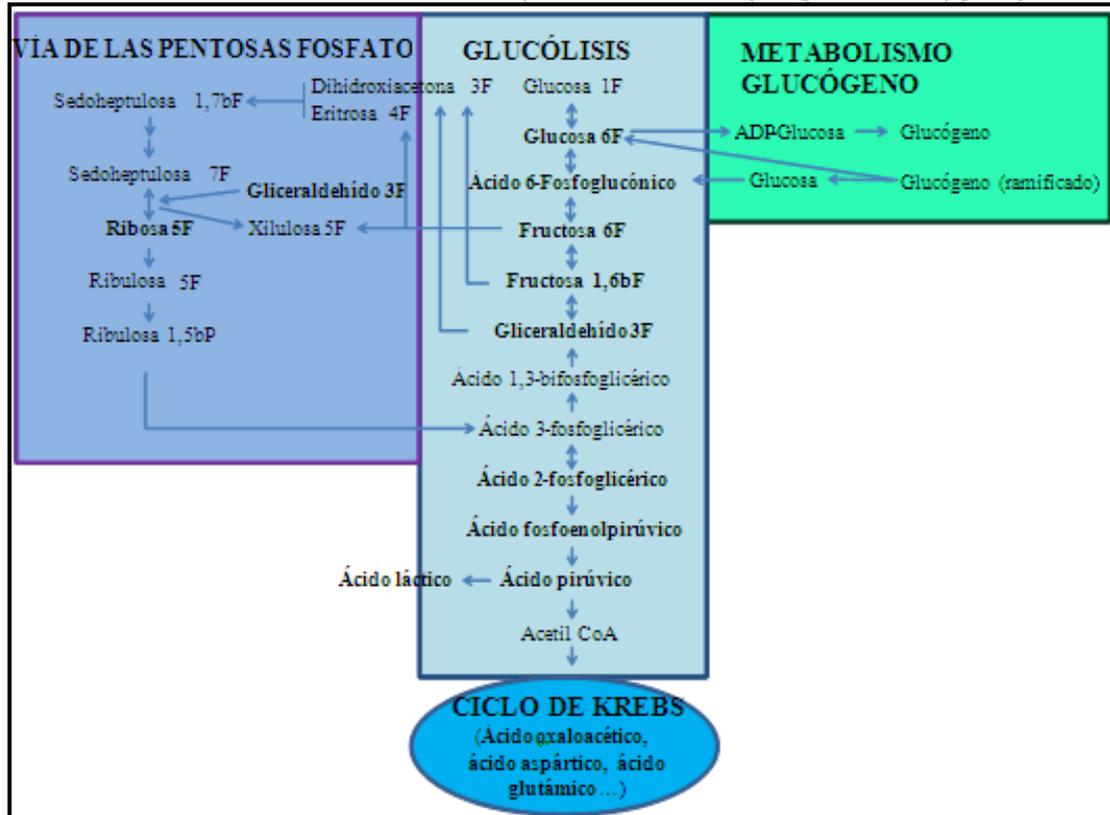


Figura 7. Rutas metabólicas implicadas en el metabolismo central del carbono. Se indican en **negrita** algunos de los metabolitos estudiados.

Entre los metabolitos del metabolismo central del carbono se han seleccionado algunos azúcares y ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos han sido: glicer aldehido 3-fosfato (GA3F), ácido fosfoenolpirúvico (FEP) y ácido 6-fosfogluconico (6FG), ácido láctico (Lac), ácido pirúvico (Pir), ácido 2-fosfoglicérico (2FG), ácido glucurónico (Gluc), ácido glutámico (Glut), ácido aspártico (Asp) y ácido galacturónico (Gal), cuyas estructuras químicas se muestran en la **Figura 8** Mientras que los azúcares estudiados son Fructosa 6-fosfato (F6F), Glucosa 6-fosfato (G6F), Fructosa 1,6-Bifosfato (F16bF), Ribosa 5-fosfato (R5F) y Maltosa (Mal), que se muestran en la **Figura 9**.

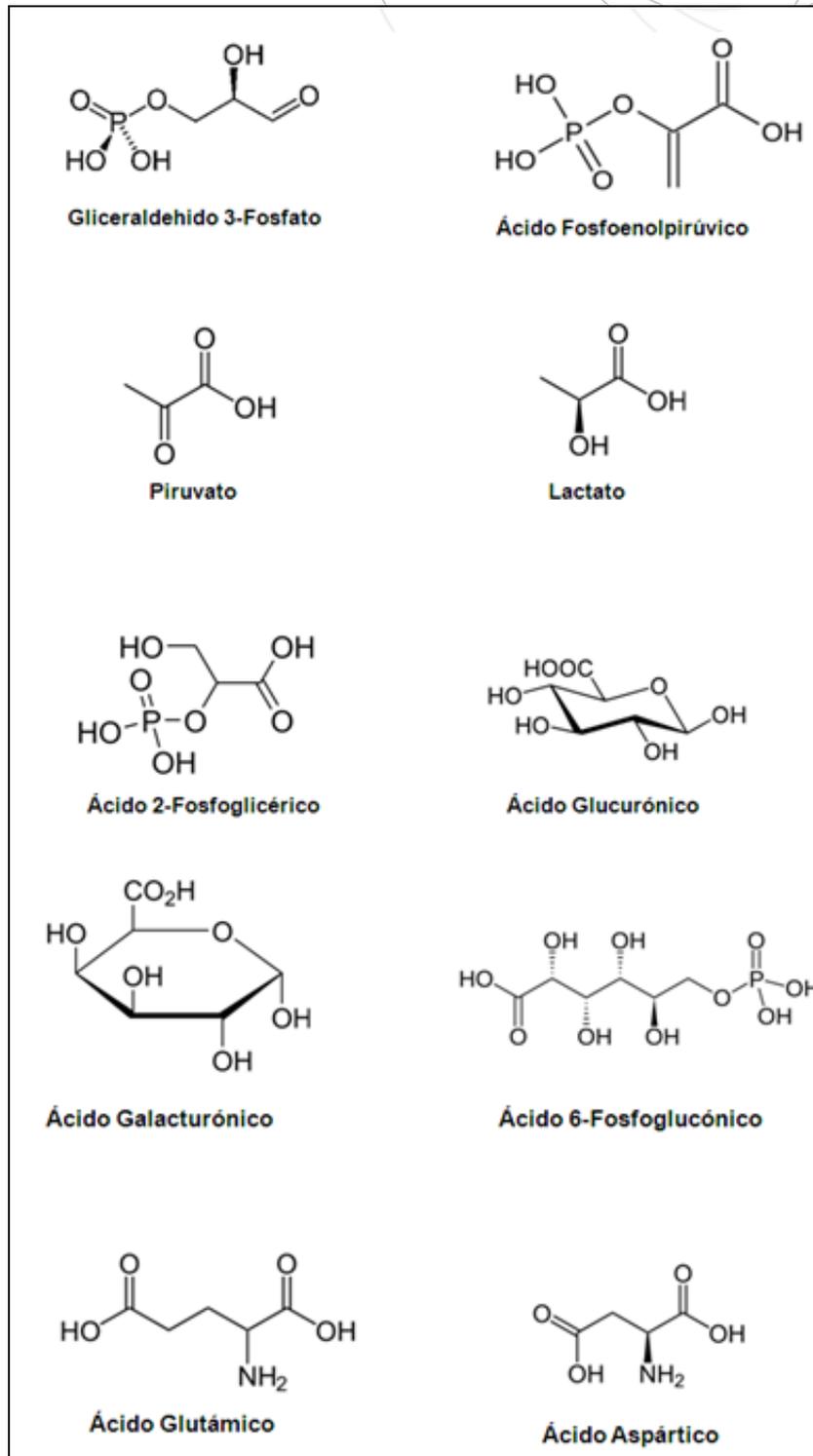


Figura 8. Estructuras químicas de los ácidos orgánicos estudiados.

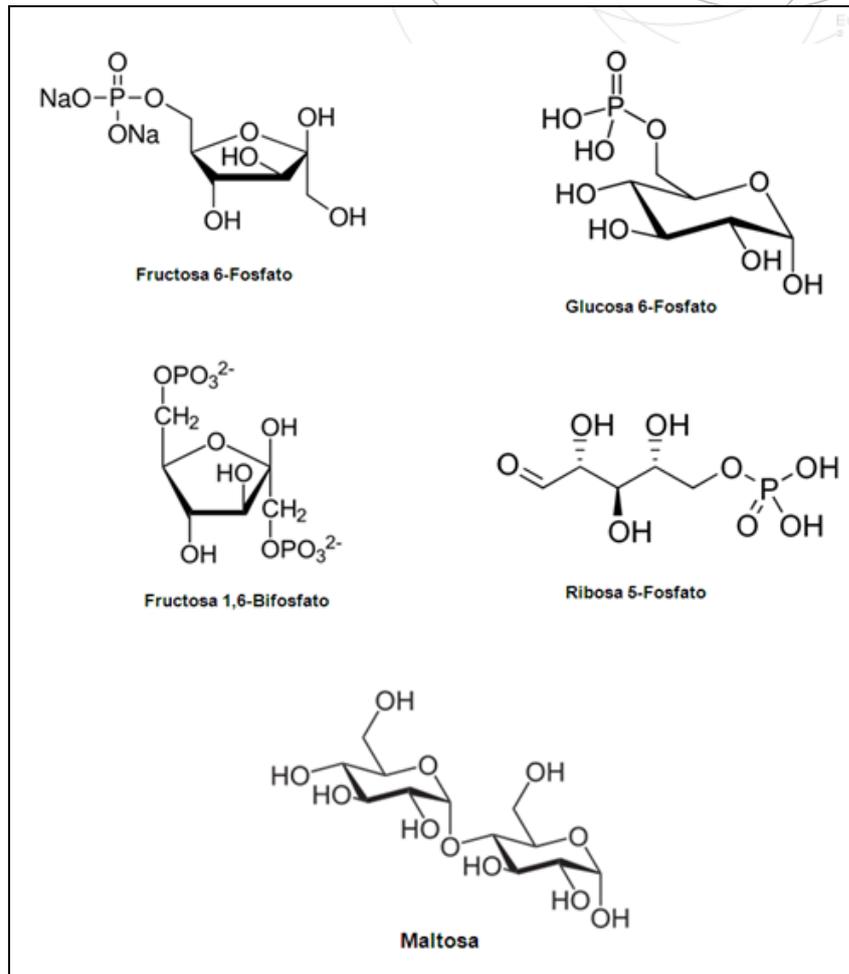


Figura 9. Estructuras químicas de los azúcares estudiados.

Debido al carácter aniónico que presentan los azúcares fosfato y los ácidos carboxílicos a valores neutros y básicos de pH, una técnica muy empleada para su análisis es la cromatografía líquida de intercambio iónico (conocida como cromatografía iónica).³ Dentro de esta técnica se distinguen la cromatografía iónica de exclusión iónica, la cromatografía iónica por afinidad, o la más utilizada, la de intercambio iónico. Esta última se basa en un proceso que permite la separación de iones y moléculas polares en función de su afinidad con el ion intercambiador. Dependiendo del tipo de iones que se quieren analizar, se emplea un intercambio catiónico o intercambio aniónico. Se aplica a cualquier tipo de molécula cargada como proteínas largas, nucleótidos pequeños y aminoácidos. Normalmente se utiliza para la



purificación de proteínas, análisis de agua, control de calidad y también se puede emplear para la separación de lantánidos.^{39,40}

Existen distintos modos de detección de los analitos, como la detección por conductividad o la detección electroquímica. La detección por conductividad es el detector clásico en cromatografía iónica y mide la conductividad, que es proporcional a la concentración de la muestra iónica y se utilizará en este trabajo para la determinación de los ácidos orgánicos.⁴¹ La detección electroquímica es una detección aplicable a compuestos orgánicos que se oxidan o se reducen y se emplea en este trabajo para la determinación de los azúcares de interés.⁴² La célula electroquímica, donde se mide la corriente eléctrica generada por el analito al ser oxidado o reducido, consta de un electrodo de trabajo, que dependerá de la aplicación, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar.⁴³ En este trabajo se utilizará un equipo de cromatografía iónica con diferentes tipos de detección (conductimétrica y electroquímica) para el análisis de los metabolitos anteriormente citados.

1.5. OBJETIVO

Ante la falta de herramientas moleculares para el diagnóstico de la esquizofrenia y dadas las posibilidades que ofrece la metabolómica para la búsqueda de biomarcadores de esta enfermedad, como ha quedado patente en la revisión bibliográfica realizada, el objetivo de este trabajo se centra en:

“Evaluar la potencialidad de la la metabolómica dirigida, en concreto la determinación de los metabolitos del metabolismo central del carbono (ácidos orgánicos y azúcares) como posibles biomarcadores de la esquizofrenia”.

Este objetivo se enmarca en un proyecto de investigación que tiene como objetivo global la búsqueda de biomarcadores de esquizofrenia mediante metabolómica tanto dirigida como no dirigida (obtención de los perfiles metabólicos) en muestras de plasma de pacientes diagnosticados con esta enfermedad.



2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los ácidos orgánicos: gliceraldehido 3-fosfato (GA3F), ácido fosfoenolpirúvico (FEP) y ácido 6-fosfogluconico (6FG), fueron obtenidas de la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España) y refrigeradas a -20°C . Los ácidos orgánicos: láctico (Lac), pirúvico (Pir), ácido 2-fosfoglicérico (2FG) fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España) y almacenados entre $2-8^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, el ácido glucurónico (Gluc), fue obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España) y almacenado a temperatura ambiente. Por último los ácidos orgánicos: ácido glutámico (Glut), ácido aspártico (Asp) y ácido Galacturónico (Gal) fueron suministrados por la casa comercial Fluka BioChemika (Madrid, España) y almacenados a temperatura ambiente.

Los azúcares: fructosa 6-fosfato (F6P), glucosa 6-fosfato (G6P), fructosa 1,6-Bisfosfato (F16bF) y ribosa 5-fosfato (R5F) fueron adquiridas a la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España) y almacenados a -20°C . Por otro lado la maltosa (Mal) de calidad para microbiología fue obtenida de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania) y almacenada entre 15 y 25°C en un lugar seco y protegido de la luz. Todos los reactivos poseían una pureza superior al 98%.

Los disolventes orgánicos metanol (MeOH) y acetonitrilo de calidad gradiente fueron suministrados por la casa comercial Teknokroma (Barcelona, España).

El hidróxido sódico utilizado como eluyente en cromatografía iónica y el ácido sulfúrico de calidad proanalysis fueron suministrados por la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania).

El plasma humano comercial utilizado fue obtenido de los laboratorios Seralab (Baltimore, USA) y almacenado a -20°C .



A lo largo de todo el trabajo se utilizó agua de calidad Milli-Q obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q Element A10 de Millipore (Milford, MA, EE.UU.).

Se prepararon disoluciones stock de los ácidos orgánicos de concentración 100 mg/L en metanol:agua (1:1) y se mantuvieron refrigeradas. Las disoluciones de trabajo de concentración 10 mg/L se prepararon por dilución con agua de las disoluciones stock.

Las disoluciones stock de los azúcares se prepararon en concentración 1000 mg/L en metanol:agua (1:1) y se almacenaron a -20°C. A partir de estas disoluciones por dilución con agua se obtuvieron las disoluciones de trabajo de 10 mg/L que se inyectaron en el cromatógrafo iónico.

2.2. INSTRUMENTACIÓN

Para la pesada de todos los reactivos se utilizó una balanza analítica Sartorius SE con una precisión de ± 0.0001 g.

La separación cromatográfica de los ácidos orgánicos se llevó a cabo usando un sistema cromatográfico Dionex DX-600 (Dionex, San Diego, California, E.E.U.U.), consistente en una bomba de gradiente Dionex GP50 y un detector de conductividad Dionex ED50. El equipo tiene acoplado un automuestreador Dionex AS40 con capacidad para 11 casetes de 6 viales de 5mL, PolyVial™, que incluyen un filtro de 20 μ m. La obtención de los datos se llevó a cabo usando la versión 6.8 del software Chromeleon de Dionex (San Diego, California, E.E.U.U.).

Para la separación de los ácidos orgánicos se empleó una columna analítica de intercambio aniónico AS11-HC (4 x 250 mm), que tiene un ion amonio cuaternario de alcanol como grupo funcional; una columna protectora AG11-HC (4 x 50 mm), una columna supresora AMMS 300 (4 mm) y una columna atrapadora de aniones de la fase móvil Dionex IonPac ATC-3 (9 x 24 mm) con un amonio cuaternario como ion intercambiador, termostatada a 35 °C. El volumen de inyección fue de 50 μ L, el flujo es de 1,45 mL/min y los

eluyentes utilizados fueron NaOH, agua Milli Q y ácido sulfúrico para asegurarse de que los analitos están como aniones.

La separación cromatográfica de los azúcares se llevó a cabo en el cromatógrafo iónico Dionex DX-600 (Dionex, San Diego, California, E.E.U.U.) acoplado a un detector electroquímico, que constaba de una célula de medida con 3 electrodos: un electrodo de trabajo de Au) sobre el que se produce la oxidación de los azúcares, un electrodo de referencia (Ag/AgCl) y un electrodo auxiliar de Pt. En la **Figura 10** se muestra la onda de potencial aplicada. Se utilizó una columna de intercambio iónico CarboPac® PA10 (4 x 250 mm) con un sustrato (55% etilvinilbenceno entrecruzado con divinilbenceno) de 10 µm de diámetro aglomerado con un ion amonio (5% entrecruzado) disfuncional de 460 nm MicroBead™. Además contiene una columna protectora Carbopack PA10 (4 x 50 mm) y una columna atrapadora de aniones de la fase móvil Dionex IonPac ATC-3 (9 x 24 mm) con un amonio cuaternario como ion intercambiador, termostatas a 35 °C.

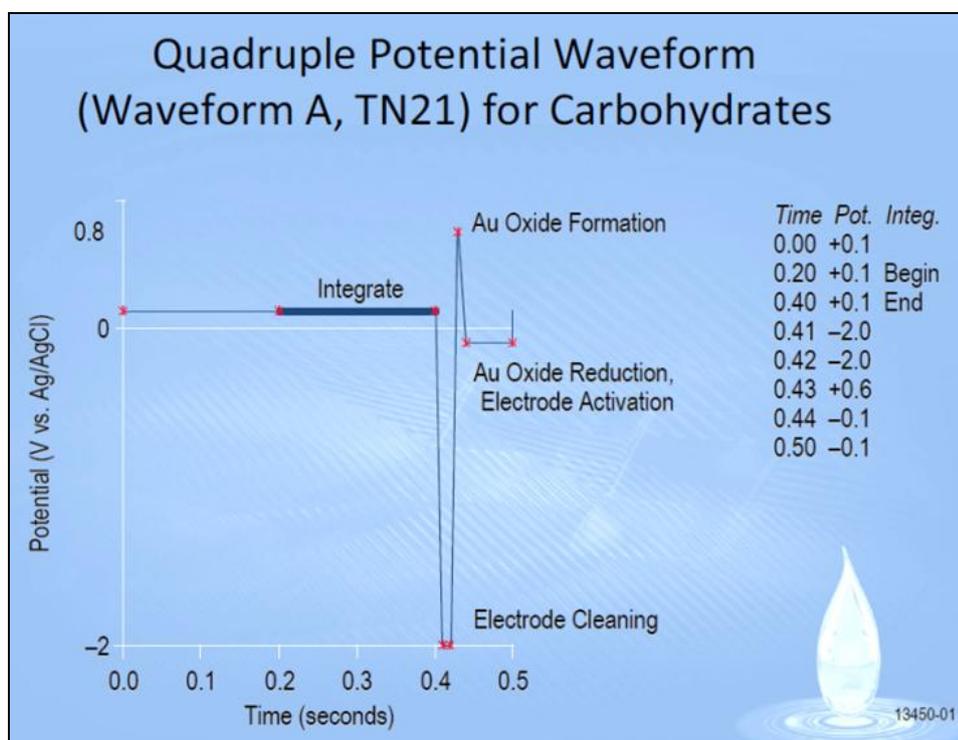


Figura 10. Forma de la onda de potencial aplicada al electrodo de trabajo de Au en el detector electroquímico.

En la precipitación de proteínas se utilizó un VWR Mixer Dig Vortex 230V EU (VWR International, Radnor-Pennsylvania, E.E.U.U.) y una centrifugadora Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf Ibérica S.L.U., San Sebastian de los Reyes-Madrid, España).

2.3. TOMA DE MUESTRA

En la toma de muestra se emplearon tubos de extracción de sangre Vacutainer de la casa comercial Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) con EDTA como agente anticoagulante. Esta toma de muestra se realizó en la Unidad de Neuroquímica del Hospital Psiquiátrico de Zamudio. Las muestras de sangre se centrifugaban a 3000 rpm y 4 °C para la obtención del plasma. El sobrenadante se transfiere a viales y se almacena a -80°C hasta su análisis.

Se obtuvieron muestras de plasma “control” de individuos no diagnosticados con esquizofrenia y muestras de pacientes diagnosticados con esquizofrenia, gracias a la colaboración de la Unidad de Neuroquímica del Hospital Psiquiátrico de Zamudio.

Se recogen en la Tabla 3 las características de las muestras control y de pacientes esquizofrénicos analizadas en este trabajo.

Tabla 3. Muestras control y de pacientes utilizados para los análisis de ácidos orgánicos y azúcares.

Muestra	Sexo	Edad	Tratamiento
471 (Control)	Mujer	53	—
A154	Mujer	48	Abandonado hace 4 semanas
474 (Control)	Mujer	53	—
A128	Mujer	50	Abandonado hace 4 semanas



En este trabajo no se ha podido contar con un número más elevado de muestras dado que la Unidad de Neuroquímica está pendiente del resultado de la solicitud realizada al Comité de Etica del Hospital de Galdácano. Para la obtención de muestras de pacientes diagnosticados con esquizofrenia.

Las muestras de plasma humano comercial se doparon con disoluciones de todos los analitos en concentración de 15 mg/L. Para el análisis de ácidos orgánicos se doparon con los analitos Lac, GA3F, 6FG, Asp, FEP, 2FG, Pir, Glut, Gal, Ácido Glu; mientras que para la determinación cualitativa de azúcares se soparon con F6F, G6F, F16bF, R5F y Mal

2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.4.1. Tratamiento de muestra: Precipitación de proteínas

Se seleccionó como tratamiento de la matriz plasma la precipitación de proteínas con acetonitrilo, procedimiento que había demostrado ser adecuado para la obtención de perfiles metabólicos en plasma humano, dado que permitía obtener de una forma reproducible el mayor número de metabolitos,⁴⁴

El procedimiento consistió en: verter en un tubo eppendorf la muestra de plasma y añadir acetonitrilo frío en una proporción 1:2 (Plasma: ACN). Se agitó el tubo con un Vortex durante 10 segundos aproximadamente. A continuación se llevó a la centrifugadora durante 10 minutos a 10.000 rpm con el fin de que todas las proteínas queden en el fondo del eppendorf. Después se recoge el sobrenadante y se lleva a otro tubo eppendorf. El sobrenadante se hace pasar por un filtro de 0,2 μm .

2.4.2. Condiciones cromatográficas

2.4.2.1 Análisis de ácidos orgánicos

Se ha optimizado el gradiente de elución utilizado para la separación de los ácidos orgánicos. Para ello se han ensayado siete gradientes de elución

diferentes, V1 a V7, **Figura 11**, utilizando un flujo de 1,45 mL/min y un volumen de inyección de 50 μ L.

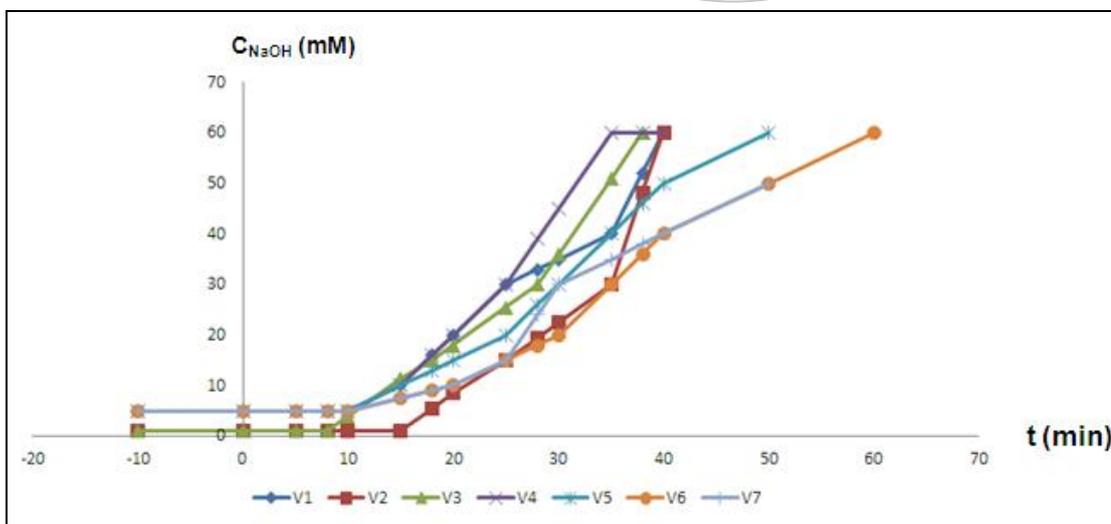


Figura 11. Gradientes de elución ensayados en la optimización del análisis de ácidos orgánicos.

2.4.2.2 Análisis de azúcares

El gradiente de elución empleado en el sistema de cromatografía iónica para el análisis de azúcares, previamente optimizado, es el recogido en la **Figura 12**.

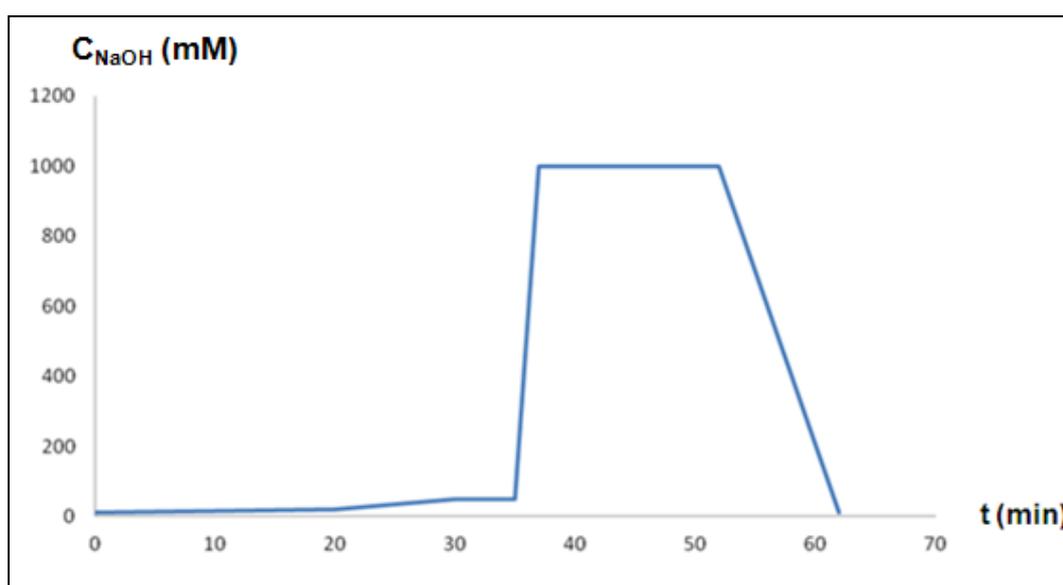


Figura 12. Gradiente de elución del análisis de azúcares.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Del estudio realizado para la optimización del gradiente de elución, se dedujo, en base a los tiempos de elución de los analitos (que no se incrementara el tiempo de análisis total), la línea base obtenida y la resolución de los picos cromatográficos, que el gradiente óptimo para la separación de los ácidos orgánicos era el V7, que se muestra en la **Figura 13**.

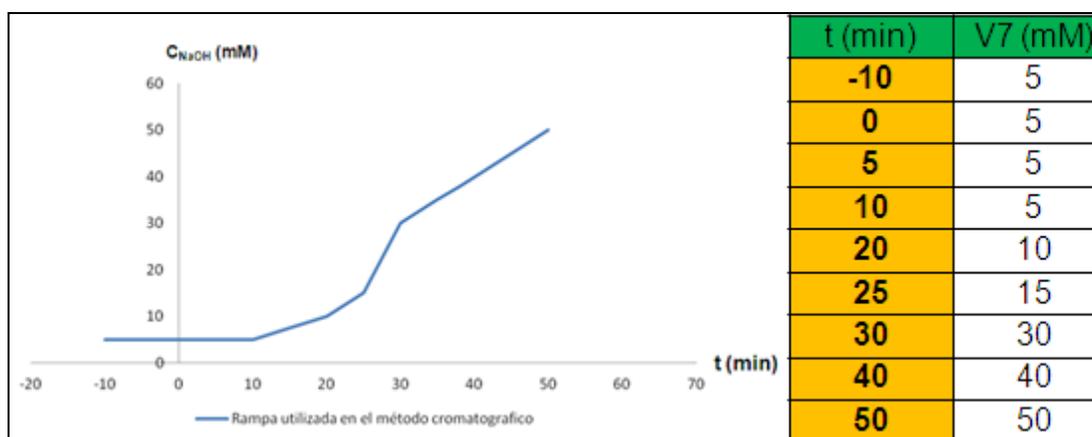


Figura 13. Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico de los ácidos orgánicos y variación de la concentración de eluyente NaOH a cada tiempo.

Una vez optimizado el gradiente de elución, se inyectaron disoluciones estandar de todos los ácidos orgánicos estudiados con el fin de establecer su comportamiento cromatográfico. En la **Figura 14** se muestra el cromatograma obtenido de los ácidos seleccionados en este estudio y en la **Tabla 4** los correspondientes tiempos de retención.

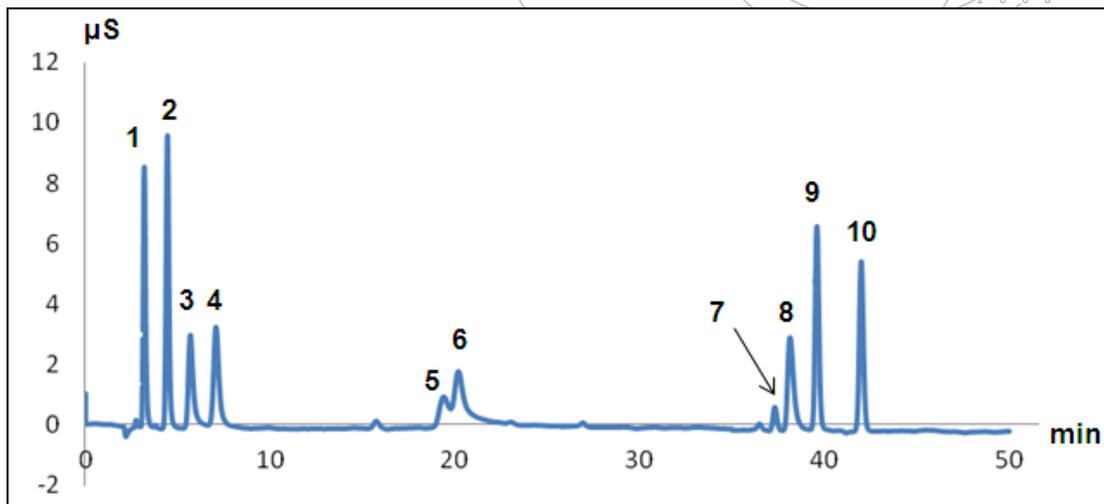


Figura 14. Cromatograma de disoluciones estándar de los ácidos orgánicos estudiados en concentración de 10 mg/L y en las condiciones cromatográficas recogidas en el apdo. 3.1.

Tabla 4. Orden de elución y tiempos de retención de los ácidos orgánicos.

	Ácido orgánico	t_R (min)
1	ácido láctico	3,19
2	ácido pirúvico	4,44
3	ácido Galacturónico	5,64
4	ácido glucurónico	7,06
5	ácido glutámico	19,29
6	ácido aspártico	20,22
7	GA3F	37,28
8	6FG	38,15
9	2FG	39,57
10	FEP	42,00

Para conocer el efecto de la matriz plasma sobre el comportamiento cromatográfico de los analitos, se inyectó un plasma humano comercial dopado con los analitos. A continuación se inyectaron una muestra de plasma de un control (471) y una muestra de un paciente esquizofrénico que había abandonado el tratamiento hacía 4 semanas (muestra A153) con el fin de estudiar las posibles diferencias en los metabolitos encontrados en ambas muestras. Se observa un desplazamiento de los tiempos de retención de los ácidos orgánicos en la matriz plasma respecto a las disoluciones

estándar y también existe un desplazamiento entre las dos muestras de plasma control y de la paciente esquizofrénica, **Figura 15**.

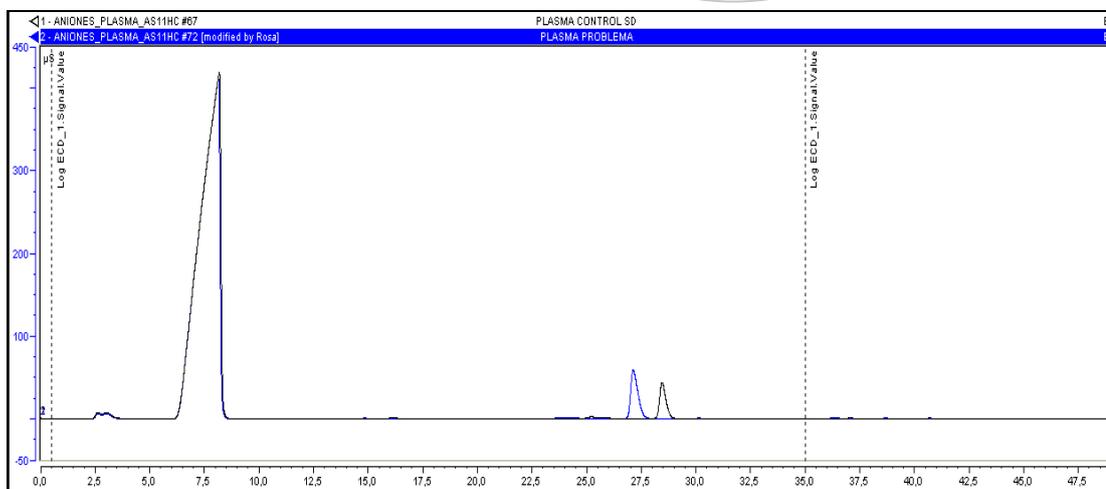


Figura 15. Cromatograma completo del análisis de la muestra control (**negro**) y la muestra de la paciente (**azul**) entre 0 y 50 min y con una conductividad entre -50 y 450 μ S, Condiciones cromatográficas recogidas en el apartado 3.1.

Se realizó un estudio pormenorizado de los cromatogramas obtenidos para la muestra de plasma control y la muestra del paciente. En primer lugar se observan picos cromatográficos a tiempos de retención cortos, **Figura 16**, que coeluyen. Por otro lado se aprecia como los niveles de los compuestos disminuye en la muestra del paciente de esquizofrenia. Se atribuyó el pico cromatográfico que eluye a 3,19 min al ácido láctico, por lo que se puede concluir que existen diferencias en el contenido de este ácido entre muestras de plasma control y las del paciente, lo que podría abrir una vía de investigación sobre las posibilidades del ácido láctico como biomarcador de la esquizofrenia.

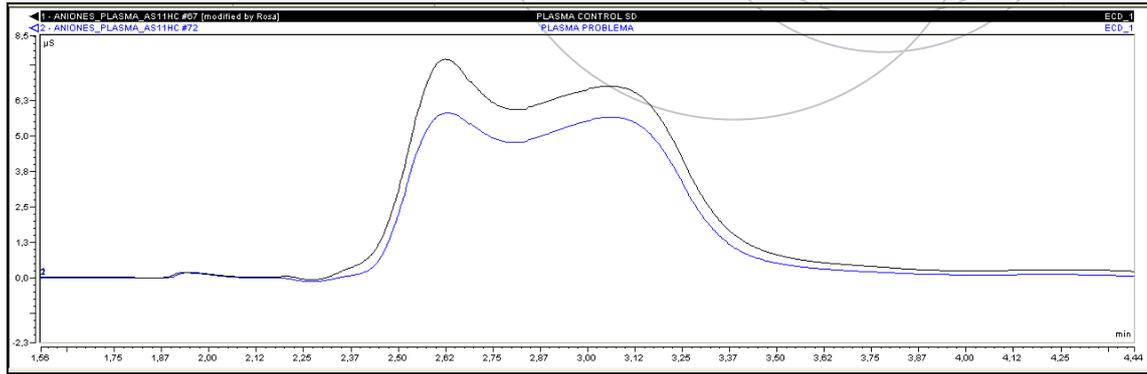


Figura 16. Cromatograma del plasma control (negro) y plasma de la paciente (azul) a un tiempo entre 1,56 y 4,44 min, y una conductividad entre -2,3 y 8,5 μ S. Condiciones cromatográficas recogidas en el apartado 3.1.

No se observan diferencias en el área cromatográfica del pico que aparece a un tiempo de retención de 7,5 minutos, **Figura 15**, para las dos muestras. Los siguientes picos significativos son los que se muestran en la **Figura 17**, donde se aprecia que los picos del plasma control eluyen a tiempos más largos. En este caso se observa como existen diferencias entre las dos muestras y en concreto para el pico cromatográfico a un tiempo de retención de 14 min los niveles de este analito en el plasma del paciente aumentan con respecto al control. Por lo que, aunque no es un analito identificado, se podría concluir que existen alteraciones en el metabolismo de los enfermos esquizofrénicos que hace que aumenten los niveles de este compuesto. Sería necesario realizar un estudio más amplio para identificar este compuesto.

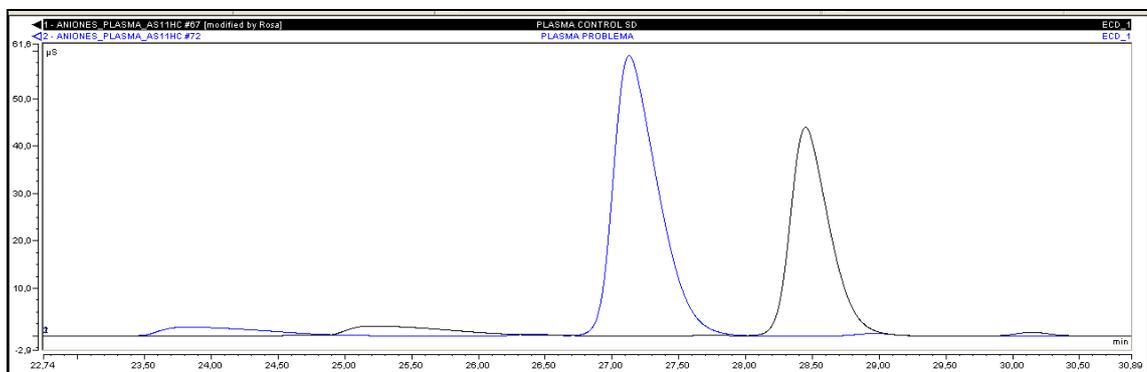


Figura 17. Cromatograma del plasma control (negro) y plasma de la paciente (azul) a un tiempo entre 22,74 y 30,89 min, y una conductividad entre -2,9 y 61,6 μ S, Condiciones cromatográficas recogidas en el apartado 3.1.

Por último, en la **Figura 18** se muestran cinco picos cromatográficos diferentes, a los tiempos de retención más largos, donde se observa el desplazamiento de los tiempos de retención del plasma control respecto a los del plasma del paciente (eluye a tiempos más largos). En la **Tabla 5** se recogen las asignaciones realizadas para cada pico cromatográfico.

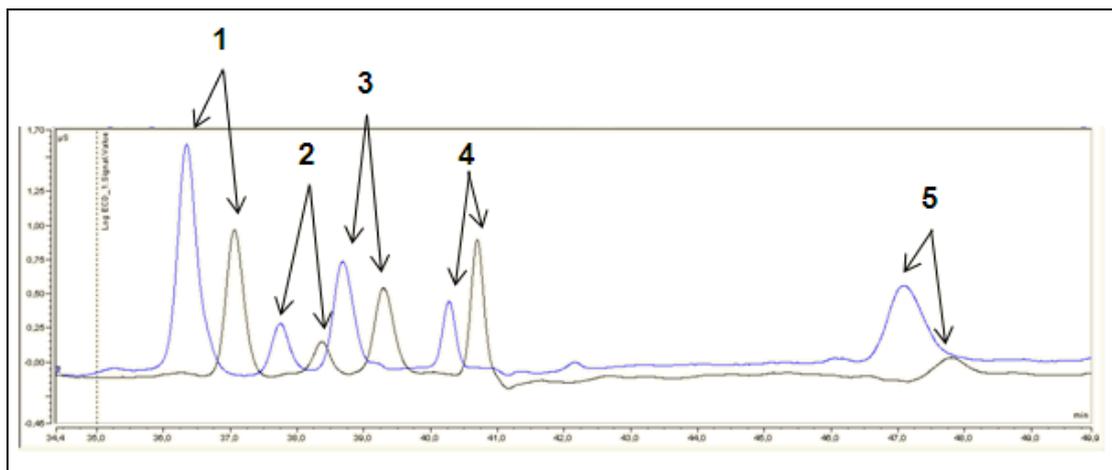


Figura 18. Cromatograma del plasma control (**negro**) y plasma de la paciente (**azul**) a un tiempo entre 34,4 y 49,9 min, y una conductividad entre -0,45 y 1,70 μS . Condiciones cromatográficas recogidas en el apartado 3.1..

Tabla 5. Ácidos orgánicos obtenidos en el cromatograma de la **Figura 18**.

	Compuesto	t_R (min)
1	GA3F	37,10
2	6FG	38,30
3	2FG	39,25
4	FEP	40,75
5	Desconocido	47,10

En la **Figura 18** se observan diferencias de comportamiento entre las dos muestras, en concreto los niveles de los compuestos 1, 2, 3 y 5 aumentan en enfermos de esquizofrenia, mientras que para el compuesto 4 disminuyen.

En la **Tabla 6** se recogen los ácidos orgánicos que presentan diferencias entre la muestra control y la muestra del paciente, lo que posibilitaría en una investigación futura considerar a dichos compuestos como potenciales

biomarcadores. Sin embargo, este estudio inicial pone de manifiesto la necesidad de ampliar el estudio e incluso utilizar otras técnicas analíticas que permitan la identificación de algunos de los picos cromatográficos no identificados.

Tabla 6. Diferencias observadas en los niveles de ácidos orgánicos entre muestra control y muestra de paciente esquizofrénico

Compuesto	t _R (min)	Variación de la concentración en esquizofrenia
Lac	3,12	Disminuye
Desconocido	29,5	Aumenta
GA3F	37,1	Aumenta
6FG	38,3	Aumenta
2FG	39,25	Aumenta
FEP	40,75	Disminuye
Desconocido	47,1	Aumenta

3.2. ANÁLISIS DE AZÚCARES

Se estudió en primer lugar el comportamiento cromatográfico de los azúcares seleccionados y mostrados en la Figura 9. Para ello se inyectaron disoluciones estándar los azúcares, obteniéndose el cromatograma de la **Figura 19**, a partir del que se calcularon los tiempos de retención de cada analito, (**Tabla 7**).

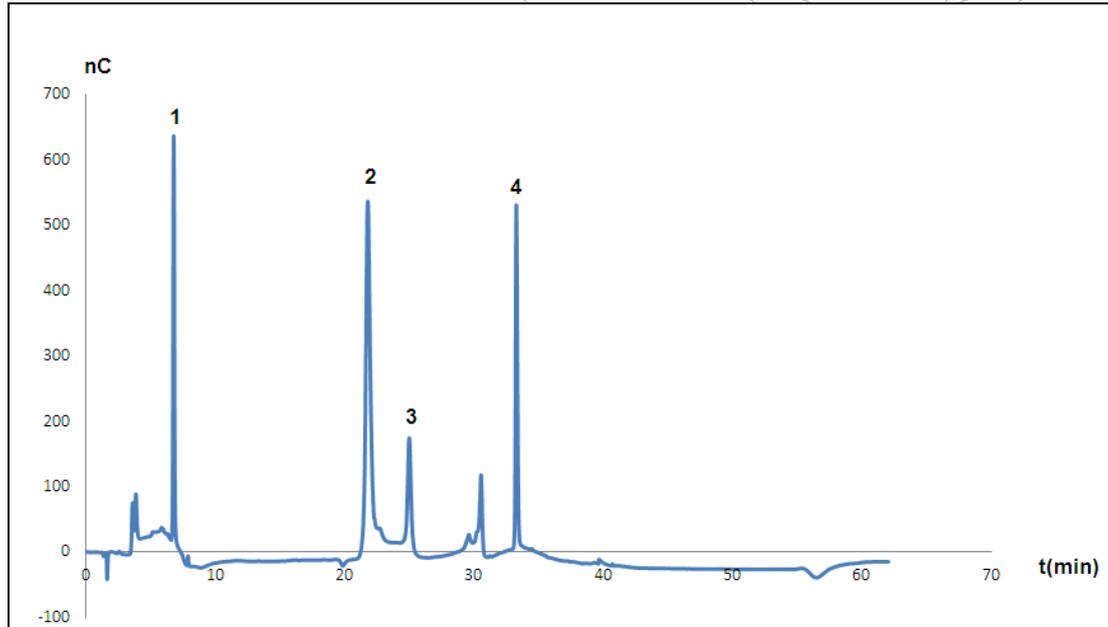


Figura 19. Cromatograma de disoluciones estándar de los azúcares estudiados en medio acuoso en concentración de 10 mg/L y en las condiciones cromatográficas recogidas en el apdo. 2.4.2.2.

Tabla 7. Tiempos de retención de los azúcares analizados.

	Azúcar estudiado	t_R (min)
1	Mal	6,78
2	G6F	21,78
3	F6F	24,98
3	R5F	25,00
4	F16bF	33,25

A la vista del cromatograma y los tiempos de retención obtenidos, se dedujo que dos picos cromatográficos coeluyen a 25 minutos. Se comprobó si en realidad la fructosa 6-fosfato y la ribulosa -5-fosfato eran los analitos que coelúan, para lo cual se inyectaron cada analito por separado y una disolución conjunta de ambos azúcares. En el cromatograma de la **Figura 20** queda patente como ambos azúcares coeluyen.

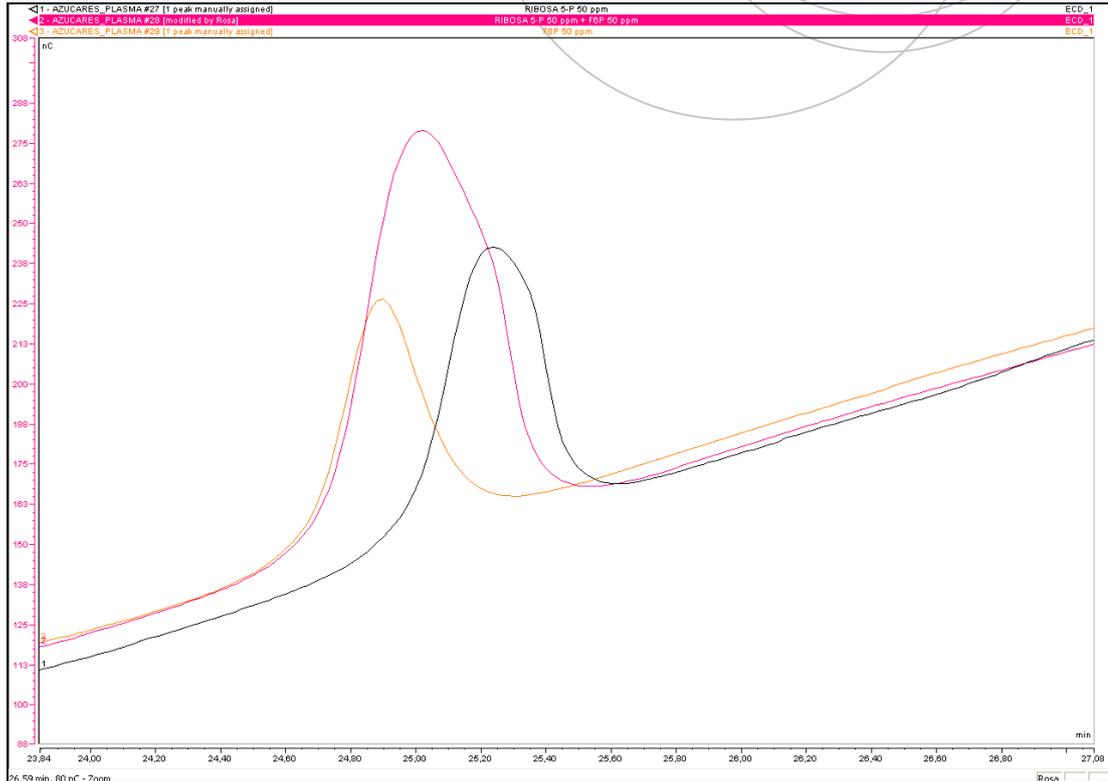


Figura 20. Cromatograma de disoluciones estándar de F6F (*naranja*) y R5F (*negra*), y de una disolución conjunta de ambos (*rosa*) entre 23,84 y 27,08 min, 88 y 308 nC.
.Condiciones cromatográficas recogidas en el apdo. 2.4.2.2.

Después de conocer el tiempo de retención de los analitos de interés se lleva a cabo el análisis de la muestra control y la muestra del paciente con esquizofrenia. En la **Figura 21** se muestra el cromatograma completo obtenido en este análisis. Como se puede observar, aparece un pico cromatográfico a un tiempo de retención cercano a 3 min con una gran área cromatográfica y que no se corresponde con ninguno de los azúcares estudiados.

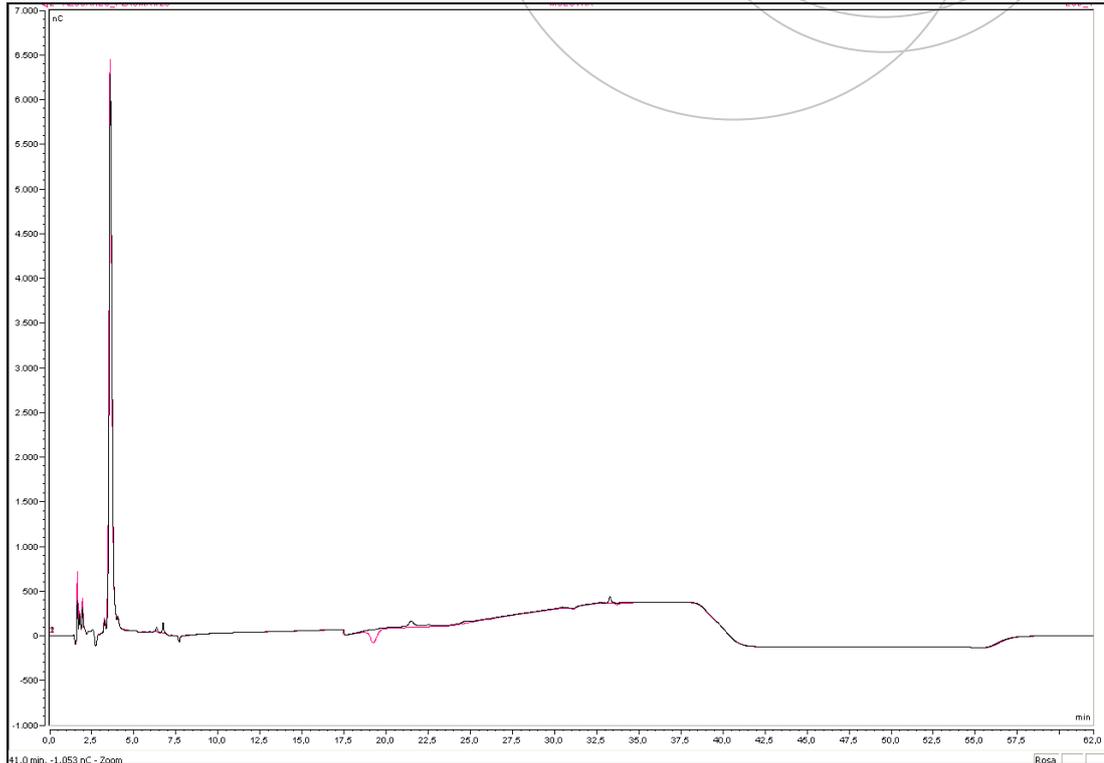


Figura 21. Cromatograma de la muestra control (**negro**) y la muestra de la paciente de esquizofrenia (**rosa**) entre -1000 y 7000 nC. Condiciones cromatográficas recogidas en el apdo. 2.4.2.2.

Se realizó un análisis pormenorizado del resto de los picos cromatográficos obtenidos. En la **Figura 22** se muestran los picos entre el minuto 0,69 y el minuto 3,06. Aparecen 3 picos cromatográficos cuya área es superior en la muestra del paciente de esquizofrenia respecto al control. Estos tres picos cromatográficos no se corresponden con ninguno de los azúcares estudiados y se precisaría realizar su identificación.

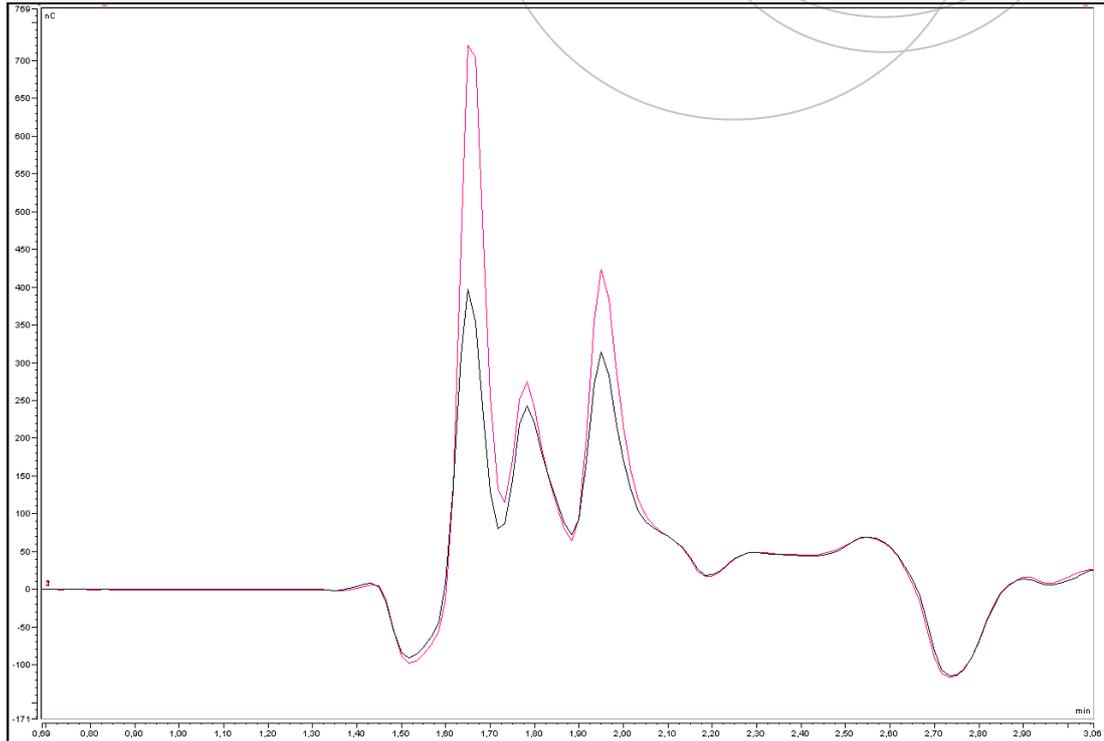


Figura 22. Cromatograma de la muestra control (negro) y muestra del paciente (rosa) entre 0,69 y 3,06 minutos y -171 y 759 nC. Condiciones cromatográficas recogidas en el apdo.

2.4.2.2.

En la **Figura 23** se observa un pico cromatográfico con un área grande, donde no se aprecian cambios muy significativos entre ambas muestras. El pico obtenido se atribuye a la glucosa, pero es probable que coeluya con algún otro compuesto. La problemática que tiene la glucosa es que sus niveles dependen mucho del estilo de vida, de la dieta o de alguna enfermedad que pueda alterar su concentración. Por lo que la glucosa se descarta como posible biomarcador de la esquizofrenia.

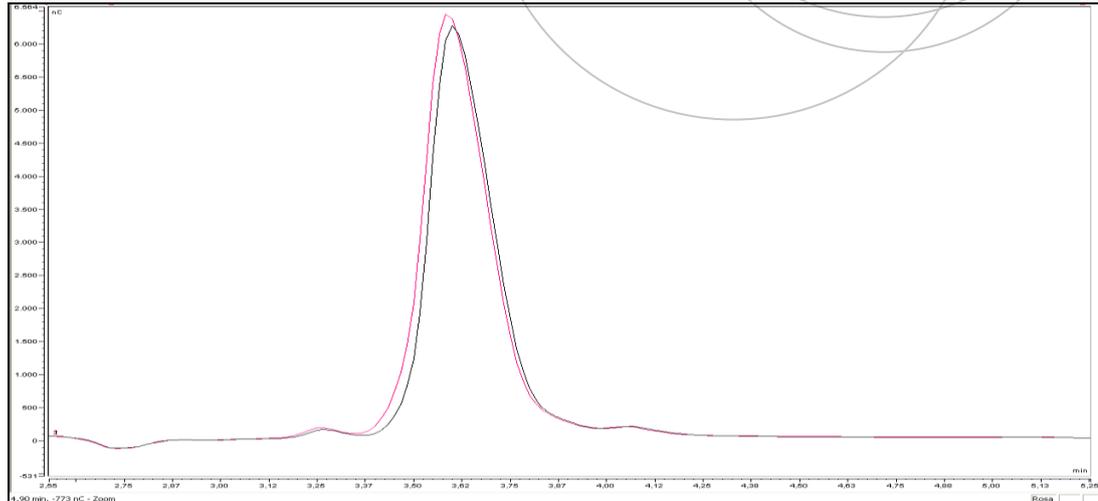


Figura 23. Cromatograma de la muestra control (**negro**) y de la paciente de esquizofrenia (**rosa**) entre 2,55 y 5,25 minutos, -531 y 6564 nC. Condiciones cromatográficas recogidas en el apdo 2.4.2.2.

Siguiendo con el estudio del cromatograma, **Figura 24**, aparecen dos picos cromatográficos en la muestra control que no se observan en la muestra del paciente de esquizofrenia. El primer pico no se ha identificado, mientras que el segundo pico pertenece a la maltosa. Por lo tanto se puede deducir que los niveles de maltosa y de un compuesto no identificado decrecen en pacientes diagnosticados de esquizofrenia.

A tiempos de retención más largos, aparecen tres picos cromatográficos (**Figura 25**), cuyas áreas son superiores para la muestra control respecto a la del paciente. El pico a un tiempo de retención de 21,5 minutos corresponde a la G6P, el correspondiente a 22,5 minutos no se ha identificado y el pico que eluye a 24,7 minutos puede corresponder a la R5P, a la F6P o a una mezcla de ambas, como se ha comentado con anterioridad. Por último, los dos picos cromatográficos a tiempos de retención de 30,5 y 33,4 min (**Figura 26**), atribuible uno de ellos a la F16bF no aparecen en la muestra del enfermo de esquizofrenia,

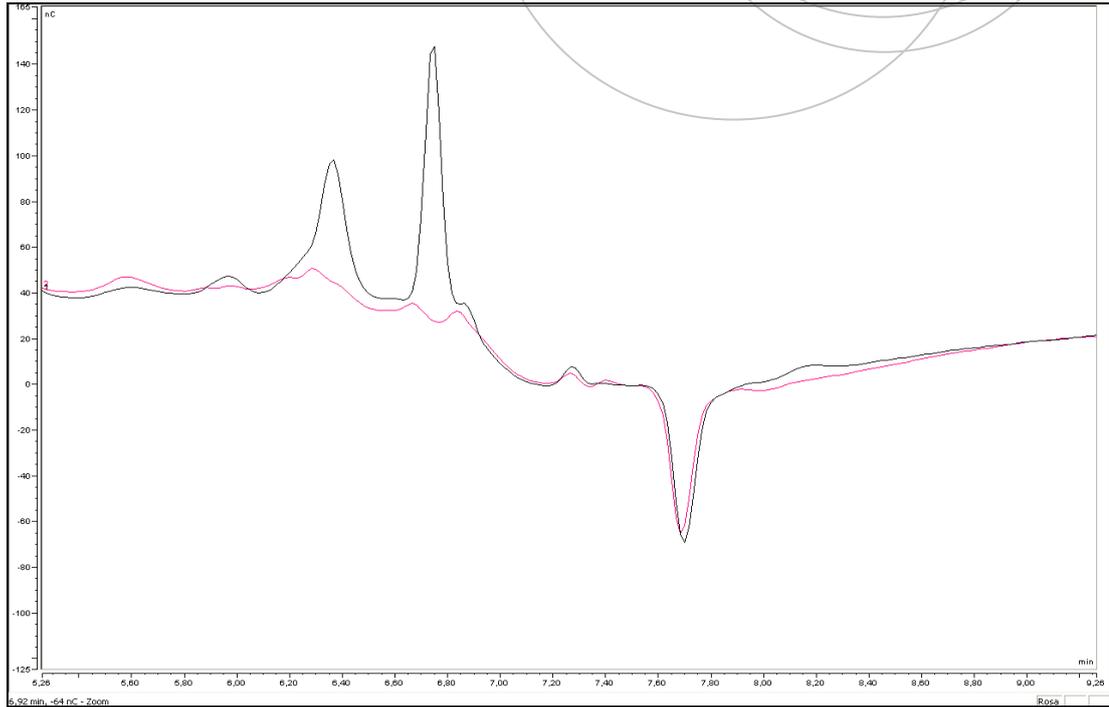


Figura 24. Cromatograma de la muestra control (**negro**) y de la paciente de esquizofrenia (**rosa**) entre 5,26 y 9,26 minutos, -125 y 169 nC. Condiciones cromatográficas recogidas en el apdo. 2.4.2.2.

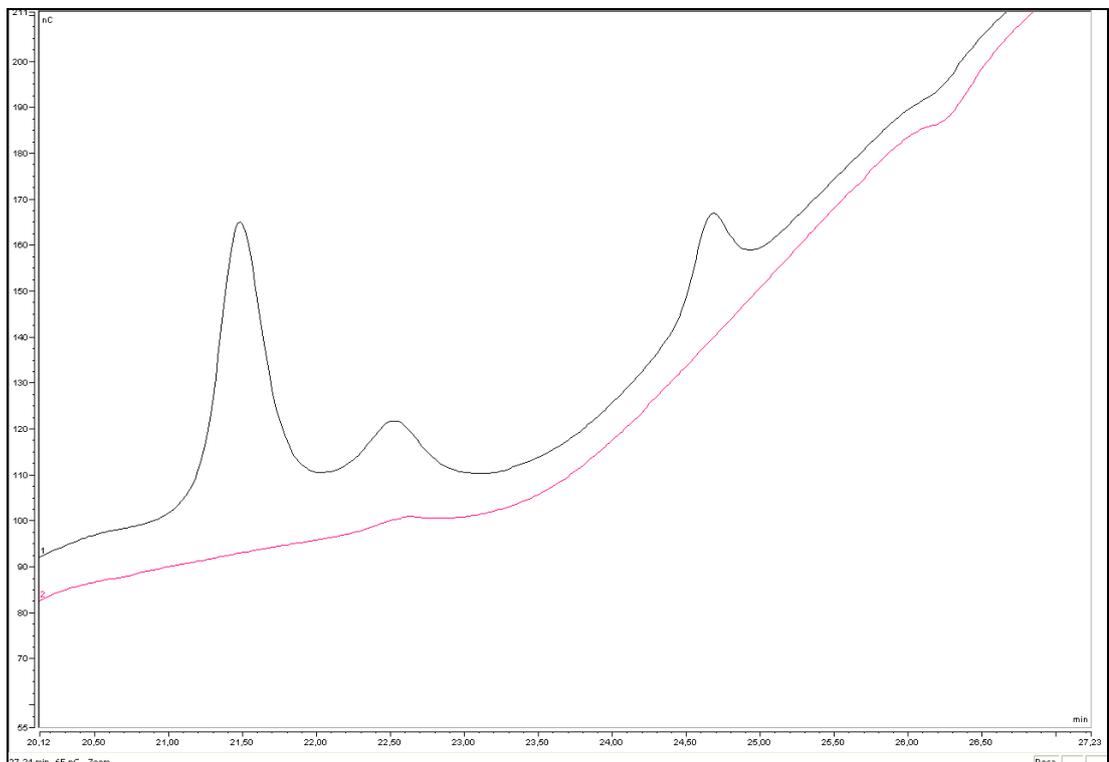


Figura 25. Cromatograma de la muestra control (**negro**) y de la paciente de esquizofrenia (**rosa**) entre 20,12 y 27,23 minutos, 55 y 211 nC. Condiciones cromatográficas recogidas en el apdo. 2.4.5.2.

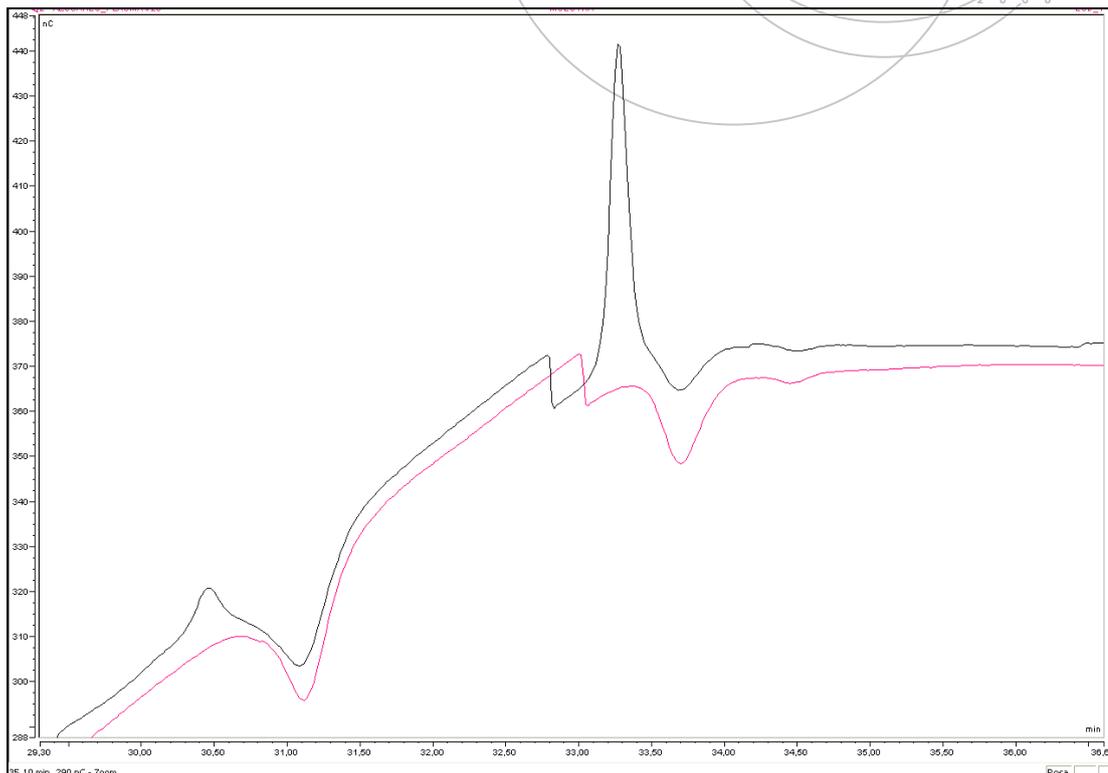


Figura 26. Cromatograma de la muestra control (negro) y de la paciente de esquizofrenia (rosa) entre 29,30 y 36,60 minutos, 288 y 448 nC. Condiciones cromatográficas recogidas en el apdo. 2.4.5.2.

A modo de resumen en la **Tabla 9** se recogen las diferencias en el análisis de azúcares observadas para el control y el paciente de esquizofrenia.

Tabla 9. Diferencias observadas en los niveles de azúcares entre muestra control y muestra de paciente esquizofrénico

Compuesto	t_R (min)	Variación de la concentración en esquizofrenia
Desconocido	1,65	Aumenta
Desconocido	1,78	Aumenta
Desconocido	1,97	Aumenta
Desconocido	6,36	Disminuye
Maltosa	6,75	Disminuye
G6F	21,5	Disminuye
Desconocido	22,5	Disminuye
R5F, F6F o ambas	24,75	Disminuye
Desconocido	30,45	Disminuye
F16bF	33,25	Disminuye



4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

1. Existen diferencias en el contenido de los metabolitos del metabolismo central del carbono (ácidos orgánicos y azúcares) entre muestra control y muestra de paciente esquizofrénico, lo que pone de manifiesto la alteración de este metabolismo en enfermos esquizofrénicos, aunque se precisa un número de muestras más elevado para evaluar la potencialidad de estos metabolitos como biomarcadores de esquizofrenia.
2. En el análisis de ácidos orgánicos, se han observado diferencias en el contenido de ácido láctico, gliceraldehido 3-fosfato, ácido 6-fosfogluónico, ácido 2-fosfoglicérico y ácido fosfoenolpirúvico (FEP); mientras que del análisis de azúcares se deduce que existen alteraciones en el contenido de maltosa y en los azúcares fosfato, glucosa, ribulosa y fructosa.
3. Las diferencias observadas en este estudio preliminar de carácter cualitativo sobre el metabolismo central del carbono, precisan ser determinadas de forma cuantitativa, así como proceder a la identificación de algunos metabolitos, sobre un número de muestras de plasma de un grupo de control y enfermos diagnosticados de esquizofrenia más elevado.



5. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Xuan, J.; Pan, G.; Qiu, Y.; Yang, L.; Su, M.; Liu, Y.; Chen, J.; Feng, G.; Fang, Y.; Jia, W.; Xing, Q.; He, J. J. *Proteome Res.* 2011, 10, 5433-5443.
- ² Al Awam, K., Dudley, E., Haußleiter, I. S., et al. *J. Neural Transm.* 2014. (DOI 10.1007/s00702-014-1224-0).
- ³ Rico, E. *Aplicaciones de la Metabolómica Basada en Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS) al Campo Clínico y Toxicológico*, UPV/EHU, 2014.
- ⁴ Sawa, A.; Snyder, S. H. *Science*, 2002, 296, 692-695.
- ⁵ Fuentes-Arderiu, X. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013, 51, 1689-1690.
- ⁶ Wishart D. S.; Tzur D.; Knox C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; et al. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 521–526.
- ⁷ De Vos, R.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J.; Bino, R.; Hall, R. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 778-791.
- ⁸ Want, E. J.; O'Maille, G.; Smith, C. A.; Brandon, T. R.; Uritboonthai, W.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.*, 2006, 78, 743-752.
- ⁹ Michopoulos, F.; Lai, L.; Gika, H. G.; Theodoridis, G.; Wilson, I. D. *J. Proteome Res.*, 2009, 8, 2114-2121.
- ¹⁰ Bruce, S. J.; Jonsson, P.; Antti, H.; Cioarec, O.; Trygg, J.; Marklund, S. L.; Moritz, T. *Anal. Biochem.*, 2008, 372, 237-249.
- ¹¹ Motta, A.; Paris, D.; Melck, D. *Anal. Chem.* 2010, 82, 2405–2411.
- ¹² Steuer, R. *Briefings in bioinformatics.* 2006, 7, 151-158.
- ¹³ Skoog, D. A. *Principles of Instrumental Analysis*; 3th Ed. Holt Saunders International Editions: Philadelphia, 1985, 407-455.
- ¹⁴ Ewin, G. W. *Instrumental methods of chemical analysis*; 3th Ed. McGraw-Hill Book: New York, 1985. Pp 380-388.
- ¹⁵ Skoog, D. A. *Principles of Instrumental Analysis*; 3th Ed. Holt Saunders International Editions: Philadelphia, 1985, 523-566.



- ¹⁶ Mohler R. E.; Dombek K. M.; Hoggard J. C.; Young E. T.; Synovec, R. E. *Anal. Chem.* 2006, 78, 2700-2709.
- ¹⁷ Vuckovic, D.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 1944–1954.
- ¹⁸ Emmett, M. R.; Kroes, R. A.; Moskal, J. R.; Conrad, C. A. ; Priebe, W. ; Laezza, F.; Meyer-Baese, A.; Nilsson, C. L. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 2014 39, 5–23.
- ¹⁹ Taylor, L. T. *Anal. Chem.* 2008, 80, 4285–4294.
- ²⁰ Taguchi, K.; Fukusaki, E.; Bamba, T. *Bioanalysis*, 2014, 6, 1679-1689.
- ²¹ Chang, K. L.; New, L. S.; Mal, M.; Goh, C.; Aw, C. C.; Browne, E. R. ; Chan, E. C. Y. *J. Proteome Res.* 2011, 10, 2079-2087.
- ²² Tkac, I.; Henry, P. G.; Zacharoff, L; Wedel, M.; Gong, W.; Deelchand, D.; Li, T.; Dubinsky, J. M. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012, 32, 1977–1988.
- ²³ Caudle, W. M.; Bammler, T. K.; Lin, Y.; Pan, S.; Zhang, J. *Expert Rev. Neurother.* 2010, 10, 925–942.
- ²⁴ Morgan, J. C.; Mehta, S. H.; Sethi, K. D. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2010, 10, 423–430.
- ²⁵ Kaddurah-Daouk, R.; McEvoy, J.; Baillie, R. A.; Lee, D.; Yao, J. K.; Doraiswamy, P. M.; Krishnan, K. R. R. *Mol. Psychiatry*, 2007, 12, 934-945.
- ²⁶ Dean, B.; Digney, A.; Sundram, S.; Thomas, E.; Scarr, E. *Psychiatry Res.*, 2008, 158, 75-78.
- ²⁷ Schwarz, E.; Guest P.C.; Rahmoune, H.; Harris, L. W.; Wang, L.; Leweke, F. M.; Rothermundt, M.; Bogerts, B.; Koethe, D.; Kranaster, L.; Ohrmann, P.; Suslow, T.; McAllister, G.; Spain, M.; Barnes, A.; Van Beveren, N. J. M.; Baron-Cohen, S.; Steiner, J.; Torrey, F. E.; Yolken, R. H.; Bahn, S. *Mol. Psychiatry*, 2012, 1, 494-502.
- ²⁸ Oresic, M.; Seppanen-Laakso, T.; Sun, D.; Tang, J.; Therman, S.; Viehman, R.; Mustonen, U.; Van Erp, T. G.; Hyötyläinen, T.; Thompson, P.; Toga, A. W.; Huttunen, M. O.; Suvisaari, J.; Kaprio, J.; Lönnqvist, J.; Cannon, T. D. *Genome Med.*, 2012, 4, 1.



- ²⁹ McEvoy, J.; Baillie, R. A.; Zhu, H.; Buckley, P.; Keshavan, M. S.; Nasrallah, H. A.; Dougherty, G. G.; Yao, J. K.; Kaddurah-Daouk, R. *PLoS ONE*, 2013, 8(7), 1-12.
- ³⁰ Watkins, S. M.; Reifsnnyder, P. R.; Pan, H.; German, J. B.; Leiter, E. H. J. *Lipid Res.*, 2002, 43, 1809-1817.
- ³¹ Wood, P.L.; Unfried, G.; Whitehead, W.; Phillipps, A.; Wood, J. A. *Schizophr. Res.*, 2015, 161, 506–510.
- ³² Wood, P. L. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 2014, 39, 24–33
- ³³ James, S. J.; Cutler, P.; Melnyk, S.; Jernigan, S.; Janak, L.; Gaylor, D. W.; Neubrandner, J. A. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 80, 1611–1617.
- ³⁴ Bjerkenstedt, L.; Edman, G.; Hagenfeldt, L.; Sedvall, G.; Wiesel, F. A. *Br. J. Psychiatry*, 1985, 147, 276–282.
- ³⁵ Geier D. A.; Geier, M. R. *Horm. Res.*, 2006, 66, 182–188.
- ³⁶ Oresic M.; Tang, J.; Seppanen-Laakso, T.; Mattila, I.; Saarni, S. E.; Saarni, S. I.; Lonqvist, J.; Sysi-Aho, M.; Hyotylainen, T.; Perala, J. *Genome Med.*, 2011, 3, 19.
- ³⁷ He, X.; Huang, Y.; Li, B.; Gong, C. X.; Schuchman, E. H. *Neurobiol. Aging*, 2010, 31, 398–408.
- ³⁸ Pastural, E.; Ritchie, S.; Lu, Y.; Jin, W.; Kavianpour, A.; Su-Myat, K. K.; Heath, D.; Wood, P. L.; Fisk, M.; Goodenowe, D. B. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2009, 81, 253–264.
- ³⁹ Strouts, C. R. N.; Wilson, H. N.; Parry-Jones, R. T. *Chemical analysis: the working tools*; Ed. Oxford University Press: Oxford, Londres, 1962; Volumen 1, pag. 409-414.
- ⁴⁰ Meyer, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*; 5th Ed. Wiley: United Kingdom, 2010, 203-216.
- ⁴¹ Meyer, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*; 5th Ed. Wiley: United Kingdom, 2010, 106-107.



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Euskadi
2006

⁴² Meyer, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography; 5th Ed. Wiley: United Kingdom, 2010, 103-104.

⁴³ <http://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis/cromatografia-ionica.html> (accedido el 05/05/2015). Cromatografía iónica.

⁴⁴ Rico, E.; Gonzalez, O.; Blanco, M. E.; Alonso, R. M.

Estitxu Rico, Oskar González, María Encarnación Blanco, Rosa María Alonso Analytical and Bioanalytical Chemistry, DOI 10.1007/s00216-014-8212.

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Euskadi
2006