



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio metabólico de orina de pacientes con trastorno bipolar

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Kevin Lebrone Montiel Servín



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 24 de enero de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres por sustentar mi vida académica y apoyarme en todo este trayecto, por enseñarme e inculcarme valores primordiales para ser una gran persona y sobre todo por darme su paciencia, amor y sus brazos en momentos difíciles y de regocijo.

A mi hermano por haberme dado un ejemplo de madurez e intervenir en mi formación como persona.

A Monserrat Arellano colega de la carrera y mi mejor amiga, la cual me acompañó en esta hermosa aventura y me llenó de sonrisas y bellas experiencias.

A Mauricio Díaz, mi mejor amigo, por apoyarme en cada momento, por sus consejos y por su apoyo incondicional con mi página de ilustración que, sin él, no sería lo que es hoy en día.

A todos mis amigos que hasta hoy han permanecido en mi vida haciendo de este, el viaje más lindo, Ethian Durán, Alejandra Sánchez, Karina Camarillo, Samantha Álvarez y Mariana Acuña.

Agradecimientos

Agradezco a aquellos profesores que supieron transmitir su conocimiento de una manera adecuada y completa ya que gracias a eso aprendí y me interesé en seguir adelante con mi carrera, entre ellos a Bárbara Serrano, María Ycela Montes, Mariana Cartagena, Sarai Montes, Gabriel Olalde, por mencionar algunos.

Agradezco a las personas que me abrieron sus puertas para ampliar mi conocimiento y adquirir nuevas habilidades, entre ellas al Dr. Juan Carlos Gallardo, a la M. en C. Aída Téllez Velasco por permitirme trabajar con ella en la Colección de Orquídeas del Jardín Botánico de la UNAM y por supuesto, a la Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera por apoyarme todo el tiempo con la realización de este proyecto.

Finalmente agradezco a mi comité, el cual está integrado por el Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez, el Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, la Dra. Violeta Gisselle López Huerta y el Dr. Euclides Avila Chávez, por revisar el presente trabajo y presenciar mi defensa de tesis de licenciatura.

Resumen

El uso de las disciplinas ómicas, tales como la metabolómica, están permitiendo estudiar las características biológicas del trastorno bipolar (TB). A partir del análisis de muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con TB se encontró que se modifican las concentraciones de ciertos metabolitos, como el ácido úrico, fructosa-6-fosfato, la CoA, el lactato, el piruvato, el citrato, el isocitrato, se modificaban en sus concentraciones. En otro estudio se reporta que la anomalía más frecuente en el TB es la alteración en la regulación de los flujos de Ca^{2+} , también que el N-acetil-aspartato se encuentra disminuido en las neuronas. Finalmente, los metabolitos cuya concentración se modifica en orina son la N-metilnicotinamida, el ácido nicotínico, el ácido L-láctico, entre otros, en este trabajo se pretenden encontrar metabolitos como biomarcadores en orina de pacientes con este trastorno en nuestra población. Debido que el TB presenta mayor probabilidad de muerte por suicidio y a que no hay una forma clínico-experimental para su detección, es de vital importancia buscar nuevos biomarcadores y formas más efectivas para su diagnóstico. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar los metabolitos que se encuentran alterados en la orina de pacientes con TB con respecto a la de individuos control debido a que este es un método no invasivo. Para el grupo control, se seleccionaron 19 individuos y para el grupo con TB 22 pacientes; todos fueron seleccionados bajo el criterio del DMS-IV y de acuerdo con la ICD-10. Los metabolitos de las muestras se analizaron por espectrometría de masas y su identificación fue mediante el uso de bases de datos como HMDB y MetLin. Los metabolitos con concentraciones modificadas más destacables fueron 4-metoxi-17beta-estradiol, oxaloacetato, topaquinona, dipéptidos (Leu-Arg), fluoxetina y lamotrigina. Estos metabolitos son parte del metabolismo de tirosina, intermediarios del ciclo de Krebs, la señalización neuronal y por receptores de estrógenos. Los mecanismos biológicos descritos en este trabajo ya se han relacionado con TB en otros reportes, lo que podría facilitar la propuesta de la detección de este padecimiento mediante un método no invasivo y respaldado por técnicas de laboratorio precisas y confiables.

Palabras clave: trastorno bipolar, manía, hipomanía, depresión, metabolitos.

índice

I. Introducción	6
I.I La metabolómica, una herramienta innovadora para diagnóstico.....	6
I.II Trastorno bipolar y su clasificación	8
I.III Gravedad del TB	9
I.IV Epidemiología del TB	9
I.V Tratamiento del TB	10
I.VI Historia natural del TB	10
I.VII Diagnóstico del TB	11
II. Antecedentes	12
III. Justificación	19
IV. Hipótesis	19
V. Objetivo	19
VI. Metodología	20
VI.I Participantes	20
VI.II Análisis experimental de las muestras de orina.....	22
VI.III Condiciones de la cromatografía	23
VI.IV Condiciones de la Espectrometría de masas para las muestras de orina	23
VI.V Análisis estadístico de datos obtenidos por MS	23
VI.VI Búsqueda de posibles metabolitos en bases de datos	25
VI.VII Obtención de redes de interacción	26
VIII. Resultados	27
IX. Discusión	41
X. Conclusión	47
XI. Perspectivas	47
XII. Referencias	48
XIII. Apéndices	55

I. Introducción

I.I La metabolómica, una herramienta innovadora para diagnóstico

En la actualidad, para comprender la compleja dinámica de un organismo vivo, se utiliza a la sistómica, la cual incluye a diferentes “ómicas” que brindan un acercamiento de lo que está ocurriendo en el organismo. Estas ciencias ómicas se enfocan en estudiar al organismo a nivel genético (genómica), a nivel de transcripción (transcriptómica), a nivel proteínas (proteómica) y a nivel metabólico y de metabolitos (metabolómica) (Bujak *et al.*, 2015).

Los estudios del metaboloma proveen una aproximación del comportamiento del organismo ya que se analizan todos los residuos generados en las otras “ómicas”. La alteración de metabolitos nos provee una idea de lo que está ocurriendo en una condición patológica o en el monitoreo de una terapia farmacológica. Esta es una ciencia que está tomando fuerza en las áreas de la biomedicina, la farmacéutica y la toxicología. Las técnicas existentes utilizan muestras de sangre, orina o tejido para analizar y proveer información confiable de la determinación e identificación de los metabolitos (Ren *et al.*, 2021).

La metabolómica es la identificación y cuantificación sistemática y comprensible de metabolitos obtenidos de muestras biológicas como las antes mencionadas. La composición del metaboloma humano no está bien descrito; sin embargo, existen bases de datos de acceso público como Human Metabolome DataBase (HMDB), METLIN y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) que proporcionan información sobre metabolitos presentes en el ser humano. Aunque pareciera que la información sobre el metaboloma es robusta, gran parte de la misma no es precisa, ya que se pueden encontrar metabolitos exógenos provenientes de la dieta de la persona, de la medicación, así como compuestos producidos por la microbiota (Bujak *et al.*, 2015).

De las técnicas utilizadas para hacer metabolómica, destacan la resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectrometría de masas (MS). La NMR generalmente no requiere de un pretratamiento de las muestras para su análisis y aunque es una técnica analítica, robusta, reproducible, no invasiva y selectiva, tiene baja sensibilidad y carece de un componente que separe los analitos (Bujak *et al.*, 2015).

La MS mide moléculas ionizadas con base en su relación masa carga (m/z) y es la principal técnica utilizada para medir el metaboloma (Bujak *et al.*, 2015).

Existen otras técnicas con una aplicación más amplia para el análisis del metaboloma, como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-MS). De estas, la LC-MS resulta ser la más utilizada debido a su amplia disponibilidad y el continuo desarrollo de instrumentos. Es adecuada para analizar compuestos no volátiles, térmicamente inestables, con alto o bajo peso molecular y con amplio rango de polaridad. Se utiliza principalmente para analizar sangre, tejidos y orina (Bujak *et al.*, 2015).

Debido a la sensibilidad de los análisis y a que las muestras biológicas que se procesan son muy complejas, se requiere de un análisis estadístico multivariado para determinar de manera precisa todos los metabolitos presentes en ellas. Los principales análisis utilizados en metabolómica son el método no supervisado llamado Análisis de Componente Principal (PCA) y el método supervisado llamado Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados (PLS-DA) (Bujak *et al.*, 2015).

I.II Trastorno bipolar y su clasificación

El trastorno bipolar (TB) es una enfermedad mental crónica donde se ve afectado el estado de ánimo de la persona que la padece. Esta enfermedad se caracteriza por fluctuaciones entre estados depresivos, de manía o hipomanía, lo cual le ocasiona a la persona un problema para establecer vínculos sociales, interpersonales o laborales, por lo que este trastorno se considera un padecimiento incapacitante (García-Blanco *et al.*, 2014).

De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM), la manía es aquel estado de ánimo expansivo o irritable donde se presenta ansiedad, con características mixtas, con ciclos rápidos, con características atípicas, psicóticas y con catatonía. Por otro lado, el estado de depresión se caracteriza por sentimientos de culpa, nihilismo, de castigo merecido y que pueden causar imposibilidad funcional. Finalmente, la hipomanía es un estado de euforia que se presenta en menor grado que la manía y que puede aparecer durante el tratamiento con antidepresivos pero que no se puede atribuir a los efectos de los mismos (García-Blanco *et al.*, 2014).

El TB se clasifica en TB I y TB II. En el TB I hay presencia de episodios maníacos y depresivos, siendo el primero el que presenta un aumento anormal en la actividad o la energía y que está presente la mayor parte del día o todo el día durante aproximadamente una semana; y el TB II donde hay presencia de episodios hipomaníacos y depresivos. La principal distinción entre ambos es el grado en el que se presentan los episodios maníacos (Martínez *et al.*, 2019).

El TB es, de los trastornos afectivos, el que presenta mayor probabilidad de tendencias suicidas siendo esto más frecuente en los episodios depresivos que en los maniáticos (García-Blanco *et al.*, 2014).

I.III Gravedad del TB

De acuerdo con el DSM, la gravedad del TB se basa en el número de síntomas y el grado de discapacidad funcional que le ocasiona a la persona; esta se clasifica como leve, moderada y grave.

- Leve. La intensidad de los síntomas causa un malestar que la persona logra manejar y que, por lo tanto, le provoca poca dificultad para relacionarse con su entorno.
- Moderada. Punto medio entre los síntomas leve y grave.
- Grave. La intensidad de los síntomas genera mucho malestar y la persona no es capaz de manejarlos, provocando que no logre relacionarse con su entorno.

I.IV Epidemiología del TB

Un estudio realizado en 2014 por la OMS, arrojó datos sobre las tasas de prevalencia anual del TB, siendo del 0.4% para el TB I, del 0.3% para el TB II y del 0.8% para el resto del espectro, es decir, aquellos que no se pueden clasificar como TB I o TB II, o que presentan características mixtas. Un año después la OMS reportó que el 3% de la población mundial, es decir, aproximadamente 350 millones de personas, padecen TB (Martínez *et al.*, 2019).

El TB es ligeramente distinto entre hombres y mujeres. Los hombres suelen desarrollar este padecimiento a edades más tempranas y los episodios maníacos son más frecuentes y con mayor duración; las mujeres presentan episodios mixtos y con mayor frecuencia depresivos, siendo el TB II el que más padecen y que es dos veces más frecuente en ellas con respecto a los hombres (García-Blanco *et al.*, 2014).

Esta enfermedad tiende a desarrollarse en la adolescencia o en la adultez temprana. Debido a que es un padecimiento complejo de identificar, en ocasiones las personas pueden ser diagnosticadas con trastorno depresivo (Martínez *et al.*, 2019).

I.V Tratamiento del TB

El tratamiento más utilizado para este trastorno se basa en la administración de litio y valproato, los cuales reducen significativamente la intensidad de los episodios depresivos y de manía y con los que se han realizado la mayoría de los estudios sobre este padecimiento. Otros medicamentos que se utilizan como tratamiento para episodios maniacos o mixtos son antipsicóticos, como el aripiprazol, la olanzapina, la risperidona y la ziprasidona. La quetiapina está indicada para episodios maniacos leves o severos, así como para episodios depresivos. Algunos medicamentos que se recomiendan como alternativas al litio y al valproato son la carbamazepina y la oxcarbazepina (Guía de Práctica Clínica., 2010).

Cuando los pacientes presentan episodios de manía resistentes y graves se considera utilizar la Terapia Electroconvulsiva (TEC), la cual se basa en generar una pequeña convulsión al paciente anestesiado para modificar la neuroquímica del cerebro y de esta manera lograr estabilizarlo (Guía de Práctica Clínica., 2010).

I.VI Historia natural del TB

El trastorno no comienza a desarrollarse sino hasta la adolescencia temprana o tardía y en algunos casos en la adultez temprana. Aproximadamente a los 17 años es cuando se comienzan a apreciar algunos aspectos como irritabilidad, disminución en la necesidad de dormir, hablar mucho o distraerse con facilidad, aspectos que pueden terminar confundiendo con el Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (ADHD) (Taylor, 2009). En un estudio (Duffy *et al.*, 2014), al comparar 229 niños con riesgo de padecer TB y 86 controles se reporta la ausencia de casos diagnosticables en niños de hipomanía o manía, algo que refuta lo antes mencionado del inicio del desarrollo del trastorno en la adolescencia. También se reporta que las manifestaciones clínicas son inespecíficas en las etapas iniciales del mismo. Se propone que el TB se desarrolla por etapas, comenzando por trastornos no específicos en la niñez como ansiedad, luego por trastornos

menores del estado de ánimo y de adaptación en la adolescencia temprana, después por episodios depresivos y finalmente la presencia de episodios de hipomanía o manía (Duffy *et al.*, 2014).

I.VII Diagnóstico del TB

Se debe prestar mucha atención a la etiología del paciente, ya que muchas de sus actitudes serán indicativas del posible padecimiento de TB y del tipo de trastorno del que se trata.

En el caso de la manía hay incremento en la energía, en la actividad, irritabilidad elevada, falta de concentración y fácil distracción, falta de sueño, gastos y compras excesivas y/o innecesarias, hiperactividad sexual, por mencionar algunas; para la hipomanía se presentan varios de estos síntomas, pero en menor grado (Secretaría de Salud, 2009).

Para la depresión se presenta ánimo bajo, sentimientos de desesperanza, pesimismo, culpa, disminución de la energía, pérdida de interés en actividades cotidianas, lentitud psicomotora, dificultad para concentrarse, falta de memoria, inquietud, dolores crónicos y hasta ideas suicidas o de muerte (Secretaría de Salud, 2009).

Cuando los estados de ánimo son mixtos, es decir, que hay una combinación entre síntomas de manía y depresión, hay mayor riesgo suicida en las personas con TB (Secretaría de Salud, 2009).

II. Antecedentes

En un estudio realizado con muestras obtenidas por punción lumbar de líquido cefalorraquídeo y de cerebro post-mortem de corteza prefrontal dorsolateral del área 46 de Brodmann, se encontraron anomalías en los niveles de algunos metabolitos en pacientes con TB (Yoshimi *et al.*, 2016). Utilizando la técnica de electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (CE-TOFMS) analizaron 116 compuestos metabólicos de diversas vías y solamente 72 fueron detectados, ya que los 44 restantes estaban por debajo del límite de detección; los metabolitos significativamente distintos entre individuos control y pacientes con TB considerando tres valores de p ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$), se encontraban disminuidos ± 0.031 , ± 0.0045 y < 0.001 respectivamente. Estos metabolitos fueron 13: ácido úrico, fructosa-6-fosfato, ribosa 5-fosfato, CoA, ácido 2-oxoisovalérico, lactato, piruvato, citrato, isocitrato, cis-aconitato, urea, alanina y triptófano. Por otra parte, en las muestras de corteza cerebral humana los niveles de mRNA de los genes de la subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa (IDH3A) y de la subunidad beta (IDH3B) fueron significativamente más bajos en comparación con los controles (Yoshimi *et al.*, 2016). Todo lo obtenido por este grupo de trabajo sugiere que el TB posiblemente se deba a alteraciones de procesos mitocondriales.

El estudio de Yoshimi *et al.* (2016) fortalece la propuesta de Quiroz *et al.* (2008) en su revisión sobre la plasticidad sináptica mediada por la mitocondria. Por un lado, se sabe que la anomalía más frecuente en el TB es la alteración en la regulación del Ca^{2+} , lo que lleva a pensar en anomalías mitocondriales. Una mitocondria disfuncional puede liberar o capturar más Ca^{2+} . Esto puede provocar que su potencial de membrana se vea afectado, que disminuya la producción de ATP y que, por lo tanto, haya una fatiga más rápida en procesos que requieran energía (Quiroz *et al.*, 2008). Aunado a esto, en el TB también se ven afectadas las proteínas BCL-2, las cuales son proteínas pro y antiapoptóticas ubicadas en la membrana mitocondrial interna y que, entre sus funciones, disminuyen las especies reactivas de oxígeno (ROS) a través del sistema antioxidante, además de tener efectos en la amortiguación celular de Ca^{2+} (Quiroz *et al.*, 2008).

Por otro lado, y relacionado con lo antes mencionado, en pacientes con TB, el N-acetil-aspartato (NAA) se encuentra disminuido. El NAA es un compuesto localizado en neuronas maduras, se sintetiza dentro de las mitocondrias y contribuye a la producción de energía a través del glutamato. Este compuesto disminuye su concentración debido a los inhibidores de la cadena respiratoria, lo que se relaciona con la disminución de ATP y el consumo de oxígeno (Quiroz *et al.*, 2008).

El tratamiento con litio y valproato ha demostrado ser eficaz en modular la señalización intracelular de Ca^{2+} , aumentando la producción de proteínas BCL-2 en la corteza frontal y atenuando las cascadas pro-apoptóticas. Estos fármacos también pueden ayudar a evitar la pérdida de materia gris y los niveles de NAA (Quiroz, J *et al.*, 2008).

Al analizar muestras de corteza prefrontal dorsolateral post-mortem del área 09 de Brodmann de 10 personas con TB y 10 personas sanas, con la finalidad de encontrar marcadores moleculares del TB mediante espectroscopía de resonancia magnética RMN, se encontró que las muestras de pacientes con TB presentan alteraciones en las concentraciones de varios metabolitos, incluyendo un aumento en mioinositol, creatina y glutamato (Lan *et al.*, 2009). También se hicieron pruebas con el tratamiento de litio y valproato en ratas y se observaron cambios metabólicos opuestos a los encontrados en muestras humanas. Los niveles de mioinositol y creatina disminuyeron, el glutamato se mantuvo igual, lo único que cambió fue la relación glutamina/glutamato. Los metabolitos que incrementaron con el tratamiento de litio fueron GABA, lactato y fosfoetanolamina. Este incremento fue de ± 1.06 (tratados/control); los niveles de NAA no se vieron afectados (Lan *et al.*, 2009). Estos datos, pese a la discordancia entre hallazgos obtenidos en ratas y en humanos, muestran un posible cambio en la neurotransmisión durante el padecimiento y durante el tratamiento.

En cuanto al diagnóstico del TB, se sabe que es inespecífico. Para evitar esta problemática se ha propuesto a la proteómica como estudio complementario. Al analizar proteínas de muestras de cerebro de ratas tratadas con litio (Li_2CO_3) mediante electroforesis bidimensional (2-D DIGE) y por espectrometría de masas (MALDI-TOF), se encontraron 19 proteínas con diferencias significativas entre las ratas tratadas con litio y las ratas control. Dichas proteínas están involucradas en procesos biológicos en los que actúa el litio, como en procesos anti-apoptóticos, en la regulación de la comunicación celular y en la sinapsis (Lakshmanan *et al.*, 2012).

En 2013, McLeod *et al.* realizaron un estudio para ver los cambios en el fosfoproteoma del sistema sinaptoneurosomal del cerebro en rata. Compararon ratas tratadas con litio contra ratas tratadas con valproato y paliperidona, siendo este último un antipsicótico empleado principalmente para tratar la esquizofrenia; se encontraron las siguientes proteínas altamente fosforiladas: ACTB, ACTS, TBA1B, MYH1, MYH2, MYH6, AINX y NFH. Sus descubrimientos apuntan a que los medicamentos están involucrados en la disfunción y transporte mitocondrial presentes en el trastorno.

La información obtenida con la proteómica, puede indicarnos el papel que tienen las proteínas en un sistema biológico; gracias a ello, se ha logrado observar que la gran mayoría de las proteínas encontradas están involucradas en la disfunción mitocondrial, anomalías en el metabolismo energético, en el estrés oxidativo y en la respuesta inflamatoria (Romário *et al.*, 2016).

En 2020, Kathuria *et al.* generaron organoides cerebrales a partir de células iPSC de ocho pacientes con TB y ocho individuos control. Al comparar las secuencias de RNA con el genoma de referencia (hg38 UCSC), encontraron 4473 genes expresados diferencialmente, de los cuales 2417 fueron de regulación a la alta y 2057 de regulación a la baja en el TB; algunos de esos genes fueron clasificados como excitatorios e inhibitorios. Esto sugiere que hay diferencias en el balance de la actividad excitatoria e inhibitoria, así como en la comunicación sináptica.

Sin embargo, al exponer los organoides TB y los organoides control a estímulos eléctricos, los primeros no mostraron actividad alguna. También se reporta una reducción significativa en los niveles de las proteínas pre y post-sinápticas de Bossoon y Homer, respectivamente. Otro hallazgo interesante que refuta lo ya mencionado en trabajos anteriores, es que al analizar las membranas del retículo endoplásmico (RE) asociadas a mitocondrias (MAMs) mediante ensayo de ligadura de proximidad se encontró una reducción significativa de estas en pacientes con TB, sustentando aún más la hipótesis de que la actividad de RE-mitocondria se ve afectada en este trastorno (Kathuria *et al.*, 2020).

Harrison *et al.* (2018), sugieren en su estudio que las variantes deletéreas del genoma y el exoma juegan un papel dentro del TB. Sin embargo, sus efectos siguen sin ser claros. Los genes que mencionan ser los que acaparan más el interés son *CACNA1C*, *ANK3* y *TRANK1*; el gen *ANK3* codifica la anquirina G que se acopla a canales de sodio dependientes de voltaje de axones y que también tiene efectos en dendritas y en glía, mientras que *TRANK1* tiene múltiples dominios de repetición de anquirina, por lo que se piensa que comparten funciones. *CACNA1C* es un gen que codifica la subunidad $\alpha 1C$ del canal de calcio dependiente de voltaje Cav1.2, por lo que se propone a los antagonistas de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) de tipo L como candidatos al tratamiento del TB. El mRNA de *CACNA1C* tiene cerca de 50 exones y más de 40 isoformas; el *splicing* de este gen genera isoformas del canal que se expresan de manera distinta en el cerebro y que también son diferentes en cuanto a sus características biofísicas, específicamente en la activación por voltaje; también altera la sensibilidad de estas isoformas a los antagonistas de VGCC. El índice de riesgo por polimorfismo de este gen se encuentra ubicado en el tercer intrón, en el alelo rs1006737, el cual aparentemente está asociado con una mayor expresión del producto génico. La variabilidad en los resultados arrojados por los estudios de asociación de genoma completo, puede deberse a diferencias en el efecto de rs1006737 sobre la expresión de *CACNA1C* en distintas regiones del cerebro. Estas inconsistencias también pueden resultar del riesgo de un polimorfismo de nucleótido único (SNP) que altera la abundancia de

ciertas variantes de *splicing*. Se postula una aproximación a la comprensión de la enfermedad y se concluye que es necesario trabajar sobre los *loci* identificados por estudios de asociación de genoma completo (GWAS), particularmente en los genes asociados a VGCC (Harrison *et al.* 2018).

Se identificaron por un GWAS 30 *loci* autosómicos, de los cuales 20 son considerados de riesgo de TB (Stahl *et al.*, 2020). Se incluyen 19 *loci* que fueron significativos en un análisis combinado y de los cuales 3 ya se habían reportado en estudios previos por el Consorcio de Genómica Psiquiátrica (PGC), que tenían SNP significativos: ADCY2, POU3F2 y ANK3; y 11 que resultaron significativos en un estudio primario.

Mediante el uso de herramientas para detectar genes asociados con enfermedades psiquiátricas (MAGMA), realizaron un GWAS genético del TB. Los niveles de significancia de los genes se asignaron por la cercanía que había de los SNP. Sin embargo, esto no implica que estos genes estén involucrados en el TB. Se obtuvieron 152 genes, incluidos 82 que están dentro de 20 *loci* en todo el genoma y 73 en 27 *loci* que no fueron significativos en todo el genoma. Entre las vías con las que se relacionan estos genes encontrados están las de equilibrio/coordination motora anormales de ratones, la regulación de la secreción de insulina y la señalización endocannabinoide (Stahl *et al.*, 2020).

Se encontraron correlaciones genéticas significativas entre TB y esquizofrenia y entre TB y trastorno depresivo. Mediante un análisis de puntaje de riesgo poligénico (PRS) para ver más a detalle la relación del riesgo genético de esquizofrenia y depresión y de los subtipos del TB, los PRS de esquizofrenia fueron significativamente más altos en el TB I y los PRS obtenidos de trastorno depresivo fueron significativamente más altos en el TB II (Stahl *et al.*, 2020).

Por último, al abordar lo antes mencionado sobre los *loci* que contienen a *CACNA1C* y los VGCC se reitera la posibilidad de que se utilicen los antagonistas de estos canales como tratamiento para el TB (Stahl *et al.*, 2020).

En 2019 se realizó un estudio metabolómico de orina con la finalidad de identificar personas con trastorno bipolar en estado depresivo. Se dividieron a los participantes en dos conjuntos: conjunto de prueba y conjunto de entrenamiento. En el primero agruparon a 55 individuos control y 35 pacientes con TB y en el segundo a 55 individuos control y 20 pacientes con TB. Esto se hizo mediante NMR y GC-MS y utilizando como modelo estadístico el Análisis Discriminante Ortogonal de Mínimos Cuadrados (OPLS-DA). Se encontraron 13 metabolitos significativamente distintos entre pacientes no medicados e individuos control, pero no entre pacientes medicados y no medicados; de estos 13, 9 podían interactuar entre ellos directamente o a través de algún metabolito y la mayoría estaban asociados al metabolismo de carbohidratos y al metabolismo energético (Chen *et al.*, 2019).

Los compuestos descritos fueron N- metilnicotinamida, sulfato de indoxilo, 2,4-dihidroxipirimidina, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido nicotínico, ácido metilmalónico, ácido L-láctico, ácido isobutírico, ácido fórmico, ácido azelaico, fructosa, hidroxilamina y sacarosa. Con estos hallazgos se propone que la homeostasis energética se ve afectada en pacientes con trastorno bipolar estando en estado depresivo. Por último, se menciona que la medicación puede tener impacto en la presencia o ausencia de metabolitos en la orina, pero que se requiere de más estudios para confirmarlo (Chen *et al.*, 2019).

Dos años después, se realizó otro estudio utilizando NMR y el modelo OPLS-DA para estimar las diferencias entre grupos. El grupo control estaba conformado por 48 individuos y el grupo con TB por 37, de los cuales 34 estaban determinados con TB I, 2 con TB II y uno sin categorizar; adicionalmente, 14 no habían sido medicados, mientras que los otros 23 sí, 37% con estabilizadores del estado de ánimo, 48.6% con antidepresivos y 37.8% con antipsicóticos (Ren *et al.*, 2021).

Se encontraron niveles elevados de betaina, glicerol, ácido hipúrico, indol sulfato, óxido de trimetilamina, urea y niveles significativamente bajos de inositol, la mayoría de los metabolitos obtenidos en el estudio se relacionan con el metabolismo de lípidos y de la microbiota. Las vías en las que estos metabolitos estaban involucrados incluían el metabolismo de la galactosa, la vitamina C, la pirimidina, glicina, serina y treonina, fenilalanina, arginina y prolina, glicerol, el inositol fosfato y la purina (Ren *et al.*, 2021).

El ácido hipúrico, el indol sulfato y el óxido de trimetilamina son productos del metabolismo de la microbiota humana, el cual se sabe que tiene relación con las enfermedades del humano. Pese a que no se encontraron indicios sobre alteraciones en el metabolismo energético, sí se encontraron anomalías en los niveles de inositol como ya lo habían reportado Lan *et al.* (2009). Se proponen estos metabolitos como posibles biomarcadores para el TB afectando a algunas vías metabólicas como el metabolismo de glicerol, el metabolismo de inositol fosfato y el metabolismo de arginina y prolina (Ren *et al.*, 2021).

Estos dos últimos trabajos destacan entre los mencionados porque se asemejan a la presente investigación. En la actualidad, los estudios metabolómicos de muestras de orina están resultando ser una opción ideal para el estudio de los trastornos mentales, principalmente porque es un método no invasivo mediante el cual es posible tener un amplio panorama de lo que ocurre y/u ocurrió en todas o varias de las vías bioquímicas del organismo. Debido a que en la orina van todos los productos del metabolismo del organismo y cuyos niveles dependen de la regulación de varias moléculas involucradas en distintos procesos, principalmente aquellos que corresponden a la función cerebral, resulta ser de interés explorar la posibilidad de detectar algún indicio que refleje las irregularidades presentes en una persona con TB y que complemente lo previamente reportado (Chen *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2021).

III. Justificación

Debido a que el TB es, de los trastornos afectivos, el que presenta mayor probabilidad de muerte por suicidio en episodios depresivos y a que es una enfermedad que conlleva un gasto económico muy elevado, es de vital importancia buscar nuevas y más efectivas formas para tratar este padecimiento.

En estudios previos se reportan metabolitos alterados en muestras de cerebro post-mortem de pacientes con TB y se propone que haya una explicación a este trastorno a nivel mitocondrial. En este trabajo se analizaron muestras de orina de 22 pacientes con TB y se compararon con las de 19 individuos control, con la finalidad de encontrar metabolitos alterados y refutar o confirmar lo encontrado en los estudios antes mencionados para así plantear nuevos blancos terapéuticos. La orina, al contener residuos de las principales vías metabólicas, es un indicador potencial de posibles alteraciones en algunas de éstas, pudiéndolo confirmar con las concentraciones a las que se encuentren dichos metabolitos.

IV. Hipótesis

Los pacientes con TB presentan metabolitos involucrados en el metabolismo energético alterados, es decir disminuidos o incrementados, por lo que serán diferentes en la orina con respecto a la de individuos sanos.

V. Objetivo

Determinar los metabolitos que se encuentran alterados en la orina de pacientes con TB con respecto a la orina de individuos sin esta enfermedad.

VI. Metodología

VI.I Participantes

Criterios de inclusión

Pacientes con TB

Pacientes mayores de 18 años, diagnosticados con TB, de acuerdo con los criterios del Manual (DMS-IV) y con la ICD-10.

Controles

Los controles fueron personas mayores de 18 años sin enfermedad psiquiátrica, según el DMS-IV.

Criterios de exclusión

Para ambos grupos de estudio

Sujetos que cursen con un trastorno neurológico concomitante debido a traumatismo craneoencefálico.

Comorbilidad con enfermedad metabólica.

Controles

Para el grupo control se seleccionaron 19 individuos sin trastorno bipolar, jóvenes de entre 18 y 27 años, 32% mujeres y 68% hombres. Entre la población control, 17 personas negaron estar bajo tratamiento médico al momento de la toma de muestras y dos manifestaron estar bajo tratamiento con anticonceptivos. En cuanto a padecimientos médicos, una persona padecía miopía y migraña, otra de colitis y otra tenía cálculos renales. Durante las evaluaciones se observó que una persona padecía una posible anemia y otra una depresión remitida. Las muestras que no cumplían con los criterios de inclusión y exclusión fueron eliminadas del análisis.

El grupo control fue seleccionado bajo el criterio del DMS-IV y de acuerdo con la clasificación internacional de enfermedades (ICD-10). Entre los estudios realizados para fortalecer la selección fueron la prueba de Fagerstrom (dependencia a la nicotina), Columbia (tendencias suicidas), AUDIT (alcoholismo) y SLC90 (Inventario

de síntomas asociados con enfermedades mentales). Las muestras se colectaron en la Universidad Benemérita de Puebla.

Pacientes con TB

Los pacientes con TB fueron seleccionados bajo el criterio del DMS-IV y de acuerdo con la clasificación internacional de enfermedades (ICD-10). Fueron 22 pacientes, 50% hombres y 50% mujeres de entre 20 y 49 años. El 86% presentaba conductas suicidas y el 14% consumía cocaína y marihuana. El 29% presentaba comorbilidad con otras enfermedades, 57% con alcoholismo, 57% fumadores. No se obtuvo un registro de la medicación; sin embargo, cabe la posibilidad de que estuvieran bajo tratamiento y de que haya un reflejo de esto en los resultados basándonos en trabajos previos (Chen *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2021).

Muestras

Las muestras de los pacientes con TB, se obtuvieron de distintas instituciones, por mencionar algunas: Instituto Nacional de Psiquiatría Juan Ramón de la Fuente y el Hospital de Psiquiatría de Monterrey.

Se obtuvo una carta de consentimiento de los participantes o bien, de los tutores legales en su debido caso. El proyecto fue revisado y aprobado por las comisiones de investigación, bioseguridad y ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica con el nombre de “Estudio del metaboloma de orina y plaquetas en enfermedades psiquiátricas” con número de dictamen CEI 2015/48.

VI.II Análisis experimental de las muestras de orina

Para el análisis metabolómico se colectaron 50 mL de la primera orina de la mañana por individuo a temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron a 800xg por 15 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante de cada una. Se alicuotaron en tubos de microcentrífuga (500 µL) y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por espectrometría de masas. Una vez listas las muestras, se enviaron al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-LANGEBIO) para su posterior análisis por espectrometría de masas.

Antes de realizar el análisis metabolómico se midieron los niveles de creatinina (114m/Z) para verificar que no hubiera diferencias significativas entre individuos control y pacientes con TB ya que, de haber un incremento de este metabolito, podría ser un indicativo de alguna patología en el riñón, algo que podría influir en la interpretación de los resultados.

En el CINVESTAV-LANGEBIO se utilizaron tres muestras artificiales denominadas “QC quality control samples”, las cuales se prepararon tomando 10 mL de cada muestra original para hacer una nueva muestra. Esto se hizo por triplicado y cada una se inyectó en el cromatógrafo 4 veces cada 10 muestras. Lo anterior se hizo para demostrar la robustez del análisis. El fundamento de utilizar estas muestras es que, al contener metabolitos de todas las muestras, deben localizarse en donde convergen los componentes principales. Las condiciones experimentales se detallan a continuación.

VI.III Condiciones de la cromatografía

Para la cromatografía líquida (LC) se utilizó una Columna HSS T3 1.8 μm 2.1 x 100 mm (Waters, USA), utilizando como fase móvil primero la solución A: agua + 0.1 % de ácido fórmico y luego la solución B: acetonitrilo + 0.1 % de ácido fórmico. A una temperatura de 40 °C y un flujo de 0.5 mL/min con un volumen de inyección de 10 μL . El gradiente de las soluciones A y B (%A/%B) se aplicó como sigue: tiempo 0.0 (99/1), 3.0 (85/15), 6.0 (50/50), 9.0 (5/95), 10.0 (99/1), 13.0 (99/1).

VI.IV Condiciones de la espectrometría de masas para las muestras de orina

Se utilizó un espectrómetro QTOF SYNAPT G1 (Waters, UK) con las siguientes condiciones: modo de ionización: ESI+; voltaje capilar: 2.5 kV; voltaje cono de muestreo: 45 V; voltaje cono de extracción: 4 V; temperatura de la fuente: 150 °C; temperatura de desolvatación: 350 °C; flujo de gas en cono: 20 L/hr N₂; flujo de gas de desolvatación: 700 L/hr; rango de masas 50 -1200 m/z; modo de adquisición: MSE; energía de colisión alta: 20 V; energía de colisión baja: 10 V; tiempo de escaneo: 1 scan/sec; formato de datos: continuo; calibrante interno del TOF: leucine-enkephalinin fusionado a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 2 ng/mL.

Posteriormente, para el análisis y la normalización de los datos de las muestras de orina por espectrometría de masas se utilizó el software Progenesis Qi (Waters). La normalización de los datos se realizó seleccionando la opción “normalizar a todos los compuestos”.

VI.V Análisis estadístico de datos obtenidos por MS

Las bases de datos con la información obtenida del análisis generado en el CINESTAV-LANGEBIO de los individuos control y de los pacientes con TB, fueron cargadas y analizadas en la plataforma MetaboAnalyst versión 5.0 para su comparación (Xia, J *et al.*, 2009). Los valores faltantes, negativos o ceros, se reemplazaron por la mitad del menor valor presente en los datos considerando éste

como el límite de detección para facilitar el análisis. Para ajustar los datos se utilizó una normalización cuantílica.

Para hacer una aproximación de los valores altos que son anormales, se realizó un análisis de razón de cambio (FC). Este es un método sencillo que presenta varias limitaciones, ya que el número de datos positivos pueden no serlo, por lo que solamente se realizó para tener una primera aproximación de los cambios entre los niveles de metabolitos de orina de la comparación de los individuos controles y los pacientes con TB.

Posteriormente, se realizó una prueba de Wilcoxon, mediante la comparación de las medias entre los dos grupos para observar cuáles son los datos atípicos. Se utilizó un valor de $p=0.05$, siendo nuestra H_0 : las medias no presentan diferencias significativas; y la H_a : las medias presentan diferencias significativas. Todos los datos con un valor de $p<0.05$ nos llevaban a rechazar la H_0 .

También se realizó un gráfico de volcán, que combina la razón de cambio con la prueba estadística de Wilcoxon, para mostrarnos los datos que son atípicos en nuestros dos grupos a analizar; aquellos puntos más dispersos, es decir, más alejados del centro, fueron considerados como los valores de interés.

Posteriormente, se obtuvo un mapa de calor por medio del método de agrupación jerárquica. Este método necesita dos parámetros, el primero es la medida de similitud que, para nuestro análisis, se utilizó la distancia Euclidiana, para así saber qué tan alejados se encuentran los puntos respecto de los otros. El segundo parámetro es el agrupamiento de los datos, para el cual se seleccionó el agrupamiento de Ward que minimiza la suma de cuadrados de ambos grupos a analizar.

Finalmente, se realizó un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Este es un método que usa técnicas de regresión multivariada con la finalidad de obtener las posibles pertenencias a la clase. Se realizó una prueba de permutación para así obtener la importancia de la discriminación de las clases; en cada permutación se construyó un modelo PLS-DA entre los datos X y las etiquetas de clase permutadas Y, utilizando el número óptimo de componentes determinado por validación cruzada para el modelo basado en la asignación de clase original. De los resultados se utilizó la importancia de variable en proyección (VIP) para observar los datos más importantes del análisis y hacer la comparación; los valores VIP se obtienen por la suma ponderada de cuadrados de las cargas de PLS teniendo en cuenta la variación dada en Y y explicada en cada dimensión.

VI.VI Búsqueda de posibles metabolitos en bases de datos

Una vez realizados los análisis estadísticos, se investigaron las identidades de los iones con base a la información proporcionada por el CINVESTAV-LANGEBIO y se buscaron en las bases de datos. Las bases de datos consultadas fueron Metlin (Smith *et al.*, 2005), Human Metabolome Database, HMDB (Wishart *et al.*, 2009) y ChemSpider. Los compuestos seleccionados fueron los que coincidieron con los datos de m/z de los picos (iones). También se buscaron en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa y Goto., 2000) las posibles vías metabólicas en las que están involucrados los compuestos, ingresando el nombre del compuesto. La búsqueda de los compuestos en Metlin y HMDB se realizó utilizando un umbral de peso molecular de ± 0.1 Da, una carga neutral y desconociendo el aducto.

Además de buscar en KEGG las vías metabólicas involucradas, también se realizó un análisis de enriquecimiento de vías en la plataforma MetaboAnalyst mediante los códigos de búsqueda de HMDB de los compuestos, estos se ingresaron en el apartado "Enrichment analysis" y se realizaron dos búsquedas, una en KEGG y otra en SMPDB (Small Molecules Pathway DataBase) para lograr acotar los resultados de forma más precisa y confiable, obteniendo dos gráficos por cada búsqueda.

VI.VII Obtención de redes de interacción

Se obtuvo la estructura química de los compuestos en PubChem y el identificador SMILES. El SMILES se ingresó en la plataforma SwissTargetPrediction para predecir los posibles blancos proteicos con los que interaccionan estos compuestos. Para lo anterior se seleccionó la opción “Homosapiens” y se tomaron las 10 proteínas con valores de probabilidad más altos ($p < 0.5$); lo mismo se hizo con cada compuesto.

Una vez obtenida la lista de 10 proteínas de cada compuesto, se ingresaron en String (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) en el apartado “multiple proteins”. String es una base de datos que muestra la interacción proteína-proteína entre las proteínas (genes o códigos de acceso de base de datos de proteínas) ingresadas. Se obtuvieron redes de interacción individuales, es decir, de cada compuesto, de compuestos endógenos (4-metoxi-17betaestradiol, oxaloacetato y topaquinona), de compuestos exógenos (lamotrigina y fluoxetina) y de todos los compuestos en conjunto.

VIII. Resultados

Los datos sin normalizar de la comparación entre el grupo TB y el grupo control (ctrl) seguían un tipo de distribución bimodal, pero con el ajuste se logró que tuvieran una distribución normal (Figura 1).

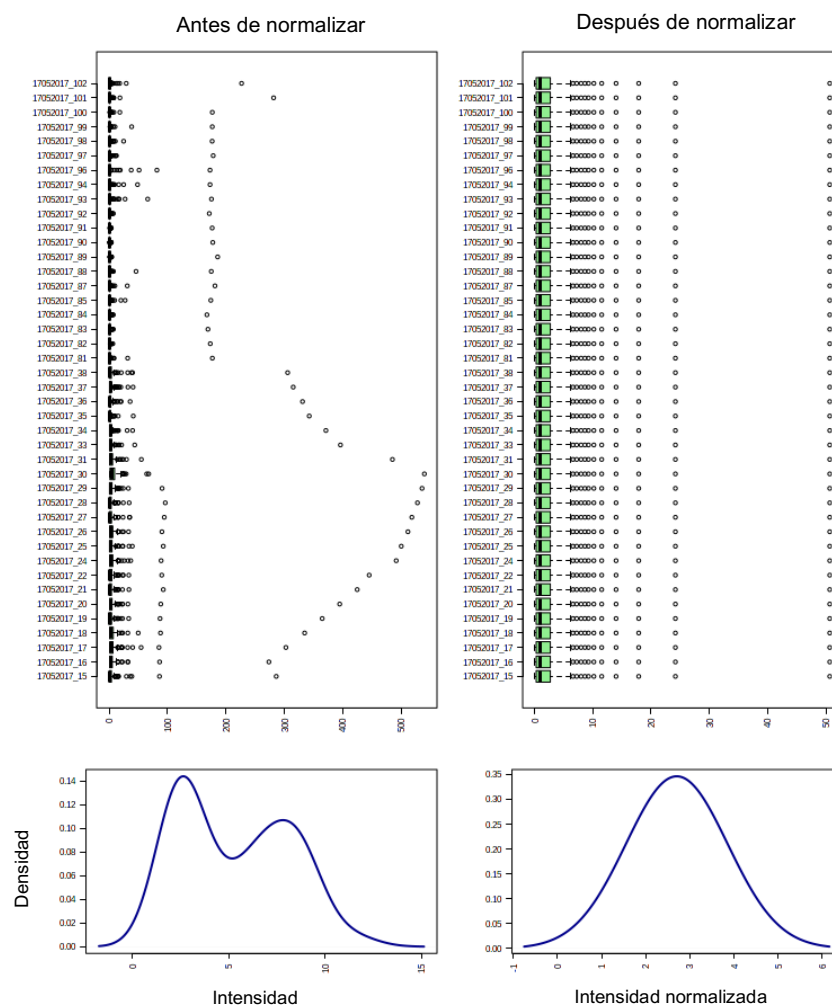


Figura 1. Distribución de los datos de la comparación entre el grupo control y el grupo con TB antes y después de la normalización cuantílica.

En el análisis de razón de cambio, se registraron 23 metabolitos significativamente diferentes entre controles y pacientes con TB (Figura 2). La información sobre estos 23 metabolitos se encuentra desglosada en la Tabla 1.

Los metabolitos que se encuentran representados por puntos grises y que se encuentran distribuidos en la parte media del gráfico son aquellos que no presentaron diferencias significativas y que se encontraban dentro del umbral establecido que, para este análisis fue de 2.

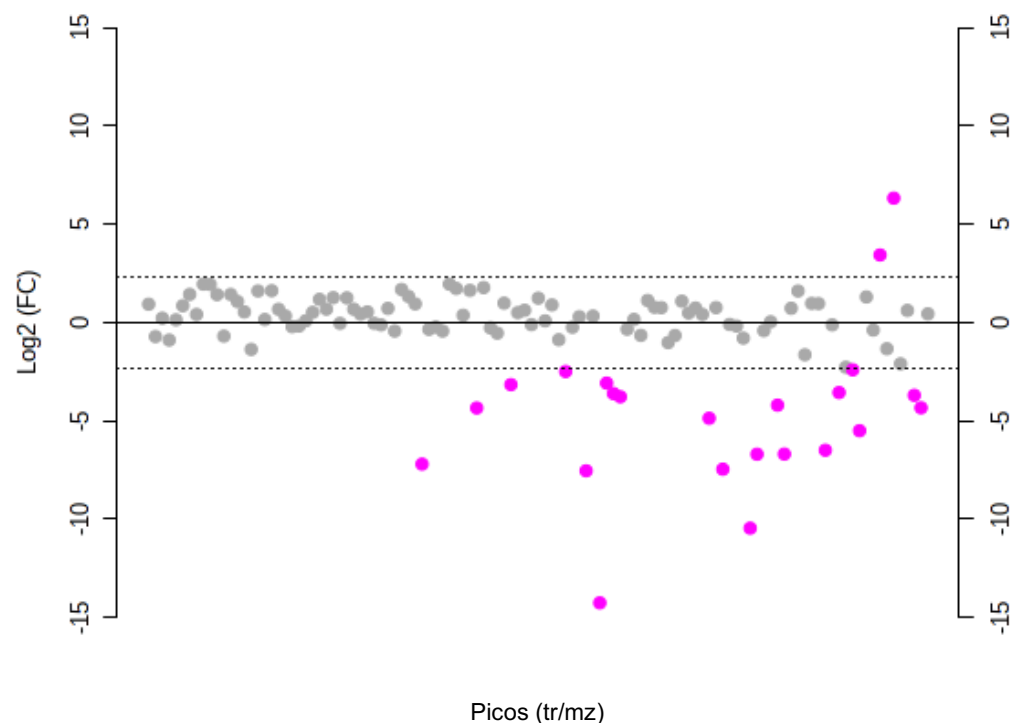


Figura 2. Gráfico de razón de cambio. Los puntos de color rosa representan los picos que se encuentran por encima o por debajo del umbral establecido y que, por lo tanto, presentaron diferencias significativas. Los valores están en escala logarítmica.

Tabla 1. Se enlistan los tiempos de retención (tr/mz) de los 23 metabolitos atípicos observados en el análisis de razón de cambio.

Picos (tr/mz)	Razón de cambio	log2(FC)
4.02_432.0507m/z	5.11E-05	-14.256
4.89_312.1218m/z	0.00071142	-10.457
4.02_256.0198m/z	0.005374	-7.5398
4.99_414.1535m/z	0.0056822	-7.4593
5.71_325.1757m/z	0.0067961	-7.2011
4.99_370.1279m/z	0.0096387	-6.6969
5.36_255.1167m/z	0.0096909	-6.6892
4.99_235.0686n	0.011089	-6.4948
3.71_342.1514m/z	79.996	6.3219
4.99_180.0858m/z	0.022052	-5.5029
5.39_354.1320m/z	0.034214	-4.8693
5.67_311.1636m/z	0.049145	-4.3468
5.78_454.2198m/z	0.049486	-4.3368
4.96_237.1060m/z	0.054298	-4.203
4.02_258.0176m/z	0.07292	-3.7775
4.93_488.1514m/z	0.076858	-3.7017
5.05_427.2213m/z	0.08176	-3.6125
5.83_343.1436m/z	0.084571	-3.5637
4.46_370.1781m/z	10.798	3.4327
5.08_309.1333m/z	0.11183	-3.1606
4.02_434.0499m/z	0.11816	-3.0812
6.92_448.3150m/z	0.17772	-2.4923
4.93_332.1712m/z	0.18858	-2.4067

En la prueba de Wilcoxon (Figura 3), utilizando los parámetros descritos en Metodología, se encontraron 61 metabolitos cuyos valores fueron de $p < 0.05$ (Tabla 2).

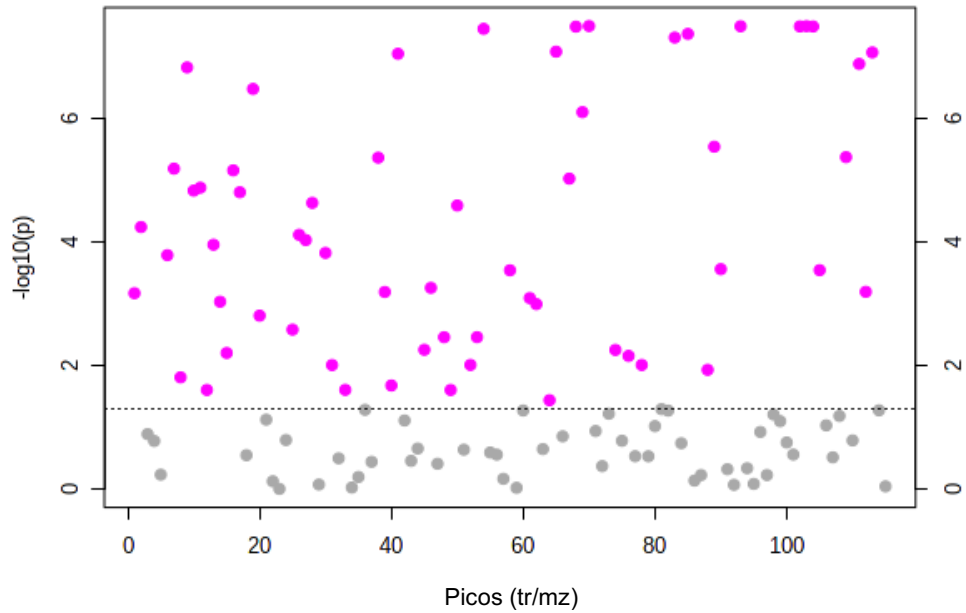


Figura 3. Prueba de rangos de Wilcoxon de la comparación entre los datos de individuos control y pacientes con TB. Los puntos de color rosa representan los picos que se encuentran por debajo de $p=0.05$. Los valores están en escala logarítmica base 10, por lo que los valores menores a 0.05 se encuentran en la parte superior.

Tabla 2. Se enlistan los tiempos de retención (tr/mz) de los 61 metabolitos con valor de $p < 0.05$. De esos 61, 18 coincidieron con los obtenidos en el análisis de razón de cambio (*); también se muestra el valor de la prueba de Wilcoxon (W).

Picos (tr/mz)	W	p.value	-LOG10 (P)
*4.02_258.0176m/z	0	3.13E-08	7.505
4.93_508.2024m/z	0	3.14E-08	7.5034
*4.96_237.1060m/z	0	3.15E-08	7.5011
*5.83_343.1436m/z	0	3.17E-08	7.4989
*4.93_332.1712m/z	0	3.18E-08	7.4978
*4.02_434.0499m/z	0	3.20E-08	7.495
*5.08_309.1333m/z	1	3.47E-08	7.4593
*4.99_414.1535m/z	2	4.19E-08	7.3774
*5.39_354.1320m/z	3	4.81E-08	7.3183
*4.02_256.0198m/z	7	8.14E-08	7.0895
*4.93_488.1514m/z	7	8.38E-08	7.077
*5.71_325.1757m/z	7.5	8.81E-08	7.055
4.58_264.2008m/z	10	1.29E-07	6.8907
3.02_320.9102m/z	428	1.46E-07	6.8342
3.02_380.8776m/z	410	3.27E-07	6.485
*5.05_427.2213m/z	23.5	7.78E-07	6.1089
*4.89_312.1218m/z	36	2.83E-06	5.5483
4.06_440.2337m/z	37	4.18E-06	5.379
*2.08_132.0489n	403	4.26E-06	5.3704
8.74_301.1494m/z	399.5	6.42E-06	5.1924
7.49_290.2933m/z	41	6.84E-06	5.1651
*4.02_432.0507m/z	48	9.32E-06	5.0307
5.31_463.1682m/z	393.5	1.31E-05	4.8839
1.34_152.0149m/z	392.5	1.46E-05	4.8364
0.87_278.9010m/z	392	1.55E-05	4.8099
1.21_269.1317m/z	388.5	2.30E-05	4.6375
1.93_229.1612m/z	387	2.54E-05	4.5954
8.33_360.3724m/z	60	5.68E-05	4.2456
0.87_294.9135m/z	377.5	7.59E-05	4.12
3.24_367.1582m/z	375.5	9.23E-05	4.0349
0.71_170.9837m/z	374	0.00010995	3.9588
1.09_209.0619m/z	371	0.0001493	3.826
8.90_704.4894n	370	0.00016228	3.7897
*4.99_370.1279m/z	76.5	0.00027354	3.563
*4.99_180.0858m/z	76	0.00028422	3.5463
1.40_137.0509m/z	364.5	0.00028545	3.5445
1.77_153.0460m/z	357.5	0.00054969	3.2599
3.80_141.0583m/z	84	0.00063725	3.1957
0.68_290.9196m/z	356	0.00064115	3.193
8.79_149.0290m/z	355.5	0.00067144	3.173
3.80_188.0759m/z	86.5	0.00080518	3.0941
0.94_229.1258m/z	352	0.00092275	3.0349
*6.92_448.3150m/z	89	0.0010094	2.9959

1.65_166.0775m/z	346	0.0015522	2.809
7.46_346.3200m/z	339	0.0026173	2.5821
4.53_302.2046m/z	336.5	0.0034624	2.4606
4.80_257.1564m/z	336.5	0.0034716	2.4595
3.83_340.1092m/z	330.5	0.0055509	2.2556
4.84_304.2195m/z	330.5	0.0055836	2.2531
7.70_348.3370m/z	329	0.0062561	2.2037
5.46_330.2358m/z	327.5	0.0069711	2.1567
3.28_120.0850m/z	117	0.0097807	2.0096
0.56_227.1314m/z	117	0.0097956	2.009
1.34_141.0453m/z	323	0.0098224	2.0078
8.05_200.2083m/z	119.5	0.011737	1.9305
7.08_349.3399m/z	316.5	0.015527	1.8089
4.15_146.0656m/z	312	0.021045	1.6768
3.83_281.1076m/z	309.5	0.024806	1.6054
7.96_240.2765m/z	130.5	0.024888	1.604
*5.67_311.1636m/z	130.5	0.024906	1.6037
5.90_356.2525m/z	303.5	0.036477	1.438

El gráfico de Volcán (Figura 4), arrojó los 18 metabolitos previamente mencionados, confirmando que efectivamente son estos los datos significativamente distintos entre controles y bipolares (Tabla 3).

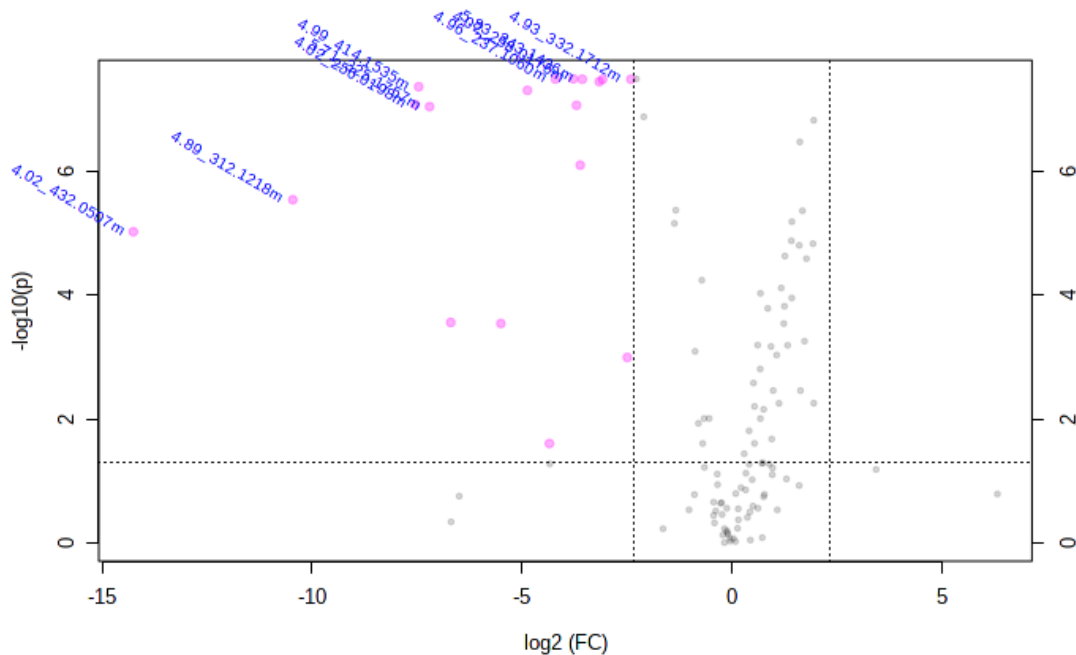


Figura 4. Gráfico de Volcán de la comparación entre los datos de individuos control y pacientes con TB. En el eje x se encuentra el umbral de la razón de cambio con valor de $5 \log_2(\text{ctrl}/\text{tb})$, en el eje y se encuentran los valores de p para el estadístico de Wilcoxon. Los puntos rosas son los datos atípicos obtenidos en el análisis.

Tabla 3. Tiempos de retención y relación masa carga (tr/mz) de los metabolitos obtenidos en el gráfico de volcán. Los 18 son los mismos que coincidieron en el análisis individual de razón de cambio con la prueba de Wilcoxon.

Picos (tr/mz)	Razón de cambio	log2(FC)**	-LOG10 (P)
4.02_258.0176m/z	0.07292	-3.7775	7.505
4.96_237.1060m/z	0.054298	-4.203	7.5011
5.83_343.1436m/z	0.084571	-3.5637	7.4989
4.93_332.1712m/z	0.18858	-2.4067	7.4978
4.02_434.0499m/z	0.11816	-3.0812	7.495
5.08_309.1333m/z	0.11183	-3.1606	7.4593
4.99_414.1535m/z	0.0056822	-7.4593	7.3774
5.39_354.1320m/z	0.034214	-4.8693	7.3183
4.02_256.0198m/z	0.005374	-7.5398	7.0895
4.93_488.1514m/z	0.076858	-3.7017	7.077
5.71_325.1757m/z	0.0067961	-7.2011	7.055
5.05_427.2213m/z	0.08176	-3.6125	6.1089
4.89_312.1218m/z	0.00071142	-10.457	5.5483
*4.02_432.0507m/z	5.11E-05	-14.256	5.0307
4.99_370.1279m/z	0.0096387	-6.6969	3.563
4.99_180.0858m/z	0.022052	-5.5029	3.5463
6.92_448.3150m/z	0.17772	-2.4923	2.9959
5.67_311.1636m/z	0.049145	-4.3468	1.6037

(*) Este compuesto también resultó ser de interés ya que tiene un valor de p estadísticamente significativo y una razón de cambio elevada.

(**) FC= ctrl/tb

En el mapa de calor se lograron observar solamente dos, fluoxetina (5.08_309.1333 m/z) y dipéptidos (4.93_332.1712 m/z), de los 18 metabolitos obtenidos en análisis anteriores. Sin embargo, el oxaloacetato (2.08_132.0489 n) resultó de interés porque se encuentra aumentado en controles y disminuido en pacientes TB (Figura 5). En los valores VIP obtenidos por PLS-DA, hubo tres coincidencias: dipéptidos, 4-metoxi-17beta-estradiol (5.71_325.1757 m/z) y topaquinona (4.02_256.0198 m/z) (Figura 6).

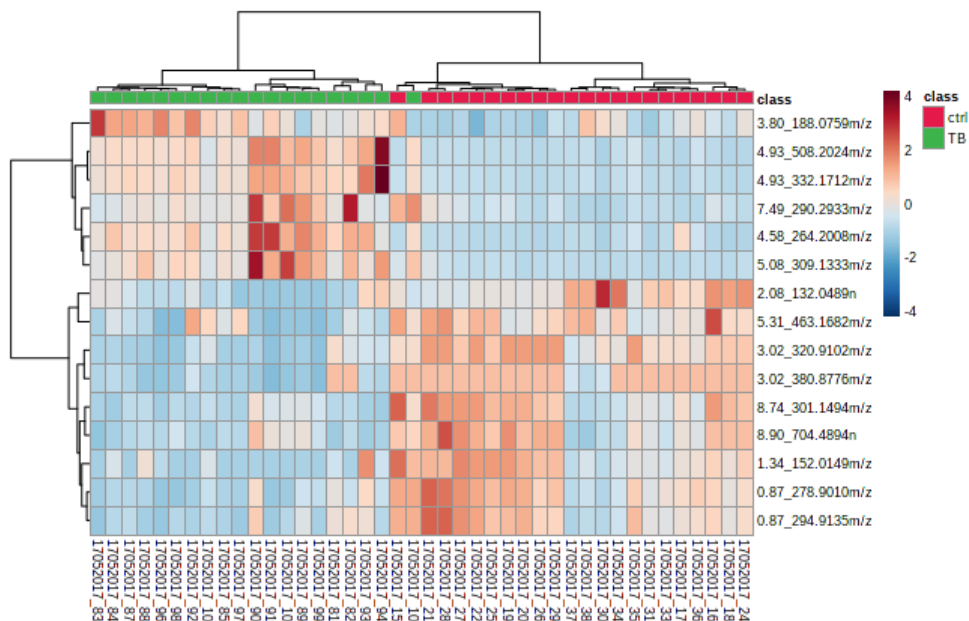


Figura 5. Mapa de Calor de la comparación entre los datos de individuos control y pacientes con TB. Los dos picos relevantes, con base a los análisis antes obtenidos, son fluoxetina (5.08_309.1333 m/z) y dipéptidos (4.93_332.1712 m/z) y por las diferencias entre ambos grupos, el oxaloacetato (2.08_132.0489 n).

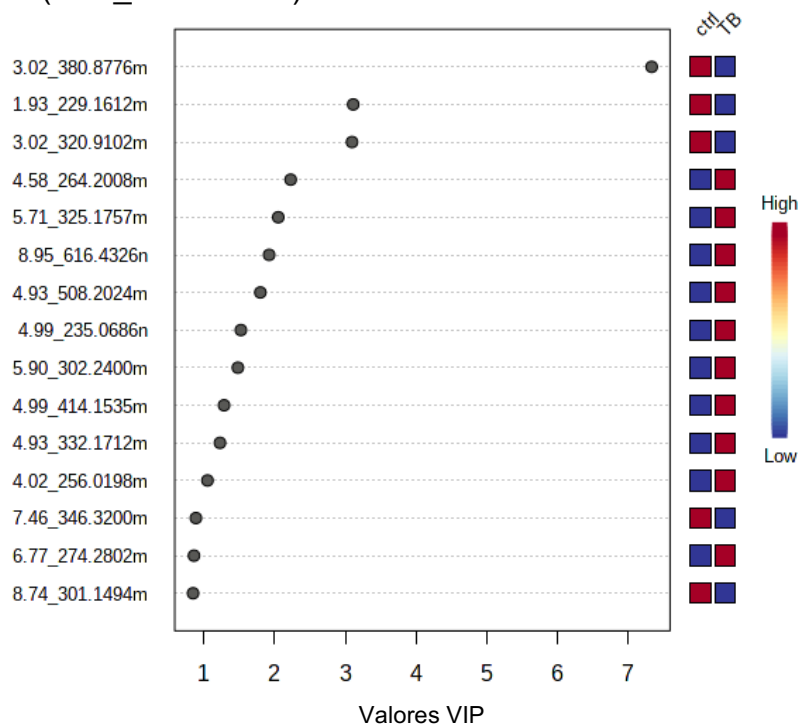


Figura 6. PLS-DA de los datos de MS de la orina de pacientes con TB y control. Se muestran los resultados VIP obtenidos. Los tres picos que coincidieron con los 18 obtenidos en los análisis anteriores son dipéptidos (4.93_332.1712 m/z), 4-metoxi-17beta-estradiol (5.71_325.1757 m/z) y topaquinona (4.02_256.0198 m/z).

Con el análisis de PLS-DA se corroboró que los datos se separan en dos grupos bien definidos, siendo los puntos rosas los individuos control y los verdes los pacientes con TB (Figura 7).

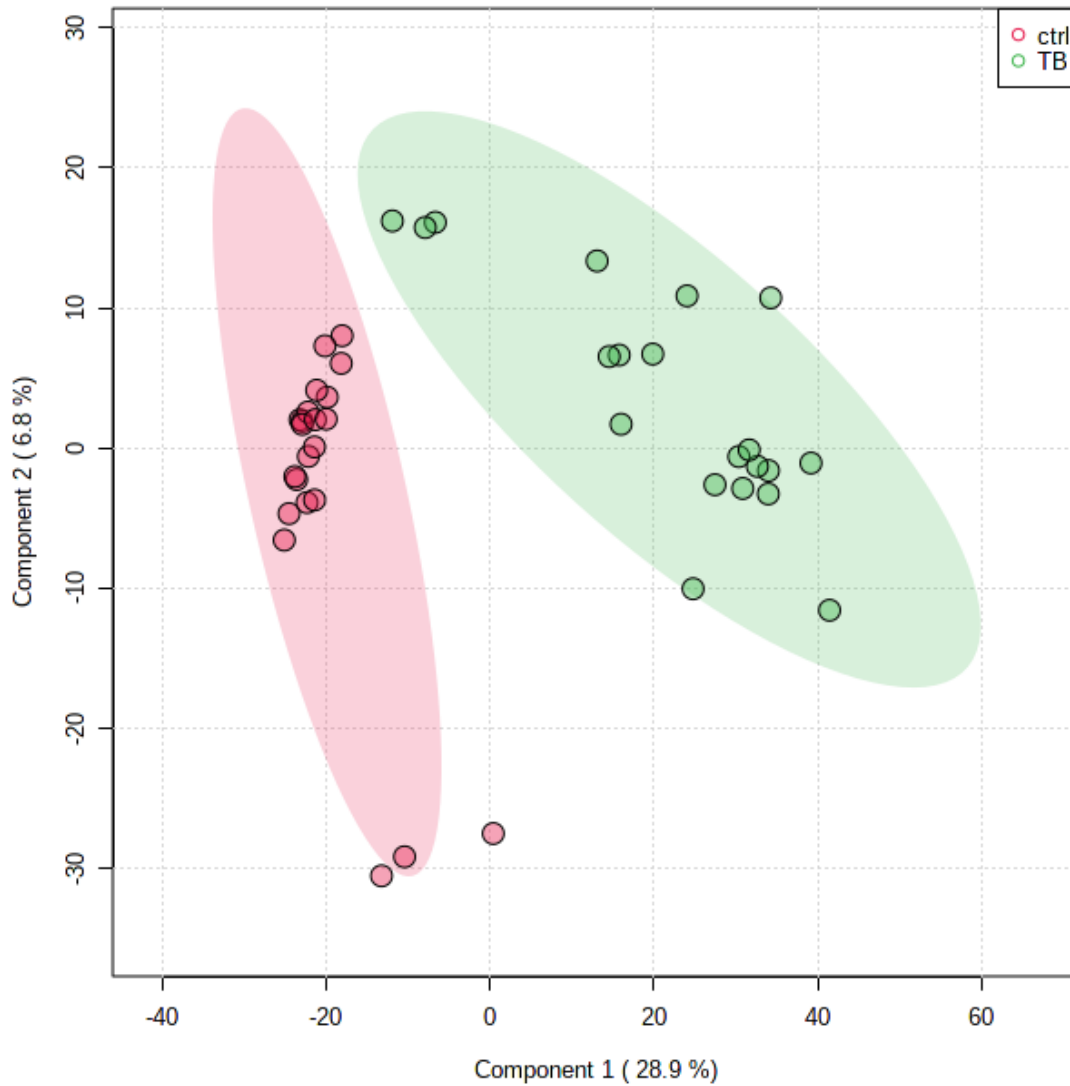


Figura 7. Análisis de PLS-DA de los datos de MS de los grupos control y con trastorno bipolar. Se muestran los dos grupos que se separan con los datos que se suministran para verificar que esta información es suficiente para separar los casos de los pacientes TB.

Una vez concatenados los tiempos de retención de los metabolitos más relevantes obtenidos de todos los análisis, se realizó la búsqueda de éstos en la base de datos de posibles compuestos proporcionada por el CINVESTAV-LANGEBIO y también se realizó una búsqueda en METLIN, HMDB y ChemSpider. Todos los compuestos encontrados están disponibles en el apartado de Apéndices en APENDICE II.

En la tabla 4 se muestran los metabolitos seleccionados como candidatos debido a que resultaron estadísticamente diferentes en varias pruebas sugiriendo una relación con el TB. Como se puede observar, todos los metabolitos tienen un valor de FC muy bajo. Esto indica que su concentración es más elevada en la orina de pacientes con TB. El oxaloacetato cuenta con valor FC mayor a 1, lo que significa que su concentración disminuye en orina de pacientes TB.

Tabla 4. Picos relevantes del análisis. Se muestran los seis posibles compuestos principales, con los datos obtenidos en MetaboAnalyst y con la información proporcionada por el CINVESTAV-LANGEBIO, a excepción de la lamotrigina (4.02_432.0507 m/z), la cual se identificó mediante tres bases de datos, las cuales se encuentran descritas en la metodología y del oxaloacetato (2.08_132.0489 n) que se obtuvo gracias al mapa de calor. Los valores negativos del log₂ (ctrl/TB) indican que, los metabolitos se encuentran más concentrados en los pacientes con TB.

Picos (tr/mz)	m/z	Razón de cambio	Compuesto	ID	-LOG ₁₀ (P)	log ₂ (FC)
2.08_132.0489 n	132.0058732 38	1.2567	Oxaloacetato	HMDB0000223	-5.3704	3.033
4.02_256.0198 m/z	256.0198492 72058	0.005374	Topaquinona	HMDB11639	7.0895	-7.5398
4.93_332.1712 m/z	332.1711822 4299	0.18858	Dipéptidos (Leu-Arg)	CSID3027543	7.4978	-2.4067
5.08_309.1333 m/z	309.1340488 18	0.11183	Fluoxetina	HMDB0014615	7.4593	-3.1606
5.71_325.1757 m/z	325.1757159 9454	0.006796	4-metoxi-17beta- estradiol	HMDB12782	7.055	-7.2011
4.02_432.0507 m/z	432.0472151	5.11E-05	Lamotrigina	HMDB0061103	5.0307	-14.256

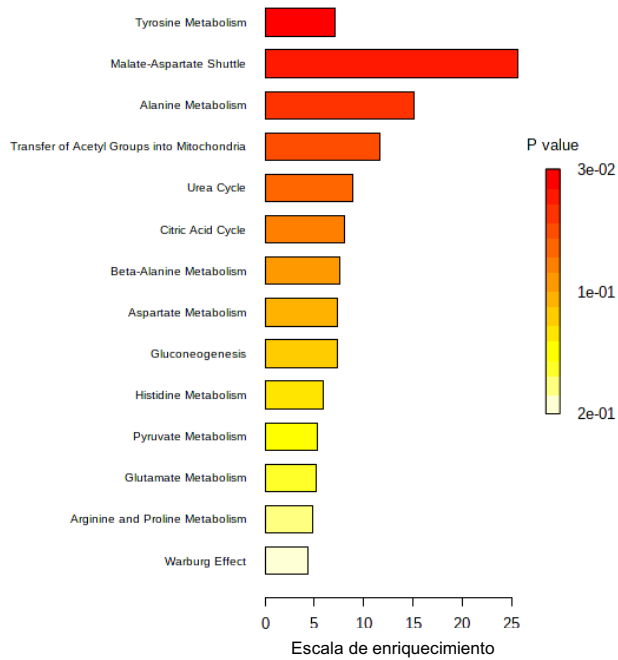
En cuanto al análisis de los niveles de creatinina, no se encontraron incrementos anormales en la filtración glomerular que pudiera modificar la filtración normal de metabolitos hacia la orina (Tabla 5).

Tabla 5. Cuadro comparativo de los niveles de creatinina en orina entre individuos control y pacientes con TB

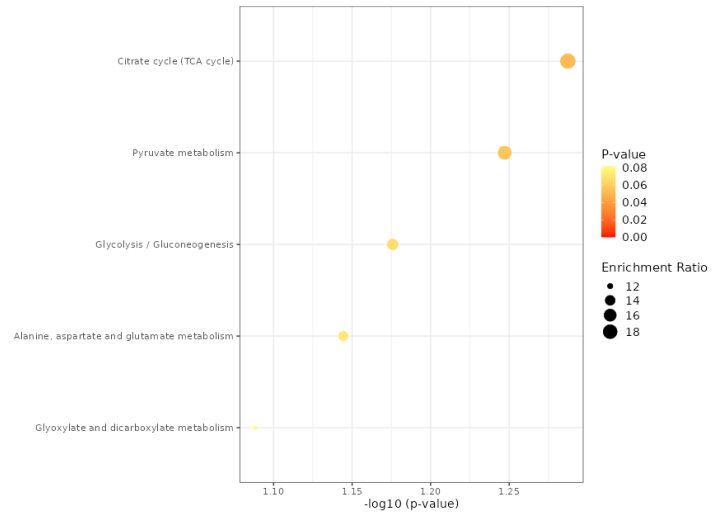
Grupo	Niveles de creatinina (abundancia normalizada)
Control	2.82 ±1.23
TB	3.14 ±1.49

En la búsqueda realizada en MetaboAnalyst mediante los códigos de HMDB de los compuestos candidatos se encontró tanto con KEGG como con SMPDB, que los compuestos posiblemente tengan un rol importante en vías como el metabolismo de tirosina, la salida de malato-aspartato, el ciclo de Krebs, el ciclo de la urea, la gluconeogénesis y el metabolismo de piruvato, por mencionar algunos (Figura 8).

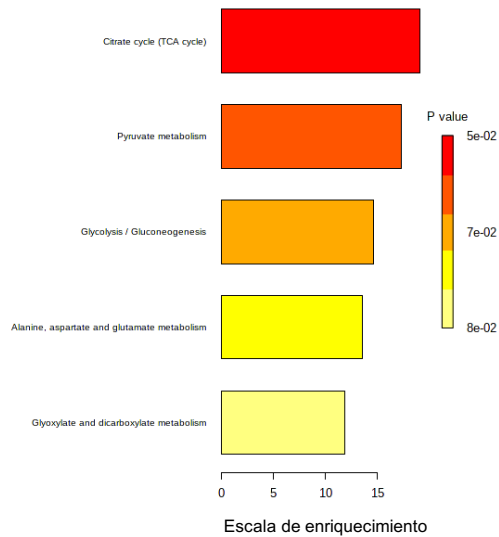
A Descripción del enriquecimiento del set de metabolitos



Descripción del enriquecimiento del set de metabolitos



B Descripción del enriquecimiento del set de metabolitos



Descripción del enriquecimiento del set de metabolitos

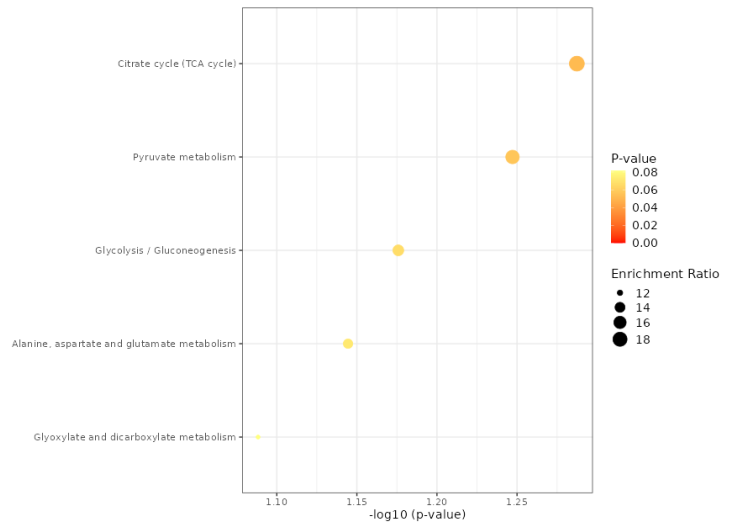


Figura 8. Enriquecimiento de vías. Se muestran los gráficos de las posibles vías en las que se involucran los compuestos reportados en una escala donde, las barras de color rojo indican una mayor interacción y el color amarillo claro una menor interacción; mientras que, en el gráfico de puntos, entre más grande es el punto, mayor es el rango de interacción. Respectivamente se muestran los gráficos obtenidos con KEGG (A) y los obtenidos con SMPDB (B).

Respecto a las redes de interacción, se obtuvo el mapeo de las proteínas blanco de los compuestos propuestos individuales, agrupados por compuestos exógenos y el mapa de la interacción entre todas las proteínas de todos los compuestos (APENDICE IV).

Un resultado muy importante fue resaltar que hay una relación entre los tres compuestos endógenos registrados como son el 4-metoxi-17beta-estradiol, la topaquinona y el oxaloacetato, ya que las proteínas blanco de los compuestos están interaccionando entre ellas (Figura 9). Entre los nodos más conectados n (hubs) y que conectan los racimos (clústers) se encuentran los receptores de estrógenos (ESR1 y ESR2), el transportador de serotonina como SCL6A4 y el receptor a glutamato (GRM2). Esto sugiere la participación de las vías de señalización correspondientes en el fenotipo del trastorno bipolar.

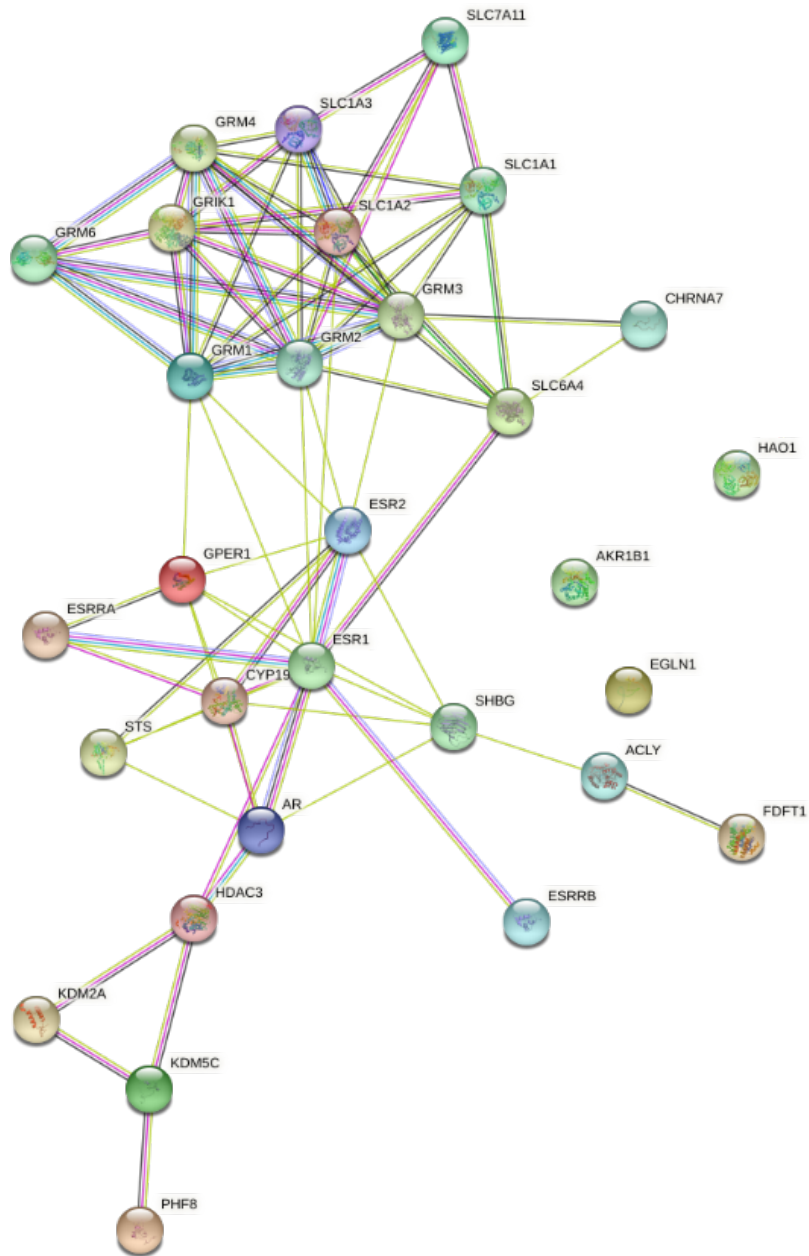


Figura 9. Red de interacción de compuestos endógenos. Se muestra la interacción entre las proteínas blanco del compuesto 4-metoxi-17beta-estradiol, topaquinona y oxaloacetato; se puede observar que la mayoría guardan una relación a excepción de las proteínas HAO1, AKR1B1 y EGLN1.

IX. Discusión

Las aproximaciones para el estudio de las bases biológicas del TB están enfocadas en el mecanismo de acción de antidepresivos y antipsicóticos y del papel de neurotransmisores de tipo monoamina (por ejemplo, serotonina y dopamina) (Kato., 2019). Un ejemplo de esto es el modo de acción del litio; esto ha llevado al estudio de varias vías de transducción que incluyen el metabolismo de inositol y señalización que involucra el flujo de calcio en las neuronas. Sobre este último punto, se ha observado una vulnerabilidad genética de la mitocondria ocasionada por la desregulación de los flujos de calcio, lo que resulta en la hiperexcitabilidad de las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo, estos estudios se han realizado en muestras de cerebro post-mortem de pacientes con TB que fueron medicados con varios fármacos como el litio y el valproato, por lo que es difícil diferenciar entre el efecto del medicamento y el de la enfermedad como tal (Kato., 2019).

En este trabajo se encontraron dos posibles fármacos, la lamotrigina (4.02_432.0507 m/z) y la fluoxetina (5.08_309.1333 m/z). La lamotrigina es un antiepiléptico derivado de la triazina que se usa como fármaco de mantenimiento en personas con TB I (Asociación Española de Pediatría., 2022). Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje de neuronas, inhibiendo la liberación de glutamato y aspartato. En un estudio in vivo se reveló que la lamotrigina inhibe los canales de calcio Cav2.3 (tipo R), algo que se relaciona con lo reportado sobre los canales Cav1.2 (Harrison *et al.*, 2018; Stahl *et al.*, 2020).

La fluoxetina es un antidepresivo utilizado en el trastorno depresivo mayor que bloquea selectivamente al transportador de recaptación de serotonina en la terminal sináptica de las neuronas. Además, tiene afinidad por los transportadores 5-HT, mecanismo a través del cual es capaz de aumentar los niveles de noradrenalina y dopamina en la corteza prefrontal (Wishart *et al.*, 2018).

Los compuestos endógenos que se encontraron mediante MS fueron la topaquinona (TPQ), algunos dipéptidos como Leu-Arg, el oxaloacetato y el 4-metoxi-17beta-estradiol, de los cuales es necesario conocer un poco más para posteriormente destacar su relación entre sí y su relevancia con el TB.

La TPQ (4.02_256.0198m/z) surge debido al autoprosesamiento de las aminooxidasas con la intervención del cobre en el sitio activo de unión a Cu, el cual es capaz de llevar a cabo la oxidación de tirosina a TPQ en presencia de oxígeno (Rinaldi *et al.*, 1998). Se han reportado distintas funciones para las enzimas con TPQ como la regulación de la homeostasis de la glucosa, la adhesión de linfocitos y la maduración de adipocitos. Por lo anterior, es posible sugerir que al verse involucrado en la regulación de la glucosa, afecta de alguna manera en la producción de ATP, alterando así el estado metabólico de personas con TB. Lo que se ha reportado es que durante la formación del cofactor se forma un intermediario aminoquinol (Wilmot *et al.*, 1999) y posteriormente, un intermediario L-dopaquinona. En este último se introduce un átomo de oxígeno generando un TPQ reducido que se oxida reduciendo oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno para formar el cofactor TPQ maduro (Klema y Wilmot., 2012). La L-dopaquinona es un intermediario común propuesto en la generación de los dos cofactores quinónicos derivados de tirosina: TPQ y LTQ (Klinman., 2001). El cofactor LTQ se ha descrito en lisil-oxidasas (LOX) (Wang *et al.*, 1996). Además de que se ha reportado que la LOXL2 oxida a TAF10, lo cual lo libera de su promotor bloqueando la expresión de los genes que dependen de este factor para su transcripción. En el desarrollo de pez cebra, la ausencia de LOXL2 resulta en una aberrante expresión de *Xox2* neural y en una diferenciación neuronal deteriorada (Iturbide *et al.*, 2015). Dado que este cofactor se encuentra en la orina y en mayor proporción en pacientes con TB en contraste con individuos control, se sugiere una mayor degradación de este tipo de proteínas en pacientes con TB probablemente por proteólisis o por estrés oxidativo; esto podría verse afectado desde etapas tempranas del neurodesarrollo del individuo con TB. Sin embargo, aún con todo esto ya reportado, se requieren de más estudios para evaluarlo adecuadamente en personas con TB.

El 4-metoxi-17beta-estradiol (5.71_325.1757 m/z) es un compuesto esteroide. Sobre estos compuestos hay dos estudios muy interesantes que ligan a las hormonas con el trastorno bipolar. Frey y Dias (2014) reportan que las mujeres presentan irregularidades en el estado de ánimo en periodos específicos de su vida reproductiva, como en el periodo premenstrual, durante el embarazo, en el periodo postparto y en la transición a la menopausia. Cuando ya existe un diagnóstico de TB en una mujer antes del embarazo, es un indicador de que se debe retomar el tratamiento en las primeras tres semanas después de haber parido. Los estrógenos tienen un efecto positivo en un factor de crecimiento perteneciente a la familia de las neurotropinas llamado factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF), el cual tiene la función de regular la maduración neuronal, la diferenciación, la supervivencia, la neurotransmisión y la plasticidad sináptica; el estradiol incrementa la expresión de BDNF, aumentando así la supervivencia neuronal y mejorando el rendimiento cognitivo. Por último, los estrógenos ayudan a estabilizar la producción de serotonina y dopamina (Frey y Dias, 2014).

En otros tipos celulares como el cáncer renal, se ha observado que tanto el 4-hidroxi-estradiol como el 4-metoxiestradiol incrementan la expresión de catecol-O-metiltransferasa (COMT) y con esto se mejora el proceso de apoptosis de este tipo celular llevando a un arresto en su proliferación (Chang *et al.*, 2012). En este estudio el 4-metoxi-17beta-estradiol se ve a la alta (Tabla 4), lo cual sugiere un efecto negativo en BDNF, algo que resulta interesante ya que se ha reportado que los niveles de BDNF se encuentran disminuidos en suero de pacientes con TB sin medicación durante el periodo maniaco (Machado-Vieira *et al.*, 2007).

Gogos *et al.* (2019) refuerzan lo reportado por Frey y Dias (2014) al analizar más a fondo las diferencias entre mujeres con TB y mujeres control en su periodo reproductivo, mostrando y comparando los cambios hormonales en porcentajes. También mencionan que hay varios estudios que resaltan la eficiencia de ciertos moduladores de los receptores de estrógenos como tratamiento del TB;

sin embargo, también resaltan que en otro estudio no se vio un cambio significativo en el estado de ánimo en mujeres con TB al ser tratadas con hormonas esteroides sintéticas.

Lo que nos muestran estos dos estudios es que los estrógenos, así como otras hormonas sexuales, tiene un papel importante en la modulación del estado de ánimo y, lo más importante es que, las mujeres que padecen TB presentan mayor riesgo de sufrir los cambios de ánimo de manera más abrupta en comparación con una mujer sana. Por ejemplo, en el periodo postparto y en la transición a la menopausia, la caída en un episodio de depresión es inminente y posiblemente más riesgoso en una mujer con TB (Gogos *et al.*, 2019).

Se encontraron dipéptidos (4.93_332.1712 m/z) como Leu-Arg, lo cual coincide con algunos trabajos que demuestran que estos compuestos tienen efectos neurotrópicos, neurosecretores, neuroestimulantes y neuroinhibidores. Algunos dipéptidos se forman a partir de proteínas precursoras y otros de aminoácidos constituyentes (Ueda *et al.*, 1989). Un ejemplo de la acción de los dipéptidos a nivel cerebral es el efecto analgésico del compuesto [Tir6]- γ 2-MSH(6–12) (Wei *et al.*, 2010). Los efectos analgésicos a altas concentraciones están mediados por el sistema opioide y para comprobar esto al utilizar naloxona, compuesto que inhibe los receptores opioides, se observó que los efectos analgésicos se reducen muy poco, por lo que se sugiere que estos efectos podrían no estar mediados por este sistema (Wei *et al.*, 2010). Basándose en la similitud de la secuencia N-terminal de [Tir6]- γ 2-MSH(6–12) y la kiotorfina (regulador del dolor en el cerebro), se enfocaron en el receptor de kiotorfina y utilizaron Leu-Arg, su antagonista, para inducir la analgesia. Sin embargo, al inyectar el dipéptido en ratas, el efecto fue totalmente suprimido, disparándose la hiperalgesia a un nivel moderado, pero con larga duración. Lo anterior es un ejemplo de cómo los dipéptidos se ven involucrados en la modulación de ciertos procesos neuronales, por lo que no resulta extraña la diferencia encontrada entre nuestros sujetos control y aquellos que padecen TB, sugiriendo que, posiblemente los receptores no estén trabajando de manera regular.

Por último, el oxaloacetato (2.08_132.0489 n), el único compuesto que se encontró disminuido en pacientes TB, es bien sabido que está involucrado en el ciclo de Krebs, por lo tanto, en la producción de energía en forma de ATP. Tungtur *et al.* (2021) reforzaron la relevancia que tiene el oxaloacetato en la investigación que realizaron. Mencionan que este compuesto tiene funciones neuroprotectoras, que mejora la fuerza muscular, ayuda a reducir la neuroinflamación en la médula espinal y en otro de sus trabajos publicados señalan que mejora las vías de señalización de la biogénesis mitocondrial en el cerebro; sin embargo, al tratar de demostrar si había mejoramiento en la respiración celular, no encontraron algo al respecto.

En la red de interacción se pudo observar que todas las proteínas se relacionan entre sí, por lo que se piensa que también lo hacen los compuestos tal y como se propone en la Figura 10

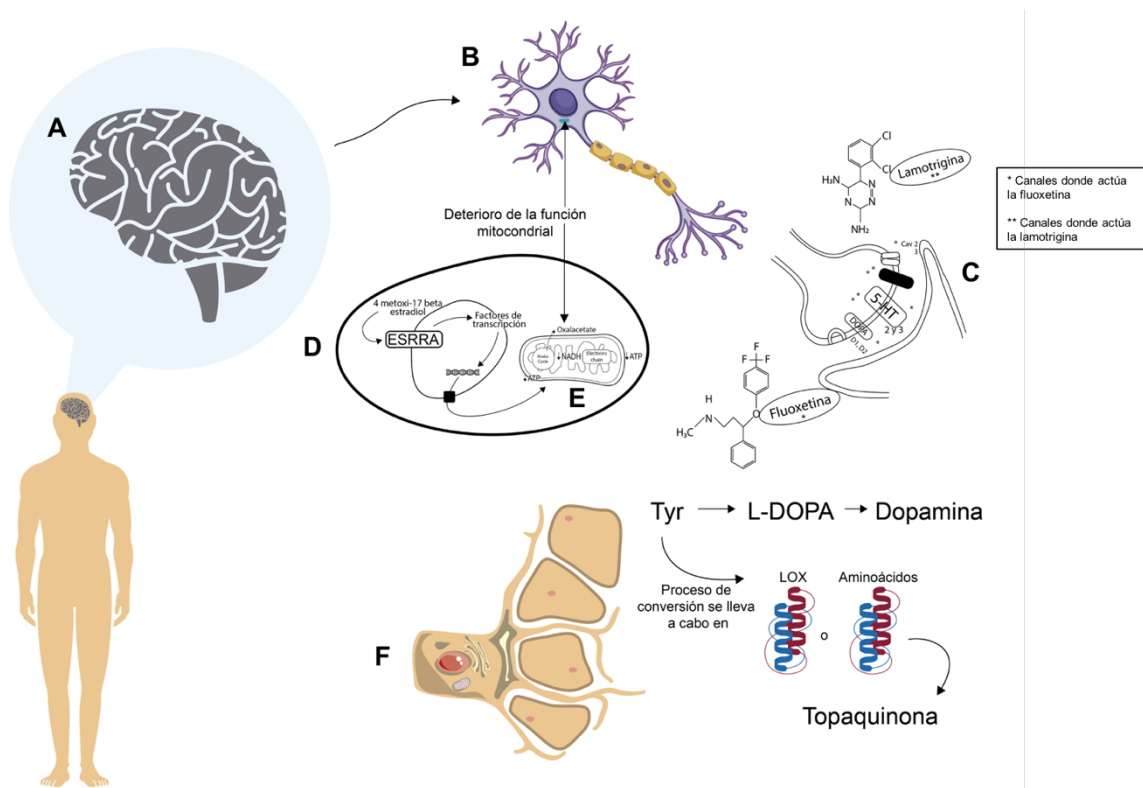


Figura 10. Zonas y procesos en los que se ven involucrados los compuestos encontrados. En el cerebro humano (A) se encuentran las neuronas (B) en las que se lleva a cabo la sinapsis (C); en las terminaciones nerviosas se encuentran los canales Cav 1 y 2, 5-ht, DOPA y D1 y D2 sobre los cuales tienen efecto los compuestos exógenos lamotrigina y fluoxetina. En el núcleo de las células somáticas (D) se encuentra el receptor ESRRR con el cual interactúa el compuesto 4-metoxi-17beta-estradiol; este canal es un factor de transcripción que traduce señales metabólicas específicas en un perfil de expresión génica específico para aportar a las demandas energéticas requeridas para diversas funciones biológicas, entre ellas el suministro de ATP para la mitocondria (E) en donde el oxaloacetato se encontró disminuido en pacientes TB. Por último, se muestra el proceso de conversión de tirosina a TPQ el cual se lleva a cabo en el melanocito (F), el cual está directamente comunicado con el sistema nervioso, por lo que se presume que este compuesto tenga repercusiones a nivel cerebral.

X. Conclusión

Se encontró oxaloacetato disminuido, un metabolito del ciclo de Krebs, lo que nos sugiere una posible baja energética; también se encontró topaquinona aumentada lo que involucra un mayor metabolismo de tirosina precursor de neurotransmisores. La elevada concentración de 4-metoxi-17beta-estradiol sugiere una mayor actividad en la señalización por receptores a estrógenos en pacientes TB.

Como ya se mencionó anteriormente, el interés actual de realizar estudios metabólicos en muestras de orina de personas con trastornos mentales se debe, principalmente, a que son enfoques no invasivos, esto permite obtener información novedosa de las alteraciones metabólicas que ocurren en este tipo de patologías. Dado a que la orina es una de las vías de excreción por excelencia, es posible detectar en este fluido de desecho algunas alteraciones en el metabolismo resultante de las alteraciones en los procesos cerebrales en pacientes con TB como lo que se ha encontrado en esta investigación y en los trabajos aquí mencionados.

XI. Perspectivas

Para tener una idea más clara de estos hallazgos y de lo antes mencionado, se requiere un análisis más profundo enfocado en la presencia, actividad y relevancia de estos compuestos en personas con trastorno bipolar, así como una selección y monitoreo más riguroso de las y los participantes

Esta aproximación abre las puertas para un estudio metabólico de orina en un grupo con un mayor número de muestras, más completo y detallado.

XII. Referencias

1. Asociación Española de Pediatría, 2022, Lamotrigina, [Internet] [Citado 03 de julio 2022] Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/lamotrigina>
2. Bujak, R, Struck-Lewicka, W, Markuszewski, MJ, Kaliszan, R, 2015, *Metabolomics for laboratory diagnostics*, J Pharm Biomed Anal, doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.017. Epub 2014 Dec 25. PMID: 25577715.
3. Cabrera, A, Garnica, A, Reyes, L, Sánchez, G y B, H.U, 2019, *Efecto analgésico de dos formas farmacéuticas tópicas con extracto de Lactuca sativa*, Tequio, pp 17-23, ISSN: 2594-0546 Oaxaca.
4. Chang, I, Liu, J, Majid, S, Saini, S, Zaman, M.S, Yamamura, S, Shahryari, A, Chiyomaru, T, Deng, G, Dahiya, R y Tanaka, Y, 2011, *Catechol-O-methyltransferase-mediated metabolism of 4-hydroxyestradiol inhibits the growth of human renal cancer cells through the apoptotic pathway*, Carcinogenesis vol.33 no.2 pp.420–426, 2012 doi:10.1093/carcin/bgr294.
5. Chen, JJ, Xie, J, Zeng, L, Zhou, CJ, Zheng, P y Xie, P, 2019, *Urinary metabolite signature in bipolar disorder patients during depressive episode*, Aging (Albany NY). 2019 Feb 5;11(3):1008-1018. doi: 10.18632/aging.101805. PMID: 30721880; PMCID: PMC6382435.
6. Duffy, A, Horrocks, J, Doucette, S, Keown-Stoneman, C, McCloskey, S y Grof, P, 2014, *The developmental trajectory of bipolar disorder*, Br J Psychiatry. doi: 10.1192/bjp.bp.113.126706. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24262817. Cambridge University.
7. Frey, BN y Dias, RS, 2014, *Sex hormones and biomarkers of neuroprotection and neurodegeneration: implications for female reproductive events in bipolar disorder*, John Wiley & Sons Ltd, Bipolar Disord. doi: 10.1111/bdi.12151. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24206266. Canadá.
8. García-Blanco, A, Sierra, Pilar y Livianos, L 2014, *Nosología, epidemiología y etiopatogenia del trastorno bipolar: Últimas aproximaciones*, Psiq Biol. doi:

- 10.1016/j.psiq.2014.07.004, 2014;21(3):89-94, Universidad de Valencia Valencia, España.
9. Garrote, H, Gómez, M, Jaime, J.C, Pavón, V y Martínez, G, 2012, *Esferocitosis hereditaria: de la biogénesis a la patogénesis*, Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Homoterapia [internet]. [citado 03 de julio 2022]; 28 (4) Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/10>, La Habana, Cuba.
 10. Ghaemi, SN, Hsu, DJ, Soldani, F y Goodwin, FK, 2003, *Antidepressants in bipolar disorder: the case for caution*, Bipolar Disord. 2003 Dec;5(6):421-33. doi: 10.1046/j.1399-5618.2003.00074.x. PMID: 14636365. Blackwell Munksgaard, Washington DC, Estados Unidos.
 11. Gogos, A, Ney, L.J, Seymour, N, Van Rheenen, T. E y Felmingham, K. L, 2019, *Sex differences in schizophrenia, bipolar disorder, and post-traumatic stress disorder: Are gonadal hormones the link?*, Br J Pharmacol. 2019 Nov;176(21):4119-4135. doi: 10.1111/bph.14584. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30658014; PMCID: PMC6877792, Gran Bretaña.
 12. Guía de Práctica Clínica, 2010, *Diagnóstico y Tratamiento del Trastorno Bipolar*, México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
 13. Harrison, P.J, Geddes, J.R y Tunbridge, E.M, 2018, *The emerging neurobiology of bipolar disorder*, Trends Neurosci. 2018 Jan;41(1):18-30. doi: 10.1016/j.tins.2017.10.006. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29169634; PMCID: PMC5755726, CellPress Reviews.
 14. Iturbide, A, Pascual-Reguant, L, Fargas, L, Cebriá, J.P, Alsina, B, García de Herreros, A y Peiró, S, 2015, *LOXL2 oxidases methylated TAF10 an controls TFIIID-dependent genes during neural progenitor differentiation*, Mol Cell. 2015 Jun 4;58(5):755-66. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.012. Epub 2015 May 7. PMID: 25959397.
 15. Izaguirre, V.L y Zavaleta, A.I, 1998, *Canales de calcio dependientes*, Ciencia e investigación, Vol.1 No.1 Lima, Perú, Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01_n1/calcio.htm

16. Kakiuchi, C, Iwamoto, K, Ishiwata, M, Bundo, M, Kasahara, T, Kusumi, I, Tsujita, T, Okazaki Y, Nanko, S, Kunugi, H, Sasaki T y Kato T 2003, *Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder*, Nat Genet. 2003 Oct;35(2):171-5. doi: 10.1038/ng1235. Epub 2003 Aug 31. PMID: 12949534.
17. Kanehisa, M y Goto, S, 2000, *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):27-30. doi: 10.1093/nar/28.1.27. PMID: 10592173; PMCID: PMC102409.
18. Kathuria, A, Lopez-Lengowski, K, Vater, M, McPhie, D, Cohen, B y Karmacharya, R, 2020, *Transcriptome analysis and functional characterization of cerebral organoids in bipolar disorder*, Genome Med. 2020 Apr 19;12(1):34. doi: 10.1186/s13073-020-00733-6. PMID: 32306996; PMCID: PMC7168850.
19. Kato, T, 2019, *Current understanding of bipolar disorder: Toward integration of biological basis and treatment strategies*, Psychiatry Clin Neurosci. 2019 Sep;73(9):526-540. doi: 10.1111/pcn.12852. Epub 2019 May 23. PMID: 31021488.
20. Klema, V.J y Wilmot, C.M, 2012, *The role of protein crystallography in defining the mechanisms of biogenesis and catalysis in copper amine oxidase*, Int J Mol Sci. 2012;13(5):5375-405. doi: 10.3390/ijms13055375. Epub 2012 May 3. PMID: 22754303; PMCID: PMC3382800.
21. Klinman, J, 2001, *Life as aerobes: are there simple rules for activation of dioxygen by enzymes?*, J Biol Inorg Chem. 2001 Jan;6(1):1-13. doi: 10.1007/s007750000172.
22. Lakshmanan, J, Seelan, R.S, Thangavel, M, Vadnal, R.E, Janckila, A.J, Casanova, M.F, Parthasarathy, L.K y Parthasarathy, R.N, 2012, *Proteomic analysis of rat prefrontal cortex after chronic lithium treatment*, J. Proteomics Bioinform 5: 140-146, doi: 10.4172/jpb.1000226.
23. Lan, MJ, McLoughlin, GA, Griffin, JL, Tsang, TM, Huang, JTJ, Yuan, P, Manji, H, Holmes, E y Bahn, S 2009, *Metabonomic analysis identifies molecular*

- changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder*, Mol Psychiatry. 2009 Mar;14(3):269-79. doi: 10.1038/sj.mp.4002130. Epub 2008 Feb 5. PMID: 18256615.
24. Machado-Vieira, R, Dietrich, M, Leke, R, Cereser, V, Zanatto, V, Kapczinski, F, Souza, D, Portela, L, y Gentil, V, 2007, *Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode*, Biol Psychiatry. 2007 Jan 15;61(2):142-4. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.070. Epub 2006 Aug 7. PMID: 16893527.
25. Martínez, O, Montalván, O y Betancourt, Y 2019, *Trastorno bipolar. Consideraciones clínicas y epidemiológicas*, Revista Médica Electrónica, 41(2), 467-482. Recuperado el 03 de julio de 2022, de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242019000200467&lng=es&tlng=es.
26. McLeod, M.C, Walss-Bass, C, Oliveros, A, Gordillo, A, Ceballos, C, Charlesworth, C.M, Madden, B, Linser, P.J, Van Ekeris, L, Smith, K y Richelson, E, 2013, *New model of action for mood stabilizers: phosphoproteome from rat pre-frontal cortex synaptoneurosomal preparations*, PLoS One. 2013 May 14;8(5):e52147. doi: 10.1371/journal.pone.0052147. PMID: 23690912; PMCID: PMC3653908.
27. Quiroz, J, Gray, N, Kato, T y Maji, H, 2008, *Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder*, Neuropsychopharmacology. 2008 Oct;33(11):2551-65. doi: 10.1038/sj.npp.1301671. Epub 2008 Jan 30. PMID: 18235426.
28. Ren Y, Chen ZZ, Sun XL, Duan HJ, Tian JS, Wang JY, Yang H. *Metabolomic analysis to detect urinary molecular changes associated with bipolar depression*. Neurosci Lett. 2021 Jan 18;742:135515. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135515. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33227370.
29. Rinaldi, A. C, Porcu, C. M, Oliva, S, Curreli, N, Resigno, A, Sollai, F, Rinaldi, A, Finazzi-Agró, A y Sanjust, E, 1998, *Biosynthesis of the topaquinone cofactor in copper amine oxidases—evidence from model studies*, Eur J

- Biochem. 1998 Jan 15;251(1-2):91-7. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510091.x. PMID: 9492272.
30. Romário, J, de Souza, G, Sussulini, A, Capelo, JL y Zezzi, MA, 2016, *Proteomics strategies for bipolar disorder evaluation: from sample preparation to validation*, J Proteomics. 2016 Aug 11;145:187-196. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.034. Epub 2016 Apr 23. PMID: 27113133.
31. Salgado, S.J, Martínez, L y Arce, C.A, 2015, *Levosimendán: farmacología, mecanismos de acción y usos actuales, Revisión, Revista Médica Electrónica*, 41(2), 467-482, Vol.26. Recuperado el 03 de julio de 2022, de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242019000200467&lng=es&tlng=es.
32. Smith, C. A, Maille, G. O', Want, E. J, Qin, C, Trauger, S. A, Brandon, T. R, Custodio, D. E, Abagyan, R, Siuzdak, G, 2005, METLIN A metabolite mass spectral database, Ther Drug Monit. 2005 Dec;27(6):747-51. doi: 10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39. PMID: 16404815.
33. Stahl, E.A, Breen, G, Forstner, A.J, McQuillin, A, Ripke, S, Trubetsky, V, et al., 2020, *Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder*, Nat Genet. 2019 May;51(5):793-803. doi: 10.1038/s41588-019-0397-8. Epub 2019 May 1. PMID: 31043756; PMCID: PMC6956732.
34. Taylor, E, 2009, *Managing bipolar disorders in children and adolescents*, Nat Rev Neurol. 2009 Sep;5(9):484-91. doi: 10.1038/nrneurol.2009.117. Epub 2009 Aug 11. PMID: 19668245.
35. Tigmasa, L.E, 2014, *Aplicación de Bacilux para el control de Mildiu Velloso (Bremia lactucae) en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa) variedades winterhaven y great lakes en el cantón de Ambato*, p. 5, Universidad técnica de Ambato.
36. Tungtur, S.K, Wilkins, H.M, Rogers, R.S, Badawi, Y, Sage, J. M, Agbas, A, Jawdat, O, Barohn, R.J, Swerdlow, R y Nishimune, H, 2021, *Oxalacetate treatment preserves motor function in SOD1^{G93A} mice and normalizes select neuroinflammation-related parameters in the spinal cord*, Nature. (2021) 11:11051. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90438-6>.

37. Ueda, H, Yoshihara, Y, Misawa, H, Fukushima, N, Katada, T, Ui, M, Takagi, H y Satoh, M, 1989, *The kyotorphin (Tyrosine-Arginine) receptor and a selective reconstitution with purified G_i, measured with GTPase and phospholipase C assays*, J Biol Chem. 1989 Mar 5;264(7):3732-41. Vol.264. PMID: 2537290.
38. Wang, S.X, Mure, M, Medzihradzky, K.F, Burlingame, A.L, Brown, D.E, Dooley, D.M, Smith, A.J, Kagan, H.M y Klinman, J.P, 1996, *A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains*, Science, 273(5278):1078-84. doi: 10.1126/science.273.5278.1078. PMID: 8688089.
39. Wei, C, Huang, W, Xing, X y Dong, S, 2010, *Dual effects of [Tyr⁶]-γ2-MSH(6–12) on pain perception and in vivo hyperalgesic activity of its analogues*, J Pept Sci. 2010 Sep;16(9):451-5. doi: 10.1002/psc.1255. PMID: 20629198.
40. Wilmot, C.M, Hajdu, J, McPherson, M.J, Knowles, P.F y Phillips, S.E, 1999, *Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis*, Science. 1999 Nov 26;286(5445):1724-8. doi: 10.1126/science.286.5445.1724. PMID: 10576737.
41. Wishart, D.S, Knox, C, Guo, A.C, et. al, 2009, *HMDB: a Knowledgebase for the human metabolome*, Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(Database issue):D603-10. doi: 10.1093/nar/gkn810. Epub 2008 Oct 25. PMID: 18953024; PMCID: PMC2686599.
42. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037.
43. Xia, J, Psychogios, N, Young, N y Wishart, D.S, 2009, *MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation*, Nucleic Acids Res. 2009 Jul;37(Web Server issue):W652-60. doi: 10.1093/nar/gkp356. Epub 2009 May 8. PMID: 19429898; PMCID: PMC2703878.
44. Yoshimi, N, Futamura, T, Bergen, SE, Iwayama, Y, Ishima, T, Sellgren, C, Ekman, CJ, Jakobsson, J, Pålsson, E, Kakumoto, K, Ohgi, Y, Yoshikawa, T,

Landén, M y Hashimoto, K, 2016, *Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder: evidence in support of mitochondrial dysfunction hypothesis*, Mol Psychiatry. 2016 Nov;21(11):1504-1510. doi: 10.1038/mp.2015.217. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26782057; PMCID: PMC5078854.

XIII. Apéndices

APENDICE I

Se muestra un análisis de prueba con una base de datos similar a la procesada en este trabajo; en este análisis se obtuvieron resultados similares, lo que brindó más confiabilidad al análisis principal.

Los datos lograron seguir una distribución normal después de la normalización en la plataforma (Figura 1A) con ello se pudieron realizar los análisis estadísticos.

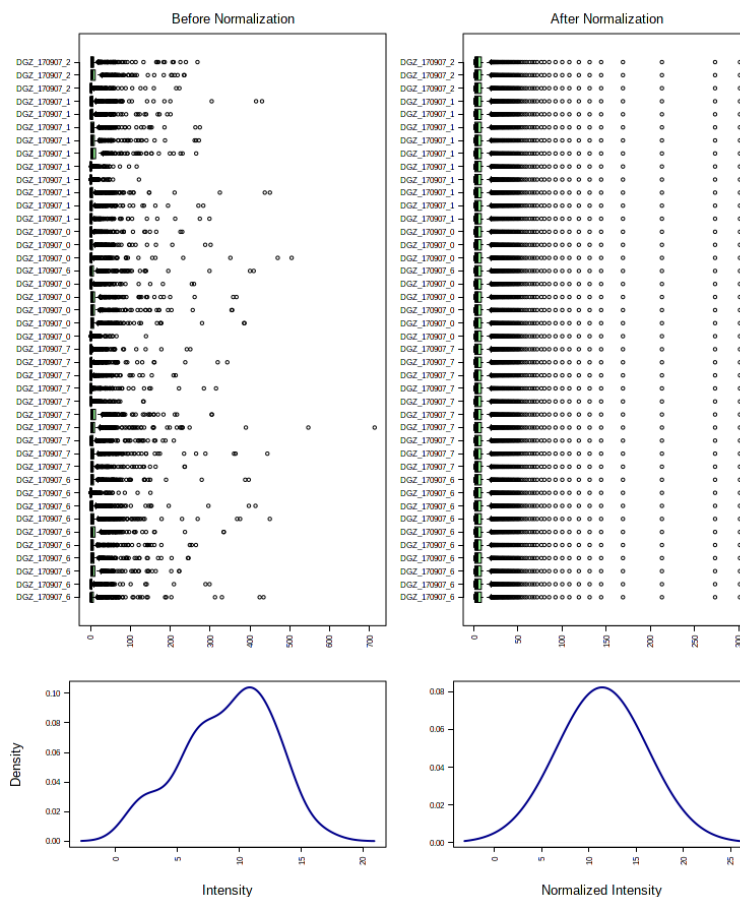


Figura 1A. Distribución de los datos antes y después de la normalización cuantílica. Se muestran 42 muestras debido al espacio limitado de la plataforma.

Para el análisis de fold change se utilizó un umbral de medición de 5 para reducir el margen de datos atípicos, siendo 9 picos los que resultaron ser diferentes al resto (Figura 2A).

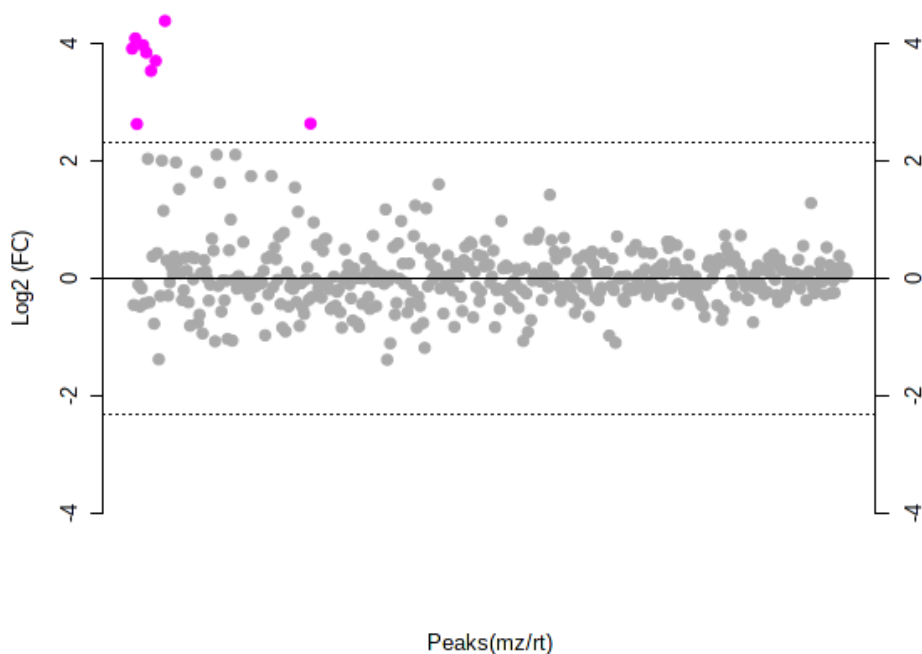


Figura 2A. Fold Change. Los puntos de color rosa representan los picos que se encuentran por encima del umbral establecido. Los valores están en escala logarítmica.

Tabla 1A. Se enlistan los nueve picos atípicos observados en el análisis de fold change.

Picos (tr/ mz)	Fold Change	log2(FC)
5.24_501.2075m/z	20.792	4.378
4.77_214.1132n	16.904	4.0793
5.15_255.0924n	15.595	3.963
5.55_454.2183m/z	14.996	3.9066
4.74_270.0728n	14.317	3.8397
4.77_255.1133m/z	12.975	3.6976
5.36_359.1916n	11.536	3.528
4.89_411.1187n	6.1955	2.6312
3.59_142.1244m/z	6.165	2.6241

Para la prueba estadística de Wilcoxon, se utilizó un valor de $p=0.05$ y se analizaron los datos en crudo asumiendo que son muestras no paramétricas. Se obtuvieron 34 picos cuyo valor de p era menor a 0.05, por lo que resultaron ser diferentes a las demás muestras (Figura 3A).

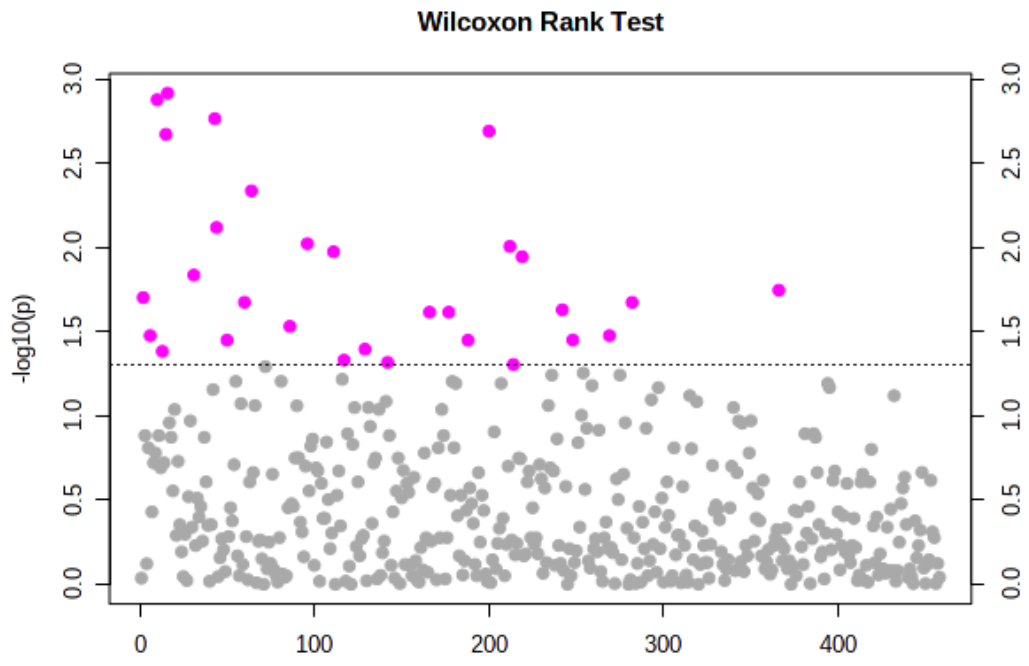


Figura 3A. Los puntos de color rosa representan los picos que se encuentran por debajo de $p= 0.05$. Los valores están en escala logarítmica base 10, por lo que los valores menores a 0.05 se encuentran en la parte superior.

Tabla 2A. Se enlistan los 30 picos con valor de $p < 0.05$. De esos 30, solamente tres coincidieron con los obtenidos en el análisis de fold change.

Picos (tr/mz)	V	p.value	-LOG10 (P)
*4.77_255.1133m/z	349	0.0012086	2.9177
*4.74_270.0728n	348	0.0013215	2.8789
5.43_269.1924m/z	95	0.001713	2.7663
4.77_344.2464m/z	97	0.0020324	2.692
5.24_365.1969m/z	97.5	0.0021202	2.6736
5.71_201.1023n	333	0.004598	2.3374
5.74_463.2374m/z	113.5	0.0075883	2.1199
3.71_167.0964n	116.5	0.0094726	2.0235
6.09_178.1381n	117	0.0098313	2.0074
6.09_137.1347m/z	118	0.010576	1.9757
4.93_125.0905n	119	0.01132	1.9462
4.84_116.0652n	317.5	0.014551	1.8371
6.02_228.1221n	125.5	0.017894	1.7473
6.40_272.2169n	127	0.01979	1.7036
3.75_189.0449n	128	0.021113	1.6754
4.96_158.1206n	128	0.021139	1.6749
7.49_119.0874m/z	129.5	0.02341	1.6306
6.02_169.1072m/z	130	0.024179	1.6166
4.61_239.1186n	130	0.024185	1.6165
2.71_147.0496m/z	133	0.02934	1.5325
6.40_448.2497n	135	0.033302	1.4775
6.05_217.1612m/z	305	0.033309	1.4774
7.49_414.2067n	136	0.035371	1.4514
3.71_126.0932m/z	136	0.035438	1.4505
4.58_270.1848n	136	0.035468	1.4502
4.53_176.0730m/z	138	0.040095	1.3969
*5.36_359.1916n	301.5	0.041324	1.3838
6.05_204.0894m/z	299.5	0.046586	1.3317
5.40_464.1959m/z	141	0.048027	1.3185
4.34_157.0899n	298.5	0.04944	1.3059

Por último, para el gráfico de volcán se introdujeron los mismos parámetros que en los dos análisis anteriores. Se obtuvieron tres picos atípicos de todos los datos procesados (Figura 4A).

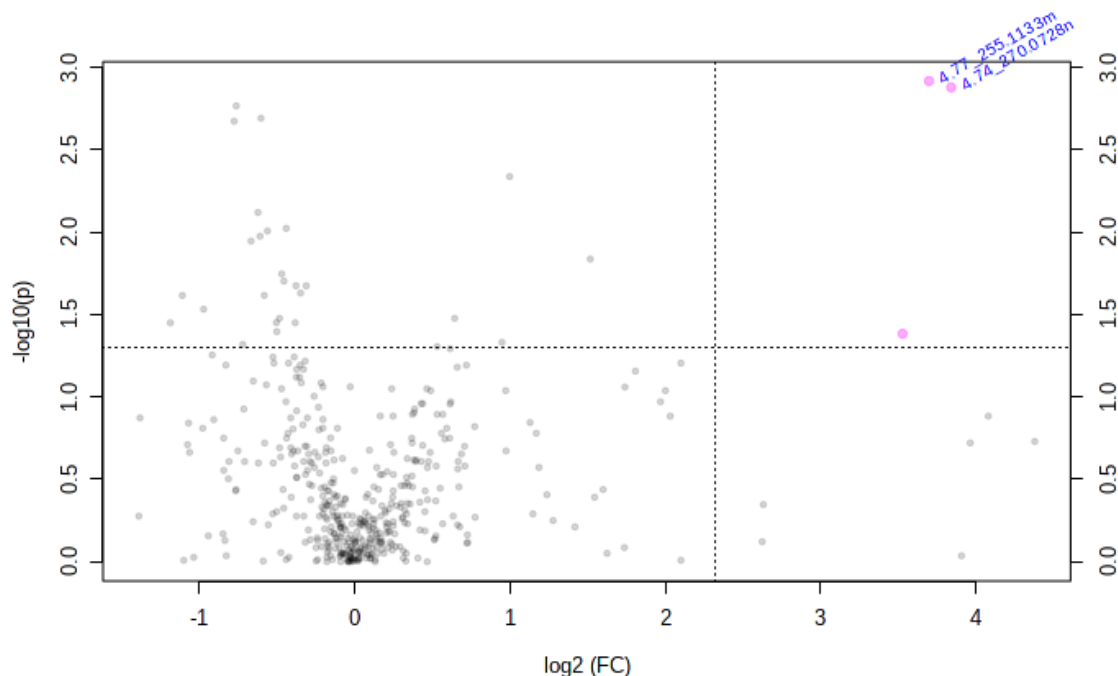


Figura 4A. Análisis de Volcán. En el eje x se encuentra el umbral del fold change con valor de 5, en el eje y se encuentran los valores de p para el estadístico de Wilcoxon. Los puntos rosas son los datos atípicos obtenidos en el análisis.

Tabla 3A. Los tres picos obtenidos en el gráfico de volcán, son los mismos que coincidieron en el análisis individual de fold change con la prueba de Wilcoxon.

Picos (tr/mz)	FC	log2(FC)	raw.pval	-LOG10 (P)
4.77_255.1133m/z	12.975	3.6976	0.0012086	2.9177
4.74_270.0728n	14.317	3.8397	0.0013215	2.8789
5.36_359.1916n	11.536	3.528	0.041324	1.3838

En el heatmap no se logró observar ninguna coincidencia con los análisis antes realizados (Figura 5A). Mientras que en los valores VIP obtenidos por PLS-DA, solamente hubo el pico 4.74_270.0728n que coincidió con los tres ya obtenidos (Figura 6A).

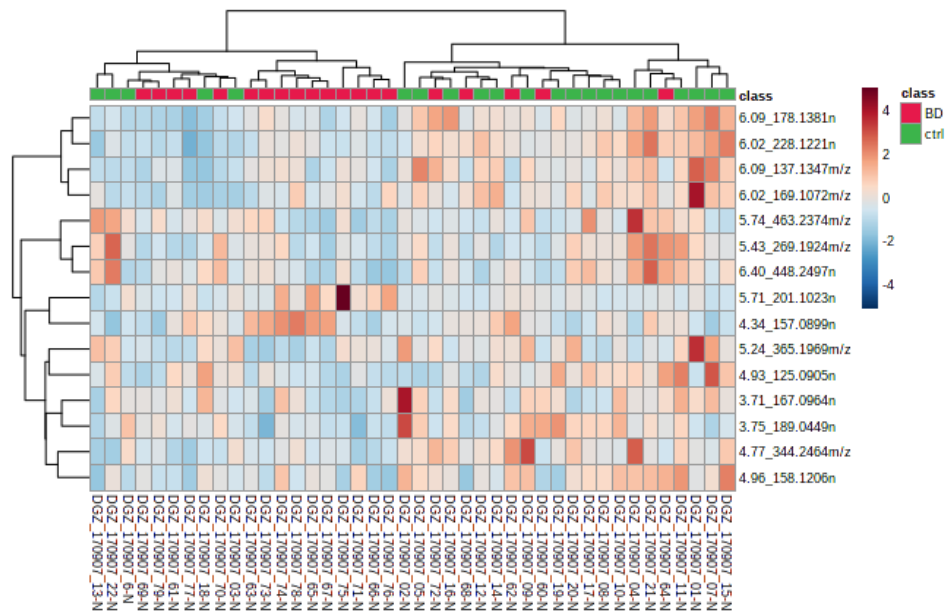


Figura 5A. Mapa de Calor. Se muestran los picos más relevantes, sin embargo, no se observó ninguna coincidencia con respecto a lo obtenido en los análisis de fold change, Wilcoxon y volcano.

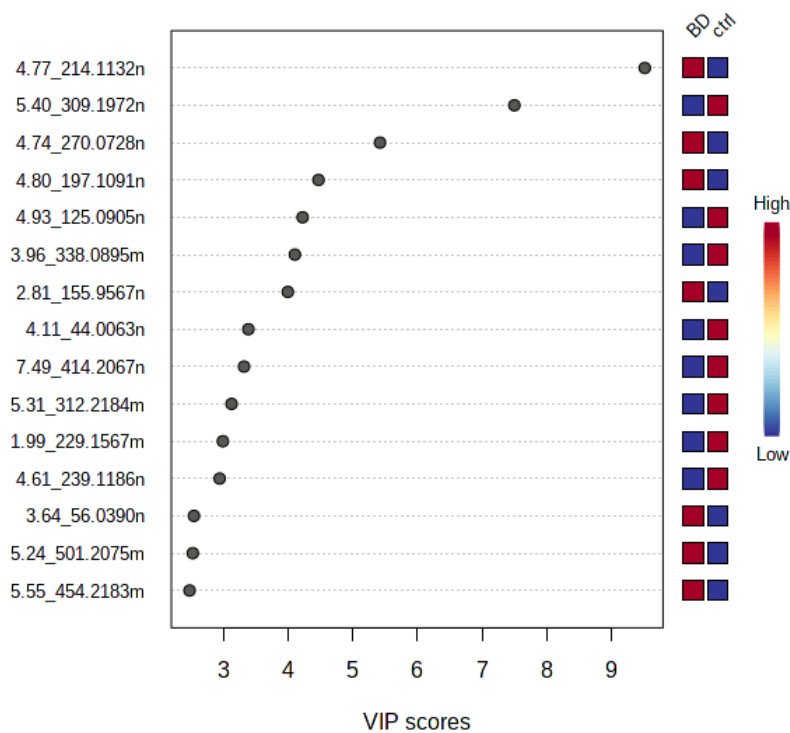


Figura 6A. PLS-DA se muestran los datos VIP obtenidos. El único pico que coincidió con los tres obtenidos en los análisis anteriores es 4.74_270.0728n.

APÉNDICE II

A continuación, se muestran las tablas con los posibles compuestos obtenidos en el análisis, teniendo en total cuatro tablas distintas.

Tabla 4A

4.02_256.0198m/z
3-(6-Hydroxy-3,4-dioxo-1,5-cyclohexadien-1-yl)-L-alanine (L-TOPAQUINONE)
N-(2,5-Dihydroxybenzoyl)glycine (GENTISURIC ACID)
(R)-3-hydroxy-2-oxo-4-phosphonoxybutanoic acid (ORGANOFOSFATO) plaguicida
NABAM fungicida
2-Oxo-3-hydroxy-4-phosphobutanoic acid
Catalyzes the reversible conversion of 3-phosphohydroxypyruvate to phosphoserine and of 3-hydroxy-2-oxo-4-phosphonoxybutanoate to phosphohydroxythreonine (By similarity).
Topaquinone
Sulfathiazole medicamento contra enfermedades microbianas

Tabla 5A

4.93_332.1712m/z
3,7-Dihydroxy-5-methoxy-2,2,10-trimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[2,3-b]quinolin-10-ium
ile-his
(5S,6S)-7,12-Dimethyl-5,6-dihydro-5,6-tetrahydronediol
6-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2-propanyl)-4-methoxy-9-methyl-2,3-dihydrofuro[2,3-b]quinolin-9-ium
arg-leu
Leu-arg
leu-his
his-ile
arg-ile
Histidylleucine
2,6-Dimethyl-2-(4-methyl-3-penten-1-yl)-2,6-dihydro-5H-pyrano[3,2-c]quinolin-5-one
ile-arg
HistidinyI-Isoleucine
HistidinyI-Leucine
Isoleucyl-Histidine
Leucyl-Histidine

Tabla 6A

5.08_309.1333m/z
4-Hydroxy-9-(hydroxymethyl)-6-methyl-3-methylene-3,3a,4,5,9a,9b-hexahydroazuleno[4,5-b]furan-2,7-dione
3-sec-Butyl-8-hydroxy-4-methyl-6-oxo-6H-isochromene-7-carboxylic acid
5-Hydroxy-6-(2-hydroxy-3-methyl-3-buten-1-yl)-7-methoxy-2H-chromen-2-one
Tyrosyltyrosine
Adenosine
OR-1896 Sensibilizador de Calcio

Tabla 7A

5.71_325.1757m/z
2-Hydroxyestradiol-3-methylether
trp-arg
Cortisone
19-Oxotestosterone formación de estrógenos
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentadienol diisobutyrate (Ácido propanoico) fungicida y antimicrobiano
19-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (Hormonas esteroides)
(1Z,4E)-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-dodecadien-3-one
1-{2-[(2E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-yl]-4-hydroxy-6-methoxyphenyl}ethanone
4-[2-(5-Hexyl-2-furyl)ethyl]-2-methoxyphenol
16-Hydroxy-10-oxohexadecanoic acid (Ácido graso)
1a-[(2E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-yl]-7a-methyl-1a,7a-dihydronaphtho[2,3-b]oxirene-2,7-dione
3a-Hydroxy-7-isopropenyl-6,6-dimethyl-2-(3-methylbutanoyl)tetrahydrocyclopenta[c]pentalene-1,3,4(2H,3aH,5H)-trione
(2Z,9E)-8-Hydroxy-2,9-heptadecadiene-4,6-diyn-1-yl acetate
(9E)-8-Hydroxy-1,9-heptadecadiene-4,6-diyn-3-yl acetate
3-Isopropyl-4a,8a-dimethyl-5-oxodecahydro-2-naphthalenyl acetate
5-Amino-6-(3-hydroxy-4-methoxybutanoyl)-2,2-dimethyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one
8-[3-(6-Hepten-1-yl)-2-oxiranyl]-4,6-octadiyn-3-yl acetate
(1,5,9-Trimethyl-10-oxatricyclo[6.2.2.0~2,6~]dodec-9-yl)methyl acetate
16alpha-Hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (Hormonas esteroides)
12S-HHTrE (Ácido graso)
7alpha-Hydroxy-4-androstene-3,17-dione
N~2~-(4-Phenylbutanoyl)glutamine (n-acil-alfa aminoácido)

11,12-Dihydroxy-7-methoxy-6,20-epoxyabieta-8(14),9(11),12-trien-20-one

Arg-Trp **Residuo**

11beta-Hydroxy-4-androsten-3,17-dione

2-Hydroxyestradiol-3-methyl ether metabolitos se convierten en metabolitos metoxilados anticancerígenos

Hexadecanedioic acid Activado mitocondrial y microsomalmente en hígado

19-Oxotestosterone **Catalizada a estrógenos**

7a-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (**Lípido esteroide**)

11b-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (**Lípido esteroide**)

16a-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (**Lípido esteroide**)

Phenylbutyrylglutamine **metabolito del fenilbutirato**

12S-HHT (Metabolito del ácido araquidónico)

4-Methoxy-17beta-estradiol **Estrógeno**

Arginyl-Tryptophan

APÉNDICE III

Se muestra una tabla con los picos espectrofotométricos, cuyos resultados arrojados fueron medicamentos.

Tabla 8A

Pico	Medicamento
4.02_256.0198m/z	Chlormezanone
4.93_332.1712m/z	Metoclopramide
4.93_332.1712m/z	Trimethoprim
5.08_309.1333m/z	Doxylamine
5.08_309.1333m/z	Zidovudine
5.08_309.1333m/z	Mianserin (antidepresivo)
5.08_309.1333m/z	Dihydromethysticin
5.08_309.1333m/z	N-{4-[(4R)-4-Methyl-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydro-3-pyridazinyl]phenyl}acetamide (acetanilidas)
5.08_309.1333m/z	4-Hydroxy-3-methoxybenzenemethanol
5.08_309.1333m/z	Ascochitine (derivado de Ácido salicílico)
5.71_325.1757m/z	Prednisolone (glucocorticoide)
5.71_325.1757m/z	2-Methoxyestradiol

APÉNDICE IV

Se muestran las redes de interacción obtenidas en string de cada compuesto (Figuras 7, 8, 9, 10 y 11A), de los compuestos exógenos (Figura 12A) y de todos los compuestos (Figura 13A).

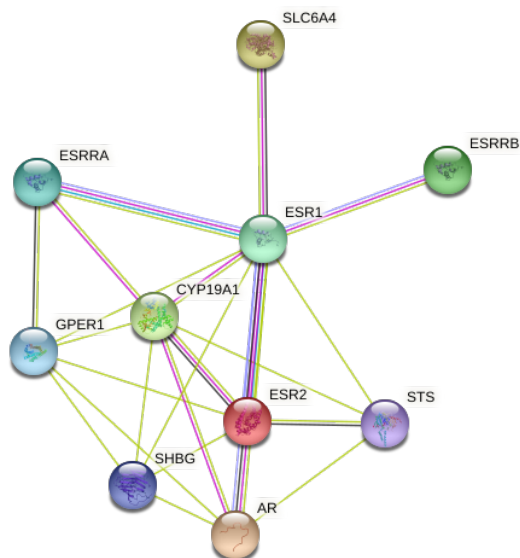


Figura 7A. Red de interacción de proteínas con las que interacciona el compuesto 4-metoxi-17beta-estradiol.

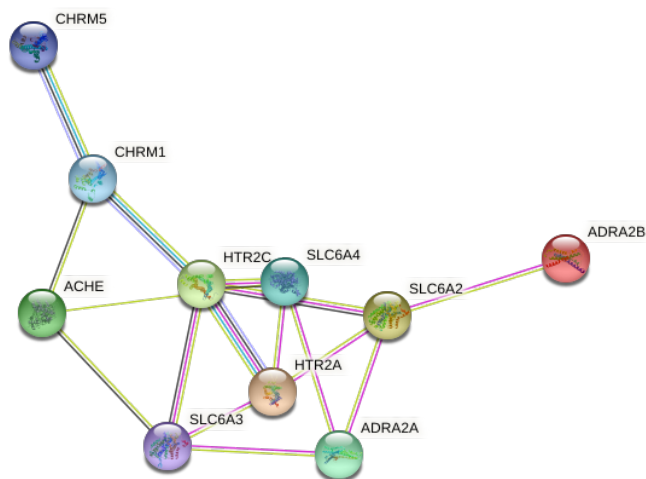


Figura 8A. Red de interacción de proteínas con las que interacciona la fluoxetina.

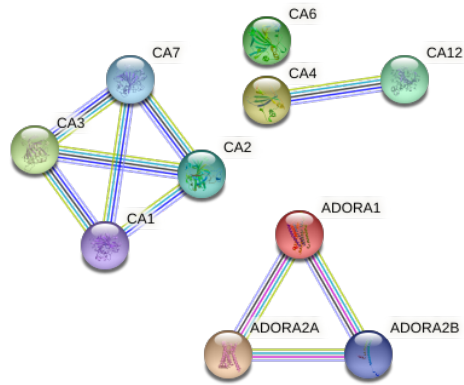


Figura 9A. Red de interacción de proteínas con las que interacciona la lamotrigina.

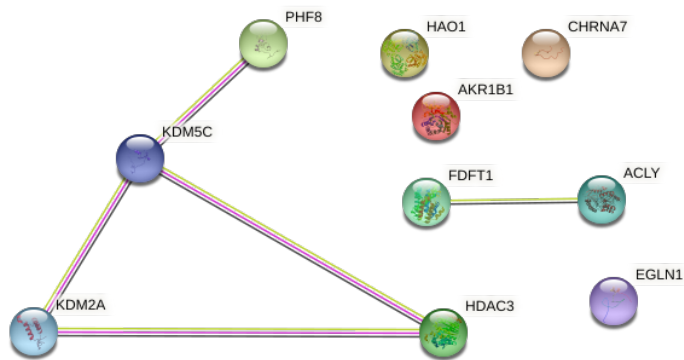


Figura 10A. Red de interacción de proteínas con las que interacciona el Oxaloaceto.

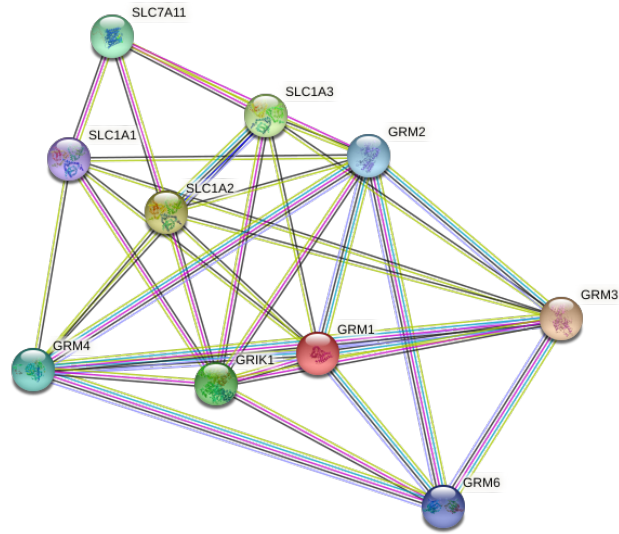


Figura 11A. Red de interacción de proteínas con las que interacciona la topaquinona.

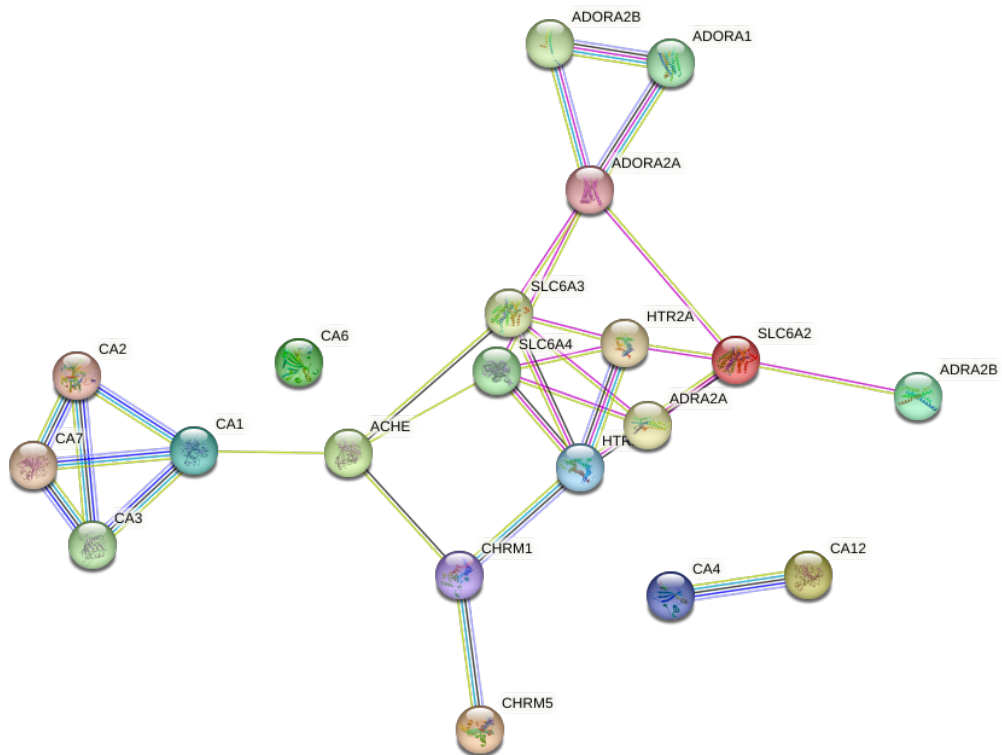


Figura 12A. Red de interacción entre compuestos exógenos. Se muestra la red de interacción entre las proteínas blanco de la fluoxetina y la lamotrigina.

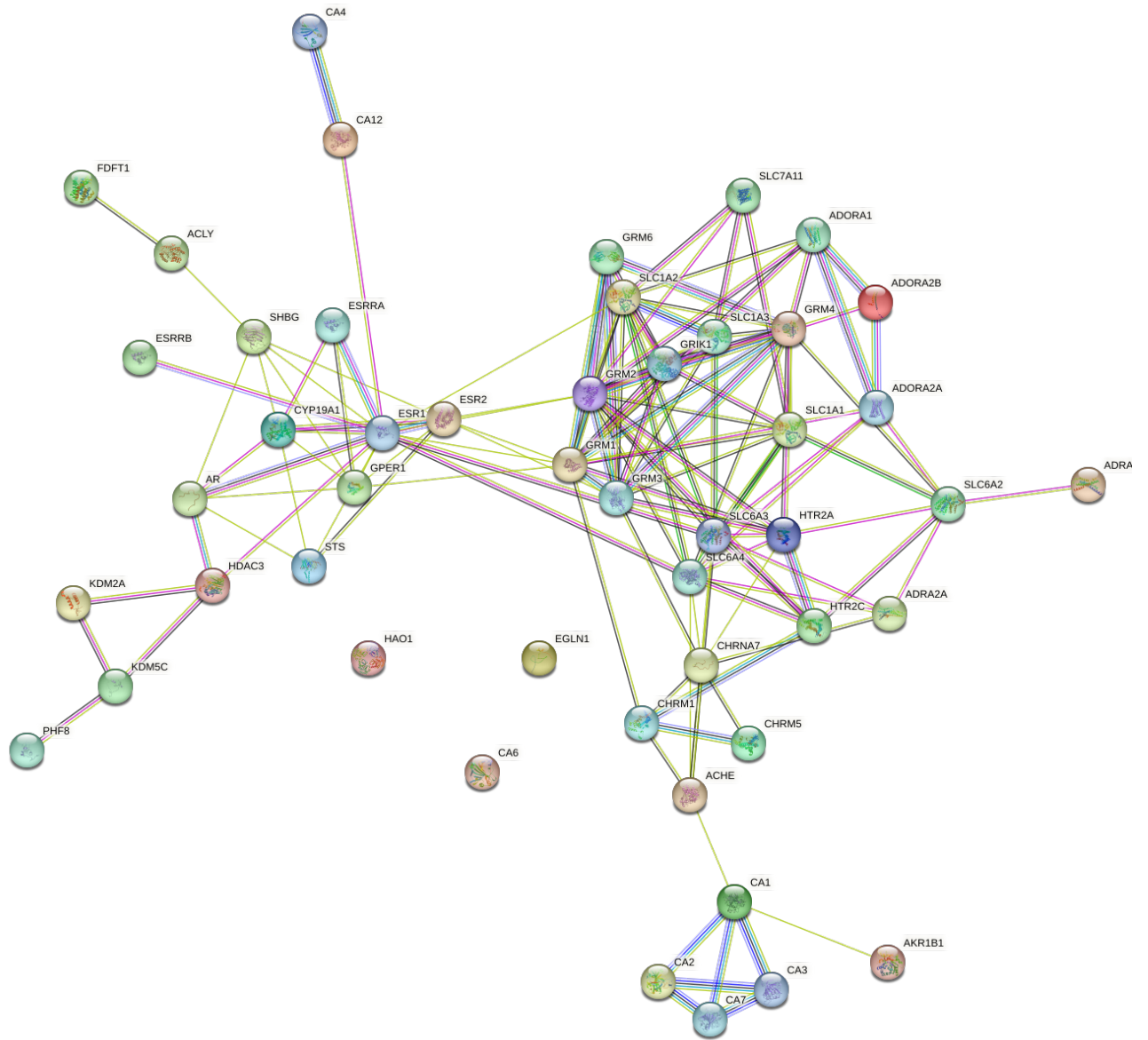


Figura 13A. Red de interacción de todos los compuestos. Se muestra la red de interacción de las proteínas blanco de todos los compuestos.

APENDICE V PROTEÍNAS DE LA RED DE INTERACCIÓN DE COMPUESTOS ENDÓGENOS

Receptores metabotrópicos de glutamato, se dividen en tres grupos.

Grupo I → GRM1 → activan fosfolipasa C que hidroliza un fosfolípido produciendo fosfatidilinositol 4,5-bifosfato y después de la reacción se genera inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG); el primero induce la liberación de calcio (Ca²⁺) a partir del retículo endoplásmico y el segundo activa a una proteína cinasa (PKC), la cual promueve la fosforilación de ciertos sustratos celulares.

Grupo II → GRM2, GRM3 Están relacionados con la inhibición de la cascada de AMP cíclico, ambos grupos difieren entre sí por su selectividad a sus agonistas.
Grupo III → GRM4, GRM6

GRIK1 → Producto genético perteneciente a la familia kainato de receptores de glutamato, modulan la liberación o inhibición de glutamato dependiendo de la señal sináptica que haya.

Portadores de solutos (Solute Carrier (SLC) familia (SLC1,2,3...) miembro (SLC7A1,2,3...))

SLC1A1 → Transportadores que terminan la acción postsináptica del glutamato y mantienen los niveles de éste en niveles por debajo de los niveles neurotóxicos. También transportan aspartato.

SLC1A2 → Transportador que elimina el neurotransmisor excitatorio glutamato del espacio extracelular en las sinapsis del sistema nervioso central.

SLC1A3 → Transportador de glutamato, se involucra en la terminación de la neurotransmisión excitatoria en el sistema nervioso central.

SLC7A11 → Sistema de transporte de cisteína y glutamato.

SLC6A4 → Transporta serotonina del espacio sináptico a neuronas presinápticas.

Subunidad nicotínica alfa 7 del receptor colinérgico

CHRNA7 → Modulan señales de transmisión rápidas en sinapsis, se ubican en una región identificado como un locus muy susceptible para epilepsia y una ubicación cromosomal involucrada en la transmisión genética de la esquizofrenia.

Receptores de estrógeno

ESTR1 → Involucrado en crecimiento, desarrollo sexual, gestación y otras funciones reproductivas. Tiene un papel importante en el cáncer de mama y endometrial así como en osteoporosis.

ESTR2 → Interactúa con ciertas secuencias del DNA para activar la transcripción, se le puede encontrar en mitocondria.

Citocromo P450 Familia 19

CYP19 → Algunas enzimas contrarrestan el efecto citotóxico de algunos fármacos antineoplásicos.

Proteína G acoplada a receptor de estrógeno 1

GPER1 → Aumenta los niveles de AMPc y promueve la movilización intracelular de calcio y la síntesis de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato en el núcleo.

Receptor alfa relacionado con estrógeno

ESRRA → Interactúa con cofactores de transcripción PGC-1 para regular la expresión de la mayoría de los genes implicados en la producción de energía y también participa en la biogénesis mitocondrial.

Esteroidesulfatasa

STS → Precursor de estrógenos, andrógenos y colesterol.

Globulina transportadora de hormonas sexuales

SHBG → Participa en la regulación de la respuesta a esteroides; transporta estrógenos y andrógenos en la sangre.

ATP citrato liasa

ACLY → Cataliza la formación de Acetil-CoA y en neuronas puede involucrarse en la biosíntesis de acetilcolina.

farnesil-difosfato farnesiltransferasa 1

FDFT1 → Forma escualeno

Histona desacetilasa 3

HDAC3 → Potencialmente supresor de tumores, regula a la baja a p53 modulando el crecimiento celular y la apoptosis.

Lisina desmetilasa 2A

KDM2A → Participa en el silenciamiento epigenético.

PHF8 → Se piensa que es un activador de la transcripción

Referencias apéndice V

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2914> (GRMs)
2. <https://knoow.net/es/ciencias-tierra-vida/biologia-es/fosfolipase-c/> (PLC)
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504441/> (cAMP)
4. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/198749/1/u050282.pdf> (kainato)
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6506> (SLC1A2)
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6507> (SLC1A3)
7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23657> (SLC7A11)
8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6532> (SLC6A4)
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1139> (CHRNA7)
10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2099> (ESR1)
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2100> (ER2)
12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100144423> (CYP19)
13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2852> (GPER1)
14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2101> (ESRRA)
15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/412> (STS)
16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6462> (SHBG)
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/47> (ACLY)
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2222> (FDFT1)
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8841> (HDAC3)
20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22992> (KDM2A)
21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23133> (PHF8)