



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Metabólica. Aspectos metodológicos y algunas
aplicaciones en salud.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

Lizbeth Cruz Flores

ASESORA: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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.



Agradecemos el apoyo del Programa PAPIME – UNAM

"Fortalecimiento de la enseñanza de la Farmacogenómica en la FES Cuautitlán".

clave PE 206518

“La memoria del corazón elimina los malos recuerdos y magnifica los buenos, y gracias a ese artificio, logramos sobrellevar el pasado”.

G. G. M.

En memoria de un gran compañero, amigo y ser humano Agustín Uriel Fuentes Hernández,
donde quiera que estés, ¡lo logramos!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi asesora de tesis Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo. Por sus conocimientos y experiencia que han sido mi fuente de motivación y curiosidad durante estos años

A los profesores que integran el jurado, Dra Patricia Ramírez Noguera, M. en C. Tais Nopal Guerrero, Dr. Julio Cesar Botello Pozos, por sus observaciones consejos y su tiempo.

A las profesoras Maritere Domínguez Rojas, Rosalba Bonilla Sánchez, gracias por ser excelentes profesoras, por sus conocimientos, su amistad y confianza brindada a lo largo de estos años. A todos los profesores de la FES- Cuautitlán que imparten sus conocimientos en cada área para la licenciatura en Bioquímica diagnóstica, gracias por demostrar su pasión día a día a todos los alumnos y brindar esa curiosidad de aprender cada vez más de ustedes, infinitas gracias.

A mi familia a todos: mamá, papá, Arturo, Reyna, Lulú, Leo, Juan, Erandy y mis latosos sobrinos, por el apoyo incondicional, en las buenas y en las malas, por apoyarme siempre los amo mucho.

A mis amigos Mariana Martínez Rodríguez, Laura Valencia Pesquera, Ángel Manuel Alarcón Mirón, Andrea Campa Higareda, Julián Salvador Cazares Cruz, Roberto Morales Vaquero, Adalid García Madrid, Julio Cesar González, Jesús Alfredo Hernández Fernández, Eric Andrés Martínez, Ana Karen Hernández Uvera, Sandra Teresa Piña, Elizabeth Núñez y Diego Martínez por estar todos estos años escuchándome, dándome sus consejos y apoyo, por los buenos momentos y las alegrías vividas.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| ÍNDICE GENERAL..... | 5 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2 OBJETIVOS | 10 |
| 2.1 Objetivo general..... | 10 |
| 2.2 Objetivos particulares | 10 |
| 3 JUSTIFICACIÓN..... | 11 |
| 4 MARCO TEÓRICO..... | 12 |
| 4.1 Hacia la “era ómica” | 12 |
| 4.2 Aspectos generales..... | 12 |
| 5 METODOLOGÍAS EN METABOLÓMICA | 25 |
| 5.1 La muestra y sus problemas de preparación | 25 |
| 5.2 Recolección de la muestra | 25 |
| 5.2.1 Líquido cefalorraquídeo (LCR)..... | 25 |
| 5.2.2 Orina..... | 26 |
| 5.2.3 Sangre entera o suero | 26 |
| 5.2.4 Células en cultivo o tejido de biopsias | 27 |
| 5.3 Desactivación Metabólica | 28 |
| 5.4 Extracción de metabolitos..... | 28 |
| 5.4.1 Los metabolitos volátiles..... | 30 |
| 5.4.2 La extracción en fase sólida..... | 30 |
| 5.4.3 Extracción Líquido-Líquido | 31 |
| 5.4.4 Ultrafiltración | 32 |
| 5.5 Almacenamiento de muestras y consideraciones de estabilidad | 32 |
| 5.6 ¿Cómo evaluar la preparación de la muestra? | 32 |
| 6 MÉTODOS DE SEPARACIÓN E INTRODUCCIÓN DE MUESTRA | 33 |
| 6.1 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)..... | 33 |
| 6.2 Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE/MS)..... | 34 |
| 6.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC/MS | 35 |
| 7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA ESTUDIOS METABOLÓMICOS..... | 37 |
| 7.1 <i>Principios básicos de la espectrometría de masas (MS)</i> | 37 |
| 7.2 Métodos de ionización | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.2.1 | Ionización electrónica (IE) | 39 |
| 7.2.2 | Bombardero Rápido de Átomos (FAB) y Espectrometría de Masas de Ion Líquido Secundario (LSI)..... | 40 |
| 7.2.3 | Ionización por Electro-aerosol | 41 |
| 7.2.4 | Desorción/Ionización láser asistida en matriz (MALDI) | 42 |
| 7.2.5 | Cuadrúpolos (Q) | 45 |
| 7.2.6 | Resonancia ciclotrón de iones con Transformada de Fourier (FT-ICR) | 46 |
| 7.2.7 | Espectrómetro de masas en tándem | 46 |
| 8 | RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR | 50 |
| 8.1 | Técnica RMN-1D..... | 50 |
| 8.1.1 | Experimento de un solo pulso..... | 50 |
| 8.1.2 | Desacoplamiento mononuclear | 51 |
| 8.2 | Técnicas de RMN de dos dimensiones (RMN-2D)..... | 51 |
| 8.2.1 | Método 2D-J-resuelta..... | 51 |
| 8.2.2 | DQF-COSY (Espectroscopía de correlación filtrada de doble cuantía)..... | 51 |
| 9 | SOFTWARE PARA EL ANÁLISIS METABOLÓMICO | 52 |
| 9.1 | Bases de datos diseño e implementación..... | 52 |
| 9.2 | Recuperación de la información | 52 |
| 9.3 | Tipos de bases de datos en la metabolómica | 53 |
| 9.4 | Bases de datos de perfil de referencia de metabolitos..... | 54 |
| 9.5 | Bibliotecas de referencia espectral | 54 |
| 9.5.1 | Biblioteca espectral Masas NIST..... | 55 |
| 9.5.2 | GMD | 55 |
| 9.5.3 | MassBank | 56 |
| 9.5.4 | METLIN | 56 |
| 9.6 | Base de datos para perfiles metabólicos específica en especies, compuestos o fluido biológicos | 57 |
| 9.6.1 | HMDB | 58 |
| 9.6.2 | Drugbank | 59 |
| 9.6.3 | LMSD | 59 |
| 9.6.4 | PubChem | 60 |
| 9.7 | Bases de Datos para Vías Metabólicas..... | 60 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 10 | APLICACIONES EN EL ÁREA DE LA SALUD | 61 |
| 10.1 | Cáncer..... | 61 |
| 10.2 | Los errores innatos del metabolismo (EIM) | 65 |
| 10.3 | Enfermedades cardíacas | 65 |
| 10.4 | Enfermedad de Alzheimer..... | 66 |
| 11 | CONCLUSIONES | 67 |
| 12 | REFERENCIAS | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1: | Flujo de expresión de la metabolómica y otras “ciencias ómicas” (Dettmer, Aronov, y Hammock, 2007)..... | 15 |
| Figura 2: | Nivel de complejidad de las “ciencias ómicas”. (Barallobre-Barreiro J Chung Y Mayr M, 2013)..... | 17 |
| Figura 3: | Gráfico que representa la información en metabolómica y proteómica (modificado de NCBI, 2018)..... | 18 |
| Figura 4: | Estrategias para la investigación metabolómica y su flujo de trabajo. (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007)..... | 20 |
| Figura 5: | Flujo de trabajo simplificado para el análisis por “firmas metabolómicas y la identificación de marcadores”. (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007). | 22 |
| Figura 6: | La espectrometría de masas y sus diferentes componentes para un análisis metabolómico. (Girolamo et al., 2013). | 38 |
| Figura 7: | Esquema de ionización electrónica. (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004). .. | 40 |
| Figura 8: | Esquema de bombardeo rápido de átomos (FAB). (Ayala-Bretón & Regil-Hernández, 2004)..... | 41 |
| Figura 9: | Esquema de un ionizador por electro-spray (ESI). (Ayala-Bretón & Regil-Hernández, 2004)..... | 42 |
| Figura 10: | Esquema de adsorción/ desorción láser asistida por matriz (MALDI). (Ayala-Bretón & Regil-Hernández, 2004)..... | 44 |
| Figura 11: | Equipos para el análisis por espectrometría de masas.(Girolamo et al., 2013)... | 45 |
| Figura 12: | Reacción de monitoreo múltiple. (Girolamo et al., 2013). | 47 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 1: | Estrategias analíticas para la investigación metabolómica.(Koek et al., 2011). | 14 |
| Tabla 2: | Espectrómetros de masas híbridos comunes con sus parámetros técnicos. (Girolamo et al., 2013). | 49 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|--|---|
| ° C grados centígrados | LSI Ion Líquido Secundario |
| μL microlitros | MALDI Ionización por desorción láser asistida por matriz |
| ADP adenosindifosfato | MIAMET Información Mínima Sobre Experimentos en Metabolómica |
| AMP adenosinmonofosfato | MOPS ácido 3- (N -morfolino) propanosulfónico |
| API ionización por presión atmosférica | mPa: miliPascales |
| ATP adenosintrifostato | MRM Monitoreo de Reacción Múltiple |
| CE Electroforesis Capilar | MS Espectrometría de Masas |
| CL Cromatografía líquida | NAD nicotinamida adenina dinucleótido oxidado |
| DESI-MS: Ionización por electro-pulverización por desorción acoplada a Espectrometría de Masas | NADH nicotinamida adenina dinucleótido reducido |
| EA Enfermedad de Alzheimer | PCA Análisis de Componentes Principales |
| EDTA Ácido etilendiaminote | PLS: Proyección de mínimos cuadrados parciales a estructuras latentes |
| EI: Ionización de electrones | QC Control de Calidad |
| EIM Errores Innatos del Metabolismo | RAM Materiales de Acceso Restringido |
| ESI Ionización por electro aerosol | RMN Resonancia Magnética Nuclear |
| eV Electro voltios | RR Rápida Resolución |
| FAB Bombardeo Rápido de Átomos | RS Rápida Separación |
| FAD Adeninflavina | SMILE Capilar Recubierto de polímero Cationico Específico |
| FT-ICR Resonancia ciclotrón de iones con transformada de Fourier | SPE Extracción de Fase Líquida |
| FT-IR: Infrarrojo con transformada de Fourier | TFC Turbulencia de Flujo |
| GC-MS Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas | TOCSY: Espectroscopía Correlacionada Total |
| HEPES ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico | TOF Tiempo de vuelo (time off flight) |
| HMQC: Correlación Hetero-nuclear Múltiple-Cuántica | TRIS 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol |
| HPLC Cromatografía de líquidos de alta resolución | UPLC Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Pureza |
| HRMAS: Espectroscopía de giro de ángulo mágico de alta resolución | |
| ISS Patrones Internos Marcados | |
| IT: Trampa de iones | |
| kDa: KiloDaltons | |
| LC-MS Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas | |
| LCR Líquido Céfaló Raquídeo | |
| LD Desorción Láser | |

1 INTRODUCCIÓN

La presente tesis para obtener el título de licenciatura en Bioquímica Diagnóstica tiene como finalidad describir la metabolómica y sus aplicaciones en el área de la salud, como material de consulta para alumnos, académicos y especialistas interesados en el tema

En el primer capítulo se describe una breve reseña histórica de la bioquímica, genética y biología molecular, la genómica y la biología de sistemas que dieron origen al término metabolómica, en este contexto se define también las bases de estudio del metaboloma y metabolómica, los objetivos que persigue esta “ciencia ómica” y sus limitaciones. Para continuar con los requerimientos metodológicos para la extracción y conservación de muestras para los estudios dirigidos y no dirigidos, algunas metodologías y el análisis óptimo de datos a través de bases de datos bioinformática, comparando las ventajas y desventajas en cada uno de los métodos descritos.

Continuaremos con las aplicaciones en el área de la salud tomando como ejemplo algunas enfermedades estudiadas a nivel mundial y raras, dando un panorama general de los hallazgos de bio-marcadores, blancos terapéuticos o metabolitos pronósticos de dichas afecciones y un breve análisis de la patogenia implicada, destacando la situación epidemiología actual, sus ventajas y desventajas de los estudios metabolómicos en esta área.

Por último, concluiremos con algunas recomendaciones de la aplicación de la metabolómica en el área de la salud y otras áreas, así como los nuevos retos que persiguen los investigadores de esta ciencia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Documentar una investigación en metabolómica y sus aplicaciones en el área de la salud, como material de consulta para alumnos, académicos y especialistas interesados en el tema.

2.2 Objetivos particulares

- Realizar una búsqueda hemerográfica y cibergráfica recopilando información actual de la metabolómica y sus aplicaciones para describir las metodologías y áreas auxiliares la metabolómica y comprender los fundamentos de esta ciencia ómica.
- Mostrar las aplicaciones de la metabolómica para el diagnóstico, evolución y tratamiento de algunas enfermedades de interés como: Enfermedades Innatas del Metabolismo, Cáncer y Enfermedad de Alzheimer para desarrollar un material de consulta que pueda ser utilizada en actividades académicas de la genómica.

3 JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo es una investigación biblio-hemerográfica y cibergráfica a cerca de los aspectos más relevantes de la metabolómica, sus orígenes y aplicaciones, centradas en el área de la salud y de enfermedades como Cáncer, Enfermedad de Alzheimer y Enfermedades Innatas del metabolismo.

Estos ejemplos nos servirán para fundamentar las metodologías que usa la metabolómica, el análisis de datos que ofrecen para el diagnóstico, pronóstico y evolución de las enfermedades antes mencionada.

Como parte de la formación de la carrera de Bioquímica Diagnóstica está el obtener los conocimientos, habilidades y actitudes éticas que permiten integrarse al equipo de salud enfocado al diagnóstico, prevención, control y tratamiento de enfermedades, siendo la metabolómica una nueva ciencia para participar en el desarrollo de los procedimientos, técnicas e interpretación de las determinaciones e investigaciones químicas, farmacológicas inmunológicas, microbiológicas, nutrición y genéticas, que provienen de este tipo de ciencias ómicas, en muestras provenientes de seres humanos, cultivos celulares, microorganismos y modelos animales utilizados en investigación; así como extractos de plantas, principios activos o toxinas ofreciendo una alternativa más específica y completa de estudio de los sistemas biológicos aplicados al desarrollo de la salud en México.

La metabolómica es una herramienta clave, para el análisis dirigido y no dirigido o perfilado de metabolitos de diferentes muestras. Las técnicas empleadas y su desarrollo a lo largo de estos años han permitido que nuevos investigadores, logren comprender las interacciones génicas y el ambiente modifican el fenotipo en algunas poblaciones, etnias o condiciones fisiológicas.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Hacia la “era ómica”

Desde principios de la década de los noventa, ha ido emergiendo con fuerza la metabolómica, la última de las ciencias ómicas (Schmidt, 2004).

Esta ciencia estudia el conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico, en particular en fluidos biológicos como orina, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), la saliva o incluso en tejidos o cultivos celulares.

Uno de los grupos pioneros en el campo de la metabolómica es el que dirige el Dr. Jeremy Nicholson, del Imperial College de Londres (Lindon, Nicholson, y Holmes, 2011), quien acuñó el término metabolómica, definiéndolo como la medida cuantitativa y multiparamétrica de la respuesta de un ser vivo a un estímulo fisiopatológico o a una modificación genética.

El término surgió en analogía con transcriptómica y proteómica. El metaboloma es algo totalmente cambiante, que refleja el estado metabólico de un sistema vivo. Puede influirse por factores internos (estado hormonal) y externos. En 2007, científicos de las Universidades de Alberta y Calgary concluyeron el borrador del metaboloma humano, catalogando y caracterizando 2,500 metabolitos, 1,200 fármacos y principios activos, y otros 3,500 componentes que pueden encontrarse en el organismo. Alrededor de toda esta información es necesario desarrollar cada vez más técnicas para almacenar y procesar colectivamente datos y estandarizar resultados de los estudios de la expresión de genes. Para ello es imprescindible la colaboración interdisciplinaria entre médicos, investigadores, matemáticos, bio-ingenieros, estadísticos, e informáticos que permitan el avance inmediato en el conocimiento de las enfermedades que aquejan y alteran la calidad de vida. Se deparan grandes descubrimientos y avances en el desarrollo de nuevos estudios y la comprensión de toda la información posibles de los metabolitos para su uso en el área de la salud, la medicina personalizada e investigación (Pinazo-Durán, 2012).

4.2 Aspectos generales

El metaboloma es el conjunto completo y dinámico de las pequeñas moléculas y elementos químicos denominadas metabolitos (intermediarios metabólicos, hormonas y metabolitos secundarios) que se pueden encontrar en un organismo vivo, sintetizados de novo o incorporados desde el exterior. Las tecnologías de genómica funcional (genómica, transcriptómica y metabolómica), son cada vez más importantes en los campos de la microbiología, plantas y ciencias médicas y se utilizan cada vez más en el enfoque de la biología de sistemas.

Debido a que la metabolómica involucra desde técnicas convencionales de perfilado hasta el estudio de organismos o sistemas biológicos, como se integran e interactúan genes, proteínas, metabolitos, vías y células; a esto se le conoce como biología de sistemas aplicada y actualmente este enfoque se aplica en enfermedades cuyos mecanismos son difíciles de comprender como Cáncer o los errores innatos del metabolismo y cuyo tratamiento debe ser personalizado (Koek, et al., 2011).

La metabolómica implica el análisis cuantitativo y cualitativo imparcial de todo el conjunto de metabolitos presentes en las células, fluidos corporales y tejidos (el metaboloma) y de la bioestadística (el análisis de datos multivariados, además del reconocimiento de patrones), desempeña un papel esencial en el análisis de las diferencias entre el metaboloma que permite la identificación de los metabolitos con una característica fenotípica específica. En analogía con otras técnicas de genómica funcional, como un enfoque integral, general-no específico se utiliza para obtener nuevos conocimientos y una mejor comprensión del funcionamiento biológico de una célula u organismo.

Obviamente, para la interpretación biológica correcta, se necesitan datos cuantitativos fiables. Por lo tanto, la optimización, la validación y el control adecuado de la calidad de los métodos analíticos son de vital importancia.

En la actualidad varias búsquedas de diferentes estrategias analíticas son aplicadas para el análisis de un gran rango de metabolitos, por ejemplo, el análisis metabólico dirigido, perfilado metabólico, firma metabólica, metabonomía y metabolómica (ver Tabla 1). Dependiendo de la cuestión biológica, se requieren de diferentes enfoques analíticos y se formulan diversas demandas en el desempeño analítico (límite de detección, exactitud, precisión etc.). La terminología en la investigación metabólica aún no ha sido estandarizada y se utilizan distintas definiciones de los términos en revisiones. (Koek et al., 2011).

El objetivo del análisis metabólico dirigido y perfiles metabólicos, se utilizan comúnmente en las estrategias de investigación metabólica clásica de una hipótesis-dirigida, donde el interés se centra en un número limitado de metabolitos o una cierta clase de compuesto o vía metabólica, debido al tratamiento previo, selección y limpieza de la muestra los límites de detección bajos, alta precisión y exactitud para este enfoque pueden ser alcanzados.

Para el rápido escaneo en muestras, clasificación y cuantificación donde no es siempre necesario un enfoque dirigido a cada metabolito individual, se aplican comúnmente las técnicas en huellas metabolómicas. La metabolómica es el análisis exhaustivo no-dirigido e integral de todos (o al menos tanto como sea posible) los metabolitos en un sistema biológico. Algunos también distinguen la metabonomía como un enfoque independiente a la investigación metabolómica. La metabonomía se define como la medición cuantitativa de la respuesta metabólica multiparamétrica y dinámica de los sistemas vivos a los estímulos fisiopatológicos o modificación genética. Sin embargo en la práctica, los términos metabolómica y metabonomía a menudo se utilizan indistintamente, y los procedimientos de análisis y modelado son los mismos (Koek et al., 2011).

Tabla 1: Estrategias analíticas para la investigación metabolómica.(Koek et al., 2011).

| Técnica | Definición | Estrategias de análisis |
|------------------------------|--|--|
| Análisis metabólico dirigido | El análisis cuantitativo de uno o pocos metabolitos enfocados. | El pretratamiento de la muestra selectiva seguida de la separación (GC, LC, CE) acoplado a detección selectiva sensible como Espectrometría de Masas. |
| Perfil metabólico | El análisis cuantitativo y cualitativo de múltiples componentes que se definen o describen como patrones metabólicos para grupos metabolómicos o metabolitos analíticamente relacionados. | El pretratamiento de la muestra selectivo para la clase de compuesto o compuestos a determinada vía seguido por la separación acoplada a la detección por Espectrometría de Masas. |
| Huella metabólica | Cribado de alto rendimiento de muestras para proporcionar la clasificación de metabolitos. Generalmente no cuantitativo (o sólo la cuantificación relativa) y ningún tipo de identificación de metabolitos individuales. | La estrategia típica: un simple pretratamiento de la muestra seguido por NMR, FT-IR, o espectrometría de masas por infusión directa (DIMS). |
| Metabolómica | El análisis cuantitativo y cualitativo de la serie completa de metabolitos presentes en un sistema biológico (células, fluidos corporales, tejidos). | Un pretratamiento genérico de la muestra seguido de separación acoplada a la detección por espectrometría de masas. |
| Metabonómica | El análisis cuantitativo y cualitativo de todos los metabolitos presentes en un sistema biológico por estímulo ambiental. | Misma metodología que se emplea en los estudios metabolómicos en la muestra y analitos ambientales. |

Aunque la comprensión de los organismos vivos a nivel del sistema molecular todavía está en sus inicios, es evidente que una amplia investigación sobre la "cascada en ómicas" con la genómica, la transcriptómica, proteómica y metabolómica son bloques de construcción y juegan un papel importante. La cascada "ómicas" comprende los conjuntos de datos complejos que se describen exhaustivamente como una entidad, la respuesta de los sistemas biológicos a la enfermedad, la genética, y las perturbaciones ambientales (Dettmer, Aronov, y Hammock, 2007).

Cascada ómica

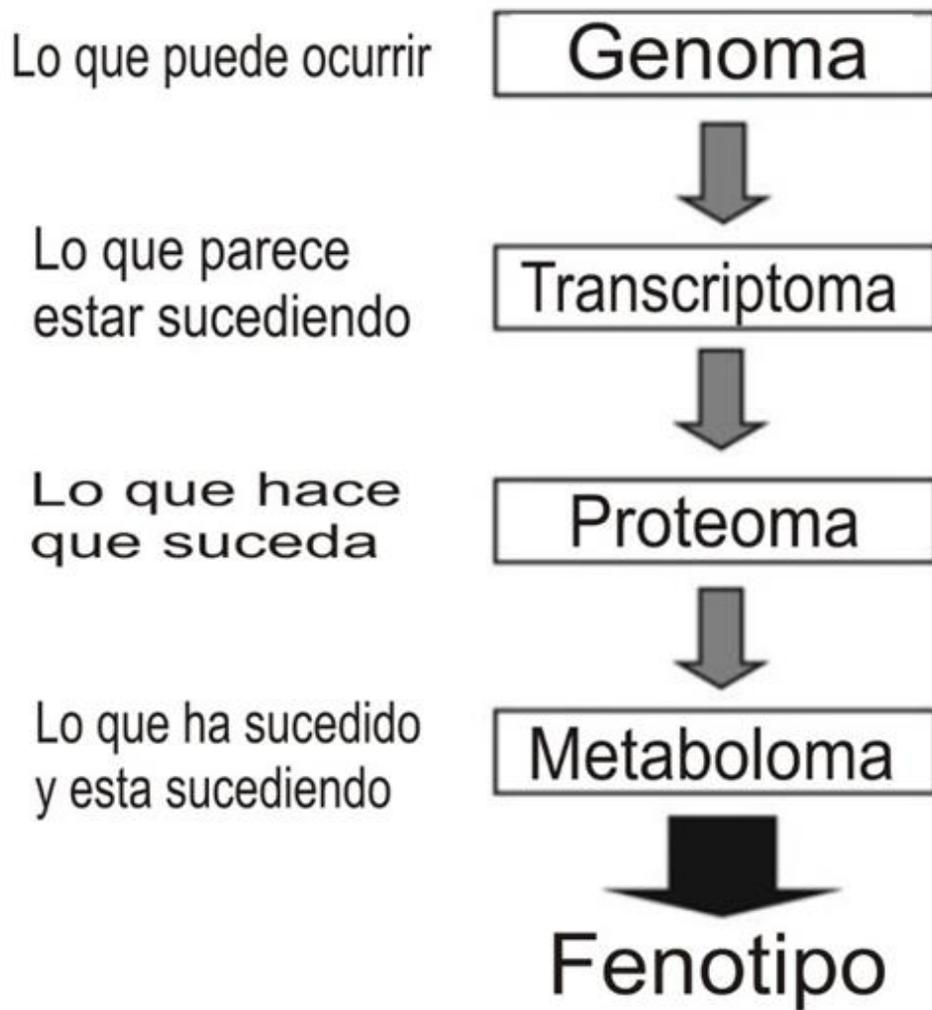


Figura 1: Flujo de expresión de la metabolómica y otras “ciencias ómicas” (Dettmer, Aronov, y Hammock, 2007).

El análisis del metaboloma humano permite describir el estado del organismo haciendo posible el estudio de respuestas celulares, mecanismos de defensa y mecanismos de homeostasis. La mejora de las técnicas de medición de los distintos metabolitos permite utilizar la metabolómica como herramienta diagnóstica y ayudar al tratamiento médico (Pinazo-Durán, 2012).

Esto se deriva en parte de la estrecha asociación del metaboloma a la fisiología de la célula. Mientras que el genoma, transcriptoma y el proteoma pueden ser vistos como medios en el flujo de la expresión génica, el metaboloma representa el nivel “ómico final” en un sistema biológico, y refleja cambios en el fenotipo y la función (Ryan y Robards, 2006). Como se observa en la Figura 1.

Las ómicas son ciencias holísticas, es decir, consideran el mayor número de variables posibles, para posteriormente extraer la información verdaderamente útil de ellas y trabajar en su conjunto. El objetivo es analizar el máximo número de metabolitos posibles y seleccionar los que verdaderamente aportan información, a partir de algoritmos de procesamiento de señal, propios de la inteligencia artificial.

Esta aproximación permite un nuevo enfoque en la investigación bioquímica y biomédica, ya que ya no es necesario partir de hipótesis-restringidas. Hasta el advenimiento de las ciencias ómicas, cuando se planteaba un experimento se realizaban hipótesis sobre los genes, proteínas y caminos metabólicos clave que interesaba estudiar; pero si la hipótesis de partida era errónea o incompleta, debíamos iniciar un nuevo experimento, con la consiguiente pérdida de tiempo y recursos. El uso de las ciencias ómicas permite iniciar los experimentos sin hipótesis previas y por lo tanto podemos explorar de forma simultánea diversas vías y rutas metabólicas (Correig, 2009).

La metabolómica permite clasificar muestras, entender mejor los mecanismos bioquímicos, identificar bio-marcadores, cuantificar metabolitos en el entorno y flujos biológicos, etc., dependiendo del punto de partida como se desea abordar. Podemos decir que se ha constituido en una técnica indispensable dentro de la biología de sistemas (Koek et al., 2011).

Al igual que en el caso de la proteómica, el objetivo de la metabolómica es caracterizar el complemento de moléculas pequeñas de una muestra determinada e interrogar a las redes metabólicas en condiciones normales y patológicas, de manera cualitativa y cuantitativa.

Las tecnologías de metabolómica se han aplicado a diferentes áreas de investigación clínica, entre ellas el descubrimiento de biomarcadores y fármacos (Shah, Kraus, y Newgard, 2012), la toxicología (Shintu et al., 2012), y la nutrición (Sampey et al., 2012). La base de datos más potente integra los datos de todos los niveles ómicos (ver Figura 2) (Barallobre-Barreiro, Chung y Mayr, 2013).

El análisis de integración de la respuesta de un organismo a una perturbación en el transcriptoma, proteoma, y los niveles de metaboloma conducirá a una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos y biológicos en los sistemas complejos. Sin embargo, mientras que la genómica, la transcriptómica y la proteómica han hecho avances significativos en el desarrollo de la tecnología, siguen surgiendo las herramientas para el examen exhaustivo del metaboloma (Bino et al., 2004).

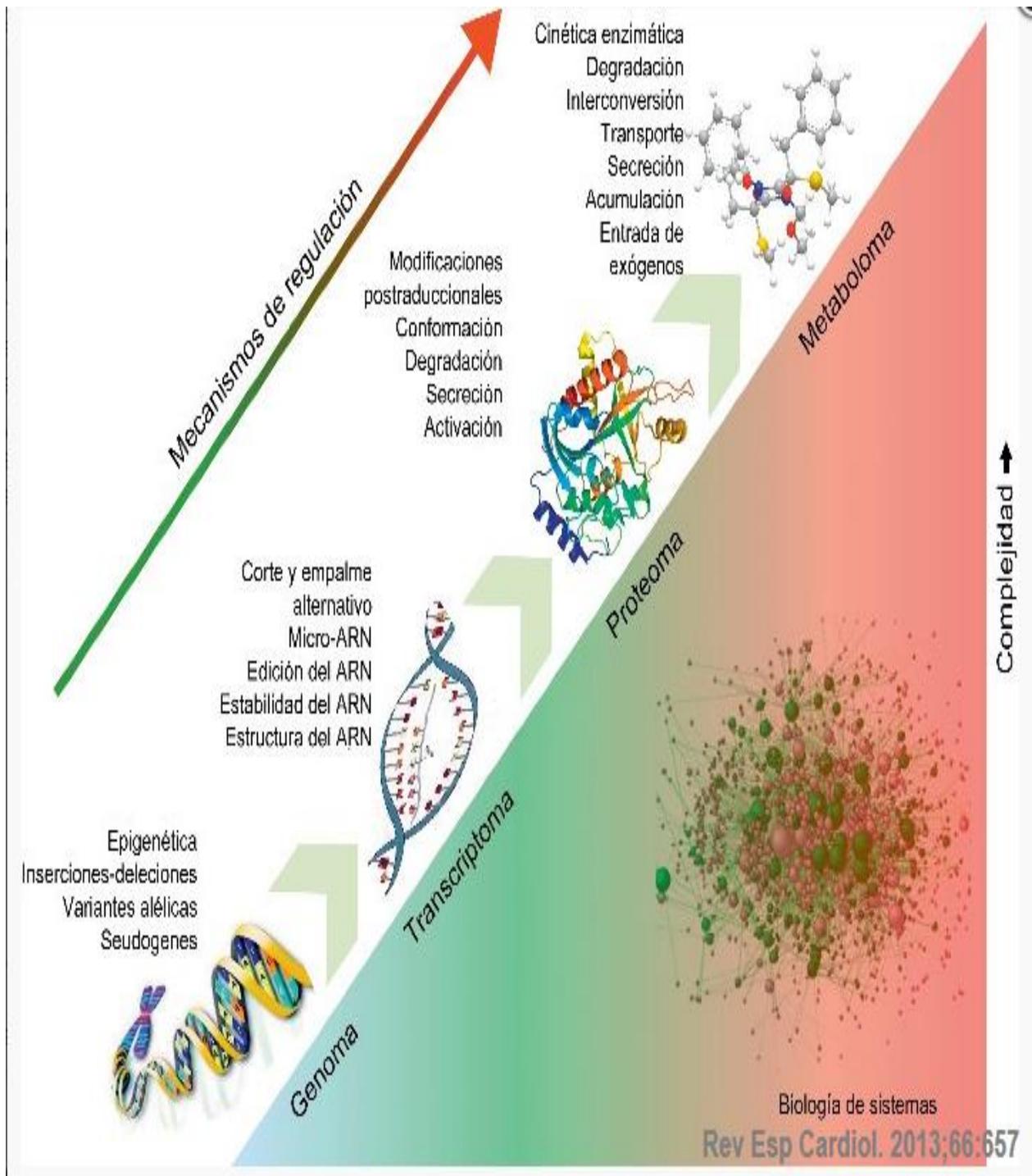


Figura 2: Nivel de complejidad de las “ciencias ómicas”. (Barallobre-Barreiro J Chung Y Mayr M, 2013).

Aunque la metabolómica es el punto final de la "cascada ómica", no hay una plataforma de un solo instrumento donde actualmente se pueda analizar todos los metabolitos. Posiblemente, porque hay la percepción de que los otros enfoques "ómicos" pueden ser manejados por una sola plataforma, la metabolómica se ha quedado atrás de las otras ciencias.

Esto se ilustra en la Figura 3, que muestra la búsqueda bibliográfica que contiene las palabras de la metabolómica y la proteómica. Mientras que en 1999 tres artículos que contiene las palabras clave metabolómica fueron publicados, el número aumentó a 147 artículos en 2003 y 556 en 2018. Se muestra la frecuencia de las publicaciones totales metabolómica (cuadrados azules), publicaciones que mencionan a la proteómica (barras naranjas) de 1997 a la fecha.

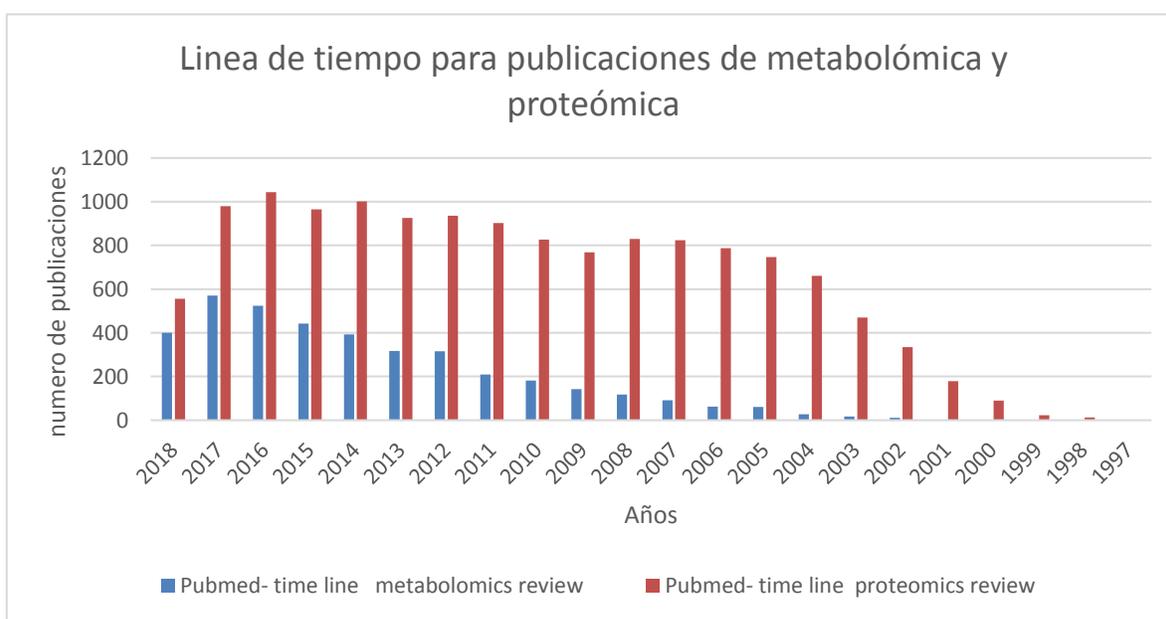


Figura 3: Grafico que representa la información en metabolómica y proteómica (modificado de NCBI, 2018).

Por otra parte, la Revista Metabolómica (Springer) lanzada en 2007, se dedica a publicar los resultados de investigación relacionados con el desarrollo de la tecnología, análisis de datos, almacenamiento, estudios integrados con otras técnicas "ómicas" y aplicaciones de la metabolómica. El creciente número de publicaciones en el campo demuestra que la metabolómica no es sólo una nueva ciencia "ómica", sino una valiosa herramienta emergente para estudiar el fenotipo y sus posibles cambios causado por influencias ambientales, enfermedades o cambios en el genotipo en poblaciones. La investigación exhaustiva del metaboloma se complica por su enorme complejidad y la dinámica. Las distribuciones de metabolitos son sometidas a una alta variabilidad espacial y temporal; por ejemplo, las fluctuaciones circadianas en organismos mamíferos son bien conocidas. Además, la dependencia de la dieta y variabilidad biológica en sistemas de mamíferos puede complicar el análisis (Vigneau-Callahan et al., 2001).

Un cuidadoso diseño experimental, es obligatorio para el éxito de este tipo de investigaciones. El metaboloma representa un gran número de componentes que pertenecen a una amplia variedad de clases de compuestos, tales como aminoácidos, lípidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, etc., estos compuestos son muy diversos en sus propiedades físicas y químicas y se producen en una amplia gama de concentraciones.

Por ejemplo, dentro de los lípidos solamente, que son compuestos muy abundantes, tales como ácidos grasos, triglicéridos o fosfolípidos, se encuentran a niveles estudiados; sin embargo, también existen trazas de los componentes con efectos reguladores importantes, tales como eicosanoides derivados del ácido araquidónico y cuyos niveles se desconocen (Koek et al., 2011).

Según Beecher, 2,000 metabolitos principales parece ser una buena estimación para los seres humanos (Harrigan y Goodacre, 2003). Este número puede ser, por supuesto mucho más grande cuando se consideran los metabolitos secundarios. Algunos de estos metabolitos pueden ser mediadores químicos de gran importancia biológica. Hasta 200,000 metabolitos se pueden encontrar en el reino vegetal (Weckwerth, 2003). En consecuencia, el estudio del metaboloma es un desafío importante para la química analítica y el análisis metabolómico en su verdadero sentido, es decir, el análisis cuantitativo de todos los metabolitos, no pueden ser alcanzados con la instrumentación analítica actual.

Actualmente, dos enfoques complementarios se utilizan para las investigaciones metabolómicas: el “perfil metabólico” y de “huella metabólica” (ver Figura 4). (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

Un resumen de las definiciones relacionadas a metabolómica se da en la Tabla 1. El perfil metabólico se centra en el análisis de un grupo de metabolitos relacionados ya sea a un camino metabólico específico o una clase de compuestos. El análisis cuantitativo de ácidos grasos como ésteres metílicos de ácidos grasos por GC-FID (Detector de Ionización de Flama) o el análisis de aminoácidos son ejemplos de perfiles metabólicos. (Koek et al., 2011).

Un enfoque aún más dirigido es el análisis objetivo que apunta a la medición de analitos seleccionados, tales como biomarcadores de la enfermedad o la exposición tóxica, o sustratos y productos de reacciones enzimáticas (Bino et al., 2004). En la mayoría de los estudios en perfiles metabólicos, basados en hipótesis formuladas, se seleccionan los metabolitos de análisis y son desarrollados métodos de análisis específicos para su determinación.

Los enormes avances tecnológicos en los últimos años permiten una expansión constante del número de analitos que se cuantifica de forma simultánea en un único análisis. Tecnológicamente, el análisis de un solo biomarcador es a menudo tan complejo como los perfiles de todos los metabolitos principales relacionados en una ruta bioquímica dada.

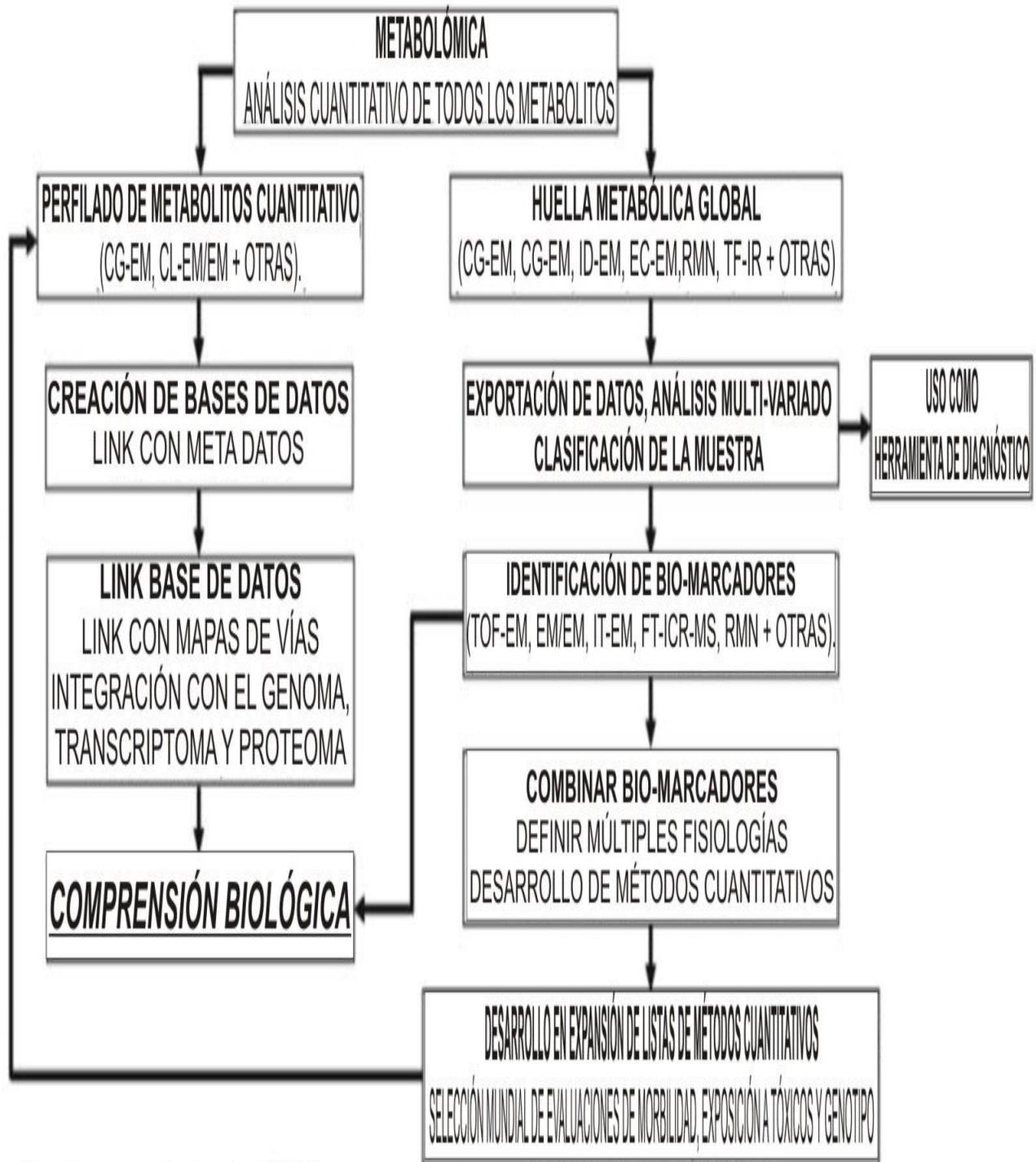


Figura 4: Estrategias para la investigación metabolómica y su flujo de trabajo (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

Sin embargo, estos últimos darán como resultado una descripción más completa y detallada de las perturbaciones metabólicas, que un solo biomarcador puede proporcionar. Los resultados de perfiles metabólicos son cuantitativos e ideales independiente de la tecnología utilizada para la adquisición de datos. En consecuencia, los datos pueden ser utilizados para construir las bases de datos que se pueden integrar con mapas de ruta u otros datos "ómicos", que mejorarán la comprensión biológica (Koek et al., 2011).

Aunque los datos cuantitativos de metabolitos de diferentes organismos modelo son abundantes en la literatura, su integración en bases de datos mundiales todavía no se ha logrado. La desventaja de los perfiles metabólicos es que el sistema no es un enfoque "ómico" global o verdadero. Sin embargo, ya se han desarrollado numerosos métodos de perfiles metabólicos cuantitativos que analizan diferentes clases de metabolitos y se utilizan de forma rutinaria. Si estos métodos de medición de los metabolitos clave, de diferentes vías bioquímicas se ensamblan como bloques de construcción para estudiar el metaboloma la metabolómica evolucionará con un enfoque poderoso (Koek et al., 2011).

El segundo enfoque hacia la metabolómica es la "huella metabólica". Inicialmente, en este enfoque la intención no es identificar cada metabolito observado, pero si para comparar patrones o "firmas" de los metabolitos que cambian en respuesta a la enfermedad, exposición a tóxicos, ambientales o alteraciones genéticas. Un flujo de trabajo típico, pero simplificado para un análisis de la "huella metabólica" se muestra en la Figura 5, se ha realizado en una amplia variedad de matrices biológicas, tales como orina, plasma o suero, saliva, y los tejidos o células. (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

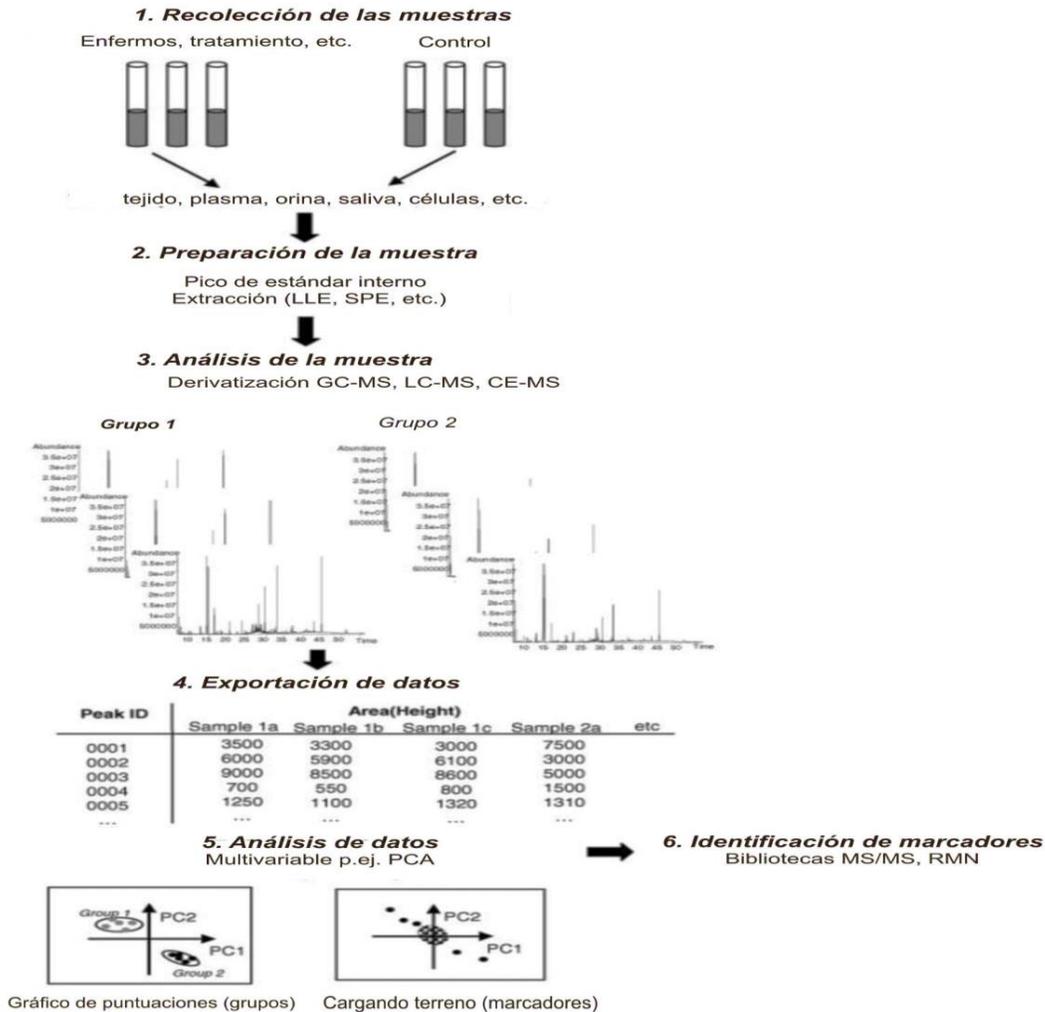


Figura 5: Flujo de trabajo simplificado para el análisis por “firmas metabólicas y la identificación de marcadores” (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

Además de la huella metabólica de los metabolitos intracelulares en sistemas de cultivo celular, el análisis de metabolitos extracelulares que excreta en el medio de cultivo o tomado del medio por las células puede proporcionar información valiosa sobre su fenotipo y el estado fisiológico. El análisis de patrones de los metabolitos en los medios de cultivo celular acondicionado se denomina “huella metabonómica” (Allen et al., 2004; Allen et al., 2003)

Las “huellas metabólicas” pueden aplicarse simultáneamente desde una amplia gama de metabolitos, con un enfoque verdadero “ómico”. La aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) basadas en “firmas metabólicas” ha marcado el inicio de un enfoque de la metabolómica como herramienta en bioquímica y ha demostrado ser muy potente en las muestras de selección para una variedad de patrones de homología o agrupaciones.

Las “huellas metabólicas” pueden ser utilizadas como una herramienta de diagnóstico, por ejemplo, mediante la evaluación de la “huella metabólica” de un paciente en comparación con sujetos sanos y enfermos. Además, el éxito de las estrategias de tratamiento se puede controlar mediante la observación de si el fenotipo metabólico cambia de nuevo a un estado no patológico, o en otras palabras si una muestra después del tratamiento cae en el grupo de sujetos sanos. Sin embargo, el uso de la metabolómica exclusivamente para las “huellas metabólicas” sin identificar los metabolitos que causan la agrupación de los grupos experimentales sólo ofrecerá una herramienta de clasificación, pero no contribuyen directamente al conocimiento y la comprensión de los mecanismos subyacentes de la acción bioquímica.

El verdadero poder de la metabolómica se realiza cuando se llevan a cabo análisis cualitativos y cuantitativos. El conocimiento de la identidad y de su perturbación cuantitativa del metabolito como descriptores de las diferencias en los fenotipos específicos proporciona información que puede ser interpretada teniendo en cuenta las vías bioquímicas. (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

Por lo tanto, los metabolitos que causan la segregación del grupo en el enfoque de “huellas metabólicas” deben ser identificados y deben ser desarrollados métodos cuantitativos para el análisis de estos metabolitos y compuestos relacionados, que unirá “huellas metabólicas” y “perfiles metabólicos”. En consecuencia, la anotación del metaboloma es un elemento importante para la investigación metabolómica exitosa. Tanto las huellas y los perfiles metabólicos se pueden utilizar en la búsqueda de nuevos biomarcadores. El valor de las pruebas de glucosa en sangre y de colesterol en el diagnóstico médico ilustra el valor de biomarcadores incluso simples (Koek et al., 2011).

La metabolómica puede producir nuevos biomarcadores que pueden llegar a la clínica como herramientas para diagnosticar el estado de salud, la enfermedad, o el resultado de un tratamiento farmacológico. La metabolómica no se limita a los biomarcadores individuales, más bien, representa un nuevo enfoque para el diagnóstico, donde grandes conjuntos de datos pueden ser empleados en total, para una mejor comprensión.

Por ejemplo, la evaluación de las vías bioquímicas relacionadas en respuesta al tratamiento farmacológico dará una descripción más completa de los mecanismos de retroalimentación o diafonía que los biomarcadores individuales pueden ofrecer. Además de incluir el concepto de salud individualizada con estudios en nutrición y tratamiento farmacológico basado en el fenotipo metabólico dependerá en gran medida de la tecnología metabolómica. (Watkins y German, 2002).

La promesa de la tecnología en la medicina clínica para pasar muestras de mililitro a microlitro y pasar de unos pocos a miles de analitos es emocionante, pero el potencial de la tecnología para generar una comprensión biológica es, posiblemente, aún más significativa (Koek et al., 2011). Numerosas plataformas analíticas se han utilizado para aplicaciones metabolómica, tales como RMN (Lindon, Nicholson y Holmes, 2011), Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) (Harrigan et al., 2004; Jonsson et al., 2004), y espectrometría de masas (MS) junto a técnicas de separación, que utilizan la inyección en flujo directo.

Las grandes ventajas de RMN son las posibilidades de las “huellas metabólicas” con alto rendimiento, los requisitos mínimos para la preparación de la muestra, y el no discriminar y la naturaleza no destructiva de la técnica. Sin embargo, mide sólo metabolitos abundantes por ser detectados con este enfoque y la identificación de los metabolitos individuales con base a señales de desplazamiento químico que causan la agrupación de la muestra en el análisis multivalente es un reto en mezclas complejas.

La metabolómica basada en la espectrometría de masas (MS) ofrece análisis cuantitativo con alta selectividad y sensibilidad y el potencial de identificar metabolitos. En combinación con una técnica de separación reduce la complejidad de los espectros de masa debido a la separación del metabolito en una dimensión de tiempo, proporciona una separación isobárica, y proporciona información adicional sobre las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos.

Sin embargo, las técnicas basadas en espectrometría de masas generalmente requieren una etapa de preparación de la muestra, que puede causar pérdidas de metabolitos, y basado en el sistema de introducción de muestra y de la técnica de ionización utilizada, los metabolitos específicos pueden ser discriminados. Por lo tanto, la aplicación paralela de varias técnicas, por ejemplo, GC-MS y LC-MS se sugieren para estudiar el metaboloma integral (Koek et al., 2011).

Sin embargo, no sólo la elección de las técnicas de análisis requiere de una cuidadosa consideración, para todo experimento en metabolómica se debe planificar como una unidad integrada, ya que los datos instrumentales sólo son tan buenos como bueno es el diseño experimental y el tratamiento de la muestra. En este contexto (Bino et al., 2004), propuso, que la información mínima sobre un experimento en metabolómica (MIAMET), debe ser reportado con cada estudio con el fin de facilitar el intercambio de información y el establecimiento de bases de datos. Recomendaciones similares con respecto a los metadatos se han hecho para las otras tecnologías "ómicas".

En general, para cada tipo de los experimentos en metabolómica se tienen los siguientes pasos que deben ser abordados durante el desarrollo y validación de métodos: (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

- Muestreo
- Preparación de la muestra
- Análisis de las muestras incluyendo la separación y detección de metabolitos
- Exportación de datos
- Análisis de los datos.

5 METODOLOGÍAS EN METABOLÓMICA

5.1 La muestra y sus problemas de preparación

La adquisición de la muestra está impulsada principalmente por el diseño experimental y el tipo de experimento. Si es posible, se debe realizar un análisis para poder garantizar el número suficiente de muestras que se requieren, para reducir la influencia de la variabilidad biológica y obtener datos estadísticamente validados. En particular, cuando se realiza un estudio con fluidos biológicos, tienen que ser considerados las influencias de la dieta, el género, la edad y los factores genéticos. Por lo tanto, en el análisis de las huellas metabólicas se analizan comúnmente un gran número de muestras para detectar la agrupación de metabolitos biológicamente relevante. Además, se deben determinar los controles de calidad representativos, tienen que ser analizadas réplicas, análisis duplicados, y blancos e incluir los esbozos del método (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

El éxito de un experimento metabolómico no sólo depende de las condiciones sino también implica etapas previas que se ocupan de la manipulación de la muestra (es decir, la elección del medio adecuado, recolección de la muestra y el transporte, la extracción del metabolito, y estabilidad) (Canelas et al., 2009). Algunos fluidos biológicos (orina, LCR y la savia de las plantas) son esencialmente libres de proteínas y pueden utilizarse casi de inmediato, sin más trabajo de preparación. Otros fluidos contienen proteínas de alto peso molecular (extractos de saliva, suero, plasma y tejidos) y partículas de lipoproteínas (suero y plasma). Estos fluidos generalmente requieren una extracción mayor o filtración para eliminar los componentes de alto peso molecular.

5.2 Recolección de la muestra

5.2.1 Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Varios fluidos biológicos de mamíferos pueden ser investigados en la metabolómica, incluyendo plasma, suero, orina, LCR o, dependiendo del campo de la investigación biológica. Por ejemplo, el LCR es relevante con respecto a los trastornos neurológicos debido a su proximidad con las células neuronales y gliales (Mochel et al., 2009), y los eritrocitos son de interés para investigar las alteraciones metabólicas en pacientes que sufren de enfermedades genéticas de las células rojas de la sangre (Darghouth et al., 2011). Sin embargo, la orina y la sangre siguen siendo los fluidos biológicos más utilizados.

La toma de muestras de LCR es el método directo menos invasivo para evaluar las alteraciones patológicas que se producen dentro del SNC, el LCR se comunica directamente con los ventrículos cerebrales, baña las porciones superficiales del cerebro, la médula espinal, y las porciones de los nervios craneales, espinales y el fluido extracelular de estas estructuras. Como tal, muchos creen que el LCR proporciona una fuente óptima de diversos biomarcadores para diversos eventos patológicos que ocurren dentro del sistema nervioso central, incluyendo Enfermedad de Alzheimer (EA) (Blennow, Zetterberg, y Fagan, 2012). La más consistente correlación con la EA y LCR se han relacionado con las concentraciones de un fragmento proteolítico de la proteína precursora $\alpha\beta$ -amiloide₁₋₄₂, además de tau-total (t-tau) y los niveles de p-tau (Hampel, Lista, y Khachaturian, 2012).

5.2.2 Orina

La orina contiene subproductos generados por el metabolismo celular que tienen que ser eliminados del cuerpo por los riñones. Muchas de las condiciones fisiológicas y fisiopatológicas se reflejan con cambios en la concentración de metabolitos en la orina, lo que indica ruptura de la homeostasis (Chace, 2001). La recolección de la orina es no invasiva, puede conseguirse fácil y rápidamente, se puede recolectar puntual, de 12 o 24 horas. En este último caso, se recomienda el uso de conservante para evitar la contaminación bacteriana (Want et al., 2010).

5.2.3 Sangre entera o suero

La sangre es una fuente atractiva de biomarcadores que refleja todo el estado metabólico del organismo en un momento dado de muestreo. Las muestras de sangre se centrifugan para eliminar las células de la sangre a fin de obtener ya sea plasma (mediante la inactivación de la cascada de coagulación utilizando anticoagulantes) o suero (después de la coagulación de la sangre). Estos dos fluidos biológicos se pueden utilizar ya que ambos parecen generar resultados similares en estudios clínicos y biológicos. Por el momento, el plasma es el más utilizado para los estudios de metabolómica (Kaddurah-Daouk et al., 2012), mientras que el suero se menciona en dos consorcios: el Proyecto Metaboloma Humano que es una asociación americana cuyo objetivo es el desarrollo de recursos de referencia metabolito centralizados para ciertos fluidos biológicos importantes, incluyendo sueros (Psychogios et al., 2011), y el consorcio HUSERMET que es una colaboración entre la Universidad de Manchester y 2 diseñadores asociados industriales para caracterizar el metaboloma del suero humano e identificar biomarcadores para el inicio, progresión y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y cáncer de ovario (Cottingham, 2008).

Yu et al., (2011), fueron los primeros en demostrar que cuando se comparan los perfiles de LC/MS mediante inspección visual simple o bien, utilizando software Mass Profiler Professional solo se encuentran diferencias sutiles entre los diferentes métodos de preparación de sangre.

Sin embargo Denery, Nunes, y Dickerson, (2011), demostraron que en relación con el suero, el coágulo impacta sobre el metabolismo energético, debido al metabolismo anaeróbico de las células rojas de la sangre. Estos cambios tienen una diferencia significativa, como lo demuestra un análisis de componentes principales (PCA) de los espectros de RMN. Además, en relación con las muestras de plasma, la elección del anticoagulante puede afectar la detección de metabolitos como lo describen Teahan et al., (2006).

Independientemente del fluido biológico que esté siendo utilizado, se debe tener cuidado para evitar la contaminación bacteriana o aditivos químicos que alteren la muestra (por ejemplo, la colocación de sangre o suero en tubos que contienen EDTA o heparina o "geles inertes" dará lugar a la contaminación sustancial del espectro de RMN con aditivos de moléculas pequeñas) (Wishart et al., 2009).

Todavía no existe un consenso claro sobre el tipo de anticoagulante que se utilizará para estudios de metabolómica. Por ejemplo, se sabe que la heparina, que contiene bisulfito de sodio como conservante, puede afectar a la cuantificación de cisteína y sulfo-cisteína debido a la formación de sulfo-cisteína y homo-sulfo-cisteína (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

Parvy et al., (1989), observaron que el uso de citrato no se recomienda porque este compuesto es un metabolito involucrados en el ciclo de Krebs. Para metales quelantes por ejemplo Ca^{2+} , necesario para la activación de las enzimas en la cascada de coagulación, los impactos del EDTA sobre el metaboloma afectan el perfil de proteínas por MS. Bando et al., (2010), recomendaron no utilizar anticoagulantes ya que los picos derivados de la heparina podrían coincidir con los metabolitos endógenos en el análisis GC-TOF, el EDTA puede interferir con la detección de metabolitos que estén presente en los espectros de RMN y la MS. Por último, cuando se selecciona, un anticoagulante debe de reportarse la concentración dentro del estudio para evitar errores en el agrupamiento de muestras en el curso de los análisis estadísticos.

5.2.4 Células en cultivo o tejido de biopsias

La preparación de muestras para estudios metabolómicos de las células o tejido consiste en separar las células de interés a partir de su entorno biológico (es decir, medio de cultivo, las células vecinas, etc.), mientras que preserva su integridad. Según el tipo de muestra, centrifugación o filtración en membranas apropiadas deben lograr este objetivo. En cuanto a las muestras de microbiología, tienen que ser mantenidas las condiciones estériles. Al final, se recomienda lavar las células recolectadas para eliminar los compuestos del medio o extracelulares (Meyer, Liebeke, y Lalk, 2010).

En la metabolómica cuantitativa de moléculas pequeñas, se trabaja con fluidos biológicos o extractos de tejidos acuosos por lo que la RMN proporciona una excelente sensibilidad y resolución. Ciertamente, es posible trabajar con muestras sólidas (tejidos o biopsias de órganos) a través del ángulo de giro de la muestra, pero hay una serie de problemas y la resolución espectral suele ser menos que ideal (Swanson et al., 2006).

La calidad de la preparación de la muestra es un factor importante para el éxito de cada procedimiento analítico. Por lo general, sirve para varios propósitos. Principalmente, se extraen los analitos a partir de matrices biológicas complejas, y los coloca en un formato que es compatible con la técnica analítica utilizada, mientras se eliminan componentes de la matriz que puedan interferir con el análisis.

En el caso de los metabolitos de baja abundancia, el procedimiento de extracción puede incluir una etapa de concentración previa para alcanzar los límites de detección de la técnica analítica aplicada. En términos de análisis metabólico dirigido o de perfiles metabólicos cuantitativo la preparación de la muestra se puede adaptar para los metabolitos dirigidos, porque los analitos son conocidos y pueden emplearse compuestos sustitutos o estándares marcados con isótopos estables para optimizar el procedimiento de extracción y retirada de la matriz.

Sin embargo, en un enfoque real de la metabolómica, todas las moléculas pequeñas son objetivo y sólo sales o macromoléculas, como proteínas o péptidos más grandes, se puede considerar como matriz.

En consecuencia, una etapa de preparación de la muestra debe ser tan simple y universal como sea posible. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que cualquier tipo de preparación de la muestra causará pérdidas de analito. En particular, los procedimientos de extracción aplicados a muestras acuosas se traducirán en recuperaciones pobres de compuestos muy polares (Koek et al., 2011).

5.3 Desactivación Metabólica

Un paso de desactivación metabólica puede ser incorporado en el proceso donde se detienen las reacciones enzimáticas en curso que ocurren después de recolección de la muestra con el fin de medir la composición verdadera del metaboloma en el momento de muestreo. La desactivación es especialmente relevante para los estudios relativos a los compuestos que muestran una alta rotación metabólica, como es el caso del metabolismo energético (Lämmerhofer y Weckwerth, 2013).

El uso de calor, la congelación (con nitrógeno líquido), la adición de ácidos, o la transferencia de suspensiones celulares en un disolvente orgánico frío puede detener la actividad enzimática residual, pero estas técnicas tienen que hacer frente a la escala de tiempo del proceso metabólico de interés sin afectar a la estabilidad de los metabolitos (Vuckovic, 2012).

Procedimientos basados en disolventes orgánicos fríos son los más comunes, pero tienen la desventaja de liberar metabolitos intracelulares debido a la lisis de la membrana. Por último, el tema de la desactivación metabólica se aborda de forma rutinaria en la metabolómica de bacterias o vegetales (Bolten, et al., 2007), pero se omite con frecuencia por planteamientos globales realizados en fluidos biológicos como la sangre o la orina.

Otro tipo de precauciones se tienen en cuenta para la recolección de fluidos biológicos de mamífero tales como la adición de inhibidores de la glicólisis tales como fluoruro que inhibe la enzima enolasa y de este modo previene la degradación de la glucosa y la producción de lactato (Mikesh y Bruns, 2008). El tiempo entre que el fluido biológico o tomar muestras de tejido y la extracción de la muestra o el almacenamiento de muestras a bajas temperaturas (-20 o -80 °C) a menudo no se controla y esto puede introducir variabilidad en el conjunto de datos. La congelación rápida en nitrógeno líquido también se cree que compromete la integridad celular debido a la formación de cristales de hielo (Lämmerhofer y Weckwerth, 2013)

5.4 Extracción de metabolitos

Los organismos vivos son sistemas dinámicos y complejos; el cuerpo humano está compuesto de más de un billón de células y cada célula contiene más de un billón de moléculas. Se predice que hay más de 100,000 proteínas diferentes, 3 mil millones de pares de bases nitrogenadas y una red muy compleja de metabolitos (Koek et al., 2011).

Tradicionalmente, en el curso de análisis específicos, la extracción de la muestra está destinada a recuperar los únicos metabolitos de interés en lugar de grandes conjuntos de moléculas. Hoy en día, con el creciente interés hacia el análisis a gran escala de metabolitos en medios biológicos, con el objetivo de un análisis global es detectar la mayor cantidad de metabolitos como sea posible. Sin embargo, debido al enorme número y la gran diversidad química de los metabolitos involucrados, el químico analítico tiene que definir un compromiso entre una pureza suficiente del extracto, que impulsa una sensibilidad óptima en la detección MS de iones, y la extensión de la información recopilada usando RMN.

Aunque los protocolos de extracción de metabolitos selectivos son obligatorios para la detección de algunos que exhiben propiedades fisicoquímicas específicas, como es el caso de los lípidos, o para su detección a nivel de traza, el tratamiento de la muestra para los enfoques globales tiene que ser mínima a fin de evitar una fuente externa de variabilidad y pérdida de información. De todos modos, siempre es necesario para eliminar las macromoléculas tales como proteínas y lipoproteínas que pueden inducir una obstrucción en la fuente, y por lo tanto disminuir la sensibilidad de detección, y que también podrían alterar las columnas cromatográfica y así degradar la calidad de la separación.

Por esta razón, los métodos de separación, tales como electroforesis capilar (CE), cromatografía de gases (GC) y HPLC son necesarios antes de analizar muestras complejas biológicas humanas por la tecnología MS. La metodología CE permite una separación eficiente en un tiempo relativamente corto, debido a la movilidad diferencial de especies cargadas en un campo eléctrico (Altria, Marsh, y Sängner-van de Griend, 2006).

En un instrumento de GC, la fase gaseosa se aplica sobre la superficie interna de la columna. El gas portador (por ejemplo, helio o hidrógeno) pasa a través de un cilindro, por un dispositivo de presión o de flujo de control de velocidad y temperatura hacia el inyector de muestras en la entrada de la columna. En el sistema de GC-MS, componentes de la mezcla se eluyen de una columna y son revelados por el detector de MS. Las mejoras de las columnas y la instrumentación han permitido que el uso actual de la cromatografía líquida avance, incluyendo HPLC, rápida resolución (RR), o rápida separación (RS). Para este fin, se consideran diferentes categorías de procesamiento de la muestra, tales como líquido-líquido, extracción en fase sólida (SPE), precipitación de proteínas utilizando disolventes orgánicos, o ultrafiltración. (Koek et al., 2011).

Además, se requiere la ruptura de las membranas celulares para las investigaciones de metabolomas celulares, para liberar metabolitos intracelulares. Esto podría hacerse, mecánicamente ya sea utilizando perlas de vidrio o ultrasonido (Meyer, Liebeke y Lank, 2010), ciclos de congelación y descongelación, o la transferencia de las células en un medio hipotónico tales como agua hirviendo (Darghouth et al., 2011).

La preparación de la muestra y los métodos de introducción de estas para su análisis pueden incluir, pero no se limitan, a la extracción de fluido supercrítico, extracción con disolvente en forma acelerada, extracción asistida por microondas, precipitación de proteínas, y métodos de membrana, tales como diálisis o ultra centrifugación. (Dettmer, Arronov y Hammock, 2007).

5.4.1 Los metabolitos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son un componente importante del metaboloma y se encuentran en la orina, plasma, o el aire exhalado. Los metabolitos volátiles pueden incluir alcoholes, aldehídos, cetonas, furanos, pirroles, terpenos y otros (Mills y Walker, 2001). El análisis de los compuestos volátiles es difícil por sí mismo. Las técnicas de preparación de muestras convencionales, tales como extracción líquido o SPE, no son a menudo factibles, debido a que los analitos no pueden ser extraídos, y ocurren, pérdidas cuando el extracto no está concentrado. Por otra parte, el disolvente puede interferir con los analitos durante la separación por cromatografía de gases debido a la separación incompleta del pico del disolvente a partir de los picos del analito. (Dettmer, Aronov y Hammock, 2007).

En concreto, en GC-MS se cortarán los analitos con el retardo del solvente. Por lo tanto, las técnicas de preparación de muestras libres de disolventes son a menudo el método de elección para el análisis de metabolitos volátiles.

5.4.2 La extracción en fase sólida

La Extracción en Fase Sólida (SPE) se ha convertido en una de las técnicas de preparación de muestras más importantes para extraer analitos de fluidos biológicos. Es ampliamente utilizado en perfiles metabólicos y análisis dirigido, cuando se necesita una separación amplia de los analitos de interferencia de la matriz (Mitra, 2003).

Los analitos retenidos se elúyen posteriormente desde la fase sólida usando un disolvente o mezclas de disolventes con suficiente fuerza de elución. Sobre la base de los analitos o la fase seleccionada, los compuestos son retenidos por interacciones de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas (Mitra, 2003).

Una variedad de materiales absorbentes de SPE están disponibles comercialmente para la amplia extracción de metabolitos, tales como sílice, sílice alquilado (por ejemplo, C-18), fases unidas a carbono, materiales de intercambio iónico, materiales poliméricos y materiales de acceso restringido (RAM) y son utilizadas para eliminar las macromoléculas. Mientras las fases de sílice C-18 modificada han ganado una amplia distribución, estas tienen una serie de limitaciones, incluyendo una pobre retención de los analitos polares, la inestabilidad a un pH elevado, y las pérdidas de analito cuando la fase se seca después de la etapa de equilibrado.

Los materiales poliméricos han ganado más atención en los últimos años como absorbentes para fases sólidas. Específicamente funcionando, las resinas poliméricas que contienen grupos funcionales polares embebidos en un polímero no polar ofreciendo una mejor columna, con la retención de los analitos polares y manteniendo analitos hidrófobos. Las resinas poliméricas para SPE también muestran una mejor estabilidad de pH y son menos propensas a las pérdidas de analito cuando se utilizan en seco. Idborg, Edlund, y Jacobsson, (2004). Utilizaron Oasis HLB (Waters, Inc., Milford, MA) un funcionalizado copolímero de divinilbenzona y N-vinilpirrolidona, para el escaneo de metabolitos extraídos de orina por LC-ESI-MS. (Idborg, Edlund, y Jacobsson, 2004)

Un desarrollo más reciente en materiales de fases-SPE es el absorbente de modo mixto, que tienen un alto potencial para la investigación metabolómica. Las fases SPE no convencionales se basan en un mecanismo fundamental para la retención del analito. En contraste, los materiales de modo mixto utilizan múltiples mecanismos de retención causados por la incorporación de diferentes ligandos en una fase sólida. Ejemplos de ello son los materiales poliméricos con sitios débil/fuerte de intercambio catiónico o intercambio aniónico en el mismo material (Mitra, 2003). Por ejemplo, utilizando un material mezclado a modo de intercambio catiónico, neutros, ácidos protonados, y las bases pueden ser extraídos de los fluidos biológicos a pH ajustado usando la misma fase sólida, compuestos neutros y ácidos protonados son retenidos por interacciones hidrófobas no específicas con el esqueleto del polímero a pH bajo, mientras que las bases son retenidas por intercambio catiónico. En consecuencia, en la elución con disolvente orgánico se recuperará una fracción que contiene los metabolitos neutros y ácidos protonados, y una segunda etapa de elución a un pH ajustado se recuperará los compuestos básicos. De este modo una amplia variedad de metabolitos puede ser extraído con estos materiales para el análisis de huellas metabólicas. (Mitra, 2003).

5.4.3 Extracción Líquido-Líquido

La extracción líquido-líquido (LLE) para fluidos biológicos tiene una larga historia como una técnica de preparación de muestras. A menudo es el método de elección para la extracción de tejido. Tras la recolección, los tejidos son congelados en nitrógeno líquido. A fin de obtener una extracción eficiente del tejido, el tejido tiene que ser homogeneizado primero mediante molienda de la muestra congelada a un polvo fino usando mortero (Weckwerth, 2003), molinos de vibración (Jonsson et al., 2004), agitación con vórtex o por mezcla con perlas hechas de un material inerte (Colebatch et al., 2004), o la homogeneización del tejido en un disolvente utilizando diferentes mezclas (Roessner et al., 2000). La extracción de metabolitos a partir del tejido se hace comúnmente por agitación con disolventes orgánicos.

Los metabolitos polares se extraen por isopropanol, etanol, metanol, metanol ácido, acetonitrilo (Aharoni et al., 2002), agua, metanol: agua (Roessner et al., 2000), u otras mezclas de dichos disolventes, mientras que los metabolitos más lipófilos pueden ser extraído por el cloroformo o acetato de etilo. La ventaja de la extracción de muestras con mezclas de agua/metanol/cloroformo o acetato de etilo es la generación de una muestra bifásica y el fraccionamiento de los metabolitos en fracciones orgánicas acuosas y lipófilos polares, que puede ser analizada por separado (Colebatch et al., 2004; Fiehn, 2002).

Gullberg, Jonsson, Nordström, Sjöström, y Moritz, (2004) utilizaron “un diseño de experimentos dirigido” para optimizar el protocolo de extracción de tejido de plantas para su posterior análisis por GC-MS. Los autores encontraron como procedimiento optimo la extracción en un molino con vibración con cloroformo seguido por la adición de una mezcla metanol/ agua para formar una mono fase, y separar los compuestos entre dos líquidos no miscibles (fase acuosa y orgánica). Por lo general los compuestos de interés biológico se encuentran en la fase acuosa. Esta técnica se ha utilizado para la determinación de drogas como benzodiacepina en sangre total Simonsen et al., 2010 (a); Simonsen et al., 2010(b), agente de dopaje en la orina (Deventer et al., 2009), o los análisis de pesticidas (Gilbert-López et al., 2010).

Wu et al., (2008), han demostrado que el acetato de amonio es compatible con la detección API-MS. Por otro lado, la extracción líquido-líquido utilizando cloroformo y metanol (Bligh y Dyer, 1959), sigue siendo popular para los enfoques globales lipídicos, esto conduce a un sistema bifásico en el que la fase orgánica contiene los lípidos de interés.

5.4.4 Ultrafiltración

Daykin et al. (2002), para el uso de RMN-¹H, observaron que las proteínas y lipoproteínas podrían ser retiradas por completo de la sangre mediante ultrafiltración. Aunque con esta técnica se asegura una mayor sensibilidad para algunas clases de metabolitos, algunas especies hidrófobas pueden ser adsorbidas sobre la membrana de filtración. Para abordar esta cuestión (Tiziani et al., 2008), proponen añadir un filtro de paso de lavado de extracción de cloroformo y después de la ultrafiltración a fin de absorber los metabolitos restantes en el filtro, no hay un consenso en relación con la extracción de metabolitos de fluidos biológicos y solo existen algunas tendencias claramente para identificación. En la mayoría de los estudios, las muestras de orina se procesan de acuerdo con la "estrategia diluir y disparar", simplemente diluyendo la muestra cruda en agua antes de la inyección en el sistema LC/MS (Plumb et al., 2003; Williams et al., 2005).

5.5 Almacenamiento de muestras y consideraciones de estabilidad

Después de la eliminación de proteínas, las células o extractos de fluidos biológicos son a menudo fraccionados en pequeñas muestras (para evitar ciclos de congelación-descongelación), se secan, y se almacenan a -80°C con el fin de minimizar la degradación. Se reconstituyen en un disolvente apropiado, lo que asegura la solubilización de los metabolitos extraídos y la compatibilidad con el sistema analítico antes de comenzar el estudio metabolómico. Esto es crucial para evaluar las condiciones de almacenamiento y la estabilidad de la muestra inicial como de sus posteriores análisis en MS. Sin embargo, pocos estudios están disponibles y hay una falta de estudios de estabilidad a largo plazo en la metabolómica (Koek et al., 2011).

El uso de la revisión visual de los datos con LC-ESI/MS y parcelas de puntuación por PCA, Gika et al., demostraron que las orinas son estables sin conservadores después de 1 y hasta después de 6 meses de almacenamiento a -20° u -80°C, pero no a 6° o 4 °C después de días (Gika, Theodoridis, y Wilson, 2008; Gika et al., 2007)

Sin embargo, PCA sólo proporciona a los usuarios una representación resumida de la estructura del conjunto de datos; algunos metabolitos, por ejemplo, que se producen a baja concentración, pueden presentar variaciones de concentración con un impacto limitado en las parcelas de puntuación de PCA. Por tanto, es necesario investigar los problemas de estabilidad en los niveles de metabolitos anotados o identificados.

5.6 ¿Cómo evaluar la preparación de la muestra?

Hasta ahora, no se ha informado de ningún análisis exhaustivo que abarca todas las clases de metabolitos. En la mayoría de las publicaciones, se realiza la evaluación de la eficacia de la extracción en el nivel quimiométrico, es decir, teniendo en cuenta el número de

características detectadas (que son metabolitos potenciales) (Bruce et al., 2009; Want et al., 2010), y/o mediante la inclusión de pequeñas listas de metabolitos conocidos (Daykin et al., 2002; Jiye et al., 2005; Vuckovic, 2012), y/o patrones internos marcados (ISS) se añaden a las muestras (Jiye et al., 2005; Want et al., 2010).

Hay una necesidad de procedimientos de control de calidad para monitorear el desempeño de preparación de muestras. Según lo propuesto por Vuckovic, los métodos de extracción podrían ser evaluado en primer lugar con respecto a la supresión de ionización usando experimentos de infusión post-columna o muestras diluidas en serie como una indicación de eliminación de componente de la matriz (Vuckovic, 2012). La recuperación de varios ISS también podría ser evaluada (Bruce et al., 2009), o material biológico de referencia podría ser utilizado, como SRM 1950 para el plasma humano.

Para estudios con extractos de células y relacionado al metabolismo energético, otra estrategia también podría basarse en la evaluación de los niveles de metabolitos vinculados a la condición de energía celular, tales como la relación de energía de carga $([ATP] + [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ o relación catabólica de reducción de la carga $[NADH] / ([NAD^+] + [NADH])$, que debe estar dentro de los rangos de referencia (Vuckovic, 2012).

Como regla general, las muestras biológicas deben ser almacenadas a -80°C en recipientes de vidrio o plástico estéril con 0,02% de azida como bactericida. Del mismo modo, siempre se deben utilizar tampones inorgánicos (fosfato o sulfato) a pH fisiológico próximo (7.5). Dejando las muestras a temperatura ambiente o incluso en los refrigeradores durante largos períodos de tiempo puede conducir a cambios notables en las concentraciones de metabolitos (Saude y Sykes, 2007). Algunos fluidos biológicos (por ejemplo, orina y LCR) parecen ser más susceptibles a la exposición que otros fluidos biológicos (por ejemplo, sangre). Varios trabajos que elaboran mejores prácticas para el manejo de diferentes tipos de muestras biológicas se desarrollaron con este fin (Lauridsen et al., 2007).

6 MÉTODOS DE SEPARACIÓN E INTRODUCCIÓN DE MUESTRA

6.1 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)

Es una combinación de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas se permite el análisis de una amplia gama de metabolitos, que van desde mayor a menor peso molecular, y desde hidrófilo a hidrófobo, se puede realizar mediante la selección de la columna apropiada y fases móviles. La ionización por electro-spray (ESI), es un método de ionización general en LC/MS, puede ionizar la mayoría de los compuestos (Whitehouse et al., 1985). Sin embargo, ESI carece de la capacidad cuantitativa debido a un fenómeno descrito por primera vez por (Ikonoraou, Blades, y Kebarle, 1990), ellos describen el efecto matriz (supresión de la ionización y la mejora debido a la co-elución de la matriz). Así mismo el marcaje de los compuestos con isótopos estables y colocar la muestra es una manera de evitar este efecto matriz (Izumi et al, 2009).

En el pasado, LC/MS se consideraba satisfactoria para el análisis de metabolitos hidrófilos. Sin embargo, en los últimos años, el análisis simultáneo de metabolitos hidrófilos (aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, etc.) se ha logrado usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con propilo penta-fluoro-fenil y fases estacionarias sin ninguna derivatización (Yoshida et al, 2007). Además, los azúcares, alcoholes de azúcar y fosfatos de azúcar han sido analizadas con éxito utilizando la columna de separación ZIC-HILIC®, un tipo de cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) (Antonio et al., 2008).

Por otra parte, la cromatografía líquida (LC) par-ion fase inversa es también un método útil para la metabolómica (Luo et al., 2007). Este sistema puede detectar compuestos cargados negativamente, incluyendo fosfatos de azúcar, nucleótidos, y ácidos carboxílicos, que están involucrados en el metabolismo central de carbono (incluyendo la vía de glucólisis, vía del fosfato de pentosa y el ciclo de ácido tricarboxílico). Un par ion reactivo es un compuesto que tiene una carga opuesta en comparación con los metabolitos diana en solución acuosa.

Aunque el uso de par iónico reactivo es muy útil, el problema más grave es el efecto matriz en la ESI-MS sobre la base de co-elución de las impurezas de la muestra y/o par iónico reactivo de la fase móvil. Se debe tener precaución cuando se utiliza un par iónico reactivo, ya que puede quedar no apareado, reactivo y contaminar el ESI-pulverizador o dentro de la MS y puede afectar a la sensibilidad y/o repetición de LC/MS.

El lanzamiento del instrumento de cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) (Waters Corporativo, EE.UU.) en 2004 jugó un papel importante en el avance de metabolómica basada en LC-MS (Plumb et al., 2003). Debido a que incluyen el uso de una columna resistente a alta presión con un portador 1.7 mm y una bomba con una presión máxima de 100 MPa. Esto resulta en un menor tiempo de medición, mejor sensibilidad y alta precisión del pico que con HPLC en tándem, Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE. UU.) y otras empresas entre ellas Shimadzu Corporation (Kyoto, Japón) desarrollaron un equipo de UPLC, que puede ser utilizado con presiones superiores a 100 MPa. A pesar de estas mejoras significativas en técnicas de cromatografía de líquidos, la capacidad máxima y la estabilidad todavía no son suficientes para el análisis simultáneo de metabolitos hidrófilos. Todavía hay oportunidades de mejora en este ámbito de la investigación.

6.2 Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE/MS)

La electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas, por sus siglas en inglés (CE/MS) se utilizó para la metabolómica por el grupo de Hieger y Soga en 2000. Ellos desarrollaron un método para la detección de aminoácidos sin derivatización, así como un sistema para el análisis de compuestos intermediarios de la vía glucolítica, vía de la pentosa fosfato, ciclo de los ácidos cítricos, ácidos carboxílicos, ácidos carboxílicos fosforilados, sacáridos fosforilados, los nucleótidos, y la nicotinamida etc., se analizó con éxito la coenzima adeninflavina (FAD) de las vías: glucólisis y del ciclo de ácidos tricarboxílicos (Soga y Heiger, 2000).

Para analizar estos metabolitos aniónicos, se requiere de un flujo electro-osmótico que se mueven desde el cátodo al ánodo. Soga et al., (2002). Utilizaron el capilar con recubrimiento especial (SMILE (+)) para resolver este problema. Debido a que los iones multivalentes tales

como nucleótidos y CoA se adsorben sobre la superficie de la pared interna del capilar SMILE (+), esta técnica de CE/MS es asistida por presión alterna utilizando un capilar DB1 que es un capilar recubierto con polímeros no cargados (Soga et al., 2003).

CE/MS es superior en comparación con HPLC/MS en términos de capacidad de separación debido a que afecta menos la MS en comparación con otros métodos. Sin embargo, la baja repetibilidad es la principal desventaja de CE/MS, que es causado principalmente por la variación en el tiempo de migración ya que es fácilmente influenciada por los cambios de temperatura. Como el método desarrollado por (Soga et al., 2002), requiere una combinación de dos métodos para el estudio de los metabolitos aniónicos

Harada, Fukusaki, y Kobayashi, (2006); Harada, et al., (2008), desarrollaron un método de análisis más completo para los metabolitos aniónicos. La característica de este método es la posición de los polos en la electroforesis capilar, donde la entrada del capilar es en el ánodo y la toma de corriente en el cátodo, se invierte con respecto al análisis de CE convencional. Además, un capilar de sílice fundida ordinaria fue elegida en lugar de un capilar recubierto de polímero catiónico específico (capilar SMILE (+)). Debido al alto pH del electrolito, el flujo electro-osmótico excede la movilidad electroforética de todos los metabolitos de destino. Además, su método supera la adsorción de metabolitos aniónicos con el capilar porque la superficie del capilar de sílice fundida tiene la carga negativa, por lo tanto, la mayoría de los aniones migran hacia la MS de manera simultánea (2006). También tuvieron éxito en la mejora de la reproducibilidad y la sensibilidad, y en la reducción de tiempo de análisis, mediante el uso de un capilar sulfonado y monitoreo de reacción múltiple (MRM) (2008). Subsecuentemente (Soga et al., 2009), examinaron los materiales que constituyen el electro pulverizador, donde encontraron que la sensibilidad se mejora mediante el uso de platino.

Un ejemplo de metabolómica basada en CE/MS es el análisis de metaboloma de saliva obtenido a partir de 215 individuos realizadas por (Sugimoto et al., 2010) Sus resultados demostraron que los metabolitos de saliva pueden ser biomarcadores alternativos para la detección de cánceres oral, mama y de páncreas.

6.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC/MS

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, cuyas siglas en inglés son: GC-MS, es una técnica muy adecuada para el análisis integral, ya que combina una alta eficacia de separación con la versatilidad, selectividad y sensibilidad de la detección de masas.

Casi todas las aplicaciones de la metabolómica basada en GC combinan GC con detección MS mediante ionización de electrones (EI). Como la respuesta de exploración completa en el modo EI es aproximadamente proporcional a la cantidad de compuesto inyectado, es decir, independiente del compuesto más o menos, todos los compuestos son adecuados para el análisis de GC y se detectan indiscriminadamente. Por otra parte, los problemas con la supresión de iones de compuestos coeluidos como se observa en LC-MS están prácticamente ausentes en GC-EI-MS.

Las ventajas de GC/MS son la capacidad de pico alto, excelente repetitividad del tiempo de retención, y las bibliotecas de compuestos fácilmente disponibles, que permiten la identificación de compuestos sin utilizar compuestos estándar. GC/MS requiere derivación de muestras cuando los objetivos son compuestos no volátiles, ya que estos tienen que ser calentado a estado gaseoso. Metabolitos hidrófilos de bajo peso molecular (por ejemplo, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.) también se pueden analizar mediante la combinación de dos métodos de derivatización. Clorhidrato de metoxamina y N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida, se utilizan para la primera y segunda derivación, respectivamente (Pongsuwan et al., 2007).

Si los metabolitos de destino son compuestos de alto peso molecular que no se volatilizan, incluso después de la derivatización, es necesario complementar el análisis con otros instrumentos. Este es también el caso de compuestos que no son resistentes a la degradación por el calor.

La identificación de compuestos usando GC/MS es relativamente fácil en comparación con otras técnicas analíticas porque el espectro de masa única de cada compuesto puede obtenerse de forma coherente. Esto se logra mediante el uso de ionización de electrones (EI), que es actualmente el método de ionización más comúnmente utilizado en GC/MS debido a su robustez y alta repetibilidad.

Además, un gran número de compuestos se puede identificar fácilmente mediante biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, <https://www.nist.gov/data>). La precisión de la identificación de los picos se ha mejorado significativamente con la reciente creación de un sistema de identificación de picos semiautomatizado (Tsugawa et al., 2011).

Así mismo, la asignación de la identidad de los picos a través de una base de datos de espectros de masa es sencilla, debido a los patrones de fragmentación extensos y reproducibles obtenidos en modo de barrido completo. Igualmente, el patrón de fragmentación se puede utilizar para identificar o clasificar metabolitos desconocidos.

Metabolitos de peso molecular bajo y volátiles, pueden ser muestreados y analizados directamente, por ejemplo, en el análisis del aliento a menudo se utiliza un enfoque directo y sin derivatización. Sin embargo, muchos metabolitos contienen grupos funcionales polares y son térmicamente lábiles a las temperaturas requeridas para su separación o no son volátiles en absoluto. Por lo tanto, se necesita derivatización antes del análisis GC para ampliar el rango de aplicación de los métodos acoplados a cromatografía de gases.

La mayoría de los métodos GC, se basan en la derivatización con un agente oxidación seguida de sililación, o únicamente sililación. Como agente de sililación son los reactivos de derivatización más versátiles y universalmente aplicables, estos son los más adecuados para el análisis integral de GC-MS. Sólo unos pocos autores utilizan una derivatización alternativa, por ejemplo, cloroformatos, o ninguna derivatización en absoluto (Chen et al., 2011).

Uno de los últimos avances en el sistema de GC es el desarrollo de una cromatografía de gases bidimensional/sistema de espectrometría de masas (GC x GC/MS). Este sistema proporciona un aumento significativo de la capacidad máxima, así como la resolución y sensibilidad, en comparación con GC/MS (Lee, Bartle, y Lewis, 2001).

Waldhier et al., (2011), han utilizado GC x GC/MS para mejorar la resolución analítica de enantiómeros de aminoácidos en suero y orina. (Kouremenos et al., 2010), mostraron que GCxGC/MS es útil para la separación de ácido orgánico isoméricos y el descubrimiento de biomarcadores. Además, compararon la combinación columna polar a no-polar y no-polar a polar. El método se aplicó al análisis de orina de 19 pacientes con insuficiencia renal. En comparación con los pacientes sanos, los niveles de D-Alanina, Valina, Prolina, Treonina, Ácido Aspártico y Asparagina aumentaron significativamente.

7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA ESTUDIOS METABOLÓMICOS.

7.1 Principios básicos de la espectrometría de masas (MS)

La espectrofotometría en masas MS es una herramienta analítica para medir las proporciones de masa a carga (m/z) de los iones con el fin de determinar su peso molecular (PM). Este proceso consta de tres pasos:

- I. la conversión de las moléculas en iones en fase gaseosa por la fuente de ionización
- II. la separación de iones por sus valores de m/z a través de campos magnéticos o eléctricos a través de un componente, es decir analizador de masas
- III. la detección de los iones separados como carga eléctrica con la obtención de señales proporcionales a la abundancia de cada especie.

En muchas configuraciones de análisis adicional es factible la espectrometría en masas tándem (MS/MS). En el modo MS/MS, el instrumento utiliza el primer analizador de masas para seleccionar un solo ion que se dispara posteriormente en una celda de colisión, donde choca con las moléculas de gas como el argón (por ejemplo, la disociación colisión-inducida, CID) que causan la fragmentación del ion.

Los múltiples fragmentos de iones son luego analizados en el analizador de masas de la segunda etapa para dar información precisa sobre las características estructurales del ion parental. En un espectro de MS, el eje "X" representa los valores de m/z , mientras que el eje "Y" indica el recuento total de iones.

Como esta tecnología analítica extraordinaria puede proporcionar información clave acerca de analitos, incluyendo su estructura, la pureza y composición, en la actualidad se utiliza de forma rutinaria, ya sea en la industria y el campo de investigación para diversos fines, tales como el descubrimiento de medicamentos, diagnósticos y análisis de biológicos

Debido al hecho de que los análisis de MS se realizan con poca frecuencia en un solo compuesto, el estudio de mezclas complejas requiere etapas de purificación anteriores. Al hacerlo, los espectrómetros de masas están acoplados con dispositivos de separación, tales como electroforesis capilar (CE), cromatógrafo de gases (GC) y cromatografía líquida (LC) (por ejemplo, CE-MS, GC-MS y LC-MS). Estas son configuraciones de sistemas de espectrometría de masas de común elección, un módulo de pre-fraccionamiento por lo general se coloca en línea con un instrumento de espectrómetro de masas. Un espectrómetro de masas consiste en tres elementos fundamentales:

- I. Una fuente de iones, que ioniza las moléculas a analizar;
- II. Un analizador de masas (o combinación de analizadores), que puede ser utilizado como celda de colisión para la fragmentación y/o clasificación con relación a su masa-carga de los iones fragmentados;
- III. Un detector que amplifica y cuantifica las señales resultantes de generación de los datos finales que consta de espectros MS y MS/MS;
- IV. Y herramientas bioinformáticas para el procesamiento de datos (Girolamo et al., 2013).

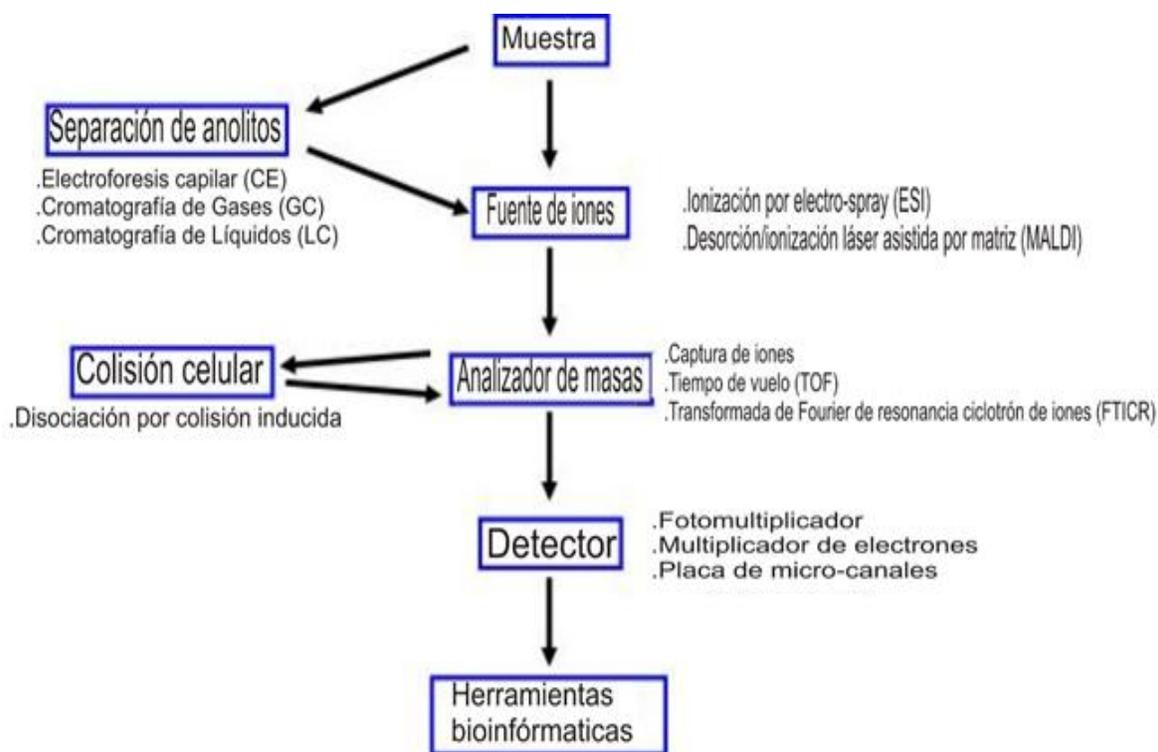


Figura 6: La espectrometría de masas y sus diferentes componentes para un análisis metabolómico. (Girolamo et al., 2013).

7.2 Métodos de ionización

7.2.1 Ionización electrónica (IE)

El primer componente de un espectrómetro de masas es la fuente de iones, donde se producen especies cargadas. En la técnica de ionización suave, hoy en día ampliamente utilizada, una baja cantidad de energía interna se transmite a las moléculas durante el proceso de ionización. Los electrones son producidos por emisión termiónica desde un filamento de tungsteno o renio. Una corriente típica de un filamento es del orden de 1×10^4 amperios. Estos electrones salen de la superficie del filamento y son acelerados hacia la cámara fuente de iones la cual mantiene a una potencial positivo (igual al voltaje de aceleración). Los electrones adquieren una energía igual al voltaje entre el filamento y la cámara fuente (típicamente 70 electro voltios, eV). La trampa de electrones se mantiene a un potencial fijo positivo con respecto a la cámara fuente. Una porción del haz de electrones golpeará la trampa de electrones produciendo la corriente de la trampa. Esta es usada como un circuito de retroalimentación para estabilizar el haz de electrones Figura 7. (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

Un imán permanente se coloca a lo largo de la cámara fuente para producir un flujo magnético paralelo al haz de electrones. Esto causa que el haz de electrones tome una dirección de espiral desde el filamento hasta la trampa, aumentando la probabilidad y la eficiencia para ionizar el analito. Las moléculas de analitos gaseosos son introducidas en la vía del haz de electrones en donde son ionizados por interacciones electrónicas con el haz de electrones. La ionización puede realizarse también por impacto directo de un electrón con una molécula de analito.

La repulsión de iones con carga positiva y la excitación negativa del voltaje actúan conjuntamente para producir un campo eléctrico en la cámara fuente tal que los iones saldrán de la cámara a través de la ranura de salida de iones. Los iones son dirigidos por medio de varios lentes de enfoque y centrados, y son enfocados hacia la ranura de salida de la cámara. Es entonces cuando los iones pueden ser analizados por su masa y carga (m/z) (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

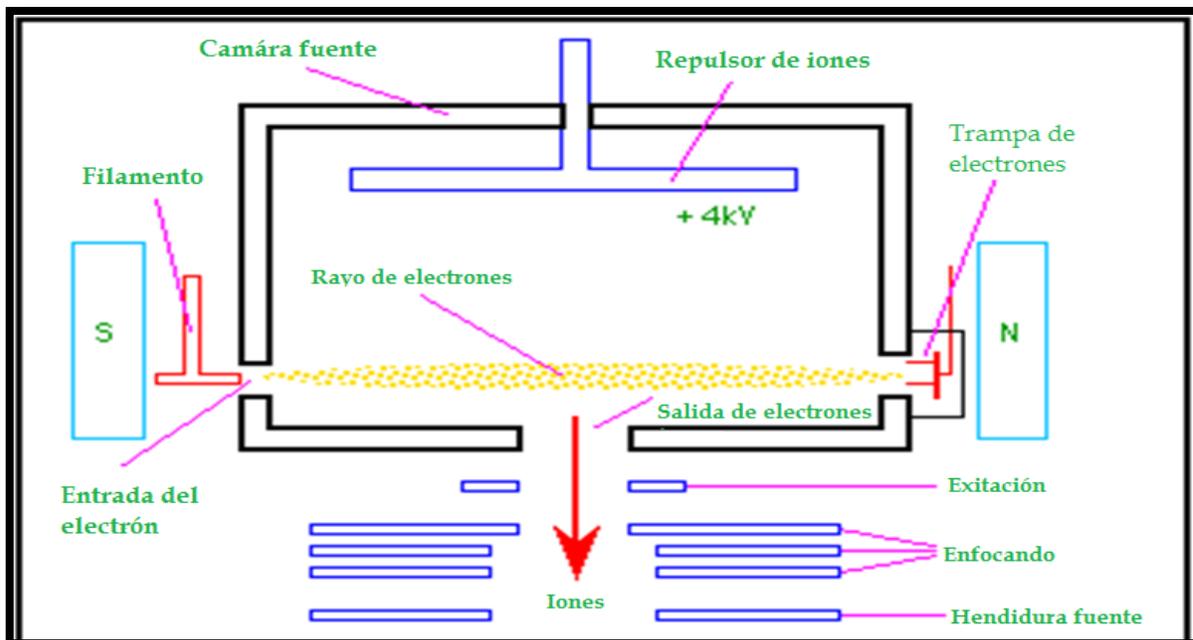


Figura 7: Esquema de ionización electrónica. (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

7.2.2 Bombardeo Rápido de Átomos (FAB) y Espectrometría de Masas de Ion Líquido Secundario (LSI).

Las técnicas de FAB y LSI consisten en el bombardeo de una mezcla sólida de analito con la matriz por un rápido haz de partículas. La matriz está formada por especies pequeñas orgánicas (glicerol o alcohol-3-nitrobencílico) las cuales son usadas para mantener una superficie homogénea “fresca” para el bombardeo, por lo tanto, extendiendo el tiempo de vida espectral y acentuando la sensibilidad. En FAB, el haz de partículas es un gas inerte neutral, comúnmente Ar o Xe, con energías de bombardeo de 4-10keV, mientras que en LSI, el haz de partículas es un ion, típicamente Cs^+ , con energías de bombardeo de 2 – 30 keV. El haz de partículas incide en la superficie del analito en donde transfiere mucha de su energía a los alrededores, generando colisiones e interferencias momentáneamente.

Algunos compuestos son expulsados fuera de la superficie en forma de cationes y aniones en este proceso, y estos iones secundarios liberados son luego extraídos de la fuente y analizados por un espectrómetro de masas. La polaridad de la fuente de extracción puede ser cambiada dependiendo que compuesto se esté analizando (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

La Figura 8, muestra un esquema que representa una fuente Rápida de Bombardeo Atómico operando en modo de ion positivo. El haz atómico rápido incide en la superficie del analito y matriz en donde produce una liberación de iones secundarios. Los iones positivos son extraídos de la fuente hacia el espectrómetro de masas. Las técnicas FAB y LSI son comparativamente técnicas de ionización suave, y por lo tanto son adecuadas para compuestos de baja volatilidad, que producen típicamente grandes picos para las especies iónicas pseudo-moleculares $[M+H]^+$ y $[MH]^-$, conjuntamente con fragmentos iónicos

estructuralmente significativos y algunos agregados iónicos de mayor peso molecular y/o dímeros (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

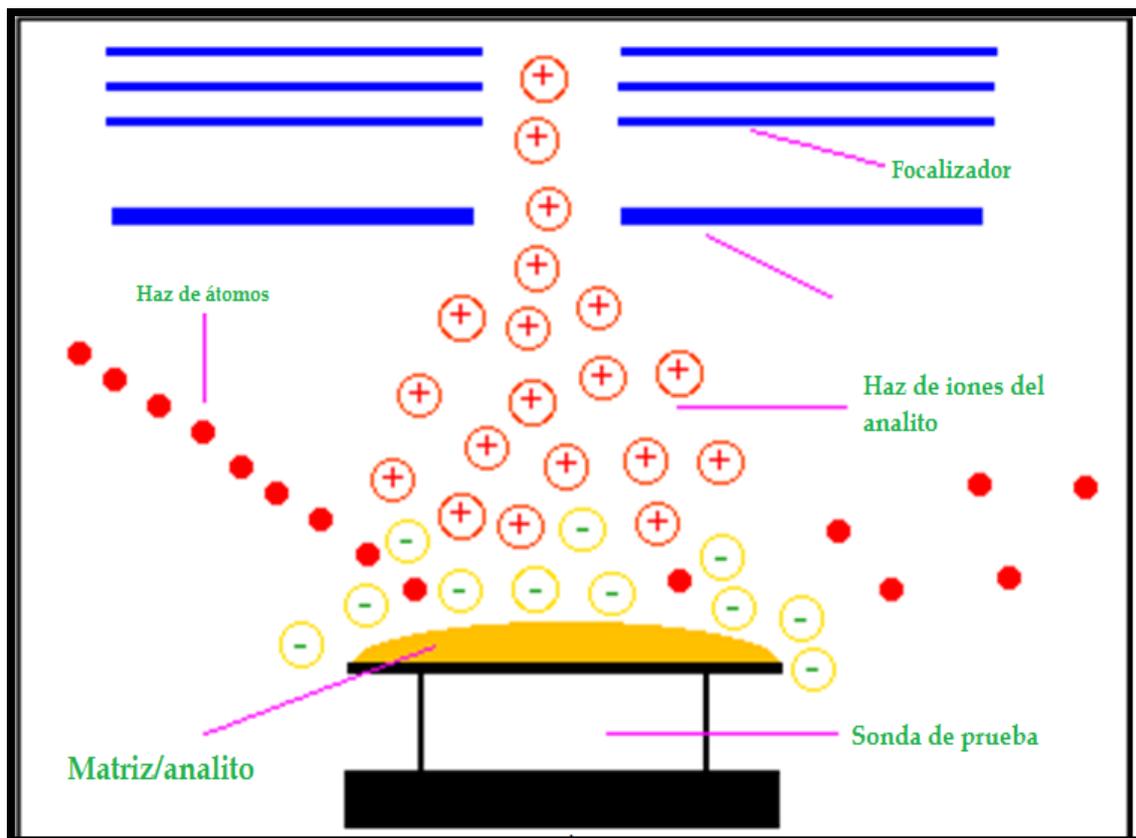


Figura 8: Esquema de bombardeo rápido de átomos (FAB). (Ayala-Bretón & Regil-Hernández, 2004).

7.2.3 Ionización por Electro-aerosol

La producción de iones por evaporación de gotas cargadas eléctricamente obtenida mediante asperjado o burbujeo se conoce desde hace siglos, pero solo recientemente se descubrió que estos iones pueden contener más de una carga. Un modelo de la formación de iones en ESI, se describe a continuación:

Grandes gotas cargadas se producen por “nebulización”; por ejemplo, cuando se fuerza a pasar la solución del analito a través de una aguja, donde al final de ésta se aplica un potencial, el potencial usado es suficientemente alto para dispersar la solución que sale en pequeñas gotas finas cargadas todas a la misma polaridad.

- ✓ El solvente se evapora, disminuyendo el volumen de la gota y aumentando la concentración de la carga en la superficie de la gota. Eventualmente, en el límite de Rayleigh, la repulsión culómbica supera la tensión superficial de la gota y ésta explota.

- ✓ Esta explosión culómbica forma una serie de gotas más pequeñas y menos cargadas. El proceso de disminución de volumen seguido de la explosión se repite hasta que se logran formar iones individuales cargados del analito “puro”.
- ✓ Las cargas están estadísticamente distribuidas en todos los sitios de carga disponibles del analito, dando lugar a la posible formación de múltiples iones cargados en las condiciones correctas.
- ✓ Al aumentar la velocidad de evaporación del analito introduciendo un flujo de gas desecante a contracorriente a los iones asperjados, aumenta el grado de carga múltiple.

Si se disminuye el diámetro capilar y se disminuye el flujo de la solución del analito, como en ionización nano aerosol, se producirán iones con una proporción más alta de m/z (es una técnica de ionización más suave) que los producidos por un ESI convencional y son de mayor utilidad en el campo de bio-análisis (Figura 9) (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

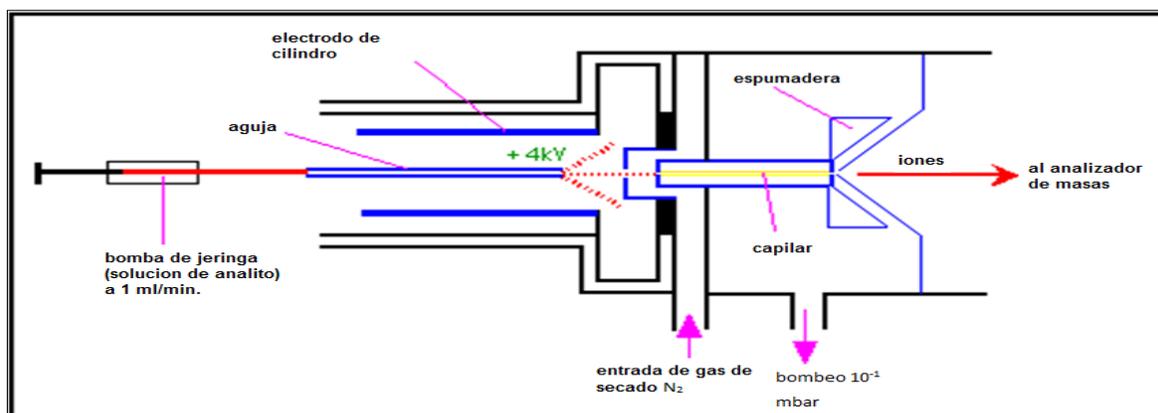


Figura 9: Esquema de un ionizador por electro aerosol (ESI). (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

7.2.4 Desorción/Ionización láser asistida en matriz (MALDI)

7.2.4.1 Desorción láser

El estudio de los compuestos polares siempre ha sido un problema para la espectrometría de masas. Se demostró a principios de la década de 1960 que la radiación de muestras orgánicas de bajo peso molecular con un pulso láser de alta intensidad produce iones que pueden ser analizados por su masa.

Desde estos primeros experimentos, la desorción láser (LD) ha sido ejecutada con un amplio rango de condiciones instrumentales y una gran variación en la calidad de los resultados. La aplicación de LD al análisis de macromoléculas biológicas polares no volátiles, macromoléculas orgánicas y polímeros fue un paso importante en el desarrollo de LD. Sin embargo, estos experimentos revelaron tener un límite máximo para el peso molecular de 5-10 kDa.

El requisito primario para una Desorción Láser exitosa es que la transferencia de energía del rayo láser hacia el analito debe ocurrir en el menor tiempo posible para prevenir la descomposición de las moléculas térmicamente lábiles del analito. El límite del peso molecular es probablemente debido a que la energía necesaria para provocar la excitación resonante y la transferencia exitosa de energía es más grande que la energía de disociación del analito. Por lo tanto, el analito no se desorbe quedando intacto en una cantidad significativa dando como resultado un espectro de fragmentos de bajo peso molecular solamente.

Otra restricción importante de la ionización LD es la corta duración del destello iónico que se produce después del pulso láser. Una consecuencia de esto es que la técnica no es adecuada para instrumentos de análisis de barrido en sector o en cuadrúpolos. Esto indica que LD es particularmente adecuada para espectrometría de masas de Tiempo de Vuelo (MS/TOF) (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

7.2.4.2 Desarrollo de la Desorción/Ionización asistida en Matriz (MALDI)

En 1987, se descubrió que el uso de una matriz de desorción láser (LD) podría liberar la limitación restrictiva del peso molecular de la técnica. Los requisitos de la matriz son que tenga una fuerte absorbancia en la longitud de onda láser y que tenga una masa molecular suficientemente baja para poder sublimarse. El analito, a baja concentración, se dispersa uniforme y completamente en la matriz sólida o líquida, depositada al final de una sonda o en una placa metálica e introducida al pulso de rayo láser.

Un analito a baja concentración tiene ventajas importantes:

- La eficiencia de la transferencia de energía del láser al analito (a través de la matriz) aumenta, mientras que los problemas asociados con la disociación del analito se reducen significativamente.
- La asociación de las moléculas de analito para formar agregados de alto peso molecular también se reduce y se cree que ciertas matrices específicas pueden inclusive acentuar la formación de iones.

Mecanismo de la Desorción iónica

El mecanismo de la técnica MALDI no se ha comprendido totalmente, pero se cree que funciona de la siguiente manera:

- (i) La formación de una “Solución Sólida”.

Las moléculas de analito están completamente distribuidas en toda la matriz de manera que se encuentran aisladas unas de otras. Esto es necesario para que la matriz forme una “solución sólida” (cualquier solvente líquido usado en la preparación de la solución se retira cuando la mezcla se seca antes del análisis) (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

- (ii) Excitación de la Matriz.

Algo de la energía láser incidente en la solución sólida es absorbida por la matriz, produciendo rápidas vibraciones y causando una desintegración local de la solución sólida formando agregados compuestos de moléculas individuales de analito rodeadas de moléculas de matriz neutra y excitada. Las moléculas de la matriz se evaporan de estos agregados dejando atrás la molécula excitada del analito.

(iii) Ionización del Analito.

Las moléculas de analito pueden ionizarse por simple protonación por la matriz excitada fotónicamente, dando lugar a la formación del compuesto típico de tipo $[M+X]^+$ (donde $X=H, Li, Na, K, \text{ etc.}$). Algunos compuestos con carga múltiple, dímeros o trímeros se pueden formar también. Se producen aniones por las reacciones con des protonación del analito por la matriz para formar $[MH]$ y por las interacciones con los fotoelectrones para formar iones moleculares radicales $[M]$.

Estas reacciones de ionización ocurren en las primeras decenas de nanosegundos después de la radiación, y dentro de la nube de desorción inicial de matriz/analito. Es en esta forma en que se produce el espectro característico MALDI, dando lugar típicamente a grandes señales para compuestos del tipo $[NM+X]n^+$ ($N * n$) (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

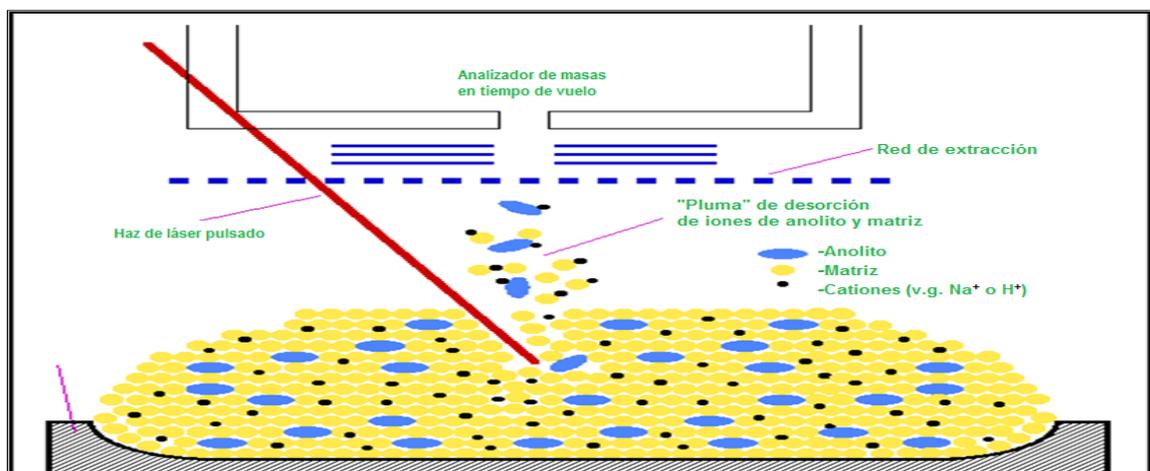


Figura 10: Esquema de adsorción/ desorción láser asistida por matriz (MALDI). (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004)

Un analizador de masas es el componente del espectrómetro de masas dedicada a la separación de iones de acuerdo con valores masa/carga (m/z). Diferentes principios físicos se pueden emplear para la separación de iones: por lo general los analizadores tradicionales accionados eléctricamente (es decir, los sectores magnéticos) emplean un campo magnético.

Actualmente, los analizadores ampliamente usados son cuadrúpolos (Q), trampa de iones cuadrúpolos (QIT), el tiempo de vuelo (TOF), y resonancia ciclotrón de iones transformada de Fourier (FT-ICR) (Figura 11). Las características de un analizador de masas se determinan por varios parámetros:

- I. resolución (la eficiencia de separación de iones, a través de su relación de m/z)
- II. exactitud de masa (la confianza en los valores de m/z)
- III. rango de masas
- IV. adquisición de MS/MS y la precisión (la capacidad de reproducir una medición de la masa de un compuesto dado) (Girolamo et al., 2013).

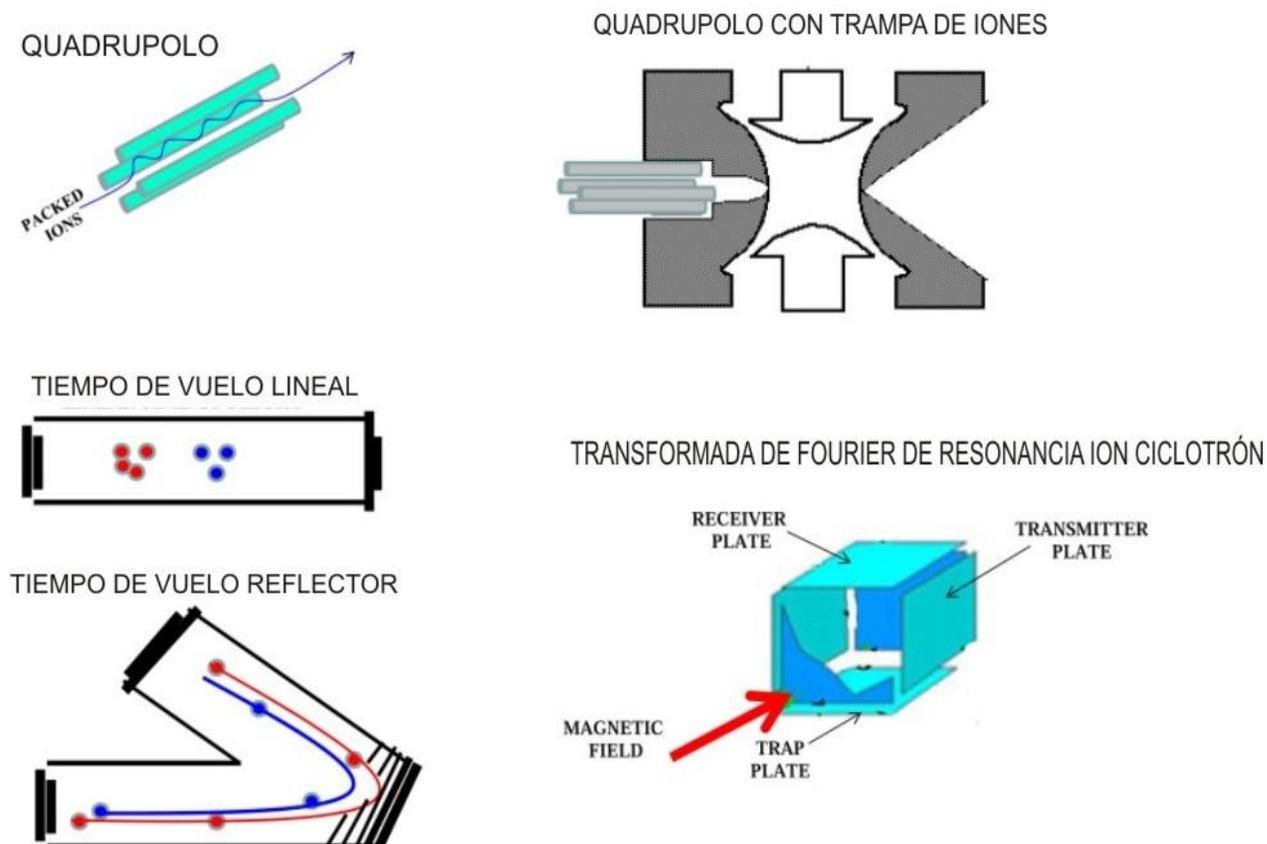


Figura 11: Equipos para el análisis por espectrometría de masas.(Girolamo et al., 2013).

7.2.5 Cuadrúpolos (Q)

El analizador de masas Q se introdujo en el campo de la investigación en la década de 1950 por el Premio Nobel P. Wolfgang. Se compone de cuatro barras paralelas de metal, donde se aplica un voltaje directo a dos de estas barras, mientras que los otros dos están vinculados a un potencial de radiofrecuencia alterna. Los voltajes aplicados determinan la fuga de iones entre las cuatro barras. Específicamente corriente directa y voltaje alterno, permiten que los iones que se caracteriza por una cierta relación masa-carga pasen al analizador. Por último, el espectro de masas se registra mediante la adquisición de los iones que pasan a través del filtro cuadrúpolos cuando se varían las tensiones (Girolamo et al., 2013).

Wolfgang también desarrolló el analizador de masas cuadrúpolos con trampa de iones QIT. Como se muestra en la FIGURA 11, Los iones, de la fuente de instrumento, entrar en la trampa y se encuentran atrapados en el interior de tres electrodos hiperbólicos que representan el electrodo de anillo, la entrada y salida electrodos encapuchados. Diferentes valores de tensión se aplican a estos electrodos, determinando así un hueco en el que están atrapados los iones, con la movilidad de iones en función de las tensiones aplicadas y relaciones m/z individuales. Los iones luego son centrados sobre el detector por un cambio gradual de los potenciales, produciendo el espectro de masas

7.2.6 Resonancia ciclotrón de iones con Transformada de Fourier (FT-ICR)

En 1929, Lawrence inventó el ciclotrón, un aparato para la aceleración de partículas nucleares a muy altas velocidades sin necesidad de utilizar altas tensiones. En 1974, Marshall y Comisarow fusionan el rendimiento del sistema de ciclotrón rápida FT, lo que permite el ciclotrón para convertirse en un espectrómetro de masas de alto rendimiento. El de ultra alta resolución FT-ICR consta de una fuente de iones ESI, para transferir iones en el campo magnético y una celda ICR o trampa de Penning (Girolamo et al., 2013).

Los iones son atrapados, expuesto al campo magnético, forzado en su movimiento ciclotrón, analizados y finalmente detectados. El uso de una trampa de Penning aumenta el tiempo de detección y por lo tanto la sensibilidad y la resolución. La más reciente adquisición de la familia FT-MS es el analizador Orbitrap. Fue inventado por Alexander Makarov como una modificación QIT, donde Orbitrap trabaja con campos electrostáticos mientras que el QIT utiliza un campo eléctrico oscilante dinámico típicamente en ~ 1 MHz. El Orbitrap se presentó al público en una conferencia de la Sociedad Americana para la espectrometría de masas en 1999 y rápidamente hizo su debut en la corriente principal de MS en 2005 como un detector de masas preciso y compacto. Los espectrómetros de masas Orbitrap difieren fundamentalmente de la FT-ICR-MS debido a su mecanismo integrado de excitación por la inyección (Makarov, 2004).

7.2.7 Espectrómetro de masas en tándem

El término “tándem” indica el uso de una segunda etapa de análisis de masas en el mismo experimento. Esto da lugar a la capacidad de estudiar selectivamente iones específicos en una mezcla compleja para obtener información estructural sobre ese ion. Acoplando dos analizadores, separados por una cámara de colisiones se puede obtener más información de la molécula. Como se muestra en la TABLA 2, varias combinaciones de analizadores de masas se pueden montar en un espectrómetro de masas en tándem comercial, la obtención de analizadores de masas conectadas en serie. En estos espectrómetros de masas híbridos, el aislamiento de iones y de exploración son realizadas por el primero y los analizadores finales, mientras que el segundo analizador es una celda de colisión que permite la fragmentación de iones (Girolamo et al., 2013).

Como se muestra en la Figura 12, para principales modos de exploración se utilizan, sobre todo:

- i. escaneo de iones-producto
- ii. escaneo de iones-precursores
- iii. escaneo pérdida neutral
- iv. reacción de monitorización seleccionada (Girolamo et al., 2013).

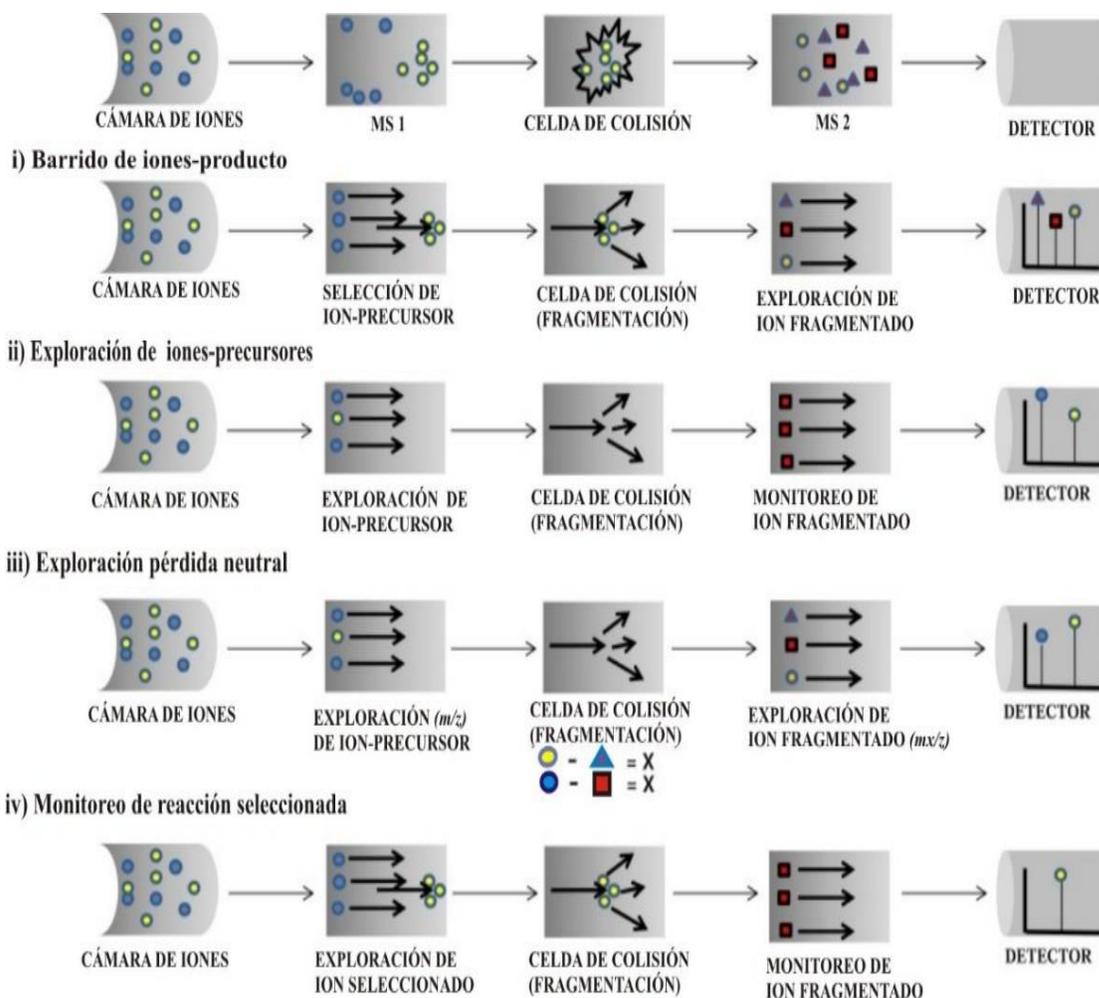


Figura 12: Reacción de monitoreo múltiple (Girolamo et al., 2013).

En la (i), el analizador selecciona un ion precursor de interés que está fragmentado en la celda de colisión, por lo tanto, la producción de los iones-producto son analizados por el segundo analizador de masas. Durante la (ii) del proceso, el segundo analizador se centra en un ion-producto particular de interés después de la colisión, mientras que el primer analizador de masas analiza las relaciones m/z . Por el modo de exploración iones-producto, se detectan todos los iones-precursores.

En la (iii), el primer y segundo analizadores de masas operan simultáneamente con un desplazamiento de “x” masa constante.

Cuando un ion-precursor se transmite a través del primer analizador de masas, este ion se registra si se produce un ion-producto correspondiente a la pérdida de un fragmento neutro de “x” desde el ion-precursor después de la celda de colisión. En la (iv) el monitoreo de reacción del ion seleccionado, el primer y segundo analizadores de masas, ambos centrados en los iones seleccionados. En esta modalidad se obtiene una alta especificidad y alta sensibilidad por un ciclo de trabajo para supervisar las transiciones de interés. En el caso del primer o segundo analizador de masas o ambos, múltiples iones se establecen para monitorizar múltiples reacciones, de ahí el término “monitoreo de reacción múltiple” (MRM) es ampliamente utilizado y su técnica es ampliamente empleada para el análisis cuantitativo de la especie molecular individual mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada MS (Girolamo et al., 2013). La espectrometría de masas en tándem puede clasificarse en dos tipos:

Tándem en espacio:

- Cuadrúpolos en tándem
- Sector en tándem
- Sector- cuádruplo

Tándem en tiempo:

- Trampa iónica
- Transformada de Fourier (Ayala-Bretón y Regil-Hernández, 2004).

La TABLA 2 muestra una visión general de los espectrómetros de masas y sus especificaciones técnicas, ofrecidos por los principales fabricantes en configuraciones LC-MS y MALDI-MS. Estas innovadoras soluciones ofrecen un avance extraordinario en la resolución de masa, masa de precisión y velocidad de adquisición. La resolución ICR y exactitud de masa son los más altos, en comparación con todos los analizadores modernos, seguido de analizadores basados en TOF–Orbitrap. Y, a pesar de que los tiempos de adquisición son más largos por el mayor número de registro de iones. Sin embargo, el aumento de la velocidad de adquisición de analizadores de masas FT es posible, pero se trata de una resolución reducida significativamente en comparación con los mejores valores reportados para velocidades de exploración lentas, como se muestra en la TABLA 2 (Girolamo et al., 2013).

7.2.7.1 Tiempo de vuelo (TOF)

Los analizadores de masas TOF tienen la velocidad más alta de escaneo entre todos los analizadores de masas y su rango de m/z es teóricamente ilimitado en configuración lineal MALDI/TOF (cientos de miles Da), a pesar de la m/z , la gama de analizadores basados en TOF en los sistemas LC-MS se limita a varias decenas de miles.

En general, el analizador Q es el más simple y barato, seguido de la TI y de TI lineal. El analizador TOF es el analizador de masas de alta resolución más barata, con características notables en términos de velocidad de adquisición, rango m/z y relativamente buena resolución y exactitud de masa. Los analizadores FT e ICR-MS tienen los mejores parámetros de funcionamiento, pero la complejidad fundamental implica aumento de los costos de inversión.

Tabla 2: Espectrómetros de masas híbridos comunes con sus parámetros técnicos. (Girolamo et al., 2013).

| Analizadores de masa combinados | Nombre comercial del instrumento | Precisión de masa (ppm) | Resolución ($\Delta m/z$) | Velocidad de adquisición (Hz) |
|---------------------------------|--|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Q q Q | LCMS-8030, Shimadzu | - | 0.7 | 15 |
| | 6490, Agilent | - | 0.4 | 10 |
| | Triple Quad 5500, AB SCIEX | - | 1 | 12 |
| | TSQ Vantage, Thermo Scientific | 5 | 0.07 | 5 |
| | XEVO TQ-S, Waters | - | 1 | 10 |
| Q-lineal trampa iónica | QTRAP 5500, AB SCIEX | - | 0.1 | 20 |
| | QTRAP 6500, AB SCIEX | - | 0.05 | 25 |
| Q-TOF | maXis 4G, Bruker Daltonics | < 0.6 | 0.02 | 30 (MS), 10 (MS/MS) |
| | micrOTOF-Q II, Bruker Daltonics | < 2 | 0.05 | 20 |
| | XEVO G2 QToF, Waters | < 1 | 0.04 | 30 |
| | 6550 QTOF, Agilent | < 1 | 0.02 | 50 |
| | TripleTOF 5600, AB SCIEX | 0.5 | 0.03 | 50 (MS), 100(MS/MS) |
| Q-IMS-TOF | Synapt G2-S HDMS, Waters | < 1 | 0.02 | 30 |
| | MALDI Synapt G2-S HDMS, Waters | < 1 | 0.1 | - |
| Q-Orbitrap | Q Exactive, Thermo Scientific | < 1 | 0.001 | 12 |
| Q-ICR | SolariX 15T, Bruker Daltonics | < 0.25 | 0.0002 | - |
| LIT-ICR | LTQ FT Ultra 7T, Thermo Scientific | < 1 | 0.0005 | 2 |
| LIT-Orbitrap | Orbitrap Elite, Thermo Scientific | < 1 | 0.002 | 8 |
| | MALDI LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific | < 2 | 0.004 | - |
| TOF/TOF | TOF/TOF 5800 System, AB SCIEX | < 1 | 0.07 | - |
| | UltrafleXtreme, Bruker Daltonics | < 1,5 | 0.08 | - |
| | Axima Performance, Shimadzu | < 5 | 0.2 | - |
| TOF-Trampa iónica | LCMS-IT-TOF, Shimadzu | 3 | 0.1 | 10 |
| | Axima Resonance, Shimadzu | 3 | 0.3 | - |

8 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La RMN es una técnica espectroscópica que estudia la absorción y emisión de radiación electromagnética por los núcleos de ciertos átomos bajo la influencia de un campo magnético. Los núcleos atómicos son entidades cargadas que poseen un movimiento de espín y como consecuencia, originan un campo magnético, dependiente de la dotación nuclear, que se puede caracterizar por un vector momento magnético (μ) cuya dirección es aleatoria. Se trata pues de un sistema con niveles de energía degenerados independientes de la orientación del vector μ . Al aplicar un campo magnético de intensidad B_0 en una determinada dirección (Z), la interacción con el núcleo en movimiento (espín) da lugar a que el momento magnético μ efectúe un movimiento de precesión. La frecuencia de precesión ν_0 (frecuencia de Larmor) depende de γ (relación giro magnética del núcleo) y de B_0 (intensidad del campo magnético aplicado) La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica analítica ampliamente usada en metabolómica debido a que requiere solo una paso para la preparación de la muestra, con naturaleza no destructiva, alta robustez, reproducibilidad y aporta información estructural de los metabolitos (Bharti y Roy, 2014).

8.1 Técnica RMN-1D

8.1.1 Experimento de un solo pulso

El experimento de un solo impulso consiste en un retardo de relajación y un pulso duro de 90° seguido por el tiempo de adquisición. Las muestras de fluidos corporales que tienen agua en concentración molar dan lugar a un pico muy intenso en el espectro que interfiere con la observación de los metabolitos en concentración milimolares (mM). Esto se conoce como un problema de rango dinámico en espectroscopia de RMN. Para superar esto, se requieren técnicas de RMN de supresión de disolventes. Se han desarrollado varias técnicas de supresión de disolventes y se han utilizado para la supresión de la señal de disolvente en muestras de metabolómica. Estos incluyen la presaturación, WATERGATE (Liu et al., 1998; Piotto, Saudek, y Sklenář, 1992), WET (Smallcombe, Patt, y Keifer, 1995), excitación esculpida, PURGE (Simpson y Brown, 2005), etc. La pre-saturación es uno de los métodos más simples y comúnmente utilizados para la supresión de disolventes. En esta técnica, se aplica un pulso selectivo de baja potencia sobre la frecuencia del disolvente para saturar la señal de agua justo antes del pulso duro de 90° . Un único espectro de RMN de las muestras analizadas, es el primer y el paso básico más importante en las asignaciones metabólicas y la cuantificación de metabolitos, y por lo tanto debe ser registrado en parámetros experimentales bien optimizados para una mejor exactitud.

Información como multiplicidad, constante de acoplamiento, valores integrales, número de señales, intensidad relativa, etc., pueden ser extraídos desde un solo espectro de RMN- único pulso para el escaneo inicial de los metabolitos (Moco et al., 2007). El principal problema asociado con la técnica de pre-saturación es la supresión de las señales de iones

intercambiables con agua (-NH, -SH, -OH). Para medir tales señales, es preferible usar WATERGATE y pre-saturación de excitación esculpida.

8.1.2 Desacoplamiento mononuclear

El desacoplamiento mononuclear es una aplicación de radiación de baja potencia en un conjunto de frecuencias y observando sus efectos sobre las matrices de acoplamiento dentro del espectro de los mismos núcleos, es decir, el núcleo de desacoplamiento y el núcleo de observación son iguales. El desacoplamiento mononuclear de protones se aplica para la simplificación de espectros de RMN, patrones complejos asociados e identificación de parejas de acoplamiento en espectros de RMN (Gowda et al., 2006). Los investigadores usan experimentos de desacoplamiento mononuclear para identificar ácidos grasos estrechamente relacionados. Por ejemplo, Annarao et.al., utilizando experimentos de desacoplamiento mononuclear diferenciaron los ácidos linolénicos (18: 3n-6) de los ácidos linolénicos (18: 2n-6), en semillas en desarrollo de *Jatropha curcas* (Annarao et al., 2008).

8.2 Técnicas de RMN de dos dimensiones (RMN-2D).

8.2.1 Método 2D-J-resuelta

J-resuelta (JRES) es uno de los experimentos más importantes utilizados para la asignación de metabolitos sobre la base de sus constantes de acoplamiento y la simplificación de los espectros de protones utilizando cálculos de proyección 1D (Viant, 2003). El espectro 2D-JRES proporciona desplazamiento químico en la primera dimensión y valor J en la segunda dimensión. Por lo tanto, el valor J puede medirse con una mayor precisión para la superposición de resonancias en el cambio químico de la dimensión (Lindon; Nicholson y Holmes, 2011). Además, la suma de las proyecciones del espectro JRES proporciona un espectro 1D desacoplado de protones que puede explorarse más a fondo para el análisis de metabolómica rutinaria.

8.2.2 DQF-COSY (Espectroscopía de correlación filtrada de doble cuantía)

La COSY bidimensional mejora la precisión de las identificaciones metabólicas extendiendo la información de cambio químico a la segunda dimensión de frecuencia. Además de la resolución espectral, la RMN de COSY ayuda en la identificación de la red de spin asociada con los metabolitos mediante el acoplamiento J y, en consecuencia, ayuda en la identificación de los metabolitos. Las señales de metilo de lactato y treonina no se distinguen en 1,33 en un espectro dimensional. Sin embargo, los picos cruzados en el espectro de COSY para el lactato (1,33, 4,12 ppm) y treonina (1,33, 4,25 ppm) ayudan en su identificación y contribución a 1,33 picos de resonancia. DQF-COSY se prefiere sobre los experimentos de COSY normales porque los picos intensos solos en el DQF-COSY se suprimen y se mejora la resolución adyacente a los picos diagonales. El inconveniente de DQF-COSY es la reducción de la sensibilidad, lo que requiere más tiempo experimental (Bharti y Roy, 2014).

9 SOFTWARE PARA EL ANÁLISIS METABOLÓMICO

9.1 Bases de datos diseño e implementación

Los datos generados por experimentos metabolómicos basados en RMN y MS consisten en perfiles espectrales y/o cromatográfico que contienen miles de señales, que representan una “instantánea” del perfil metabólico de un estado biológico particular (Gomase et al., 2008). En cualquier experimento metabolómico basado en MS, por ejemplo, cada metabolito está representado por las siguientes características: relación masa/carga (m/z), la abundancia relativa o intensidad, y tiempo de retención (Brown et al., 2005; Katajamaa y Orešič, 2007).

Con miles de metabolitos que pueden ser detectados simultáneamente, estos conjuntos de datos requieren herramientas de software de procesamiento, software de visualización, herramientas estadísticas y bases de datos completas para el análisis de datos eficiente e interpretación. El flujo de trabajo de análisis de datos comienza con el procesamiento de datos, lo que implica la reducción de ruido, la detección de pico, la normalización, y la conversión de los datos procesados a un formato adecuado para su posterior análisis (Brown et al., 2005; Katajamaa y Orešič, 2007).

El siguiente paso es analizar los datos con herramientas de análisis de datos “corrientes abajo” para la identificación de metabolitos, reconocimiento de patrones, o la asignación de la función biológica metabolito. El gran volumen de datos que tiene que ser analizado plantea un desafío único en el análisis de datos. Para responder a este desafío se requieren recursos específicos de bioinformática y quimio-informáticos. Recursos que faciliten el análisis de datos, recuperación de la información pertinente para la interpretación de datos y diseño experimental; son bases de datos que pueden integrar los datos espectrales, propiedades fisicoquímicas, las propiedades estructurales y químicas, y los flujos de trabajo de experimentación. Hay una serie de bases de datos que se utilizan actualmente en la metabolómica. (Go, 2010).

9.2 Recuperación de la información

El primer paso en la organización y la gestión de la gran cantidad de conjuntos de datos generados a partir de experimentos metabolómicos es el desarrollo de bases de datos completas y fáciles de usar, con buenas anotaciones y pública, para su almacenamiento y difusión de datos. El adecuado diseño e implementación de la gestión de datos, el manejo y la recuperación es fundamental en la captura de toda la información pertinente en una muestra biológica dada, para el análisis e interpretación de datos

Además, una base de datos debe proporcionar a los usuarios, registros finales de la consulta en la interfaz y sistemas fáciles de usar que permiten un almacenamiento, recuperación y visualización de datos a través de diferentes plataformas informáticas. Las bases de datos metabolómicas actuales están diseñadas para el almacenamiento de datos, identificación de metabolitos, como un centro de información de las propiedades fisicoquímicas, perfiles espectrales de moléculas, flujo de trabajo experimental, y la determinación de las funciones biológicas (Nobeli y Thornton, 2006; Wishart, 2007).

Con la gran cantidad de información que está siendo adquirida, las bases de datos siguen creciendo y evolucionando. Por lo tanto, se debe hacer un esfuerzo considerable para anotar la información para mantener la base de datos actualizada y precisa.

Al igual que muchas bases de datos biológicas y proteómicas, estas herramientas en metabolómicas son de fácil acceso en línea a través de una interfaz web. Estas bases se implementan con los sistemas relacionados, como MySQL, PostgreSQL y Oracle, y programación y lenguajes script que incluyen Perl, Python, PHP y Java. Los contenidos de las bases de datos y la información relacionada se recuperan a través de un motor de búsqueda que admite texto y búsquedas basadas en la estructura y verosímil "hits" se resumen normalmente en un formato tabular (Go, 2010).

Los avances en las herramientas computacionales permiten la prestación en línea de estructuras químicas, datos espectrales y diagramas de rutas. Las bases de datos en metabolómica son ampliamente entrelazadas a otras y repositorios de datos químicos para proporcionar información completa para cada entrada metabolito. Asistir y permiten a los usuarios sacar el máximo provecho de la información y datos disponibles almacenada en estos recursos, el sitio web proporciona documentación en línea, páginas de ayuda, guía del usuario, tutoriales y vídeos webinar (Go, 2010).

Un aspecto importante en el desarrollo de bases de datos es la implementación de los formatos estandarizados para describir y representar datos metabolómicos. Tal esfuerzo permitiría que el almacenamiento de datos, intercambio y difusión sea más eficiente. Hasta ahora, las iniciativas de normalización establecidas por la Sociedad de Metabolómica (Fiehn et al., 2006), la Mínima Información sobre experimentos de la Metabolómica (MIAMET) (Bino et al., 2004). Reportes de Estándares Metabólicos de Estructuras (SMRS) (Amberg et al., 2005), por Arquitectura para la metabolómica (ArMet) (Jenkins et al., 2004), y la Iniciativa de Normalización en Metabolómica (MSI) (Fiehn et al., 2007; Sansone et al., 2007), están tomando las medidas necesarias para la estandarización de datos metabolómico. Esta iniciativa ha puesto en marcha en la actualidad el lenguaje de marcado extensible (XML, <http://www.w3.org/TR/xml11/>) para el intercambio de datos en este marco y ha establecido directrices para el modelo de datos en informes metabolómico (Go, 2010).

9.3 Tipos de bases de datos en la metabolómica

En la actualidad, las bases de datos metabolómicos abarcan desde metabolitos, datos espectrales y la información estructural de los flujos de trabajo experimentales. Estas se consideran útiles en la investigación e incluyen: (Mendes, 2002).

- ✓ Perfiles detallados de metabolitos que incluye datos brutos y metadatos,
- ✓ Almacenar perfiles de metabolitos de especies individuales,
- ✓ Contienen perfiles de metabolitos combinados de muchas especies y condiciones,
- ✓ La lista de todos los metabolitos conocidos de cada especie,
- ✓ Información biológica establecida.

Hasta el momento, el alcance actual de las bases de datos metabolómicas existentes abarca tres de las bases de datos que acabamos de describir. Estas pueden ser clasificados de acuerdo con su contenido de los datos:

- las bases de datos de perfiles de metabolitos de referencia, que consiste en bibliotecas, especies específicas de perfiles de metabolitos, bases de datos compuestas y bases de vía espectrales
- el sistema de gestión de información de laboratorio metabolómica (LIMS) que almacena los flujos de trabajo experimentales (es decir, desde la recepción de la muestra hasta la presentación de datos).

9.4 Bases de datos de perfil de referencia de metabolitos

Estas bases contienen colecciones completas de datos biológicos, químicos y físicos de los compuestos, así como metabolitos en los sistemas biológicos y organismos. Están diseñados para facilitar la identificación de metabolitos y la búsqueda de la función biológica relevante. En esta categoría incluyen espectros de referencia en la biblioteca, de vías, y que son específicos de compuestos particulares, especies y fluidos biológicos (Go, 2010).

9.5 Bibliotecas de referencia espectral

El uso de bibliotecas espectrales de referencia para identificar metabolitos ha sido una herramienta de identificación de metadatos, específicamente en estudios de metabolitos de perfiles basados en la cromatografía de gas acopladas a espectrometría de masas (GC-MS) (Kopka et al., 2005; Schauer et al., 2005).

Típicamente, MS y/o MS/MS o espectros de RMN generado a partir de un experimento dado se compara con una biblioteca espectral o una base de datos de compuestos de referencia. El espectro del metabolito desconocido se identifica a partir de una lista de posibles espectros de compuestos de referencia que mejor se ajuste al perfil espectral del metabolito desconocido. Para un análisis determinado tenga éxito, bibliotecas espectrales de referencia deben tener los datos espectrales de alta calidad integral (Ausloos et al., 1999). Además, estos datos de los metabolitos de referencia generados a partir de estas bibliotecas o bases de datos contienen también el tiempo de retención, nombres/estructuras químicas, y enlaces a otras bases de metabolitos. Hasta la fecha, hay varias bibliotecas espectrales de referencia y que están disponibles para la metabolómica. Estos incluyen GC-MS, cromatografía líquida (LC)/MS, ionización por electro aerosol (ESI)-MS, con transformada de Fourier (FT)-MS y espectros de RMN. Bibliotecas espectrales representativas o bases de datos que se utilizan comúnmente en la metabolómica incluyen la biblioteca de recursos de la base de datos del:

- ✓ Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología (NIST, <http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>),
- ✓ La Base de Datos Golm metabolitos (GMD, <http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html>) (Kopka et al., 2005).
- ✓ MassBank (<http://www.massbank.jp>) (Horai, Arita, y Nishioka, 2008).
- ✓ METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) (Smith et al., 2005).

✓ Y la base de datos del Consorcio Madison en Metabolómica (MMCD, <http://mmcd.nmrfam.wisc.edu/>) (Cui et al., 2008; “NEW BIOINFORMATICS RESOURCES FOR METABOLOMICS,” 2006).

El uso generalizado de estas bibliotecas se debe a su contenido y facilidad de uso. El contenido de los datos y la interfaz de usuario de estas bibliotecas han mejorado mucho en los últimos años. Sin embargo, algunas bibliotecas espectrales todavía carecen de documentación en línea, tutoriales y páginas de ayuda (Go, 2010).

9.5.1 Biblioteca espectral Masas NIST

La Biblioteca espectral Masas NIST es una de las bibliotecas espectrales más completas disponibles para la metabolómica.

Se compone de cuatro bibliotecas: la principal, la réplica, la salada, y biblioteca de datos MS/MS de índice de retención (RI) que contiene 293,247 valores Kovats RI para 44.008 compuestos. NIST contiene más de 200,000 espectros MS de 192.108 compuestos volátiles analizados por ionización de electrones (EI)-MS, 717 espectros EI-MS de 672 compuestos volátiles en la biblioteca de sal y 14,802 espectros de 3,898 positivo y 1,410 iones precursores negativos en bibliotecas MS/MS. NIST 08 ofrece un programa de búsqueda independiente de la plataforma MS, una utilidad de MS-intérprete, sistema de decodificación y la identificación de espectro de masas automatizado (AMDIS), un manual electrónico, y una versión en .pdf de la guía y páginas de ayuda del usuario (Go, 2010).

9.5.2 GMD

Es una base de datos a disposición del público de los espectros de metabolito por análisis GC-MS y los índices de tiempo de retención, los datos espectrales y los índices de tiempo de retención se combinan en una biblioteca de índices de espectros de masas y tiempo de retención conocidos (MSRI). La biblioteca GMD-MSRI comprende espectros de metabolitos analizados por instrumentos GC-MS-cuadrúpolos, GC-MS y GC tiempo de vuelo (TOF), con experimentos utilizando configuración y columnas de instrumentos similares.

MSRI se puede utilizar con AMDIS de NIST para identificar metabolitos basado en sus marcas espectrales de masa MSRI. Los catálogos de la biblioteca GMD MSRI con más de 2,000 espectros GC-MS. GMD también contiene registros de experimentos de perfiles de metabolitos realizados en el Instituto Max-Planck de Fisiología Vegetal Molecular y sus colaboradores para el intercambio abierto de datos, así como las metodologías experimentales. Para apoyar el intercambio abierto de información, los experimentos de perfiles de metabolitos son compatibles con MIAMET.

GMD soporta consultas basadas en texto para buscar compuestos y consultas basadas en espectros de comparación de los espectros de masas en NIST o formatos AMDIS con disposición espectros de masa que se encuentra en la biblioteca de GMD. GMD también permite a los usuarios generar bibliotecas personalizadas que son subconjuntos de la biblioteca GMD existente.

GMD se puede acceder a través del sitio web de Sistemas Integrales Proyecto Biológico (<http://csbdb.mpimgolm.mpg.de/index.html>), que proporciona información acerca de GMD y enlaces a las preguntas más frecuentes (FAQs) y las páginas de ayuda (Go, 2010).

9.5.3 MassBank

Los esfuerzos de la comunidad han impactado positivamente en el intercambio de espectros de masas. La base de datos de MassBank (<http://massbank.jp>) es uno de los ejemplos más exitosos, con una amplia base de usuarios y colaboradores de muchos países diferentes. En una coalición de servidores de bases de datos, los esfuerzos europeos de MassBank (<https://massbank.eu/>) y MassBank de Norte América (<http://massbank.us/>) permiten el intercambio inmediato de espectros de masas de estructuras anotadas, incluyendo la autocuración de espectros e información de estructura química. En comparación, la base de datos espectral GNPS utiliza enfoques de aprovisionamiento público para anotar compuestos desconocidos. Las bibliotecas comerciales como NIST17 aún desempeñan un papel importante debido a los altos niveles de curación manual, la buena calidad general de los datos y la amplia cobertura de sustancias.

9.5.4 METLIN

La espectrometría de masas en tándem (MS / MS) de la base de datos METLIN fue creada en 2003 y puesta a disposición del público en 2005 para ayudar a identificar metabolitos; que, en ese momento, no tenían una base de datos para identificar o cualquier otra entidad química. METLIN, una plataforma en forma de nube de libre acceso y base de datos para metabolitos, ya que ha crecido a partir de una pequeña colección de espectros MS / MS en 100 metabolitos en su primera versión a más de 10 000 metabolitos en 2012, con un adicional de 12 000 metabolitos y compuestos en los últimos 5 años. Los datos de METLIN son ampliamente útiles a través de múltiples tipos de instrumentos espectrometría de masas en tándem, con los datos recogidos en ambos modos de ionización positivo y negativo en múltiples energías de colisión, proporcionando espectros de alta resolución, sistemáticamente adquirida y curada manualmente directamente de normas y sus análogos de isótopos estables. Estos datos complementan los datos de otras bases de datos, que han sido recogidos por impacto de electrones (EI) o la resonancia magnética nuclear (RMN) de instrumentación

Las consultas a la base de datos se pueden realizar a través de texto- o consulta basada en la estructura que puede ser refinado en función de los parámetros seleccionados por el usuario y METLIN apoya en modo de búsqueda simple o por lotes en masa o nombre de compuestos. Los resultados de la búsqueda se muestran en forma de tabla con la siguiente información:

- metabolito ID
- masa
- nombre,
- fórmula
- número del Chemical Abstracts Service,
- un enlace a la Enciclopedia de Kioto de genes y genomas (KEGG)
- base de datos (si está disponible),

- y la estructura (si está disponible).

METLIN también proporciona la visualización de datos con los diagramas 3D LC/MS, histograma y gráficos de dispersión con la característica de codificación de color añadido para los valores de masa en base a diferentes parámetros introducidos por el usuario. METLIN también está integrado en XCMS2 (Benton et al., 2008), una herramienta metabolómica de procesamiento/análisis de datos para la asignación automática de datos MS-tándem. METLIN está disponible libremente en línea o disponible como descarga para uso local. El sitio web proporciona información sobre METLIN y Consejos de búsqueda.

MMCD es una biblioteca espectral NMR y MS de libre acceso de los estándares de metabolitos diseñados para la caracterización e identificación de metabolitos (Go, 2010).

Contiene más de 3,000 espectros de RMN de 477 metabolitos con su desplazamiento químico, acoplamientos, secuencias de pulsos, y el pico de intensidad y más de 2,000 espectros GC-MS de metabolitos recogidos y organizados desde otras bases de datos de metabolitos de libre acceso y la literatura. Además, MMCD también contiene propiedades químicas y estructurales de más de 20,000 moléculas pequeñas recogidas de las bases de datos de metabolitos conocidos. MMCD se apoya en consultas por texto, estructura-, basados en MS y RMN, y, así como de búsqueda de Google™. MMCD proporciona una herramienta de dibujo (editor estructura PubChem) para las consultas basadas en la estructura. Resultados de la búsqueda están dispuestos en el orden de relevancia en base a los parámetros definidos por el usuario con cada candidato adoptivo se muestra con el metabolito, la información estructural, física, química, y enlaces a otras bases de datos de metabolitos público. MMCD implementa un LIMS-metabolómica, sésamo-LIMS, que almacena los protocolos experimentales, datos primarios, y detalles de los experimentos. Sésamo LIMS proporciona herramientas para acceder a los datos, visualización de datos, y el análisis de colaboración. MMCD proporciona a los usuarios con páginas de ayuda detallados y está disponible gratuitamente en línea y como descarga para los usuarios académicos (Go, 2010).

9.6 Base de datos para perfiles metabólicos específica en especies, compuestos o fluido biológicos

Las bases de datos para perfiles metabólicos específica en especies, compuestos y fluido biológicos están orientados a facilitar la identificación de metabolitos y el análisis cuantitativo de los datos metabolómicos en la nutrición (Rezzi et al., 2007), el descubrimiento de biomarcadores (Dunckley, Coon, y Stephan, 2005; Kim, Maruvada, y Milner, 2008; Schlotterbeck et al., 2006), y el desarrollo, descubrimiento y evaluación de los fármacos (Karp et al., 1999; Schlotterbeck et al., 2006; Wishart, 2007).

Estas bases de datos contienen información completa de los perfiles de metabolitos en un determinado estado de un sistema biológico que son específicos para una determinada clase química de los metabolitos, especie, fluido biológico o tejido (Go, 2010).

Los datos en estas bases consisten en propiedades físico-químicas y biológicas de los metabolitos, como se asocian a determinadas enfermedades, la concentración de estos en

fluidos biológicos, tejidos, u órganos, estructuras químicas, y los datos espectrales que se recogen a partir de experimentos, las bases de datos públicas y la literatura (Go, 2010).

Ejemplos de estas bases de datos incluyen

- Base de Datos del Metaboloma Humano (HMDB, <http://www.hmdb.ca>) (Wishart et al., 2007, 2009), la Base de Datos del Metaboloma del líquido cefalorraquídeo HMDB-(LCR) (<http://www.csfmetabolome.ca>) (Wishart et al., 2008).
- Base de Datos de lípidos y Estructura (LMSD, <http://www.lipidmaps.org>) (Sud et al., 2007).
- Banco de Drogas (<http://www.drugbank.ca/>) (Wishart, 2006; Wishart, 2007; Wishart et al., 2008), y PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Sayers et al., 2009).

Una breve descripción de cada base de datos se muestra a continuación.

9.6.1 HMDB

Es la colección más completa de datos de metabolitos endógenos en fluidos biológicos y tejidos obtenidos de experimentos, así como los reunidos de otras bases de datos y la literatura humana. La base de datos contiene espectros de RMN y MS, concentraciones en fluidos biológicos y tejidos, los datos fisicoquímicos, nombres, sinónimos, descripción de los metabolitos, estructuras químicas, los datos clínicos tales como asociación con la enfermedad, los datos biológicos tales como gen/SNP/mutación/datos de la enzima, la vía metabólica, y enlaces a otras bases de datos públicas. Cada entrada de cada metabolito se asocia con una MetaboCard que contiene aproximadamente 90 campos de datos de información detallada sobre el metabolito de interés (Go, 2010).

La versión actual (v. 3.0) contiene más de 6,800 entradas de metabolitos de 52 clases de compuestos, ~ 3000 espectros MS y NMR, y 28 vías únicas. Otras mejoras en esta versión actual incluyen un aumento en la anotación metabolito y las mejoras en la interfaz de usuario, consulta y herramientas de visualización.

HMDB se apoya de consultas basadas en texto, estructura y en secuencias; proporciona una utilidad de extracción de datos, DataExtractor, de búsqueda personalizada. HMDB también implementa un sistema LIMS (MetaboLIMS) para apoyar el almacenamiento y gestión de información de la muestra, los datos de RMN y MS, protocolos experimentales, y los recursos de laboratorio.

HMDB es de libre acceso y como descarga para el acceso local. La información adicional acerca de los campos HMDB, datos utilizados en HMDB, actualizaciones recientes, y enlaces a otras bases de datos se proporcionan en su sitio web.

Un avance reciente para apoyar la investigación de metabolómica en neurociencia es el nuevo desarrollo para el perfil cuantitativo y global de metabolitos en el LCR y su base de datos. La Base de Datos del metaboloma de LCR, que es una parte de HMDB, es una colección de metabolitos endógenos en LCR que se han detectado a partir de experimentos realizados por

científicos del proyecto metaboloma humano y se describe en los datos publicados. Los contenidos de esta base se derivan de experimentos con ¹H-NMR, GC-MS o espectrometría de masas acoplada a ciclotrón de iones con transformada de Fourier (FT-ICR)-MS. Los registros de la HMDB-LCR consisten en un nombre metabolito, datos de concentración, enfermedades, e información literaria de el metabolito en líquido cefalorraquídeo. Cada entrada de la base de datos se asocia con un MetaboCard y está vinculada a HMDB. La base de datos contiene actualmente más de 300 metabolitos del LCR. La base de datos está implementada en un entorno similar a software de HMDB y, por lo tanto, tiene consulta similar, visualización y herramientas relacionados con la base de datos como HMDB (Go, 2010).

9.6.2 Drugbank

Es una base de datos de fármacos disponible públicamente para el diseño in-silico, el descubrimiento de dianas terapéuticas, y el análisis de las interacciones diana fármaco/fármaco.

Contiene una amplia colección de fisicoquímica, espectral, estructural, farmacológica, farmacéutica, y los datos fisiológicos de las drogas y el blanco terapéutico de drogas, información tales como la secuencia, estructura y vías, que se compilan de la literatura y otras bases de datos. La base de datos contiene más de 4,850 medicamentos, que consta de más de 1,400 fármacos aprobados de molécula pequeña, 128 proteínas biotecnológicas/fármacos peptídicos, 71 nutracéuticos, más de 3,200 medicamentos experimentales, 64 medicamentos retirados, y 188 drogas ilícitas. También almacena más de 4,500 blancos farmacológicos consisten en proteínas y ADN blancos identificados por la FDA, más de 5,000 secuencias, y más de 3,200 entradas del Banco de Datos de Proteínas.

Cada entrada a DrugBank se asocia con una DrugCard que detalla más de 100 campos de datos de medicamentos que va desde el nombre del medicamento, estructura fisicoquímica, clínica y propiedades farmacológicas, enlaces a otras bases de datos y resúmenes, de Wikipedia aplicaciones interactivas/imágenes de estructuras químicas de la droga, y de las dianas de las drogas.

DrugBank se puede acceder a través de una simple consulta de texto o en el menú desplegable "Examinar" en la parte superior de la página web. Este menú consiste en navegación-DrugBank, Pharma-navegación y Geno-navegación, que detalla los datos DrugBank en formato de tabla con un clic de un ratón. DrugBank tiene herramientas de búsqueda similares a HMDB, como TextQuery, ChemQuery, SeqSearch y DataExtractor y herramientas de visualización/dibujo con HMDB (Go, 2010).

9.6.3 LMSD

Es una base de datos que consta de estructuras químicas de los lípidos biológicamente relevantes obtenida de los LIPID-MAPAS por un consorcio de colaboradores, otras bases de datos de lípidos (Lípido-Banco y LIPIDAT), la literatura, las estructuras químicas generadas computacionalmente y lípidos que se identifican a partir de experimentos.

La base de datos contiene más de 9.000 estructuras de lípidos que se clasifican de acuerdo con un sistema de clasificación global propuesta por el consorcio LIPID-MAPAS y se nombran después de un esquema molecular por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada-Unión Internacional de Bioquímica y Biología.

LMSD ofrece herramientas de dibujo de la estructura para facilitar la representación de las diferentes clases de estructuras de lípidos y herramientas de visualización que soporta GIF, JMol, ChemDraw y applets MarvinView (Fahy et al., 2007). Cada entrada de lípidos tiene LM-ID, nombre común, nombre sistemático, fórmula química, clase de lípidos, sinónimo, estado, y enlaces a otras bases de datos. La base de datos compatible con las consultas de texto y basados en la estructura.

Los resultados de Búsqueda son totalmente anotados y vinculadas a otras bases de datos de lípidos y con referencias cruzadas a la base de datos del proteoma LIPID MAPAS (Cotter et al., 2006). LMSD proporciona a los usuarios una variedad de herramientas de análisis en línea e información detallada acerca de los lípidos que incluye la clasificación de los lípidos, lípidos Wikipedia, normas de lípidos, los protocolos experimentales, las vías, los foros de discusión, y una visita guiada (Go, 2010).

9.6.4 PubChem

Es uno de los mayores repositorios disponibles públicamente de propiedades químicas, estructurales y biológicas de las moléculas pequeñas que se utilizan como agentes de diagnóstico y terapéuticos (Sayers et al., 2009). Cataloga más de 19,6 millones de moléculas pequeñas con más de 11 millones de estructuras únicas que se almacenan en una suite de vínculos de bases de datos, es decir, PubChem Compuesto, PubChem Sustancias y PubChem BioAssay. Todas las bases de datos PubChem están vinculadas a bases de datos Entrez y texto y consultas basadas en estructura. PubChem ofrece curso en línea y ejercicios, preguntas frecuentes, y páginas de ayuda detalladas en el uso de los recursos PubChem. Una limitación de PubChem es la falta de “depuración” de los datos depositados en público de los contribuyentes PubChem (Bradley, 2008).

9.7 Bases de Datos para Vías Metabólicas

Estas bases de datos son depositarios de las vías bioquímicas y reacciones con datos sobre los genes, productos de genes, enzimas y compuestos, diseñados para proporcionar una descripción cualitativa de los procesos bioquímicos implicados en el metabolismo (Wittig y De Beuckelaer, 2001). Las bases de datos para vías metabólicas contienen un amplio conjunto de secuencia de reacciones catalizadas por enzimas bioquímicas organizadas en vías o mapas.

El contenido de la base de datos está “custodiada” de los recursos de la literatura y de Internet o en vías informáticas que se refinan y se actualizan en forma manual para mayor exactitud. Estas bases de datos se utilizan en análisis de la vía (Papin et al., 2003), la genómica comparativa (Cakmak y Ozsoyoglu, 2007), la determinación de fenotipo molecular (Fiehn, 2001), análisis computacional de las redes metabólicas (Papin et al., 2003; Schmidt, 2004),

el diseño de fármacos (Karp et al., 1999), y la bioingeniería metabólica (Deckwer et al, 2006; Peterhansel, Niessen, y Kebeish, 2008). Lo más comúnmente utilizados son

- Bases de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa, 2000, 2004, 2002).
- BioCyc (<http://biocyc.org>) (Karp et al., 2005; Krummenacker et al., 2005).
- MetaCyc (<http://metacyc.org/>) (Caspi, 2006; Caspi y Karp, 2007; Karp, 2002; Krieger et al., 2004).
- HumanCyc (<http://humancyc.org/>) (Romero et al., 2005) y
- Reactome (<http://reactome.org>) (Joshi-Tope et al., 2005; Matthews et al., 2009).

Estas bases de datos para vía metabólica son de acceso público, se puede acceder directamente a través de su página web, y son fáciles de usar. Mientras que estos recursos sirven como la base de conocimientos para el metabolismo, estas bases de datos no pueden ser utilizados para la identificación de metabolitos y como recurso para obtener información completa sobre los perfiles de metabolitos en los sistemas biológicos (Go, 2010)

10 APLICACIONES EN EL ÁREA DE LA SALUD

Ha habido un crecimiento explosivo en la aplicación de metabolómica basada RMN y en MS impulsada por el potencial para la detección temprana de la enfermedad, monitorización de la terapia, y en última instancia, para alcanzar la meta de la medicina personalizada. En particular, los estudios de metabolómica se han centrado en la identificación de los metabolitos asociados con un número de enfermedades incluyendo el cáncer, la diabetes, los errores innatos del metabolismo y enfermedades cardiovasculares.

En general, estos estudios iniciales son prometedores, sin embargo, los estudios de validación son críticamente necesarios para confirmar la identidad y la generalidad de los supuestos biomarcadores. Los estudios de validación implican normalmente varios conjuntos de muestras independientes para la misma enfermedad, incluso con representación a factores tales como el género, la edad, la etnia, la morbilidad de otras enfermedades, y el origen geográfico (Gowda et al., 2008)

10.1 Cáncer

El cáncer se detecta típicamente radiográficamente, y, a menudo en la etapa tardía cuando las opciones de terapia son limitadas. Por lo tanto, hay una gran demanda de alternativas, iniciales y químicamente, con herramientas metabolómicas basadas en MS y RMN que tienen el potencial para el diagnóstico e incluso la gestión de la terapia (Sitter et al., 2006).

Algunas investigaciones han buscado establecer biomarcadores para cáncer de mama (Yang et al., 2007), la mayoría de ellos centrados en la detección de biomarcadores directamente en tumores de cáncer de mama. Se observó la correlación de múltiples metabolitos tales como lactasa, lípidos, fosocolina, colina y glicina con el cáncer empleando una variedad de 1D y 2D o 1H 31P-MAS-NMR de alta resolución. Con base en el análisis estadístico multivariado de los datos de RMN, tumor y los tejidos no implicados podrían clasificarse con una alta especificidad (100%) y sensibilidad (82%) (Sitter et al., 2006).

Las diferencias en líneas de células epiteliales mamarias, tales como la regulación positiva de la síntesis de ácidos grasos se han detectado a partir de los métodos combinados de RMN-2D y GC-MS (Yang et al., 2007). Los intentos para detectar el cáncer de mama a partir del análisis de aliento exhalado también se han hecho. Los compuestos orgánicos volátiles fueron recolectados en el aliento de las mujeres con mamografías anormales y biopsias. En este estudio, los pacientes y los controles de cáncer han sido distinguidos con una sensibilidad y especificidad del 94.1% y 73.8%, respectivamente (Phillips et al., 2003).

El estudio ¹H-NMR de las muestras de suero preoperatorios se ha hecho para detectar el cáncer epitelial de ovario (Odunsi et al., 2005). Los datos de RMN fueron analizados mediante PCA para clasificar a los pacientes en subgrupos: con cáncer de ovario y no cáncer (quistes ováricos benignos y controles sanos). Los análisis estadísticos de pacientes con cáncer distinguieron de las muestras benignas y control con 97 a 100% de precisión. Sin embargo, los supuestos biomarcadores consistían en dos señales no específicas que emanan de la región de lípidos y 3-hidroxibutirato, que se ha visto en un número de otros estudios metabolómica y puede resultar del metabolismo de la microflora intestinal.

Perfiles metabólicos alterados en el cáncer de páncreas se han estudiado utilizando muestras de plasma y tejidos (Beger et al., 2006; Fang et al., 2007). El análisis de ¹H RMN en plasma (Beger et al., 2006), se basa en la hipótesis reportada de que los niveles de insulina y de glucosa están alterados, en consecuencia, el cáncer de páncreas en un perfil lipídico alterado en la sangre. Los espectros de RMN de los lípidos extraídos de plasma se sometieron a análisis estadístico utilizando PCA. Se informó La sensibilidad, la especificidad y la precisión global de la detección de cáncer de páncreas cuando se utilizaron 4 regiones espectrales de RMN para la discriminación siendo de 96%, 88% y 92%, respectivamente, y el 98%, 94% y 96%, respectivamente, cuando se utilizaron 5 regiones. Análisis de espectrometría de masas indicó una disminución de los fosfolípidos en las muestras de cáncer. Estos resultados son complementarios al perfil metabólico recientemente derivada de los estudios ¹H HRMAS de tejido a partir de modelos animales de cáncer de páncreas (Fang et al., 2007). En ese estudio, fosfocolina y glicerol-fosfocolina se encontraron disminuidos en el cáncer.

La caracterización metabolitos de los tumores de cuello uterino se ha demostrado mediante ¹H NMR HRMAS y análisis estadístico multivariado. Tejido maligno del cuello del útero mostró niveles más altos de ácidos de colina y aminoácidos en comparación con el tejido no maligno (Sitter et al., 2004). Se han realizado estudios de RMN HRMAS para explorar la apoptosis en el cáncer cervical. Se analizaron los espectros para metabolitos lipídicos y no lipídicos utilizando experimentos de un pulso y de eco de espín, respectivamente (Lyng et al., 2007). Se encontraron correlaciones significativas entre la fracción de células tumorales y la concentración de glucosa, entre la densidad de las células tumorales y la concentración glicerofosfocolina, y en la proporción de glicerofosfocolina a colina. Los resultados sugieren una aplicación del método para explorar el papel de la apoptosis en el curso de la enfermedad. Los avances en la detección basada en metabolito de cáncer de pulmón se han realizado durante un número de años (Deng, Li, y Zhang, 2004; Poli et al., 2005).

La mayoría de estas investigaciones se centran en la detección de compuestos orgánicos volátiles en muestras de aliento usando diversas estrategias de recolección y detección de GC-MS de alta sensibilidad.

Un gran número de compuestos orgánicos volátiles se ha demostrado que distinguir entre cáncer de pulmón y los controles (Chen et al., 2011), sin embargo, lograr una precisión diagnóstica por encima del 90% ha sido desafiante. Las investigaciones en biomarcadores de cáncer de pulmón también se han llevado a cabo utilizando fluidos corporales tales como suero y orina (Deng et al., 2004). A partir del análisis GC-MS de suero, las concentraciones más altas de dos aldehídos, hexano y heptano, se ha demostrado distinguir a los pacientes con cáncer de pulmón a partir de los controles (Deng et al., 2004). Perfiles de metabolitos en la orina de los modelos de ratones de cáncer de pulmón xenográfico se han explorado usando tanto RMN y la nueva técnica DESI-MS (Chen et al., 2007) La orina de ratones tanto cancerosas y de control se sometieron a RMN y MS combina con el análisis estadístico multivariado. PCA tanto de la RMN y MS identificando un gran número de metabolitos de diferenciación, donde muchos de los cuales localizado en la vía de metabolismo de las purinas.

Se empleó un enfoque metabolómico y proteómico combinado para estudiar un modelo de ratón de cáncer de próstata (Connor et al., 2010). El análisis multivariado incluyendo O-PLS se aplicó para interpretar las diferencias plasma y en perfiles metabolómico, proteómicos. Se observaron correlaciones entre un precursor serotransferrina, tirosina y 3-D-hidroxitirato, y entre una disminución de la concentración de tirosina y una mayor presencia de gelsolina. Varios estudios metabolómicos sobre el cáncer de próstata se centraron en el análisis de tumores y fluido seminal (Suhre et al., 2010). Un combinado estudio de ¹H RMN y HRMAS con la histopatología cuantitativa en mismos especímenes tumorales mostraron una correlación lineal entre la concentración de espermina medido por RMN y el porcentaje en volumen de células epiteliales prostáticas normales cuantificadas por histopatología (Suhre et al., 2010). Estos resultados ponen de relieve el papel de la RMN como una herramienta eficaz para investigar el mecanismo inhibitorio de espermina en los seres humanos. Un combinado in vivo e in vitro de RMN, y el estudio histopatológico indican la utilidad potencial de la traducción de biomarcadores ex vivo derivadas para una mejor interpretación clínica de cáncer de próstata mediante RMN in vivo (Kim et al., 2008). En este estudio, el tejido glandular sano se discriminó de cáncer de próstata basado en alto citrato y poliaminas, y baja colina, fosfocolina y glicerofosfocolina. Además, las concentraciones de taurina, mio-inositol, y esciloinositol eran más altos en cáncer en comparación con los tejidos glandulares y estromales sanos. Se propuso un modelo computacional de la patología del tejido basado en perfiles metabólicos derivados de HRMAS RMN para el cáncer de próstata (Oberbach et al., 2011). Los resultados del análisis de RMN y de tejido asistido por informática mostraron una correlación lineal entre ellos, tanto para el epitelio normal y cáncer de próstata (Wang et al., 2011). La capacidad diagnóstica de la espectroscopia de RMN para predecir el cáncer de próstata se puso a prueba mediante el análisis multivariado de datos HRMAS RMN metabólicos y de histopatología cuantitativa de 199 muestras de tejido de 82 pacientes con cáncer, las cantidades de varias concentraciones de metabolitos de próstata se determinaron mediante ¹H NMR HRMAS y comparados entre normal y el cáncer de los tejidos (Denkert et al., 2006).

Las concentraciones de fosfocolina/glicerofosfocolina, colina total, el lactato y alanina fueron mayores en el cáncer de próstata que en los tejidos glandulares y estromales sano, mientras que las concentraciones de citrato y de poliamina fueron significativamente más altos en los tejidos glandulares sanos que en los tejidos estromales o cáncer de próstata sanos.

Un estudio ^1H NMR utilizando fluido seminal indicó que la detección del cáncer de próstata basadas en citrato supera las pruebas de antígeno específico de próstata y un estudio con ^1H RMN pone de relieve el uso de mio-inositol y espermina, además de citrato, para detectar la presencia de cáncer o cáncer de próstata (Serkova et al., 2008).

La exploración de metabolitos biomarcadores para el cáncer renal basado en muestras de tejido se exploró poco después de que HRMAS fuera desarrollado (Moka et al., 1998) Posteriormente, los tumores renales se han investigado, el empleo de los últimos avances tecnológicos en HRMAS RMN y el análisis multivariante (Righi et al., 2007; Tate et al., 2000). Los métodos convencionales de RMN 1D como un impulso y eco de espín, así como experimentos 2D tales como J-resuelto, TOCSY y HMQC ^1H - ^{13}C se han utilizado para las asignaciones de resonancia. Los análisis estadísticos multivariantes no supervisados y vigilados de los datos de RMN HRMAS centraron en la clasificación de tejido normal y carcinoma renal, y mostraron una clara distinción basada en la intensidad de señal de RMN. Se utilizó un análisis discriminante lineal para clasificar los tejidos normales y tumorales con 100% de precisión (Righi et al., 2007). Los perfiles metabólicos de las muestras normales de corteza y la médula se compararon con tejido maligno utilizando también HRMAS RMN (Tate et al., 2000). En comparación con las células normales, células de carcinoma renal tenían osmolitos orgánicos más bajas y más altas concentraciones de lípidos. Por otro lado, en el carcinoma papilar de células renales la concentración de taurina fue mayor y las señales de lípidos estaban ausentes. Kind et al, (2007), han evaluado tres métodos analíticos basados en MS para identificar biomarcadores potenciales para el cáncer renal. El enfoque combinado da una buena cobertura de los metabolitos urinarios, varios de los cuales los autores creen que pueden ser útiles para el diagnóstico (Kind et al., 2007).

Un buen número de estudios recientes se han centrado en la identificación de metabolitos diferenciales en los cánceres de cerebro (Griffin y Kauppinen, 2007; Martínez-Bisbal et al., 2004). Asignaciones detalladas de los compuestos bioquímicos en los tumores cerebrales se han realizado utilizando la combinación de análisis y el empleo de varios experimentos de RMN 1D y 2D in vivo y ex vivo (Martínez-Bisbal et al., 2004). Un gran número de metabolitos se han demostrado para diferenciar un tumor cerebral a partir de tejido normal, y las rutas metabólicas se utilizan para lograr la más alta sensibilidad. Teniendo en cuenta el hecho de que la espectroscopia por RM en cerebro in vivo es fácilmente manejable para aplicaciones clínicas, se han hecho intentos de establecer el vínculo entre la espectroscopia por RM y análisis neuropatológico utilizando el perfil metabólico obtenido utilizando espectroscopia de RMN de alta resolución ex vivo (Martínez-Bisbal et al., 2004; Tzika et al., 2002). Un estudio combinado HRMAS RMN y genómica a microescala demostró que las muestras de tejido tan pequeños como de 2 mg podrían ser utilizados con éxito para los experimentos HRMAS y cantidades pequeñas de ARNm produciendo datos genómicos de alta calidad. Esta es una de las nuevas aplicaciones interesantes en los que la metabolómica y la genómica han sido combinados. En este caso, se observaron alteraciones en la expresión de genes de la ruta de Kennedy y la desregulación en la vía Sonic Hedgehog en la patogénesis del cáncer (Swanson et al., 2006) Clasificación de los pacientes en función de la metástasis y la supervivencia de predicción de los pacientes con cáncer del cerebro se hicieron mediante la realización de análisis multivariable de los datos de RMN HRMAS (Kline et al., 2006).

Si bien los resultados de PCA mostraron claramente una tendencia en la agrupación debido al origen de las metástasis, el análisis PLS indicó distinta agrupación de los espectros de los pacientes que murieron menos de 5 meses después de la cirugía. Aunque se necesitan más validación, estos resultados indican el potencial para aplicaciones clínicas para tratar a los pacientes con cáncer cerebral.

10.2 Los errores innatos del metabolismo (EIM)

El EIM formar un grupo grande y diverso de enfermedades. La mayoría de éstos implican defectos genéticos individuales que afectan a una enzima específica (Jones y Bennett, 2002). Individualmente, IEM son poco frecuentes, sin embargo, su incidencia colectiva es relativamente alta y se encuentran en el rango de 1 por cada 1.400 a 5.000 nacidos vivos en los Estados Unidos. En la mayoría de los trastornos, los problemas surgen debido a la acumulación de metabolitos que son tóxicos o interfieren con la función normal. A menudo, IEM son difíciles de diagnosticar ya que los signos clínicos y síntomas se superponen entre las distintas enfermedades.

Las pruebas bioquímicas suelen ser inespecíficas para algunos metabolitos y el análisis de genes no siempre son concluyente, para clasificar el error innato. Por otra parte, para varios trastornos metabólicos, las técnicas analíticas integrales no se han establecido por lo que es difícil de diagnosticar tales enfermedades. Por ejemplo, los metabolitos N-acetilados en la orina que están implicadas en varios IEM y no son fácilmente detectables (Engelke, 2004). Actualmente GC/MS o MS/MS se utiliza para detectar hasta 80 diferentes EIM, aunque estos análisis se basan típicamente en la detección de biomarcadores de metabolitos individuales. La metabolómica puede desempeñar un papel en el cambio de la detección de al menos algunos de estos EIM. La espectroscopia de RMN es muy útil para el diagnóstico y se ha combinado con éxito con MS utilizando un enfoque metabolómico dirigido (Pan et al., 2007). La metabolómica parece ser particularmente prometedora para la identificación de posibles biomarcadores adicionales para EIM, y puede ser útil para la detección, o para la subclasificación de las enfermedades.

10.3 Enfermedades cardíacas

Las enfermedades cardíacas (EC) proporcionan otro excelente objetivo para la metabolómica y el diagnóstico. La angiografía, es un método de diagnóstico actual de las enfermedades del corazón es costosa e invasiva. Por lo tanto, la evaluación del avance en la metabolómica basada en EC es altamente deseable. En vista de esta oportunidad, los metabolitos de lípidos han sido evaluados por algún tiempo utilizando espectroscopia de RMN para entender el riesgo de enfermedades del corazón (Kuller et al., 2002; Otvos, Jeyarajah, y Bennett, 1991).

La utilidad de diagnóstico de la metabolómica dirigida basado en RMN se evaluó utilizando suero de individuos sin evidencia de estenosis (arterias coronarias normales, NCA), o EC severa define como al menos 50% de estenosis (enfermedad de los vasos triple, TVD) empleando análisis estadístico multivariable (Brindle et al., 2002). Los sujetos enfermos y control se separaron claramente del análisis utilizando PLS-DA y OSC. La clasificación se logró principalmente por las diferencias sutiles en las señales de lípidos de los espectros de RMN entre los dos grupos. Estos resultados están en conformidad con los resultados de

estudios independientes realizados en personas con y sin enfermedad coronaria. Posteriormente, la espectroscopia de RMN se evaluó como un método de diagnóstico en los pacientes con hipertensión, y los resultados en muestras de suero claramente se distinguen la presión arterial sistólica (PAS) baja/normal, de las limítrofes y/o elevados (Brindle et al., 2003). El diagnóstico basado en RMN de EC depende principalmente de las principales regiones de lípidos de los espectros de RMN de ¹H y muchas variables tales como la dieta, género, estilo de vida y las drogas afectan a la composición de lípidos no tomar esto en cuenta como variable puede llevar a una confusión o conclusión falsa. Se realizó un estudio para determinar el poder predictivo del método basado en RMN en grupos de pacientes de sexo masculino. En este estudio se logró un simple 36,2% y el 6,2% de precisión predictiva en el nivel de confianza del 99% para los grupos tratados y no tratados, respectivamente, lo que indica que el método de la metabolómica basada en RMN aún carece de la precisión diagnóstica suficiente (Kirschenlohr et al., 2006).

Ala-Korpela, 2008. En su artículo presenta una evaluación del enfoque de la metabolómica, con énfasis en la evaluación del riesgo de cardiopatía coronaria y el diagnóstico mediante ¹H NMR de plasma. Se destaca la utilidad potencial de combinar metabolómica basada en RMN ¹H in vitro y de imágenes por resonancia magnética de contraste múltiple in vivo para el diagnóstico precoz y la evaluación de riesgos de múltiples fases de la aterotrombosis (Ala-Korpela, 2008)

10.4 Enfermedad de Alzheimer

Varma et al., 2018, realizaron un marco novedoso para identificar los metabolitos del cerebro y la sangre biológicamente relevantes asociados con la patología y la progresión de la enfermedad durante las etapas prodrómica y preclínica de dicha enfermedad. Sus resultados muestran que las perturbaciones en el metabolismo de los esfingolípidos se asocian sistemáticamente con endo-fenotipos de la fase preclínica y prodrómica en la enfermedad, así como con la patología en la autopsia. Encontraron que distintas especies de esfingolípidos que incluyen esfingomielina (SM) con un resto de acilo C16: 0, C18: 1 y C16: 1 (SM C16: 0, SM C18: 1, SM C16: 1) y la hidroxisfingomielina con un resto de acilo C14: 1 (SM (OH) C14: 1) se asociaron de manera consistente con la gravedad de la patología de la EA en la autopsia y la progresión en las etapas prodrómica y preclínica. Las mayores concentraciones en sangre de los cuatro esfingolípidos transformados en logarítmicos en individuos cognitivamente normales se asociaron significativamente con un mayor riesgo de conversión futura a EA incidente: Las especies de esfingolípidos identificadas se relacionan con varias vías biológicamente relevantes implicadas en la EA, que incluyen la fosforilación de tau, el metabolismo del amiloide- β (A β), la homeostasis del calcio, la biosíntesis de la acetilcolina y la apoptosis. Este estudio tuvo limitaciones por el número relativamente pequeño de muestras de tejido cerebral que limitó el poder para detectar asociaciones significativas, controlar la heterogeneidad entre grupos y replicar los hallazgos en las muestras de cerebro independientes derivadas de la autopsia.

11 CONCLUSIONES

En la metabolómica muchos componentes son medidos y se centran en la riqueza de información obtenida con técnicas analíticas de espectroscopía de MS y de RMN. El análisis de los datos complejos de estos métodos utilizando técnicas de estadística multivariada avanzada, proporciona una potente plataforma para aplicaciones de diagnóstico, así como para la investigación transnacional y clínica. Durante los últimos años se han producido numerosos avances en el campo, incluyendo una serie de avances en los métodos analíticos para mediciones de alto rendimiento, enfoques estadísticos mejorados para clasificar muestras basadas en cambios sutiles y aplicaciones en el área de diagnóstico de enfermedades y evaluación de toxicidad.

Hoy en día, los métodos de MS proporcionan alta sensibilidad, sin embargo, la reproducibilidad sigue siendo una preocupación, al igual que la identificación única de metabolitos desconocidos e interesantes. Los métodos de RMN permiten la identificación y cuantificación de metabolitos hasta límites de μM facilitados por sondas criogénicas, sin embargo, la complejidad espectral sigue siendo un problema debido al alto grado de superposición de señales. Estos avances combinados con las bases de datos desarrolladas de metabolitos humanos e información metabólica, y la información sobre vías metabólicas disponible benefician enormemente al campo de la metabolómica.

La mayoría de los estudios de metabolómica se han centrado en el uso de un único método analítico, espectroscopia de RMN o MS. Dada la complejidad de los sistemas biológicos, será más prudente explotar ambos métodos en paralelo, al menos en las etapas de desarrollo del campo, para obtener información más significativa sobre las variaciones metabólicas en la salud y la enfermedad. La alta reproducibilidad de la RMN y la alta sensibilidad de la MS proporcionan datos complementarios e importantes para la identificación y validación de biomarcadores. El análisis multivariado combinado de los datos de RMN y Ms proporcionará información que es más útil e importante que usar un único enfoque. Sin embargo, en la literatura hay demasiada información sobre las aplicaciones de la metabolómica en diferentes campos (clínica, investigación, toxicología, alimenticia, plantas, animales, humanos, nutrición etc.), lo que pretendió esta tesis es la revisión general. Se recomienda buscar información específica si se quiere abordar las aplicaciones de la metabolómica en otras áreas; por ejemplo, nutrición, farmacología, veterinaria etc. y sus avances. Esta tesis analizo algunas de las técnicas comunes empleadas como las espectrometrías de masas acopladas a diferentes métodos de separación y los métodos de ionización suave; sin embargo, no son las únicas plataformas que existen actualmente para el descubrimiento y cuantificación masiva de metabolitos y para resonancia magnética nuclear existen muchas técnicas en desarrollo.

Para las enfermedades mencionadas en esta tesis, existen muchos artículos actuales con un panorama completo de la metabolómica y su aplicación en la clínica. Muchos investigadores sugieren un grupo mayor de estudio para profundizar si sus resultados pueden demostrarse en cualquier grupo étnico de la población. El papel del bioquímico diagnóstico en esta ciencia aún está en desarrollo con diferentes líneas de investigación, análisis y búsqueda de información actual que pueda apoyar al, tratamiento, seguimiento, investigación de enfermedades en una población, por lo cual las futuras generaciones tienen una gran área de oportunidad de ejercer su profesión.

12 REFERENCIAS

- Aharoni, A., Ric de Vos, C. H., Verhoeven, H. A., Maliepaard, C. A., Kruppa, G., Bino, R., & Goodenowe, D. B. (2002). Nontargeted Metabolome Analysis by Use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 6(3), 217–234. <https://doi.org/10.1089/15362310260256882>
- Ala-Korpela, M. (2008). Critical evaluation of ¹H NMR metabonomics of serum as a methodology for disease risk assessment and diagnostics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.006>
- Allen, J., Davey, H. M., Broadhurst, D., Heald, J. K., Rowland, J. J., Oliver, S. G., & Kell, D. B. (2003). High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nature Biotechnology*, 21(6), 692–696. <https://doi.org/10.1038/nbt823>
- Allen, J., Davey, H. M., Broadhurst, D., Rowland, J. J., Oliver, S. G., & Kell, D. B. (2004). Discrimination of modes of action of antifungal substances by use of metabolic footprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6157–6165. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6157-6165.2004>
- Altria, K. D., Marsh, A., & Sanger-van de Griend, C. (2006). Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.200600030>
- Amberg, A., Antti, H., Baunsgaard, D., & Beger, R. (2005). Standardisation of Reporting Methods for Metabolic Analyses: A Draft Policy Document from the Standard Metabolic Reporting Structures (SMRS) Group, 44(March), 1–37. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.100.6948&rep=rep1&type=pdf>

- Annarao, S., Sidhu, O. P., Roy, R., Tuli, R., & Khetrapal, C. L. (2008). Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using ¹H NMR spectroscopy. *Bioresource Technology*, 99(18), 9032–9035. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.023>
- Antonio, C., Larson, T., Gilday, A., Graham, I., Bergström, E., & Thomas-Oates, J. (2008). Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of carbohydrate-related metabolites from *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(9), 1399–1407. <https://doi.org/10.1002/rcm.3519>
- Ausloos, P., Clifton, C. L., Lias, S. G., Mikaya, A. I., Stein, S. E., Tchekhovskoi, D. V., ... Zhu, D. (1999). The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(4), 287–299. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00159-7)
- Ayala-Bretón, C., & Regil-Hernández, R. (2004). *Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas*. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_proteinas.pdf
- Bando, K., Kawahara, R., Kunimatsu, T., Sakai, J., Kimura, J., Funabashi, H., Fukusaki, E. (2010). Influences of biofluid sample collection and handling procedures on GC-MS based metabolomic studies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(4), 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.04.010>
- Barallobre-Barreiro J Chung Y Mayr M. (2013). La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Española de Cardiología*, 66(8), 657–661. Retrieved from <http://www.revespcardiol.org/es/la-proteomica-metabolomica-los-mecanismos/articulo/90210676/>

- Beger, R. D., Schnackenberg, L. K., Holland, R. D., Li, D., & Dragan, Y. (2006). Metabonomic models of human pancreatic cancer using 1D proton NMR spectra of lipids in plasma. *Metabolomics*, 2(3), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0026-2>
- Benton, H. P., Wong, D. M., Trauger, S. A., & Siuzdak, G. (2008). XCMS2: Processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization. *Analytical Chemistry*, 80(16), 6382–6389. <https://doi.org/10.1021/ac800795f>
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2014). Metabolite Identification in NMR-based Metabolomics. *Current Metabolomics*, 2(3), 163–173. <https://doi.org/10.2174/2213235X02666140924211244>
- Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Sumner, L. W. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.004>
- Blennow, K., Zetterberg, H., & Fagan, A. M. (2012). Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(9), a006221–a006221. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006221>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bolten, C. J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J. C., & Wittmann, C. (2007). Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Analytical Chemistry*, 79(10), 3843–3849. <https://doi.org/10.1021/ac0623888>
- Bradley, D. (2008). Dealing with a data dilemma. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(8),

632–633. <https://doi.org/10.1038/nrd2649>

- Brindle, J. T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J. K., Bethell, H. W. L., Grainger, D. J. (2002). Erratum: Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nature Medicine*, 8(12), 1439–1445. <https://doi.org/10.1038/nm1202-802>
- Brindle, J. T., Nicholson, J. K., Schofield, P. M., Grainger, D. J., & Holmes, E. (2003). Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *The Analyst*, 128(1), 32–36. <https://doi.org/10.1039/b209155k>
- Brown, M., Dunn, W. B., Ellis, D. I., Goodacre, R., Handl, J., Knowles, J. D., Kell, D. B. (2005, March). A metabolome pipeline: From concept to data to knowledge. *Metabolomics*. <https://doi.org/10.1007/s11306-005-1106-4>
- Bruce, S. J., Tavazzi, I., Parisod, V., Rezzi, S., Kochhar, S., & Guy, P. A. (2009). Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(9), 3285–3296. <https://doi.org/10.1021/ac8024569>
- Buchholz, A., Buchholz, A., Hurlebaus, J., Hurlebaus, J., Wandrey, C., Wandrey, C., ... Takors, R. (2002). Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomolecular Engineering*, 19(1), 5–15.
- Buchholz, A., Takors, R., & Wandrey, C. (2001). Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Analytical Biochemistry*, 295(2), 129–137. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5183>
- Cakmak, A., & Ozsoyoglu, G. (2007). Mining biological networks for unknown pathways.

- Bioinformatics*, 23(20), 2775–2783. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm409>
- Canelas, A. B., Ten Pierick, A., Ras, C., Seifar, R. M., Van Dam, J. C., Van Gulik, W. M., & Heijnen, J. J. (2009). Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Analytical Chemistry*, 81(17), 7379–7389. <https://doi.org/10.1021/ac900999t>
- Caspi, R. (2006). MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D511–D516. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj128>
- Caspi, R., & Karp, P. D. (2007). Using the MetaCyc Pathway Database and the BioCyc Database Collection. In *Current Protocols in Bioinformatics* (Vol. Chapter 1, p. Unit1.17). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0117s20>
- Castrillo, J. I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., & Oliver, S. G. (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*, 62(6), 929–937. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00713-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00713-6)
- Chace, D. H. (2001). Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Chemical Reviews*, 101(412), 445–478. <https://doi.org/10.1021/cr990077+>
- Chen, T., Xie, G., Wang, X., Fan, J., Qiu, Y., Zheng, X., Jia, W. (2011). Serum and Urine Metabolite Profiling Reveals Potential Biomarkers of Human Hepatocellular Carcinoma. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(7), M110.004945. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004945>
- Chen, X., Xu, F., Wang, Y., Pan, Y., Lu, D., Wang, P., Zhang, W. (2007). A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. *Cancer*, 110(4), 835–844. <https://doi.org/10.1002/cncr.22844>
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Udvardi, M.

- K. (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant Journal*, 39(4), 487–512.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x>
- Connor, S. C., Hansen, M. K., Corner, A., Smith, R. F., & Ryan, T. E. (2010). Integration of metabolomics and transcriptomics data to aid biomarker discovery in type 2 diabetes. *Molecular BioSystems*, 6(5), 909–921. <https://doi.org/10.1039/b914182k>
- Correig, X. (2009). An Introduction to Metabolomics. Retrieved from
<http://www.iispv.cat/recerca/research-groups/13/plataforma-metabolomica>
- Cotter, D., Maer, A., Guda, C., Saunders, B., & Subramaniam, S. (2006). LMPD: LIPID MAPS proteome database. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), D507-10.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkj122>
- Cottingham, K. (2008). HUSERMET researchers look to the metabolome for answers. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/pr800626d>
- Cui, Q., Lewis, I. A., Hegeman, A. D., Anderson, M. E., Li, J., Schulte, C. F., Markley, J. L. (2008). Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database [3]. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt0208-162>
- Darghouth, D., Koehl, B., Madalinski, G., Heilier, J. F., Bovee, P., Xu, Y., Roméo, P. H. (2011). Pathophysiology of sickle cell disease is mirrored by the red blood cell metabolome. *Blood*, 117(6), e57–e66. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-299636>
- Daykin, C. A., Foxall, P. J. D., Connor, S. C., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2002). The comparison of plasma deproteinization methods for the detection of low-molecular-weight metabolites by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 304(2), 220–230. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5637>
- Deckwer, W. D., Jahn, D., Hempel, D., & Zeng, A. P. (2006). Systems biology approaches

to bioprocess development. *Engineering in Life Sciences*.

<https://doi.org/10.1002/elsc.200620153>

Denery, J. R., Nunes, A. A. K., & Dickerson, T. J. (2011). Characterization of differences between blood sample matrices in untargeted metabolomics. *Analytical Chemistry*, 83(3), 1040–1047. <https://doi.org/10.1021/ac102806p>

Deng, C., Li, N., & Zhang, X. (2004). Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 813(1–2), 47–52.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.007>

Denkert, C., Budczies, J., Kind, T., Weichert, W., Tablack, P., Sehouli, J., Fiehn, O. (2006). Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Research*, 66(22), 10795–10804. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0755>

Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51–78.

<https://doi.org/10.1002/mas.20108>

Deventer, K., Pozo, O. J., Van Eenoo, P., & Delbeke, F. T. (2009). Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison between liquid-liquid extraction and direct injection. *Journal of Chromatography A*, 1216(31), 5819–5827. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.003>

Dunkley, T., Coon, K. D., & Stephan, D. A. (2005). Discovery and development of biomarkers of neurological disease. *Drug Discovery Today*.

[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03353-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03353-7)

Engelke, U. F. H. (2004). N-Acetylated Metabolites in Urine: Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Study on Patients with Inborn Errors of Metabolism.

Clinical Chemistry, 50(1), 58–66. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.020214>

Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., & Subramaniam, S. (2007). LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), W606–W612.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkm324>

Fang, F., He, X., Deng, H., Chen, Q., Lu, J., Spraul, M., & Yu, Y. (2007). Discrimination of metabolic profiles of pancreatic cancer from chronic pancreatitis by high-resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance and principal components analysis. *Cancer Science*, 98(11), 1678–1682. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00589.x>

Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*.

<https://doi.org/10.1002/cfg.82>

Fiehn, O. (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), 155–171. <https://doi.org/082/11>

Fiehn, O., Kristal, B., Ommen, B. Van, Sumner, L. W., Sansone, S.-A., Taylor, C., Kaddurah-Daouk, R. (2006). Establishing Reporting Standards for Metabolomic and Metabonomic Studies: A Call for Participation. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 10(2), 158–163. <https://doi.org/10.1089/omi.2006.10.158>

Fiehn, O., Robertson, D., Griffin, J., van der Werf, M., Nikolau, B., Morrison, N., Sansone, S. A. (2007). The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 175–178. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>

- Gika, H. G., Theodoridis, G. A., & Wilson, I. D. (2008). Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine. Sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *Journal of Chromatography A*, *1189*(1–2), 314–322.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.066>
- Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Wingate, J. E., & Wilson, I. D. (2007). Within-day reproducibility of an HPLC-MS-based method for metabonomic analysis: Application to human urine. *Journal of Proteome Research*, *6*(8), 3291–3303.
<https://doi.org/10.1021/pr070183p>
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Fernández-Alba, A. R., & Molina-Díaz, A. (2010). Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1217*(24), 3736–3747.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.025>
- Girolamo, F., Lante, I., Muraca, M., & Putignani, L. (2013). The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Current Organic Chemistry*, *17*(23), 2891–2905.
<https://doi.org/10.2174/1385272817888131118162725>
- Go, E. P. (2010). Database Resources in Metabolomics: An Overview. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *5*(1), 18–30. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9157-3>
- Gomase, V. S., Changbhale, S. S., Patil, S. A., & Kale, K. V. (2008). Metabolomics. *Current Drug Metabolism*, *9*(1), 89–98.
- Gonzalez, B., François, J., & Renaud, M. (1997). A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast*, *13*(14), 1347–1356. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199711\)13:14<1347::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199711)13:14<1347::AID-)

YEA176>3.0.CO;2-O

- Gowda, G. A. N., Somashekar, B. S., Ijare, O. B., Sharma, A., Kapoor, V. K., & Khetrapal, C. L. (2006). One-step analysis of major bile components in human bile using ^1H NMR spectroscopy. *Lipids*, *41*(6), 577–589. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5007-8>
- Gowda, G. N., Zhang, S., Gu, H., Asiago, V., Shanaiah, N., & Raftery, D. (2008). Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *8*(5), 617–633. <https://doi.org/10.1586/14737159.8.5.617>
- Griffin, J. L., & Kauppinen, R. A. (2007, March). A metabolomics perspective of human brain tumours. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05676.x>
- Gullberg, J., Jonsson, P., Nordström, A., Sjöström, M., & Moritz, T. (2004). Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, *331*(2), 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.037>
- Hampel, H., Lista, S., & Khachaturian, Z. S. (2012). Development of biomarkers to chart all Alzheimer's disease stages: The royal road to cutting the therapeutic Gordian Knot. *Alzheimer's and Dementia*. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.2116>
- Harada, K., Fukusaki, E., & Kobayashi, A. (2006). Pressure-assisted capillary electrophoresis mass spectrometry using combination of polarity reversion and electroosmotic flow for metabolomics anion analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(5), 403–409. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.403>
- Harada, K., Ohyama, Y., Tabushi, T., Kobayashi, A., & Fukusaki, E. (2008). Quantitative analysis of anionic metabolites for *Catharanthus roseus* by capillary electrophoresis

using sulfonated capillary coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(3), 249–260.

<https://doi.org/10.1263/jbb.105.249>

Harrigan, G. G., & Goodacre, R. (2003). *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0333-0>

Harrigan, G. G., LaPlante, R. H., Cosma, G. N., Cockerell, G., Goodacre, R., Maddox, J. F., Roth, R. A. (2004). Application of high-throughput Fourier-transform infrared spectroscopy in toxicology studies: Contribution to a study on the development of an animal model for idiosyncratic toxicity. *Toxicology Letters*, 146(3), 197–205.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.09.011>

Hjertén, S. (1958). Free zone electrophoresis. Preliminary note. *Arkiv for Kemi*, 13(2), 151–152.

Horai, H., Arita, M., & Nishioka, T. (2008). Comparison of ESI-MS Spectra in MassBank Database. In *2008 International Conference on BioMedical Engineering and Informatics* (Vol. 2, pp. 853–857). <https://doi.org/10.1109/BMEI.2008.339>

Idborg, H., Edlund, P.-O., & Jacobsson, S. P. (2004). Multivariate approaches for efficient detection of potential metabolites from liquid chromatography/mass spectrometry data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(9), 944–954.

<https://doi.org/10.1002/rcm.1432>

Ikonoraou, M. G., Blades, A. T., & Kebarle, P. (1990). Investigations of the Electrospray Interface for Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 62(9), 957–967. <https://doi.org/10.1021/ac00208a012>

- Izumi, Y., Okazawa, A., Bamba, T., Kobayashi, A., & Fukusaki, E. (2009). Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *648*(2), 215–225.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.001>
- Jenkins, H., Hardy, N., Beckmann, M., Draper, J., Smith, A. R., Taylor, J., Kell, D. B. (2004). A proposed framework for the description of plant metabolomics experiments and their results. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1041>
- Jiye, A., Trygg, J., Gullberg, J., Johansson, A. I., Jonsson, P., Antti, H., Moritz, T. (2005). Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Analytical Chemistry*, *77*(24), 8086–8094. <https://doi.org/10.1021/ac051211v>
- Jones, P. M., & Bennett, M. J. (2002). The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, *324*(1–2), 121–128. <https://doi.org/S0009898102002383> [pii]
- Jonsson, P., Gullberg, J., Nordström, A., Kusano, M., Kowalczyk, M., Sjöström, M., & Moritz, T. (2004). A Strategy for Identifying Differences in Large Series of Metabolomic Samples Analyzed by GC/MS. *Analytical Chemistry*, *76*(6), 1738–1745.
<https://doi.org/10.1021/ac0352427>
- Joshi-Tope, G., Gillespie, M., Vastrik, I., D'Amico, Eustachio, P., Schmidt, E., de Bono, B., Stein, L. (2005). Reactome: A knowledgebase of biological pathways. *Nucleic Acids Research*, *33*(DATABASE ISS.), D428–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gki072>
- Kaddurah-Daouk, R., McEvoy, J., Baillie, R., Zhu, H., K. Yao, J., Nimgaonkar, V. L., Nasrallah, H. A. (2012). Impaired plasmalogens in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, *198*(3), 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.02.019>

- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M. (2002). The KEGG Database. In G. Bock & J. A. Goode (Eds.), *Novartis Foundation Symposia* (Vol. 247, pp. 91–103). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470857897.ch8>
- Kanehisa, M. (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 32(90001), 277D–280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh063>
- Karp, P. D. (2002). The MetaCyc Database. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 59–61. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.59>
- Karp, P. D., Krummenacker, M., Paley, S., & Wagg, J. (1999). Integrated pathway–genome databases and their role in drug discovery. *Trends in Biotechnology*, 17(7), 275–281. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01316-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01316-5)
- Karp, P. D., Ouzounis, C. A., Moore-Kochlacs, C., Goldovsky, L., Kaipa, P., Ahrén, D., ... López-Bigas, N. (2005). Expansion of the Biocyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(19), 6083–6089. <https://doi.org/10.1093/nar/gki892>
- Katajamaa, M., & Orešič, M. (2007). Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.021>
- Kim, Y. S., Maruvada, P., & Milner, J. A. (2008). Metabolomics in biomarker discovery: Future uses for cancer prevention. *Future Oncology*. <https://doi.org/10.2217/14796694.4.1.93>
- Kind, T., Tolstikov, V., Fiehn, O., & Weiss, R. H. (2007). A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Analytical Biochemistry*,

363(2), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.028>

Kirschenlohr, H. L., Griffin, J. L., Clarke, S. C., Rhydwen, R., Grace, A. A., Schofield, P. M., Metcalfe, J. C. (2006). Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nature Medicine*, 12(6), 705–710.
<https://doi.org/10.1038/nm1432>

Kline, E. E., Treat, E. G., Aversa, T. A., Davis, M. S., Smith, A. Y., & Sillerud, L. O. (2006). Citrate Concentrations in Human Seminal Fluid and Expressed Prostatic Fluid Determined via ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Outperform Prostate Specific Antigen in Prostate Cancer Detection. *Journal of Urology*, 176(5), 2274–2279. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.07.054>

Koek, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Tas, A. C., & Hankemeier, T. (2011). Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives. *Metabolomics*. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0254-3>

Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., ... Steinhauser, D. (2005). GMD@CSB.DB: The Golm metabolome database. *Bioinformatics*, 21(8), 1635–1638. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti236>

Kouremenos, K. A., Harynuk, J. J., Winniford, W. L., Morrison, P. D., & Marriott, P. J. (2010). One-pot microwave derivatization of target compounds relevant to metabolomics with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(21), 1761–1770. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.036>

Krieger, C. J., Krieger, C. J., Zhang, P., Zhang, P., Mueller, L. a, Mueller, L. a, Karp, P. D. (2004). MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 32(90001), 438–442. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh100>

- Krummenacker, M., Paley, S., Mueller, L., Yan, T., & Karp, P. D. (2005). Querying and computing with BioCyc databases. *Bioinformatics*, *21*(16), 3454–3455.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti546>
- Kuller, L., Arnold, A., Tracy, R., Otvos, J., Burke, G., Psaty, B., Kronmal, R. (2002). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *22*(7), 1175–1180. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000022015.97341.3A>
- Lämmerhofer, M., & Weckwerth, W. (Eds.). (2013). *Metabolomics in Practice Successful Strategies to Generate and .pdf*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Lauridsen, M., Hansen, S. H., Jaroszewski, J. W., & Cornett, C. (2007). Human urine as test material in ¹H NMR-based metabolomics: Recommendations for sample preparation and storage. *Analytical Chemistry*, *79*(3), 1181–1186.
<https://doi.org/10.1021/ac061354x>
- Lee, A. L., Bartle, K. D., & Lewis, A. C. (2001). A model of peak amplitude enhancement in orthogonal two-dimensional gas chromatography. *Analytical Chemistry*, *73*(6), 1330–1335. <https://doi.org/10.1021/ac001120s>
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Holmes, E. (2011). *The Handbook of Metabolomics and Metabolomics--John C. Lindon--Elsevier.pdf*.part. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52841-4.50022-9>
- Liu, M., Mao, X. A., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K., & Lindon, J. C. (1998). Improved Watergate Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, *132*(1), 125–129. <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1405>
- Luo, B., Groenke, K., Takors, R., Wandrey, C., & Oldiges, M. (2007). Simultaneous

determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry.

Journal of Chromatography A, 1147(2), 153–164.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.034>

Lyng, H., Sitter, B., Bathen, T. F., Jensen, L. R., Sundfør, K., Kristensen, G. B., & Gribbestad, I. S. (2007). Metabolic mapping by use of high-resolution magic angle spinning ^1H MR spectroscopy for assessment of apoptosis in cervical carcinomas.

BMC Cancer, 7, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-11>

Martínez-Bisbal, M. C., Martí-Bonmatí, L., Piquer, J., Revert, A., Ferrer, P., Llácer, J. L., Celda, B. (2004). ^1H and ^{13}C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy sample *ex vivo* and *in vivo* ^1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in Biomedicine*, 17(4),

191–205. <https://doi.org/10.1002/nbm.888>

Matthews, L., Gopinath, G., Gillespie, M., Caudy, M., Croft, D., de Bono, B., D'eustachio, P. (2009). Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes.

Nucleic Acids Research, 37(SUPPL. 1), D619–D622.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkn863>

Mendes, P. (2002). Emerging bioinformatics for the metabolome. *Briefings in*

Bioinformatics, 3(2), 134–145. <https://doi.org/10.1093/bib/3.2.134>

Meyer, H., Liebeke, M., & Lalk, M. (2010). A protocol for the investigation of the

intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome. *Analytical Biochemistry*, 401(2),

250–259. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.003>

Mikesh, L., & Bruns, D. (2008). Stabilization of glucose in blood specimens: Mechanism of delay in fluorid inhibition of glycolysis. *Clin Chem*, 54(5), 930–932.

<https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.102160>

- Mills, G. A., & Walker, V. (2001). Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: Application to metabolic investigations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(2), 259–268.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00554-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00554-5)
- Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. (S. Mitra, Ed.), *Methodology*. Hoboken, N.J: J. Wiley. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2011.09.024>
- Mochel, F., Sedel, F., Vanderver, A., Engelke, U. F. H., Barritault, J., Yang, B. Z., Wevers, R. A. (2009). Cerebellar ataxia with elevated cerebrospinal free sialic acid (CAFSA). *Brain*, 132(3), 801–809. <https://doi.org/10.1093/brain/awn355>
- Moco, S., Vervoort, J., Moco, S., Bino, R. J., De Vos, R. C. H., & Bino, R. (2007). Metabolomics technologies and metabolite identification. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(9), 855–866. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.08.003>
- Moka, D., Vorreuther, R., Schicha, H., Spraul, M., & Lindon, J. C. (1998). Biochemical classification of kidney carcinoma biopsy samples using magic-angle-spinning 1 H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17(1), 125–132.
- Nobeli, I., & Thornton, J. M. (2006, May). A bioinformatician's view of the metabolome. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.20414>
- Oberbach, A., Blüher, M., Wirth, H., Till, H., Kovacs, P., Kullnick, Y., ... Bergen, M. von. (2011). Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *Journal of Proteome Research*, 10(10), 4769–4788.
<https://doi.org/10.1021/pr2005555>
- Odunsi, K., Wollman, R. M., Ambrosone, C. B., Hutson, A., McCann, S. E., Tammela, J.,

- Alderfer, J. L. (2005). Detection of epithelial ovarian cancer using ^1H -NMR-based metabonomics. *International Journal of Cancer*, *113*(5), 782–788.
<https://doi.org/10.1002/ijc.20651>
- Otvos, J., Jeyarajah, E., & Bennett, D. (1991). Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Chemistry*, *37*(3), 377–386.
- Pan, Z., Gu, H., Talaty, N., Chen, H., Shanaiah, N., Hainline, B. E., ... Raftery, D. (2007). Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *387*(2), 539–549. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0546-7>
- Papin, J. A., Price, N. D., Wiback, S. J., Fell, D. A., & Palsson, B. O. (2003, May). Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends in Biochemical Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00064-1)
- Parvy, P., Bardet, J., Rabier, D., Bonnefont, J. P., & Kamoun, P. (1989). A new pitfall in plasma amino acid analysis. *Clinical Chemistry*, *35*(1), 178.
- Peterhansel, C., Niessen, M., & Kebeish, R. M. (2008). Metabolic engineering towards the enhancement of photosynthesis. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 84, pp. 1317–1323). <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00427.x>
- Phillips, M., Cataneo, R. N., Ann, B., Fisher, P., Greenberg, J., Gunawardena, R., ... Wong, C. (2003). Breath Test for Bca Volatile Markers of Breast Cancer in the Breath Test for Bca. *The Breast Journal*, *9*(3), 184–191.
- Pinazo-Durán, M. D. (2012). Genética y algo más. *Archivos de La Sociedad Espanola de Oftalmologia*, *87*(2), 35–37. <https://doi.org/10.1016/j.ofthal.2012.01.001>
- Piotto, M., Saudek, V., & Sklenář, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of Biomolecular NMR*,

2(6), 661–665. <https://doi.org/10.1007/BF02192855>

Plumb, R. S., Stumpf, C. L., Granger, J. H., Castro-Perez, J., Haselden, J. N., & Dear, G. J. (2003). Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids. In *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (Vol. 17, pp. 2632–2638). <https://doi.org/10.1002/rcm.1250>

Poli, D., Carbognani, P., Corradi, M., Goldoni, M., Acampa, O., Balbi, B., ... Mutti, A. (2005). Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: Cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respiratory Research*, 6, 71. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-71>

Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., & Kobayashi, A. (2007). Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 231–236. <https://doi.org/10.1021/jf062330u>

Prasad Maharjan, R., & Ferenci, T. (2003). Global metabolite analysis: The influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 313(1), 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00536-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00536-5)

Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., ... Wishart, D. S. (2011). The human serum metabolome. *PLoS ONE*, 6(2), e16957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957>

Rezzi, S., Ramadan, Z., Fay, L. B., & Kochhar, S. (2007, February). Nutritional metabonomics: Applications and perspectives. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/pr060522z>

Righi, V., Mucci, A., Schenetti, L., Tosi, M. R., Grigioni, W. F., Corti, B., ... Tugnoli, V.

- (2007). Ex vivo HR-MAS magnetic resonance spectroscopy of normal and malignant human renal tissues. *Anticancer Research*, 27(5 A), 3195–3204.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Journal*, 23(1), 131–142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00774.x>
- Romero, P., Wagg, J., Green, M. L., Kaiser, D., Krummenacker, M., & Karp, P. D. (2005). Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biology*, 6(1), R2. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-r2>
- Ruijter, G. J. G., & Visser, J. (1996). Determination of intermediary metabolites in *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiological Methods*, 25(3), 295–302. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00104-2](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00104-2)
- Ryan, D., & Robards, K. (2006, December). Metabolomics: The greatest omics of them all? *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac0614341>
- Sampey, B. P., Freerman, A. J., Zhang, J., Kuan, P. F., Galanko, J. A., O'Connell, T. M., ... Makowski, L. (2012). Metabolomic profiling reveals mitochondrial-derived lipid biomarkers that drive obesity-associated inflammation. *PLoS ONE*, 7(6), e38812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038812>
- Sansone, S.-A., Fan, T., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hardy, N. W., Kaddurah-Daouk, R., ... Fiehn, O. (2007). The Metabolomics Standards Initiative. *Nature Biotechnology*, 25(8), 846–848. <https://doi.org/10.1038/nbt0807-846b>
- Saude, E. J., & Sykes, B. D. (2007). Urine stability for metabolomic studies: Effects of preparation and storage. *Metabolomics*, 3(1), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0042-2>

- Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., ... Ye, J. (2009). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), D5–D15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn741>
- Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., ... Kopka, J. (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters*, 579(6), 1332–1337. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.029>
- Schlotterbeck, G., Ross, A., Dieterle, F., & Senn, H. (2006, October). Metabolic profiling technologies for biomarker discovery in biomedicine and drug development. *Pharmacogenomics*. <https://doi.org/10.2217/14622416.7.7.1055>
- Schmidt, C. W. (2004). Metabolomics: What's happening downstream of DNA. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/082>
- Serkova, N. J., Gamito, E. J., Jones, R. H., O'Donnell, C., Brown, J. L., Green, S., ... Crawford, E. D. (2008). The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Prostate*, 68(6), 620–628. <https://doi.org/10.1002/pros.20727>
- Shah, S. H., Kraus, W. E., & Newgard, C. B. (2012). Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases form and function. *Circulation*, 126(9), 1110–1120. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060368>
- Shintu, L., Baudoin, R., Navratil, V., Prot, J. M., Pontoizeau, C., Defernez, M., ... Dumas, M. E. (2012). Metabolomics-on-a-chip and predictive systems toxicology in microfluidic bioartificial organs. *Analytical Chemistry*, 84(4), 1840–1848. <https://doi.org/10.1021/ac2011075>

- Simonsen, K. W., Hermansson, S., Steentoft, A., & Linnet, K. (2010). A validated method for simultaneous screening and quantification of twenty-three benzodiazepines and metabolites plus zopiclone and zaleplone in whole blood by liquid-liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, *34*(6), 332–341. <https://doi.org/10.1093/jat/34.6.332>
- Simonsen, K. W., Steentoft, A., Buck, M., Hansen, L., & Linnet, K. (2010). Screening and quantitative determination of twelve acidic and neutral pharmaceuticals in whole blood by liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, *34*(7), 367–373. <https://doi.org/10.1093/jat/34.7.367>
- Simpson, A. J., & Brown, S. A. (2005). Purge NMR: Effective and easy solvent suppression. *Journal of Magnetic Resonance*, *175*(2), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.05.008>
- Sitter, B., Bathen, T., Hagen, Birn, Arentz, C., Skjeldestad, F. E., & Gribbestad, I. S. (2004). Cervical cancer tissue characterized by high-resolution magic angle spinning MR spectroscopy. *MAGMA Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, *16*(4), 174–181. <https://doi.org/10.1007/s10334-003-0025-5>
- Sitter, B., Lundgren, S., Bathen, T. F., Halgunset, J., Fjosne, H. E., & Gribbestad, I. S. (2006). Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR in Biomedicine*, *19*(1), 30–40. <https://doi.org/10.1002/nbm.992>
- Smallcombe, S. H., Patt, S. L., & Keifer, P. A. (1995). WET Solvent Suppression and Its Applications to LC NMR and High-Resolution NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, *117*(2), 295–303. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.0759>

- Smith, C. A., O'Maille, G., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., ...
Siuzdak, G. (2005). METLIN: A metabolite mass spectral database. In *Therapeutic Drug Monitoring* (Vol. 27, pp. 747–751).
<https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39>
- Soga, T., & Heiger, D. N. (2000). Amino Acid Analysis by Capillary Electrophoresis Electro spray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1236–1241.
<https://doi.org/10.1021/ac990976y>
- Soga, T., Igarashi, K., Ito, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H. P., & Tomita, M. (2009). Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(15), 6165–6174.
<https://doi.org/10.1021/ac900675k>
- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., & Nishioka, T. (2003). Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2(5), 488–494.
<https://doi.org/10.1021/pr034020m>
- Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., & Nishioka, T. (2002). Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electro spray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(10), 2233–2239. <https://doi.org/10.1021/ac020064n>
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Subramaniam, S. (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), D527–D532. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>
- Sugimoto, M., Wong, D. T., Hirayama, A., Soga, T., & Tomita, M. (2010). Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast

and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*, 6(1), 78–95.

<https://doi.org/10.1007/s11306-009-0178-y>

Suhre, K., Meisinger, C., Döring, A., Altmaier, E., Belcredi, P., Gieger, C., Illig, T. (2010).

Metabolic footprint of diabetes: A multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS ONE*, 5(11), e13953.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013953>

Swanson, M. G., Zektzer, A. S., Tabatabai, Z. L., Simko, J., Jarso, S., Keshari, K. R.,

Kurhanewicz, J. (2006). Quantitative analysis of prostate metabolites using ¹H HR-MAS spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 55(6), 1257–1264.

<https://doi.org/10.1002/mrm.20909>

Tate, A. R., Foxall, P. J. D., Holmes, E., & Moka, D. (2000). Distinction between normal

and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of ¹H magic angle spinning (MAS) NMR spectra. *NMR in ...*, 13(2), 64–71. Retrieved

from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1492(200004)13:2%3C64::AID-NBM612%3E3.0.CO%5Cnhttp://2-)

[1492\(200004\)13:2%3C64::AID-NBM612%3E3.0.CO%5Cnhttp://2-](http://2-1492(200004)13:2%3C64::AID-NBM612%3E3.0.CO%5Cnhttp://2-)

[x/pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/70DAE2AE-B5DE-424B-9398-](http://2-1492(200004)13:2%3C64::AID-NBM612%3E3.0.CO%5Cnhttp://2-x/pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/70DAE2AE-B5DE-424B-9398-665E4D80475D)

[665E4D80475D](http://2-1492(200004)13:2%3C64::AID-NBM612%3E3.0.CO%5Cnhttp://2-x/pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/70DAE2AE-B5DE-424B-9398-665E4D80475D)

Teahan, O., Gamble, S., Holmes, E., Waxman, J., Nicholson, J. K., Bevan, C., & Keun, H.

C. (2006). Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma. *Analytical Chemistry*, 78(13), 4307–4318.

<https://doi.org/10.1021/ac051972y>

Tiziani, S., Emwas, A. H., Lodi, A., Ludwig, C., Bunce, C. M., Viant, M. R., & Günther,

U. L. (2008). Optimized metabolite extraction from blood serum for ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 377(1), 16–23.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.01.037>

- Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2011). GC/MS based metabolomics: Development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-131>
- Tzika, A. A., Cheng, L. L., Goumnerova, L., Madsen, J. R., Zurakowski, D., Astrakas, L. G., ... Black, P. M. (2002). Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neurosurgery*, *96*(6), 1023–1031. <https://doi.org/10.3171/jns.2002.96.6.1023>
- Varma, V. R., Oommen, A. M., Varma, S., Casanova, R., An, Y., Andrews, R. M., ... Thambisetty, M. (2018). Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. *PLOS Medicine*, *15*(1), e1002482. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002482>
- Viant, M. R. (2003). Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *310*(3), 943–948. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.092>
- Vigneau-Callahan, K. E., Shestopalov, A. I., Milbury, P. E., Matson, W. R., & Kristal, B. S. (2001). Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: analytical and biological variability issues in rats. *J Nutr*, *131*(3), 924S–932S. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11238787%5Cnhttp://jn.nutrition.org/cgi/reprint/131/3/924S.pdf
- Villas-Bôas, S. G., & Gombert, A. K. (2006). Análise do Metaboloma. *Bioteχνologia Ciência e Desenvolvimento*, *36*, 59–69.
- Vuckovic, D. (2012, June). Current trends and challenges in sample preparation for global

- metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6039-y>
- Waldhler, M. C., Almstetter, M. F., Nürnberger, N., Gruber, M. A., Dettmer, K., & Oefner, P. J. (2011). Improved enantiomer resolution and quantification of free d-amino acids in serum and urine by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4537–4544. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.039>
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Hazen, S. L. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472(7341), 57–65. <https://doi.org/10.1038/nature09922>
- Want, E. J., Wilson, I. D., Gika, H., Theodoridis, G., Plumb, R. S., Shockcor, J., ... Nicholson, J. K. (2010). Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nature Protocols*, 5(6), 1005–1018. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.50>
- Watkins, S. M., & German, J. B. (2002, October). Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition. *Current Opinion in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00363-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00363-4)
- Weckwerth, W. (2003). Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 669–689. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135014>
- Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., & Fenn, J. B. (1985). Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Analytical Chemistry*, 57(3), 675–679. <https://doi.org/10.1021/ac00280a023>
- Williams, R. E., Major, H., Lock, E. A., Lenz, E. M., & Wilson, I. D. (2005). D-Serine-induced nephrotoxicity: A HPLC-TOF/MS-based metabonomics approach. *Toxicology*, 207(2), 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.08.023>

- Wishart, D. S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.001>
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Forsythe, I. (2009). HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_1), D603–D610. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn810>
- Wishart, D. S., Lewis, M. J., Morrissey, J. A., Flegel, M. D., Jeroncic, K., Xiong, Y., Li, L. (2008). The human cerebrospinal fluid metabolome. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 871(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.05.001>
- Wittig, U., & De Beuckelaer, A. (2001). Analysis and comparison of metabolic pathway databases. *Briefings in Bioinformatics*, 2(2), 126–142. <https://doi.org/10.1093/bib/2.2.126>
- Wittmann, C., Kiefer, P., & Zelder, O. (2004). Metabolic Fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during Lysine Production with Sucrose as Carbon Source. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7277–7287. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7277-7287.2004>
- Wu, H., Zhang, J., Norem, K., & El-Shourbagy, T. A. (2008). Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(4), 1243–1248. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.002>
- Yang, C., Richardson, A. D., Smith, J. W., & Osterman, A. (2007). Comparative metabolomics of breast cancer. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific*

Symposium on Biocomputing, 192, 181–192.

https://doi.org/10.1142/9789812772435_0018

Yang, Y., Li, C., Nie, X., Feng, X., Chen, W., Yue, Y., Deng, F. (2007). Metabonomic

Studies of Human Hepatocellular Carcinoma Using High-Resolution Magic-Angle
Spinning ^1H NMR Spectroscopy in Conjunction with Multivariate Data Analysis.

Journal of Proteome Research, 6(7), 2605–2614. <https://doi.org/10.1021/pr070063h>

Yoshida, H., Mizukoshi, T., Hirayama, K., & Miyano, H. (2007). Comprehensive analytical

method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid
chromatography and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

55(3), 551–560. <https://doi.org/10.1021/jf061955p>

Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., Belcredi, P., Möller, G., Prehn, C., Wang-Sattler, R.

(2011). Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS ONE*,

6(7), e21230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021230>